h131en

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

43

1992

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

序

平成４年度の研究年報をお届けします．

四季の移ろいと歳事が生活の，会計年度が行政の，それぞれ節目であるように，年報の発行はわが研究所の主な事業分野のひとつである研究活動にとって，重要な節目の役を果たしてきました．多くの報文を寄せられた研究者のみなさんと，多忙な通常業務の寸暇を割いてこの価値ある刊行物を維持してこられた歴代の編集関係者の労を多としたいと思います．

衛生研究所の研究活動については，いままでもなにかと議論が絶えませんでした．それは純然たる学術研究機関の研究を基準にして研究のあり方や成果を測るという風習に根差しているようです．ですが，ことの本質に立ち戻って考えれば，職業として，あるいは職務としての研究とは，知識の生産活動にほかなりません．用途に応じて生産物の特性が変わるのは当然のことで，知識の価値を学術性という単一の物差しで測ろうとするのは，本来，多彩で豊かな応用範囲を持つはずの知識の使いみちを，ことさらに狭く，痩せこけたものにしてしまうことにはならないでしょうか．ですから，行政研究機関の研究成果には，それに適した評価の尺度と利用形態があってしかるべきだと思うのです．もちろん，その生産物が学術的に高く評価されて悪い理由は毛頭ありません．

こうした研究をさしあたり行政研究と呼ぶことにすれば，それは行政的な，また社会的な利用価値の高い知識の生産を主な目的とする研究活動ということになります．知識生産のこの領域はまだ成熟にはほど遠い状況です．しかし学術的知識に対する行政の間接需要は増えこそすれ，決して減ることはないでしょう．それは“科学的な行政”の呼び声が高いことからも察せられます．その種の需要も含めてひろく行政の知識需要に応えられるように体制を整えてゆくのが，衛生研究所をも含めて，今後の行政研究機関に課せられた大きな責務であろうかと考えます．

各位のご理解とご支援を切望する次第です．

平成４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

Vero 毒素産生性大腸菌 OUT：H19によると推定された集団下痢症の疫学的・細菌学的検討成績
……甲斐　明美，尾畑　浩魅，楠　　淳，高橋　正樹，新垣　正夫
柳川　義勢，山田　澄夫，太田　建爾，工藤　泰雄，木村　靖彦
山本　　裕，土屋　伸久，渡辺　恵次，舟越　幸子，長谷川恵一
田村　延一，吉田　好文，福田　博保，富樫　哲也…… 1

東京都内のインフルエンザ検索成績（1991年11月～1992年２月）
……山崎　　清，伊藤　忠彦，林　　志直，太田　建爾…… 8

東京都における HIV 抗体検査（1987年２月～1992年３月）
……関根　大正，貞升　健志，大貫奈穂美，寺山　　武，太田　建爾，三木　　隆…… 12

Nested-PCR 法によるヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-I）ゲノムの検出
……貞升　健志，大貫奈穂美，伊藤　忠彦，関根　大正，太田　建爾
寺山　　武，三木　　隆，柳田　昌彦…… 17

1991年世界エイズデーに東京都で実施された無料街頭検診におけるエイズ及び性感染症の血清学的調査
……貞升　健志，大貫奈穂美，吉田　靖子，矢野　一好，新開　敬行
関根　大正，太田　建爾，堀　　幹郎，石上　　武，寺山　　武
三木　　隆，本保　善樹，前田　秀雄，中村　清純，石井　明子…… 23

1984年から1991年までの８年間における売春容疑者のリン菌保有率と分離菌株の保有プラスミドおよび薬剤感受性
……石上　　武，堀　　幹郎，長　　昭…… 27

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第６報）
Anisakis Ⅰ型幼虫の運動性および生存期間におよぼす漢方薬
（十全大補湯，六味丸，柴胡桂枝乾姜湯，四物湯，帰耆建中湯，人参養栄湯）および生薬の影響
……村田以和夫，安田　一郎…… 33

漢方製剤十全大補湯エキス顆粒剤及び原料生薬の理化学的品質評価
……安田ノ一郎，高橋奈穂子，浜野　朋子，瀬戸　隆子，高野伊知郎
渡辺四男也，秋山　和幸，末次　大作，新江　　徹，森　　由子
清水　虎雄，山川　洋平…… 39

紫雲膏の Epstein-Barr Virus 活性化抑制効果の発現について
……浜野　朋子，安田　一郎，渡辺四男也，木島　孝夫，徳田　春邦…… 46

キャピラリーガスクロマトグラフィーによる山薬中アラントインの *tert*-Butyldimethylsilyl 化体の定量
……萩原　輝彦，渡辺四男也…… 51

東京都におけるめっき廃水中のシアンについて
（1970年度-1990年度）
……岩崎由美子，奥本千代美，渡辺四男也…… 56

可視部吸収検出器を用いた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タール色素の分析
……伊藤　弘一，岸本　清子，鈴木　助治，中村　　弘…… 59

高速液体クロマトグラフィーによる殺そ剤中のワルファリン及びワルファリンカリウムの分析
……佐藤　憲一，雨宮　　敬，鈴木　助治，中村　　弘…… 66

腸線縫合糸の元素含有量
……江波戸擧秀，中村　　弘…… 70

保存期間と温度が血液塗抹標本の染色におよぼす影響
……大石　向江，小林　千種，蓑輪　佳子，五味　邦英，渡辺　清明
河野　均也…… 76

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

東京湾産スズキ中の水銀含有量
……山野辺秀夫，竹内　正博，水石　和子，中村　　弘…… 79

食肉における *Listeria* 属菌の汚染実態
……小久保彌太郎，金子　誠二，飯田　　孝，丸山　　務…… 82

Listeria monocytogenes の低温増殖性に関する検討
……飯田　　孝，神崎　政子，伊藤　　武，丸山　　務…… 87

市販キットによる食肉中の残留抗菌性物質の微生物学的スクリーニング検査法の検討
……門間　千枝，神保　勝彦，伊藤　　武…… 92

標準品としての市販指定外着色料の検討
……中沢久美子，石川ふさ子，田端　節子，川合　由華，田村　行弘
二島太一郎…… 98

輸入食品中の天然色素の使用実態調査
……荻原　　勉，天川　映子，野沢　竹志，大西　和夫，加納　いつ
山岸　達典……111

食品中のβ-アポ-8'-カロチナール及びβ-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル分析法
……天川　映子，荻原　　勉，大西　和夫，加納　いつ，山岸　達典……118

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
－平成３年度－
……小林　麻紀，永山　敏廣，塩田　寛子，二島太一郎……124

輸入農産物中の残留農薬実態調査
－平成３年度－
……塩田　寛子，永山　敏廣，小林　麻紀，二島太一郎……130

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第９報）
－平成３年度－
……真木　俊夫，観　　公子，橋本　秀樹，二島太一郎……137

輸入食品中の放射能濃度（第３報）
－平成３年度－
……観　　公子，真木　俊夫，橋本　秀樹，川合　由華，二島太一郎……142

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第３報）
酵素活性の測定及び有機副剤の分析（その２）
……広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，中島　和雄，風間　成孔……149

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第４報）
製剤中の無機塩類及び不純物の分析（その２）
……安野　哲子，栗原　裕子，荻野　周三，小関　正道，風間　成孔……155

生体試料中のトコフェロール抽出に及ぼす共存脂肪酸の影響
……植田　忠彦，市川　久次，五十嵐　脩……158

アシタバ各部位のカロテン，トコフェロール，水溶性ビタミン含量およびその季節による違い
……井口　正雄，菊谷　典久，門間　公夫，笠原　利英，友松　俊夫
村上　泰城，浦野　元幸……166

健常人の血清中25-Hydroxyvitamin D_3濃度
……早藤知恵子，友松　俊夫……171

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

東京湾の環境汚染モニタリング（第10報）
平成２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……175

パソコンで推定した東京都区部の200m メッシュ別 NO_2年平均濃度
……牧野　国義……179

ディーゼル排気ガス暴露によるラット母乳成分に及ぼす影響
……大澤　誠喜，加藤　紀子，山田　達史，加納　堯子，森　憲二……187

高速液体クロマトグラフィーによる水中アシュラムの簡易スクリーニング法
－シリンジタイプミニカラムの応用－
……鈴木　俊也，近藤　治美，関山　登，矢口久美子，山岸　達典……192

都民からの苦情で持ち込まれた浴室，洗面台等に発生するスライムの細菌学的検討
……古畑　勝則，松本　淳彦……197

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

ラットを用いたブドウ球菌外毒素の単回投与毒性試験
……藤井　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道
角　千代，五十嵐英夫……205

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第５報）
クリソタイルの小腸内動態
……福森　信隆，角　千代，佐々木美枝子……209

Salmonella typhimurium TA97，TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第７報）
……藤田　博，角　千代，佐々木美枝子……219

六味丸水抽出物の *Salmonella typhimurium* に対する変異原性について
……藤田　博，角　千代，佐々木美枝子……228

放射線感受性マウス細胞における DNA 単鎖切断と修復に関するアルカリ溶出法による研究
……金西　信次，金城　康人，渡部　　真，稲葉　浩子，佐藤　弘毅……231

ブラジル産ガラナの Na, K-ATPase 活性におよぼす影響
……佐藤かな子，中村ジュリア小夜子，長井二三子，牛山　慶子……235

ファーマコキネティクスのモデリングと解析法（第1報）
微分方程式の数値解法と最小2乗法における最適化法の改良
……深野　駿一……239

ファーマコキネティクスのモデリングと解析法（第2報）
生理学的モデルの実際例と実験計画
……深野　駿一……245

著書及び他誌発表……253

学　会　発　表……263

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Epidemiological and Bacteriological Investigation of A Gastroenteritis Outbreak Associated with Verotoxin-Producing *Escherichia coli* OUT:H19 ..... A. Kai, H. Obata, J. Kusunoki, M. Takahashi, M. Shingaki, Y. Yanagawa, S. Yamada, K. Ohta, Y. Kudoh, Y. Kimura, Y. Yamamoto, N. Tuchiya, K. Watanabe, S. Hunakoshi, K. Hasegawa, N. Tamura, Y. Yoshida, H. Hukuda and T. Togashi 1

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo. (Nov. 1991–Feb. 1992) ..... K. Yamazaki, T. Ito, Y. Hayashi and K. Ohta 8

Serological Survey for Antibodies against HIV–1 in Tokyo. (Feb. 1987–Mar. 1992) ..... H. Sekine, K. Sadamasu, N. Ohnuki, T. Terayama, K. Ohta and T. Miki 12

Detection of HTLV–Ⅰ Proviral Genome by the Nested-Polymerase Chain Reaction ..... K. Sadamasu, N. Ohnuki, T. Ito, H. Sekine, K. Ohta, T. Terayama, T. Miki and M. Yanagida 17

Serological Survey for Antibodies against HIV–1 and Other Sexually Transmitting Agents in Tokyo on World AIDS Day, 1991 ..... K. Sadamasu, N. Ohnuki, Y. Yoshida, K. Yano, T. Shinkai, H. Sekine, K. Ohta, M. Hori, T. Ishigami, T. Terayama, T. Miki, Y. Honbo, H. Maeda, A. Sugaya, K. Nakamura and A. Ishii 23

Studies on Gonorrhea in Tokyo : Its Prevalence in Prostitutes and Antimicrobial Susceptibility and the Contents of Plasmid of the Isolates in 1984–1991 ..... T. Ishikami, M. Hori and A. Tyo 27

REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Effects of Chinese Medicine for Helminth. (VI). Effects on The Lifespan and Activity of *Anisakis* Type I Larvae with Several Kinds of Chinese Medicine and Crude Drugs ..... I. Murata and I. Yasuda 33

Physical and Chemical Evaluation of Granulated Kampo Extract Medicine "Juzen-taiho-to" and the Raw Material Crude Drugs ..... I. Yasuda, N. Takahashi, T. Hamano, T. Seto, I. Takano, Y. Watanabe, K. Akiyama, D. Suetugu, T. Arae, Y. Mori, T. Shimizu and Y. Yamakawa 39

Investigation of Constituents of "Shiun-ko" which Induce Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation ..... T. Hamano, I. Yasuda, Y. Watanabe, T. Konoshima and H. Tokuda 46

Determination of Allantion in Dioscoreae Rhizoma by Capillary Gas Chromatography as *tert*-Butyldimethylsilyl Derivatives ..... T. Hagiwara and Y. Watanabe 51

Trend of Analytical Data of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process in Tokyo Area (Apr. 1970–Mar. 1990) ..... Y. Iwasaki, T. Okumoto and Y. Watanabe 56

Determination of Water Soluble Coal-Tar Dyes for Cosmetics and Toiletries by Ion-pair HPLC using Visible Spectrophotometric Detector
..... K. Itoh, K. Kishimoto, S. Suzuki and H. Nakamura 59

High Performance Liquid Chromatographic Determinations of Warfarin and Warfarin Potassium in Rodenticides
..... K. Sato, T. Amemiya, S. Suzuki and H. Nakamura 66

Elements Content in Catgut
..... K. Ebato and H. Nakamura 70

Effect of Preservation Time and Temperature on Staining of the Blood Smear
..... H. Oishi, C. Kobayashi, K. Minowa, K. Gomi, K. Watanabe and K. Kawano 76

REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Content of Mercury in Sea-bass of Tokyo Bay
..... H. Yamanobe, M. Takeuchi, K. Mizuishi and H. Nakamura 79

Incidence of *Listeria* Species in Raw Meat and Poultry
..... Y. Kokubo, S. Kaneko, T. Iida and T. Maruyama 82

Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperature
..... T. Iida, M. Kanzaki, T. Itoh and T. Maruyama 87

The Microbiological Screening Test for the Detection of Antimicrobial Residues in Meat
..... C. Monma, K. Jinbo and T. Itoh 92

Study of Undesignated Food Colors on the Market of the Standard Colors.
..... K. Nakazawa, F. Ishikawa, S. Tabata, Y. Kawai, Y. Tamura and T. Nishima 98

Survey of Natural Dyes in Imported Foods
..... T. Ogiwara, E. Amakawa, T. Nozawa, K. Ohnishi, I. Kano and T. Yamagishi 111

Determination of β-apo-8'-Carotenal and Ethyl β-apo-8'-Carotenoate in Foods
..... E. Amakawa, T. Ogiwara, K. Ohnishi, I. Kano and T. Yamagishi 118

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits. –Apr. 1991～Mar. 1992–
..... M. Kobayashi, T. Nagayama, H. Sioda and T. Nishima 124

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops. –Apr. 1991～Mar. 1992–
..... H. Shioda, T. Nagayama, M. Kobayashi and T. Nishima 130

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo. (IX) –1991–
..... T. Maki, K. Kan, H. Hashimoto and T. Nishima 137

Radioactive Contamination in Imported Foods. (IX) –Apr. 1991～Mar. 1992–
..... K. Kan, T. Maki, H. Hashimoto, Y. Kawai and T. Nishima 142

Survey on Quality of Enzyme Preparations used in Food Processing. (Ⅲ). Measurement of Enzyme Activities and Analysis of Organic Subsidiaries in Enzyme Preparations(2)
..... M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu, K. Nakajima and M. Kazama 149

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing. (Ⅳ). Determination of Inorganic Salts, Heavy Metals and Arsenic in Enzyme Preparations(2)
..... T. Yasuno, Y. Kurihara, S. Ogino, M. Koseki and M. Kazama 155

Effect of Coexisting Fatty Acid on the Extraction of Tocopherols in Biological Specimens
..... T. Ueda, H. Ichikawa and O. Igarashi 158

Tocopherol, Carotene and Water-Soluble Vitamin Contents and Seasonal Differences in the Different Parts of Ashitaba(*Angelica keiskei*)
..... M. Iguchi, N. Kikutani, K. Monma, T. Kasahara, T. Tomomatsu, Y. Murakami and M. Urano 166

Serum Levels of 25–Hydroxyvitamin D_3 of Normal Subjects
..... C. Hayafuji and T. Tomomatsu 171

REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay(X). Residue Levels in Japanese Sea bass and Gull in 1990.
..... T. Ohkubo, H. Seto and T. Kanoh 175

Annual Mean Concentrations of NO_2 by 200–Meter Mesh in the Ward-Area of Tokyo Estimated with a Personal Computer.
..... K. Makino 179

Effects of Diesel Exhaust Exposure on Components of Rat Breast Milk
..... M. Ohsawa, N. Kato, T. Yamada, T. Kano and K. Mori 187

Screening Method for Determination of Asulam in Water Samples by Reversed Phase Liquid Chromatography with SyringeType Minicolumn
..... T. Suzuki, H. Kondo, N. Sekiyama, K. Yaguchi and T. Yamagishi 192

Some Bacteriological Studies on the Pinkish Slimy Films Formed on Tiles Using for Bathrooms and Washstands
..... K. Furuhata and A. Matsumoto 197

REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

Acute Toxicity Test of Staphylococcal Enterotoxin in Rats by Single Intramuscular Injection
..... T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, C. Sumi and H. Igarashi 205

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers.(V). Behavior of Injected Chrysotile Fibers
..... N. Fukumori, C. Sumi and M. Sasaki 209

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. (Ⅶ).
..... H. Fujita, C. Sumi and M. Sasaki 219

Mutagenicity of Water Extract of Rokumigan with *Salmonella typhimurium*
..... H. Fujita, C. Sumi and M. Sasaki 228

DNA Single-Strand Breaks and Repair in a Radiation-Sensitive Mutant of Mouse Cells as Revealed by Alkaline Elution
..... N. Kananishi, Y. Kinjo, M. Watanabe, H. Hama-Inaba and K. Sato 231

The Effect of Guarana of Brazirian Growth on Na, K-ATPase Activity
..... K. Satoh, J.S. Nakamura, F. Nagai and K. Ushiyama 235

Analytical Methods of Pharmacokinetics and its Modelings. (Ⅰ). Modifications of Numerical Solutions of Differential Equations and Least Squares Solutions
..... S. Fukano 239

Analytical Methods of Pharmacokinetics and its Modelings. (Ⅱ). Physiological Models and Experimental Planning
..... S. Fukano 245

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 253

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 263

報　　文　Ⅰ

感染症等に関する調査研究

REPORTS Ⅰ

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS AND OTHERS

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 1－7, 1992

Vero 毒素産生性大腸菌 OUT：H 19によると推定された集団下痢症の疫学的・細菌学的検討成績

甲斐明美*, 尾畑浩魅*, 楠　淳*, 高橋正樹*
新垣正夫*, 柳川義勢*, 山田澄夫*, 太田建爾*
工藤泰雄*, 木村靖彦**, 山本　裕**, 土屋伸久**
渡辺恵次**, 舟越幸子**, 長谷川恵一**, 田村延一***
吉田好文***, 福田博保***, 富樫哲也***

Epidemiological and Bacteriological Investigation of A Gastroenteritis Outbreak Associated with Verotoxin-Producing *Escherichia coli* OUT : H 19

AKEMI KAI*, HIROMI OBATA*, JUN KUSUNOKI*, MASAKI TAKAHASHI*, MASAO SHINGAKI*, YOSHITOKI YANAGAWA*, SUMIO YAMADA*, KENJI OHTA*, YASUO KUDOH*, YASUHIKO KIMURA**, YUTAKA YAMAMOTO**, NOBUHISA TUCHIYA**, KEIJI WATANABE**, YUKIKO FUNAKOSHI**, KEIICHI HASEGAWA**, NOBUKAZU TAMURA***, YOSHIFUMI YOSHIDA***, HIROYASU FUKUDA*** and TETSUYA TOGASHI***

An outbreak of acute gastroenteritis due to verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) OUT: H19 occurred at an elementary school in Tokyo during the period from May 14 through June 6, 1991. Eightynine (23.6%) out of 377 pupils were affected. The major clinical symptoms observed among the patients were abdominal pain (88.8%), diarrhea (69.7%), fever (22.5%), malaise (19.0%), headache (18.0%), nausea (14.6%) and vomiting (9.0%). Diarrhea with mucus or bloody diarrhea were observed in 7 or 4 patients, respectively. Six patients were hospitalized, with no deaths.

By the bacterial examination, VTEC OUT: H19 which produces verotoxin 2-only, was isolated from 5 of 81 fecal specimens of patients and 1 of 69 not-ill pupils. The detection rate of the organism was low because most of the specimens were obtained one week or more after the onset of illness or after antibiotics treatment. But VT or VT-encoded gene was also detected with the Latex agglutination (LA) test and/or polymelase chain reaction (PCR) method in 3 additional fecal specimens which were negative for VTEC OUT: H19 on DHL agar. The food responsible for the outbreak could not be determined epidemiologically or bacteriologically.

Keywords：Vero 毒素産生性大腸菌 Verotoxin-producing *Escherichia coli*, Vero 毒素 verotoxin, 大腸菌 *Escherichia coli*, 集団下痢症 outbreak

緒　言

1977年に Konowalchuk ら[1]によって報告された Vero 毒素産生性大腸菌(VTEC)が広く注目されるようになったのは，1982年アメリカにおいて発生した出血性大腸炎の原因菌として腸管出血性大腸菌 O 157：H 7 が発見され[2]，更に本菌の病原性発現に Vero 毒素の関与が明白

＊東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 169 東京都新宿区百人町 3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
＊＊東京都北区赤羽保健所
＊＊＊東京都衛生局生活環境部食品保健課

になって以降のことである．そしてその後の調査の著しい進展に伴い，本菌感染症が世界的に分布すること，またその疾病も当初報告された出血性大腸炎に限らず，急性胃腸炎や溶血性尿毒症性症候群(HUS)など多彩な病像を示すことも明らかとなった[3]．

著者らも，我が国における本菌感染症の実態を把握すべく，米国CDC(Centers for Disease Control)より腸管出血性大腸菌O157 H7の菌株分与を受け，検査体制を整えると共に，1983年以降東京で発生した大腸菌性食中毒を中心に疫学的検討を加えてきた[4]．そして，これまでに集団下痢症事件として2事例，また散発症例として15事例のVTEC感染症の存在を明らかにした．著者らが経験した2つの集団事件のうち，1事例目は1984年東京都内某小学校に発生した本邦初の集団事例[5]で，その原因菌は極めて稀な血清型大腸菌O145：NMによるものであったが，1991年5月同様に都内の小学校で発生した2例目の事件もこれまでVTECとして報告のない新しい血清型大腸菌OUT：H19によると推定される興味ある事例であった．

本報では，この新しい血清型を持つVTEC OUT：H19による集団下痢症について詳細に検討した疫学的・細菌学的調査成績について報告する．

被検材料および方法

1．被検材料

6月4日～6月14日にかけて採取された学童患者糞便81件，非発症の学童糞便69件および調理従業員糞便4件を対象に細菌学的，ウイルス学的検索を行なった．また，原因食品や汚染経路を追求する目的で，給食施設に保管してあった検食等15件(5月28日～6月4日分)，給食施設の調理器具・器材等の拭き取り材料14件および飲用に供されていた水道水6件についても併せて検査を実施した．

2．腸管病原菌の検索方法

赤痢菌，サルモネラ，下痢原性大腸菌，腸炎ビブリオおよびその他の病原ビブリオ，エロモナス，プレジオモナス，バチルス・セレウス，黄色ブドウ球菌，カンピロバクター，ウェルシュ菌などの病原菌を対象に，常法[6]に従って検査を実施した．大腸菌の検索は，DHL寒天(日水製薬)を用いて行い，1件につき原則として4～5集落をTSI寒天(栄研化学)，LIM培地(日本製薬)に接種し一次確認培養を行った後，微生物検査必携[7]に準拠して同定した．

3．大腸菌の血清型別

大腸菌のO血清型別は，普通寒天培地(日水製薬)で37℃，1夜培養した被検菌を100℃，1時間加熱したものを抗原とし，市販の病原大腸菌診断用血清(デンカ生研)および著者らが自家調製したO1～O173の抗O因子血清を用いたスライド凝集反応によった。

H血清型別は，予めクレーギー管を用いて運動性を増強した被検菌をHブイヨン(Difco)で37℃6時間培養後，ホルマリンで固定処理したものを抗原とし，自家調製したH1～56の抗H血清を用いて試験管内凝集反応法によって実施した。

4．大腸菌の病原性試験

1)LTおよびST産生性試験：被検菌をCAYE-3半流動寒天(自家調製)で37℃，18～24時間培養後ポリミキシンB処理したものをリン酸緩衝液で抽出し，毒素検査用試料とした[8]．易熱性毒素(LT)は，ラテックス凝集反応を応用した市販のLT検出用キット，セロトキシLT(栄研化学)で，耐熱性毒素(ST)は，乳飲マウス胃内投与法によって調べた[9]．

2)組織侵入性試験：Pennassay寒天平板37℃18時間培養菌を用いて，モルモット眼接種法により行った[10]．

3)Vero毒素産生試験：VT 1及びVT 2について以下の3法で検討した．①培養法：DHL寒天平板の分離菌を対象に，そのVT産生性を著者らが開発したラテックス凝集反応(LA)法および遺伝子増幅(PCR)法で検討した[11]．②直接LA法：糞便のTrypticase soy broth (TSB, BBL)，37℃，24時間培養液の遠心上清を対象にLA法で直接VT 1及びVT 2の検出を行った．③直接PCR法：糞便のTSB，37℃，16時間培養液よりPCR法で直接VT遺伝子の検出を行った．

PCR法は，小林ら[12]が報告したVT 1及びVT 2用プライマーを用いて行った．その条件は，熱変性：94℃，1分，アニーリング：55℃，2分，伸長：72℃，2分で，このサイクルを25回行った．この方法で増幅される遺伝子サイズは，VT 1が811 bp，VT 2は471 bpである．

なお，LA法やPCR法でVT産生性が認められた大腸菌については，更にVero細胞を用いた培養細胞法でVT産生性を確認した[13]．

5．薬剤感受性試験

NCCLSディスク法[14]により，センシディスク(BBL)を用いて実施した．供試薬剤は，クロラムフェニコール(CP)，テトラサイクリン(TC)，ストレプトマイシン(SM)，カナマイシン(KM)，アンピシリン(ABPC)，スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST)，ナ

リジクス酸(NA)，ホスホマイシン(FOM)，ノルフロキサシン(NFLX)の9剤である．

6．プラスミド・プロファイルの検討

Kadoらの方法[15]に従ってプラスミドを抽出後，0.6%アガロースで電気泳動を行い，エチジウム・ブロマイド染色をして，そのプロファイルを調べた．

成　　績

1．疫学的調査成績

発生状況：1991年5月14日～6月6日の24日間にかけて東京都内の某小学校において学童377名中89名(発病率23.6%)が急性胃腸炎症状を呈した．日別の患者発生状況はFig. 1に示す通りで，5月14日に1名の初発患者がみられて以降徐々に患者数が増加し，5月27日に患者13名，また6月4日に再び8名の小さな発生ピークを認めた後，6月6日の1名の患者発生をもって終息をみた長期間に及ぶ流行であった．

患者は，1年～6年生までの全学年に認められた．発症者数および発症率は，1年生6名：10.3%，2年生11名：19.0%，3年生19名：30.0%，4年生16名：30.8%，5年生15名：20.5%，6年生22名：30.6%で，患者は高学年にやや多い傾向であったが，特定クラスへの片寄りは認められなかった．また，教職員に患者発生はみられなかった．

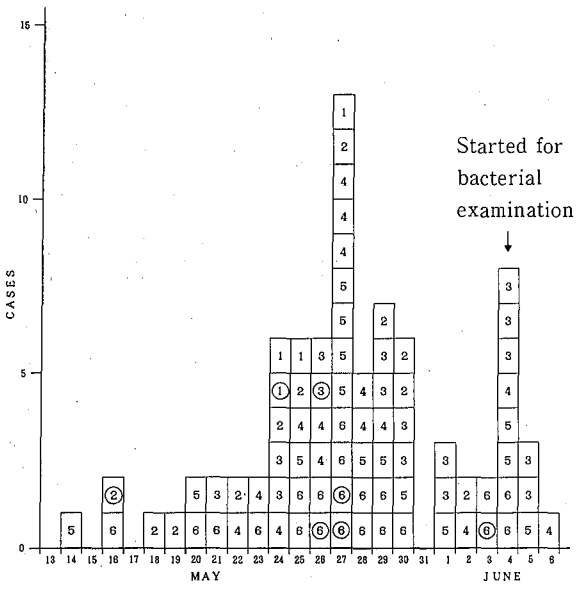


Fig. 1．Cases of gastroenteritis, according to date of onset (1991). The number in the square shows the grade of elementary school. ○：Positives for *E. coli* OUT:H19 and/or VT.

主要臨床症状は，Table 1．に示す通り，腹痛79名(88.8%)と下痢62名(69.7%)であった．調査し得た54名の便性状は，軟便25名(40.3%)，水様便18名(29.0%)，粘液便7名(11.3%)，粘血便4名(6.5%)であった．1日の下痢回数は，調査できた56名中，10回以上が4名，6～10回が8名で，大半は5回以下であった．発熱が認められたのは20名(22.5%)で，39℃以上の高熱を呈したものは4名のみであった．患者89名中39名(43.8%)が受診し，内6名が入院した(3名の臨床診断は急性虫垂炎の疑い)．しかし，患者全員の予後は良好であり，死亡者もいなかった．

感染源の追求：患者発生が当小学校内にのみ限定されていることから，本流行の感染源としては学校給食が疑われた．特に初発患者の発生日からみて5月13日以前の給食が最も疑われたが，事件発生の保健所への届出が6月1日と遅れたことから，検査し得た検食は5月28日～6月4日までのものであり，これらはすべて病原菌陰性であった．また，同時期に検査した飲用水6件，給食施設の調理器具・器材等の拭き取り材料14件からも，特定の病原菌は検出されなかった．

2．細菌学的調査成績

病原菌の検出状況：6月4日～6月14日にかけて採取された患者糞便81件，非発症の学童糞便69件および給食従事者4件の合件154件を対象に病原菌の検索を行った

Table 1．Clinical Symptoms in 89 Patients of *E. coli* OUT：H 19 Gastroenteritis Outbreak

Symptoms	No. of cases (%)
Abdominal pain	79(88.8%)
Diarrhea	62(69.7%)
with mucus	7
with blood	4
waterly	18
loose stool	25
Fever	20(22.5%)
36.5-36.9℃	3
37.0-37.9	9
38.0-38.9	4
39.0-39.9	4
Malaise	17(19.0%)
Headache	16(18.0%)
Nausea	13(14.6%)
Vomiting	8(9.0%)

結果，カンピロバクターが患者1名から検出されたのみで，本集団下痢症事件と直接関連づけられるような既知病原菌は検出されなかった。また，ロタウイルスや小型球形ウイルスなど腸管病原ウイルスも患者9名について検査したが，すべて陰性であった．一方，被検者全員に大腸菌が認められたので，これらの分離株を対象に大腸菌診断用血清による凝集反応，易熱性毒素および耐熱性毒素の産生性，組織侵入性を調べた結果いずれも陰性であった．しかし，Vero毒素産生性をラテックス凝集反応法およびPCR法で調べた結果，3名の患者および1名の非発症者由来株がVT 2産生性であることが確認された．さらに，患者糞便の増菌培養液を対象に直接LA法および直接PCR法でVT産生菌の有無を検討した結果，直接LA法で患者6名，直接PCR法で5名にVT 2産生菌の存在が確認された(Table 2)．また，これらいずれかの方法で陽性であったが，培養法で陰性であった糞便について再度その増菌培養液を用いてVT産生菌の検出を試みた結果，新たに2件からVT 2産生菌を検出することができた．しかし，糞便からの当該菌の検出割合は非常に低く，検査した100株中1～3株に過ぎなかった．一方，当初の培養法でVT 2産生菌が検出された糞便では，当該菌は4株中1～4株と高率であった．

6名から検出されたVT 2産生大腸菌6株の血清型別を行った結果，O抗原は既知のO1～O173のいずれの血清型にも該当しなかったが，H抗原は19に型別された．一方，分離菌株内のO抗原の異同を明らかにするため，代表株の加熱抗原をウサギに免疫して調製した抗O血清を用いて凝集反応を行った結果，全株とも同じ血清型に該当することが確認された。これらの結果から，本菌の血清型は暫定的にOUT：H19として扱った。O血清型については，更に検討中である．なお，VTEC OUT：H19が検出された，またはLA法やPCR法でVT 2産生菌の存在が証明された患者の発症日は，5月16日1名，24日1名，26日2名，27日2名、6月3日1名で(Fig. 1中の○印)，残り2名は発症日不明と非発症者であった．

分離VTEC OUT：H19株の生物学的活性：分離VTEC 6株について検討した生物学的活性をTable 3．に示した．易熱性および耐熱性毒素の産生性，組織侵入性はすべて陰性であったが，全株にマウス致死活性およびVero細胞に対する細胞毒性が認められた．さらに，VT 1とVT 2の2種類のVero毒素産性をラテックス凝集反応法およびPCR法で調べた結果，6株すべてVT 2単独産生株であった．

VTEC OUT：H19株の生化学的性状および薬剤感受性：検出されたVTEC 6株の生化学的性状をTable 4．に示した．分離株は乳糖分解，白糖非分解，リジン脱炭酸能陽性，インドール陽性，VP反応陰性の典型的な大腸菌であった．しかし，分離当初DHL寒天平板上で桃

Table 2. Results of Bacterial Examinations for Fecal Specimens

No.	Days after onset of illness	Culture on DHL agar	TSB-LA	TSB-PCR
1.	5 days	+(3/4)*	+	+
2.	11 days	+(4/4)	+	+
3.	10 days	+(3/4)	+	NT**
4.	Not ill	+(1/4)	−	−
5.	11 days	+(3/100)	+	+
6.	22 days	+(1/100)	+	−
7.	10 days	−	+	NT
8.	14 days	−	−	+
9.	?	−	−	+
10.-85.		−	−	−/NT
No. of positives		6	6	5+

*No. of VTEC / No. of colonies tested. **Not tested.

色であった集落をTSI寒天で培養後DHL寒天上で再分離した場合，桃色と無色透明の2種類の集落が出現した．そこで，両集落につき糖分解性を調べた結果，無色の集落が乳糖遅分解性であった以外他の生化学的性状や血清型，およびVero毒素産生性に差異は認められなかった．

Table 3. Biological Activities of *E. coli* OUT:H19 Strains

Tests	Reaction
Enterotoxic activity	−(0/6)*
Heat-labile toxin (RPLA)	
Heat-stable toxin (Infant mouse)	−(0/6)
Sereny test in guinea pig eye	−(0/6)
Lethal toxicity in mouse (i.p.)	+(6/6)
Cytotoxicity (Vero celles)	+(6/6)
Latex agglutination test for VT	
VT 1	−(0/6)
VT 2	+(6/6)
PCR for VT	
VT 1	−(0/6)
VT 2	+(6/6)

*No. of positives/ No. of strains tested.

また，6株はいずれもソルビトール発酵性およびβ-グルクロニダーゼ産生性が陽性であった．

一方，薬剤感受性をCP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLXの9剤について調べた結果，6株すべてが全薬剤に対して感受性であった．

VTEC OUT：H19株のプラスミド・プロファイル：分離した6株について，そのプラスミド・プロファイルを調べた結果，全株とも約80 kbのプラスミド単独保有株で，菌株による差異は認められなかった．

考　察

下痢原性大腸菌は，今回報告した新しいタイプのVero毒素産生性大腸菌(Verotoxin-producing *E. coli*; VTEC)と，これまでに知られていた病原血清型大腸菌(Enteropathogenic *E. coli*；EPEC)，組織侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E. coli*；EIEC)，毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E. coli*；ETEC)と併せて現在少なくとも4種に分類されている[16]

著者ら[4]は，これら下痢原性大腸菌による腸管感染症の発生状況などについてこれまで詳細な検討を加えてきているが，1966年～1991年までの26年間に東京都内で発生した大腸菌によると推定された集団下痢症事件123件の調査では，その原因として最も多いのは，ETECによ

Table 4. Biochemical Characteristics of *E. coli* OUT:H 19 Strains

Test	Sign	%+	Test	Sign	%+
Indole	+	100	D-Mannitol	+	100
Voges-Proskauer	−	0	Dulcitol	−	0
H_2S (TSI)	−	0	L-Arabinose	+	100
Nitrate to nitrite	+	100	Cellobiose	−	0
Urease	−	0	D-Xylose	+	100
Citrate, Christensen	+	100	Adonitol	−	0
Citrate, Simmons	−	0	L-Rhamnose	+	100
Sodium acetate	+	100	L-Inositol	−	0
Malonate	−	0	Raffinose	−	0
Lysine decarboxylase	+	100	Salicin	−	0
Ornithine decarboxylase	−	0	D-Sorbitol	+	100
Arginine dihydrolase	−	0	Maltose	+	100
D-glucose	+	100	Trehalose	+	100
Gas from glucose	+	100	KCN	−	0
Lactose	+	100	Oxidase	−	0
Sucrose	−	0	β-Glucuronidase	+	100

Six strains were tested. +=positive within 1 or 2 days; −=negative within 7 days.

るもので72件，次いでEPECが21件，EIECが7件であった．残りの事件は，ETEC, EPECあるいはEIECのいずれにも該当しないものであったが，新しいタイプの大腸菌による可能性も否定できないことからこれら原因不明由来株についてその病原性を詳細に検討した結果，1984年に小学校で発生した血清型O 145：H－大腸菌による集団下痢症がVT 1およびVT 2の両毒素を産生する本邦で初めてのVTECによる集団事例であることを明らかにすることができた[5]．今回報告した事例は都内におけるVTEC集団事件として2例目に当たる．また，これまでにVTECによる散発下痢症の調査で確認し得た症例は，1992年6月現在国内事例889件中22件，海外由来事例831件中1件，計23件(血清型O 157：H 7が17件，O 128：H 2が2件，O 26：H 11が2件，O 111：H－が1件，O 103：H 2が1件)である[4]．

一方，全国的なVTEC下痢症状の発生状況[4]をみると，著者らの本邦初の集団事例報告以降地方衛生研究所を中心に精力的な調査が開始されるとともに，これまでに集団事例として東京都内の2事例を含めて計7事例，また散発事例として1984年以降少なくとも150余例が報告されるまでに至り，認識される症例も1990年における埼玉県浦和市の集団発生[17]以後急増する傾向にある．

これまでに我が国で同定されたVTECの血清型[3]についてみると，著者らが集団事件の原因菌として報告したO 145：H－および本報のOUT：H19両血清型はVTEC血清型として内外では恐らく初めてと考えられる稀な血清型であった．しかし，それ以外の血清型はO 157：H 7/H－やO 26：H 11，O 111：H－によるものが主体[17,18]であり，諸外国とあまり大差は認められていない[4]．

VTEC感染症の感染源としては，VTEC下痢症が多発しているカナダや米国の集団事例では，牛肉やその加工品，未滅菌の牛乳など畜牛に起因するものの多いことが指摘されている[3]．しかし，わが国では感染源が特定された例は少なく，集団事例に限っても埼玉県の保育園で発生した事例[17]が井戸水と推定された以外，全て不明であった．今回の事例も，患者発生が当小学校内にのみ限定されたこと，また飲用水に特に問題はなかったことから，5月初旬に提供された給食が感染源として最も有力と考えられたが，事件発生の保健所への届出が6月1日と遅れたことなどからそれを特定するまでに至らなかった．

一方，本事例の患者発生は既述のごとく，5月27日と6月4日に2つのピークがあり，単一暴露型の感染にしてはやや奇異な態度を示した．しかし，これは今回の発生が単一暴露型であることを否定するものではなく，恐らく疫学調査の開始が初発患者の発生から2週間以上経過した6月4日と遅れ，また患者が学童であったため，学校や保健所の精力的な調査にも関わらず発病日を必ずしも正確に特定し得なかったことが強く影響したものと思われる．

本事例では，細菌検査に供試した糞便も，疫学調査と同様発症後1週間以上経過したものや既に抗生物質が投与されたものなど不適な材料が多く，原因と推定したVTEC OUT：H19の患者からの検出率は，分離培養以外の方法の導入で新たにVTECの存在が確認されたものを含めても9.0%と低率であった．しかし，VTEC O 157：H 7の下痢症患者糞便からの検出率を調べたTarrら[19]の調査では，発病2日以内では100%であるものの，7日以上経過した場合は約33%にまで減少する結果が示されていること，また本事件でVTECと診定された患者の発症日が流行の全期間に分布し，かつ患者発生が1年生から6年生までの全学年に認められたこと，患者の主要臨床症状が腹痛と下痢で，一部は粘液便や粘血便を呈し，また臨床診断では急性虫垂炎の疑いのもたれた患者がいたなどVTEC感染症に特徴的な臨床所見[3]が認められている点から，本事例はVTEC OUT：H19による集団下痢症と推定してまず間違いなかろう．

今回採用した糞便のTSB増菌培養液からVero毒素を直接検出する直接LA法や直接PCR法による菌の証明は初めての試みであったが，これらにより菌培養陰性材料から3名のVTECを確認しえた．今回のように原因菌の検出があまり期待できない不適な検査材料の場合には，この種の方法の利用価値が高いことを示すものであり，今後更に検討を加えて行きたいと考える．

結　論

1991年5月14日～6月6日の24日間にかけて東京都内の某小学校において学童377名中89名(発病率23.6%)が急性胃腸炎症状を呈した．

患者の主要臨床症状は，腹痛79名(88.8%)と下痢62名(69.7%)であった．下痢の症状は，軟便や水様便が主体であったが，粘液便が7名(11.3%)，粘血便が4名(6.5%)に認められた．発熱が認められたのは20名(22.5%)で，39℃以上の高熱を呈したものは4名のみであった．患者89名中39名(43.8%)が受診し，内6名が入院した(3名の臨床診断は急性虫垂炎の疑い)．しかし，患者全員の予後は良好であり，死亡者もいなかった．

6月4日から6月14日にかけて採取された患者糞便81件，非発症者の学童糞便69件および給食従事者4件の合計154件を対象に病原菌の検索を行った結果，患者糞便81件中5件，非発症者の学童糞便69件中1件からVTEC OUT：H19が検出され，本事件の原因菌と推定された．本菌は，細胞培養法で細胞毒素が確認され，またラテックス凝集反応(LA)法およびPCR法でVT 2単独産生菌であることが同定された．更に，糞便の増菌培養液から直接LA法とPCR法を行った結果，本菌が陰性であった患者糞便3件からも新たにVT 2産生菌の存在が確認された．しかし，感染源を特定するまでには至らなかった．

(本研究の概要は第65回細菌学会総会1992年4月で発表した．)

文　献

1) Konowalchuk, J., Speirs, J. I. and Stavric, S.: *Infect. Immun.*, **18**, 775-779, 1977.

2) Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., et al.: *N. Engl. J. Med.* **308**, 681-685, 1983.

3) 甲斐明美，工藤泰雄：モダンメディア，**37**，24-32，1991.

4) Kudoh, Y., Kai, A., Yamada, S., et al: *Abstracts of Twenty-seventh joint conference on cholera and related diarrheal disease*, 145-148, 1991, Charlottesville, Virginia.

5) 伊藤　武，甲斐明美，斉藤香彦，他：東京衛研年報，**36**，16-22，1985.

6) 坂井千三，太田建爾：一般検査体系，微生物検査必携編集委員会編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，D 2 - D 13，1987，日本公衆衛生協会，東京.

7) 工藤泰雄：腸管病原性大腸菌，微生物検査必携編集委員会編，微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3版，D 30-D 42，1987，日本公衆衛生協会，東京.

8) Kudoh, Y., Matsushita, S., Yamada, S., et al.: *Advances in research on cholerae and related diarrheas*, 2, Kuwahara, S., and Pierce, N. F. (eds.), 261-268, 1985, KTK Sci. Publ. Tokyo.

9) 松下　秀，工藤泰雄：モダンメディア，**30**，80-91，1984.

10) Sereny, B.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 4, 367-376, 1956.

11) 甲斐明美，山田澄夫，松下　秀，他：日細菌誌，**44**，434，1989.

12) 小林一寛：臨床と微生物，**18(4)**，69-75，1991.

13) 甲斐明美，工藤泰雄：モダンメディア，**35**，240-243，1989.

14) National Committee for Clincal Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 3 rd Ed., **4 (16)**, 1984, NCCLS, Villanava.

15) Kado, C. I. and Liu, S. T.: *J. Bacteriol.*, **145**, 1365-1375, 1981.

16) 甲斐明美，工藤泰雄：臨床と微生物，**18(4)**，55-60，1991.

17) 鈴木忠義：公衆衛生情報，**1991. 3**，39-45，1991.

18) 高山有道，松本修平：愛媛県立病院学会会誌，**24**，1-13，1988.

19) Tarr, P. I., Neill, M. A., Clausen, C. R., et al.: *J. Infect. Dis.* **162**, 553-556, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 8-11, 1992

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1991年11月～1992年2月)

山崎　清*, 伊藤忠彦*, 林　志直*, 太田建爾*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Nov. 1991～Feb. 1992)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, YUKINAO HAYASHI* 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

近年のわが国におけるインフルエンザの流行は，AH1型(Aソ連型)，AH3型(A香港型)あるいはB型ウイルスのいずれかによる単独，もしくはこれらの混合によるものである．東京都においても例外でなく，過去9年間のインフルエンザの流行を遡ってみると，1982～1986年ではいずれもAH1型，AH3型あるいはB型ウイルスのいずれかによる単独流行[1-3]であったものの，1987～1990年はこれら三型の組み合わせによる混合流行[4-6]が認められている．

本報では，1991年11月から1992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散発例として渋谷区内及び新宿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，1991年11月下旬から1992年2月下旬までに，集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小，中学校の計35集団153名(1集団2～5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18名(7歳～58歳)及び新宿区内の1医療機関を受診したインフルエンザ様疾患々者20名(4歳～42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191例について，既報[4]に準じ発育鶏卵及びRD, Hep 2, Hela, Vero 355, MDCKの各種培養細胞を用いて行った．

血清学的試験　血清学的試験は急性期及び回復期に採取したペア血清を対象に補体結合反応(以下CFと略す)及び赤血球凝集抑制試験(以下HI試験と略す)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試験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, A/東京/2176/92

AH3型：A/北京/352/89

B　型：B/Bangkok/163/90

なお，A/東京/2176/92は今冬期，1991年12月中旬に発生した事例から分離した株であり，他の3株はすべて今期のワクチン株である．

CF, HI試験共に回復期の抗体価が急性期のそれに比し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[4]に準じて行った．

成績と考察

患者の病因検索　今年度のインフルエンザ様疾患集団例は，1991年11月に1集団，12月5集団，1992年1月に26集団及び2月3集団の合計35集団例であった．これら患者材料について，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，22集団例(患者103名中44名)よりインフルエンザAH1型ウイルスを検出した．また，ウイルス分離試験は陰性であったが血清学的試験

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

表1．集団かぜ患者の病因検索状況（1991～1992年）

発生年月旬	検索対象		検索結果				
	集団	搬入	インフルエンザウイルス		アデノ＋	エコーウイルス	不明
	例数	件数	AH1型	AH3型	AH1型	30型	
1991. 11下	1	5				1*	
. 12上	1	5					1+
中	4	17	2				2++
1992. 1中	6	26	4	1			1
下	20	85	19		1**		
. 2上	1	5	1				
中	1	5	1				
下	1	5	1				
計	35	153	28	1	1	1	4

*：集団例数　　**：アデノウイルス感染の判定はCF反応による
+：コクサッキーB群2型ウイルス検出（1/5）
++：1集団例から単純ヘルペス1型ウイルス検出（1/4）

の結果，AH1型による感染と診断された集団例が7例（1992年1月下旬6集団，2月下旬1集団）認められ，AH1型による事例は合計29集団であったことが確認された．AH1型ウイルスを検出した22集団例のうち，1月下旬の1集団例では対象患者5名中2名からAH1型ウイルスを検出することができた．他の3名は陰性であった．しかし，これら3名の血清学的試験の結果，アデノウイルスに対する抗体価の有意上昇が認められ，同ウイルスに罹患していたことが明らかとなり，この集団例はインフルエンザとアデノウイルスの二種による感染例であったことが判明した．

AH3型ウイルスによる事例は，1992年1月中旬に搬入された1集団のみで，患者2名中1名からは同ウイルスを検出した．なお，他の1名はペア血清が得られHI試験の結果，AH3型ウイルス抗原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例であったことが確認された．以上の結果からインフルエンザウイルスによる事例は，35集団例中合計30集団例であった．

インフルエンザウイルス以外の事例として，1991年11月下旬に発生した事例では，患者5名中4名からエコーウイルス30型が検出され，同ウイルスによる感染例であったことが確認された．病因検索の結果，原因不明となった事例は合計4集団例であった．このうち，1991年12月上旬に搬入された1集団では，5名中1名からコクサッキーB群2型ウイルスが検出された．また，同月中旬に搬入された1集団4名中1名からは単純ヘルペスウイルス1型が検出されたが，これら検出ウイルスがそれぞれの事例の病因であるか否かは不明である．

次ぎに散発例についてみると，渋谷区内における18例では9例からインフルエンザAH1型ウイルスが検出された．残り9例のウイルス分離試験は陰性であった．また，18例中6例から得られたペア血清の血清学的試験では，ウイルスが検出された3例を含む4例に，AH1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2例はインフルエンザウイルス及びアデノウイルスに対する抗体の有意上昇は認められなかった．この結果，患者18例中10例がインフルエンザウイルスによる症例であることが確認されたが，8例は病因を明らかにすることはできなかった．

新宿区内の医療機関については，20例の咽頭うがい液及び17例のペア血清を対象とした．検索の結果9例からインフルエンザAH1型ウイルスを，さらに残りの11例中2例からAH3型ウイルスが検出された．また，ペア血清による血清学的試験では，AH1型ウイルスが検出された7例を含む11例にAH1型ウイルスに対する抗体価の上昇が認められた．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ものは2例であったが，これらはいずれも同型ウイルス検出例であった．残り4例はインフルエンザウイルス及びアデノウイルスに対する抗体の有意上昇は認められず，また，これらのうがい液からのウイルス分離も陰性であり病因は不明であった．

インフルエンザ様疾患調査のうち，特に感染源を追及する際の必要条件は，発症まもない患者からの検査材料（咽頭うがい液）の採取と，採取された材料を速やかに検

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（1991年11月～1992年2月）

A/山形/32/89（AH 1）

	回復期										
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9 >10	計
	<1					1+	1				2
	1										
急	2									1	1
	3									1	1
性	4								1	6 3	10
	5						1	1	1	5 3	11
期	6						1		1	2 3	7
	7									1 3	4
	8								2	1	3
	9										
	計					1	3	1	5	15 14	39

A/東京/2176/92（AH 1）

	回復期										
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9 >10	計
	<1						1	1			2
	1								1		1
急	2										
	3							1		1	2
性	4					1			3	7 3	14
	5									3 2	5
期	6							1	2	2 8	13
	7								1	1	2
	8										
	9										
	計					1	1	3	7	12 15	39

A/北京/352/89（AH 3）

	回復期										
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9 >10	計
	<1										
	1										
急	2										
	3										
性	4										
	5					3					3
期	6						3				3
	7							10	1		11
	8								9	4	13
	9									6	6
	>10									3	3
	計					3	3	10	10	10 3	39

B/Bangkok/163/90

	回復期										
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9 >10	計
	<1	7									7
	1										
急	2										
	3			5							5
性	4				8	1					9
	5					6	1				7
期	6					1	6				7
	7							3			3
	8									1	1
	9										
	>10										
	計	7		5	8	8	7	3		1	39

*：8×2^n値

+：例　数

査室へ搬入することが第一である．また，これと同時に当該ウイルスによる感染の有無の確認のためにも急性期及び回復期のペア血清も必要である．たとえ病因となったウイルスの検出ができなかったとしてもペア血清が得られた場合は抗体価の推移による感染の有無，更には迅速な結果報告も可能である．

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AH 1型ウイルスが検出された患者のうち，ペア血清が得られた39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されたAH 1型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を急性期及び回復期の比が4倍以上とした場合，AH 1型抗原株に対する抗体の有意上昇率はA/山形/32/89株に対して89.7%(35/39)，A/東京/2176/92株では92.3%(36/39)であった．

今回供試した39例のペア血清のうち急性期血清で，すでにA型，B型ウイルス抗原に対する抗体価が128倍($n=4$)以上と高い抗体を保有していたものが，AH 1型山形株で89.7%，東京株87.2%，AH 3型北京株100%，B型Bangkok株69.2%と多く認められ，特にAH 3型株では全例256倍($n=5$)以上であった．このことを説明するものとして，前年度冬期に都内ではAH 3型ウイルス主体の流行[6]を経ていることが挙げられる．更に患者の

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が原因であると考えられる．なお，B型ウイルスは1例も検出されず，患者ペア血清におけるインフルエンザB型株に対するHI抗体価の有意上昇例もなく，今冬期の東京都における本ウイルスによる流行は認められなかった．

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，AH1型ウイルスによるものであったが，一部AH3型ウイルスによる集団例もあったことが確認された．

全国的な今冬期のウイルス分離状況は，まず，最初に1991年10月，長野県内の散発例からAH3型ウイルス検出の報告[7]がなされた．それ以降11月までインフルエンザ様疾患の発生報告はあるものの，原因ウイルスの分離報告はなかった．12月に入り島根県において集団例からAH1型ウイルス検出の報告[8]がなされ，以後，全国的にAH1型，AH3型及びB型ウイルス検出の報告が相次いだ．流行の主体は東京都の場合と同様AH1型で，これにAH3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[8]．

1991/1992シーズンインフルエンザ流行情報[9]によれば，全国で3,095株のインフルエンザウイルス分離の報告があり，そのうちAH1型2,240株(72.4%)，AH3型847株(27.4%)及びB型8株(0.2%)であった．

まとめ

1．1991年11月中旬から1992年2月下旬にかけて東京都内において発生したインフルエンザの流行は，集団発生例及び散発例ともに，インフルエンザAH1型ウイルスによるものが主体で，この他にAH3型ウイルスによるものが集団で1例及び散発例で2例認められた．

2．1月下旬の1集団例(患者5名)において，2名の患者はAH1型ウイルスによるインフルエンザと確認されたが，他の3名はアデノウイルスによる感染症で，同時期に二種のウイルスによる混合流行であったことが判明した．

3．インフルエンザの流行初期，1991年11月の1集団例では，エコーウイルス30型による感染症例があった．

4．病因不明となった4集団例(患者17名)のうち，12月の上旬の例及び中旬の1例において，それぞれコクサッキーB群2型ウイルス1株及び単純ヘルペス1型ウイルス1株が検出された．

文献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，岩崎謙二：東京衛研年報，**34**，60-64，1983.

2）坂井冨士子，伊藤忠彦，山崎　清，藪内　清：東京衛研年報，**35**，69-72，1984.

3）山崎　清，伊藤忠彦，中村清純，新開敬行，大貫奈穂美，藪内　清：東京衛研年報，**39**，32-34，1988.

4）山崎　清，伊藤忠彦，新開敬行，大貫奈穂美，貞升健志，藪内　清：東京衛研年報，**40**，36-40，1989.

5）山崎　清，伊藤忠彦，藪内　清：東京衛研年報，**41**，6-10，1990.

6）山崎　清，伊藤忠彦，関根整治，太田建爾：東京衛研年報，**42**，1-4，1991.

7）厚生省保健医療局疾病対策課結核・感染症対策室：インフルエンザ様疾患発生報告（第4報），1992.

8）厚生省保健医療局疾病対策課結核・感染症対策室：インフルエンザ様疾患発生報告（第12報），1992.

9）国立予防衛生研究所内日本インフルエンザセンター：1991/92インフルエンザシーズンウイルス分離状況速報⑤.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 12-15, 1992

東京都におけるHIV抗体検査 (1987年2月～1992年3月)

関根大正*, 貞升健志*, 大貫奈穂美*, 寺山武*
太田建爾**, 三木隆***

Serological Survey for Antibodies against HIV-1 in Tokyo(Feb. 1987 - Mar. 1992)

HIROMASA SEKINE*, KENJI SADAMASU*, NAHOMI OHNUKI*, TAKESI TERAYAMA*, KENJI OHTA** and TAKASI MIKI***

Keywords：ヒト免疫不全ウイルス HIV, 抗体検査 antibody test, 抗体陽性率 seroposotove rate

緒　言

AIDS(ヒト免疫不全症候群)は1980年代突然世界に登場し，その治療抵抗性と致死率の高さから人々の注目を集めた．HIV(ヒト免疫不全ウイルス)による伝染性の疾患であること，感染診断法の確立により世界各国で急速に拡大しつつあることが明らかになったこと，などから多くの人々の関心をよんだ．国によっては国民の間に心理的パニックをひきおこし，感染者に対する差別が見られるなど社会的問題となってきている．

WHOによれば1992年3月末までの世界の報告患者数は48万人を越え，推定感染者数は成人で800-1,000万人小児で100万人である．また西暦2000年の世界での感染者数を成人3,000万人，小児1,000万人と予測している．初期には欧米の男性同性愛者，静注薬物乱用者などに患者，感染者が多数報告された．1980年代後半以後アフリカ等の発展途上国に異性間性的接触による多数の感染者が報告され，また欧米でもこの感染経路による感染の増加傾向が見られ，現在全世界の感染者の80％近くは異性間性的接触によるものと考えられている．我が国では1985年に最初の患者が報告されて以来平成4年2月末現在，患者458名(外国人40名)，感染者2,008名が報告されている．東京都では1987年2月以来都内保健所を受診者のエイズ抗体検査(HIV抗体検査)を都立衛生研究所にて実施してきた．本報では保健所経由検体のエイズ抗体検査の1992年3月までの結果について報告する．

方　法

HIV抗体検査は一次スクリーニング検査は酵素抗体法(EIA)(1987年2月－1998年3月はアボット anti HTLV III キット，1988年3月－1989年9月はバイロノスチカ anti HTLV III キット，1989年10月以後はパスツールエラビア EIA キット)を用い，確認検査はウエスタンブロット(WB)法(オーソ HIV ウエスタンブロットキット)および間接蛍光抗体法(IFA)(国際試薬 VIR GO HIV IFA コクサイ)を用いた・一次スクリーニング検査で陽性になったものに対して確認検査を行った．結果の判定は各々のキットの判定基準に従って行った．

1989年10月以後の抗体検査で一次スクリーニング検査で陽性になったもの86件について確認検査の結果をしらべた．確認検査の結果は結果送付書の書式に従って陽性，陰性，3ケ月後再検査の3通りである．

結　果

1987年2月より1992年3月末までの期間に23,551件の検体について抗体検査を実施し，14件の抗体陽性例を検出した．1987年2月より1991年3月末までの4年2ケ月間では検査件数15,857件に対し3件の陽性件数であった．1991年4月より11月までは前年の同時期よりは多少件数の増加がみられたがそれほど顕著ではなかった．1991年12月より，12月993件，92年1月1,071件，2月1,615件，

＊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
＊Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
＊＊同部細菌第一研究科
＊＊＊江戸川区江戸川保健所

3月2,178件と著しい検体数の増加がみられ，陽性件数もこの4ケ月間で7件であった．陽性件数の増加傾向はもうすこし前からみられ，91年4月より92年3月末までの1年間では11件であった(表1)．

89年10月よりのスクリーニング検査陽性例，86件の確認検査の結果をしらべたところ，陽性12件，陰性10件，3ケ月後再検査64件であった．

考　察

日本では献血者集団におけるHIV抗体陽性率は100万人あたり1.6人と報告されるなど，これまで先進国間にあって例外的にHIV感染者の数が少なかった．我々の実施した東京地区における保健所経由検体のHIV抗体検査においても検査を開始した87年2月以来4年余りの期間では検査件数15,857件に対し抗体陽性例は僅かに3件，検査件数約5,000件に1件の割合であった．しかしながら91年4月よりの1年間に検査件数及び抗体陽性件数の急増がみられ，検査件数は7,689件，陽性件数は11件となり抗体陽性率は約700件に1件の割合であった．日本におけるHIV感染者数及びエイズ患者数をモニターしている厚生省のエイズサーベイランス委員会は昨年から感染者数の急増を報告している．我々の結果は東京地区においてもHIV感染者が増加しているのを反映しているかもしれない．

スクリーニング検査陽性例の確認検査の結果であるが，86件中3ケ月後再検査のものが64件もあった．この原因は確認検査に用いているWB法の検査の結果，バンドがウイルスのコア蛋白質の位置のみに出現する検体をキットの判定基準に従ってWB法(±)と判定し3ケ月後に再検査することにしているからである(図1)．その目的は抗体陽性化前にこのようなバンドのみを示す例があるので，経過を追って検査し，抗体陽性化の有無を確認するためである．今後は抗原検出キットを用いての抗原検査，あるいはPCR法を用いてのプロウイルスゲノムの有無の確認などの方法によって再検査の件数を絞ることが検討課題と思われる．

都立衛生研究所においてHIV抗体検査を開始した1987年2月当時は，神戸でエイズ患者が死亡したことがマスコミで報じられるなどしたせいでパニック状態が出現し，抗体検査受診数の一過性の急増がみられたが，その後沈静化し検査件数も減少した．今回の検査希望者の急増が今後いかなる変遷をたどるかは誰にもはっきりした予測はできないが，抗体陽性者が確実に増加している点で前回の騒ぎよりは受診動機に根拠があるともいえる．今後とも検査業務の遂行に努力しつつ動向を見守っていきたい．

ま と め

1．1987年2月より1992年3月までの5年2ケ月間に23,551件のHIV抗体検査を実施し14件の抗体陽性例を検出した．

2．1991年4月より1992年3月の一年間に7,689件の検査を行い抗体陽性者11名を検出した．

3．検査開始以来4年2ケ月間の抗体陽性率は約5,000件に1件であったが，その後の1年間では約700件に1件であった．

4．確認検査の結果，多数の要再検査例があるので今後その扱いを検討していく必要がある．

表1　エイズ検査件数の月別・年次別動向

年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1987 昭62	検査件数		1,728	2,359	1,350	866	662	440	276	296	263	211	193	8,644
	陽性数 スクリーニング		1	10		1		2		3		1	1	19
	確認試験		1											1
年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1988 昭63	検査件数	190	216	229	200	218	224	195	146	189	141	122	171	2,241
	陽性数 スクリーニング													0
	確認試験													0
年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1989 平元	検査件数	153	182	169	167	175	184	166	145	119	139	143	108	1,850
	陽性数 スクリーニング			1						1	2			4
	確認試験			1										1
年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1990 平2	検査件数	139	163	127	168	142	171	136	150	147	227	233	249	2,052
	陽性数 スクリーニング	2	1	1		3			1	1		1	1	11
	確認試験									1				1
年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1991 平3	検査件数	463	336	276	193	219	235	220	185	209	227	344	993	3,900
	陽性数 スクリーニング		1			2	6	1	6	1	2	3	9	31
	確認試験						2		1			1	1	5
年度		月別検査件数 Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	計
1992 平4	検査件数	1,071	1,615	2,178										4,864
	陽性数 スクリーニング	4	16	22										42
	確認試験		1	5										6

試験方法：

1986.2-1988.3　アボット anti HTLV III　　アボット社
1988.3-1989.9　バイロノスチカ anti HTLV III　　オルガノテクニカ社
1989.10-　　パスツールエラビア EIA　　パスツール社

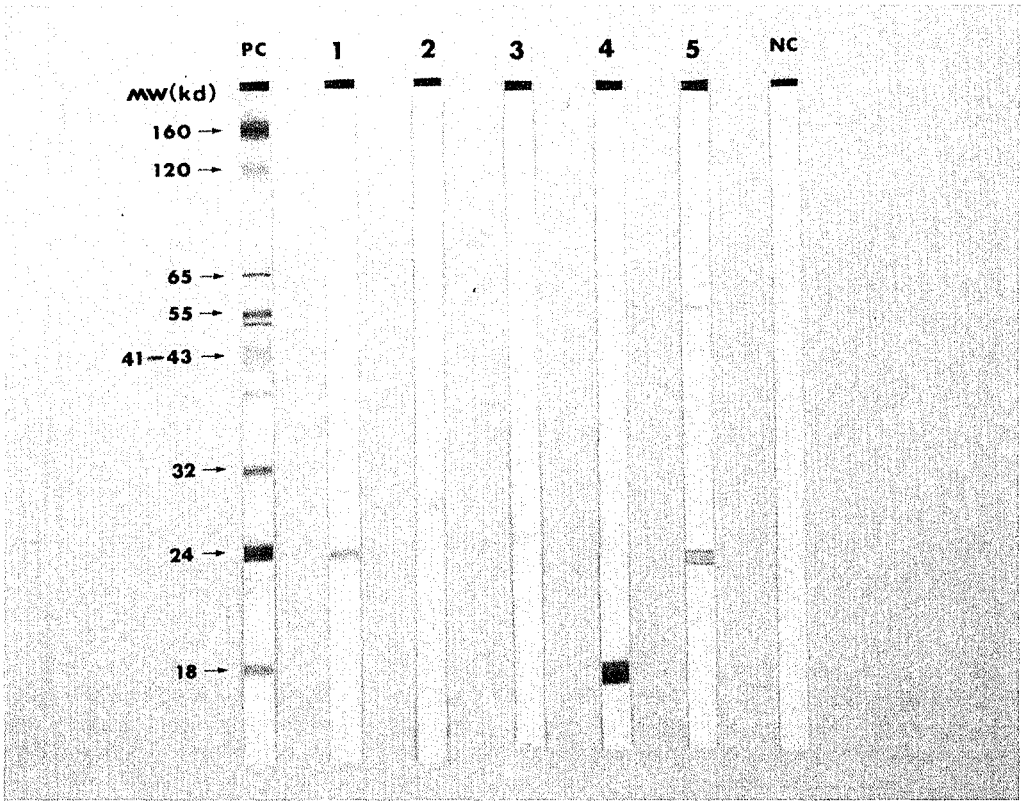


図1．Western blot 法による抗 HIV-1抗体の解析

PC　：陽性検体
1-4　：判定保留検体（p24）
5　　：抗p24モノクロナル抗体
NC　：陰性検体

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 17-21, 1992

Nested-PCR 法によるヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-I）ゲノムの検出

貞升健志*, 大貫奈穂美*, 伊藤忠彦*, 関根大正*
太田建爾**, 寺山武***, 三木隆****, 柳田昌彦*****

Detection of HTLV-I Proviral Genome by the Nested-Polymerase Chain Reaction

KENJI SADAMASU*, NAHOMI OHNUKI*, TADAHIKO ITO*, HIROMASA SEKINE*, KENJI OHTA**, TAKESHI TERAYAMA***, TAKASHI MIKI**** and MASAHIKO YANAGIDA*****

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) proviral DNA was detected in the HTLV-I infected T-cell cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of anti-HTLV-I antibody positive women by the nested-polymerase chain reaction (PCR). It was possible to detect one copy of HTLV-I proviral genome in the cell lines.

Of the 20 samples which were antibody-positive or indeterminate by the Western blot assay and indirect immunofluorescence testing, 20 were positive by the nested-PCR of the pX region, and 19 were positive by that of the polymerase region.

These results indicate that the nested-PCR is useful as a confirmation test of the anti-HTLV-I antibody test and that it can be applied for an early diagnosis of perinatal infection.

Keywords：ヒトT細胞白血病ウイルス human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)，ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction (PCR)，二段階 PCR 法 nested-PCR

緒　言

Human T-cell Lymphotropic Virus Type Ⅰ (HTLV-I) は，Adult T cell Leukemia(成人T細胞白血病;ATL)の病原体として1980年から1981年にかけて明らかにされたレトロウイルスである[1]．このウイルスは HTLV-I Associated Myelopathy (HAM) 及び Tropical Spastic Paraparesis (TSP) の病原体としても知られている．我が国では約100万人の感染者がいて年間約500人の ATL 患者が発生するといわれている．日本国内では九州，南四国など南西部に最も多い．

ウイルスが発見されてすでに10年を経過しているが，抗体検査法にはまだ種々の問題点が指摘されている．

抗体検査法にはスクリーニング法としてゼラチン凝集(PA)法，酵素免疫抗体(ELISA)法があり，確認検査法としては間接蛍光抗体(Indirect Immunofluorescence; IF)法及びウエスタンブロット(WB)法がある．いずれの方法についても市販キットがすでにあり，広く利用されている．スクリーニング法では偽陽性反応が出現することがある[2]．IF 法は特殊な技術が必要で判定が困難な場合があり，WB 法は WHO の定める判定基準[3]を満足するキットが国内ではまだ発売されていない．また，IF 法及び WB 法キット相互間の不一致例も少なくない[4]．さらに，母児感染の早期診断には，母親由来の移行抗体が1年近く子供の血液中に残存するため，その間には抗体

*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
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
**細菌第一研究科
***微生物部
****江戸川区江戸川保健所
*****都立築地産院，都立荒川産院，都立大塚病院，都立台東病院，都立豊島病院，都立府中病院，都立墨東病院，都立母子保健院，都立広尾病院

検査では児の感染の有無を判定できない．以上の理由から，抗体検査に依存しない確認検査法が強く望まれていた．

これらの問題点を解決する方法の一つとしてpolymerase chain reaction(PCR)法がある[5,6]．

HTLV-Iは約9,000塩基からなるRNA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，より安定なプロウイルスゲノムとして宿主細胞内のDNAの中に組み込まれ，細胞分裂の際にも安定した状態で維持される．

従って，ウイルス粒子(RNA)そのものよりプロウイルスゲノム(DNA)を標的とした方が有利であると考え，プローブを必要としないnested-PCR法[7,8]を開発し，その有用性を確認したので報告する．

材料および方法

1．細　胞

PCR法用の陽性コントロールとしてHTLV-I感染細胞のMT-2細胞及びMT-4細胞を用いた．

各領域のプライマーペアのPCR法による検出感度を確かめるために，HTLV-I非感染細胞のCEM細胞75,000個中にHTLV-I感染細胞のMT-2細胞またはMT-4細胞を各々1,000，100，10，1，0.1，0.01個の割合に含むように希釈系列を作り，nested-PCR法によるHTLV-Iプロウイルスゲノムの検出感度を検討した．

2．供試試料

都内病産院にてHTLV-I抗体スクリーニング法陽性とされた母体血液20検体を対象とした．すべての検体はEDTA-2Naを加えて採血し，採血後24時間以内に下記により単核球分離を行った．

3．抗体検査

HTLV-I抗体検査は市販のWBキット(BIO RAD社)及びIFキット(MBL社)を用いて行った．結果の判定については，各キット付属の取り扱い説明書に準じた．

4．単核球分離

フィコールパーク(Pharmacia)1容上に，PBS(-)で2倍に希釈したEDTA-2Na加血液2容を静かに重層し，1,800 rpmで30分間遠心して単核球分画を得た．単核球はPBS(-)にて洗浄後，細胞数を計算し1.5×10^6個をエッペンドルフチューブに移し，DNA抽出に使用した．残りの細胞は液体窒素ボンベ内に保存した．

5．DNAの抽出

Ouら[5]の方法を一部改良した方法を用いて行った．エッペンドルフチューブに移した単核球試料を遠心してPBS(-)を除き，滅菌蒸留水223 μl，Ouらの報告で述べられたLysis bufferの10倍濃度としたもの(100mM Tris-HCl pH8.3，500mM KCl，25mM $MgCl_2$，10mg/ml gelatin，4.5% NP40，4.5% tween20)25 μlとproteinase K(10mg/ml)2 μlを加え，56℃で1時間処理した．ついで95℃，10分処理してproteinase Kを不活化後，PCR用DNA試料(細胞75,000個/12.5 μl/vial)として用いた．なおPCR法を実施するまで-20℃にて保存した．

6．PCRおよび特異的遺伝子の検出

PCRはPerkin Elmer Cetus社のGeneAmp ™キットを用いて，nested-PCR(2 step PCR)法で実施した[8]．1st-step，2nd-stepともに反応volumeは50 μlにて実施し，反応濃度は，50mM KCl，10mM Tris-HCl(pH.8.3)，1.5mM $MgCl_2$，0.001% gelatin，0.1% BSA，200 μM dNTP，Taq polymerase 1 U/50 μlであり，各プライマー濃度は1.0 μMで行った．1st-stepは，各抽出DNA 12.5 μl(DNA 0.5 μg＝細胞約75,000個)をテンプレートとし，1st-step用プライマーペアを用いて94℃1分，53℃1分，72℃1分で30サイクルの反応を行った．PCR反応はPC-600(ASTEC)を使用して行った．

1st-step終了後，反応液の蒸発を防止するために重層したmineral oilを除去後，クロロフォルムを加えてvortex処理した後，12,000rpmにて遠心して上清を得た．

次にこの上清3 μlをテンプレートとし，2nd-step用プライマーペアを用いて1st-stepと同条件でPCRを25サイクル行った．

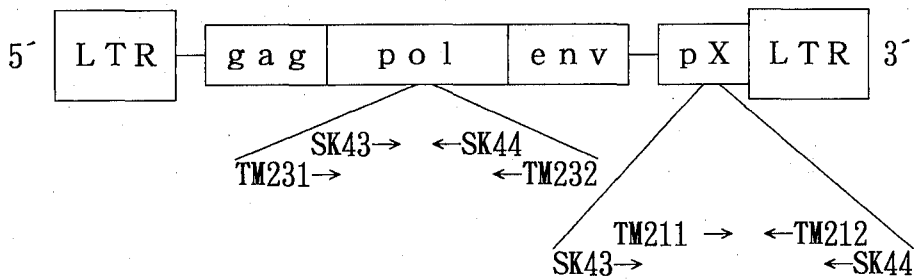
2nd-step終了後，5 μlをエチジウムブロマイド加1.5%アガロースゲルにて電気泳動し，陽性対照と対比される特異的バンドを認めたものをゲノム検出と判定した．

使用したプライマーは，pX領域を標的としたPCRでは，1st-step用プライマーとしてSK 43/44[6]を用い，2nd-step用プライマーとしてTM 211/212 (pX 7362-7381/pX 7463-7444[9])を用いた．pol領域を標的としたPCRでは，1st-step用プライマーとしてTM 231/232 (pol 3322-3341/pol 3535-3516)を用い，2nd-step用プライマーとしてSK 54/55[6]を用いた(Fig. 1)．　TM 211/212及びTM 231/232については，Seikiら[9]およびMalikら[10]の報告を参考にして各ウイルス株に共通な部分をプライマーとして合成した．

結　果

1．PCRによる各プライマー領域の検出感度

10倍濃度のLysis buffer(Ou変法)を用いれば，フェノール，クロロフォルムなどを用いて再抽出しなくても



pol	TM231	AACTCCTACCTTACGCCAGC
	TM232	CACTACAGTAGTGGTGCCAG
	SK54	CTTCACAGTCTCTACTGTGC
	SK55	CGGCAGTTCTGTGACAGGG
pX	SK43	CGGATACCCAGTCTACGTGT
	SK44	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
	TM211	ACTGTGTACAAGGCGACTGG
	TM212	CAGGTGATCTGATGCTCTGG

Fig. 1. Nucleotide sequence of oligonucleotide primers used in the nested-PCR and their locations in the HTLV-I genome.

十分 PCR 法用の DNA を抽出することができることが分かった.

pX 領域の PCR では CEM 細胞75,000個中 MT-2 細胞 10^{-1}個を含む試料まで検出することができたが, pol 領域では CEM 細胞75,000個中 MT-2 細胞 1 個を含む試料までの検出が可能であり(Fig. 2), pX 領域の方が pol 領域より感度がよかった. 一方, MT-4 を用いた実験では pX 及び pol ともに10^{-1}個までの検出が可能であった(Table. 1).

以上のことから, MT-4 または MT-2 細胞 1 個未満からのプロウイルスゲノムの検出が可能であり, いずれの細胞内にも 1 から10コピー以上の HTLV-I ゲノムが存在することが示唆された.

Table. 1 Detection of provirus genome of HTLV-I infected cell lines (MT-2 and MT-4) using the nested-PCR with pX and pol primer pairs.

		cells/7.5×10⁴ CEM cells					
		10^3	10^2	10^1	10^0	10^{-1}	10^{-2}
MT-2	pX	+	+	+	+	+	−
	pol	+	+	+	+	−	−
MT-4	pX	+	+	+	+	+	−
	pol	+	+	+	+	+	−

"+" was to be detected.

2. 陽性者のリンパ球を用いた PCR

20検体中 IF 法または WB 法にて HTLV-I 抗体陽性と診断されたのは19検体であり(95%), 1 検体については IF 法および WB 法において判定保留となった. 20検体すべてについて, pX 領域及び pol 領域で nested-PCR を行ったところ, pX 領域ではすべての検体においてゲノムが検出されたが(100%), pol 領域では19検体(95%)でゲノムが検出された(Table. 2), 2 領域ともにゲノムが検出された検体は, 20検体中19検体(95%)であった.

考 察

HTLV-I は約9000塩基からなる RNA ウイルスである. HIV-1 と同じレトロウイルスであるが, レンチウイルス亜科ではなく, オンコウイルス亜科に属する.

ゲノム構造は両端にLTR(long terminal repeat)を持ち, gag(ウイルス粒子コア蛋白), pol(逆転写酵素), env(ウ

Table. 2 The results of provirus genome detection by the nested-PCR and HTLV-I antibody detection by IF and WB in the blood material of screening test positive cases for HTLV-I antibody.

NO. of samples (n=20)	NO. of samples positive by: IF	WB	PCR pX	PCR pol
20	19	19	20	19

イルス表面の糖蛋白)及びpX(発現調節蛋白)遺伝子を持つ[9]．また，HTLV-IはHIV-1に比べて変異が少なく，細胞内のコピー数も多いことから，PCR法により診断する対象として有利である．

nested-PCR法の検出感度については，MT-2またはMT-4細胞10^{-1}個に相当するDNAからのプロウイルスゲノムの検出が可能であった．MT-2細胞1個内には，pX遺伝子約10コピーが存在することから[11]，我々の方法では1コピーあれば検出できるものと考えられる．本来，PCR法にはRIやジゴキシゲニン[12]などで標識したプローブが不可欠であるが，PCRを2回繰り返すnested-PCR法を用いれば，プローブを用いずに1コピー程度のゲノム検出が可能である．さらに，PCRを2回繰り返すとは言え，プローブの標識，サザンブロットなどによる手間が省けるため，迅速診断も可能になると思われる．

今回，スクリーニング検査陽性例20検体中20検体(100%)で，pX領域のPCR法でゲノムが検出されたことから，我々のnested-PCR法の有用性が示された．しかしながら，抗体検査判定保留例の1例についてはpX領域でゲノムが検出されたものの，pol領域では検出できなかった．この1例については，欠損ウイルスなのか[13,14]，ゲノム数が少ないことによるものか[15]，あるいはミューテイションによるものかは現在のところ不明である．今後，PCR法の判定基準を含めて，新しいプライマーによる検索等により明らかにしていきたい．

また，nested-PCR法をHTLV-Iのルーチン検査に用いる上での問題点の一つとして，コンタミネーションが挙げられる．一般に，PCR法を2回繰り返すことにより，コンタミネーションが増えると考えられているが，DNAの抽出法として，細胞に溶解液を加えて熱処理するという簡便な方法を採用すること，並びにpre-PCR室，post-PCR室とDNAを扱う部屋を分けることにより，DNA抽出及びPCR操作中のコンタミネーションを減少させることができるものと思われる．

nested-PCR法は抗体検査と同程度の感度でウイルスゲノムの検出が可能であったことから，抗体検査法の確認検査としてかなり有効であることが明らかになった．

また，抗体検査では避け難い抗体検査判定保留例や，移行抗体の存在により抗体検査法では感染の有無を判定できない母児感染例の確認試験法としても，今後有用な方法と思われる．

ま と め

HTLV-I抗体スクリーニング陽性血液試料からnested-PCR法によりプロウイルスゲノムを検出することにより，HTLV-I感染を診定する方法を検討し，以下の結果を得た．

1．10倍濃度のLysis bufferにより，PCR法への直接使用が可能であった．
2．75,000個のCEM細胞中10^{-1}個のHTLV-I感染細胞の検出が可能であった．
3．HTLV-I抗体スクリーニング陽性20検体中20検体でpX領域のゲノムが検出され(100%)，19検体(95%)でpol領域のゲノムが検出された．

文 献

1) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M.: *Proc Natl Acad Sci USA* 78：6476-6480, 1981.
2) 鈴木恵美子，千田大作，渡邊 徹，他：臨床検査機器・試薬 **13**(1) 107-110.
3) *Wkly Epidem. Rec.*: **65**. 281-288, 1990.
4) 渡邊 徹，柳田昌彦，千田大作，他：日本医事新報，3392，31-34. 1989.
5) Ou C-Y., Kwok S., Mitchell SW., et al: *Science*, **239**, 295-297, 1988.
6) Kwok S., Ehrlich G., Poiesz R., et al: *Blood*, **72**(4), 1117-1123, 1988.
7) Matumoto C., Mitsunaga S., Oguchi T.: *J Virology*, **64**, 5290-5294, 1990.
8) 貞升健志，関根大正，大貫奈穂美，他：HIV感染者発症予防・治療に関する研究班 平成2年度報告書 81-87, 1991.
9) Seiki M, Hattori S., Hirayama Y., et al:*Proc, Natl. Acad. USA*, **80**, 3618-3622, 1983.
10) Malik K. A, Even J., Karpas A.: *J. Gen. Virol.* **69**, 1695-1710, 1988.
11) Durand JM., Kaplanski G., Lefevre P. et al: *J Infect Dis* **165**, 779-780, 1992.
12) 貞升健志，大貫奈穂美，関根大正，他：東京衛研年報，**42**，8-13，1991.
13) Watanabe, T.: *Virology*, **133**, 238-241, 1984.
14) Suetake N., Takeuchi Y., Shimizu Y., et al: *J Caner Res Clin Oncol*,**115**, 279-284, 1989.
15) Korber B., Okayama A., Donnell R., et al: *J Virology*, **65**, 5471-5476.

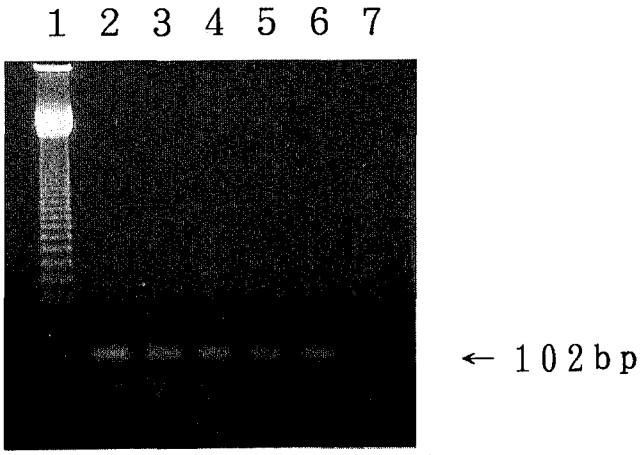


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of HTLV-I proviral genome amplified by the nested-PCR.
DNA samples for in vitro amplification by PCR were prepared from vials containing 1,000 (lane 2), 100 (lane 3), 10 (lane 4), 1 (lane 5), 0.1 (lane 6), and 0.01 (lane 7) of MT-2 cells, respectively.
Nested-PCR was performed by using two sets of primer pairs for HTLV-I pX region, and HTLV-I DNA sequences were detected in the amplified products by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 23-26, 1992

1991年世界エイズデーに東京都で実施された無料街頭検診におけるエイズ及び性感染症の血清学的調査

貞升健志*, 大貫奈穂美*, 吉田靖子*, 矢野一好*
新開敬行*, 関根大正*, 太田建爾**, 堀幹郎***
石上武***, 寺山武****, 三木隆*****, 本保善樹******
前田秀雄******, 中村清純******, 石井明子******

Serological Survey for Antibodies against HIV-I and Other Sexually Transmitting Agents in Tokyo on World AIDS Day 1991

KENJI SADAMASU*, NAHOMI OHNUKI*, YASUKO YOSHIDA*,
KAZUYOSHI YANO*, TAKAYUKI SHINKAI*, HIROMASA SEKINE*,
KENJI OHTA**, MIKIO HORI***, TAKESHI ISHIGAMI***,
TAKESHI TERAYAMA****, TAKASHI MIKI*****, YOSHIKI HONBO******,
HIDEO MAEDA******, KIYOSUMI NAKAMURA****** and AKIKO ISHII******

Keywords：後天性免疫不全症候群 acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), ヒト免疫不全ウイルスI型 HIV-I, 世界エイズデー world AIDS day, 性感染症 sexually transmitted diseases (STD)

緒　言

日本における後天性免疫不全症候群(エイズ)患者は1992年4月現在473人で，ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)感染者数は2,077人と報告されており，他の先進諸国と比較して格段に少ない．さらに，HIV感染者のうちの大部分は血液製剤に起因するものとされている．血液製剤による感染は輸血の監視体制が確立されたことにより，今後，新たな感染はなくなるものと思われる．その他の感染経路として，麻薬静注者にみられる注射器の相互利用による感染，男性同性愛者間の感染，母子感染，異性間性行為感染がある．日本における今後の動向を考えた場合，麻薬静注や男性同性愛者間感染よりは，アフリカ及びタイで代表されるような異性間感染が主体になっていくものと予想される．特に，東京都は日本の玄関であり，国際都市として様々な国から多くの人々が訪れることから，輸入感染症としての対応が必要であろう．

異性間の性的接触により感染する感染症としては，1948年に施行された性病予防法により指定されている性病(梅毒，淋病，軟性下かん，そけいリンパ肉芽腫)があるが，これら以外に現在では性行為により感染する様々な疾病が存在しており，これらをより大きな概念として性感染症(STD=Sexually Transmitted Disease)と称している．HIV感染はB型肝炎，クラミジア症などとともに，STDとしても位置づけされている．特に，*Treponema pallidum*, Herpes simplex virus type 2, *Chlamydia trachomatis* などはHIV感染を促進するとともに報告されていることから[1]，ある集団におけるHIVおよび他のSTD感染率を調査することは重要な意味をもつものといえよう．

*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
*Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
**細菌第一研究科
***細菌第二研究科
****微生物部
*****江戸川区江戸川保健所
******東京都衛生局医療福祉部

世界エイズデーは，1988年に行われたエイズ予防プログラムに関する世界サミットで，エイズへの関心，エイズに関する経験と情報の交換を強力に推進することを目的に提唱された年1回の日(12月1日)である．現在，この日には世界各地で数千のイベントが行われている．

東京都においても，1989年からイベントの一つとして，希望者に無料でHIVおよび他のSTD感染の有無を検査してきている[2]．

本報では1991年世界エイズデー(1991年12月1日)に東京都内で実施した集団無料検診におけるHIV-1，B型肝炎ウイルス(HBV)，C型肝炎ウイルス(HCV)及び梅毒抗体検査の結果について報告する．

方　法

1．材　料

無料街頭検診は1991年12月1日に，東京都庁舎前(都民広場)で実施された．本検診を受診した335名(男性254名，女性79名)を対象に検査を行った．

2．検査項目及びその方法

1）HIV-1抗体検査：HIV-1抗体検査は一次スクリーニングとして酵素抗体法(ELISA法：パスツールエラビアEIA)または粒子凝集法(PA法：セロディアHIV)を用い，確認試験にはウエスタンブロット(WB法：オーソHIVウエスタンブロットキット)を用いた．ELISA法についてはカットオフ値(OD=0.300)以上のものを，PA法では凝集像の認められたものについて一次スクリーニング陽性とし，WB法の判定はキット付属の使用説明書に従って行った．

2）HIV-1抗原検査：血清からのHIV-1抗原検査はHIV抗原EIAアボットを用い，血餅から抽出したDNAを用いたPCR法では，gagのプライマーペアを用いたnested-PCR法[3]にて実施した．

3）B型肝炎抗体・抗原検査：HBs抗体検査は，ELISA法(エルジア-Anti-HBs：国際試薬)を用いて行った．HBs抗原検査も，ELISA法(エルジア-HBsAg：国際試薬)を用いて行い，ELISA法弱陽性の検体については中和試験を実施して確認した．

4）C型肝炎抗体検査：C型肝炎抗体検査はELISA法(HCV・EIAⅡアボット)を用いて行い，陽性のものについてはイムノブロッティング法(カイロンHCV RIBAテスト)を用いて確認検査を行った．

5）梅毒抗体検査：梅毒検査はTPHA及びガラス板法で行った．

結　果

1．HIV-1抗体検査

335例中スクリーニング検査で陽性となったのは3例(0.9%)で，これらについて確認検査を行った結果1例(0.3%)が陽性となった(表．1)．この1検体の受診者は前年度の検診も受診していることが分かり，-20℃にて保存しておいた前年度の血清について，WB法並びにHIV抗原検査を行ったが陰性であった．また，併せて保存しておいた前年度血餅からDNAを抽出しnested-PCR法によりHIV-1ウイルスゲノムの検査を実施したが，陽性所見は得られなかった．なお，この検体はHBs抗体陽性であった．

2．HBV検査

HBs抗体が陽性だった検体は60例(17.9%)であり，そのうちHIV-1陽性が1例(1.6%)，HCV陽性1例(1.6%)，梅毒はTPHA(＋)・ガラス板法(＋)が1例(1.6%)，TPHA(＋)・ガラス板法(－)が2例(3.3%)であった．

HBs抗原が陽性だった検体は10例(3.0%)であった．

HBs抗原が陽性で，他のSTD検査が陽性の例はなかった．

3．HCV検査

HCV抗体検査でスクリーニング検査陽性は5例(1.5%)認められ，そのうち4例が確認検査法でHCV

表1．無料街頭検診者335名におけるSTD検査結果

	No. of samples	HIV	HBs抗体	HBs抗原	HCV	梅毒 ガラス板法	梅毒 TPHA法
No. of samples	335	1	60	10	4	6	9
HIV抗体	1	−	1	0	0	0	0
HBs抗体	60	1	−	0	1	3	1
HBs抗原	10	0	0	−	0	0	0
HCV抗体	4	0	1	0	−	0	0
梅毒抗体 ガラス板法	6	0	3	0	0	−	4
梅毒抗体 TPHA法	9	0	1	0	0	4	−

抗体陽性(1.2%)であった．4例中1例はHBs抗体も陽性(25.0%)であった．

4．梅毒検査

梅毒抗体検査のうちTPHA法で9例(2.7%)が陽性で，ガラス板法で6例(1.8%)が陽性であった．両方法で陽性だった検体は4例(1.2%)であった．このうち，TPHA法で陽性のもの9例中3例(33.3%)がHBs抗体陽性で，ガラス板法陽性のもの6例中1例(16.7%)がHBs抗体陽性であった．

考　察

1989年世界エイズデーから始まった東京都内における集団無料検診も今回で3回目である．1989年8人，1990年137人[2]，1991年335人と年々受診者が増加する傾向にある．このことはマスメディアなどを用いた宣伝の影響も考えられるが，エイズに対する関心を持つ人が年々増えてきていることが背景にあると考えられる．

本集団についての受診動機については，すでに石井らが報告しているが[4]，75.8%は男性，23.6%は女性であり，受診要因が男性に高いことを意味するものと推察される．しかし，検査機会に関するアンケート調査で，男性同性愛者は10%強であり，受診要因がそれ以外にもあることを示している．

検査が「受けやすい」と回答した者は63.9%で，その理由としては「無料」が63.1%，「手続きが簡単」が59.3%と半数以上を占めており，「匿名」を理由に上げた人は20.6%であった．

通常，都内保健所においてもAIDS検査を実施しているが，受診料(1,600円)負担があること，予約を必要とするなど，手続きが必ずしも簡単でないことなどの理由から，この集団が保健所でエイズ検査を受診している集団とは若干異なった構成である可能性が考えられる．このことから，この種類の街頭検診は通常の保健所受診集団とは異なる集団とみなすことができ，これらの集団におけるHIV感染並びにその他のSTD感染の実態を知ることは意義あるものといえよう．

本集団でのHIV-1抗体陽性者は1例(0.3%)であったが，献血者を対象にした検査では0.00049%との報告があり[5]，保健所における我々の調査0.06%よりも高い．

なお，本集団におけるHIV-1陽性者は前年度に実施した検診も受診していたことがその後の調査で判明した．

そこで，保存しておいた検体のHIV-1抗原検査をELISA法及びPCR法により実施したところ，陽性所見が得られなかったことから，前年度の検査日以降のHIV-1感染が示唆された．また，本検体はHBs抗体陽性であったが，前年度の検査時にすでにHBs抗体陽性であった．

HCV及びHBVは，HIVと同様の感染経路により伝搬すると言われている．HIV-1感染者の3-8%がHCVに感染しているという報告もあり[6,7]，STD感染のマーカーとしても重要である．一般献血者のHCV抗体陽性率は，1.15%との報告があり[8]，本集団はほぼ同様の値を示している．

HBVについては，HBs抗原及びHBs抗体を検査した．

HBs抗原が検出されるということは，感染性のB型肝炎ウイルスが体内に含まれている可能性が高いことを意味している．一般に日本において，HBs抗原陽性者は1.9-2.0%との報告があるが[9]，本集団はそれよりやや高めの値を示している．

HBs抗体が血中に検出されることは，過去にHBVの感染を受け，すでに治癒したか，あるいはHBVのワクチンの接種を受けたかのいずれかの状態を示す．一般のHBs抗体陽性率は20～30%であることから[9]，本集団におけるHBs抗体陽性率は特に高いとはいえない．本検診におけるHBs抗体陽性者60例の中にはHIV-1陽性が1例(1.6%)，HCV陽性が1例(1.6%)，梅毒はTPHA(+)・ガラス板法(+)が1例(1.6%)，TPHA(−)・ガラス板法(+)が2例(3.3%)に認められた．

梅毒の病原菌である*Treponema pallidum*は，HIV-1感染を促進し，HIV-1感染者の8.9%が梅毒陽性という報告がある[1]，しかしながら，本集団におけるHIV-1陽性者は梅毒陰性であった．

東京都における梅毒感染は0.494%(人口10万人あたり494人)，日本全国では0.0015%(人口10万人あたり1.5人)との報告がある[10]．本集団は1.19%であり，東京都のそれの2.4倍，日本全国のそれの800倍であった．

以上のことから，本集団はHIV-1，HBV，梅毒感染率の比較的高い集団であることから，これらの感染ルートを考えると性的接触活動が相対的に活発な集団と考えられる．

石井らは本集団におけるクラミジアの陽性率が女性で43.0%，男性でも29.5%と報告しているが[4]，女性でのこの値は東大産婦人科における陽性率の5倍を示し，性的接触活動の活発な集団であることの推測を裏付けるものと思われる．

通常では検査のために医療機関を訪れない集団の検査を実施することは隠れたHIV感染者を発見するだけでなく，前述のようにHIV感染との関連性を思考する上にも意義あるものと思われる．今後もこのような集団に

おける検査を実施し，各STD間の感染の相互関係についてさらに調査していく予定である．

まとめ

1．1991年世界エイズデーに東京都で実施した無料街頭検診に335名が受診した．

2．335名中HIV-1陽性が1名(0.3%)，HBs抗体陽性が60名(17.9%)，HBs抗原陽性が10名(3.0%)，HCV抗体陽性が4名(1.2%)，梅毒陽性がガラス板法で6名(1.8%)，TPHA法で9名(2.7%)に見られた．

3．各STD感染の間に特別な関係は認められなかった．

文献

1) Moss GB., Kreiss JK.: *Med Clin North Am*; **74**, 1647-1660, 1990.

2) 大貫奈穂美，貞升健志，関根大正，他：東京衛研年報，**42**，5-7，1991.

3) 貞升健志，関根大正，大貫奈穂美，他：HIV感染者発症予防・治療に関する研究班　平成2年度研究報告書，81-87，1991.

4) 石井明子，中村清純，菅谷愛弓，他：厚生省HIV疫学研究班平成3年度報告書，99-101，1992.

5) 清水勝：厚生省HIV疫学研究班平成元年度報告書 54-58，1990.

6) Malone JD., Hyams KC., Smith ES., et al: *J Acquir Immun Defic Syndr*, **5**：427-428，1992.

7) Sherman KE., Freeman S., Harrion S., et al: *J Infect Dis*, **163**，414-415，1991.

8) 西岡久壽彌：日本臨牀第**49**巻，2号7-12，1991.

9) 飯野四郎：B型肝炎とB型肝炎ウイルス，ライフサイエンス67.

10) 厚生省大臣官房統計情報部編　平成2年伝染病統計 96-107.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 27-32, 1992

1984年から1991年までの8年間における売春容疑者のリン菌保有率と分離菌株の保有プラスミドおよび薬剤感受性

石上　武*，堀　幹郎*，長　昭**

Studies on Gonorrhea in Tokyo : Its Prevalence in Prostitutes and Antimicrobial Susceptibility and the Contents of Plasmid of the Isolates in 1984-1991

TAKESHI ISHIKAMI*, MIKIO HORI* and AKIRA TYO**

Keywords：リン病 gonorrhea, β-ラクタメース産生ペニシリン耐性リン菌 penicillinase producing *Neiseria gonorrheae* (PPNG), 薬剤感受性 antimicrobial susceptibility, プラスミド plasmid, 街娼 prostitute

はじめに

わが国で初めてβ-ラクタメース産生ペニシリン耐性リン菌(PPNG)が1977年に分離されて[1]以来，リン病届出患者数[2]は増加し続け，1984年までの7年間に約2.8倍に達し，PPNGの分離率も1980年代半ばまで増加傾向を示し約20%[3]に達した．しかし，1980年代後半においては，リン病届出患者数・PPNG分離率ともに減少傾向となった．この1980年代後半は，社会的背景として新風俗営業法の施行(1985年)やエイズ報道(1987年)が行われた時期であった．

今回私たちは，リン病届出患者数の最も多かった1984年から減少傾向を続ける1991年までの8年間東京都内において売春容疑により検挙された女性についてリン菌保有率及び分離菌の薬剤感受性を調査した．なお，分離菌の保有するプラミスドパターンについては，1981年までさかのぼり検討した．以下はその成績である．

調査対象と方法

1．調査対象

対象は1984年1月から1991年12月までの8年間に，都内で売春容疑で検挙され，性病予防法第11条の定めるところにより東京都医療福祉部結核感染症課分室において検診を受けた女性(以下街娼という)合計832名である．

2．調査方法

検体採取および輸送，リン菌の分離同定，β-ラクタメース産生能，分離菌株の薬剤感受性試験については前報[4]と同様に行った．

分離されたリン菌の保有するプラミスドについては，リン菌をTBE-buffer(90mM Tris, 90mM Boric acid, 2.5mM EDTA-Na_2)に浮遊後lysing solution(3% SDS, 0.05M Tris, PH.12.6)で溶菌し，フェノール：クロロホルム(1：1)で抽出し，遠心(15,000rpm, 5 min.)上清を0.7%寒天ゲルを用いて電気泳動を行いその大きさを測定した．

成　績

1．検挙された街娼の数，年齢構成および住居地の年次推移

図1に示すように検挙された街娼数は1989年まで減少傾向にあったが，1990年以降は増加がみられた．街娼に占める外国人名も，国籍は定かではないものの1988年まではそのほとんどは漢字名の者であった．しかし，1989年にはカタカナの外国人名が全体の1/4を占める程に増加し，1990年には約3/4，1991年には92%とそのほとんどを占めた．

街娼の年次別年齢構成を図2に示した．調査期間中に検挙された街娼の年齢は14歳から68歳までの広い範囲に

*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
**東京都衛生局医療福祉部結核感染症課

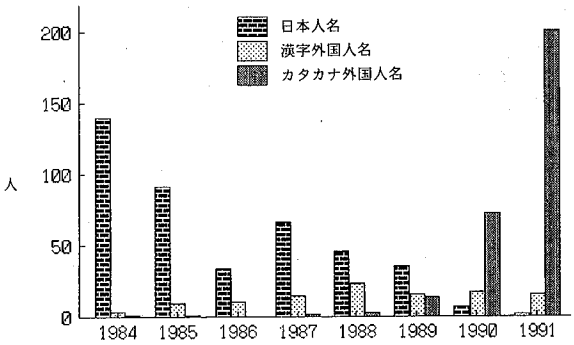


図１．検挙された街娼数の年次別推移

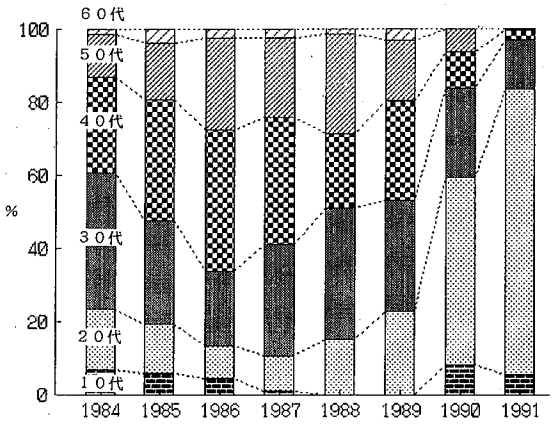


図２．街娼の年次別年齢構成

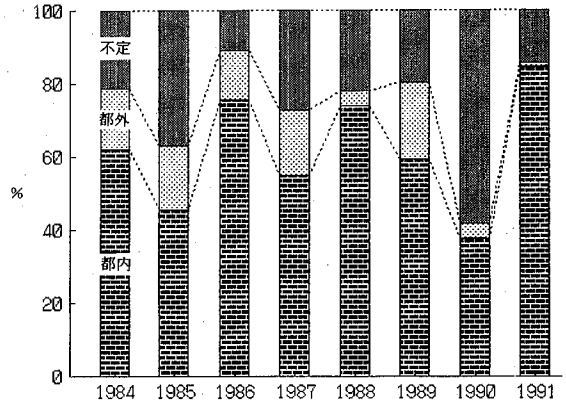


図３．街娼の住居地別年次構成

及んだ．また1989年までのその年齢構成は30代，40代あるいは50代のうち２つで全体の約60％を占め，20代は約15％あるいはそれ以下であった．しかし，1989年から1991年までの20代が23％，51％，78％と増加したのに対し，1990年と1991年には60代が０になるなど街娼の低年齢化がみられた．

表１　年次別リン菌保有率及びPPNG分離率

年	件数	リン菌保有数(%)	PPNG分離数(%)*
1984	145	38(26.2)	3(7.9)
1985	103	12(11.7)	1(8.3)
1986	45	7(15.6)	— —
1987	84	12(14.3)	— —
1988	73	7(9.6)	— —
1989	66	9(13.6)	— —
1990	98	6(6.1)	— —
1991	219	18(8.2)	3(16.7)

*：PPNG分離数/リン菌保有数×100

街娼の年次別の住居地別構成比を図３に示した．街娼の住居地は，カタカナ外国人名数が多くなった1990年に住居不定者が約60％と高かったものの，それ以外の年では半数近くあるいはそれ以上が都内であった．住居地を都外とする街娼は，1988年を除き1989年までは約15％から20％の間を推移していたが，1990年から1991年にはそれぞれ4.1％，0.9％と減少がみられた．

２．街娼のリン菌保有率とPPNG検出率

表１に年次別のリン菌保有率と分離リン菌に占めるPPNG検出率を示した．街娼のリン菌保有率は1984年に26.2％と高率であったが，それ以降は15.6％から6.1％と比較的低率であり，減少傾向がみられた．

PPNG株は1986年から1990年までは分離されなかったが，1991年の検出率は16.7％と，1984年および1985年の検出率7.9％および8.3％の約２倍であった．

３．分離したリン菌の保有するプラスミドパターン

分離したリン菌の持つプラスミドパターンを年次別に表２に示した．non-PPNGおよびPPNGを問わず24.5Mdのプラスミドを保有するリン菌の割合は，1981年の7.1％から1986年の83.3％と急激な増加を示し，1987-88年には36.4％，28.6％と低下がみられたものの，1989-91年には55.6％から100％と保有率が再度高くなった．また，この11年間に街娼から分離された12株のPPNGは，すべて24.5Mdのプラスミドを有するアジア型であった．

４．分離したリン菌の薬剤感受性

薬剤感受性試験には1984年から1991年までのそれぞれ35，11，５，７，６，８，５，18株の計95株を供試した．1986年以降は外国人名のリン菌保有街娼が多くなったことから，non-PPNG株を1984-85年分離の42株と1986-91

表2 年次別分離菌の保有プラスミドパターン

分離年	菌株数	保有プラスミドパターン 2.6Md	non-PPNG 4.4Md	non-PPNG 24.5Md	PPNG(アジア型) 4.4Md	PPNG(アジア型) 24.5Md	24.5Mdプラスミド保有率(%)
		−	−	+	+	+	
		−	−	−	+	+	
		−	−	+	−	+	
1981	28		1	25	2		7.1
1982	37		2	25	8	2	27.0
1983	31		1	15	12	3	48.4
1984	34			13	18	3	61.8
1985	10			4	5	1	60.0
1986	6			1	5		83.3
1987	11		1	6	4		36.4
1988	7		1	4	2		28.6
1989	9			4	5		55.6
1990	5				5		100.0
1991	18		1	5	9	3	66.7

年分離の46株とに分けた．この2群に1984-91年分離のPPNG 7株の1群を加えた計3群の薬剤感受性の比較を表3に示した．PCGとABPCについてはPPNG 7株をさらに1984-85年の4株，1991年の3株に分けた．なお，MIC 50とMIC 90についてはそれが含まれるそれぞれの薬剤希釈濃度を示した．

PCGにおいてはnon-PPNGの84-85群および86-91群のMIC 50，MIC 90共に差がみられなかったが，PPNG 91群はPPNG 84-85群よりMIC 50，MIC 90ともに4倍低かった．ABPCのnon-PPNG群でも84-85群および86-91群のMIC 50，MIC 90ともに差がみられなかったが，PPNG群では84-85群と91群のMIC 50の差は2倍，MIC 90ではPCGと同様に4倍の差がみられた．PPNG群全体ではnon-PPNG群に比べMIC 50とMIC 90でそれぞれPCGで64倍と32倍，ABPCで256倍と128倍高かった．

CXMではnon-PPNG 84-85群より86-91群においてMIC 50で2倍低く，CFXではnon-PPNG 84-85群より86-91群においてMIC 90で2倍高く，またLMOXではnon-PPNG 84-85群より86-91群においてMIC 50で2倍低かったが，これら3薬剤共にnon-PPNG群とPPNG群での差は認められなかった．

GM, SPCM, KMのMICは狭い範囲にあったが，GMではnon-PPNG 84-85群が86-91群よりMIC 90で2倍高く，KMのPPNG群ではnon-PPNG群よりMIC 50で2倍低かった．しかしSPCMではこの様な差がみられなかった．

TCのMIC 50およびMIC 90においてはこれら3群に差は認められなかったが，CPではnon-PPNG 86-91群が84-85群よりMIC 90において2倍低く，PPNG群ではnon-PPNG群よりMIC 50で2倍高かった．また，EMではnon-PPNG 84-85群より86-91群がMIC 50において2倍高いものの，non-PPNG 86-91群とPPNG群とでは差が認められなかった．

STではnon-PPNG群間においてMIC 50およびMIC 90ともに差は認められなかったが，PPNG群はnon-PPNG群よりMIC 90において2倍高かった．

ROSOのMIC50ではnon-PPNG 86-91群が84-85群より2倍高かったが，PPNG群はそれよりさらに2倍高かった．しかし，MIC 90ではnon-PPNG 86-91群が84-85群より4倍高くなったのに対しPPNG群ではnon-PPNG群より16倍低かった．

考　察

この調査は1981年から始められたが，調査開始以来1988年までの街娼の年齢構成は30代と40代あるいは50代で全体の約60％を占めていたのに対し，1989年以降はカタカナ外国人名の増加とともに20代が多くなってきた．また，街娼のうち都外を住居地とするものは，各年15％から20％であったのが，外国人名の増加と共に減少するなど，この数年街娼の様相の変化とともに，国際化における東京のマイナス面の一端が伺われる．

日本におけるリン病届出患者数は，1977年の4,858名から1984年の約13,500名までほぼ直線的に増加したが，その後減少を続け1990年には約5,500名となった．当所において調査した街娼のリン菌保有率も，調査を開始した1981年の13.7％から年々増加し，1984年には26.2％と高率になったものの，その後は明らかな減少傾向がみられ，リン病届出患者数の推移とほぼ同様であった．

分離されたリン菌の保有するプラスミドについてみると，街娼からまだPPNGが分離されなかった1981年の分離リン菌における24.5Mdのプラスミド保有率は7.1％にすぎなかったが，街娼からPPNGが分離された1982年以降増加し続け1986年の保有率は83.3％にもおよんだ．また1986年から1990年の間にPPNGが分離されなかったのはリン菌分離数が少なかったのも一因であろうが，この間24.5Mdのプラスミド保有率が28.6％まで低下し，その後再度の増加がみられ，1991年には再びPPNGが分離されるようになった．このことはPPNGの耐性が24.5Mdの伝達性プラスミドにより伝達されるということを如実に反映していると考えられる．

また，日本におけるPPNGの年次別分離状況として，1980年代前半にはPPNGの増加がみられ，後半はPPNGの減少が報告[3)5)]されているが，わが国で初めてPPNG

表3　分離菌95株の薬剤感受性

			最小発育阻止（μg/ml PCG は u/ml）																					
			0.008		0.031		0.125		0.5		2		8		32		128							
抗菌剤	分離年	菌株数		0.016		0.062		0.25		1		4		16		64			MIC50		MIC90	
PCG	84-85	non-PPNG 42			1		5	17	9	1	5	2	2						0.25		2	
	86-91	non-PPNG 46				1	16	8	4	7	10								0.25		2	
	84-85	PPNG 4							1						2	1			32		64	
	91	PPNG 3										1	1	1					8		16	
ABPC	84-85	non-PPNG 42		1	4	15	8	7	4	2	1								0.06		0.5	
	86-91	non-PPNG 46		1	10	14	10	5	4	2									0.06		0.5	
	84-85	PPNG 4							1						1	2			32		64	
	91	PPNG 3										1		2					16		16	
CXM	84-85	non-PPNG 42		5	15	9	6	4	1	2									0.06		0.25	
	86-91	non-PPNG 46	1	7	15	5	8	8	1	1									0.03		0.25	
	84-91	PPNG 7			3	2	1	1											0.06		0.25	
CFX	84-85	non-PPNG 42					2	21	10	6	2	1							0.25		1	
	86-91	non-PPNG 46					1	22	12	5	3	3							0.25		2	
	84-91	PPNG 7					1	3	1	1	1								0.25		2	
LMOX	84-85	non-PPNG 42			2	18	18	2	2										0.125		0.25	
	86-91	non-PPNG 46		5	15	5	8	9	3	1									0.06		0.25	
	84-91	PPNG 7			1	2	3	1											0.125		0.25	
GM	84-85	non-PPNG 42									7	29	6						4		8	
	86-91	non-PPNG 46									11	32	3						4		4	
	84-91	PPNG 7									2	5							4		4	
SPCM	84-85	non-PPNG 42											21	21					8		16	
	86-91	non-PPNG 46											22	20	4				8		16	
	84-91	PPNG 7											4	3					8		16	
KM	84-85	non-PPNG 42											9	31	2				16		16	
	86-91	non-PPNG 46										2	12	30	2				16		16	
	84-91	PPNG 7											4	3					8		16	
TC	84-85	non-PPNG 42						6	15	13	5	3							0.5		2	
	86-91	non-PPNG 46					1	4	17	13	7	2	2						0.5		2	
	84-91	PPNG 7							4	2	1								0.5		2	
CP	84-85	non-PPNG 42							11	1	16	8	5	1					2		8	
	86-91	non-PPNG 46						1	15	4	17	7	2						2		4	
	84-91	PPNG 7									1	4	2						4		8	
EM	84-85	non-PPNG 42			4	8	13	5	6	5	1								0.125		1	
	86-91	non-PPNG 46			1	9	7	10	11	4	4								0.25		1	
	84-91	PPNG 7			1			3	2	1									0.25		1	
ST	84-85	non-PPNG 42									19	12	11						4		8	
	86-91	non-PPNG 46								4	9	17	12	4					4		8	
	84-91	PPNG 7										4	2	1					4		16	
ROSO	84-85	non-PPNG 42		7	15	11	4	1		3			1						0.031		1	
	86-91	non-PPNG 46		8	8	14	3		1	1	3	7	1						0.06		4	
	84-91	PPNG 7			1	2	2	2											0.125		0.25	

ST：スルファメソキサゾール：トリメソプリム＝5：1

の分離がされた1977年からPPNG分離率のもっとも高かった1980年代半ばまでリン病届出患者数が増え続けたことも興味深い.

なお, 1980年代後半におけるPPNG分離率の低下の理由としては, 臨床の場でニューキノロン系の抗菌薬やβ-ラクタメース阻害剤を含有する抗菌薬が広く用いられるようになったからではないかといわれている[3)5)]. しかしながら1980年代後半はPPNG分離率のみならずリン病届出患者数の減少も見られる. これらのことから, 1985年の新風俗営業法の施行や1987年のエイズ報道とその後の関連報道が, 性的行動になんらかの影響を及ぼし, リン病届出患者数の減少の一因となっているのであろうと推測される.

しかし, リン病届出患者数及びPPNG分離率が減少傾向にあるとはいえ, PPNGの増加要因としての24.5Mdの伝達性プラスミドの保有率に注目してみると, 1990年以降に街娼から分離されたリン菌の24.5Mdのプラスミド保有率は約74%と依然として高く, また都立台東病院で1990-91年に分離されたリン菌の24.5Mdのプラスミド保有率も約60%と高い(未発表). 今後, 治療への抗菌剤の使用によってはPPNGが再び, またプラスミドDNAによるテトラサイクリンなどを含めた他の耐性菌が増加することもあるのではないかと思われる.

一方, 街娼から分離されたリン菌に対する薬剤感受性については, 1977-80年の小原らの報告[6)]があり, 街娼分離株と同期間に分離した臨床株との比較を行い, 街娼分離株が臨床分離株より感受性が高かったとしている. 7薬剤の薬剤感受性について, 小原らの成績, 我々が街娼株について行った1981-83年の成績および今回の私どもの成績を, 比較し表4に示した. この表からは街娼株3群においてPCGのMIC 50とMIC 90, CXMとCFXのMIC90, CPのMIC50とMIC90に感受性の低下がみられたが, 1977-80年の臨床株と1984-91年の街娼株ではほとんど差が認められなかった. また, PCG, ABPCおよびEMについて1984-91年の街娼株の成績と1980-89年の西村ら[5)]のそれとを比較してみても差がみられなかった.

1984-85年株の95%は日本人名の街娼からの分離株であるが, 1986-91年株の72%は外国人名の街娼からの分離株であった. しかし1984-85年株と1986-91年株の2群のnon-PPNG株間には薬剤感受性にあまり差が見られないことから, 外国人名の街娼が保有していたほとんどのリン菌は国内で感染したものと推測される.

国内における薬剤耐性リン菌分離状況をみてみると, 1980年代後半までは, PPNGはアジア型のプラスミドを持つ株のみであったが, 1988年にアフリカ型のプラスミドをもつPPNGの分離を岡崎ら[7)]が, また1991年には, 1983年の分離菌にトロント型プラスミドをもつPPNG株があったことをS.K.Sarafianらが報告[8)]している. さらに, スペクチノマイシン耐性リン菌の報告も1987年に山井ら[9)]によってされている. 国内での分離報告はまだないが, PPNGには上記3型の他の2つの型が, さらにテトラサイクリン耐性のリン菌も存在し, これらの耐性リン菌がいつ国内に持ち込まれるかわからない状況である. 新しい耐性リン菌の国内持込みや街娼における外国人名の増加及び低年齢化, さらにはエイズの問題などを考慮し, 今後の総合的な性病対策が望まれる.

表4 薬剤感受性の比較

抗菌剤		臨床株	1977-80[6)] 街娼株	1981-83[4)] 街娼株	1984-91 街娼株
PCG	MIC50	0.5	0.13	0.125	0.25
	MIC90	2	0.5	2	2
CXM	MIC50	<0.06	<0.06	0.016	0.03
	MIC90	0.25	0.13	0.25	0.25
CFX	MIC50	0.25	0.25	0.25	0.25
	MIC90	2	0.5	1	2
SPCM	MIC50	16	8	16	8
	MIC90	16	16	16	16
KM	MIC50	16	8	16	16
	MIC90	16	16	16	16
TC	MIC50	0.5	0.5	0.5	0.5
	MIC90	2	2	2	2
CP	MIC50	2	1	2	2
	MIC90	8	4	4	8

まとめ

1984年から1991年に検挙された街娼の実態と, それらから分離されたリン菌の保有するプラスミドパターン(プラスミドに関しては1981年から)および薬剤感受性を調査し以下のことが明らかになった.

1. 街娼における外国人名の著しい増加とともに街娼の低年齢化がみられた.
2. 街娼からのリン菌分離率は調査した期間内において減少傾向にあった.
3. 国内でPPNGが増加した1980年代前半において, 分離されたリン菌の保有する24.5Mdの伝達性プラスミドの急激な増加が確認された. なお分離されたPPNGはすべてアジア型プラスミドを有する株であった.
4. non-PPNG株の薬剤感受性における1984-85年と1986-91年の比較ではROSOにおいて比較的耐性な株の増加がみられたが, その他の薬剤では差が2倍以下で

あった.

PPNG 株の薬剤感受性における1984-85年と1991年の比較では PCG と ABPC の MIC 90において 4 倍の感受性の低下がみられた.

PCG, ABPC をのぞいた non-PPNG 全株と PPNG 株の薬剤感受性比較では, ROSO の MIC90で16倍の差がみられたが, その他の薬剤では差が 2 倍以下であった.

文　献

1) 小野田洋一, 三井一子, 小原　寧, 他：国内でのβ-lactamase 産生淋菌(PPNG)の検出について, *Chemotherapy*, **27**, 265-268, 1979.

2) 東京都衛生局：東京都衛生年報　平成 3 年版, 214-214, 1991, 東京都衛生局, 東京.

3) 熊本悦明, 島田　馨, 川名　尚　編：性と感染(STD)ー性感染症学ー, 初版, 97-120, 1990, 医薬ジャーナル社, 大阪.

4) 石上　武, 堀　幹郎, 鈴木重任, 他：1981年から1983年までの 3 年間における売春容疑者のリン菌保有率と分離菌株の薬剤感受性. 東京都衛生研究所年報, **35**, 49-54, 1984.

5) 西村昌宏, 熊本悦明, 広瀬崇興, 他：リン菌のβ-lactamase 産生の有無および抗菌薬感受性に関する検討, 感染症誌, **65**, 77-87, 1991.

6) 小原　寧, 下田祐子, 新川隆康, 他：常習売春容疑者のリン菌保有率と分離菌の薬剤感受性調査成績. *V.D.*, **62 No. 1. 2. 3..**17-23, 1981.

7) 岡崎武二郎, 石上　武, 小野寺昭一, 他：本邦におけるアフリカ型 PPNG の検出, 感染症誌, **64**, 280-283, 1991.

8) Samuel K. Sarafian, Mong-ling Chu, Hiroyuki Kojima et al.：Distribution of the 3.05-Mdal "Toronto" β-lactamase plapmid among penicillinase-producing isolates of Neisseria gonorrhoeae in the Far East. *Sexually Transmitted Diseases*, **October-December**. 201-204, 1991.

9) 山井志郎, 渡辺祐子, 黒木俊郎, 他：スペクチノマイシン耐性リン菌の検出, 感染症誌, **61**, 983-984, 1987.

報　　文 Ⅱ

医薬品等に関する調査研究

REPORTS Ⅱ

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 33-38, 1992

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第6報*）
Anisakis I型幼虫の運動性および生存期間におよぼす漢方薬（十全大補湯，六味丸，柴胡桂枝乾姜湯，四物湯，帰耆建中湯，人参養栄湯）および生薬の影響

村　田　以和夫**，安　田　一　郎***

Effects of Chinese Medicine for Helminth (VI*)
Effects on The Lifespan and Activity of *Anisakis* Type I Larvae with Several Kinds of Chinese Medicine and Crude Drugs

IWAO MURATA** and ICHIRO YASUDA***

Keywords：漢方薬 chinese medicine，生薬 crude drugs，アニサキスI型幼虫 *Anisakis* Type I larvae

はじめに

著者ら[1-5]は，これまで *Anisakis* I型幼虫の感染，消化管壁穿入を防止するため，主として本虫の運動抑制効果を有する化合物の検索を目的として，各種の漢方薬，生薬，薬味および香辛料などのスクリーニングを行ってきた．

その結果，市販の漢方薬では，安中散，平胃散などの胃腸薬及び，これら構成生薬のうち桂皮・茴香・良姜など芳香性を示す生薬に本虫に対する殺虫効果や，強い運動抑制効果が認められ，加えて各種生薬と由来が同一の香辛料の16種類中9種類に殺虫・運動抑制効果が確認された．また，和名のない香辛料7種のうち4種類に同様の効果が認められたことを報告[5]した．

一方，一連の実験を通じて，漢方薬に配合される生薬の内，生薬人参などには *Anisakis* I型幼虫に対して運動亢進作用[2]を示すことが明らかになってきた．

また，スケトウダラ等鮮魚から活発な運動性を保持する本虫を採取して，常時多量の寄生虫を，実験に供することは11月から翌年3月の漁獲期間以外，極めて困難である．したがって，年間を通じて実験用の虫体を培養により確保する必要がある．さらに，人体に感染し組織穿入した *Anisakis* の体内寿命について未だに定説が無いため，少なくともin vitroでの培養を試みて，本虫の生存期間を確認するとともに，漢方・生薬由来の運動亢進作用または延命効果を有する生理活性物質を検索することは有意義と思われる．現在，東京都衛生局の東洋医学事業として，漢方薬の安全性と有効性についてプロジェクト研究が実施されており，その一環として本研究が組み込まれている．そこで今回は，十全大補湯，六味丸，柴胡桂枝乾姜湯，四物湯，帰耆建中湯，人参養栄湯など主として滋養強壮薬として用いられる漢方薬ならびに構成生薬を中心に，本虫の運動性および生存期間に与える影響について検討した．次いで，組織培養用のEagle's MEM培地を用いて本虫の生存期間を追求した．また，本虫培養系に対する哺乳動物細胞培養系に障害を与えるといわれる過酸化水素(H_2O_2)濃度[6]の影響について検討し，二三の知見が得られたので報告する．

材料および方法

1　材料：1)既報[1]のとおりスケトウダラの肝臓表面に披嚢する *Anisakis* I型幼虫を採取し，0.4%生理食塩水(以下0.4% NaCℓ と略)中で，活発なS字状運動を呈するものだけを選び実験に供した．2)被検漢方薬は，衛生局東洋医学事業の研究試料[8,9,10]すなわち，十全大補湯(エキス顆粒)，六味丸(散剤およびエキス剤)，その他市販製剤として，柴胡桂枝乾姜湯，四物湯，帰耆建中湯，人参養栄湯，計4種のエキス顆粒を用いた．

---

*第5報，東京衛研年報，**40**，53-57，1989

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

***東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

3)被検生薬は，東洋医学事業の研究試料を中心に，黄耆，芍薬，川芎，当帰(大和)，人参(白参)，甘草(東北)，半夏，山薬，霊芝，杜仲，茯苓，鹿茸，甘茶蔓，計13種を実験に供した．4)市販ドリンク剤として，スポーツ飲料；粉末イオンサプライ POCARI SWET® (大塚)を用いた．5) *Anisakis* 幼虫の培養には，Eagle' s MEM Medium® (ニッスイ)を使用した．

2 方法：1) 被検液の調整法：漢方・生薬は，1日服用量を0.4%NaCℓ 90mlに加え，室温(20～25℃)で30分間振盪抽出後，2,000 rpm．15分間遠心分離し，その上澄液30 ml を被検液とした．六味丸・エキス剤は，3 g /30 ml の生理食塩水に溶解した遠心上澄液を，また生薬は，それぞれ3 g/30 ml に調整し，30分間振盪抽出後，遠心上澄液それぞれ20 ml を被検液とした．

2) 試験液：a) 予備試験：六味丸(散剤)，山薬，甘茶蔓，霊芝，鹿茸，人参，杜仲，茯苓，各抽出原液および1/3，1/9濃度液を調製し，それぞれ30 ml をガラスシャーレに分注し，*Anisakis* Ⅰ型幼虫を20隻ずつ各被検液に投入後，室温に放置して，1日，2日，1週間，2週間，3週間，5週間後の本虫の運動性および生存状態について観察した．

対照として0.4 %NaCℓ のほか，試みにスポーツ飲料と組織培養用の Eagle' s MEM 培地を加えて，本虫の運動性および，生存期間について観察を行った．

b) 本試験：十全大補湯，六味丸エキス，柴胡桂枝乾姜湯，四物湯，帰耆建中湯，人参養栄湯の6種漢方抽出液およびこれら漢方薬に主として滋養強壮薬として配合されている黄耆，芍薬，川芎，当帰(大和)，人参(白参)，甘草(東北)，半夏の生薬7種の抽出液，およびこれまで殺虫効果が明らかとなった鬱金と烏山椒の抽出液を調製し，各被検液および対照として0.4%NaCℓ に *Anisakis* Ⅰ型幼虫を10隻ずつ投入後，20℃のフラン器で1日，2日，1週間から最長5週間まで運動性の変化について観察を行った．

c) *Anisakis* Ⅰ型幼虫の MEM 培地生存期間に及ぼす過酸化水素負荷試験：組織培養用の Eagle' s MEM 培地を使用法どおりに調製し，高圧滅菌後30，50，100 μM となるように過酸化水素水を添加して，それぞれ25 ㎠ポリスチレン製組織培養フラスコ(CORNING®)に20 ml 当て無菌的に分注し被検液とし，無添加培地および滅菌0.4%NaCℓ を対照とした．スケトウダラ肝臓表面より採取した *Anisakis* Ⅰ型幼虫は，滅菌0.4%NaCℓ を分注した滅菌シャーレに順次移しながら10回洗浄したあと，各被検液に7隻，対照の0.4%NaCℓ に10隻ずつ投入した．残りの200隻の過酸化水素無添加の MEM 培地に移して，3～7日毎に同操作を経て新規培地に移し，可及的無菌培養を試みた．3カ月以降は培地の pH 変化による変色が認められない限り，培地交換せずに20℃のフラン器で密栓培養し，毎月生死判定を行った．200隻投入の無添加培地は，開栓せずには判定ができないため，16カ月後の最終判定日まで生死数を数えなかった．

実験成績

1 予備試験：室温条件下における六味丸(散剤)および主として老人性疾患に滋養強壮薬として配合される，7種の生薬抽出液と試みにスポーツ飲料の原液，1/3および1/9濃度液を調製して，*Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動性および生存期間におよぼす影響について検討した．観察期間中，六味丸と杜仲および対照の0.4%NaCℓ のみがカビの発育を抑制したが，その他の被検抽出液は菌膜を形成したため，ピンセットで除去しながら生死判定を行った．表1に示すように，5週間判定時に被検虫体全てが生存し得た抽出液は六味丸の原液，1/3，1/9の濃度液，人参の原液，スポーツ飲料1/3濃度液および対照に用いた MEM 培地のみであった．各被検液の濃度を比較すると，人参抽出原液では5週間後まで濃度が下がると生存率が低下した．一方，スポーツ飲料では原液より希釈液のほうが生存率が良好な成績が得られた．さらにスポーツ飲料では1週間処理しても，3濃度とも活発なS字状運動(+++)を呈する活動虫数が最も多く，対照および漢方生薬の各種抽出液より運動持続性がやや高い成績が得られた．

対照の0.4%NaCℓ および MEM 培地と比べて，漢方生薬の抽出液は，カビの菌膜形成に伴う悪影響を考慮しても，総じて運動性の亢進作用および生存期間延長作用への影響は認められなかった．

2 本試験：20℃条件における，漢方薬7種，生薬7種および既知殺虫効果を有する生薬2種の抽出液，計16種について *Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動性および生存期間におよぼす影響について検討した．5週におよぶ観察期間中，人参，甘草，鬱金および0.4%NaCℓ は，カビ繁殖の影響を受けなかったが，他の抽出液は全て1～2週目以後に菌膜の形成があり，生死判定の際，できるだけピンセットを用いて除去しながら判定を行った．表2に示すように，運動性にややバラツキが認められたが，漢方薬のうち十全大補湯5包を用いた抽出液では1～5週で，2/10，5/10，8/10の死滅虫体が認められ，人参養栄湯では，3週で4/10，5週で10/10が死滅し，対照の0.4%NaCℓ の本虫生存期間と大差ない成績であった．

生薬の抽出液では，甘草と半夏が1週～5週にかけて死滅数が増加し，次いで川芎が3週後9/10，5週目では3種ともに全て死滅した．黄耆，芍薬，川芎，当帰の生存数は5週の間，対照の0.4%NaCℓ と比較して大差無い成績を示した．一方，鬱金は2日目，烏山椒は1週間で全虫体が死滅するとともに，鬱金の5/10と烏山椒の6/10の虫体に，既報[7]のような頚部損傷像が肉眼的に認められた．

表1　室温条件下における漢方生薬抽出液の *Anisakis* I型幼虫の運動性および生存期間におよぼす影響・予備試験成績

漢方薬名	被検虫数	処理期間																			
		1日				3日				1週間				3週間				5週間			
		+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
六味丸・散剤	20	7	13			1	19			3	17			4	16				20		
1/3濃度	20	11	9			2	18			3	17				20				19	1	
1/9濃度	20	6	14			3	17			5	15				20				20		
山　　薬	20	1	19			2	18			3	17			3	17			2	8		10
1/3濃度	20	9	11			6	14			4	16				20				11		9
1/9濃度	20	10	10			3	17			2	18				19	1			17		3
霊　　芝	20	6	14			3	17			3	17			1	19				17		3
1/3濃度	20	6	14			2	18			6	14			1	19				17		3
1/9濃度	20	5	15			5	15			6	14				19		1		17		3
人　　参	20	6	14			4	16			4	16				20			4	16		
1/3濃度	20	8	12			5	15			3	17			1	19			3	14		3
1/9濃度	20	10	10			1	19			7	13				20				9		11
杜　　仲	20	9	11			2	18			3	17				20				15		5
1/3濃度	20	4	16			2	18			3	17				20				16		4
1/9濃度	20	4	16			2	18			2	18				19		1		13		7
茯　　苓	20	5	15			3	17			3	17				19		1		16		4
1/3濃度	20	5	15			3	17			5	15				17		3		17		3
1/9濃度	20	10	10			1	19			5	15				18		2	1	17		2
甘 茶 蔓	20	6	14			3	17			6	14			1	19				5		15
1/3濃度	20	6	14			5	15			6	14				20				1		19
1/9濃度	20	4	16			4	16			5	15				19		1		7		13
鹿　　茸	20	10	10			3	17				20				16		4	1	7		12
1/3濃度	20	6	14			3	17			5	15				19	1			9		11
1/9濃度	20	7	13			2	18				19	1			19	1			19		1
スポーツ飲料	20	16	4			14	6			16	4				20				10		10
1/3濃度	20	11	9			5	15			17	3			2	18				20		
1/9濃度	20	4	16			7	13			18	2				20				19		1
対　　照																					
0.4%NaCℓ	20	5	15			4	16			3	17				19		1		19		1
MEM培地	20	3	17				20			2	18				20				20		

注）六味丸および各生薬5g／0.4%NaCℓ 水50 ml，30分間室温で震盪抽出後，遠心上澄み液30 ml を使用
スポーツ飲料：粉末イオンサプライ POCARI SWET® （大塚）7.4 g／蒸留水100 ml
MEM培地：Eagle's MEM® （ニッスイ）9.4 g／蒸留水1,000 ml
運動性の表示
+++：活発なS字状運動を示すもの
++：シャーレに衝撃を与えると自発的巻き運動を示すもの
+：ピンセットで虫体を刺激して，わずかに動くもの
-：虫体の透明度が減少し，白濁，全く運動が認められないもの

表2 漢方生薬抽出液の *Anisakis* I 型幼虫の運動性および生存期間に及ぼす影響

漢方薬名	被検虫数	処理期間 1日 +++	++	+	−	2日 +++	++	+	−	1週間 +++	++	+	−	3週間 +++	++	+	−	5週間 +++	++	+	−
十全大補湯(5包)	10		8	2			7	3			6	2	2		1	4	5			2	8
〃 (1包)	10		10				10				9	1			9	1			9		
六味丸エキス	10	3	7				10				10				9	1			9		1
柴胡桂枝乾姜湯	10	6	4				10				10				9	1			9		1
四物湯	10		6	4			1	9			3	7			3	7			6	4	
帰耆建中湯	10		10				10				10				10				10		
人参養栄湯	10	2	8				10				10					6	4				10
黄耆	10	3	7			2	8				9	1			9	1			9		1
芍薬	10	2	8				10				10				10				10		
川芎	10	4	4	2			3	7			1	9				1	9				10
当帰(大和)	10	3	7			3	7				9	1			7	2	1		7	2	1
人参(白参)	10	3	7			2	8			1	7	2		1	5	3	1	1	1	1	7
甘草(西北)	10	2	8				10				5	2	3		2	2	6				10
半夏	10	2	8			3	7				3	1	6			4	6				10
対照																					
鬱金	10			10				10					10				10				10
烏山椒	10		7	3				10					10				10				10
0.4%NaCℓ	10	1	9				10				10				10				10		

注) +++：活発なS字状運動を示すもの
++：シャーレに衝撃を与えると自発的巻き運動を示すもの
+：ピンセットで虫体を刺激して，わずかに動くもの
−：虫体の透明度が減少し，白濁，全く運動が認められないもの

表3 *Anisakis* I 型幼虫のMEM培地生存期間におよぼす過酸化水素負荷試験成績

処理方法 H_2O_2 添加量	虫数	処理期間 1月 生	死	2月 生	死	3月 生	死	6月 生	死	9月 生	死	12月 生	死	16月 生	死
30 μM	7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	3	4	0	7
50 μM	7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	5	2	1	6
100 μM	7	7	0	7	0	7	0	7	0	7	0	6	1	4	3
0 μM	200	200	0	200	0	※		※		※		※		129	71
対照															
0.4%NaCℓ	10	10	0	9	1	3	7	0	10	*		*		*	

注) ※MEM培地交換および生死数の判定せず
*：生死の判定省略

3 Anisakis I 型幼虫のMEM培地生存期間におよぼす過酸化水素負荷試験成績：表3に示すように，MEM培地による可及的無菌培養を20℃で16カ月間継続した結果，129/200(64.5%)の生存数(率)が確認された．30，50および100 μMの過酸化水素を添加した培地では，それぞれ12カ月後に3/7(42.9%)，5/7(71.4%)，6/7(85.7%)の生存数(率)を示した．また，16カ月後では0/7(0%)，1/7(14.3%)，4/7(57.1%)の生存数(率)を示し，必ずしも H_2O_2 の添加量の影響はみられなかった．一方，対照の無菌0.4%NaCℓでは，2カ

月後に生存虫体数が9/10(90.0%), 3カ月後に3/10(30.0%)と減少し, 6カ月以降生存虫体は認められなかった. 16カ月の観察期間を通じて, 本虫の体長, 体幅の有意な伸長は認められず, 生殖器官及び他の器官の発育ならびに第Ⅲ期から第Ⅳ期幼虫への脱皮・成長も全く認められなかった. 過酸化水素の添加培地では無菌状態が維持されたのに対して, 無添加培地および対照の0.4%NaCℓ では無菌培養が困難であった. この結果から人体組織内に侵入した *Anisakis* Ⅰ型幼虫が, 薬物または宿主側の免疫学的な作用を受けない限り, 少なくとも12～16カ月間は生存可能であるとの示唆が得られた. また, 本虫は実験的に細胞変性が起こり得る過酸化水素の濃度に対しても抵抗し, 12カ月間以上生存可能であることが明らかとなった.

考　察

著者[7]らは, これまで *Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する殺虫または運動抑制作用を有する化合物の検索を漢方・生薬, 香辛料および薬味類に求め, 一部有効物質の構造および最小致死濃度など構造活性相関について報告してきた. これら一連の実験を通じて, 人参のように本虫に対して運動性を抑制する作用とは全く逆の運動亢進作用を有するものが見いだされた. これを契機に, 漢方・生薬のうち一般的に主として滋養強壮薬として市販されている六味丸, 十全大補湯など漢方薬7種と, これらに配合される生薬類13種の抽出液および組織培養に用いられるMEM培地が本虫の運動性および生存期間に及ぼす影響について, 16カ月間にわたる観察を行った.

その結果, 六味丸(散剤・エキス剤)抽出液では, 室温および20℃条件ともに5週間後の判定時90%以上の生存率を示すとともに, ほとんどの運動性は++(シャーレに衝撃を与えると自発的な巻運動を示す)を維持した. 同様の経過を示した漢方薬は, 十全大補湯の1包抽出液, 柴胡桂枝乾姜湯抽出液であった. 帰耆建中湯は1日目から5週間後に至る間, 全例が++の運動性を維持した. 四物湯は5週生存率が100%にもかかわらず運動性が劣り, 人参養栄湯および十全大補湯の5包抽出液は, 予想に反して3～5週後の生存率が他の抽出液および対照の0.4%NaCℓ より急激に減少した. 14種の生薬のうち, 人参の抽出液2種と芍薬, 黄耆抽出液のみが, 5週生存率で対照の0.4%NaCℓ と比べ顕著な差は認められなかった. これらの成績を総合して, 生薬および漢方薬抽出液の本虫に対する延命効果は期待できないものと思われた. 予備試験で用いた人参の原液と1/3濃度液は, 本試験で試みた人参(白参)抽出液より生存数および運動性の持続に優れた成績が得られたことから, 将来標準法を確立すれば, 人参の種類または産地ごとの品質評価を *Anisakis* を用いた実験により判定することができる可能性がでてきた. 一方, 実験中カビ, 雑菌の繁殖を極力防ぐ努力を行えば, 対照とした0.4%NaCℓ では2カ月, MEM培地では16カ月程度は本虫の生存を維持できるが, 運動性の活性維持は困難である. 生死判定も「不動・白濁」を指標としているが, 今回のような長期観察を短期間で一定の成績を得るためには, 過酸化水素の濃度を更に上げるか, 既知[1]の allylisothiocyanate のような運度抑運作用のある化合物による負荷試験の方法を開発して, 人参のような未知の生理活性物質を含む生薬を検索する必要がある.

動植物由来の被検材料および加熱できない寄生虫を実験に応用する場合の無菌操作は極めて難しいのでカビ類の発育前, 少なくとも1週間以内に判定が行えるように実験法を改良することが今後の課題であろう.

Anisakis の生理活性を阻害または亢進させる化合物に関する研究を持続的に行うために, 本虫の安定維持が必要であるが, 今回初めてMEM培地による培養を試みたところ本虫の発育には成功しなかったものの, 16カ月間におよぶ生存は確認し得た. また, 試みに行ったスポーツ飲料の1/3濃度液では運動性持続のために良好な成績が得られた. このことは, ヒトの生理食塩水(0.85% NaCℓ)の浸透圧より1/2濃度(0.4%NaCℓ)液のほうが本虫生存期間が長いというこれまでの経験から推定して, スポーツ飲料の原液より1/3希釈液の方が本虫の適合浸透圧に近いものと思われる. また, 好適浸透圧に加えて, 滋養強壮薬抽出液よりヒトの体液に近い成分組成となっているスポーツ飲料の方が, 糖質, ビタミン類, 無機塩類, クエン酸が処方され, 電解質イオンも適度に調整されているため, 総合的に本虫維持には好都合であったものと考えられる.

実験に供せられる *Anisakis* が長期にわたって活発な運動性を維持し得る培養方法には, さらに検討すべき余地が残されているが, 本実験の結果から, 人体組織に侵入した本虫の生存期間は, 有効薬物および宿主側の免疫学的作用が働かない限り, 12カ月以上と推定される.

まとめ

スケトウダラより採取した *Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動性および生存期間におよぼす主として滋養強壮の目的で用いられる漢方薬8種と生薬14種抽出液の影響を5週間にわたって観察した. その結果, 人参の抽出原液のみが対照の0.4%NaCℓ およびMEM培地より活発な運動性

を維持し得ること，また，十全大補湯，六味丸，柴胡桂枝乾姜湯および帰耆建中湯抽出液は0.4％NaCℓ と同様な生存率を示し，本虫に対する延命効果は期待できないことが明らかになった．

一方，試みにスポーツ飲料(1/3濃度)では5週間以上，組織培養用のMEM培地では12～16カ月以上本虫の生存を維持できること，また本虫は実験的に哺乳動物の培養細胞を変性し得る過酸化水素濃度(30～100 μM)に9カ月以上抵抗することを明らかにした．本虫の培養条件については，さらに検討の余地を残しているが，これらの成績から，人体組織に侵入した本虫の生存期間は有効薬物および宿主免疫の作用が働かない限り，12カ月以上におよぶものと推定された．

(本研究は所内プロジェクト研究・東洋医学事業の一環として実施された.)

文　献

1) 村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，**39**，15-18，1988.
2) 村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，**39**，19-23，1988.
3) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，瀬戸隆子，村田以和夫，宮沢貞雄，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，**39**，24-27，1988.
4) 村田以和夫，宮沢貞雄，安田一郎，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，**40**，46-52，1989.
5) 安田一郎，高野伊知郎，浜野朋子，瀬戸隆子，高橋奈穂子，村田以和夫，宮沢貞雄，小田　稔，渋谷智晃：東京衛研年報，**40**，53-57，1989.
6) 金西信次，渡部　真，金城康人：東京衛研年報，**40**，319-323，1989.
7) 村田以和夫：寄生虫学雑誌，**40**，1，(補)，131，1991.
8) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸隆子，他：東京衛研年報，**42**，27-32，1991.
9) 藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，湯沢勝廣，長沢明道，多田幸恵，他：東京衛研年報，**42**，235-242，1991.
10) 藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，湯沢勝廣，長沢明道，他：東京衛研年報，**42**，243-251，1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 39-45, 1992

漢方製剤十全大補湯エキス顆粒剤及び原料生薬の理化学的品質評価

安田一郎*, 高橋奈穂子*, 浜野朋子*, 瀬戸隆子*
高野伊知郎*, 渡辺四男也*, 秋山和幸*, 末次大作**
新江徹***, 森由子***, 清水虎雄***, 山川洋平***

Physical and Chemical Evaluation of Granulated Kampo Extract Medicine " Juzen-taiho-to" and the Raw Material Crude Drugs

ICHIRO YASUDA*, NAHOKO TAKAHASHI*, TOMOKO HAMANO*, TAKAKO SETO*, ICHIRO TAKANO*, YOHYA WATANABE*, KAZUYUKI AKIYAMA*, DAISAKU SUETUGU**, TOHRU ARAE***, YOSHIKO MORI***, TORAO SHIMIZU*** and YOUHEI YAMAKAWA***

Keywords：漢方薬 kampo medicines, 十全大補湯 juzen-taiho-to, 生薬 crude drugs, エキス末 extract powder, 顆粒剤 granulated medicines, グリチルリチン酸 glycyrrhizic acid, ペオニフロリン paeoniflorin, ケイヒ酸 cinnamic acid, γ-アミノ酪酸 γ-aminobutyric acid, 品質評価 quality evaluation

緒　言

東京都衛生局では東洋医学事業の一つとして「老人性疾患に対する漢方薬の有効性」をテーマに，臨床研究及び基礎研究の各分野で体系化した研究を進めているが，その一環として平成3年度から「十全大補湯(エキス顆粒剤)」研究を実施することになった．

十全大補湯は一般的に病後の体力低下，疲労倦怠，食欲不振，ねあせ，手足の冷え，貧血などに効果のある薬剤として用いられている[1]．当研究では外科領域において体力回復(改善)の遅い術後患者を対象に，本エキス剤の有効性を臨床的に検討する一方で，基礎研究の立場からその有効性，安全性を証明することが計画されている．ここで，再現性の良い科学的実験データを得るためには，一定の品質に管理された薬剤が必要であり，また，各研究グループ間のデータ交換を容易にする統一された試料が必要である．本報ではこの研究に用いる原料生薬の品質評価を行い，十全大補湯エキス末，生薬単味エキス末，十全大補湯エキス顆粒剤の製造及び品質管理について報告する．

十全大補湯は四物湯(当帰，川芎，芍薬，地黄，血虚すなわち貧血に用いる)と四君子湯(人参，朮，茯苓，甘草，気虚すなわち胃腸機能の衰弱に用いる)の合方に強壮作用のある桂皮(桂枝)と黄耆を加えるもので，東洋医学的には気力と貧血を治す補剤と考えられ[2]，古くから湯剤として用いられてきた．しかし，湯剤として用いてきたものをエキス剤化して使用するようになったのは最近のことで，その歴史は浅い．エキス剤が，広く医療に用いられるようになったのは昭和51年以降である．そして，成分変動の激しい草根木皮の生薬を配合して製造された漢方エキス剤は，化学薬品製剤に比較し成分含量の点で，品質確保が図られていないといわれ[3]，昭和60年厚生省薬務局審査課通達(昭和60年5月31日　薬審二第120号)によってはじめて改善が図られたとされる．そこで，統一試料として用いる原料生薬は優良品を選び，顆粒剤，湯エキス末及び生薬単味エキス末の各製造はメーカーに委託する一方で，以下の試験を行いこれらの品質確保に努めた．

十全大補湯の原料生薬10種はいずれも日本薬局方(以下日局と略す)収載品目である[4]．かび，昆虫，異物などの混入がなく，規定される日局試験に適合した各2～4ロットの中から，経験的に良品といわれるロットを五感法により選品した．これらについては，水製エキス含

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

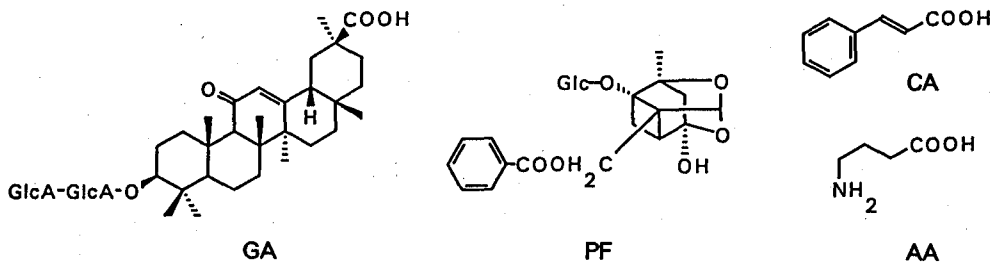


図1．グリチルリチン酸（GA），ペオニフロリン（PF），ケイヒ酸（CA）及びγ-アミノ酪酸（AA）の化学構造

量，希エタノール(50%エタノール溶液)エキス含量，無水エタノールエキス含量，精油，乾燥減量など各定量試験を合わせて行った．

十全大補湯エキス末あるいは生薬単味エキス末については水製，希エタノール及び無水エタノールの各エキス含量，乾燥減量，アミノ酸の1種であるγ-アミノ酪酸(以下AAと略す)の含量を明らかにした．そして，有効成分と言われているグリチルリチン酸(以下GAと略す)，ペオニフロリン(以下PFと略す)及びケイヒ酸(以下CAと略す)の各含量を指標に原料生薬との比較を行い，その品質を検討した(図1)．

顆粒剤については，十全大補湯エキス末から適正に製剤化が行われているか判断するためGA，PF，CA及びAAの定量を実施した．また，重量偏差試験，崩壊試験などの製剤試験を行い，その品質が確保されているか否かを検証した．

実験の部

(1) 原料生薬

原料生薬の選品は，「和漢薬の良否鑑別法及び調製方」[5]，「中薬鑑定学」[6]，などを参考に行った．味，匂い，外観の観察，手触りなどの五感法により，鮮度が高く，かび，昆虫，異物などを含まない，いわゆる良品を選んだ．これらの総計は1,911 kgであり，その使途は表1に示した．

人参　ひげ根のほとんど除かれた形の整った白参，韓国産2ロット，長野県産1ロットの中から，長野県産白参(1990年9月20日納入品)を選択した．

黄耆　ほとんど分枝のない蒙古黄耆，中国河北省産2ロットの中から，1990年5月29日納入品を選択した．

蒼朮　比較的形状の整った古立蒼朮，中国湖北省産3ロットの中から，1990年4月20日納入品を選択した．

茯苓　中国広西省産2ロット，安徽省産1ロットの中から，広西省産茯苓(1989年12月20日納入品)を選択した．

当帰　大深当帰である栃木県産2ロット，群馬県産2ロットの中から，群馬県産当帰(1991年3月15日納入品)を選択した．

芍薬　生干芍薬である中国四川省産3ロット，群馬県産1ロットの中から，群馬県産芍薬(1991年3月15日納入品)を選択した．

地黄　乾地黄である中国河北省産2ロット，広東省産1ロットの中から，広東省産地黄(1990年10月12日納入品)を選択した．

川芎　生干川芎である群馬県産3ロット，岩手県産1ロットの中から，岩手県産川芎(1990年12月25日納入品)を選択した．

桂皮　広南桂皮である中国広西省産3ロットの中から，1990年12月21日納入品を選択した．

甘草　東北甘草である中国吉林省産1ロット，内蒙古自治区産1ロット，遼寧省産1ロットの中から，吉林省産甘草(1990年2月7日納入品)を選択した．

(2) 分析用試料及び調製

原料生薬　表1に示す保存試料各10 kgの生薬からそれぞれ約500 gを採取し，切断した後よくかき混ぜ10℃の冷暗所に保存した．用時粉末とし分析用試料とした．

顆粒剤　臨床研究試料である顆粒剤は，1包 2.5 gとしてアルミヒートシールで分包され，1,890包が紙箱に納められている．その65箱のうち1箱を開封し，無作意に50包を選択し試料とした．分析には試料を粉末として用いた．

十全大補湯エキス末及び生薬単味エキス末　各エキス末は基礎研究試料として10℃，暗所に保存したものの一部をそのまま試料とした．

(3) 灰分，酸不溶性灰分及び乾燥減量　日局〔B〕一般試験法 25.生薬試験法[7]に従った．

表1．原料生薬とその使途

生薬	ロット番号	産地	湯エキス末[a]製造用	単味エキス末[b]製造用	保存試料	総計
人参	9207650	長野県	138 kg	50 kg	10 kg	198 kg
黄耆	9206900	中国河北省	138	50	10	198
蒼朮	10200890	中国湖北省	138	50	10	198
茯苓	9202110	中国広西省	138	50	10	198
当帰	10203400	群馬県	138	50	10	198
芍薬	10203420	群馬県	138	50	10	198
地黄	9208200	中国広東省	138	50	10	198
川芎	10203410	岩手県	138	50	10	198
桂皮	9208470	中国広西省	138	50	10	198
甘草	9201750	中国吉林省	69	50	10	129
		計	1,311	500	100	1,911

a) 人参3，黄耆3，蒼朮3，茯苓3，当帰3，芍薬3，川芎3，桂皮3及び甘草1.5の成分分量（g／日）からなる十全大補湯エキス末を製造した．

b) 生薬単味エキス末は各生薬50 kgより十全大補湯エキス末と同様の工程でそれぞれ製造した．

(4) エキス含量及び精油含量 日局〔B〕一般試験法 25. 生薬試験法[7]に準じた．すなわち，希エタノールエキス含量及び水製エキス含量は，規定の方法に従い，無水エタノールエキス含量は溶媒として無水エタノールを用い，希エタノールエキス定量法を準用した．

精油含量は各原料粉末50.0 gをとり，精油定量法に従い分析した．ただし，10生薬のうち蒼朮を除いた9生薬の定量試験には，あらかじめフラスコ内の試料上にシリコン樹脂約1 mlを加え，発泡を抑え試験した．

(5) 重量偏差試験法及び崩壊試験法 日局〔B〕一般試験法 24. 重量偏差試験法[8]，及び 43. 崩壊試験法[9]に従った．

(6) グリチルリチン酸(GA)[10]，ペオニフロリン(PF)及びケイヒ酸(CA)[11]の定量

試料溶液の調製 希エタノールエキス定量の際調製した抽出液100 mlの一部を0.45 μmのフィルターを通し，1～1/500に適宜希釈して試料溶液とした．定量値は乾燥減量によって得た数値より乾燥物に換算した試料量に対しそれぞれ算出した．

検量線の作成 GA(東レテクノ製，生薬分析用)約0.25 mg/ml，PF(東レテクノ製，生薬分析用)約0.70 mg/ml，CA(和光純薬製，特級)約2.00×10^{-2} mg/mlの濃度の希エタノール溶液を調製し，それぞれの標準溶液とした．各標準溶液は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10 μlをHPLC(日本分光製，880型)に注入し，GAはピーク高さから，PF及びCAはピーク面積から検量線を作成した．

GAのHPLC条件 カラム；TSKgel ODS-80 TM，6.0 mm I.D.×150 mm, 5 μm(東ソー製)，温度；40 ℃，移動相；水・アセトニトリル・酢酸混液(62：38：3)，流速；1.5 ml/min，検出；紫外部 254 nm，感度；0.16 AUFS，注入量；10 μl.

PFのHPLC条件 GAのHPLC条件に準じた．ただし，移動相；水・アセトニトリル・酢酸混液(175：25：1)，検出；紫外部235 nm.

CAのHPLC条件 GAのHPLC条件に準じた．ただし，移動相；水・アセトニトリル・酢酸混液(14：6：1)，検出；紫外部 280 nm.

(7) γ-アミノ酪酸(AA)[12]の定量

試料約1.0 gを精密に秤量し，前報[12]と同様の方法で試料溶液を調製し，自動アミノ酸分析計(日立製，835形)でAAの定量を行った．定量値は乾燥減量によって得た数値より乾燥物に換算した試料量に対しそれぞれ算出した．

結果及び考察

(1) 原料生薬の品質

今回，㈱ツムラに十全大補湯エキス末及び顆粒剤の製造委託を行ったことから，その医薬品製造承認に従い，成分及び分量(g/日)は人参3.0(2.5～3.0)，黄耆3.0(2.5～3.0)，蒼朮3.0(朮3.0)，茯苓3.0(3.0)，当帰3.0(3.0)，芍薬3.0(3.0)，地黄3.0(3.0)，川芎3.0(3.0)，桂皮3.0

表2．原料生薬の分析結果

生薬	エキス含量(%)[a]			精油含量	乾燥減量	灰分	酸不溶性
	水	希エタノール	無水エタノール	(ml)	(%)	(%)	灰分(%)
人参	52.2	49.8	5.6	<0.1	11.1	3.89	0.01
黄耆	33.7	34.6	5.4	<0.1	9.2	2.88	0.47
蒼朮	44.8	28.9	8.0	3.4	15.3	6.16	0.78
茯苓	2.0	1.9	0.8	<0.1	13.1	0.14	0.02
当帰	44.7	54.1	6.5	0.1	10.0	5.90	0.28
芍薬	35.6	36.5	13.2	<0.1	9.0	4.04	0.18
地黄	89.2	88.9	6.6	<0.1	16.6	2.39	0.32
川芎	34.0	43.5	9.7	0.3	8.2	3.93	0.25
桂皮	9.2	14.8	11.6	0.9	14.3	2.55	0.06
甘草	36.4	42.3	14.6	<0.1	8.9	4.01	0.42

a) 乾燥減量値から乾燥物に換算した．

(3.0)，甘草1.5(1.5)とした．( )内は厚生省承認審査内規[13]である．

選品した原料生薬の試験結果は表2と共に以下に記載する．

人参 本品は，灰分4.2%以下，希エタノールエキス含量14.0%以上，異物2.0%以下の日局規格[4]に適合し，土砂の混入の目安となる酸不溶性灰分は0.01%と少なく，極めて良好な数値であった．

黄耆 灰分5.0%以下，酸不溶性灰分1.0%以下，乾燥減量13.0%以下の日局規格[4]に適合し，希エタノールエキス含量は34.6%，無水エタノールエキス含量は5.4%であり，市場品[14]中では高含量を示す黄耆であった．

蒼朮 灰分7.0%以下，酸不溶性灰分1.5%以下，アトラクチロン呈色反応陰性，精油含量0.7 ml以上の日局規格[4]に適合した．精油含量は3.4 mlと極めて高く[15]，揮発性成分を多く含む蒼朮であった．

茯苓 和産の生薬の入手が難しいことから，中国産を用いることにした．日局規格[4]は灰分規格(1.0%以下)のみである．各種試験を行ったところ，エキス含量はいずれも原料生薬の中では最も低い数値であった(表2)．

当帰 本品は酸不溶性灰分1.0%以下，希エタノールエキス含量35.0%以上，葉しょう部3.0%以下，異物含量1.0%以下の日局規格[4]に適合した．市場品当帰の一部には土砂を多く含むものもあるが，本ロットは酸不溶性灰分が0.28%と低く，土砂は概ね除かれていると考えられた．

芍薬 灰分6.5%以下，酸不溶性灰分0.5%以下の日局規格[4]に適合した．2～6%といわれるペオニフロリン含量[4]は3.7%であった．無水エタノールエキスは13.2%であり，甘草と並んで脂溶性成分含量の高い生薬であった．

地黄 灰分6.0%以下，酸不溶性灰分2.5%以下の日局規格[4]に適合した．水製エキス含量は89.2%，希エタノールエキス含量は88.9%であり，原料生薬の中で最も水溶性成分を多く含む生薬であった．

川芎 中国産川芎が日局の基原植物の規定[4]に外れることから，和産の生干し品を選んだ．灰分6.0%以下，酸不溶性灰分1.0%以下の日局規格[4]に適合し，精油含量は0.3 mlであった．

桂皮 桂皮は基原植物の明らかな広南桂皮[16]を選択した．灰分5.0%以下，乾燥減量15.5%以下，精油含量0.5 ml以上の日局規格[4]に適合した．水溶性成分含量の目安となる水製エキス含量及び希エタノールエキス含量は9.2%，14.8%であり，これらは茯苓に次いで低い値であったが，無水エタノールエキス含量は11.6%と比較的高い数値であった(表2)．

甘草 苦味の少ない東北甘草を選んだ．灰分7.0%以下，酸不溶性灰分2.0%以下，希エタノールエキス含量25.0%以上，乾燥減量12.0%以下の日局規格[4]に適合した．2～6%といわれるグリチルリチン酸含量[4]は5.5%であった．また，脂溶性成分含量の目安となる無水エタノールエキス含量は14.6%と原料生薬の中で最も高い値を示した(表2)．

これら10種類の生薬は成分含量からみても本邦に流通する生薬の中では良品のグループに属するもので，十全大補湯エキス末及び顆粒剤の原料としては十分な品質を持つものと判断した．

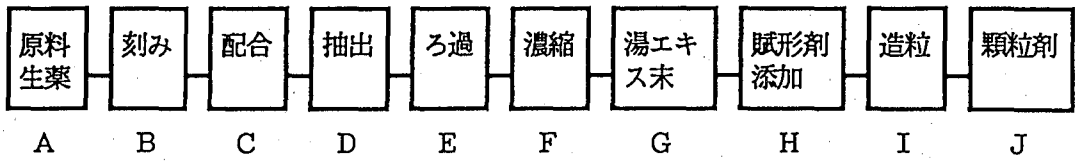


図２．十全大補湯エキス末及び十全大補湯エキス顆粒剤の製造工程の概要

(2) 十全大補湯エキス末及び生薬単味エキス末の品質

図２に示す製造工程に従い，原料生薬(A)から十全大補湯エキス末(G)及び顆粒剤(J)を，また，10種の原料生薬からそれぞれの生薬単味エキス末を委託製造した．

その概略は次に記載する．原料生薬(A)を個別に抽出効率の良い切度に刻み(B)，これらを十全大補湯の成分分量に従い表１の仕込量で混ぜ(C)，仕込量の12倍量の精製水で，100℃，１時間抽出した(D)．これを温時ろ過し(E)，水分を減圧留去し，１/５～１/６量に濃縮した(F)．濃縮液は噴霧乾燥機にかけ湯エキス末(G)として得た．湯エキス末(G)にはその量の１/２量の乳糖を加え練合し(H)，造粒(I)，乾燥工程を経て顆粒剤(J)とした．

すなわち，十全大補湯エキス末(G)は顆粒剤(J)の製造工程から一部抜きとったものであり，一方，10種類の生薬単味エキス末は，配合(C)の工程を除き十全大補湯エキス末(G)と同条件で作成されたものである．

作成された各エキス末はいずれも吸湿性が高く，なかでも茯苓エキス末は著しいものであった．これらの分析結果は表３に示したが，各エキス末に含有される水製エキス量は最大，黄耆エキス末96.4%，十全大補湯エキス末96.3%，最小，芍薬エキス末86.7%であった．これらは熱水抽出物であることから，100%に近い水製エキス含量が期待されたが，芍薬エキス末，桂皮エキス末，川芎エキス末などでは十分に水に溶解せず，10%以上のロスを生じた．これらは主に，抽出工程Dあるいは噴霧乾燥機によるエキス末製造工程Gで，加熱により水不溶性物質が生成した結果と推定している．

いずれの生薬単味エキス末においてもエキス含量は，水製，希エタノール，無水エタノールの順に低くなったが，原料生薬の各エキス含量(表２)と比較すると，この傾向は一様ではなく，無水エタノール含量から求められる脂溶性成分の占める割合は，必ずしも同一ではないことが明らかとなった．

AA は乾燥物１g当り0.22～3.98 mg の範囲でいずれの生薬単味エキス末にも含まれ，また十全大補湯エキス末１日量5.0 g 中には10.7 mg 含有されていた(表４)．各生薬単味エキス末に含まれる含量から十全大補湯の分

表３．十全大補湯エキス末及び各生薬単味エキス末の分析結果

	エキス含量 (%)[a]			γ-アミノ酪酸	乾燥減量
	水	希エタノール	無水エタノール	含量(mg/g)[a]	(%)
湯エキス末	96.3	82.5	15.2	2.25	4.0
人参エキス末	90.9	82.7	11.1	3.98	4.2
黄耆エキス末	96.4	85.5	12.3	1.67	4.2
蒼朮エキス末	94.0	72.9	2.0	0.43	4.5
茯苓エキス末	89.5	78.9	45.3	0.90	7.5
当帰エキス末	90.2	76.7	10.1	2.17	3.7
芍薬エキス末	86.7	75.7	22.7	2.80	4.0
地黄エキス末	95.4	94.6	3.8	0.29	3.5
川芎エキス末	88.4	66.3	9.7	3.86	3.2
桂皮エキス末	87.4	72.9	10.5	0.22	3.9
甘草エキス末	94.6	86.3	22.1	0.90	4.3

a) 乾燥減量値から乾燥物に換算した．

表4．グリチルリチン酸，ペオニフロリン，ケイヒ酸及びγ-アミノ酪酸の分析結果[a)]

	顆粒剤	湯エキス末	生薬単味エキス末	原料生薬
グリチルリチン酸				
1 g[b)]中の含量(mg)	2.79	3.99	91.5（甘草エキス末）	55.1（甘草）
1日量中の含量(mg)	19.9（103%）	19.4（100%）	19.7（102%）	74.8（386%）
ペオニフロリン				
1 g[b)]中の含量(mg)	6.39	9.31	69.4（芍薬エキス末）	37.1（芍薬）
1日量中の含量(mg)	45.6（102%）	44.7（100%）	42.4（ 95%）	102 （228%）
ケイヒ酸				
1 g[b)]中の含量(mg)	0.15	0.22	7.41(桂皮エキス末)	0.92(桂皮)
1日量中の含量(mg)	1.04(99%)	1.05(100%)	1.22(116%)	2.46(234%)
γ-アミノ酪酸				
1 g[b)]中の含量(mg)	1.51	2.25	1.77[c)]	1.04[d)]
1日量中の含量(mg)	10.7（100%）	10.7（100%）	10.4（ 97%）[c)]	26.8（249%）[d)]

a)（ ）内の%は1日量の十全大補湯エキス末5.0 g中の含量を100%とした時の数値.
b) 乾燥減量値から乾燥物1 gあたりに換算した.
c) 各単味エキス中のγ-アミノ酪酸含量を十全大補湯に配合する割合で合算し求めた.
d) 各原料生薬中のγ-アミノ酪酸含量を十全大補湯に配合する割合で合算し求めた.

量に従って換算し，1日量あたりとして合計すると，AAは10.4 mgとなり，ほとんど同じ値となった.

AAの分析結果と合わせGA，PF及びCAの結果を表4に示したが，十全大補湯エキス末1日量中の含量を100%とすると，甘草エキス末に含まれるGAは102%，芍薬エキス末に含まれるPFは95%，桂皮エキス末に含まれるCAは116%で，生薬単味エキス末に含まれる成分は湯エキス末となっても含量は大きくは増減しないことが明らかになった.

次に，原料生薬に含まれるGA，PF，CA及びAA含量を十全大補湯エキス末の分析値と比較した．湯エキス末1日量中の含量を100%とすると，甘草1.5 gに含まれるGAは386%，芍薬3 gに含まれるPFは228%，桂皮3 gに含まれるCAは234%であり，また，各生薬に含まれるAAを十全大補湯1日量中の分量に従って合算すると249%となった．原料生薬に2～4倍量の成分が含まれることは，湯エキス末には生薬含有成分の半量あるいはそれ以下しか移行しなかったことになる．生薬は天然資源であり，その有効利用を考えると，収率を上げるよう検討する必要がある.

(3) 十全大補湯エキス顆粒剤の品質

顆粒剤について以下の理化学試験を実施した.

包装形態及び性状に異常はなく，1包中の重量偏差試験[8)]を行ったところ，最大2.54 g，最低2.47 g，平均2.52 gでその相対標準偏差は1.5%と偏差の小さい試料であった．また，崩壊試験[9)]では3分以内に極めて容易に崩壊し，灰分は4.77%，酸不溶性灰分は0.19%の分析値を示した.

乾燥物1 gあたりのGAは2.79 mg，PFは6.39 mg，CAは0.15 mg，AAは1.51 mgで，各々の含量を1日量（3包，7.56g)あたりに換算すると，十全大補湯エキス末1日量に対しGAは103%，PFは102%，CAは99%，AAは100%となった．これらの定量値は市販の医療用十全大補湯エキス製剤[17)]と比較するとやや高く，臨床研究用試料として問題はないと判断した．すなわち，十全大補湯エキス末と顆粒剤は成分的に同等性が確保され，統一した研究試料として十分なものと考えた.

ま と め

十全大補湯原料生薬10種について，経験的に良品とされるものを選択し各種試験を行った．その結果，これらはいずれも日局試験に適合し，成分含量面からも質の高いものであることが判明した.

これらを用いて，十全大補湯エキス末，十全大補湯エキス顆粒剤及び生薬単味エキス末を委託製造し，原料生薬と同様の各種試験により品質を検討した．その結果，各エキス末及び顆粒剤は成分的に同等であり，本事業における統一試料として十分な品質が確保されているものと考察された.

そして，顆粒剤は製剤試験に適合し，1日量あたりの成分含量はグリチルリチン酸19.9 mg，ペオニフロリン

45.6 mg，ケイヒ酸1.04 mg，γ-アミノ酪酸10.7 mgであった．これらの分析値が市販の同一処方製剤より高いことから，研究試料として良質な薬剤と考えている．

謝辞 本研究にあたり，十全大補湯エキス末，顆粒剤及び生薬単味エキス末の製造に御協力頂いた㈱ツムラに深謝致します．
(本研究は，平成3年度衛生局東洋医学事業「十全大補湯エキス顆粒剤に関する研究」の一部として実施したものである．)

文　献

1) 矢数道明：臨床応用漢方処方解説，241-244，1966，創元社，大阪.
2) 大塚恭男，室賀昭三，赤堀　昭，他編：新・漢方処方マニュアル，157，1991，思文閣出版，京都.
3) 成川一郎：漢方の主張，179-187，1991，健友館，東京.
4) 日本公定書協会編：第12改正日本薬局方解説書，D-111－D-114，D-196－D-203，D-271－D-276，D-407－D-409，D-428－D-432，D-535－D-537，D-559－D-562，D-664－D-668，D-714－D-721，D-835－D-837，1991，廣川書店，東京.
5) 一色直太郎：和漢薬の良否鑑別法及び調製方，1982，谷口書店，東京.
6) 任仁安編：中薬鑑定学，1986，上海科学技術出版社，上海.
7) 日本公定書協会編：第12改正日本薬局方解説書，B-185－B-198，1991，廣川書店，東京.
8) 日本公定書協会編：第12改正日本薬局方解説書，B-182－B-185，1991，廣川書店，東京.
9) 日本公定書協会編：第12改正日本薬局方解説書，B-382－B-391，1991，廣川書店，東京.
10) 原田正敏編：繁用生薬の成分定量，94-119，1989，廣川書店，東京.
11) 石橋無味雄，秋山和幸編：続医薬品の開発，19巻，製剤分析Ⅱ，275-291，1992，廣川書店，東京.
12) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，他：東京衛研年報，**42**，27-32，1991.
13) 厚生省薬務局監修：一般用漢方処方の手引き，131-132，1975，薬業時報社，東京.
14) 高橋奈穂子，安田一郎，瀬戸隆子，他：東京衛研年報，**40**，84-89，1989.
15) 西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子：生薬，**29**，139-146，1975.
16) 西本和光：現代東洋医学，**31**(1)，43-49，1982.
17) 未発表.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 46-50, 1992

紫雲膏の Epstein-Barr Virus 活性化抑制効果の発現について

浜野朋子*, 安田一郎*, 渡辺四男也*, 木島孝夫**, 徳田春邦***

Investigation of Constituents of "Shiun-ko" which Induce Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation

TOMOKO HAMANO*, ICHIRO YASUDA*, YOHYA WATANABE*,
TAKAO KONOSHIMA** and HARUKUNI TOKUDA***

The constituents related to the inhibitory effects on Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) activation of a kampo medicine for external application, "Shiun-ko", were investigated. The *in vitro* assay used EBV-EA activation by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) as the tumor promoter.

Assay of various in-house preparations showed the inhibitory effects on EBV-EA activation to increase significantly in the preparing processes where lard was added and where roots of *Lithospermum erythrorhizon* (Ko-shikon) or roots of *Arnebia euchroma* (Nan-shikon) were added finally ("Shiun-ko"), and to decrease in the preparations where lard was not added and where Shikon was not added. It was suggested that lard and Shikon, particularly Ko-shikon, are directly related to the inhibitory effects.

However, that effects of "Shiun-ko" have no correlation to the contents of shikonin and its derivatives (total shikonin content), the efficacious components of Shikon.

Keywords：EBV 活性化抑制効果 inhibitory effects on Epstein-Barr virus early antigen activation, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 漢方外用薬 kampo medicines for external application, 紫雲膏 shiun-ko, 硬紫根 roots of *Lithospermum erythrorhizon*, 軟紫根 roots of *Arnebia euchroma*, 総シコニン量 total shikonin content

緒　言

化学発癌の予防には，発癌2段階説[1]におけるイニシエーションとプロモーションの両過程のうち，プロモーションの阻害がより実効性の高いものと考えられており，医薬品開発の分野では発癌プロモーション抑制活性成分の検索が盛んに進められている[2]．その活性の検定法の1つとして伊藤らが提唱している，発癌プロモーター12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による Epstein-Barr virus (EBV) の活性化を指標としたアッセイ法[3]は，少量の試料で短期間に多数の処理が可能であるため，簡易的かつ有用な方法として広く応用されている．

紫雲膏は，紫根及び当帰を主剤とする漢方外用薬で，その抗菌・抗炎症作用により，湿疹，火傷，痔疾等の治療に繁用されるが，近年，本剤が発癌ウィルス EBV の活性化抑制作用に対し強い効果を示し，使用した Raji 細胞に対する細胞毒性が極めて弱いことが報告された[4]．

そこで，今回，その活性成分を明らかにするために，自家製剤を用い，伊藤らの方法に従って紫雲膏の EBV 活性化抑制効果を検討し，作用発現に関与している生薬の検索を行った．さらに，紫根の有効成分とされる shikonin 及びその類縁物質[5,6]の含量（総シコニン量）と活性との相関について考察を行ったので，併せて報告する．

実験の部

1．実験材料

紫雲膏構成生薬　紫根（東京市場品）；硬紫根及び軟紫根

*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 Pubulic Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
**京都薬科大学
***京都府立医科大学

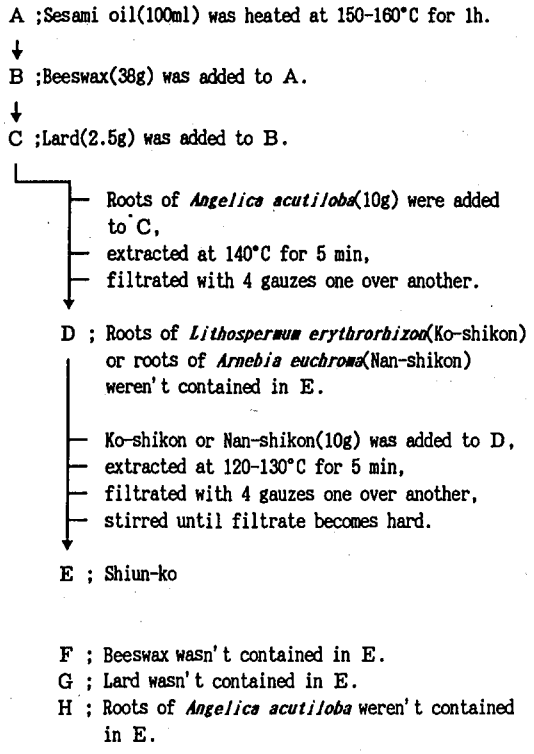


Fig. 1. Preparing Process of In-house Preparations

各6ロット，当帰(東京市場品)；7ロット，日局ゴマ油；8ロット，日局ミツロウ；7ロット，豚脂；6ロット．

自家製剤 上記構成生薬を適宜組み合わせ，Fig. 1に示す手順に従って，自家製剤A～Hの8種各8ロット，計64ロットを製した．

A；ゴマ油のみを加熱したもの
B；Aにミツロウを加えたもの
C；Bに豚脂を加えたもの
D；Cに当帰を加えたもの
E；Dに紫根を加えたもの(紫雲膏)
F；Eからミツロウを抜いたもの
G；Eから豚脂を抜いたもの
H；Eから当帰を抜いたもの

市販製剤 東京都内の薬局で購入したもの 15ロットを用いた．

2．EBV 活性化抑制効果

製剤約500 mg を正確に秤量し，無水エタノール約40 ml を加え，超音波処理後無水エタノールで正確に50 ml とした．これをジメチルスルホキシド(DMSO)で希釈して100, 10, 1 μg/ml の濃度の試料溶液を調製し，既報[4]の方法に準じて EBV 活性化試験を行った．また，1×10^6細胞/ml の濃度に調製した Raji 細胞に 4 mM 酪酸及び20 ng/ml TPA を加え，37℃，48時間培養したときの EBV early antigen(EA)陽性細胞の発現率を100として表わした．

3．総 shikonin の定量

既報[7]の方法に準じて行った．

すなわち，製剤約1.0 g を正確に量り，クロロホルムに溶かして正確に50 ml とした試料溶液について，525 nm における吸光度を測定し，別に作成した検量線から総 shikonin 量を求めた．

4．紫根の HPLC による分析

粉末とした紫根約500 mg を正確に量り，メタノール 40 ml を加えて15分間振とう抽出を行った．遠心分離後，残渣にメタノール25 ml を加え，同様の操作をさらに2回繰り返し，上澄を合してメタノールで正確に100 ml とした．これを0.45 μm のフィルターに通し，20 μl を HPLC に付した．

カラム；TSKgel ODS -80 T_M，4.6 mmI.D.×150 mm，5 μm，温度；40℃，移動相；アセトニトリル・水・酢酸(65：35：5)→(95：5：5)リニアグラジェント，流速；1.0 ml/min，検出；525 nm.

結果及び考察

1．紫根の HPLC パターン分析

日本薬局方[8]では，紫根として *Lithospermum erythrorhizon* の根(硬紫根)が規定されている．しかし，実際には，本邦市場品は中国から輸入される *Arnebia euchroma* (軟紫根)が主流となっており，形態上，識別に混乱を来たすものが見受けられる．有効成分は共に，赤色の naphthoquinone 系色素に属する shikonin 及びその類縁物質であるが，それらの組成及び組成比は互いに異なっている[6,9]ことから，両者は区別して用いるのが望ましいと考えられている．

東京市場において入手した硬紫根及び軟紫根12ロットについて HPLC を行ったところ，クロマトグラムは t_R 12.6分に出現するピークTの有無により，Ⅰ及びⅡに大別された(Fig. 2)．Ⅰのパターンを示した紫根はすべて市場において硬紫根，Ⅱはすべて軟紫根と称されたもので，HPLC パターンと呼称による分類は完全に一致した．軟紫根の特有成分として teracrylshikonin(teracrylalkannin)，anhydroalkannin が報告[6,9]されていることから，現在，Ⅱのみに出現するピークTについて，単離同定作業を進めている．

以下，EBV 活性化抑制試験を行うにあたっては，こ

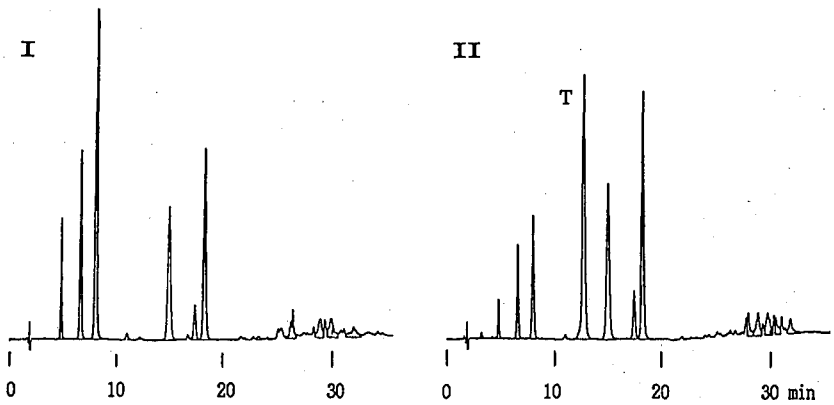


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Ko-shikon (Ⅰ) and Nan-shikonin (Ⅱ)

HPLC conditions were described in the experimental.

こで識別を明らかにした硬紫根及び軟紫根を用いて自家製剤を調製し，これを実験材料とした．

2．自家製剤の EBV 活性化抑制効果

自家製剤A～H 8種の各濃度における EBV 活性化抑制効果は，いずれも濃度に依存して高くなっており，ロット間の変動は大きいものの，概ね最終製品である紫雲膏(製剤E)の抑制効果が最大となる傾向が認められた．一方，細胞毒性については，10 μg/ml 以下の低濃度では発現せず，高濃度でも弱いものであった．

そこで，製剤間の効果の差が最も顕著であった100 μg/ml におけるデータをもとに，各製剤8ロットを平均化して Fig. 3 に表わし，抑制効果に関与する生薬の検索を行った．ゴマ油を加熱したAから最終製品であるEに至るまでの各工程毎の抑制効果は段階的に増加したが，

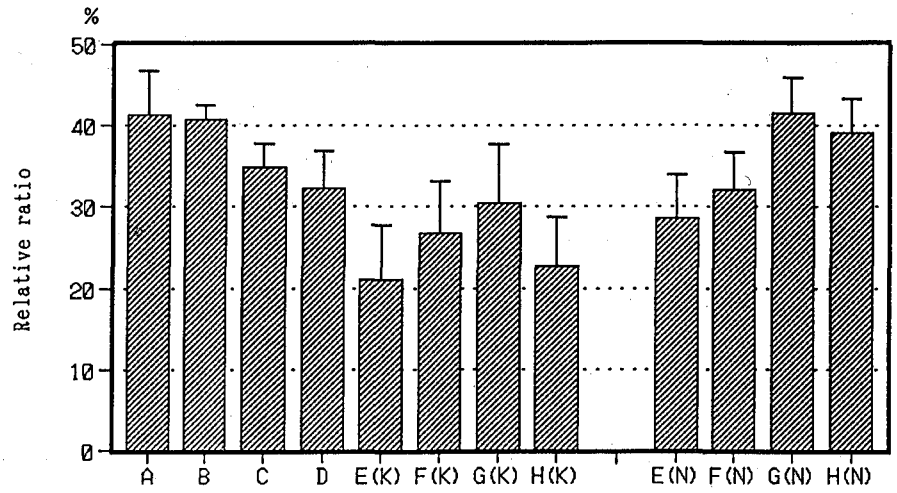


Fig. 3. Relative Ratio* of EBV-EA Activation with Respect to Positive Control (TPA 20 ng/ml) in Presence of Various In-house Preparations, A～H (100 μg/ml)

* Values are shown as means ± SE (n=8 in each group).
A; (sesami oil), B; A+(beeswax), C; B+(lard), D; C+(roots of *Angelica acutiloba*), E-(Ko-shikon or Nan-shikon), E; D+(Ko-shikon or Nan-shikon), "Shiun-ko", F; E-(beeswax), G; E-(lard), H; E-(roots of *Angelica acutiloba*)
(K); made of Ko-shikon, (N); made of Nan-shikon

BからCすなわち豚脂を加えた工程，及びDからEすなわち紫根を加えた工程で効果は大きく異なり，特に硬紫根(K)では約11%も増強された．また，紫雲膏(E)と各種抜き製剤(D，F～H)を比較すると，硬紫根で製した場合には，豚脂抜き製剤(G(K))及び紫根抜き製剤(D)と紫雲膏E(K)との効果の差が最も大きく，共に約10%であった．一方，軟紫根(N)で製した場合は，同様に紫雲膏E(N)と豚脂抜き製剤(G(N))との間に約13%と顕著な差が現われ，硬紫根に比べ相対的に小さいものの軟紫根による効果も認められた．以上のことから，本剤のEBV活性化抑制効果の発現に直接的に関与しているのは，紫根及び豚脂と推察された．

当帰については，紫雲膏(E)と当帰抜き製剤(H)の抑制効果の違いを比較したところ，硬紫根製E(K)ではその影響がほとんど現われなかったが，軟紫根製E(N)では紫雲膏の抑制効果を約10%も増強する傾向が認められた．この結果は，当帰エキスが硬紫根エキスに対してあまり影響を与えず，軟紫根エキスに対しては抑制効果を増強させるという報告[4]と一致するものである．

また，Bの抑制効果はAとほとんど変わらず，ミツロウ自身には活性がないものと推察された．しかし，E，Fを比較すると，硬紫根製及び軟紫根製共にミツロウを加えることによって抑制効果が強化されたことから，ミツロウは共存する他成分の活性を増強し，抑制効果の発現に間接的に寄与しているものと考察される．

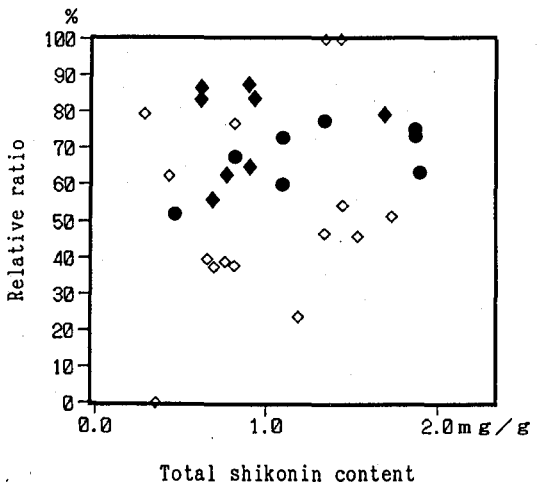


Fig. 4. Relation between Total Shikonin Content and Relative Ratio of EBV-EA Activation with Respect to Positive Control (TPA 20ng/ml) in Presence of "Shiun-ko" (10 μg/ml)

● ; in-house preparations made of Ko-shikon
◆ ; in-house preparations made of Nan-shikon
◇ ; commercial preparations

3．EBV活性化抑制効果と総shikonin量

本剤のEBV活性化抑制効果に紫根が関与していることが判明したことから，先の紫雲膏(E)16ロット及び市販製剤15ロットについて総shikoninを定量し，その含量と抑制効果との関連を検討した．EBV活性化抑制効果は，活性が認められ，かつ細胞毒性が現われない10 μg/mlの濃度での結果を用い，Fig. 4にプロットした．

紫根中の総shikonin量は，軟紫根の方が高いとされている[6,10]．しかし，著者らは既報[11]で硬紫根が高いとの結果を報告し，今回製した自家製剤についても同様に，硬紫根を用いた場合の方がやや高い傾向であった．その変動幅は，硬紫根製で0.5～1.9 mg/g，軟紫根製で0.6～1.7 mg/gといずれも大きく，その含量に対する抑制効果は50～90%の範囲に分布したが，両紫根の区別如何に関わらず，含量と抑制効果との間に相関は認められなかった．一方，市販製剤については，総shikonin量の変動幅は自家製剤とほぼ同様であったが，抑制効果は0～100%とさらに広範囲に分布し，この場合も相関は得られなかった．紫根の活性成分はshikonin及びその類縁物質の画分に存在すると推察される[12]ことから，本剤の有効性については，今後活性成分の単離同定を行い，その含量から論ずる必要があるものと考える．

結　語

紫雲膏のEBV活性化抑制効果の発現に関与する生薬について，各種自家製剤を用いて検索を行った．その結果，作用発現には紫根及び豚脂の関わりが大きいことが明らかとなった．紫根は，有効成分がnaphthoquinone系色素のshikonin及びその類縁物質とされることから，さらに，その含量と活性との関連について検討を加えたところ，自家製剤及び市販製剤共に，相関は全く認められなかった．

今後は，活性成分を検索し，単離，構造解析したうえで，その含量から検討を行う必要がある．

文　献

1) Berenblum, I.：*Cancer Res.*, **1**, 807-812, 1941.
2) Verma, A. K., Shapas, B. G., Rice, H. M., et al.：*Cancer Res.*, **39**, 419-425, 1979；Ohigashi, H., Takamura, H., Koshimizu, K., et al.：*Cancer Lett.*, **30**, 143-151, 1986；Tokuda, H., Konoshima, T., Kozuka, M. and Kimura, T.：*Cancer Lett.*, **40**, 309-317, 1988

; 木島孝夫, 徳田春邦, 小塚睦夫, 他：生薬, **41**, 344-348, 1987 ; Konoshima, T., Takasaki, M., Kozuka, M., et al.：生薬, **42**, 343-346, 1988 ; Konoshima, T., Takasaki, M., Kozuka, M., et al.：生薬, **43**, 135-141, 1989 ; Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., et al.：生薬, **44**, 346-348, 1990 ; Inada, A., Nakanishi, T., Konoshima, T., et al.：生薬, **44**, 215-218, 1990 ; Hagiwara, N., Ahn, Y. J., Ishida, M., et al.：生薬, **45**, 199-202, 1991 ; 安川 憲, 滝戸道夫, 竹内美恵子, 中川滋木：薬誌, **108**, 794-796, 1988.

3) Ito, Y., Kawanishi, H., Harayama, T., et al.：*Cancer Lett.*, **12**, 175-180, 1981 ; Ito, Y., Yanase, S., Fujita, J., et al.：*Cancer Lett.*, **13**, 29-37, 1981.

4) 木島孝夫, 小塚睦夫, 徳田春邦, 田部昌弘：薬誌, **109**, 843-846, 1989.

5) 田中康雄, 小谷 功：薬誌, **92**, 525-530, 1972.

6) 京極和旭, 寺山博行, 館 安英, 他：生薬, **27**, 31-36, 1973.

7) 浜野朋子, 安田一郎, 瀬戸隆子, 他：東京衛研年報, **33**, 95-99, 1982.

8) 日本公定書協会編, 第12改正日本薬局方解説書, D-418-420, 1991, 廣川書店, 東京.

9) 塚田 稔, 福井宏至, 羽原千里, 田端 守：生薬, **37**, 299-306, 1983.

10) 中国医学科学院薬物研究所等編, 中薬誌第一冊, 569-576, 1982, 人民衛生出版社, 北京.

11) 安田一郎, 浜野朋子, 瀬戸隆子, 秋山和幸：東京衛研年報, **34**, 93-97, 1983.

12) 浜野朋子, 安田一郎, 秋山和幸, 他：日本薬学会第110年会講演要旨集 2, 232, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 51-55, 1992

キャピラリーガスクロマトグラフィーによる山薬中アラントインの *tert* - Butyldimethylsilyl 化体の定量

萩原輝彦*, 渡辺四男也*

Determination of Allantion in Dioscoreae Rhizoma by Capillary Gas Chromatography as *tert* - Butyldimethylsilyl Derivatives

TERUHIKO HAGIWARA* and YOHYA WATANABE*

A method of capillary gas chromatographic determination of *tert* - butyldmethylsilylated (*tert* - BDMS) allantion was developed. Allantion extracted from Dioscoreae Rhizoma was derived with MTBSTFA [N - (*tert* - butyldmethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide] and pyridine by heating at 90°C for 24 hours. The *tert*-BDMS allantion was determined by gas chromatography equipped with a capillary column. The contents of allantoin in 7 lots of Dioscoreae Rhizoma on the market were 0.4～7.9 (mg/g). EI - MS spectral examination of the *tert* - BDMS allantion showed that the mass molecular ion [M] was at *m/z* 455.

Keywords：アラントイン allantion, 山薬 dioscoreae rhizoma, *tert* -ブチルジメチルシリル化 *tert* - BDMS, キャピラリィーガスクロマトグラフィ capillary gas chromatography, 電子衝撃型質量分析 EI-MS

緒　言

山薬，葛根，紫根及び防已などの生薬にアラントイン($C_4H_6N_4O_3$)(Fig. 1)は含有されており，その生理作用として抗炎症作用及び抗潰瘍作用などが知られている．アラントインの定量は主として，強カチオン系イオン交換充塡剤を用いる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行われている[1,2]．HPLC 法はアラントイン含有量の少ない防已や，六味丸などの漢方製剤では，カラムの劣化が比較的早く，また，妨害物からのピーク分離が不十分となり定量の困難な場合がある．アラントインは，水溶性の物質で分解しやすいこと，メタノールにわずかに溶ける以外ほとんどの有機溶媒に不溶であることなどから，これまでにガスクロマトグラフィー(GC)を用いる定量法は報告されていない．

今回，アラントインを，シリルバイアル瓶中で内標準物質(L-システイン)と共に N – Methyl – N – (*tert* - butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide(以下 MTBSTFA と略)及びピリジンを加え反応させ，アラントインを *tert* – Butyldimethylsilyl 化(以下 tert – BDMS 化と略)するキャピラリー GC 法について検討を行った。さらに tert – BDMS 化アラントインのマススペクトルを四重極電子衝撃型質量分析計(EI-MS)により測定し，生成物の確認を行った．また，本法を用いて他の生薬に比べ比較的含有量が多い山薬(Dioscoreae Rhizoma)中のアラントインについて定量を行ったので報告する．

実験の部

1．器具及び試薬

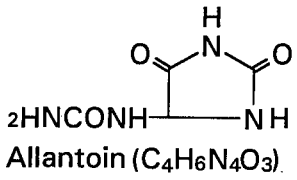
シリルバイアル瓶：テフロンシリコンセプタム・オープントップキャプ付，5 ml (ジーエルサイエンス)，ミクロピペッター：4700型(EPPENDORF)．

アラントイン：関東化学製．MTBSTFA：東京化成製．脱水ピリジン：関東化学製ピリジン(脱水)100 ml に無水硫酸ナトリウム 3 g を加えた上層を使用した．その他の試薬は既報[2]と同じ試薬を使用した．

2．装　置

キャピラリーガスクロマトグラフィー装置：DB - 1 キャピラリーカラム(30 m×0.25mm, J&W)を GC-14 A 型ガスクロマトグラフ(島津製作所製)に装着し，インテグレータ(CR4 A クロマトパック：島津製作所製)に接続した．四重極型質量分析計：オートマス20型(JEOL)．減

*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



Allantoin ($C_4H_6N_4O_3$)

Fig. 1.

圧加温型乾燥器：UVS. 30型(HEIDON)．超音波発生装置：B-2200型(BRANSONIC)．ドライブロックバス：AL・500型，アルミブロック：シリルバイアル瓶，5 ml用，20穴(SCINICS)．

3．定量法

粉砕した山薬約0.2 g を50 ml 遠心管に正確に量り取る．新たに調製した蒸留水 8 ml 及び内標準物質〔L-シスイン(1→4,000)〕2 ml を正確に加え，加温した水を入れた超音波発生装置を用いて20分間抽出する．冷後，10分間遠心(3,000 rpm)し，上澄をメンブランフィルター(0.45 μm)でろ過する．このろ液0.5 ml をシリルバイアル瓶に加え栓を緩めにして減圧乾燥器(50° 五酸化リン)中で完全に水を除去する．冷後，MTBSTFA 及びピリジン100 μl ずつを加え強く栓を締めた後，シリルバイアル瓶全体を内容液に接触させ90° に保ったドライブロックバスに入れ，24時間反応させる．冷後，酢酸エチル250 μl を加えよく混和した後，この液1 μl を GC に注入する(Chart 1)．

結果及び考察

1．*tert*-BDMS 化反応条件

アラントインは酸及びアルカリにより容易に加水分解をうけるため，GCの誘導体化には強酸や強アルカリなどを使用することはできない．今回，比較的緩和でアラントインに加水分解を起こさせない．*tert* – BDMS 化反応について検討を行った．MTBSTFA は，有機酸[3]，チオール[4]，スルホン化合物[5]，アミノ酸[6-10]及びステロイド[11,12]などの GC 誘導体化剤として使用されてきたものであるが，*tert* – BDMS 化の反応条件は，対象となる反応基質により，これまで反応温度，反応時間，溶媒及び試薬などがそれぞれ経験的に決められている．そこで反応条件を設定するため，溶媒にピリジンを使用し，内標準物質(L-システイン)に対する反応収量及び再現性について経時的に検討した(Fig. 2)．時間の経過に従い *tert* – BDMS 化アラントインの内標準物質に対するピーク面積比及びその再現性(n＝3)は向上，ほぼ20時間で一定になった．また，反応温度は70°，90° 及び110° で検討したが，反応温度70° では *tert* – BDMS 化アラントインの収量は低く，また，反応温度110° では GC クロマトグラフ上に多くの分解ピークがみられた．よって，反応温度は90° 反応時間24時間とした．

Chart. 1. The Procedures for Determination of Allantoin in Dioscoreae Rhizoma.

- Take 0.2 g of pulverized sample in centrifuge flask.
- Add 8 ml of water and 2 ml of internal standard solution (IS) *.
- Sonicate for 20 min.
- Centrifuge for 10 min (3,000 rpm) and filter the supernatant with membrance (0.45 μm).
- Take 0.5 ml of the filtrate in a silylvial (5 ml) and close the cap a bit loosely.
- Evaporate the water in a desiccator (50°, reduced pressure, phosphorus pentoxide).
- Add 100 μl of MTBSTFA and 100 μl of pyridine.
- Derivatize for 24 h in hot dry bath at 90°.
- Add 250 μl of ethyl acetate and mix.
- Inject 1 μl of the mixture to GC.

*Internal standard: L – cysteine (1→4,000)

(GC conditions)
Column: DB – 1 (0.25 mm×30 m, J&W), Initial temp.: 240°, Initial time: 2 min, rate: 5°/min, Final temp.: 280°, InJ. temp.: 260°, Inj. vol.: 1 μl; split (1:50), Range: 10^1,

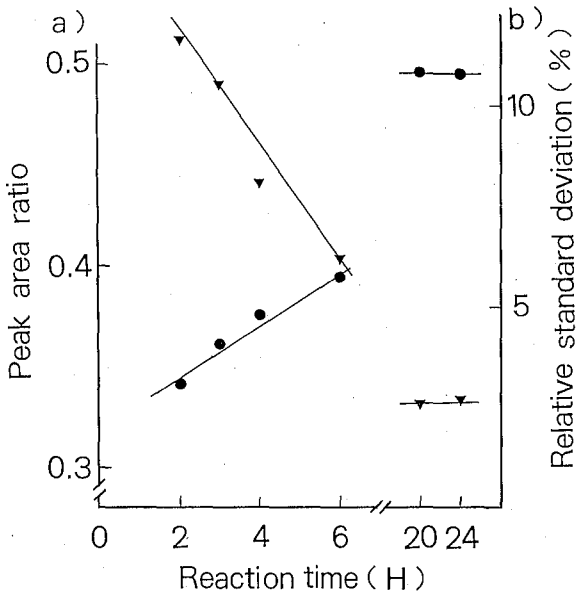


Fig. 2. Time Course for the Change of Peak Area Ratio vs Reaction Time.
a) : ●: Average of peak area ratio (n= 3).
b) : ▼: Relative standard of deviations of peak area ratio (n= 3).
The mixture of 25 μg of allantion, 12 μg of IS (L-cysteine), 100 μl of MTBSTFA and 100 μl of pyridine was used for the reaction. At each time, 1 μl of the reaction mixture was injected on GC.

2. 直線性

10 ml 中にアラントインを0.06～1.0 mg 含有する濃度系列(n = 6)を作成し，それぞれ0.5 ml ずつを 2 回繰り返して *tert* – BDMS 化した．内標準物質に対するピーク面積比により作成した検量線はよい直線性を示した(Y =1.062X -0.076, r >0.99ただし，X：ピーク面積比，Y：アラントイン mg /10 ml)．なお，本法により検量線を作成した場合，日差変動が認められるため，標準アラントインと試料は同時に *tert* – BDMS 化して試料の定量を行う必要がある．

3. *tert* - BDMS 化アラントインの安定性

アラントイン0.5 mg (n = 6)を本法にしたがい *tert* – BDMS 化し実験室内で 6 日間放置後の内標準物質に対するピーク面積比を求めた(Table 1)．各種 *tert* – BDMS 化化合物の反応後の安定性については多くの報告[4,5,7,9,10,14,15]がある．*tert* – BDMS 化アラントインもこれらと同様に反応後は極めて安定であった．

Table. 1. Stability of tert – BDMS Allantoin.*1

Silyl bottle[2]	1	2	3
0 day	0.925*3	0.934*3	0.927*3
6 day	0.910*3	0.899*3	0.910*3
Stability (%)	98.4	96.3	98.2

*1 The mixture of 0.5 mg of allantion and 0.2 mg of IS (L-cysteine) in 10 ml of water was determined by the proposed method (Chart 1).
*2 After reaction of the tert – BDMS allantoin (90°, 24h), the bottle was stored at ambient temperature in the laboratory.
*3 Peak area ratio (allantion/IS).

Table. 2. Recovery Test of Allantion.*1*2

Found (mg)	0.46	0.47	0.46	0.52	0.48	0.47

$\bar{X}$=0.477 mg σ_{n-1}=0.0225 mg RSD=4.7%
Recovery=95.4%

*1 Each value represents duplicate analyses of an independent sample.
*2 Allantoin (0.5 mg) dissolved in 2 ml of water was added to 0.2 g of pulverized Dioscoreae Rhizoma.

4. 添加回収実験

tert – BDMS 化を GC 定量に用いた場合，試料に直接添加して回収実験を行った報告は少ない[3]．また，*tert* – BDMS 化反応の生成量に再現性はないとする結告もある[13]．そこで，山薬0.2 g にアラントイン(0.5 mg / 2 ml)を添加して回収率(n = 6)を求めた(Table 2)．*tert* – BDMS 基はかさ高く，また，アラントインは分子内に複数の二級アミノ基があるため *tert* – BDMS 化反応は遅い進行が予想された．しかし，内標準物質と共に90°，24時間で反応はほぼ完全に終了し，回収率は約95%であり，その相対変動係数は 5 %という結果を得ることができた．

5. 市場品山薬中アラントインの定量

これまで，山薬中のアラントイン定量は HPLC 法により行われている．相楽ら[1]及び滝戸ら[16]はそれぞれ2.0～7.2(mg /g)及び2.7～9.6(mg /g)のアラントインを山薬中から検出している．今回，市場品山薬 7 ロットについて本法(GC 法)及び本法により水抽出した液を HPLC

Table. 3. Determination of Allantoin in the Dioscoreae Rhizoma accomplished by the proposed method.

Sample		Proposed method*1	HPLC*2
1	China	1.6 (mg/g)	2.7 (mg/g)
2	China	0.4	1.1
3	Japan	7.9	5.5
4	China	3.1	3.7
5	China	0.8	1.0
6	China	2.3	3.1
7	Japan	6.7	4.0

＊1 Each value represents duplicate analyses of an independent sample.

＊2 The same extracted solution was determined by GC and HPLC.

(HPLC conditions)
Column : TSK – gel SCX, 6 mmid×15cm (TOSOH),
Mobile phase : 1/15 M Potassium dihydrogenphosphate,
Flow rate : 0.5 ml /min, Column temp. : 40°
Detection : UV 210 nm, 0.16 AUFS, Rec. out, ATT× 3,
Inj. vol. : 10 μl.

法で定量した(Fig. 3 及び Table 3). GC 法と HPLC 法の定量値はアラントイン含量の多い試料でやや GC 法が高めになる傾向があるが，その他の試料では，一致した結果を与えた.

6. *tert* - BDMS 化アラントインのマススペクトル

EI-MS により *tert* - BDMS 化アラントインのマススペクトルを測定した(Fig. 4). *tert* – BDMS 化誘導体では，分子イオン［M］から *tert* - ブチル基が離脱した強い［M-57］イオン及びメチル基が離脱した［M-15］イオンがマススペクトルに現れることが知られている. *tert* - BDMS 化アラントインでは，*m/z* 398の強いピークが［M-57］イオンに相当し，*m/z* 440にも［M-15］イオンが観測されることから，*m/z* 455のイオンが分子イオンピークであると推定された.

ま と め

1. これまでの *tert* - BDMS 化反応条件は，室温～75°で20分～5時間程度反応させる報告が多い. しかし，アラントインの至適反応条件は高温と長時間(90°，24時間)を必要とした.

2. *tert* - BDMS 化アラントインは共存物質の影響を受けず，キャピラリー GC により分離定量された. また，室温保存では6日間安定であった.

3. マススペクトル上で，*tert* - BDMS 体に特徴的な *m/z* 398[M-57]$^+$及び *m/z* 440[M-15]$^+$のピークが容易に確認されたことより *m/z* 455のピークが分子イオンピークであると推定された.

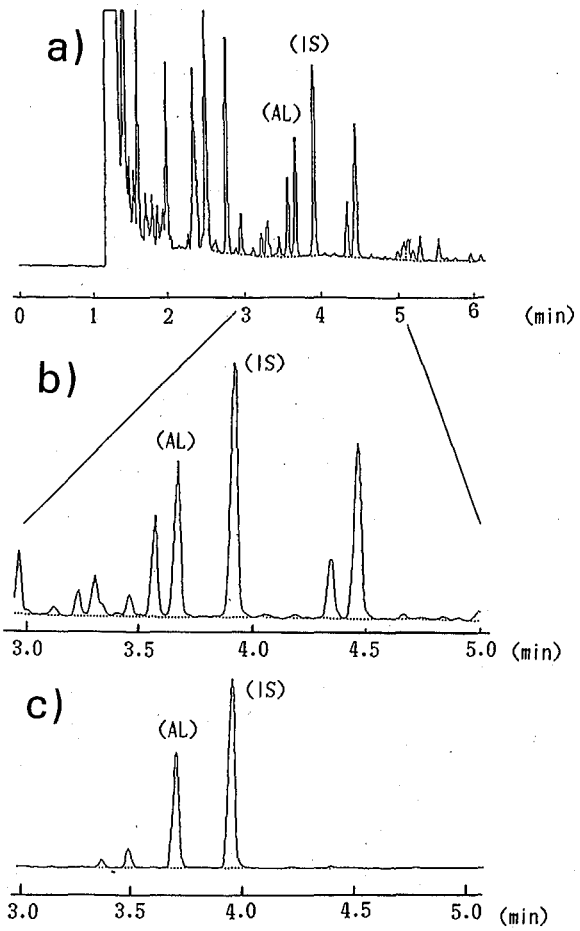


Fig. 3. Capillary gas chromatography of *tert* - BDMS Allantoin in the Dioscoreae Rhizoma a),c) and authentic standard of Allantoin b).

(Operating Conditions for GC)
Model: Hewlett 5890 (Hewlett Packard)
Column: DB – 1 0.25 mm×30 m (J&W)
Int. temp. : 240° Int. time : 2 min Rate : 5°/min Int. tem. : 260° Inj. vol. : split (1 : 50) : 1 μl Range : 10^1 Integrator:Chromatopac CR 4 AX (Shimadzu)

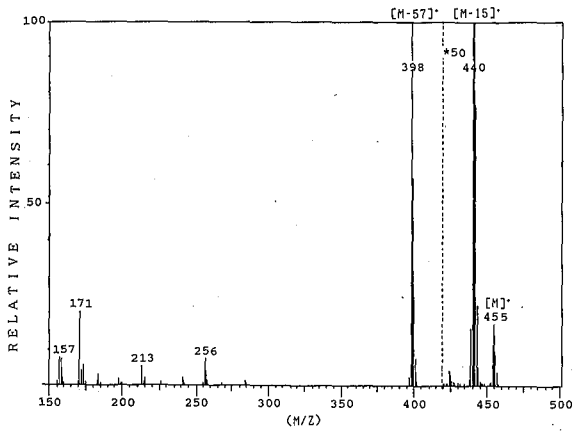


Fig. 4. EI Mass Spectra of *tert*-BDMS Allantion.

(Operating Conditions for GC/MS)
Model: JMS- Automass 20 Ouadrupole Mass spectrometer (JEOL)
Ionization : Electron impact Ionization voltage : 70 ev Ionization current: 300 μA Interface temp. : 250° Source temp. : 150° Printer: Laser Jet Ⅲ (Hewlet Packard)

文 献

1) 相原和彦, 須藤桂一, 吉田継親：生薬学雑誌, **42**, 268-271, 1988.
2) 萩原輝彦, 秋山和幸：東京衛研年報, **42**, 15-20, 1991.
3) Tomas, C. and Carina, N.: *J. Chromatogr.*, **344**, 1-9, 1985.
4) Deborah, C. L. and Thomas, P. M.: *J. Chromatogr.*, **483**, 21-32, 1989.
5) Lay - Keow, NG. and Miche, H.: *J. Chromatogr.*, **513**, 61-69, 1990.
6) Mackenzie, S. L. and Tenaschuk, D.: *J. Chromatogr.*, **322**, 228-235, 1985.
7) Thomas, P. M., Robin, R., Asmaew, A. and Michael, A. M.: *J. Chromatogr.*, **358**, 231-242, 1986.
8) Fortier, G., Tenzschuk, D. and Mackenzie, S. L.: *J. Chromatogr.*, **361**, 253-261, 1986.
9) Chaves, D. N. and Vasconcelos, A. M. P.: *J. Chromatogr.*, **392**, 249-258, 1987.
10) Mackenzie, S. L., Tenaschuk, D. and Fortier, G.: *J. Chromatogr.*, **387**, 241-253, 1987.
11) Stig, H. G. A. and Jan, S.: *J. Chromatogr.*, **289**, 195-206, 1984.
12) Kwan, T. K., Taylor, N. F. and Gower, D. B.: *J. Chromatogr.*, **301**, 189-197, 1984.
13) Thomas, P. M. and Michael, A. D.: *J.* Org. Chem., **47**, 3336-3339, 1982.
14) Thomas, P. M.: *J. Chromatogr.*, **257**, 37-44, 1983.
15) J. Garfield, P., Jack, G. P. and Raynor K. M.: *J. Chromatogr.*, **475**, 261-272, 1989.
16) 滝戸道夫, 桃澤洋三, 菅谷愛子, 平賀敬夫, 後藤勝実：東洋医学事業研究報告書, 平成2年度, 113-156, 1991, 東京都衛生局薬務部, 東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 56-58, 1992

東京都におけるめっき廃水中のシアンについて (1970年度－1990年度)

岩崎 由美子*, 奥本 千代美*, 渡辺 四男也*

Trend of Analytical Data of Cyanide in Waste Water from Metal Plating Process in Tokyo Area (Apr. 1970 – Mar. 1990)

YUMIKO IWASAKI*, CHIYOMI OKUMOTO*
and YOHYA WATANABE*

Keywords：シアン化物 cyanide, 廃水 waste water, めっき事業所 metal plating process

緒　言

東京都衛生局薬務部の電気めっき業者を対象とするシアン廃水指導取締事業は数年の予備的調査を経て，1970年度から開始された．当研究科では，この事業の試験部門を担当し，めっき廃水中の遊離シアンの含有量を測定している．めっき廃水については，当初はシアン含有量を1lにつき2mg以下となるように処理して排水することが法[1]により義務づけられていたが，1971年の施行令[2]の改正により1lにつき1mg以下に改められた．

本報では，1970年度から1990年度までの21年間のシアン検査結果について集計し，めっき事業所数の年次推移及び地域分布，検査件数の年次推移，シアン含有量の推移並びに違反率の年次推移について集約したので報告する．

調査方法

1．試　料

シアン廃水指導取締事業に基づき，都内のめっき事業所から採水されたシアン廃水である．

2．調査期間

シアン廃水指導取締事業が開始された1970年度から1990年度までの期間である．

3．資　料

(1) **事業所数**　薬務部より各年度初めに配布されたシアン取扱者名簿の事業所の数を採用した．この事業所数は4月1日現在の届出事業所数である．

(2) **検査件数**　当研究科の報告書に記載された件数を採用した．

(3) **シアン含有量**　厚生省令[3,4]に従い測定しためっき廃水のシアン含有量である．

(4) **違反件数**　シアン含有量が規制値を超えるものの件数である．ただし，1971年5月31日までは1lにつき2mg，それ以降は1lにつき1mgを超えたものとする．

また，参考検体として送付されためっき槽液等の試料については，(3)及び(4)の集計から除外した．

4．分析方法

(1) **事業所数の年次推移及び地域分布**　事業所数の21年間の年次推移を観察した．また，1990年度の事業所数を地域別に区分し，地域分布を観た．更に，1970年度と1990年度の地域別事業所数を比較した．

地域区分は全部を23区と多摩に分け，23区は区単位で，多摩は保健所単位で区分した．

(2) **検査件数の年次推移**　検査件数の年次推移を観察した．

(3) **シアン含有量の推移**　1970年度から4年毎の年間の全測定結果を，シアンを検出しないもの(0.1 μg/ml未満)，0.1 μg/ml以上1 μg/ml以下のもの，1 μg/lを超え100 μg/ml以下のもの及び100 μg/mlを超えるものに濃度範囲で分け，濃度範囲別の検出率の推移を観察した．

(4) **違反率の年次推移**　違反率の年次推移を観察した．

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

結果及び考察

1．事業所数の推移及び地域分布

めっき事業所数の年次推移を図1に示した．1970年度には1,727件あった事業所数は，漸次的に減少し，1990年度には1970年度の47.0％の812株になった．

1990年度の地域別の事業所数は，23区で741件，多摩で71件であった．事業所数が100件を超える地域は墨田，葛飾及び大田の3区であった．一方，中央区と五日市保健所には事業所が存在しなかった．1990年度の地域分布を観る限り，事業所は23区に集中している．

1990年度の全都の事業所数は取締事業が開始された1970年度に比べて大幅に減少している．両年度間の事業所数の減少率を地域別に比較すると，全都では53.0％，23区では53.7％，多摩では44.1％であった．特に減少率が70.0％を超える地域は，23区では中央，新宿，港，江東，杉並及び千代田区で，多摩では青梅及び武蔵野保健所であった(表1)．

2．検査件数の年次推移

検査件数の年次推移を図2に示した．シアン廃水指導取締事業が開始された1970年度には3,962件であった検査件数は，取締強化のため検査回数を増やしたことにより，増加して1973年度には7,476件になった．それ以降は1974年度からの4年間を除いて，1990年度まで年間7,000件を超えている．

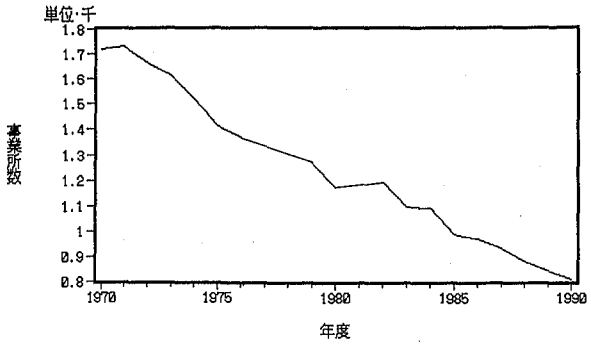


図1．めっき事業所数の年次推移

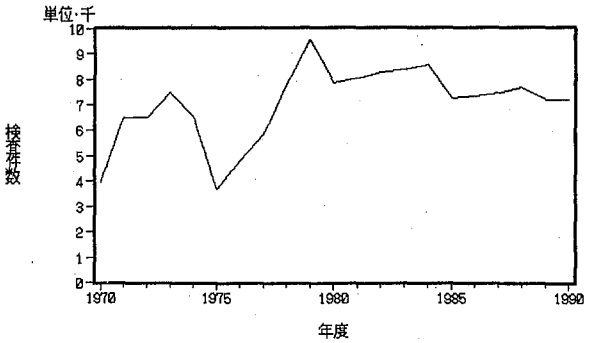


図2．めっき廃水中のシアン検査件数の年次推移

表1．地域別のめっき事業所数と減少率

地域	事業所数（件） 1970年度	1990年度	減少率(％)
全都	1,727	812	53.0
23区	1,600	741	53.7
中央区	3	0	100.0
新宿区	20	1	95.0
渋谷区	32	5	84.4
港区	47	8	83.0
江東区	42	9	78.6
杉並区	11	3	72.7
千代田区	14	4	71.4
多摩	127	71	44.1
青梅保健所	8	2	75.0
武蔵野保健所	4	1	75.0

(減少率が70.0％を超える地域のみ記載した)

3．シアンの含有量の推移

1970年度から4年毎の濃度範囲別の検出率の推移を図3に示した．検出率は1970年度では62.5％と高率であったが，4年後の1974年度には約2割の13.1％に急激に減少し，1978年度には8.3％になった．それ以後は緩やかに減少して，1990年度には6.8％にまで下がっている．

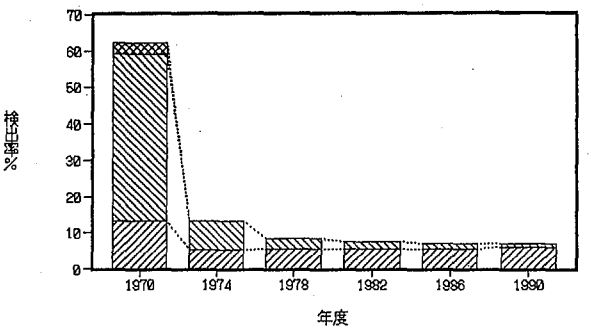


図3．シアン含有量の濃度範囲別の検出率の推移

a：シアン含有量（μg/ml）

▨：0.1 ≦ a ≦ 1，▧：1 ＜ a ≦ 100，▩：100 ＜ a

また，シアンの検出率の内訳を観ると，0.1 μg/ml 以上 1 μg/ml 以下の検出率は1970年度には12.3%であったが，1974年度以降は約 5 %となり，その後は一定となった．1 μg/ml を超え100 μg/ml 以下の検出率は1970年度には46.1%であったが，1974年度には7.9%に急減し，それ以降は除々に減少して，1990年度には0.9%となっている．また，極めて高い100 μg/ml を超える濃度の検出率は1970年度には3.2%であったものが，1974年度には0.1%に激減し，1986年度以降には検出されていない．

これらのことより，シアンの検出率は1974年度までに急速に減少しており，また，1 μg/ml 以上の違反の検出率も，年々減少していることがわかった．

4．違反率の年次推移

上記の違反率の減少を詳細に検討するために，違反率の年次推移を観察した(図 4)．シアン廃水指導取締事業が始まった1970年には43.0%であった違反率は，急速に減少して1974年度には8.0%にまで下がった．それ以降は緩やかに減少して1982年度には 2 %以下となり，1990年度には1.0%となっている．このような違反率の推移は，検出率の推移とよく符号している．

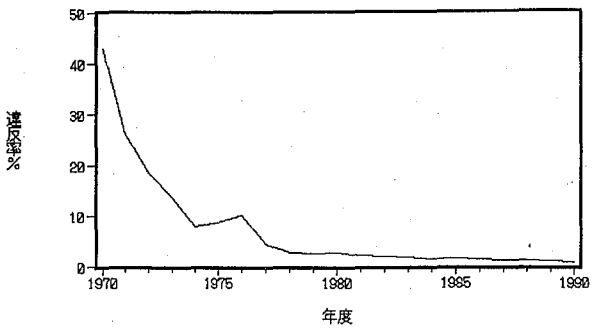


図 4．シアン含有量の違反率の年次推移

1970年度から1974年度までの違反率の急減と，1982年度以降，2 %以下の違反率を維持していることは，電気めっき業者の自主管理の励行と，薬務部の適切な指導取締が相乗的に効果を上げたものと思われるが，違反率 0 %を目指して関係者の一層の努力が必要と考えている．

ま と め

1．都内の事業所数は21年間に減少を続けて，1990年度には1970年度の47.0%の812件になった．

2．事業所は23区に集中しており，特に，墨田，葛飾及び大田区に多く存在している．

3．検査件数は1978年以降7,000件を超えている．

4．シアンの検出率は1970年度から1974年度の間で急減し，1970年度の 2 割の13.1%になり，1990年度には6.8%になっている．

5．1970年度には43.0%あった違反率は，減少し続けて，1982年度以降は 2 %以下を維持している．

謝 辞 ご協力いただいた薬務部薬事衛生課毒劇物指導係の皆様に深謝いたします．

文 献

1）政令第 3 号，昭和40年 1 月 4 日．
2）政令第46号，昭和46年 6 月 1 日．
3）厚生省令第 1 号，昭和41年 1 月 8 日．
4）厚生省令第46号，昭和46年12月27日．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 59-65, 1992

可視部吸収検出器を用いた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タール色素の分析

伊藤弘一*, 岸本清子*, 鈴木助治*, 中村　弘*

Determination of Water Soluble Coal-Tar Dyes for Cosmetics and Toiletries by Ion-Pair HPLC using Visible Spectrophotometric Detector

KOICHI ITOH*, KIYOKO KISIMOTO*, 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, 可視部吸収検出器 visible spectrophotometric detector, タール色素 coal-tar dyes, 化粧品 cosmetics

緒　言

我国では厚生省令により83種のタール色素が医薬品，医薬部外品及び化粧品への使用を許可されている．このうち約半数は水溶性色素であり，現在多くの化粧品に使用されている．化粧品中の色素分析は従来薄層クロマトグラフ(TLC)法によって行われているが，共存する活性剤等を除去するために煩雑な前処理を必要とし，迅速にルーチン分析を行うことができない．そこで著者らは前報[1]でケイ光検出器を用いたイオン対高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により水溶性ケイ光タール色素の分析法を報告した．

現在報告されているタール色素の一斉分析法は大半が四級アンモニウム塩を用いたイオン対HPLC法であり，分離モードはグラジェントによるものである[2-4]．しかし，グラジェントによる分離モードでは，色素の保持時間の再現性が悪く，多量の活性剤を含む試料の分析には適さない．そこで著者らはアイソクラティック分析を用いることとし，37種の水溶性タール色素及び米国において許可されている色素1種の計38種について，検出器に可視部吸収検出器を用い，種々の四級アンモニウム系カウンターイオンを用いたイオン対HPLC法による簡易迅速分析法を検討した．さらに本法を用いて市販化粧品の分析を行ったので併せて報告する．

実験方法

1．試　薬　標準色素として赤色(アマランス)，同3号(エリスロシン)，同102号(ニューコクシン)，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)，同503号(ポンソーR)，同504(ポンソーSX)，黄色4号(タートラジン)，同5号(サンセットエローFCF)，同403号(ナフトールエローS)，緑色3号(ファストグリーンFCF)，青色1号(ブリリアントブルーFCF)及び同2号(インジゴカルミン)は国立衛生試験所標準品を，緑色204号(ピラニンコンク)は癸巳化成㈱製の米国FDA認定品を，赤色201号(リソールルビンB)，同213号(ローダミンB)，同227号(ファストアシッドマゲンタ)，同230号の(2)(エオシンYSK)，同401(ビオラミンR)，だいだい色205号(オレンジⅡ)，同207号(エリスロシン黄NA)，同402(オレンジ1)，黄色202号の(1)(ウラニン)，同203号(キノリンエローWS)，同402号(ポーラエロー5G)，同406号(メタニルエロー)，同407号(ファストライトエロー3G)，緑色201号(アリザリンシアニングリーンF)，同401号(ナフトールグリーンB)，かっ色201号(レゾルシンブラウン)，黒色401号(ナフトールブルーブラック)及び紫色401号(アリズロールパープル)は同社製の化粧品用の市販品を，赤色506号(ファストレッドS)，FD&C Red No. 40(アルラレッドAC)，緑色205号(ライトグリーンSF黄)及び同402号(ギネアグリーン)はアルドリッチ製試薬を，赤色502号(ポンソー3R)は東京化成工業試薬を用いた．

カウンターイオン用試薬の臭化テトラブチルアンモニ

*東京都立衛生研究所理化学部薬品研究科 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

ウム(以下TBAと略す)および臭化テトラペンチルアンモニウム(TPA)は関東化学製特級品を，臭化テトラヘキシルアンモニウム(THA)，臭化テトラヘプチルアンモニウム(THPA)および臭化テトラオクチルアンモニウム（TOA)はアルドリッチ製特級品を，塩化セチルピリジニウム(CPC)および塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTA)は東京化成工業製特級品を用いた．

その他の試薬はすべて和光純薬工業製特級品または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：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-3-5)(東ソー)

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

4．試験溶液の調製　4-1．固体試料　試料0.5～2.0gを50 mlの遠心分離管にとり，メタノール20 mlを加えて混和し，超音波浴を用いて15分間抽出を行った後，3,000 rpm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 80TM(5 μm, 4.6 mm i, d,×150 mm)(東ソー)，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

1．HPLC測定条件の検討

1．カラム　逆相クロマトグラフィーにより分析を行うことを目的として，C_8(オクチル)およびC_{18}(オクタデシル)のカラムを検討したところ，色素相互の分離が適当であったC_{18}のTSKgel ODS 80TMを用いることとした．

2．移動相　分析法はアイソクラティック分析として移動相の検討を行った．大戸らはイオン対HPLCにより食用色素を一斉分析するために，種々の四級アンモニウム塩の検討を行っている[5]．そこで著者らは前記報文を参考とし，38種の水溶性タール色素を化学構造および色調別に分類し，四級アンモニウム塩にはTBA, TPA, THA, THPA, TOA, CPCおよびCTAを用いてHPLCの測定条件の検討を行い，表1の測定条件を得た．例えばアゾ系黄色色素の分離用移動相は，アセトニリル：25 mMリン酸緩衝液(3：2)に5 mMのTPAを加え，リン酸にてpHを3として作製した．また本条件で得られた主なクロマトグラムを図1～6に示す．

3．検出波長　検出波長は黄色系色素には400 nmを，だいだい色系色素には475 nmを，赤色系色素には525 nmまたは570 nmを，青色系色素には600 nmまたは640 nmを用いた．また各色素のピークの測定波長別面積比を求めるために，すべての色素について400 nm, 475 nm, 525 nm, 575 nm, 600 nmおよび640 nmにて測定を行った．なおキサンテン系色素の黄色202号は本移動相の条件では可視部の吸収が弱いため測定にはUV 254 nmを用いた．

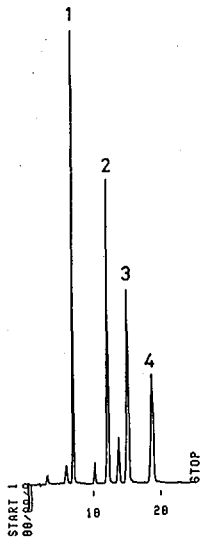


図1．アゾ系だいだい色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）だいだい色402号，2）だいだい色205号，3）黄色5号，4）かっ色201号
測定条件：測定波長：475 nm, 移動相：アゾ系だいだい色色素用移動相（表1），色素濃度：各10 μg/ml

表1．水溶性タール色素とHPLC測定波長および移動相

種　別	色　　素	測定波長 (nm)	移　　動　　相 CH_3CN-リン酸緩衝液	対イオン	pH
アゾ					
黄色系(1)	黄色402号	400	3：2	TPA	3
(2)	黄色4号，406号，407号	400	3：2	THPA	3
だいだい色系	だいだい色205号，402号，かっ色201号，黄色5号	475	3：2	THPA	3
赤色系	赤色2号，102号，201号，227号，502号，赤色503号，504号，506号，FD&C Red No. 40	525	55：45	THA	3
青色系	黒色401号	600	3：2	THA	3
キサンテン					
黄色系	黄色202号	254	[1]	CTA	5
だいだい色系	だいだい色207号	475	3：1	THA	3
赤色系(1)	赤色106号[a]，213号，401号	525,570[a]	7：3[2]	THA	—
(2)	赤色3号，106号[a]，230号，401号	525,570[a]	3：2	CPC	3
(3)	赤色104号，105号[a]	525,570[a]	9：1[2]	CPC	—
トリフェニルメタン					
青色系	緑色3号[b]，205号，402号，青色1号	600[b],640	3：2	TOA	3
その他					
黄色系	黄色203号，403号，緑色204号	400	3：2	THPA	3
青色系(1)	緑色201号，紫色401号，青色2号	600	3：2	THA	3
(2)	緑色401号	600	45：55[2]	TBA	—

1）CH_3OH-CH_3CN-50 mM リン酸緩衝液（35：15：50）　2）CH_3OH-25mMリン酸緩衝液

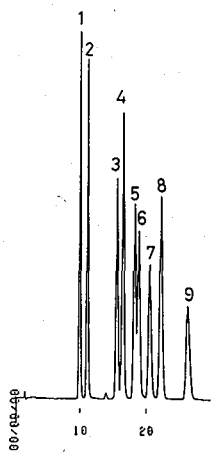


図2．アゾ系赤色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）FD&C Red No. 40，2）赤色227号，3）赤色503号，4）赤色201号，5）赤色504号，6）赤色502号，7）赤色2号，8）赤色506号，9）赤色102号
測定条件：測定波長：525 nm，移動相：アゾ系赤色色素用移動相（表1），色素濃度：各10 μg/ml

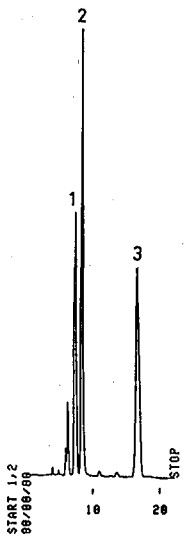


図3．キサンテン系赤色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）赤色401号，2）赤色106号，3）赤色230号，4）赤色3号
測定条件：測定波長：525 nm，移動相：キサンテン系赤色色素(1)用移動相（表1），色素濃度：各10 μg/ml

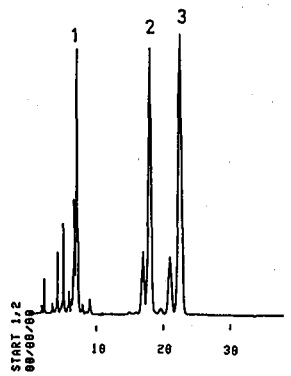


図4．トリフェニルメタン系青色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）緑色402号，2）緑色3号，
2）緑色205号，3）青色1号
測定条件：測定波長：640 nm, 移動相：トリフェニルメタン系青色色素用移動相（表1），
色素濃度：緑色3号および緑色205号，各5 μg/ml，その他各10 μg/ml

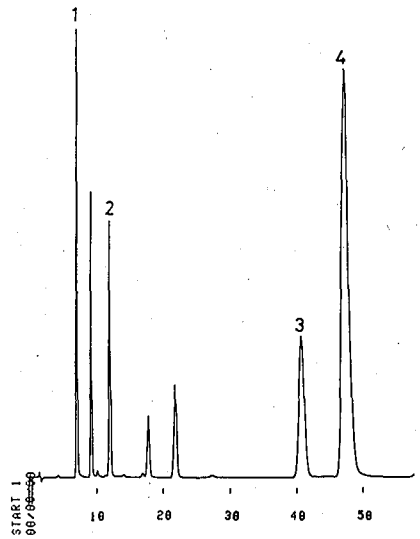


図5．アゾ系，キサンテン系，トリフェニルメタン系以外の黄色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）D&C Yellow No. 10，2）黄色203号，3）黄色403号，4）緑色204号
測定条件：測定波長：400 nm, 移動相：その他黄色色素用移動相（表1），
色素濃度：緑色204号，5 μg/ml，
その他各10 μg/ml

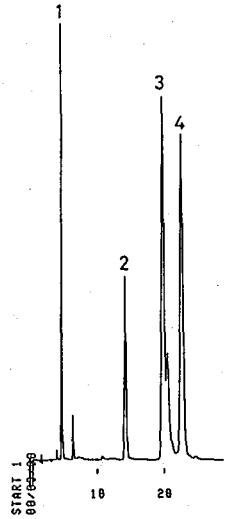


図6．トリフェニルメタン系以外の青色色素のクロマトグラム
ピークNo.：1）青色2号，2）紫色401号，
3）黒色401号，4）緑色201号，
測定条件：測定波長：600 nm, 移動相：その他の青色色素用移動相（表1），
色素濃度：各10 μg/ml

4．測定波長別ピーク高比　表2に各色素の保持時間および測定波長別ピーク高比を示した．

緑色3号と緑色205号はいずれもトリフェニルメタン系の色素で構造が非常に似ているため，図4に示すように本HPLC条件では分離できない．そこで表2を用いることによりこの2色素の定性が可能となる．すなわち，緑色3号の最高検出波長600 nmで得られたピーク高を100としたときの400 nm, 475 nm, 525 nm, 575 nm, 600 nmおよび640 nmのピーク高比は9：0：3：35：100：93となった．一方緑色205号は最高検出波長640 nmを100とするとピーク高比は4：0：0：13：50：100となり，緑色3号と緑色205号の各々の定性を行うことができる．このように表2を用いることにより他の色素の定性も適確なものとすることができる．なお波長別ピーク高比はフォトダイオードアレー検出器を用いることにより一回の測定で得ることができる．

Ⅱ　市販化粧品の分析

1．各色素の定量限界及び添加回収率　標準色素の各色素について表1の条件で測定したときの定量限界を求めた．定量限界は黄色202号を除いて0.1～1 μg/mlであり，黄色202号は10 μg/mlであった．

表2．各色素の保持時間及び測定波長別ピーク高比

色素	保持時間 (min)	波長 (nm) 400	475	525	570	600	640	色素	保持時間 (min)	波長 (nm) 400	475	525	570	600	640
アゾ系								だいだい色207号	11.4	8	45	100	0	0	0
黄色4号	31.6	100	59	0	0	0	0	赤色3号	12.8	14	30	100	11	0	0
黄色5号	14.9	46	100	47	0	0	0	赤色104号	13.6	5	14	100	56	0	0
黄色402号	15.9	100	50	0	0	0	0	赤色105号	17.1	2	8	49	100	0	0
黄色406号	15.8	100	51	0	0	0	0	赤色106号	7.4	3	4	38	100	3	0
黄色407号	13.7	100	10	0	0	0	0	赤色213号	8.4	7	11	100	85	0	0
だいだい色205号	11.9	47	100	47	0	0	0	赤色230号	7.1	9	27	100	0	0	0
だいだい色402号	6.7	31	100	18	0	0	0	赤色401号	16.8	4	15	100	23	0	0
かっ色201号	18.5	95	100	0	0	0	0	トリフェニルメタン系							
赤色2号	20.8	17	55	100	48	0	0	緑色3号	18.2	9	0	3	35	100	93
赤色102号	26.5	17	68	100	18	0	0	緑色205号	18.2	4	0	0	13	50	100
赤色201号	16.7	30	51	100	10	0	0	緑色402号	7.3	11	0	0	33	81	100
赤色227号	11.4	20	40	100	51	0	0	青色1号	22.7	0	0	0	23	61	100
赤色502号	19.1	31	66	100	10	0	0	その他							
赤色503号	15.8	33	72	100	5	0	0	黄色203号	12.1	100	0	0	0	0	0
赤色504号	18.5	33	83	100	5	0	0	黄色403号	41.0	100	18	0	0	0	0
赤色506号	22.5	25	72	100	22	0	0	緑色201号	22.9	59	6	19	8	91	100
RED NO. 40	9.3	24	62	100	14	0	0	緑色204号	47.4	100	0	0	0	0	0
黒色401号	21.5	18	14	31	65	100	69	緑色401号	15.9	100	36	20	20	43	100
キサンテン系								紫色401号	14.5	0	11	71	95	100	40
黄色202号	16.6	−	−	−	−	−	−	青色2号	4.9	0	6	18	59	100	57

表3．化粧品中の色素含有量

試料	色調	濃度 μg/g 赤色	黄色	緑色	青色	紫色
化粧水 A	緑			3.7 (401)[1]		
B	緑		0.8 (4)		1.2 (1)	
C	橙	0.2 (106)	1.9 (5)			
D	青		trace[2] (4)	4.8 (201)		2.9 (401
クリーム A	緑		37.8 (4)		13.6 (1)	
B	橙	0.2 (213)	1.6 (5)			
C	青				2.5 (1)	
シャンプーA	褐色	1.7 (2)			1.1 (2)	
B	緑		1.8 (4)	12.2 (401)		
C	青				32.7 (1)	
リンス A	黄		115.9 (407)			
B	ピンク	1.4 (106)	trace (4)			
ヘアトリートメント A(クリーム)	青				0.4 (1)	
B(液)	緑		21.8 203			
セットローション	紫	10.8 (401)			6.3 (1)	
ヘアクリーム	黄		4.5 (4)			
パック	緑		2.0 (4)			
浴用剤 A(クリーム)	青				23.7 (1)	
B(液)	黄		328 (4)			
C(粉末)	黄		2000 (202)		3.5 (1)	

1)（ ）：省令における色素の番号　2)trace：0.5 μg/g 以下

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青色1号10 μg/gを添加し，添加回収率を求めた．5回の実験の平均回収率は98.5%で，変動係数は3.2%であった．これらの結果により本法は市販化粧品の分析に適用できることが認められた．

2．黄色203号について　黄色203号は2-(2-キノリル)-1，3-インダンジオンを発煙硫酸でスルホン化して製するが，スルホン化の際ジスルホン化体のほかモノスルホン化体およびトリスルホン化体も生成する．我国の省令では黄色203号はジスルホン化体に規定されているが，米国ではモノスルホン化体を主体としたもの(D&C Yellow No. 10)と規定している．

そこで標準色素として使用の可能性を検討するために市販の試薬の分析を行った．アルドリッチ製(1990年カタログ，Qunoline Yellow water soluble)及び東京化成工業製(1990年カタログ，Qunoline Yellow S)の試薬を分析した．得られたクロマトグラムを図7に示す．

両社の試薬ともモノスルホン化体を主体とするものであり黄色203号の標準色素としては適さないことが認められた．

3．市販化粧品の分析結果　本法を用いて市販化粧品20製品を分析しその結果を表3に示す．色素の含有量は化粧水で5 μg/g以下，浴用剤で100～2,000 μg/g，その他は概ね50 μg/g以下であった．

まとめ

可視検出器付きHPLCを用いて38種の水溶性タール色

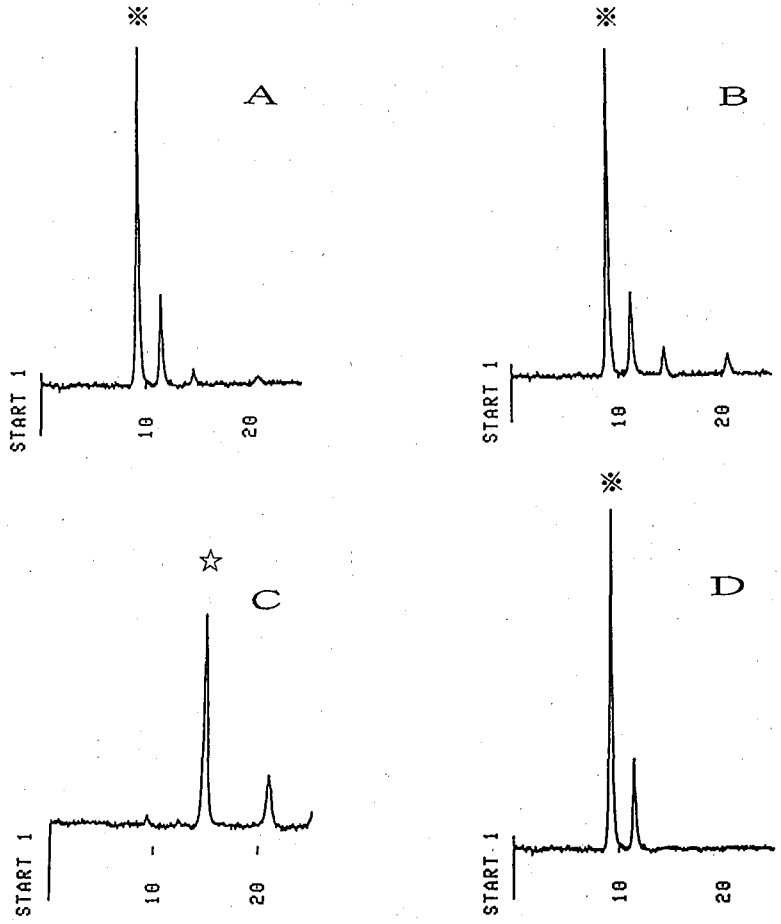


図7．市販試薬（キノリンエロー）のクロマトグラム
A）アルドリッチ社製（※モノスルホン化体）
B）東京化成工業社製（※モノスルホン化体）
C）黄色203号標準色素（☆ジスルホン化体）
D）D C Yellow No. 10標準色素（※モノスルホン化体）
測定条件：測定波長：400 nm, 移動相：その他の黄色色素用移動相（表1），色素濃度：各10 μg/ml

素の分析法を検討した．本法は簡便な前処理で直接注入や簡単な抽出により製品の分析が行え，水溶性タール色素の迅速分析法として有効である．なお輸入化粧品配合の色素には，FD&C Red No. 40(アルラレッドAC)のように我国では食品添加物としてのみ許可されているものものや，D&C Yellow No. 10のように我国の許可色素である黄色203号と同一のCI No. を持ちながら構造の違う色素があるため，輸入化粧品等の分析にあたっては現行薬事法規定の色素であるかどうかの検討を要すると思われる．

（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）伊藤弘一，佐藤憲一，鈴木助治　他：東京衛研年報 **42**, 44-48, 1991.
2）Vanliedekerke, B. M. and Deleenheer, A. P. : *J. of Chromatogr.*, **528**, 155-162 (1990).
3）石川ふさ子，斎藤和夫，中里光男　他：東京衛研年報，**41**, 101-107 (1990).
4）Wegener, J. W., Klamer, J. C., Govers, H., et al : *Chromatographia*, **24**, 865-875 (1987).
5）大戸幹也，松永明信，山本敦　他：食衛誌　**29**,

192-198 (1988).

6) The Office of the Federal Register National Archives and Records Adminitration : *Code of Federal Regulation*, Title 21. Parts 74. sec. 74. 3710. 1990. U. S. Goverment Printing Office, Whashington, D. C.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 66-69, 1992

高速液体クロマトグラフィーによる殺そ剤中のワルファリン及びワルファリンカリウムの分析

佐藤憲一*, 雨宮　敬*, 鈴木助治*, 中村　弘*

High Performance Liquid Chromatographic Determinations of Warfarin and Warfarin Potassium in Rodenticides

KENICHI SATO*, TAKASHI AMEMIYA*, SUKEJI SUZUKI* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords：ワルファリン warfarin, ワルファリンカリウム warfarin potassium, クマテトラリル coumatetralyl, フマリン fumarin, 殺そ剤 rodenticide, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

はじめに

我国で普及している家庭用殺そ剤は，クマリン系製剤が全体の約60%を占めている．クマリン系製剤は血液凝固阻止作用によりネズミを徐々に死亡させる抗凝血作用性殺そ剤の一種で，主に家住性ネズミの駆除に有効である．薬事法により殺そ剤は医薬部外品として扱われ，クマリン系成分であるワルファリン，クマテトラリル，フマリン及びネオクマラン[1,2]はいずれも容器等への表示義務成分に指定されている．

最近，著者らは家庭用殺そ剤の行政検査を行ったなかで，ワルファリン製剤中のワルファリンが処方量の約30%しか検出されないという，含量不足の事例を経験した．また市販殺そ剤にワルファリン以外にワルファリンカリウムを配合した殺そ剤が多く使用されており，検査を効率的に行う上でワルファリン及びワルファリンカリウムを同一処理で分析できる方法の開発が必要であることがわかった．

殺そ剤中のワルファリンの分析法としては，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による方法[3-5]が一般的であるが，ワルファリンの分析法が多くワルファリンカリウムに関して詳しく検討されていない．

そこでHPLCによる殺そ剤中のワルファリン及びワルファリンカリウムの分析法を検討し，またこの方法で若干の市販殺そ剤の分析を行ったので報告する．

実験の部

1．試　薬　ワルファリンはAldrich Chemical製，ワルファリンカリウムはエーザイ製，クマテトラリルは日本特殊農薬製造製，フマリンは有恒薬品工業製を使用した．アセトニトリルは液体クロマトグラフィー用を使用した．その他の試薬はすべて特級を用いた．

2．装　置　島津製作所製高速液体クロマトグラフ　ポンプ：LC-6AD型，システムコントローラ：SCL-6B型，オートインジェクタ：SIL-6B型，検出器：紫外，可視波長可変SPD-6AV型，カラム恒温槽：CTO-6A型，データ処理装置：クロマトパックC-R6A型，分光光度計：島津製作所製UV-265FW型，遠心機：久保田KN-70，pHメーター：東亜HM-16

3．試　料　平成2年7月から8月にかけて都内で購入した市販品の殺そ剤6種類を試料とした．

4．試験溶液の調製　試料を乳鉢で粉砕し，その1.0 gを50 mlの遠沈管にとり，1,4-ジオキサン：1%ピロリン酸ナトリウム溶液(85：15)(用時調製)の混合溶媒を正確に50 ml加え，振とう機を用いて1時間抽出する．5分間遠心分離(3,000 rpm)後，上澄液を試験溶液とする．

5．標準溶液の調製　ワルファリン及びワルファリンカリウムを各々50 mgを精密に量り，前者はエタノールに後者は水に溶解して正確に50 mlとし標準原液とする．さらにこの液を各々の溶媒で希釈して10, 20, 30, 40,

*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

50ppm の標準系列を調製する．（用時調製）

6．HPLC 測定条件 カラム：TSKgel ODS-80TM（5 μm，4.6mm i.d.×150mm，東ソー製），移動相：アセトニトリル/水（1：1）をリン酸で pH3.0に調製した液，流速：1 ml/min，カラム温度：40°C，検出波長：283nm（0.04a.u.f.s.），注入量10 μl

結果と考察

1．抽出溶媒と抽出時間 Billings ら[4]は殺そ剤からのワルファリンの抽出溶媒を検討し，1,4-ジオキサン：1％ピロリン酸ナトリウム溶液(85：15)がよく，また抽出時間は60分以上で一定になると報告している．著者らも抽出溶媒としてアセトン：1％炭酸ナトリウム，アセトン：1N酢酸，アセトン：水，アセトニトリル：水，エタノール，ジオキサンなどを検討したが1,4-ジオキサン：1％ピロリン酸ナトリウム(85：15)がすぐれていた．そこで Billings らの条件を追試した結果，図1に示すように抽出時間が40分以上であれば抽出率がほぼ一定となり60分の96％以上の抽出率を示すことから，同じ抽出溶媒と時間を採用することにした．

2．移動相の検討 今回は逆相系 ODS カラムとして TSKgel ODS-80TM を用いてアセトニトリル－水系の移動相を検討した．ワルファリンとその類縁体であるクマテトラリルの両者のカラム保持能(K')を比較検討して pH とアセトニトリルの濃度を設定した．

2－1 pH の影響 ワルファリンとクマテトラリルは，アルカリ金属塩を形成する活性水素を有することから，まず pH について調べた．即ちアセトニトリル/水（1：1）に対してリン酸を用いて pH 2－6 まで変化させて K' を求めた．その結果を図2に示す．図2に示すように pH により両者の K' は著しく変化し，pH3.0のときに安定な分離を示すことがわかった．従って，移動相の pH を3.0に設定した．

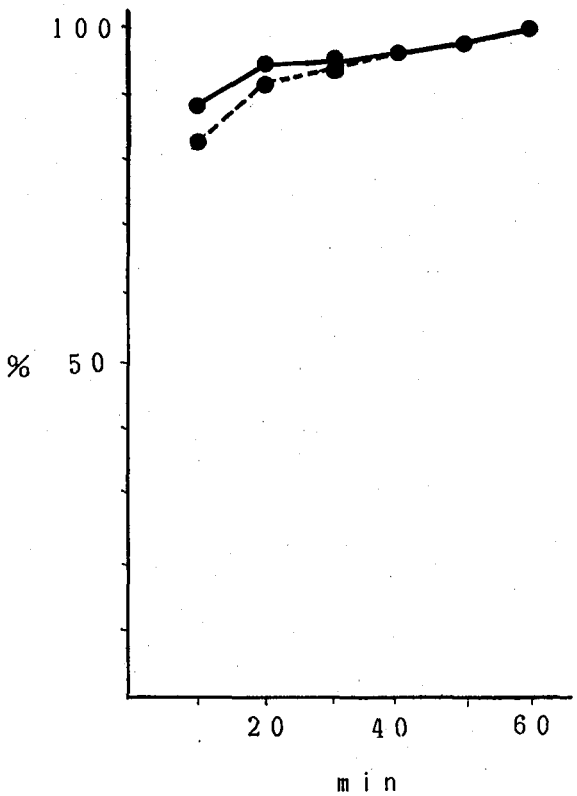


図1．ワルファリン及びワルファリンカリウムの抽出時間による抽出率の変化

— ワルファリン
··· ワルファリンカリウム

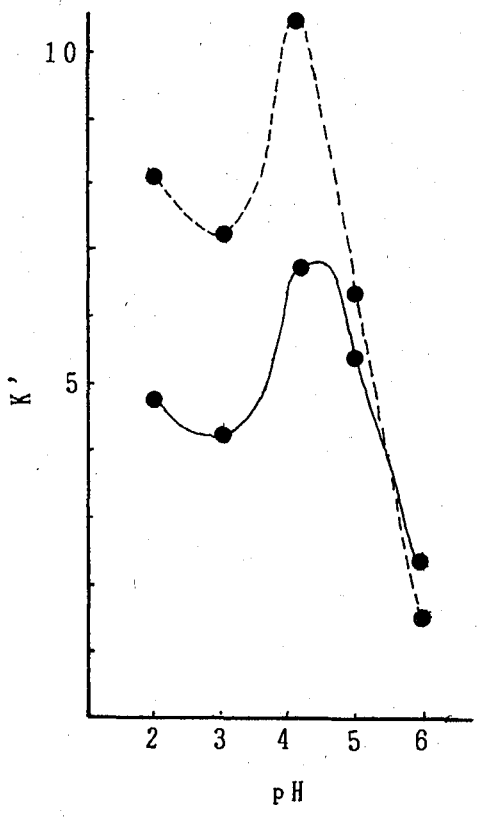


図2．ワルファリンとクマテトラリルの K' に及ぼす pH の影響

— ワルファリン
··· クマテトラリル

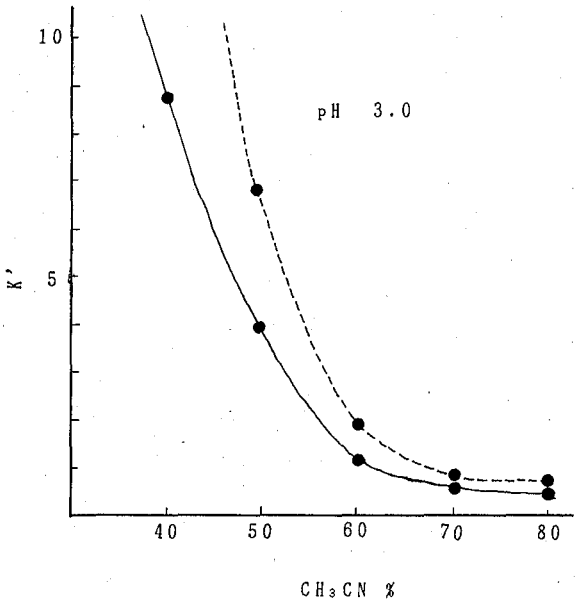


図3．ワルファリンとクマテトラリルのK'に及ぼすアセトニトリル濃度の影響

— ワルファリン
··· クマテトラリル

2-2 アセトニトリル濃度の影響 pHをリン酸で3.0としてアセトニトリル濃度を40-80%と変化させてK'を調べた．その結果を図3に示す．図3に示すようにアセトニトリル濃度が高いほどワルファリンとクマテトラリルのK'は小さくなり，接近し両者の分離がわるい．そこでワルファリンとクマテトラリルのK'の差が大きく，分析時間が15分以内になるような条件を選び，アセトニトリルと水の比を1：1とした．

3．検出波長 図4にワルファリンとワルファリンカリウムの紫外部吸収スペクトルを示す．ワルファリンカリウムの水溶液は，ワルファリンと異なり310nm付近に極大を有するが，酸性の移動相を溶媒とすると短波長側にシフトし，ワルファリンと同一のスペクトルを示す．また，クマテトラリル及びフマリンについても，図5に示すように移動相を溶媒とするとワルファリンと近似のスペクトルを示す．従ってHPLCの検出波長は両者に最大吸収を示す283nmに設定した．

4．検量線 市販殺そ剤中のワルファリン及びワルファリンカリウムの配合量は0.1%のものが多く，試験溶液の調製は試料1.0gに抽出溶媒50 mlを加えることから，その濃度は約20ppmとなる．そこで，ワルファリン及びワルファリンカリウムの標準原液より10,20,30,40,50

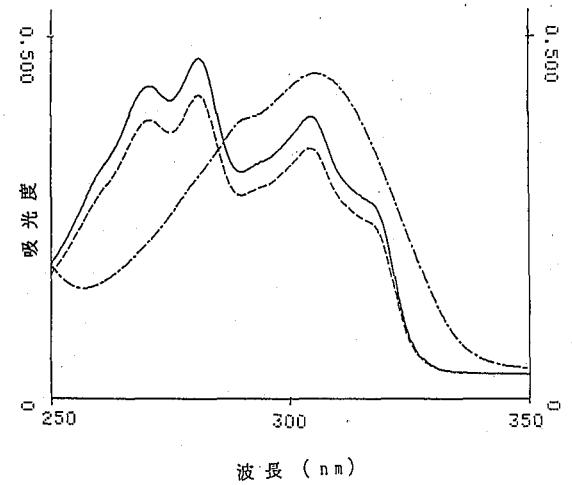


図4．ワルファリン及びワルファリンカリウムの紫外部吸収スペクトル

— ワルファリン（溶媒 エタノール）
··· ワルファリンカリウム（溶媒 移動相）
--- ワルファリンカリウム（溶媒 水）

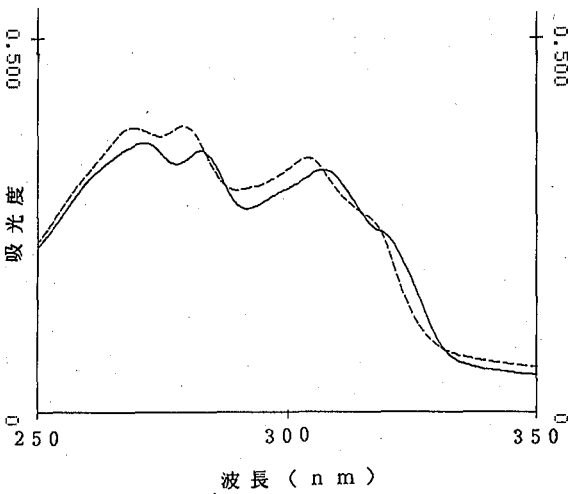


図5．クマテトラリル及びフマリンの紫外部吸収スペクトル

— クマテトラリル（溶媒 移動相）
··· フマリン（溶媒 移動相）

ppmの標準溶液を調製し検量線を作成した．その結果ワルファリン及びワルファリンカリウムについて濃度とピーク面積との間に原点を通る直線を示すことがわかった．なお，クマテトラリル及びフマリンについても検量線を作成したところ，直線性が認められることにより本

法による定量が可能である.

5. 回収率 抽出溶媒として1,4-ジオキサン：1％ピロリン酸ナトリウム溶液(85：15)を用い，抽出時間を1時間に設定し，小麦粉1.0gにワルファリンまたはワルファリンカリウムを1.0，2.0 mg(0.1，0.2%)添加したものについて回収実験を行なった．その結果を表1に示す．表1に示すようにn＝6の平均回収率は94.2-97.9%，変動係数は0.29-1.16%と満足できる結果であった.

6. 市販品の分析結果 表2に市販殺そ剤6種の分析結果を示す．また，図6に標準品と市販品のクロマトグラムを示す．表2に示すようにワルファリン製剤の方が配合量に比べ116，108%と高い値を示す傾向があったが，全体として配合量に対して92-116%とほぼ満足な結果が得られた．また，図6に示すようにワルファリンに対して妨害ピークは認められなかった.

表1．ワルファリン及びワルファリンカリウムの回収率

殺そ剤	添加量[1] (%)	平均回収率[2] (%)	変動係数 (%)
ワルファリン	0.1	94.2	0.3
	0.2	97.4	0.5
ワルファリンカリウム	0.1	97.2	0.9
	0.2	97.9	1.2

1) 小麦粉1.0gに添加する
2) n＝6

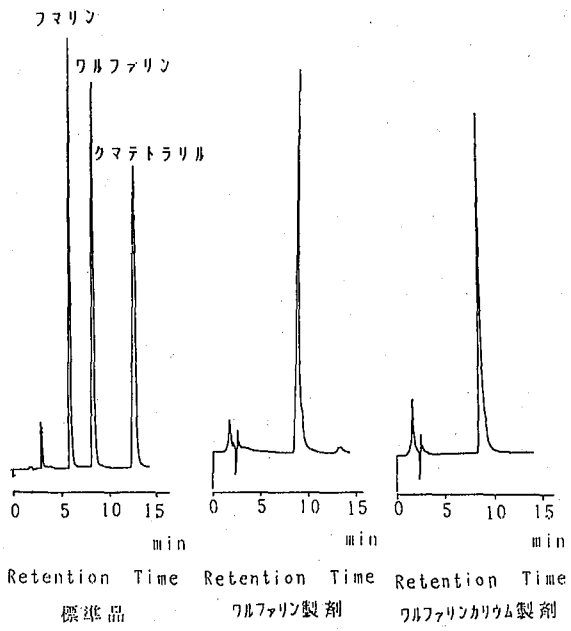


図6．標準品と市販品の液体クロマトグラム

表2．市販殺そ剤の分析結果

No.	試料	配合量 (%)	含量 (%)
1.	ワルファリン製剤	0.05	0.058
2.	〃	0.1	0.108
3.	ワルファリンカリウム製剤	0.1	0.093
4.	〃	0.1	0.097
5.	〃	0.1	0.092
6.	〃	0.1	0.102

まとめ

殺そ剤中のワルファリン及びワルファリンカリウムのHPLCによる分析法の検討を行った．試料を1,4-ジオキサン：1％ピロリン酸ナトリウム溶液(85：15)の混合溶媒で1時間抽出する．この溶液をカラム：TSKgel ODS-80TM，移動相：アセトニトリル：水(1：1)(リン酸でpH3.0に調製した液)，検出波長：283nmの条件で高速液体クロマトグラフィーにより定量した．ワルファリンまたはワルファリンカリウムを含有する市販殺そ剤6種類について，本法で試験したところ，定量値は配合量の92-116%の範囲で得られ，実試料へ適用することができた．また本法によりクマテトラリル及びフマリンも同様に定量することができる.

謝辞 標準品の提供をいただいたエーザイ株式会社，日本特殊農薬製造株式会社及び有恒薬品製造株式会社に深謝いたします.

文献

1)梅津剛吉：家庭用化学薬品の知識，105-112，1982，南山堂，東京.
2)池田安之助：フレグランスジャーナル，**71**，86-87，1985.
3)Selina Akhtar, Leonard C. Bailey：*J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **68**, 1139-1142, 1985.
4)Toby J. Billings, Alan R. Hanks, Billy M. Colvin：*J. of A. O. A. C.*, **59**, 1104-1108, 1976.
5)岡本光美，日比 誠：岐衛研所報，**28**，38-39，1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 70-75, 1992

腸線縫合糸の元素含有量

江波戸 擧 秀*, 中 村 弘*

Elements Content in Catgut

KIYOHIDE EBATO* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords：腸線縫合糸 catgut, クロミック chromic, プレーン plain, クロム chromium, 元素 elements, 金属 metals

緒 言

腸線縫合糸は，牛，羊等の小腸しょう膜をより糸加工した体内で吸収される手術用縫合糸である．薬事法施行令では医療用具の医療用品に分類され，日本工業規格(JIS)としてJIS T 4102が規定されている．JISでは取り扱いの相違により，加熱して良いボイラブルと，加熱してはならないノンボイラブルが規定されている．また，加工の種類によりA形(無加工又はプレーン加工)，B形(弱加工)，C形(中加工又はクロミック加工)，D形(強加工)が規定されているが，市販品のほとんどはノンボイラブルの無加工の体内吸収期間が約1週間のA形，ノンボイラブルの酸化クロム処理された体内吸収期間が約3週間のC形である．

クロムやニッケル等の元素は，金属アレルギーの原因物質として歯科用ニッケルクロム合金，ピアス，ネックレス，時計バンド等で問題となっている．クロムの毒性については皮膚面に傷があると一次刺激性皮膚炎や，比較的低濃度でアレルギー性接触皮膚炎あるいは炎症を起こすと言われている．

腸線縫合糸では元素濃度規格として可溶性クロムのみが，英米の薬局方等で規制されているが，腸線縫合糸は体内吸収されることから手術創の化膿，炎症等の一因としてクロム等に起因する金属アレルギーも考えられ，クロムをはじめとする元素の存在量を知ることは意義がある．酸化クロム処理されたC形は当然のことながら，クロムの存在量が多いと予想されるがその含有量を測定した報告がなく，また，その他の元素についても含有量の報告例はない．そこで，今回，A形及びC形腸線縫合糸のクロム含有量を中心に18の元素を高周波誘導結合アルゴンプラズマ発光分光分析法(ICP-AES)及びフレームレス原子吸光法(FLA-AAS)等を用いて測定し，その結果をまとめたところ，若干の知見が得られたので報告する．

実 験

1．試 料

国産品5社及び輸入品2社のノンボイラブルA形及びC形と表示された腸線縫合糸各15種，合計30種を試料とした．JIS規格で腸線縫合糸では0000号から6号(直径0.18-1.11㎜)まで10種類規定されているため，径の違いによる元素含有量の変動を避けるため同一メーカーの同一号数のA形及びC形を試料とした．試料とした号数は000号から3号(直径0.24-0.76㎜)の中で長さ1.5mのものを4種類を選び使用した．

2．試 薬

硝酸，硫酸，過塩素酸，塩酸：和光純薬工業製の有害金属測定用試薬を用いた．ICP-AES用標準溶液：和光純薬工業製のクロム(Cr)，アルミニウム(Al)，バリウム(Ba)，カルシウム(Ca)，銅(Cu)，鉄(Fe)，マグネシウム(Mg)，マンガン(Mn)，ニッケル(Ni)，リン(P)，アンチモン(Sb)，ストロンチウム(Sr)，チタン(Ti)及び亜鉛(Zn)の原子吸光分析用標準溶液(1000ppm)を0.5N塩酸で希釈混合して用いた．FLA-AAS用標準溶液：和光純薬工業製のカドミウム(Cd)及び鉛(Pb)の原子吸光分析用標準溶液(1000ppm)を0.1%硝酸で希釈混合して用いた．ひ素用標準溶液：和光純薬工業製のひ素(As)の原子吸光分析用標準溶液(1000ppm)を希釈して用いた．水銀用標準溶液：和光純薬工業製の水銀(Hg)の原子吸光分析用標準溶液(1000ppm)を用時蒸留水で希釈して用いた．その他の試薬は和光純薬工業製の特級試

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

薬を用いた．水銀測定用試料添加剤(加熱時発生するガス等の中和剤)は日本インスツルメントの添加剤を用いた．

3．装　置

ICP-AES はサーモジャーレルアッシュ社製ポリスキャン61ESS 型にシータック社製超音波ネブライザーU-5000型を接続して使用した．FLA-AAS はバリアンインスツルメント社製 Spectr AA-400型に同社製フレームレス部 GTA-96型を接続して使用し，ひ素の測定は同社製の水素化物発生装置 VGA-76型を使用した．水銀分析装置は日本インスツルメント社製の理学マーキュリー/SP型を使用した．ホットプレートはサーモライン社製の1900型を使用した．

4．試験法

1）ICP-AES，FLA-AAS 及びひ素水素化物 AAS 用試料の調製と測定：腸線縫合糸1本分(約0.1-0.3g)を85℃で4時間乾燥後，30分間シリカゲルデシケーター中で放冷後テフロン試験管に入れ正確に秤量する．同様に処理した乾燥試料を他に2種用意し，それぞれを下記のように分解処理し試験溶液を調製する．すなわち，試料を入れたテフロン試験管に硫酸一滴を滴下し，硝酸2 ml を加え一夜放置後ホットプレート上で突沸しないように注意しながら160℃以下で分解する．途中乾固しないように適宜硝酸を滴下する．有機物の分解が進行し内容液が褐色に変色した時，過塩素酸1滴滴下し，さらに適宜硝酸を滴下しながら分解濃縮を進める．A形では内容液がほとんど無色透明，C形ではほとんど無色透明または緑色に変色した時，硝酸の滴下を中止し酸分解液をほとんど蒸発乾固する．冷後，ICP-AES 用試験液として0.5N 塩酸を加え5 ml に定容とし，これを表1に示す測定条件により ICP 発光分析法[1]に準じて測定した．FLA-AAS 用試験溶液として0.1%硝酸を加えて定容としたのち，測定は山野辺ら[2]の方法に準じて，また，ひ素測定用試験溶液の場合はアンモニア水で中和後，山野辺ら[2]の方法に準じて測定した．

2）水銀測定用試料の調製と測定：腸線縫合糸を室温で1日放置後，その一部約20mg をとり，水銀測定用試料とした．水分量は上記の乾燥法に準じて処理し，水銀量を補正した．水銀の測定は山野辺ら[3]の方法に準じて測定した．

Table. 1．Operating Conditions of ICP-AES

ICP	
Reflect Power (W)	: 1150
Torch Gas Flow	: High flow
Auxiliary Gas Flow	: 1.0l/min
Observation Height (mm)	: 15
Nebulizer Pressure (psi)	: 30
Flush Pump Rate (RPM)	: 200
Flush Time (sec)	: 30
Analysis Pump Rate (psi)	: 100
Pump Tubing Type	: Tygon
Wavelength (nm)	
Al 308.2　Ba 455.4　Ca 317.9　Cr 267.7	
Cu 324.7　Fe 259.9　Mg 279.0　Mn 257.6	
Ni 231.6　Sb 206.8　Sr 407.7　Ti 334.9	
P 214.9　Zn 213.8	
Ultrasonic Nebulizer	
Sample Heating Temperature (℃)	: 140
Sample Cooling Temperature (℃)	: 5

結果及び考察

A形(プレーン)及びC形(クロミック)腸線縫合糸各15種合計30検体中の18元素の濃度範囲，平均値及び標準偏差を表2に示した．また，各元素ごとの濃度分布を図1及び2に示した．表2に示すように，各元素濃度の平均値はC形では Cr＞Ca＞P＞Mg＞Al＞Fe＞Zn＞Sb＞Sr＞Mn＞Ba＞Cu＞Ti＞Ni＞Hg＞Pb＞Cd＞As の順であり，A形では Ca＞P＞Al＞Mg＞Fe＞Zn＞Cr＞Sr＞Mn＞Cu＞Ba＞Ti＞Ni＞Sb＞Hg＞Pb＞Cd＞As の順であった．

これらの元素のうち，比較的多量に含まれる元素(50ppm 以上)はC形では Cr，Ca，P，Mg，Al であり，A形では Ca，P，Al，Mg であった．また，有害元素とされる Hg，Pb，Cd，As はC形では平均値でそれぞれ0.132，0.029，0.012及び0.0007ppm，A形では0.033，0.018，0.0085及び0.000ppm と低値を示したが，中には Hg の1.5ppm，Pb の0.12ppm(いずれもC形)のように，平均値の10倍を越える含有量のものも認められた．また，金属アレルゲンとなる Cr 及び Ni はC形でそれぞれ1.7-5,430ppm (平均値1,458ppm)，0.02-1.64ppm (平均値0.47ppm)，A形で1.7-32.2ppm (平均値12.1ppm)，0.11-7.72ppm (平均値0.86ppm)で，Cr 加工されたC形で当然のことながら高い値を示した．しかし，表3に示すように，クロム加工されたC形で Cr 含有量が1.7ppm あるいは2.1ppm と無加工のA形と同じように少ないものも認められた．いずれにしても，各元素含有量にばらつきが目立つが，C形及びA形の各元素について正規分布検定を行ったところ，いずれの元素も正規分布は示さなかった．

このように各元素ともばらつきの多い原因としては，

Table. 2. Content of 18 Elements in Catgut

	C Type (Chromic)		A Type (Plain)	
Element	Range	Mean±SD	Range	Mean±SD
Cr (ppm)	1.68−5430	1458 ±1606	1.7 − 32.2	12.1 ± 10.1
Ca (ppm)	40.3 −4958	914 ±1474	53.4 −5483	1064 ±1778
P (ppm)	15.4 − 682	120 ± 178	13.4 − 883	152 ± 251
Mg (ppm)	ND− 450	75.8 ± 150	5.85− 310	54.8 ± 96.5
Al (ppm)	12.2 − 512	75.7 ± 126	15.4 − 692	106 ± 174
Fe (ppm)	0.57− 157	24.7 ± 48.8	6.52− 120	32.4 ± 34.6
Zn (ppm)	0.01− 131	18.0 ± 37.2	0.81− 94.5	18.6 ± 26.4
Sb (ppm)	0.22− 15.3	5.25± 4.48	ND− 2.07	0.42± 0.52
Sr (ppm)	0.25− 27.9	5.11± 8.79	0.15− 27.5	4.52± 9.13
Mn (ppm)	0.08− 32.5	4.67± 8.89	0.18− 7.44	2.79± 2.42
Ba (ppm)	0.26− 7.52	2.11± 2.02	0.21− 6.97	1.94± 2.31
Cu (ppm)	ND− 5.51	1.39± 1.81	0.27− 11.6	2.35± 3.30
Ti (ppm)	ND− 7.23	1.15± 2.05	0.19− 3.9	1.46± 1.2
Ni (ppm)	0.02− 1.64	0.47± 0.55	0.11− 7.72	0.86± 1.91
Hg (ppb)	8.16−1504	132 ± 382	5.52− 131	33.2 ± 35.1
Pb (ppb)	5.57− 118	28.7 ± 38.3	2.26− 62	18.2 ± 16.3
Cd (ppb)	2.13− 38.7	11.7 ± 9.15	2.80− 26.5	8.54± 6.19
As (ppb)	ND− 8.65	0.74±·····	ND−·····	ND ·····

(n=15) C Type: As: n=13(ND), A Type: As: n=15(ND)

Table. 3. Chromium Content in Catgut

Maker	A Type (Plain)	C Type (Chromic)
C	3.31	877
F	32.2	5430
D	8.95	4140
C	12.8	1242
C	1.85	2893
A	12.8	1354
B	17.7	2.14
C	7.84	2330
E	29.6	162
B	24.4	1.68
E	2.38	949
A	3.84	496
C	16.2	1451
F	5.59	440
F	1.7	117

(ppm on dry weight basis, n=15)

上述のように腸線縫合糸が牛，羊の小腸しょう膜をより糸加工した製品であるため，原料となる動物種の違いあるいは動物の成育環境の違い等が考えられる．

つぎに，クロム処理の影響を観察するため，A形及びC形腸線縫合糸の元素含有量の差の検定をノンパラメトリック法の Mann-Whitney U 検定(n=15 U値64 $P<0.05$)により行った．その結果，Sb(U値12.5)，Cr (U値28)，Fe(U値48)，Zu(U値61)の4元素でA形及びC形腸線縫合糸含有量に差があった．酸化クロム処理によりSbの差がCrよりも大きく，Fe，Znの順に差が小さくなった．また，その他の元素に含有量の差はみられなかった．

ま と め

A形(無加工)及びC形(クロミック加工)の腸線縫合糸15種について18元素(Cr, Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Sb, Sr, Ti, Zn, As, Pb, Cd, Hg)の含有量調査を行なった．その結果

1)腸線縫合糸に比較的多量に含まれる元素はC形ではCr，Ca，P，Mg，Alであり，A形ではCa，P，Al，Mgであった．

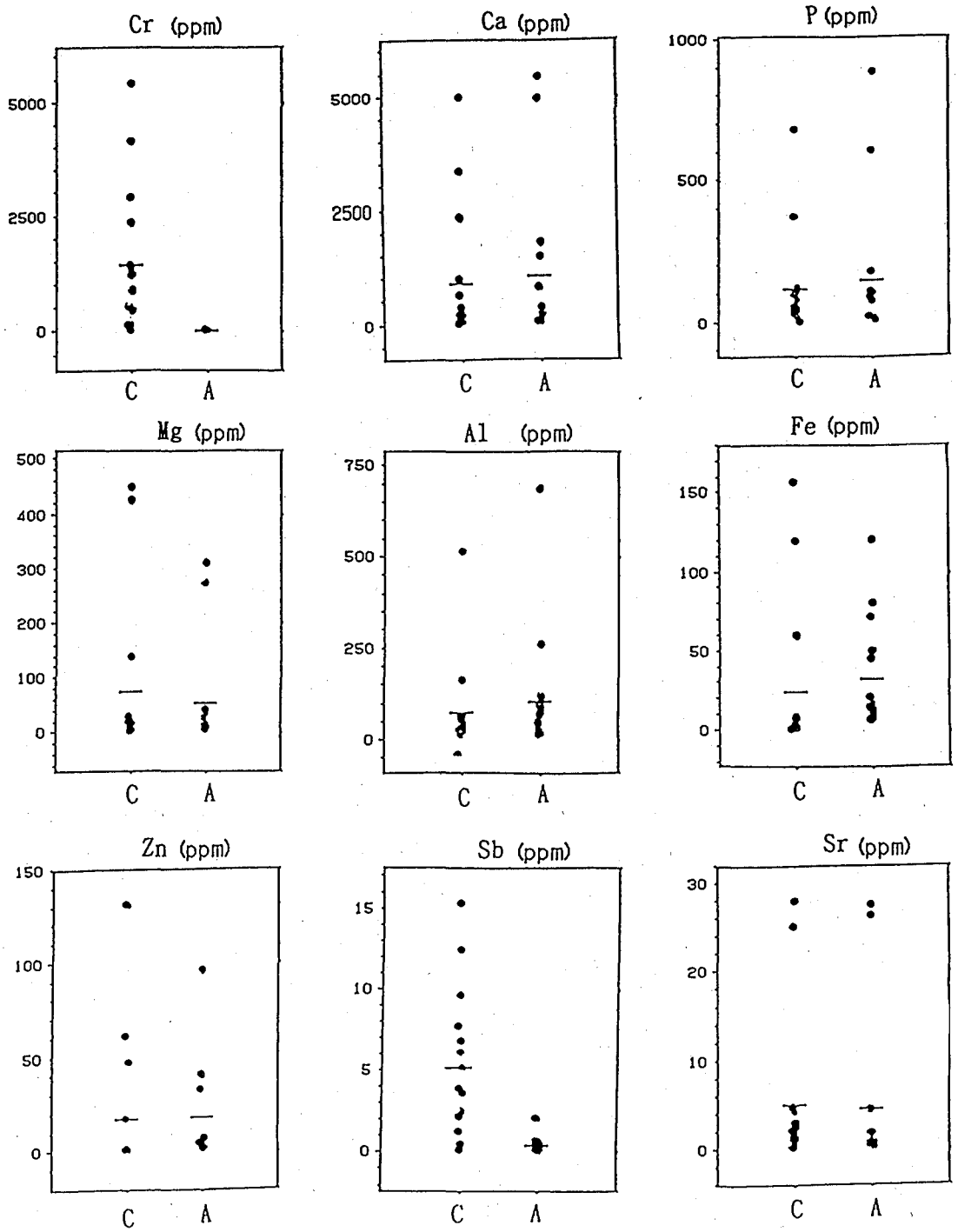


Fig. 1. Content of Elements in Catgut
—— : Arithmetic mean
A : A type (Plain) catgut
C : C type (Chromic) catgut

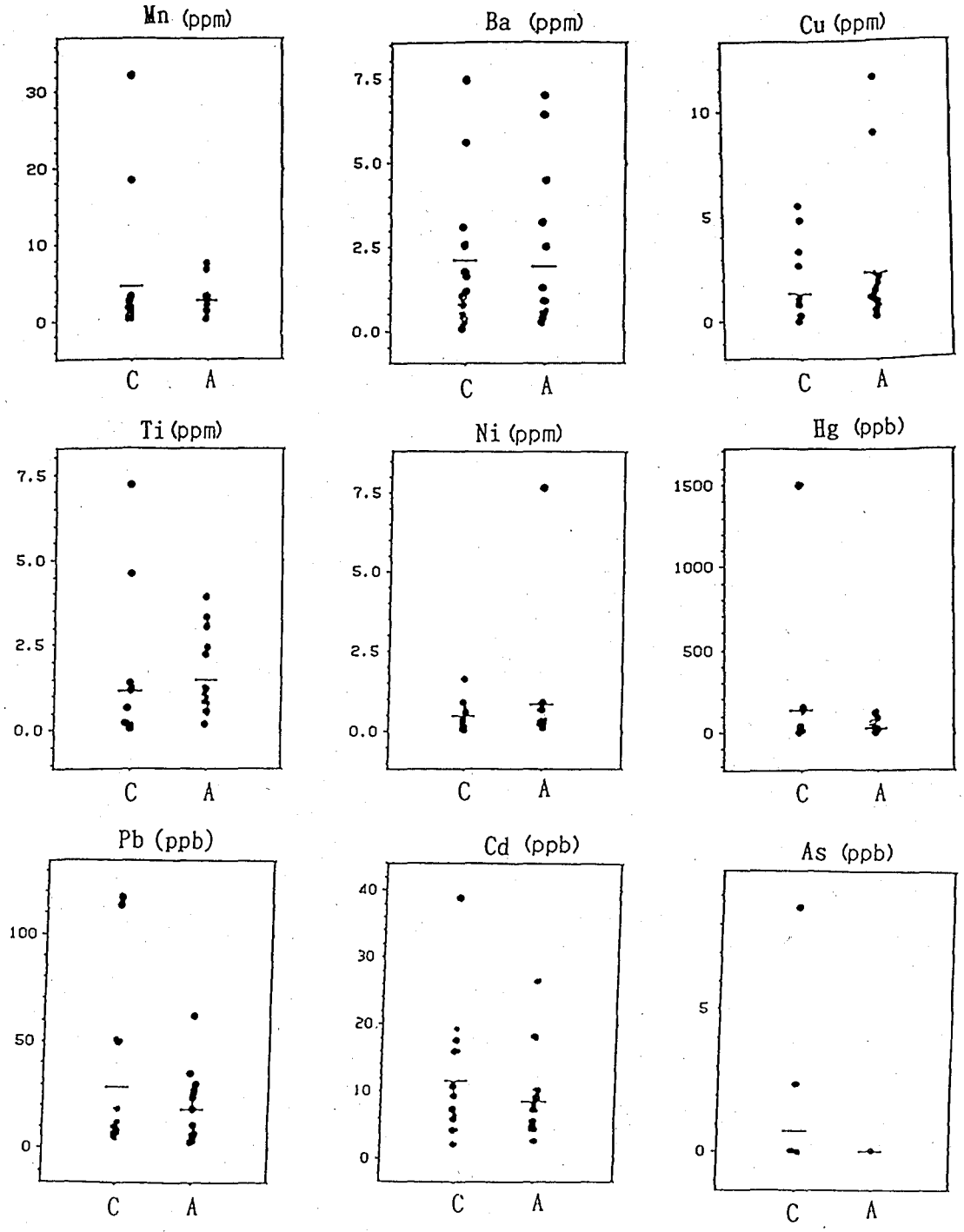


Fig. 2. Content of Elements in Catgut
—— : Arithmetic mean
A : A type (Plain) catgut
C : C type (Chromic) catgut

2)クロム処理加工したC形腸線縫合糸でのCr含有量は，低値を示した2製品を除き，117-5,430ppmであり，A形と比べて高い値を示した．

3)各元素とも含有量のばらつきが多く，正規分布を示さなかった．

4)C形及びA形腸線縫合糸の元素含有量の差を検定したところ，Sb，Cr，Fe及びZnの含有量の差が認められた．

(本研究の概要は日本微量元素学会第3回大会1992年6月で発表した．)

文　献

1）日本薬学会編：衛生試験法・注解，17-32，1990，金原出版，東京．

2）山野辺秀夫，竹内正博，水石和子他：東京衛研年報，**42**，90-94，1991．

3）山野辺秀夫，竹内正博，水石和子他：東京衛研年報，**36**，151-154，1985．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 76-78, 1992

保存期間と温度が血液塗抹標本の染色におよぼす影響

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

Effect of Preservation Time and Temperature on Staining of the Blood Smear

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

Keywords：血液塗抹標本 blood smear, 保存温度 preservation temperature, 保存期間 preservation time, 染色 stain, 精度管理調査 external quality assessment

緒　言

血液像の観察は，血球の形態学的および量的異常の判別において多くの情報を提供するものであり，疾病の診断および治療方針決定上の有効な手段として活用されている．東京都衛生検査所精度管理調査では，昭和60年度より都内の衛生検査所における白血球の血液像検査を調査項目に加え，各施設の検査成績向上の確保を図っている[1]．

血液塗抹標本の作製(塗抹および染色作業)は，採血後速やかに実施されることが望ましいとされているが[2]，精度管理調査においては準備の都合上，塗抹標本を調査参加施設に対して採血後直ちに配布することは不可能である．そのため，未染色標本の保存期間および保存温度が染色と血球形態にどのような影響をおよぼすかについて調査を行い，以下の知見を得たので報告する．また，染色時に使用する緩衝液の鮮度が染色性におよぼす影響をも考慮するため，若干の検討も行ったので，あわせて報告する．

実験の部

1．試　料

塗抹標本作製に用いた血液は，30代後半の健常な女性1名より採取した．

2．標本作製器具

①注射器および採血用試験管：いずれもテルモ社製のもので，採血用試験管は抗凝固剤として，EDTA-2K が入ったものを使用した．

②スライドグラスおよびカバーグラスは武藤化学薬品株式会社製のものを使用した．

③スチロール製ふた付き密封容器

3．試　薬

①染色液：武藤化学薬品株式会社の製品を使用した．各染色液の製造番号は次のとおりである．Wright-Giemsa 染色液；9000601, Wright 染色液；9001001, May-Grünwald；9000901.

②緩衝液：和光純薬株式会社製の粉末状りん酸緩衝液(1/15mol, pH6.4)を用いた．製造番号は CTR 7253であり，蒸留水で1lに溶解して使用した．また，緩衝液の鮮度の染色性におよぼす影響をみるために作製後5年6月経過し，その間冷蔵庫内に保管しておいた緩衝液を染色時に使用して一部の染色を行った．

③無水メチルアルコール：同仁化学研究所の製品を使用した．

④シリカゲル：和光純薬製の中粒を使用した．

*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

4．実験手順

①注射器により肘正中静脈より採血した血液を，EDTA-2K 入り採血用試験管に入れて転倒混和し，凝固を阻止した上でビーカーに移し，以下の実験に供した．

②採血後の血液はただちにカバーグラスを用いてスライドグラス上に塗抹した．

③塗抹したスライドグラスを風乾し，メチルアルコール中に1分間浸して血液を固定し，取り出したスライドグラスを風乾した．

④血液を固定した標本は，塗抹の状態が良好なものを選び，保存温度及び保存期間を調べるために次のような群に分けて保存した．まず，平日昼間のみ空調装置が作動する室内，冷蔵庫内(約3℃)，ふらん器内(30℃に設定)に保存する3群に大別し，さらにそれぞれについて，血液塗抹固定の直後，1，2，3，4，6および29週経過後に染色する群に分けた．血液固定後の標本はこの群に従って，シリカゲルとともにスチロール製ふた付き密封容器に入れた．標本は以下の3方法について3-4枚ずつ染色した．各期間の経過後，冷蔵庫およびふらん器内で保管した標本については，室温にもどるまでふたをしたまましばらく放置し，その後に染色した．作業室内環境については，温度および湿度を自記記録計で測定した．実験は11月29日より開始したが，保存期間中の室温は0.5℃から28.2℃で，湿度は23%～88.2%であった．また，各染色時の室温はいずれも20.5～22℃であった．

⑤ 染色方法：平成元年度の東京都衛生検査所精度管理調査において，39の検査所が採用していた染色方法はWright-Giemsa 染色が25施設(64.1%)，Wright 染色が5施設(12.8%)，May-Grünwald 染色が9施設(23.1%)であった[3]．この結果をふまえて，今回は Wright 染色，Wright-Giemsa 染色，May-Grünwald 染色を実施した．なお，染色手技は染色液の手順書によった．

また，緩衝液の鮮度が染色性に及ぼす影響を検討するために，29週経過後の標本の一部について，作製後約5年6月が経過した古い緩衝液を用いた染色をも実施した．

⑥染色後の標本は昭和大学医学部付属病院血液検査室の専門技師が各標本の染色性，細胞の状態を観察した．

結果および考察

2．各染色方法での観察結果は以下のとおりである．

(1) Wright-Giemsa 染色

①白血球：室温，30℃保存の標本は，1～2週間以降より白血球全体の染色性は低下し，白血球がきれいに染まらなかった．特に，細胞質内の顆粒の不鮮明さが目立ち，顆粒の微細構造が観察できなかった．冷蔵庫内保存の標本は上記の変化が2週間後より認められた．

②血小板：室温，30℃保存の標本は，血小板の顆粒の染色性の低下が1週間で認められ，血小板全体がきれいに染色されていなかった．冷蔵庫内保存の標本でも，同様の変化が2週間以降に認められた．

③赤血球：室温，30℃保存の標本は，29週で赤血球の染色性が多染性を示し，全体的に青紫色に染色されていた．しかし，29週以前の標本では上記のような変化が認められなかった．

(2) Wright 染色

①白血球：室温，30℃保存の標本は，1週間後より白血球全体の染色性が低下し，白血球がきれいに染まらなかった．この染色性の変化は，核ではクロマチンが崩壊しており，細胞質内の顆粒では顆粒が不鮮明になり，お互いに融合したようにみられた．また細胞質の染色性の変化はリンパ球で特に認められ，青色から赤紫色に変わり，赤みが強くなる傾向がみられた．冷蔵庫内保存の標本は，上記の変化が2週間後より認められた．

②血小板および赤血球：Wright-Giemsa 染色と同様な所見であった．

(3) May-Grünwald 染色

標本作成直後より染色が不良なため，評価は不可能であった．

3．その他

Wright-Giemsa 染色は，Wright 染色に比べて，核，顆粒ともにきれいに染まっていた．染色は血液の固定後，直ちに行うことが望ましいとはいわれているが，今回の成績でも同じことが明らかとなった．精度管理調査に使用する試料は，調査対象の成績を左右しかねないものであり，その品質が特に保証されていなければならない．今回の結果から，血液の塗抹固定後1週間ですでに染色性に変化が生じることを考慮すると，血液塗抹標本を調査配布試料とする場合には，なるべく配布時に近い時点で作製することが求められる．また，冷蔵庫保存の場合には，室温および30℃の環境下での保存に比較して染色性への影響が遅いことから，やむを得ない場合には冷蔵庫内に保存することが良いように考えられる．特に，盛夏では深夜でも室温の上昇することを想定して，30℃に設定したふらん器内に保管した標本群を設けたのであるが，今回の結果によると，室温保管でも30℃保管でも染色性に大きな違いはみられなかった．血算検査を実施している検査所の中で血液像検査を実施する検査所の割合は90.7%(39/43：ただし，39施設のうち6施設は外部へ委託，そのうち1施設は血算検査のみを自施設で実

施)であり，血算検査を受注する検査所では血液像検査をも受注している割合が高い．一方，血液像検査を精度管理調査項目に加えた当初は，血球の分類のみを調査対象としていたため，染色ずみの標本を配布していた．しかし，染色性をも調査の対象とするためには，今回の結果を考慮して，標本の取り扱いには十分に注意しなければならないと考える．

また，古い緩衝液での染色性は新鮮な緩衝液を使用したものと変わりがなかったので，緩衝液は古くても pH に変化がなければ染色性には影響がなく，使用可能であった．

今回 May-Grünwald 染色法については十分な結果が得られなかった．その理由については不明であるが，衛生検査所での採用割合が高いので，今後，この染色法について再度検討してみたいと考える．また，室内および30℃で保存した標本では，Wright 染色および Wright-Giemsa 染色のいずれも1週間の保存で染色性の低下が認められるため，固定後1週間以内での検討をしてみたいと考える．さらに，自動染色機器が普及している現状から，機器を使用した場合の成績を今回のものと比較検討する必要があると考える．

ま と め

血液塗抹標本作製後の保存期間と保存温度が標本の染色性におよぼす影響を検討し，以下の知見を得た．

1．血液塗抹標本は，室温および30℃で保存した場合には，血液の塗抹，固定後約1週間以内に染色性の劣化をきたす．また，冷蔵庫内に保存した場合には約2週間後から染色性に変化を生じた．以上のことから，血液塗抹標本は作製後なるべく速やかに染色を実施することが望ましい．

2．もし，やむを得ない事情で染色作業までに保存を要する場合には，冷蔵庫を用いるなど，なるべく低温で保存することが望ましい．

3．染色性に対する緩衝液の影響としては，作製した緩衝液の鮮度(古さ)が染色性の劣化を生じるのではなく，pH 等の他の要因によるものであると考えられる．

文 献

1）東京都：昭和60～平成3年度(第4～第10回)東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1985～1991.
2）日野志郎：臨床検査講座15血液学，第4版，178，1984，医歯薬出版，東京.
3）東京都：平成元年度第8回東京都衛生検査所精度管理調査報告書，1989.

報　　文 Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS Ⅲ

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 79-81, 1992

東京湾産スズキ中の水銀含有量

山野辺 秀 夫*, 竹 内 正 博*, 水 石 和 子*, 中 村 弘*

Content of Mercury in Sea-bass of Tokyo Bay

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

Keywords：スズキ sea - bass, 総水銀 total mercury, メチル水銀 methyl mercury, 東京湾 Tokyo bay

緒　　言

一般に，魚類の水銀汚染は化学工場などの排水中の水銀による河川や海洋の汚染に起因するものと考えられている．熊本県水俣市で起こった中枢神経系疾患，いわゆる水俣病や新潟県阿賀野川流域で起こった第二水俣病はメチル水銀で汚染された魚類の長期摂取により発生したもので，大きな公害問題となった．

著者らは，国が1973年に定めた「魚介類の水銀の暫定規制値について」[1]（環乳第99号厚生省環境衛生局長通達）に基づき，1973年以来，東京都内に流通する魚介類について水銀汚染調査を実施しその概要について報告してきた[2-12]．今回は沿岸回遊魚で比較的高い水銀含有量を示す魚種であるスズキを東京湾の環境汚染指標として選び，1982年－1991年に東京湾で捕獲されたスズキ281検体について，総水銀及びメチル水銀含有量の調査を行ったので報告する．

実　　験

1．試料　1982年から1991年の間，東京湾内において捕獲されたスズキを各年で10－60検体（但し，1988年は0検体），合計281検体を試料とした．試料は三枚におろし，可食部をホモジナイザーで均一にし，－20℃で保存した．

2．試薬　水銀標準液：和光純薬工業㈱製の1000 ppm標準液を適宜希釈して用いた．メチル水銀標準液：塩化メチル水銀（和光純薬工業㈱製）100 mg を正確に秤りベンゼン100 ml に溶解し1000 ppm のメチル水銀標準溶液を作成し冷暗所に保存した．測定にはこれを適宜希釈して用いた．ベンゼンは残留農薬分析用を，硫酸，硝酸は有害金属測定用，その他の試薬はすべてJIS特級品を用いた．

3．装置　水銀分析装置：日本インスツルメンツ㈱製リガクマーキュリーSP に同社製還元気化装置を付けて使用した．ガスクロマトグラフ装置：島津製作所製 GC - 9 AM 型を使用した．

4．試験法　総水銀：試料5.0 g を採り，硫酸－硝酸還流法[13]によって湿式分解した．分解後水で正確に50 ml とし，その一定量を採取し，塩化第一スズ溶液を用いて還元気化一金アマルガム法で測定した．メチル水銀：日本薬学会協定の衛生試験法（飲食物試験法）による直接抽出法[14]に従って試験溶液を調製し，電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフで測定した．

測定条件：カラム，10％Thermon - HG（Chromosorb W AW-DMCS, 80-100 mesh, 1 m×3 mm φ），カラム温度，170℃，注入口及び検出器温度，280℃，キャリアガス，窒素．

結果及び考察

1．総水銀及びメチル水銀含有量

表1に各年の測定結果を示した．総水銀の最高値は1983年の0.49 ppm で，他の年は0.10－0.36 ppm の範囲であった．平均値は1986年の0.21 ppm が最も高かった．メチル水銀の最高値は1983年の0.40 ppm で，他の年は0.03－0.24 ppm の範囲であった．平均値は1983年が0.12 ppm であったが，他の年は0.02－0.11 ppm の範囲であった．1991年には検出限界以下のものが1検体あった．

厚生省は1973年に魚介類中の水銀暫定規制値を，総水銀として0.4 ppm，メチル水銀（水銀として）0.3 ppm を定めている．本調査では，規制値を越えているものは1983年に2検体認められた．これらの値は総水銀が0.49

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

表1．各年におけるスズキ中の水銀含有量および平均値

年	検体数	総水銀		メチル水銀（水銀として）	
		範囲	平均±SD	範囲	平均±SD
'82	36	0.05−0.26	0.14±0.05	0.03−0.23	0.11±0.05
'83	60	0.05−0.49	0.16±0.09	0.05−0.40	0.12±0.08
'84	30	0.04−0.27	0.14±0.06	0.03−0.24	0.11±0.06
'85	30	0.08−0.36	0.17±0.07	0.02−0.21	0.11±0.05
'86	10	0.13−0.33	0.21±0.07	0.05−0.16	0.08±0.03
'87	32	0.07−0.31	0.18±0.06	0.02−0.13	0.07±0.03
'89	21	0.02−0.17	0.09±0.04	0.01−0.07	0.04±0.02
'90	34	0.04−0.20	0.08±0.03	0.01−0.06	0.03±0.01
'91	28	0.05−0.10	0.07±0.01	0.00−0.03	0.02±0.01

SD：標準偏差　　単　位：ppm

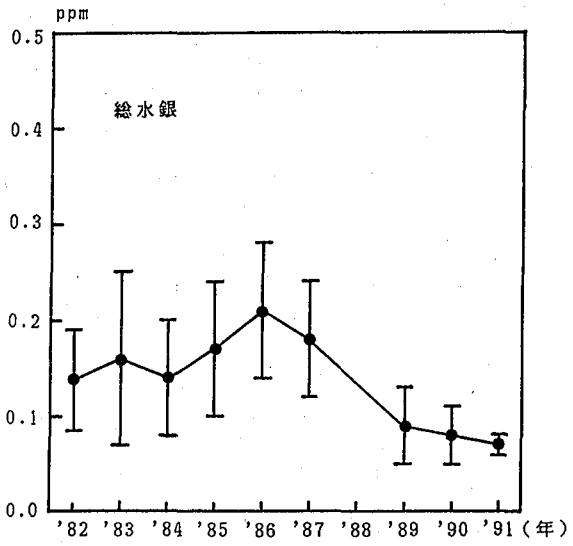


図1．スズキ中の総水銀平均含有量の経年変化

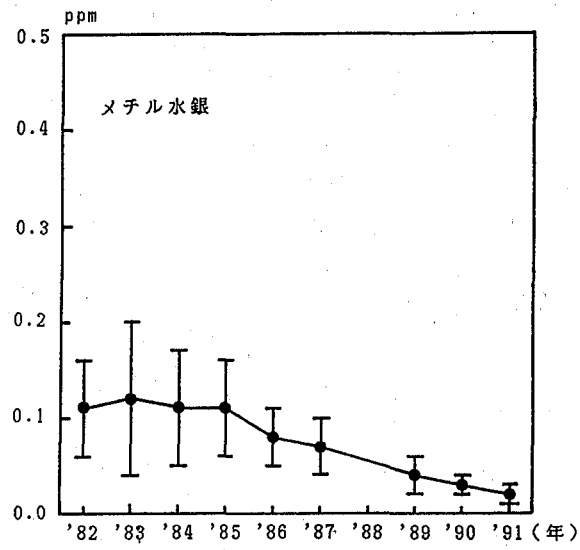


図2．スズキ中のメチル水銀平均含有量の経年変化

ppm，メチル水銀は0.40 ppm，他の1検体は総水銀が0.43 ppm，メチル水銀は0.40 ppmであった．

図1に総水銀，図2にメチル水銀の各年の平均値及び標準偏差をプロットして示した．総水銀は1982年から1987年までは若干の上下はあるもののほぼ横ばいであったが，1989年からは明らかに低減化がみられた．メチル水銀についても総水銀と同様に1985年までは横ばい，その後は低減化の傾向が認められた．

つぎに，各年における0.10 ppm以上の検出率をみると，総水銀は1982年から1987年は検出率が76%−100%の範囲にあるが，1989年以降が33.3%，1990年が20.6%，1991年が3.6%と急速に下がっている．メチル水銀についても，1982年から1987年の間は21.9%−60.0%の検出率であったが，その後は0.10 ppm以上を検出するものは無かった．

以上の結果から，東京湾産スズキの水銀含有量は各年における最高値，平均値とも低減化していることが明らかであり，また0.10 ppm以上の検出検体数が減少していることから，湾内の水銀汚染が漸減してしることが推測できた．

2．総水銀に対するメチル水銀の割合

表2に総水銀に対するメチル水銀の割合(%)を示した．図3にこれらをプロットして示し経年推移をみた．メチル水銀/総水銀の割合は1982年から1985年まで70−80%であったが，1986年以降は減少しており，1991年には最も高い1984年(平均79.0%)に比べて半分以下(平均

32.8%)になった．日本では魚類中のメチル水銀は，魚種を問わず総水銀に対して30－90%と見積もられている[15]が，最近は下限に近づいていることが明らかとなった．

結　　語

1982年から1991年にわたり東京湾で捕獲したスズキ281検体について，総水銀及びメチル水銀含有量を測定し，その推移をみた．総水銀の各年の平均含有量は1987年までは横ばい傾向を示したが，その後減少し，1991年には1982年の約1/2となった．メチル水銀についても，1985年までは横ばい傾向を示し，以後減少し，1991年には1982年の1/5となった．1986年から1988年を境に水銀含有量が減少しており，これからも減少あるいは横ばい傾向が予測できるが，これらのことにより東京湾における水銀汚染はかなり低減化していることが推測された．

表2．各年におけるスズキ中の総水銀に対するメチル水銀含有比

年	検体数	範囲	平均±SD
'82	36	42.9－100.0	77.8±18.0
'83	60	27.3－100.0	74.5±21.3
'84	30	53.8－100.0	79.0±14.2
'85	30	25.0－100.0	64.3±16.6
'86	10	30.0－ 48.5	40.2± 7.4
'87	32	28.6－ 46.7	41.2± 4.0
'89	21	33.3－ 83.3	48.2±11.2
'90	34	16.7－ 62.5	36.8± 9.7
'91	28	0.0－ 40.0	32.8± 7.6

SD：標準偏差　　単位：%

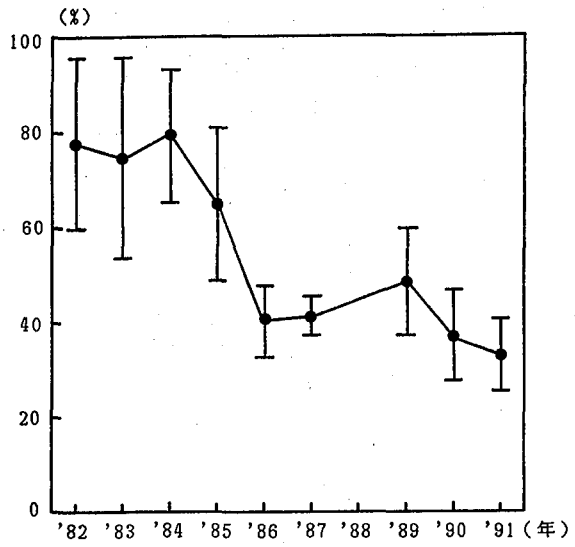


図3．総水銀に対するメチル水銀比の経年変化

謝辞：本調査を行うにあたり御協力いただ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の方々に深謝致します．

文　　献

1）厚生省環境衛生局長通達：魚介類中の水銀の暫定規制値について，昭和48年7月23日，環乳第99号．
2）伊藤弘一，竹内正博，江波戸擧秀他：東京衛研年報，**25**，141-152，1974.
3）雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一他：東京衛研年報，**26**-1，129-133，1975.
4）雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一他：東京衛研年報，**27**-1，122-125，1976.
5）雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一他：東京衛研年報，**28**-1，104-106，1977.
6）雨宮　敬，竹内正博，伊藤弘一他：東京衛研年報，**29**-1，167-169，1978.
7）雨宮　敬，竹内正博，原田裕文：東京衛研年報，**30**-1，137-139，1979.
8）雨宮　敬，竹内正博，原田裕文：東京衛研年報，**31**-1，153-155，1980.
9）山野辺秀夫，雨宮　敬，竹内正博他：東京衛研年報，**32**-1，148-150，1981.
10）山野辺秀夫，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，**33**，179-181，1982.
11）山野辺秀夫，竹内正博，吉原武俊：東京衛研年報，**34**，139-141，1983.
12）山野辺秀夫，竹内正博，風間成孔：東京衛研年報，**35**，184-186，1984.
13）日本薬学会編：衛生試験法・注解，558，1990，金原出版，東京．
14）日本薬学会編：衛生試験法・注解，626-628，1990，金原出版，東京．
15）喜多村正次，近藤雅臣，滝澤行雄，藤井正美，藤水素士：水銀，179-181，1976，講談社，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 82-86, 1992

食肉における *Listeria* 属菌の汚染実態

小久保 彌太郎*, 金 子 誠 二**, 飯 田 孝**, 丸 山 務***

Incidence of *Listeria* Species in Raw Meat and Poultry

YATARO KOKUBO*, SEIJI KANEKO**, TAKASHI IIDA**
and TSUTOMU MARUYAMA***

In order to clarify the contamination of *Listeria* species in commercial beef, pork and chicken, a total of 762 samples were collected from meat processing plants and retail shops in Tokyo Metropolis and examined. Samples each in the amount of 10 g were subjected to enrichment in 90 ml of EB medium (Difco) at 30℃ for 7 days. On the 2nd and 7th days, they were subjected to isolation on Oxford agar (Oxoid) plate. The colonies which grew and appeared suspicious were examined for their biological properties, such as carbohydrate fermentation and hemolysis, to identify *L. monocytogenes*, and then these cultures were subjected serological typing. *Listeria* species were detected in 524 samples (68.8%), 276 (36.2%) of which were identified as *L. monocytogenes*. The detection rate tended to be higher for the meat samples with a larger number of standard plate count. The number of *Listeria* in the positive samples was below 100/g in most cases. The serotype of *L. monocytogenes* which was most frequently found was 1/2c at about 40%, followed by 1/2a (26%), 1/2b (20%) and 4b (14%). When classified by the kind of meat, 1/2a rated highest in chicken samples, whereas 1/2c was most frequent in pork and beef samples.

Keywords: *Listeria* 属菌 *Listeria* species, リステリア モノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*, 食肉 meat, 汚染実態 incidence

緒 言

Listeria 属中の *Listeria monocytogenes* は，かなり以前から人畜共通感染症の起因菌の一つとして位置付けられてきたが[1]，1980年代に入って欧米諸国で集団事例を含む食品媒介リステリア症が相次いで報告されたことから，にわかに注目されるようになった[2]．1988年に WHO から公表された「食品媒介リステリア症」という報告書の中でも *L. monocytogenes* は広範囲の食品を介してヒトに伝播される可能性があり，その危険性の特に高い食品は乳や食肉を主原料とした加工品であると指摘されている[3]．これまでにも，食肉並びにその加工品がリステリア症の媒介食品として疑われる事例が報告されており，ミートパテや家禽肉製品が感染源として取り上げられている[4]．欧米諸国における調査では，*L. monocytogenes* は食肉中に高頻度に分布しており，特異性状として低温発育能を有し，高濃度の食塩や亜硝酸塩に抵抗するなど，現在では食肉衛生の分野でも重要な菌種であると位置付けられている[5]．一方，わが国で流通あるいは市販されている食肉について，本菌の汚染実態はあまり知られていないところから，われわれは東京都内の食肉処理業並びに市販店舗から採取した各種食肉を対象に *Listeria* 属菌の汚染状況を調査したので，その成績を報告する．

材料および方法

1．調査材料

1989年1月から1990年10月に東京都内の食肉処理業から採取した牛肉(モモ，ロース)82例，豚肉(モモ，ロース，レバー)117例，鶏肉(モモ，ムネ，ササミ，レバー)192例の計391例，及び同期間に市販店舗から採取した牛

*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 Reseach Laboratory of Public Health 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
***国立公衆衛生院衛生獣医学部

肉(モモ，ロース，ステーキ，挽肉)143例，豚肉(モモ，ロース，挽肉)92例，鶏肉(モモ，ムネ，ササミ，挽肉)136例の計371例である．

2．*Listeria* 属菌の検査手順

食肉を対象とした *Listeria* 属菌の検査法として，われわれが提案した方法に従った(Fig. 1)[6]．すなわち，検体10 g を90 ml の EB 培地(Difco)中で30℃で増菌培養後，2及び7日目の2回にわたり Oxford 寒天(Oxoid)で分離培養を行った．分離培地上に発育したエスクリン分解陽性の集落を釣菌して，0.6%酵母エキス加 Trypticase soy 寒天(BBL)平板に再分離し，30℃で24時間培養後に斜光法による集落の観察，グラム染色性，カタラーゼ反応，運動性，VP 反応により *Listeria* 属菌を同定した．次いで，5%緬羊血液加重層寒天平板を使用した CAMP テストで黄色ブドウ球菌の溶血素により増強される弱いβ-溶血を示し，ラムノース発酵性陽性でキシロースとマンニット発酵性陰性のものを *L. monocytogenes* と鑑別した．本菌種と同定された菌株は自家製の型別用抗血清により血清型別を行った．

一部の調査材料については，検体10 g に0.1%ペプトン加生理食塩水90 ml を加えて作成した試料原液1 ml と Oxford 寒天培地とを混釈培養して定量的に *Listeria* 属菌数を測定した．

調査成績

1．食肉の種類別，*Listeria* 属菌の検出状況

調査した全食肉762例中524例(68.8%)から *Listeria* 属菌が検出され，その半数以上の276例(36.2%)が *L. monocytogenes* であり，他の菌種はほとんどが *L. innocua* と同定された．これらの検出率は，食肉処理業に比較して市販店舗でやや高い傾向がみみられたが大差は認められなかった．

畜種別にモモ，ロース，ムネ，ササミなどの部分肉，レバー及び挽肉に分けて *Listeria* 属菌の検出状況を Table 1 に示した．畜種別では鶏肉の汚染が豚肉や牛肉に比較してやや高い傾向が認められた．肉種別では食肉処理業で採取した豚のレバーや鶏のササミで検出率が低く，両者における *L. monocytogenes* の検出率は10%以下であった．しかし，これ以外の食肉では市販店舗から採取した鶏肉でモモやムネの90%以上から *Listeria* 属菌が検出されるなど，部分肉，挽肉ともに *L. monocytogenes* を含む *Listeria* 属菌が高頻度に分布していることが認められた．

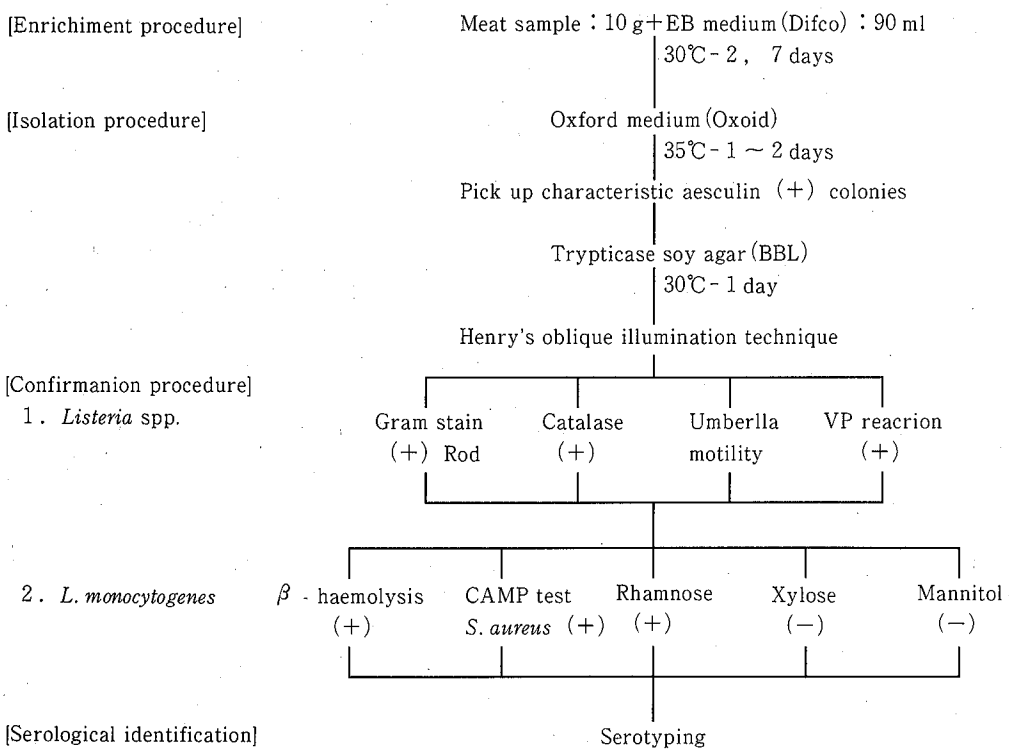


Fig. 1．Schematic outline of procedure for isolation of *Listeria* spp. in meat sample

Listeria 属菌陽性検体中402例についてそれらの菌数分布をみると，Table 2 に示したようにほとんどの食肉が1g当り100個以下であり，ほぼ75%が10個以下と少ない菌数であった．畜種による菌数の差異は明確でなかったが，一般的に *Listeria* 属菌数の多い食肉ほど *L. monocytogenes* が検出される頻度も高くなる傾向が認められた．

2．*L. monocytogenes* の検出状況と細菌数との関係

今回調査対象とした部分肉中495例について，同時に標準寒天培地を用いた混釈培養法により細菌数を測定し，その分布状況と *L. monocytogenes* の検出された193例の検出頻度との関係を Table 3 に示した．

細菌数は1g当り10^5個レベルをピークとして10^2～10^7個レベルの範囲に分布しており，細菌数が10^3個またはそれ以下のレベルと少ない食肉では *L. monocytogenes* の検出率が約10%であった．しかし，細菌数が多くなるにしたがい *L. monocytogenes* の検出率が高くなり，細菌数が10^6個レベルまたはそれ以上の食肉ではほぼ70%が陽性であった．

3．食肉から分離された *L. monocytogenes* の血清型

L. monocytogenes が検出された276例からの分離菌株1株ずつについて血清型別試験を行い，型別された血清型の内訳を畜種別に Table 4 に示した．

全体では6型に型別され，1/2c が106株(38.4%)と最も多く，次いで1/2a が71株(25.7%)，1/2b が55株(19.9%)，4b が39株(14.1%)の順であった．畜種別では，牛肉や豚肉では1/2c，鶏肉では1/2a の分離頻度が高い傾向があり，牛肉では4b も20%以上に認められた．

考　察

Listeria 属菌は動物を取り巻く環境中に広く分布し，以前から食肉の汚染が高いことが知られていたが，1988年以降に欧米諸国を中心に報告された多数のデータにより，このことが確認されている[5]．われわれの調査でも，

Table 1．Incidence of *Listeria* spp. in meat samples

Specimens		Number of samples	Number (%) of positive samples: All *Listeria* spp.	*L. monocytogenes*
Beef：	loin	133	87 (65.4)	41 (30.8)
	steak	51	29 (56.9)	19 (37.3)
	round	41	26 (63.4)	17 (41.5)
	Total	225	142 (63.1)	77 (34.2)
Pork:	ham	131	92 (70.2)	55 (42.0)
	liver	37	7 (18.9)	3 (8.1)
	round	41	32 (78.0)	18 (35.3)
	Total	209	131 (62.7)	76 (36.4)
Chicken:	leg	175	148 (84.6)	72 (41.1)
	breast	81	50 (61.7)	24 (29.6)
	liver	38	23 (60.5)	11 (28.9)
	round	34	30 (88.2)	16 (47.1)
	Total	328	251 (76.5)	123 (37.5)

Table 2．Counts of *Listeria* spp. in meat samples.

Specimens	Number of samples	*Listeria* spp./g: <10	10～100	100<
Beef	112	84 (47)	25 (17)	3 (1)
Pork	95	71 (36)	22 (16)	2 (2)
Chicken	195	144 (67)	47 (33)	4 (4)
Total	402	299 (150)	94 (66)	9 (7)

( )：Nomber of positives of *L. monocytogenes* in 10 g.

Table 3．Correlation between level of standard plate count and incidence of *L. monocytogenes* in meat samples

Standard plate count Log10/g	Number of samples (a) n=495	Number of positives of *L. monocytogenes* (b) n=193	$\frac{(b)}{(a)}\times 100$
10^2	10	0	0
10^3	45	6	13.3
10^4	179	58	32.4
10^5	185	79	42.2
10^6	67	46	68.7
10^7	7	4	57.1

Table 4．Serotypes of *L. monocytogenes* isolated from meat samples.

Meat of origin	Number of strains	Number of strains with serotypes on: 1/2a	1/2b	1/2c	3b	4b	4d
Beef	77	11	12	33	0	18	3
Pork	76	11	16	42	1	6	0
Chicken	123	49	27	31	0	15	1
Total	276	71	55	106	1	39	4
(%)	(100)	(25.7)	(19.9)	(38.4)	(0.4)	(14.1)	(1.4)

対象とした食肉全体のほぼ70%から *Listeria* 属菌が検出され，その半数以上が *L. monocytogenes* であり，わが国の食肉も欧米諸国と同様に高率に汚染されていることが明らかにされた．しかし，これらの菌数は，ほとんどが1g当り100個以下と少なく，Karches & Teufel[7]が豚や牛挽肉について調べた成績と一致した．

Listeria 属菌の食肉への汚染源として，と畜場の枝肉では家畜自体の糞便や皮膚が主要な役割を果たしていることが指摘されている[8-10]．また，わが国のと畜場環境の調査では，と殺解体に使用されるナイフやマナイタなどの器具類及び作業員の手指から *L. monocytogenes* が高い頻度で検出されることが示されている[11]．一方，Genigeorgis et al.[12]は市販鶏肉の汚染源について調査し，処理場における冷却後の枝肉を取り扱う作業員による二次汚染が最も汚染に関与していると指摘している．今回の調査では，と畜場の枝肉は対象にしていないが，流通末端の市販店舗で採取された部分肉や挽肉では，その前の流通経路である食肉処理場よりも検出率がやや高い傾向が認められた．特に，市販店舗から採取された鶏挽肉では90%以上から *Listeria* 属菌が検出されるなど極めて汚染が高かった．さらに，同時に検査した取り扱いの衛生指標である細菌数の高い食肉ほど *L. monocytogenes* の検出率が高かったことは，加工処理過程での二次汚染と増殖の防止が重要であることを裏付けていた．このような一連の調査成績から，食肉中の *Listeria* 属菌の汚染経路は，家畜自体が保有する本菌がと殺解体処理環境を汚染し，それが自然界の広範な分布と結び付いて食肉の取り扱い行程が進むにつれて作業従事者などにより伝播されたものであり[13]，したがって，本菌の汚染防止には従来の細菌汚染防止対策がそのまま適用できると考えられる．

今回分離された *L. monocytogenes* 以外の *Listeria* 属菌の菌種は畜種に関係なくほとんどが *L. innocua* であった．両菌種は食肉中に同程度に重複して分布することが知られており[14]，*L. monocytogenes* の汚染指標として *L. innocua* は有用であると提案されている[4]．

わが国のヒトのリステリア症患者から分離される *L. monocytogenes* の血清型は4bが60%，次いで1/2bが30%とこの2型が圧倒的に多く，1/2cは1%にすぎない[15]．このような傾向は諸外国においてもほぼ共通しており，欧米諸国で報告されている食品媒介リステリア症の起因菌はほとんどが4bである[3]．一方，食肉を汚染する *L. monocytogenes* の血清型は，われわれの成績と同様に1/2cが多いことから，食肉とヒトのリステリア症との結び付きに疑問を示す報告もみられる[16,17]．しかし，食品媒介リステリア症の感染経路など疫学的背景については未だ不明確な部分が多く，今回食肉から分離された *L. monocytogenes* の30%以上が4b及び1/2bにより占められていた事実は注目される．

要　約

東京都内の食肉処理業並びに市販店舗から採取した牛，豚及び鶏肉の計762例について *Listeria* 属菌の汚染状況を調査した．本菌属は524例(68.8%)から検出され，その半数以上が *L. monocytogenes* と同定された．採取場所による差はあまりなく，畜種別では鶏肉の汚染がやや高い傾向が認められた．陽性検体の *Listeria* 属菌数はほとんどが1g当り100個以下と少なく，その検出頻度は同時に調べた細菌数の多い検体ほど高くなる傾向がみられた．分離された *L. monocytogenes* の血清型は6型に型別され，これらのうち1/2cが最も多く約40%を占め，次いで1/2a，1/2bの順であり，わが国の臨床材料から高頻度に検出される4bも約15%に認められた．

(本研究の一部は，第110回日本獣医学会1990年11月で発表した)

文　献

1) Hird, D. W.: *J. Food Protec.*, **50**, 429-433, 1987.
2) Wehr, H. M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 769-772, 1987.
3) WHO Working Group : *Bull. WHO*, **66**, 421-428, 1988.
4) Farber, J. M. and Peterkin, P. I.: *Microbiol. Rev.*, **55**, 476-511, 1991.
5) Johnson, J. L., Doyle, M. P. and Cassens, R. G.: *J. Food Protec.*, **53**, 81-91, 1990.
6) 小久保彌太郎，飯田　孝，金子誠二，丸山　務：食衛誌，**31**，51-56，1990.
7) Karches, H. and Teufel, P.: *Fleischwirtsch.*, **68**, 1388-1392, 1988.
8) Skovgaard, N. and Morgen, C.-A.: *Inter. J. Food Microbiol.*, **6**, 229-242, 1988.
9) Skovgaard, N. and Norrung, B.: *Inter. J. Food Microbiol.*, **8**, 59-63, 1989.
10) Gobat, P.-F. and Jemmi, T.: *Fleischwirtsch.*, **70**, 1448-1450, 1990.
11) 水谷浩志，飯田　孝，丸山　務：日獣会誌，**43**，602-605，1990.
12) Genigeorgis, C. A., Dutulescu, D. and Fernandez-Garayzabal, J.: *J. Food Protec.*, **52**, 618-624, 630,

1989.

13) Ryer, E. T. and Marth, E. H.: *Listeria, listeriosis and food safety* p 422-423, 1991, Marcel Dekker, Inc., New Yolk.

14) Breuer, V. J. and Prandle, O.: *Archiv. Lebensmittlehyg.*, **39**, 28-30, 1988.

15) 寺尾通徳：獣医畜産新報, **44**, 757-760, 1991.

16) Schmidt, U., Seeliger, H. P. R., Glenn, E., et al.: *Fleischwirtsch.*, **68**, 1313-1316, 1988.

17) Nicolas, J. -A., Espaze, E.-P., Catimel, B., et al.: *Zbl. Bakt.*, **272**, 242-247, 1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 87-91, 1992

Listeria monocytogenes の低温増殖性に関する検討

飯田　孝*, 神崎政子*, 伊藤　武*, 丸山　務**

Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperature

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

Keywords：リステリア　モノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*, リステリア *Listeria* species, 増殖性 growth, 低温 low temperature, 患者 patient, 血清型 serovar

はじめに

Listeria monocytogenes は髄膜炎，敗血症，流産などのリステリア症を起すヒトや家畜の病原菌として古くから知られている[1,2]．ヒトへの感染経路については母親から子供への垂直感染が知られている[3]以外は，不明な点が多かったが，1980年代に入ってカナダにおおけるキャベツサラダ[4]，米国における殺菌乳[5]やナチュラルチーズなどの食品を介した集団感染例が相次いで報告され[6]，その後の調査研究により，*L. monocytogenes* は食品媒介感染症の重要な起因菌の一つとして認められるようになった．

本菌はサルモネラ，腸炎ビブリオなどの食品媒介病原菌と異なり，0℃でも発育可能な低温細菌であるとされている[7,8,9]．近年，低温流通が普及したことで食品の鮮度や品質が長時間維持できるようになった反面，低温域で増殖が可能な病原細菌の食品中における存在と挙動が食品衛生の分野で注目を集めている[1,10,11]．

そこで，食品を介したリステリア症を未然に防止するための基礎資料を得るために，*L. monocytogenes* の低温域における発育態度を，由来別あるいは血清型別に検討したので報告する．

材料および方法

1．供試菌株

L. monocytogenes の血清型別用レファレンス株21株，患者由来株8株，健康人由来株3株，食品由来株として市販チーズ由来株1株，市販牛肉由来株1株，市販豚肉由来株1株計3株，動物由来株としてウシ腸内容物由来株2株，ネズミ腸内容物由来株1株の計38株である．

他に，*Listeria innocua* のブタ腸内容物由来株1株(血清型6a)およびレファレンス2株(6a, 6b)の計3株と *Listeria ivanovii* 1株(血清型5)を供試した．

2．試験菌液の作成

供試菌株は10 ml の Tryptose broth(Difco，以下TB)で37℃，18時間の増菌培養を2代行い，これを PBS で1 ml 当り約1.0×10^5コになるように希釈して試験菌液とした．

3．4℃における増殖実験

TB を15 ml 分注した中試験管に試験菌液0.15 ml を接種した．4℃に培養後7日目，14日目，21日目に PBS により10倍階段希釈を行い，各階段希釈液0.1 ml を2枚の Tryptose agar(Difco，以下 TA)平板に滴下し，コンラージ棒で均一に塗抹した．これらの平板は30℃，48時間培養して菌数を求め，得られた菌数から平均世代時間を求めた．

4．10℃および20℃における増殖実験

TB を15 ml 分注したL字管に，前述の方法により作成した試験菌液0.15 ml を接種し，自動勾配菌培養装置(TEMPERATURE GRADIENT BIO-PHOTORECORDER TN-112 D，東洋科学)を使用して10℃および20℃で静置培養した．なお，均一な濁度を保つために一日に2回午前9時と午後6時にL字管を数回静かに振盪させた．自動的に描かれた増殖曲線上の菌数から平均世代時間を求めた．

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
**国立公衆衛生院衛生獣医学部

5．平均世代時間の求め方

各菌株の世代時間を下記に示した式[12]から求め，同様の実験を2回行って平均世代時間を算出した．

$$\text{世代時間}=\frac{t\cdot 1\,og\,2}{1\,og\,Bt-1\,og\,Bo}$$

Btはt時間後の菌数，Boは最初の菌数

結　果

1．4℃における平均世代時間

L. monocytogenes 38株，*L. innocua* 3株および*L. ivanovii* 1株の4℃での増殖性について検討を行った．その結果，平均世代時間は菌株によって大きく異なり，表1に示すように*L. monocytogenes*では平均世代時間が20時間未満に分布している比較的早く増殖した菌株は6株(15.8%)，20～30時間未満に分布している菌株は9株(23.7%)であった．さらに30～40時間未満に分布している菌株は21株(55.3%)で最も多く，増殖時間が遅い40時間以上に分布している菌株は2株(5.2%)であった．

表1：4℃におけるリステリアの平均世代時間

供試菌株	菌株数	平均世代時間			
		<20	<30	<40	40≦
L. monocytogenes	38	6	9	22	2
L. ivanovii	1		1		
L. innocua	3		1	1	1
合　計	42	6	11	22	3

表2．4℃における*L. monocytogenes*の平均世代時間と血清型との関連

血清型	菌株数	平均世代時間			
		<20	<30	<40	40≦
1/2a	13	5	2	6	
1/2b	4	1	2	1	
1/2c	4		1	3	
3a	2			1	1
3b	1			1	
3c	1		1		
4a	2			1	1
4ab	1			1	
4b	5		2	3	
4c	2			2	
4d	2		1	1	
7	1			1	
合　計	38	6	9	21	2

なお，*L. innocua* 3株の平均世代時間は86.4，26.6および31.2時間，*L. ivanovii*のそれは28.6時間であった．

2．4℃における*L. monocytogenes*の血清型別平均世代時間

4℃における38株の*L. monocytogenes*について平均世代時間と血清型との関連を調べた(表2)．平均世代時間が20時間未満の早い増殖態度を示した6株の血清型はすべて1型であった．また，比較的増殖が早い20～30時間未満の9株は，1型が5株，3型が1株，4型が3株であった．30～40時間未満の21株は，1型が10株，3型が2株，4型が9株であった．平均世代時間が最も長かった40時間以上の2株は，3型と4型が各1株であった．

3．4℃における*L. monocytogenes*の由来別平均世代時間

今回，実験に供した*L. monocytogenes*のうち由来が判明している新鮮分離菌株17株の平均世代時間を表3に示した．それぞれの平均世代時間は，チーズ由来株34.1時間，市販牛肉由来株33.2時間，市販豚肉由来株34.6時間，ウシ腸内容物由来株31.7および33.1時間，ネズミ腸内容物由来株31.9時間，健康人糞便由来株22.1～38.5時間，患者由来株18.5～31.3時間で患者由来株が他の由来株に比べて増殖性が良好であった．

4．4℃，10℃および20℃における*L. monocytogenes*の増殖態度

*L. monocytogenes*のうち健康人の糞便由来株89-88株と

表3．4℃における*L. monocytogenes*の由来別平均世代時間

由来	菌株番号	血清型	平均世代時間
チーズ	88-319	1/2a	34.1
市販牛肉	89-382	1/2b	33.2
市販豚肉	89-383	1/2a	34.6
ウシ腸内容物	88-283	1/2c	31.7
	89-203	1/2c	33.1
ネズミ腸内容物	89-378	4ab	31.9
健康人糞便	88-289	1/2a	38.5
	89-88	1/2b	22.1
	89-94	1/2a	30.5
患者	88-315	1/2b	24.7
	88-316	1/2a	18.5
	88-317	1/2a	27.9
	88-318	1/2a	19.9
	89-25	1/2a	18.5
	89-26	4b	31.3
	89-171	1/2a	19.4
	89-172	1/2a	19.4

市販豚肉由来株89-383株および*L. innocua* 88-188株の3株について4℃，10℃および20℃における増殖性について比較した．4℃培養における菌の増殖は図1に示したように3株とも培養7日目までほとんど増殖しなかったが，その後21日目に89-88株は1×10^7個/ml，89-383株は1×10^5個/mlまで増殖した．しかし，88-188株は培養21日目でも菌数は培養前とほとんど変わらなかった．10℃培養では図2に示したように89-88株，89-383株いずれも，9日目に1×10^9個/mlに達したが，88-188株は他の2株と比較して増殖が遅く，9日目で1×10^7個/ml，14日目で1×19^9個/mlであった．さらに，20℃では図3に示したように89-88株および89-383株はともに2日目で1×10^9個/mlとなったが，88-188株は他の2株と1日遅れて4日目に1×10^9個/mlとなった．

各温度における平均世代時間は89-88株では4℃で22.1時間，10℃では10.4時間，20℃では2.8時間であった．また，89-383株では4℃で34.6時間，10℃では10.3時間，20℃では2.8時間であった．88-188株は4℃では86.4時間，10℃で16.1時間，20℃でも3.9時間と，いずれの温度でも他の2株と比較して平均世代時間がやや長かった．

考　察

近年，リステリアの食品への汚染は乳，乳製品のみならず食肉，魚介類におよぶことが明らかにされてきた[6]．

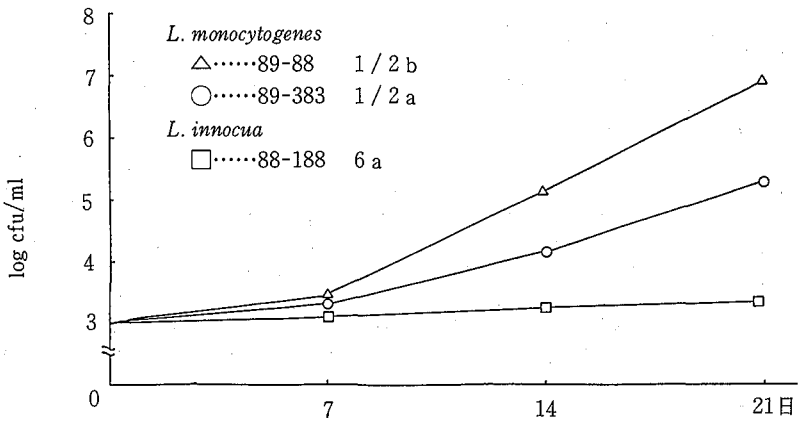


図1．4℃におけるリステリアの発育態度

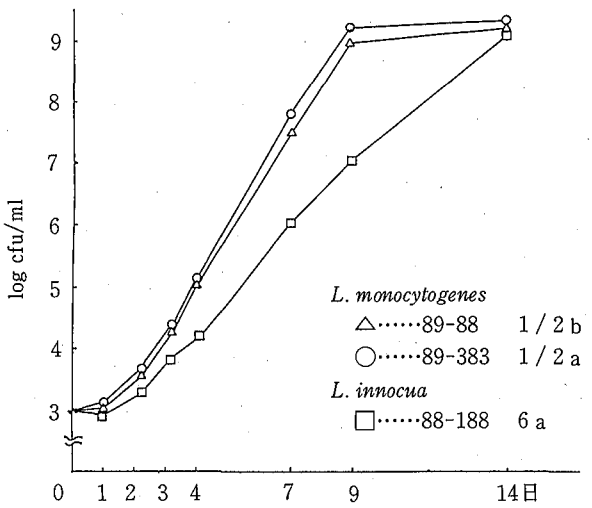


図2．10℃におけるリステリアの発育態度

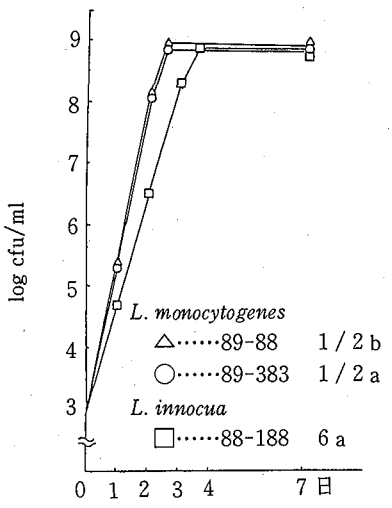


図3．20℃におけるリステリアの発育態度

今回は，そのリステリアの中でヒトに病原性を示す *L. monocytogenes* を主体に低温域での増殖性について検討を行った．

L. monocytogenes の4℃での平均世代時間は，Petranら[9]は33.5時間，RosenowとMarthは約34.8時間と報告[13]している．今回各種由来の *L. monocytogenes* 38株を用いて行った実験では，平均世代時間は19.4～38.5時間と菌株間により差が認められたが，平均すると28.6時間とこれまでの報告と比較して短い傾向にあった．

リステリアの増殖性が温度や培養基によって異なるという報告[8,9,14,15]はあるが，今回，人工のTB培地を用いて4℃の条件下で増殖性を比較したところ，平均世代時間が20時間未満の増殖性のよい *L. monocytogenes* が15.8%確認された．それらの菌株の由来を調べたところ，6株中5株が患者由来株であった．さらに，患者から分離した菌株の87.5%は平均世代時間が30時間未満であった．一方，食肉や動物など他の材料から分離した株は，健康人糞便由来の1株を除けば，すべて30～40時間未満であったことから患者由来株は，その他の材料から分離した株と比較して世代時間が短く，増殖の早い株が多いことが判明した．これらの菌株が食品中に混入した場合，今まで考えられていたより[9,13]短時間に菌の増殖することが示唆された．

現在，*L. monocytogenes* の血清型は22型に分類されているが，ヒトの臨床例から多く分離される血清型は1/2 a，1/2 b，4 bであると言われている[6]．今回実験で用いた1/2 a，1/2 b，4 bのうち患者材料から分離した菌株はそれ以外の材料から分離した菌株と比較して低温での増殖が早い傾向にあった．このように，ヒトの感染に関与する *L. monocytogenes* は，血清型に加え増殖性も感染の重要な因子であることが推察され，今後ヒト由来株について温度による増殖態度と病原性との関連についてさらに検討する必要があろう．

4℃で増殖性の異なる *L. monocytogenes* 2株と *L. innocua* 1株を用いて，わが国の食品における保存基準値の10℃および室温にしばらく食品が放置されたことを想定した20℃の2つの培養条件下で，これらの菌株がどのような増殖態度を示すか検討した．4℃では増殖性に差が認められた3株が10℃では増殖が遅かった88-188株を除いて，ほとんど差がなくなった．さらに20℃では，3株間のいずれにも世代時間の差がなくなることから，*L. monocytogenes* の混入が疑われる食品が4℃より保存基準の上限である10℃に保存されると，菌は2～5倍，20℃では8～22倍増殖が早くなることが分った．食品の低温保存に関する報告[16]でGlassらは，食品中の *L. monocytogenes* の増殖を出来る限り抑制するには4℃より2℃で保存することが望ましいと述べている．今後 *L. monocytogenes* の汚染が疑われる食品の保存基準は従来の10℃よりさらに厳しくする必要があると思われる．

以上の結果から，*L. monocytogenes* の低温増殖性には，菌株間で違いがあり，低温での増殖が早い株は病原性と関連のある血清型が多く含まれていることが明らかになった．

要　約

L. monocytogenes の血清型別用レファレンス株および各種材料由来株38株について，低温増殖性を検討した．

これら菌株の4℃における平均世代時間は20時間未満が15.8%，20～30時間未満が23.7%，30～40時間未満が55.3%，40時間以上5.2%であった．

平均世代時間を由来別にみると食品，動物，健康人糞便由来株は，ほとんどが30～40時間未満であったが，患者由来株は，そのほとんどが30時間未満の増殖の早い株であった．血清型別にみると，患者由来株の1/2 a，1/2 bは増殖が早かったが，他の材料から分離した同じ血清型の菌株の平均世代時間は長い傾向が見られた．このことより，*L. monocytogenes* の病原性には血清型に加え，低温増殖性も重要であることが推察された．さらに，4℃，10℃および20℃における増殖性を調べた結果4℃では平均世代時間に大きな差が認められたが，20℃では同じような増殖態度を示した．

文　献

1）丸山　務：*New Food Industry.*, **30**, 22-25, 1988.
2）Prentice, G.A. and Neaves, P.：IDF E-DOC, 1988.
3）Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broom. C.V.：*Clinical. Microbiol. Rev.* **4**, 169-183, 1991.
4）Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R. A. et al,：*New Engl. J. Med.*, **308**, 203-206, 1983.
5）Fleming, D.W. Cochi, S.L., MacDonald, K. L. et al：*New Engl. J. Med.*, **312**, 404-407, 1985.
6）Farber, J.M. and Peterkin, P.I.：*Microbiol. Rev.* **55**, 476-511, 1991.
7）Khan, M.A., Palmas, C.V., Seaman, A. et al.：*Zentralbl. Bakteriol. Hyz.* 1. *Abt Orig. B.*, **157**, 277-282, 1973.
8）大草　潔：日本公衛誌, **31**, 601-606, 1985.
9）Petran, R.L. and Zottola, E.A.：*J. Food Science.*, **54**, 458-460, 1989.
10）丸山　務：食品と微生物, **6**, 3-15, 1989.

11) 丸山　務：乳技協資料, **38**, 25-41, 1989.
12) 平戸勝七編：獣医微生物学, **30**, 養賢社, 東京.
13) Rosenow, E.M. and Marth, E.H.：*J. Food Protect.*, **50**, 452-459, 1986.
14) McClure. P.J., Roberts, T.A., Oguru, P.O., et al：*Lett. Appl. Microbiol.*, **9**, 95-99, 1989.
15) El-Shenawy, M.A. and Marth, E.H.：*Int. J. Food Microbiol.*, **8**, 85-94, 1989.
16) Glass, K.A. and Doyle, M.P.：*Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1565-1569, 1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 92-97, 1992

市販キットによる食肉中の残留抗菌性物質の微生物学的スクリーニング検査法の検討

門間千枝*, 神保勝彦*, 伊藤　武*

The Microbiological Screening Test for the Detection of Antimicrobial Residues in Meat

CHIE MONMA*, KATSUHIKO JINBO* and TAKESHI ITOH*

Keywords：微生物学的スクリーニング検査法 microbiological screening test, 市販キット commercial kit, 残留抗菌性物質 antimicrobial residues, 食肉 meat

はじめに

食肉中に残留する抗菌性物質のスクリーニング検査法として，平成3年10月に厚生省が通知した畜水産食品中の残留抗菌性物質簡易検査法(以下，簡易検査法と略す.)がある[1]．この方法は，試験操作が簡易迅速で，しかも従来の検査法[2]に比べて広範囲の種類の抗菌性物質をスクリーニングできるが，アミノグリコシド系抗生物質，ポリエーテル系抗生物質，サルファ剤等の抗菌性物質に対して検出感度が低いという難点がある．

一方，米国の屠畜場等では，残留抗菌性物質のスクリーニング検査法として綿棒を用いるSTOP法(Swab Test On Premises)[3]が採用されている．著者らはこの方法を検討したところ，わが国の従来の検査法[2]に比べて高い検出感度を示すが，試験操作などの実用性の面で検討する余地のあることを報告した[4]．更に，STOP法を基にして，綿棒を用いたバイオアッセイによる残留抗菌性物質スクリーニング法が開発され[5,6]，最近本キットがわが国でも市販された．このキットは牛の尿や腎臓中の残留抗菌性物質検出を目的としたものである．そこで，このキットが，食肉中の残留抗菌性物質検出に応用できるか否かを検討した．

実験材料及び方法

1．抗菌性物質標準品

実験に供試した抗菌性物質は，抗生物質26種類，合成抗菌剤12種類の合計38種類である．抗生物質としては，テトラサイクリン系(TCs) 4種類，ペニシリン系(PCs) 3種類，アミノグリコシド系(AGs) 5種類，マクロライド系(MLs) 5種類，ポリエーテル系(PEs) 3種類，ポリペプタイド系(PTs) 3種類及びその他にリンコマイシン(LCM)，クロラムフェニコール(CP)，チアムリン(TML)を用いた．

合成抗菌剤としては，サルファ剤(SAs) 3種類，キノロン剤(QLs) 3種類，ニトロフラン剤(NFs) 2種類，抗原虫剤3種類及びその他にチアンフェニコール(TP)を用いた．これらの薬剤名の詳細を表1に示す．

2．抗菌性物質標準溶液の調製

供試抗菌性物質を秤量し適切な緩衝液，あるいは溶媒中に溶解して[7-9]，それぞれ1,000 μg,IU/mlに調製した．これをMIC法[10]に準じて希釈することにより標準溶液を作成した．

3．抗菌性物質添加食肉の調製

あらかじめ抗菌性物質が残留していないことを確認した豚肉を挽き肉にし，抗菌性物質標準溶液を所定の濃度になるように加え，よく混合して使用した．

4．市販キット

実験に供試した市販キットは，米国ENVIRONMENTAL DIAGNOSTIS社製のLAST(Live Animal Swab Test)とCAST (Calf Antibiotic Sulfa Test)の2種類である．LAST及びCASTの試験菌は，前者が *Bacillus subtilis* ATCC 6633，後者が *Bacillus megaterium* ATCC 9885であり，芽胞浮遊液としてキットに添付されている．使用する培地も生培地としてすでに調製されている．その概要を表2に示す．

5．試験方法

a) LAST

滅菌済み綿棒を抗菌性物質標準溶液，または抗菌性物

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

表1．各種抗菌性物質標準溶液に対するLAST及びCASTの検出感度の比較

薬剤名（略号）	検出感度(μg,IU/ml) LAST	CAST	薬剤名（略号）	検出感度(μg,IU/ml) LAST	CAST
抗生物質			ポリペプタイド系抗生物質(PTs)		
テトラサイクリン系抗生物質(TCs)			バシトラシン(BC)	>10.0	>10.0
塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)	0.1	0.5	硫酸コリスチン(CL)	>10.0	>10.0
塩酸クロルテトラサイクリン(CTC)	0.05	0.1	エンラマイシン(ER)	1.0	0.25
塩酸ドキシサイクリン(DOXY)	0.025	0.025	その他の抗生物質		
塩酸テトラサイクリン(TC)	0.1	0.5	リンコマイシン(LCM)	5.0	10.0
ペニシリン系抗生物質(PCs)			クロラムフェニコール(CP)	5.0	5.0
ペニシリンGカリウム(PCG)	0.025	0.05	チアムリン(TML)	>10.0	>10.0
アンピシリン(ABPC)	0.05	0.1	合成抗菌剤		
アモキシシリン(AMPC)	0.1	0.1	サルファ剤(SAs)		
アミノグリコシド系抗生物質(AGs)			スルファジメトキシン(SDMX)	>10.0	0.25
硫酸カナマイシン(KM)	0.5	0.25	スルファモノメトキシン(SMMX)	>10.0	0.25
硫酸ジヒドロストレプトマイシン(DSM)	0.5	0.5	スルファジミジン(SDD)	>10.0	0.5
硫酸フラジオマイシン(FM)	0.5	0.25	キノロン剤(QLs)		
デストマイシンA（DM-A)	>10.0	1.0	ナリジクス酸(NA)	>10.0	>10.0
塩酸カスガマイシン(KSM)	>10.0	>10.0	オキソリン酸(OA)	1.0	2.5
マクロライド系抗生物質(MLs)			ピロミド酸(PA)	2.5	5.0
リン酸タイロシン(TS)	1.0	1.0	ニトロフラン剤(NFs)		
エリスロマイシン(EM)	0.1	0.1	フラゾリドン(FZ)	1.0	0.5
リン酸オレアンドマイシン(OM)	0.25	0.025	ジフラゾン(DFZ)	0.1	0.1
スピラマイシン(SP)	1.0	2.5	抗原虫剤		
キタサマイシン(KT)	0.5	1.0	クロピドール(CLP)	>10.0	>10.0
ポリエーテル系抗生物質(PEs)			ナイカルバジン(NCZ)	>10.0	>10.0
サリノマイシンナトリウム(SLM)	>10.0	10.0	ピリメタミン(PYR)	>10.0	>10.0
モネンシンナトリウム(MN)	>10.0	>10.0	その他の合成抗菌剤		
ラサロシドナトリウム(LS)	5.0	2.5	チアンフェニコール(TP)	>10.0	10.0

質を添加した食肉中に挿入した．綿棒は試料溶液が十分しみた後取り出し，先端(綿)から1.5 cmの部分で棒を切りとった．次に，あらかじめ試験菌を塗抹した寒天平板上に綿棒を置き，同時にコントロールとしてキット添付のネオマイシンディスクを同寒天平板上に置いた．29～30℃で18時間培養後，ネオマイシンディスクの阻止帯が形成されていることを観察し，本キットの検出感度に異常がないことを確認した後，綿棒周囲に1 mm以上阻止帯幅を形成している場合を陽性と判定した．

b）CAST

LASTと同様に行った．ただし，培養は44～45℃で16時間行った．

c）STOP法

Johnstonらの方法[3]に従った．

d）簡易検査法

厚生省通知の方法[1]に従った．

実験結果

1．抗菌性物質標準溶液に対するLAST，CASTの検出感度

抗菌性物質標準溶液に対するLAST及びCASTの検出感度を表1に示す．

LASTの検出感度はTCs, PCs, MLsのEM及びNFsのDFZに対して0.1 μg, IU/ml以下の高い値を示した．AGsのKM, DSM, FM, MLsのOM, KTに対して0.25～0.5 μg/ml, MLsのTS, SP, PTsのER, QLsのOA, PA, NFsのFZに対しては1.0～2.5 μg/ml, PEsのLS, LCM, CPに対して5.0 μg/mlの検出感度を示した．これら以外の薬剤に対しては10.0 μg/mlで検出できなかった．

CASTではTCsのCTC, DOXY, PCs, MLsのEM, OM, NFsのDFZに対して0.1 μg, IU/ml以下の高い値を示した．TCsのOTC, TC, AGsのKM, DSM, FM, PTsのER, SAs, NFsのFZに対して0.25～0.5 μg/ml, AGsのDM-A,

表2．各種残留抗菌性物質スクリーニング検査法の概要[1,3,5,6]

検査法	試験菌	試験菌液	培地	ペトリ皿直径	検査用培地（培地量）	試験法	培養温度 時間	判定（陽性）
LAST	*B. subtilis* ATCC 6633	芽胞浮遊液	ストレプトマイシンアッセイ培地	60mm	単層，塗抹（6 ml）	直接綿棒法	29～30℃ 18時間	阻止帯 幅1 mm以上
CAST	*B. megaterium* ATCC 9885	芽胞浮遊液	ミュラー・ヒントン培地	60mm	単層，塗抹（6 ml）	直接綿棒法	44～45℃ 16時間	阻止帯 幅1 mm以上
STOP法	*B. subtilis* ATCC 6633	芽胞浮遊液	AM 5	60mm	重層，混釈（基層4 ml，種層2 ml）	直接綿棒法	35℃ 18時間	阻止帯 幅2 mm以上
簡易検査法	*B. subtilis* ATCC 6633	芽胞浮遊液	AM 5 トリメトプリム加	85mm	単層，混釈（8 ml）	抽出ディスク法	30℃ 18時間	阻止円 直径12mm以上
	M. luteus ATCC 9341	培養原液	AM 5	85mm	単層，混釈（8 ml）	抽出ディスク法	30℃ 18時間	阻止円 直径12mm以上
	B. mycoides ATCC 11778	芽胞浮遊液	AM 5	85mm	単層，混釈（8 ml）	抽出ディスク法	30℃ 18時間	阻止円 直径12mm以上

AM 5 ：Antibiotic Medium 5

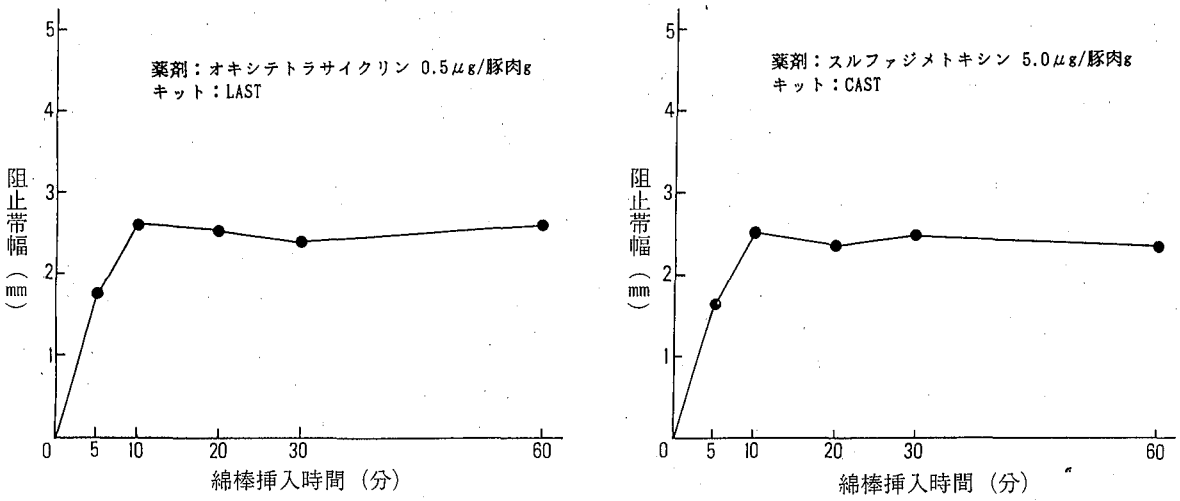


図1．阻止帯形成に及ぼす食肉中への綿棒挿入時間の影響

MLsのTS, SP, KT，PEsのLSに対して1.0～2.5 μg/ml, CPに対して5.0 μg/mlの検出感度を示した．これら以外の薬剤については10.0 μg/mlまたはそれ以上の値であった．

2．阻止帯形成に及ぼす食肉中への綿棒挿入時間の影響

OTC 0.5 μg/g及びSDMX 5.0 μg/gを添加した豚挽き肉中に綿棒を5,10,20,30,60分間差し込み，これら綿棒が形成する阻止帯の大きさをLAST及びCAST寒天平板を用いて調べた．その成績を図1に示す．OTC添加豚肉に10分間差し込んだ綿棒は2.6 mmの阻止帯を形成し，それ以降，阻止帯の大きさは変わらなかった．SDMX添加豚肉に綿棒を差し込んだ場合も同様の傾向がみられた．

3．抗菌性物質添加食肉に対するLAST及びCASTの検出感度

抗菌性物質を添加した食肉を対象としてLAST, CASTの検出感度を表3に示す．

LASTではTCs，PCsに対して0.1～0.5 μg, IU/gの高い検出感度を示した．AGsのKM，MLsのTS, EM, OM, KT，QLsのOA, PA，NFsに対して1.0～5.0 μg/gの検出

感度を示した．これら以外の薬剤に対しては10.0 μg/g またはそれ以上の値であった．

CASTではTCsのOTC, CTC, DOXY, PCsのPCG,ABPC, AGsのKM, FM, NFsのDFZ に対して0.25～0.5 μg,IU/g の高い検出感度を示した．TCsのTC, PCsのAMPC, AGsのDSM, DM-A, MLsのTS, EM, OM, KT, PEsのLS, PTsのER, SAsのSDMX, SMMX, NFsのFZ に対して1.0～5.0 μg, IU/g の検出感度を示した．これら以外の薬剤に対しては10.0 μg/g またはそれ以上の値であった．

4．抗菌性物質添加食肉に対するSTOP法及び簡易検査法の検出感度

LAST 及びCAST の各キットの検出感度とSTOP 法及び厚生省の簡易検査法のそれと比較するために上述の抗菌性物質を添加した食肉を使用して検討した(表3)．

STOP 法では TCs の CTC, DOXY, TC, PCs に対して0.25～0.5 μg, IU/g の高い検出感度を示した．TCsのOTC, AGsのKM, DSM, MLsのTS, EM, OM, KT, QLs, NFsのFZ に対して1.0～5.0 μg/g の検出感度を示した．これら以外の薬剤に対しては10.0 μg/g またはそれ以上の値であった．

簡易検査法では TCsのCTC, DOXY, PCs, MLsのEM に対して0.25～0.5 μg, IU/g の高い検出感度を示した．TCsのOTC, TC, AGsのKM, DSM, MLsのTS, OM, KT, PTsのBC, QLsのOA に対して1.0～5.0 μg/g の検出感度を示した．これら以外の薬剤に対しては10.0 μg/g またはそれ以上の値であった．

考　察

昭和58年に厚生省から通知された抗菌性物質簡易検査法[2]は食肉の残留抗菌性物質の迅速なスクリーニング検査法として食肉衛生検査所等の日常検査に採用され，抗菌性物質を含有する食肉を排除する上で成果をあげてきた．しかし，検出感度が低いことから，その改良あるいはより検出感度の高い検査法の開発が望まれていた．厚生省は平成3年10月にこの検査法を改良した簡易検査法

表3．各種抗菌性物質添加食肉に対するスクリーニング検査法別の検出感度の比較

薬剤名	検出感度(μg,IU/g)				薬剤名	検出感度(μg,IU/g)			
	LAST	CAST	STOP 法	簡易検査法		LAST	CAST	STOP 法	簡易検査法
TCs					PTs				
OTC	0.5	0.5	1.0	1.0	BC	>10.0	>10.0	10.0	1.0
CTC	0.1	0.25	0.25	0.25	CL	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
DOXY	0.1	0.25	0.25	0.25	ER	10.0	2.5	10.0	>10.0
TC	0.5	1.0	0.5	1.0	その他の抗生物質				
PCs					LCM	>10.0	10.0	>10.0	10.0
PCG	0.25	0.5	0.25	0.25	CP	10.0	10.0	10.0	>10.0
ABPC	0.25	0.5	0.25	0.1	TML	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
AMPC	0.25	1.0	0.25	0.1	SAs				
AGs					SDMX	>10.0	5.0	>10.0	>10.0
KM	5.0	0.25	2.5	2.5	SMMX	>10.0	5.0	>10.0	>10.0
DSM	10.0	1.0	2.5	2.5	SDD	>10.0	10.0	>10.0	>10.0
FM	>10.0	0.25	>10.0	>10.0	QLs				
DM-A	>10.0	5.0	>10.0	>10.0	NA	>10.0	>10.0	2.5	>10.0
KSM	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	OA	1.0	10.0	1.0	2.5
MLs					PA	2.5	>10.0	5.0	10.0
TS	5.0	2.5	5.0	5.0	NFs				
EM	5.0	1.0	5.0	0.5	FZ	5.0	2.5	2.5	10.0
OM	1.0	2.5	1.0	2.5	DFZ	2.5	0.5	>10.0	>10.0
SP	>10.0	10.0	>10.0	10.0	抗原虫剤				
KT	5.0	2.5	2.5	2.5	CLP	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0
PEs					NCZ	>10.0	>10.0	10.0	>10.0
SLM	>10.0	>10.0	>10.0	2.5	PYR	>10.0	>10.0	10.0	>10.0
MN	>10.0	>10.0	>10.0	>10.0	その他の合成抗菌剤				
LS	>10.0	5.0	>10.0	>10.0	TP	>10.0	>10.0	10.0	>10.0

を各都道府県に通知した[1]．この簡易検査法[1]は従来の方法[2]に比べて多少検出感度が高くなったが，一部の抗菌性物質についてはまだ検出感度が低く，更に改良する余地がある．一方，米国やカナダではSTOP法，EC諸国ではGermann Hermstoff法及びFour-Plate法等が食肉中の残留抗菌性物質スクリーニング法として採用されている[11-15]．近藤らはこれらの検査法を比較した結果，STOP法とGermann Hermstoff法が優れていることを報告した[16]．最近，乳牛の尿中の残留抗菌性物質検査法としてSTOP法を改良としたLAST，牛の尿あるいは腎臓中の残留抗菌性物質検査法としてCASTが米国のUSDA/FSISで開発された[5,6]．Korsrudらは CAST及びSTOP法等について基礎的検討を行った結果，CASTの検出感度が優れていること報告した[17]．TerHuneら，Seymourら及びMacneilらはそれぞれ投与実験により牛の尿等からLASTあるいはCASTで残留抗菌性物質を検出できることを証明した[18-20]．牛の尿を対象としてLAST及びCASTを用いた残留実態調査も報告されている[13,21,22]．これらの報告はいずれも尿や臓器を対象としたものである．

今回，著者らは食肉中の残留抗菌性物質の検出に両方法を用いることを試み，その基礎実験としてわが国で家畜に使用されている代表的な抗菌性物質38種類の標準溶液に対するLAST及びCASTの検出感度を調べた．その結果，TCs, PCsに対してはLASTの方が高い値を示したが，CASTも十分満足できる値であった．AGs, SAs及びERに対してはCASTの方が高い値を示し，MLs, NFsに対してはLAST, CASTは同じ様な値を示した．特にAGsに対しては，これまでの検査法は*B. subtilis* ATCC 6633とAntibiotic Medium 5の組み合わせで用いられており，著者等もわが国で残留抗菌性物質検査に用いられている11種類の試験菌について調べた結果，この組み合せがよいことを報告した[23]．しかしTCs, PCs, MLsに比べて検出感度が低く，今回の実験から*B. megaterium* ATCC 9885とストレプトマイシン・アッセイ培地を用いたCASTが*B. subtilis*とミュラー・ヒントン培地を用いたLASTよりも検出感度は高いことが判り，CASTを用いることによりAGsの検出感度を高くできることが示唆された．また，CASTのSAsに対する値は簡易検査法で採用されているトリメトプリム添加培地(SAs用培地)のそれと同等以上であるので，CASTを用いればSAsの検出感度は高くなるものと推察される．

次に，抗菌性物質を添加した食肉を対象として，LAST及びCASTの検出感度を，STOP法及び簡易検査法のそれと比較した．食肉に抗菌性物質が吸着される等の影響により，標準溶液で検討した成績より検出感度が低くなっているが，検出可能な薬剤の種類は同じであり，LAST及びCASTとも簡易検査法とほぼ同様の成績が得られている．なお，試験菌が異なるためか検出感度の差異が認められる．すなわち，LASTで検出できる抗菌性物質はTCsとPCsであり，MLsのOM，QLsのOAとPA，NFsのDFZは高濃度残留している場合に検出でき，これら以外の抗菌性物質は検出することが困難である．CASTではTCs，PCs，AGsのKMとFM，NFsのDFZを検出でき，AGsのDSM，MLs，PTsのER，NFsのFZは高濃度残留している場合に検出でき，これら以外は検出することは難しく，特に，標準溶液では高い検出感度を示したSAsの検出も難しいと考えられる．検出できる抗菌性物質に相違があることから，LASTとCASTの両者を併用することにより，STOP法及び簡易検査法に比べて幅広く抗菌性物質をスクリーニングできるものと考える．しかし，PEs，PTs(ERを除く)，TML，抗原虫剤及びTPに対しては両キットともほとんど感受性を示さなかったことから，これら薬剤に対するスクリーニング法を早急に開発する必要があると考える．

現在市販されているLAST, CASTの両キットは綿棒，平板培地，試験菌等が調製できていることから，常に同一条件で検査ができるので，食肉衛生検査所等の日常検査に応用できると考えられる．また．本キットによる検査では，綿棒に組織液を完全にしみ込ませることが重要である．今回著者らが行った豚挽き肉での実験では10分間で十分であったが，枝肉，臓器あるいは肉の種類等で組織液のしみ込む時間が異なると考えられるので，綿棒に組織液のしみ込む時間，すなわち，挿入時間を各臓器や肉の種類ごとに定める必要があろう．

結　論

牛の尿あるいは腎臓中の抗菌性物質スクリーニングテストとして開発されたLAST及びCASTの2種類のキットについて，食肉中の残留抗菌性物質スクリーニング検査法として応用できるか否かを検討し，以下の結果を得た．

1．26種類の抗生物質，12種類の合成抗菌剤の標準溶液に対するLAST及びCASTの検出感度を検討した結果，LAST, CAST共TCs, PCs, EM, DFZに対しては0.1 μg/ml以下の高い検出感度であったが，DM-A, KSM, SLM, MN, BC, CL, TML, TP及び抗原虫剤に対しては非感受性であった．SAsに対してLASTは非感受性であったがCASTの検出感度は0.25～0.5 μg/mlであり，その他の

抗菌性物質に対しては中程度の感度を示した.

2．抗菌性物質を添加した食肉について検出能を検討した結果，LAST，CAST 共に標準溶液で得られた成績とほぼ同一であった.

3．LAST，CAST，STOP 法及び簡易検査法の検出感度を比較した結果，それらの間に大差はなかった．しかし，LAST と CAST を併用して検査すれば，STOP 法及び簡易検査法に比べて広範囲の抗菌性物質をスクリーニングできることが判った.

4．豚挽き肉中への綿棒挿入時間は10分間で十分であり，それ以上挿入しても阻止帯の大きさは変わらなかった.

5．LAST 及び CAST は，綿棒，平板培地，試験菌が調製済みであり，常に同一条件で検査できることから実用性が高かった.

(本研究の概要は，第63回　日本食品衛生学会　1992年5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抗菌性物質簡易検査法，1991.

2）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の5，1983.

3）Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H.G. and Schwab, B.: *J. Food Prot.*, **44**, 828-831, 1981.

4）神保勝彦，門間千枝，丸山　務，松本昌雄：食品衛生学会第60回学術講演会講演要旨集，1990.

5）Anoymous : How to perform the Live Animal Swab Test for antibiotic residues. USDA, Handbook No. 601, 1983, Washington, D. C.

6）USDA/FSIS : Performing the Calf Antibiotic and Sulfa Test. A Self-Instructional Guide. First Revision September 1984, 1984, Washington, D. C.

7）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，1983.

8）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第1集の2，1985.

9）厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜水産食品中の残留物質検査法　第2集の2，1984.

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

11）Prucha, J. R. : 食品衛生研究，**40**. 57-63, 1990.

12）Salisbury, C. D. C., Rigby, C. E. and Chan, W. : *J. Agric. Food Chem.*, **37**. 105-108, 1989.

13）Schthort, M. Van., Leusden, F. M. Van. and Nouws, J. F.M. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**. 1209-1213, 1978.

14）Nouws, J. F. M., Borex, N. J. G., Den Hartog, J. M. P. and Driessens, F. : *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **39**. 135-138, 1988.

15）Nouws, J. F.M., Schthort, M.Van. and Ziv, G. : *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **30**. 4-8, 1979.

16）近藤房生，松本和之，永田祥代：畜産の研究，**43**, 353-356, 1989.

17）Korsrud, G. O. and Macneil, J. D. : *J. Food Prot.*, **51**, 43-46, 1988.

18）TerHune, T.N. and Upson, D.W. : *J.Amer.Vet.* Med. Assoc., **194**, 918-921, 1989.

19）Seymour, E. H., Jones, G. M. and McGilliard, M. L. : *J. Dairy Sci.*, **71**, 539-544, 1988.

20）Macneil, J. D., Korsrud, G. O., Boison, J. O., Papich, M. G. and Yates, W. D. G. : *J. Food Prot.*, **54**, 37-40, 1991.

21）Tritschler, J.P. Ⅱ, Duby, R. T., Oliver, S. P. and Prange, R. W. : *J. Food Prot.*, **50**, 97-102, 1987.

22）Dresser, W.R.V. and Wilcke, J. R. : *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **194**, 1700-1710, 1989.

23）門間千枝，神保勝彦，丸山　務，松本昌雄：東京衛研年報，**42**, 112-117, 1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 98-110, 1992

標準品としての市販指定外着色料の検討

中沢 久美子*, 石川 ふさ子*, 田端 節子*
川合 由華*, 田村 行弘*, 二島 太一郎*

Study of Undesignated Food Colors on the Market of the Standard Colors

KUMIKO NAKAZAWA *, FUSAKO ISHIKAWA*,
SETSUKO TABATA*, YUKA KAWAI*, YUKIHIRO TAMURA*
and TAICHIRO NISHIMA*

Keywords：指定外着色料 undesignated food color, 着色料 color additives, 食用着色料 food color, ペーパークロマトグラフィー paper chromatography, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

緒　言

現在，我が国には多くの食品が輸入されているが，その中には日本の食品衛生法で指定された12種類以外の着色料を使用している食品が時々見つけられる．ここ数年内に我々が検査した食品からもアゾルビン，キノリンエロー，パテントブルーV，ブラックPN等が検出された．

このような指定外着色料を食品から分析及び同定する中で，市販の着色料を標準品とした場合，同一商品名でもペーパークロマトグラフィーで異なる挙動を示したり，Color Index Number (C.I.No.)が表示されていない着色料もあり，どの製品を標準品として使用するのが適当か判断が困難な場合があった．

そこで，我々は食品中の着色料を分析する際に標準品として適している着色料製品をみつける目的で，過去に我が国で食品から検出した指定外着色料の中で主に市販の着色料について，ペーパークロマトグラフィー(PC)，液体クロマトグラフィー(HPLC)及び一部質量分析法(FAB/MS)により品質を検討し，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1．試　料　1992年1～4月に購入した49製品，入手時期不明の5製品及び製造会社から分与された3製品で，合計16種，57製品を試料とした．その内訳を表1．に示したが，国産17製品及び外国製40製品である．

2．PC用試薬[1)]

1）PC用ろ紙：アドバンテック東洋㈱製PC用ろ紙，No.50，12×22cm，9本溝入り

2）展開溶媒：①アセトン・イソアミルアルコール・水(6：5：5)②n-ブタノール・無水エタノール・1％アンモニア水(6：2：3)③25％エタノール溶液・5％アンモニア水(1：1)

3）基準色素溶液：色素は国立衛生試験所標準品を用いた．

基準色素溶液ⓐ　アマランス(食用赤色2号)，ニューコクシン(食用赤色102号)，サンセットエローFCF(食用黄色5号)及びナフトールエローSのそれぞれ0.1％を含む水溶液

基準色素溶液ⓑ　エリスロシン(食用赤色3号)，フロキシン(食用赤色104号)，ローズベンガル(食用赤色105号)及びアシドレッド(食用赤色106号)のそれぞれ0.1％を含む水溶液

3．HPLC用装置及び測定条件[2)]

1）装置　高速液体クロマトグラフ：Waters社製600MS型，検出器：同社製Photodiode Aray Detectar 994型

2）測定条件　カラム：Waters社製5 C18AR，4.5 mmi.d.×150 mm

移動相：A液－酢酸緩衝液 PH 4.6・水(1：10)，B液－A液・メタノール(20：80)，酢酸緩衝液－1M NaOH・1M酢酸・水(5：10：35)

グラジェント条件：

分	A液％	B液％
0	100	0
15	65	35

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-Ku, Tokyo, 169 Japan

表1－1．試料とした着色料製品

試料 No.	商品名	C.I.[1] No.	EEC[2] No.	商品 No.	メーカー名
アゾルビン		14720	E122		
1	Azorubin S			1B 097	CHROMA
2	Brillantcarmoisin O			1B 099	CHROMA
3	Carmoisin B			1B 101	CHROMA
4	Chromotrope FB			21,451-5	ALDRICH
レッド 2G		18050	128		
5	Acid Red 1	18050		A-2775	SIGMA
6	Azophloxin	18050		1B 103	CHROMA
7	Acid Red 1			21,063-3	ALDRICH
ポンソー 3R		16155			
8	Ponceau 3R	16155		P 591	東京化成
9	Ponceau 3R	16155		166-11921	和光純薬
10*	Ponceau 3R	16155		国立衛生試験所標準品	
ポンソー 6R		16290			
11	Ponceau 6R	16290		P0667	東京化成
12	Ponceau 6R			1B 121	CHROMA
ファストレッド E		16045			
13**	Fast Red E	16045			三栄化学
14**	Acid Fast Red KS (C.I.Acid Red 13)				関西染料
キノリンエロー		47005	E104		
15	Quinoline Yellow	47005		Q-1376	SIGMA
16	Quinoline Yellow S	47005		Q 023	東京化成
17*	Quinoline Yellow	47005		Q 023	東京化成
18	Quinoline Yellow (water sol.)			30,905-2	ALDRICH
19	Quinoline Yellw			1B 141	CHROMA
20	Quinoline Yellow (Chinolingelb)			22680	FLUKA
21	Quinoline Yellow WS			918-4	大和化工
キシレンエロー		18965	107		
22	Acid Yellow 17	18965		A-4645	SIGMA
23	Xylene Fast Yellow 2G	18965		X 025	東京化成
24	Acid Yellow 17			20,198-7	ALDRICH
オレンジ G		16230			
25	Orange G	16230		1B 221	CHROMA
26	Orange G	16230		75380	FLUKA
27	Orange G (Sodium Salt)	16230		0-1625	SIGMA
28	Orange G			86,128-6	ALDRICH

＊　：入手時期不明の着色料.
＊＊：市販品ではなく製造会社から分与された着色料.
1）：Color Index Number
2）：EEC Number, Eの記号のないものは暫定を示す.

表1－2．試料とした着色料製品

試料 No.	商品名	C.I.[1] No.	EEC[2] No.	商品 No.	メーカー名
オレンジ Ⅱ		15510			
29	Orange Ⅱ	15510		1B 377	CHROMA
30	Orange Ⅱ	15510		75370	FLUKA
31	Orange Ⅱ	15510		0-8126	SIGMA
32	Orange Ⅱ			19,523-5	ALDRICH
33	Mandarin G			1B 373	CHROMA
34	Tropaeolin 000 NR.2			1B 381	CHROMA
アズールブルー VX		42045			
35	Patentblau V	42045		1B 451	CHROMA
36	Patent Blue Violet	42045		P-6396	SIGMA
37	Patent Blue V(Azure Blue VX)	42045		P0597	東京化成
38	Patent Blue(Patent Blue V)	42045		161-11312	和光純薬
39	Patentblau V			1I 305	CHROMA
パテントブルー V		42051	E131		
40	Patent Blue V	42051		76270	FLUKA
41	Patent Blue Violet	42051		P-6671	SIGMA
42	Acid Blue 3	42051		A1242	東京化成
43*	Patent Blue(Azure Blue V)	42051		P 597	東京化成
グリーン S		44090	E142		
44	Lissamine Green B	44090		L-6382	SIGMA
45	Lissamine Green B			19,958-3	ALDRICH
46	Kiton Green S			1B 197	CHROMA
47	Lissamingrün B			1B 199	CHROMA
ブリリアントミリンググリーン		42100			
48	Patent Green	42100		B0791	東京化成
49**	Acid Brilliant Milling Green B			675	保土谷化
ベンジルバイオレット 4B		42640			
50	Benzylviolett			1F 163	CHROMA
51	Formylviolett S 4BN			1F 165	CHROMA
52	Säurerviolett 6B			1F 169	CHROMA
ブラック PN		28440	E151		
53	Brilliant Black BN	28440		B-8384	SIGMA
54	Brillant-Schwarz(or-Black)			1B 085	CHROMA
55	Ariavit Brilliant Black BN				WILLIAMS
ブラウンHT		20285	155		
56*	Ariavit Chocolate Brown HT				WILLIAMS
57*	Chocolate Brown FB				AZUMA

＊　：入手時期不明の着色料.

＊＊：市販品ではなく製造会社から分与された着色料.

1）：Color Index Number

2）：EEC Number，Eの記号のないものは暫定を示す.

20	50	50
25	0	100
36	0	100
42	100	0

流速：1 m l /min，カラム温度：室温，注入量：10 μl
検出波長：衛生試験法[3]記載の各々の色素の最大吸収波長を用いた．

4．質量分析法の装置及び測定条件

1）装置　Finnigan MAT 社製質量分析計 TSQ-70型，Ion Tech 社製 FAB 銃

2）測定条件　FAB/MS(Fast Atom Bombardment/Mass Spectrometry)，負イオンモード，マルチ電圧 1200V，FAB 銃：High vol. Outgut 7 KV，Current 2 mA，キセノンガス，マトリックス：グリセロール/チオグリセロール(1：1)

5．実験方法

PC の操作法は衛生試験法[1]に準じた．すなわち試料着色料の0.1％水溶液を調製しこれを試料溶液とした．PC 用ろ紙に試料溶液及び基準色素溶液ⓐ又はⓑを塗布する．このろ紙を展開溶媒①，②及び赤色については③も用いて13～14 cm 展開する．ろ紙を取り出し風乾した後，Rf.(原点からスポットの上端までの距離/原点から溶媒の先端までの距離)と色調を自然光及び紫外線(365及び253nm)下で基準色素と比較した．

また HPLC[2]は，試料着色料をHPLC条件の移動相A液に溶解し50ppm溶液とした．これを試料溶液とし，HPLC で分析を行い，検出したピークについてフォトダイオードアレイ検出器で吸収スペクトル(350～700nm)を測定した．また必要に応じ衛生試験法記載の緩衝液に溶かし，可視部吸収スペクトルを測定した．

アズールブルーVX 及びパテントブルーVについては FAB/MS によっても分析を行った．

結果及び考察

着色料は RTECS[4]及び Color Index[5]等から別名を調査した．また分類は RTECS に従い，色素名は衛生試験法[3]に基づき表示した．なお，各着色料の PC の結果を図1～3に示した．

アゾルビン(試料1～4)

4試料とも C.I.No. の表示がなく商品名も異なっていたが，PC において赤紫色の単一スポットでRf.も一致した．また紫外線下でいずれもピンク色の蛍光が見られた．

HPLC では4試料とも主ピークは Rt. 27.8分にあり，このピークは516 nm に最大吸収波長を持っていた．

PC 及び HPLC の結果から，試料1～4はアゾルビンの標準品として適当と考える．

我々の最近の検査では，オーストラリア産のジャムからアゾルビンが検出された．

レッド2G(試料5～7)

試料5及び7は PC においてチェリーピクン色の単一スポットであったが，試料6は前者と同様なスポットに加えて展開溶媒①及び②では上部に，展開溶媒③では下部に同一色調の副色素を認めた．

HPLC では3試料とも Rt. 23.7分に主ピークがあり，このピークの最大吸収波長は506 nm であった．また主ピークの後方に数本の小さなピークがあったが，いずれも最大吸収波長は506 nm と一致しなかった．試料6は主ピーク以外の比率が他と比べ高かった．

PC 及び HPLC により試料5～7はレッド2Gの標準品として適していると考える．

ポンソー3R（試料8～10)

PC において試料9及び10は同じ Rf. の桃色の単一スポットで蛍光も同色であった．しかし試料8は珊瑚紅色の2つのスポットが重なりあい，下部のスポットには桃色の蛍光があった．

HPLC の結果を図4に示したが，試料9及び10は Rt. 28.3分に主ピークが検出され，このピークの最大吸収波長は508 nm であった．試料8の主ピークは Rt. 27.8分にあり，その最大吸収波長は500 nm であった．また副ピークが Rt. 27.4と28.5分にあり最大吸収波長はそれぞれ487，410 nm であった．

以上の結果からまた試料10は国立衛生試験所標準品であることから，試料9,10はポンソー3Rと考えられるが，試料8は前2者と異なり検討が必要である．

ポンソー6R（試料11,12)

PCでは試料11及び12ともチェリーピンクのスポットで Rf. も同じであった．また HPLC では主ピークは Rt. 3.8分に認められ，その最大吸収波長は512 nm であった．

PC 及び HPLC により試料11，12はポンソー6Rの標準品として適当と考える．

他に商品名が似ていた Crystal Ponceau 6R(SIGMA C-0644)を購入し検討したが，C.I. 16250の表示があり，また PC 及び HPLC でも試料11，12と挙動が異なり別のものであった．

ファストレッドE（試料13，14)

本品は市販品が入手できず，製造会社から分与された試料である．なお試料14は繊維用着色料である．

PC において試料13，14とも主スポットは展開溶媒①及び②でRf.0.45の桃色のスポットであったが，両試料

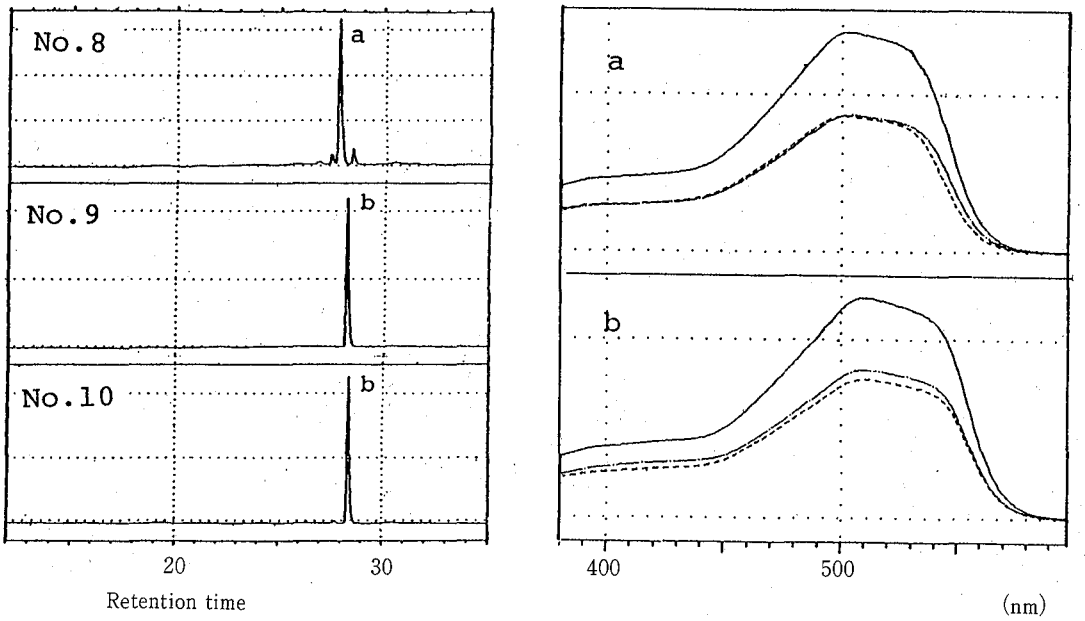


図4．ポンソー3Rの液体クロマトグラム及び吸収スペクトル
液体クロマトグラム検出波長：508 nm

とも他に小さなスポットが認められた．試料14の小さなスポットは食用赤色2号及び同102号とRf.及び色調が一致した．

HPLCでは2試料ともRt. 27.2分に主ピークが認められ，このピークは最大吸収波長504 nmであった．試料14ではRt. 15.3及び18.6分にも小さなピークがあり，これらのピークは食用赤色2号及び同102号とRt.及び吸収スペクトルがよく一致した．

以上により試料13及び14は副色素が多いが，ファストレッドEの標準品として使用できると考える．

キノリンエロー（試料15～21）

PCでは試料によりスポットの数が1～4個のものまであった．主なスポットは展開溶媒①ではRf. 0.50と0.35で次にRf. 0.20，0.40であり，展開溶媒②ではRf. 0.65と0.35で次に0.20であった．どのスポットもやや緑色を帯びた黄色で蛍光は認められなかった．

HPLCの結果を図5に示したが，試料15，16，18及び20はRt. 27.8分と28.3分にピークが認められた．試料19及び21はRt. 21.4分，22.8分に大きなピークがあり27.8分，28.3分にも小さなピークがあった．試料17はRt. 21.6，23.4，25.3，27.9，28.4及び28.6分と6本の大きなピークが認められた．これらのピークは図5に示した吸収スペクトルのようにいずれも414 nm及び432 nm付近に2つの極大吸収波長を持っていた．

キノリンエローは2-(2-キノリル)インダン-1，3ジオンのモノ～トリ体スルホン酸ナトリウム混合物[2),6)]であるため，PC及びHPLCにおいて複数のスポット及びピークが検出されたと考える．

以上のことから，試料15～21はキノリンエローの標準品として使用可能と考える．

他にQuinoline Yellow（ALDRICH 23，413-3）及びQuinoline Yellow（SIGMA Q-1251）を購入したが，前者はspirit sol.の表示があり，後者はC.I. 4700の表示があってともに水溶性ではなかった．

なお，キノリンエローの分析の際は成分の異なる複数の製品を標準品として用いる必要がある．

我々の検査では，イギリス産のキャンデーからキノリンエローを検出しているが，そのパターンは試料19のCHROMA社のものと類似していた．

キシレンエロー（試料22～24）

PCでは3試料とも展開溶媒①及び②で黄色の単一スポットを認めた．またHPLCでも3試料の主ピークはRt. 25.5分で，その最大吸収波長は404 nmであった．

PC及びHPLCにより試料22～24はキシレンエローの標準品として適当と考える．

オレンジG（試料25～28）

PCにおいて試料25～28は蜜柑色のスポットであったが，試料27だけはRf. 0.15にも黄色の小さなスポットが

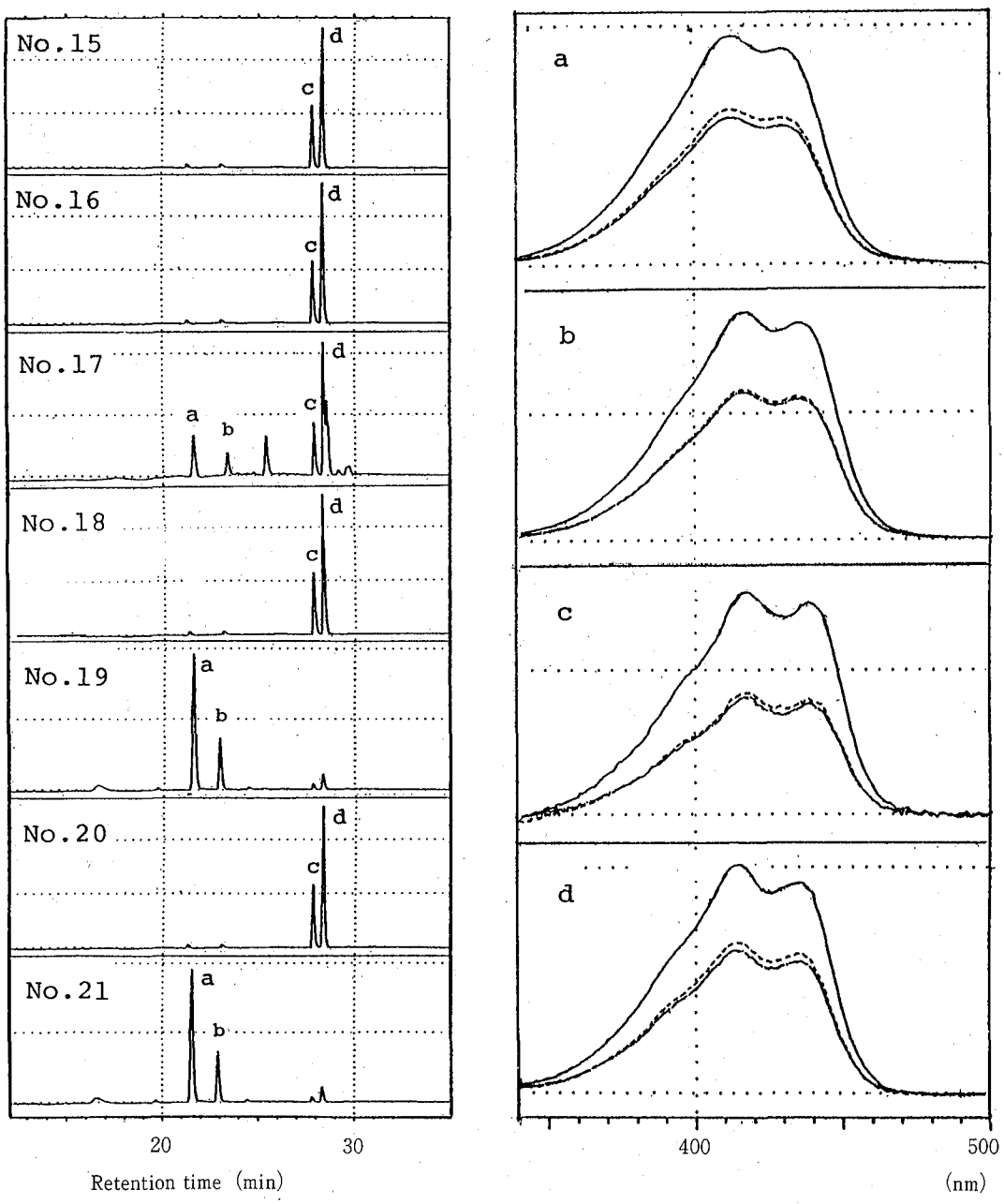


図5．キノリンエローの液体クロマトグラム及び吸収スペクトル
液体クロマトグラム検出波長：414 nm

あり，これには同色の蛍光がみられた．

HPLCでは試料25，26及び28はRt. 22.5分に主ピークがあり，試料27は主ピークがRt. 22.5分にまた小さなピークがRt. 23.2分に認められた．Rt. 22.5分のピークは474 nmに最大吸収波長を持っていたが，Rt. 23.2分のピークは最大吸収波長465 nmであった．

以上のことから，試料25～28は標準品として使用できると考える。

オレンジⅡ(試料29～34)

PCでは試料29～34はいずれも橙色の単一スポットであった．またHPLCではRt. 29.6分に主ピークがあり，その最大吸収波長は485nmであった．

PC及びHPLCより試料29～34はオレンジⅡの標準品として適していると考える.

アズールブルーVX(試料35～39)

PCでは試料35, 36及び37は青色の単一スポットで, 試料38は主スポットの下部に藤色のスポット, 試料39は主スポットの上部と下部に少し青色のスポットが認められた.

HPLCの結果を図6に示したが, 試料35～39の主ピークはRt. 28.4分であり, その最大吸収波長は638 nmであった.

FAB/MSの負イオンモードによる測定結果では, 試料35, 36, 37, 38, 39及び43はC.I.42045のM-Na, m/Z543.1, また試料40, 41及び42はC.I.42051のM-1/2Ca, m/Z559.7の親イオンが検出された. 図7にその代表的なもののマススペクトルを示した.

PC, HPLC及びFAB/MSにより試料35～39はアズールブルーVXと考える.

なお, 5試料ともPatent BlueまたはPatent Blue Vという商品名でありC.I.No.で確認しないかぎりパテントブルーV(C.I.42051)と誤認する可能性がある. 日本では昭和34年12月まで食用青色101号として許可されていた関係から, 日本のメーカーの製品はいずれもアズールブルーVXが現在も販売されているものと考えられる. 現在, アズールブルーという表示は衛生試験法のみであり, 他に相当する名称はなく, いずれもPaten Blue, Blue VRSあるいはAcid Blue 1で表示されており, その名の由来はどこにあるのか不明である. EC等では次に示すパテントブルーVが許可されている.

パテントブルーV (試料40～43)

PCにおいて4試料とも同一色調の青色であったが, 試料40, 41及び42は展開溶媒①ではアズールブルーVXとほぼ同じRf.であった. 展開溶媒②ではRf.0.55でありアズールブルーVXと分離した. 試料43は展開溶媒①及び②でアズールブルーVXと同じRf.であった.

HPLCでは図8のように試料40～42の主ピークのRt.は28.9分でその最大吸収波長は635 nmであり, アズールブルーVXと分離した. 試料43の主ピークはRt.28.3

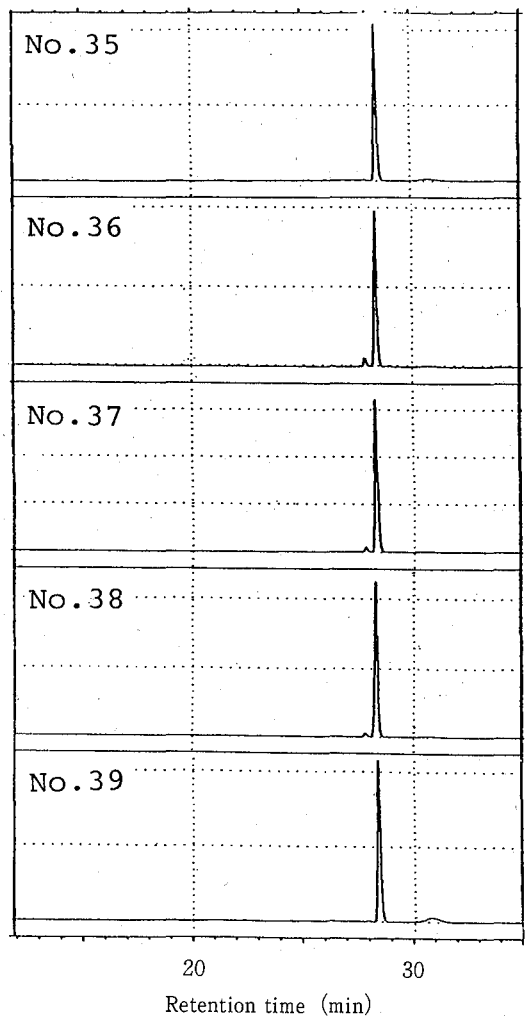


図6. アズールブルーVXの液体クロマトグラム
検出波長：635 nm

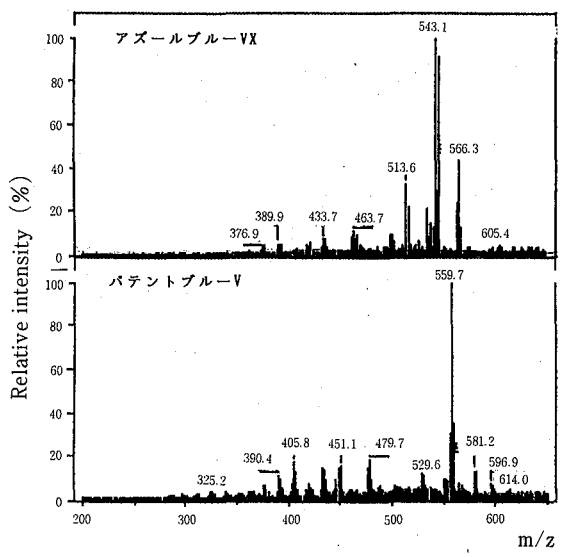


図7. アズールブルーVX及びパテントブルーVのマススペクトル

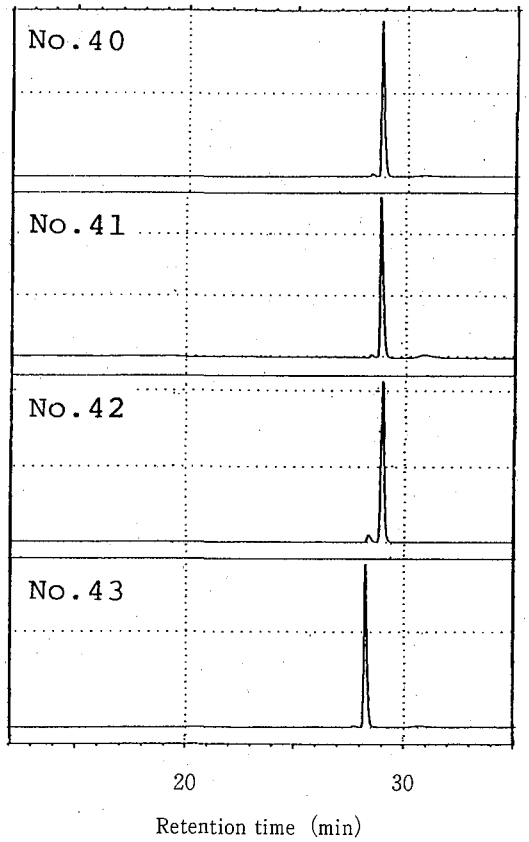


図8．パテントブルーVの液体クロマトグラム
検出波長：635 nm

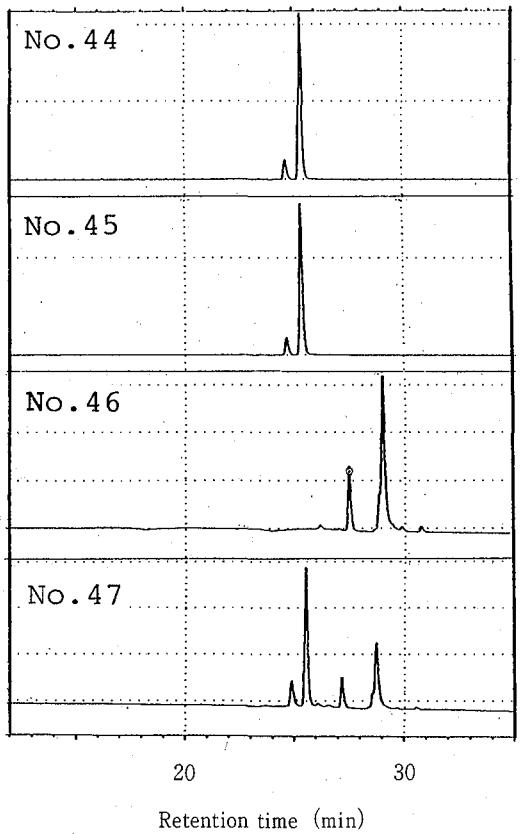


図9．グリーンSの液体クロマトグラム
検出波長：636 nm

分でその最大吸収は638 nm付近にあった．

PC，HPLC及びFAB/MSにより試料40～42はパテントブルーVであり，試料43はPatent Blue (Azure Blue V) C.I.42051の表示があったが，アズールブルーVX (C.I.42045)であると考える．

試料43は数年前に購入した製品であるが，古いものを使用する場合にはパテントブルーVかアズールブルーVXかを確認することが必要である．

我々の検査事例では，スイス産キャンデーからパテントブルーV(C.I.42051)を検出している．

グリーンS（試料44～47）

PCにおいて展開溶媒②で試料44及び45はRf.0.40の青色単一スポット，試料46はRf.0.65の緑色スポット，試料47は両方のスポットが認められた．また試料46及び47のRf.0.65のスポットはアンモニア蒸気で退色した．

HPLCの結果を図9に示した．試料44及び45では主ピークRt.25.4分の他にRt.24.7分に，試料46では主ピークRt.29.0分の他にRt.27.4分に，試料47では主ピークRt.25.4分の他にRt.24.9，27.2及び28.7分にピークがみられた．そのなかでRt.25.4分のピークだけが最大吸収波長636nmを示し，他のピークはいずれも長波長側にシフトしていた．

以上の結果から試料44及び45はグリーンSの標準品として使用できるが，試料46は別のものであり，また試料47は混合物であると思われ検討が必要である．

ブリリアントミリンググリーン（試料48，49）

PCでは試料48及び49は展開溶媒①，②ともRf.0.70で青緑色のスポットであるが，試料49は主スポットの上部に微量の副色素が認められた．展開溶媒③でも確認のため展開を行ったところ，両者のスポットは展開中は退色し風乾後は復色し，またRf.も一致した．

HPLCでも両者の主ピークはRt.28.5分で641 nmに最大吸収波長を持ったいた．

以上により試料48及び49はブリリアントミリンググ

リーンの標準品として適当と考える.

他に Brilliantgreen (FLUKA 16020), Brillantgrün (CHROMA 1B 285) 及び Brilliant Green (和光純薬 021-02352)も検討したが3試料ともC.I.42040の表示があり塩基性色素であった.

ベンジルバイオレット4B (試料50～52)

PCにおいて3試料とも展開溶媒①でRf.0.65に紫色の単一スポット, 展開溶媒②でRf.0.80に紫色のスポットとRf.0.90に同色の副色素を認めた. この副色素はピンク色の蛍光が見られた.

HPLCでは3試料の主ピークはRt.30.2分で, その最大吸収波長は約590 nmであった. しかし衛生試験法記載の最大吸収波長と異なることから, 3試料の0.02N酢酸アンモニウム溶液の可視部吸収スペクトルを測定したところ, 最大吸収波長は546 nmでよく一致した. HPLCの主ピークの最大吸収波長が590 nm付近であったのは, 溶媒により長波長側にシフトしたためと考える.

以上の結果から試料50～52はベンジルバイオレット4Bの標準品として適していると考える.

ブラックPN (試料53～55)

PCでは3試料とも展開溶媒①でRf.0.20, 展開溶媒②でRf.0.15に紺色の単一スポットが認められた.

HPLCではRt.23.8分に主ピークを認めたが, そのピークの最大吸収波長は574 nmであり, 吸収スペクトルはよく一致した.

PC及びHPLCにより試料53～55はブラックPNの標準品として適当と考える.

我々の検査では, デンマーク産のランプフィッシュキャビアからブラックPNを検出している.

ブラウンHT (試料56, 57)

PCにおいて展開溶媒①では試料56はRf.0.05, 0.30, 0.55に, 試料57はRf.0.05, 0.30, 0.65に茶色のスポットが見られるが全体にテーリングしていた. 展開溶媒②では試料56はRf.0.05からRf.0.25までテーリング, 試料57はRf.0.05, 0.15, 0.30にスポットが見られるが全体にテーリングがあり, 両試料のパターンはやや異なった.

HPLCでは試料56は主ピークがRt.28.6分に, 試料57では主ピークRt.28.6及び28.8分の他にRt.29.4, 30.0及び30.4分に小さなピークがあった. これらのピークはRt.20～42分までのベースラインのなだらかな上昇の上にみられ, いずれのピークも466 nmに最大吸収波長があった.

以上の結果から, 試料56及び57は複合物とも考えられ更に検討する必要がある.

まとめ

食品中の指定外着色料分析に用いる標準品として適している製品をみつける目的で市販着色料16種, 57製品の検討を行った.

1. 今回検討した製品のうちアゾルビン, レッド2G, ポンソー6R, ファストレッドE, キシレンエロー, オレンジG, オレンジⅡ, ブリリアントミリンググリーン, ベンジルバイオレット4B及びブラックPNは, 特に問題となる製品はなく標準品として使用できると考える.

2. ポンソー3Rでは, 東京化成のC.I.16155(P 591)は他のポンソー3Rとは異なった性状を示した.

3. キノリンエローは単品ではなく混合物であり, 製品によりその構成成分が異なっていた. 従って分析の際は成分の異なる複数の製品を用いる必要がある.

4. アズールブルーVXはどの製品もPaten Blue又はPatent Blue Vの商品名でありパテントブルーV(C.I.42051)と誤認する可能性がある.

5. パテントブルーVはPCでは展開溶媒②, HPLC及びFAB/MSでアズールブルーVXと分離した.

日本ではアズールブルーVXが食用青色101号として許可されていた関係から, パテントブルーVと混乱している製品もあり, 古い物の場合には確認した後使用する必要がある.

6. グリーンSでは, Kiton Green S (CHROMA 1B 197)はグリーンSと異なり, Lissamingrün B(CHROMA 1B 199)はグリーンSと他の混合物である.

7. 市販の着色料を購入して標準品として使用する際は, C.I.No., 色調, PC, 可視部吸収スペクトル及びHPLC等で確認のうえ使用する必要がある. また商品名が種々でC.I.No.のない製品は特に注意が必要と思われる.

文献

1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 351-374, 1980, 金原出版株式会社, 東京.
2) Joint FAO/WHO expert committee on food aditives ; Specifications for identity and purity of food colors : *FAO Food and Nutrition Paper*, **31**, 117-119, 1984.
3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, 500-547, 1990, 金原出版株式会社, 東京.
4) Chem-Bank ; RTECS, Silver Platter, CD-ROM.
5) The Society of Dyers and Colourists : *Colour Index*, Third Edition.
6) WHO:*Technical Report Series*, **710**, 18, 1984.

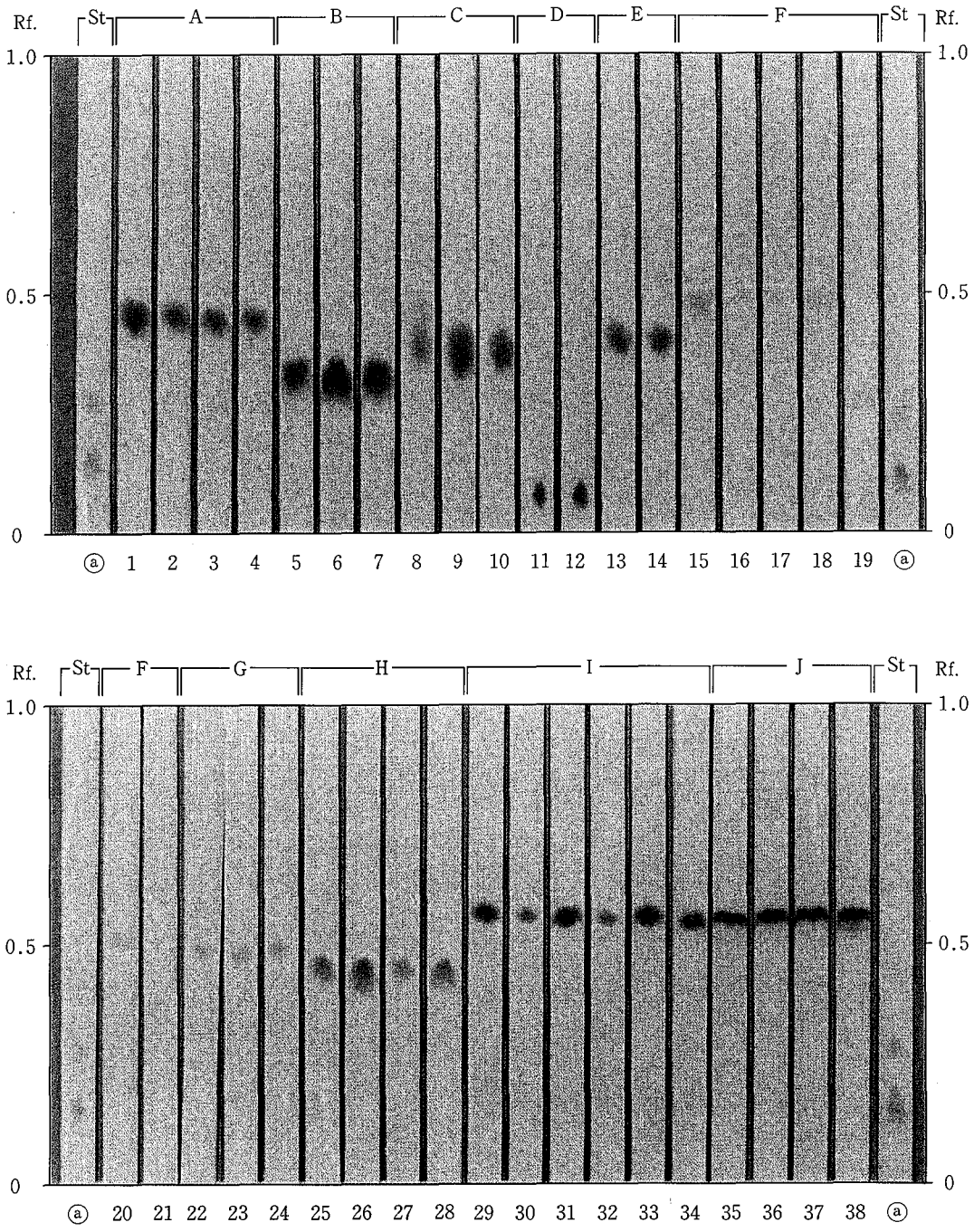


図１．展開溶媒①*による指定外着色料のペーパークロマトグラム

Ａ：アゾルビン，Ｂ：レッド２Ｇ，Ｃ：ポンソー３Ｒ，Ｄ：ポンソー６Ｒ，Ｅ：ファストレッドＥ，
Ｆ：キノリンエロー，Ｇ：キシレンエロー，Ｈ：オレンジＧ，Ｉ：オレンジⅡ，Ｊ：アズールブルーＶＸ，
Ｋ：パテントブルーＶ，Ｌ：グリーンＳ，Ｍ：ブリリアントミリンググリーン，
Ｎ：ベンジルバイオレット４Ｂ，Ｏ：ブラックＰＮ，Ｐ：ブラウンＨＴ，Ｓｔ：基準色素ⓐ
＊展開溶媒①：アセトン・イソアミルアルコール・水（６：５：５）

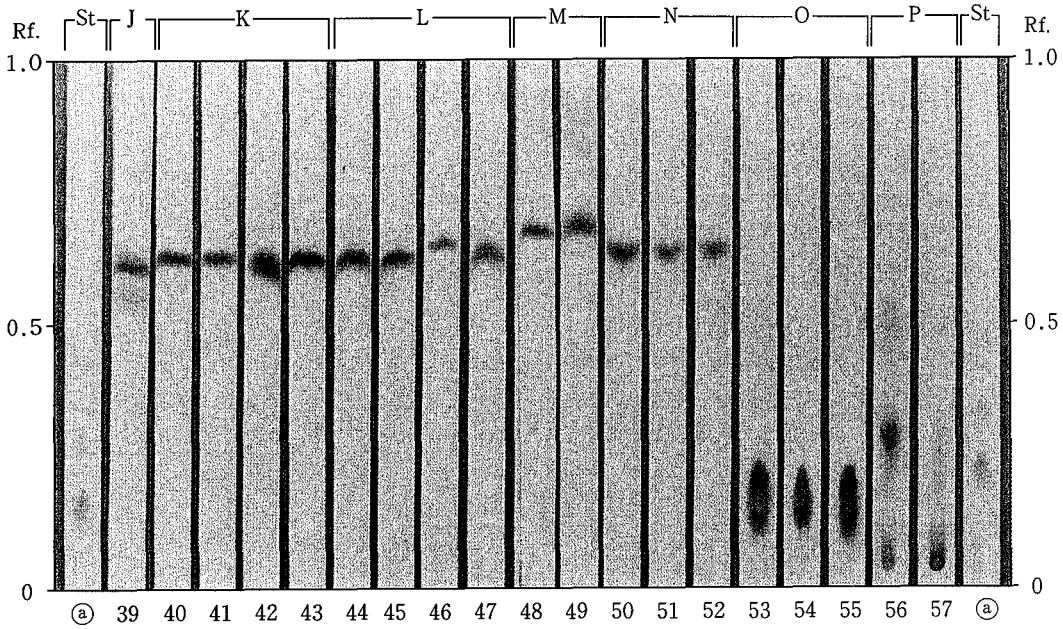


図１．展開溶媒①*による指定外着色料のペーパークロマトグラム

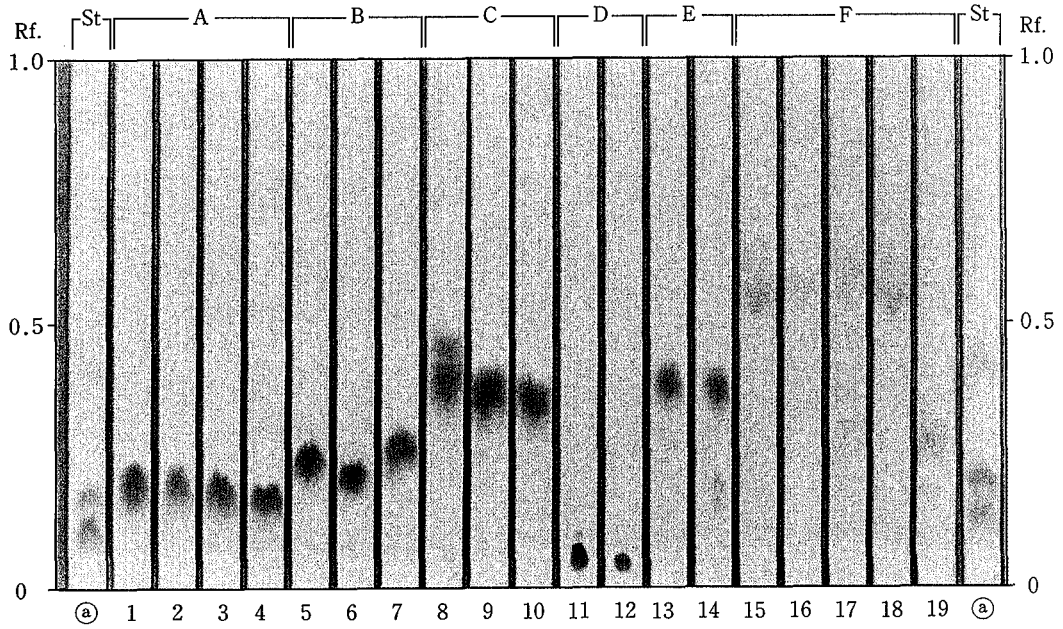


図２．展開溶媒②**による指定外着色料のペーパークロマトグラム

A：アゾルビン，B：レッド２G，C：ポンソー３R，D：ポンソー６R，E：ファストレッドE，
F：キノリンエロー，G：キシレンエロー，H：オレンジG，I：オレンジⅡ，J：アズールブルーVX，
K：パテントブルーV，L：グリーンS，M：ブリリアントミリンググリーン，
N：ベンジルバイオレット４B，O：ブラックPN，P：ブラウンHT，St：基準色素ⓐ
＊展開溶媒①：アセトン・イソアミルアルコール・水（６：５：５）
＊＊展開溶媒②：n-ブタノール・エタノール・１％アンモニア水（６：２：３）

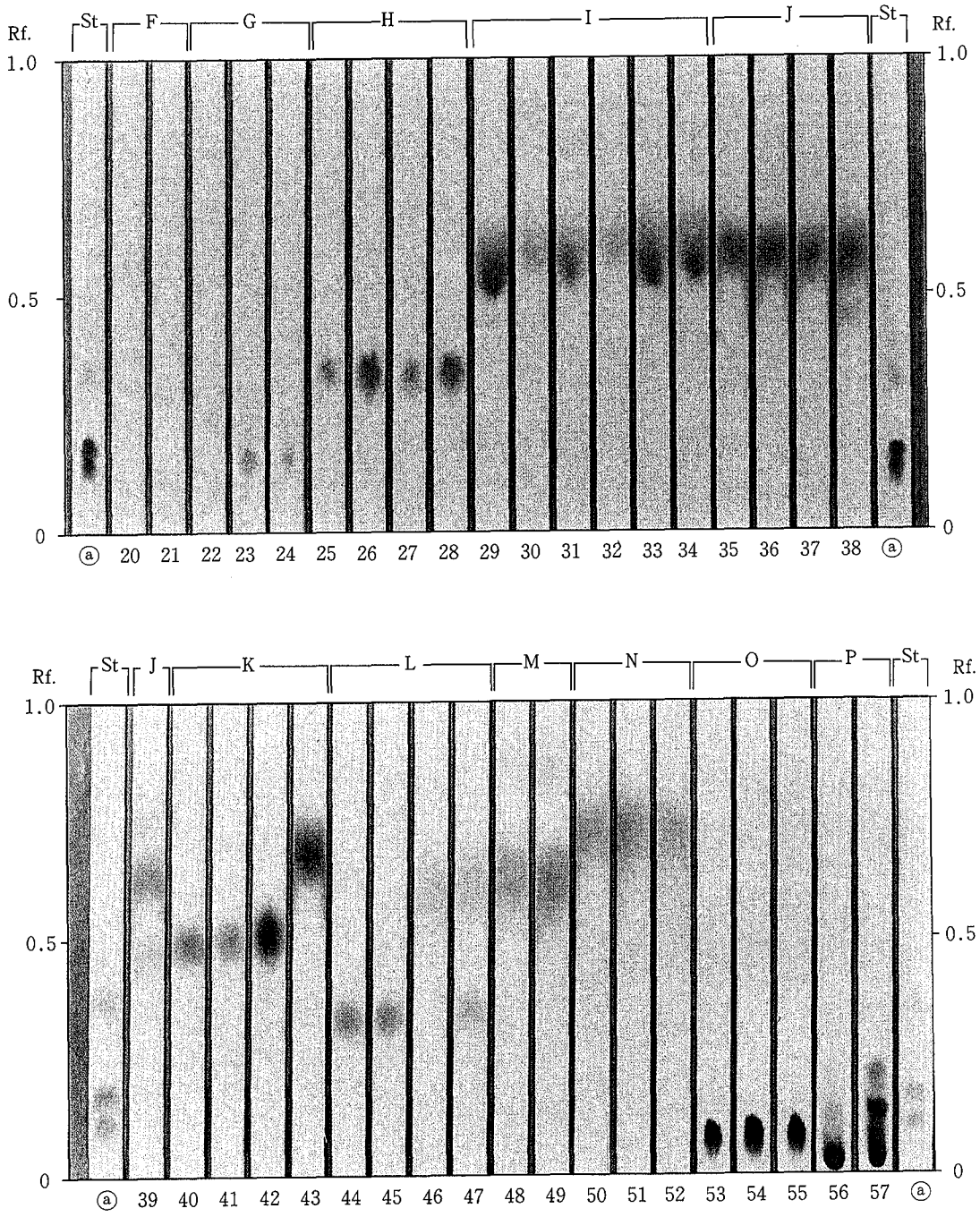


図２．展開溶媒②**による指定外着色料のペーパークロマトグラム

Ａ：アゾルビン，Ｂ：レッド２Ｇ，Ｃ：ポンソー３Ｒ，Ｄ：ポンソー６Ｒ，Ｅ：ファストレッドＥ，
Ｆ：キノリンエロー，Ｇ：キシレンエロー，Ｈ：オレンジＧ，Ｉ：オレンジⅡ，Ｊ：アズールブルーＶＸ，
Ｋ：パテントブルーＶ，Ｌ：グリーンＳ，Ｍ：ブリリアントミリンググリーン，
Ｎ：ベンジルバイオレット４Ｂ，Ｏ：ブラックＰＮ，Ｐ：ブラウンＨＴ，Ｓｔ：基準色素ⓐ
＊＊展開溶媒②：ｎ-ブタノール・エタノール・１％アンモニア水（６：２：３）

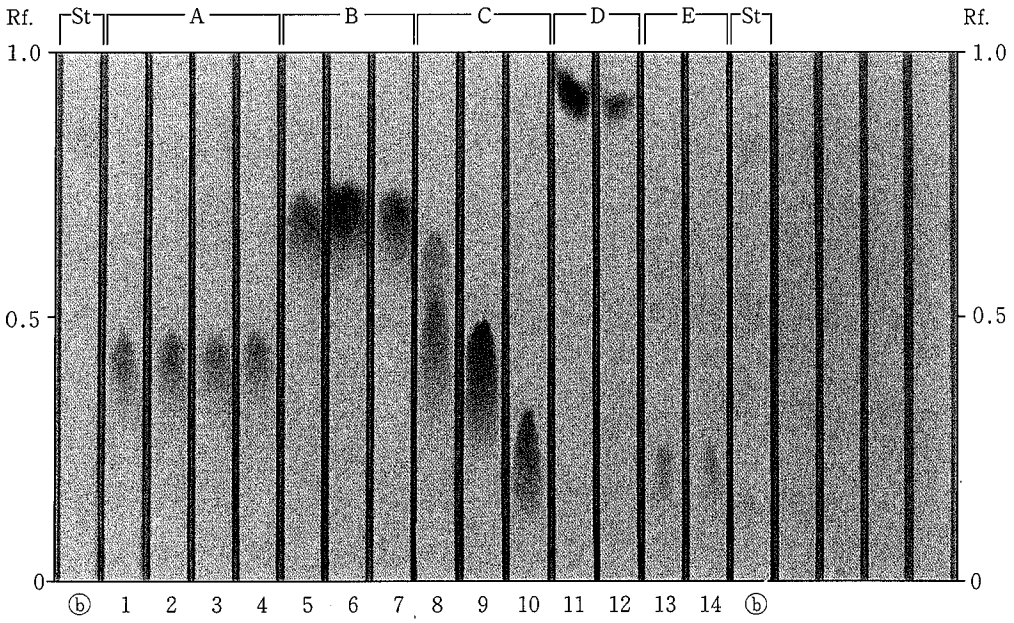


図３．展開溶媒③***による指定外着色料のペーパークロマトグラム

Ａ：アゾルビン，Ｂ：レッド２Ｇ，Ｃ：ポンソー３Ｒ，Ｄ：ポンソー６Ｒ，Ｅ：ファストレッドＥ，
Ｓｔ：基準色素ⓑ
＊＊＊展開溶媒③：25％エタノール・５％アンモニア水（１：１）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 111-117, 1992

輸入食品中の天然色素の使用実態調査

荻原　勉*, 天川映子*, 野沢竹志*
大西和夫*, 加納いつ**, 山岸達典*

Survey of Natural Dyes in Imported Foods

TSUTOMU OGIWARA*, EIKO AMAKAWA*, TAKESHI NOZAWA*,
KAZUO OHNISHI*, ITSU KANO** and TATSUNORI YAMAGISHI*

Keywords：水溶性天然色素 water soluble natural dyes, 油溶性天然色素 water insoluble natural dyes, 輸入食品 imported foods

緒　言

近年，我が国では，国民の食生活水準の向上やグルメ指向とあいまって，多種多様な食品が多くの国々から輸入されている．輸入件数についていえば，1986年～1990年の間に年平均約13％の増加がみられ[1]．今後とも，さらに増加することが予測される．

しかし，これらの輸入食品について使用されている食品添加物の使用実態については，現在，ほとんど明らかにされていない．

著者らは，これまでに，天然色素に関する分析法を作成し[2-5]，この分析法を利用して，国内産[6]の食品を対象とする天然色素の使用実態調査を実施した．その結果，多種類の食品に，天然色素が広く使用されていることがわかった．そこで，今回は輸入食品中の天然色素の使用実態について調査を行ったので，その結果を報告する．

実験方法

1．試料

試料は平成元年4月から平成4年3月の間に都内において市販されていた輸入加工食品で，外観上何らかの色が認められ，かつ，主として合成着色料添加等の表示のない合計276件を対象とした．試料は便宜上次に示す5群に大別して実験に供した．

1）菓子	194検体
2）清涼飲料水	21検体
3）食肉・魚介及び乳製品	12検体
4）穀類・豆類・野菜及び果実加工品	29検体
5）調味料及び香辛料	20検体

2．試薬及び装置

赤キャベツ色素：三栄化学工業㈱製
銅クロロフィル：日本葉緑素㈱製
他は前報[2-5]に従った．

なお，リボフラビンはわが国では化学的合成品とみなされ，指定添加物に数えられているが，欧米では天然物扱いで着色料として使用されることが多いので本調査においても対象の一つとした．

また，銅クロロフィルは天然色素ではないが，クロロフィルの誘導体であるので調査対象に加えた．

3．分析方法

試料の調製は前報[2-5]に準じた．すなわち，試料の着色の程度により，5～25gを秤取し，液体試料はそのまま，固体試料は細切し，水または水・エタノール（1：1）混液50 ml を加えてホモジナイズした後，1N酢酸及び0.5Nアンモニア水を用いて，pH 6～7に調整した．さらにエーテル50 ml を加えて約10分間振とう後，有機層及び水層をそれぞれ分取し，有機層は高速液体クロマトグラフィー[4-5]で，水層は薄層クロマトグラフィー[2]で分析した．また，銅クロロフィルについては井上ら[7]の方法に準じた．

なお，アントシアン色素は原料となる植物によってクロマトグラムのパターンが異なるため，生産量[8]の多いベリー色素，赤キャベツ色素，ムラサキトウモロコシ色素及びブドウ果汁色素の4種の色素を標準色素として選

*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

び，食品中のアントシアン色素の確認をした．

結果及び考察

1．菓子

菓子の検査結果を表1に示した．

赤色のあめ25検体を検査したところ23件からアントシアン色素が検出された．このうち，1件はウコン色素と併用されていた．他にビートレッドが2件あった．あめではアントシアン色素の検出率が高かった．一般に，アントシアン色素は食品の加工時及び貯蔵中に変色しやすい不安定な色素であるが，酸性では美しく，安定な赤色を呈する．従って，酸性であるあめには適した色素であると考える．

橙色のあめ20検体中アナトー色素が6件，β-カロチン及びパプリカ色素がそれぞれ5件ずつ検出された．い

表1．菓子中の天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
あめ	赤	25	アントシアン色素（22），ビートレッド（2），アントシアン色素＋ウコン色素（1）
	橙	20	β-カロチン（5），パプリカ色素（5），アナトー色素（5），コチニール色素（1） ウコン色素（2），アントシアン色素＋ウコン色素（1），アナトー色素＋ウコン色素（1）
	黄	24	ウコン色素（17），β-カロチン（5），クチナシ黄色素（1），リボフラビン（1）
	緑	6	β-カロチン＋B 2（2），ウコン色素（2） リボフラビン（1），ウコン色素＋銅クロロフィル（1）
	赤紫	7	アントシアン色素（6），アントシアン色素＋B 2（1）
	桃	3	ビートレッド（3）
ゼリー	赤	7	アントシアン色素（5），コチニール色素（1），ビートレッド（1）
	橙	6	コチニール色素（2），アナトー色素（1），β-カロチン（1） パプリカ色素（1），パプリカ色素＋β-カロチン（1）
	黄	7	ウコン色素（4），クチナシ黄色素（2），ベニバナ黄色素（1）
グミキャンデー	赤	7	アントシアン色素（6），アナトー色素＋コチニール色素（1）
	橙	6	クチナシ黄色素（5），β-カロチン（1）
	黄	2	クチナシ黄色素（1），ウコン色素（1）
	赤紫	1	アントシアン色素（1）
砂糖菓子	赤	2	アントシアン色素（2）
	橙	2	β-カロチン（1），アントシアン色素＋ウコン色素（1）
	黄	4	ウコン色素（4）
	緑	2	ウコン色素（2）
ラムネ菓子	赤	2	アントシアン色素（2）
	橙	1	アントシアン色素＋リボフラビン（1）
	黄	1	リボフラビン（1）
揚げ菓子	橙	4	アナトー色素（1），パプリカ色素（1） アナトー色素＋ウコン色素（1），ウコン色素＋パプリカ色素（1）
	黄	1	ウコン色素（1）
ビスケット及びクッキー	赤	2	アントシアン色素（2）
	橙	1	β-カロチン＋R 3（1）
	黄	2	ベニバナ黄色素（2）
ガム	黄	1	ウコン色素（1）
チョコレート(ジャム入り)	橙	1	アナトー色素（1）
チョコレート	桃	1	コチニール色素（1）

R 3：食用赤色3号，B 2：食用青色2号

ずれの色素も耐熱性にすぐれており[9]，やや赤味を帯びた鮮やかな橙黄色の色素であるため，その性質があめの着色に巧みに利用されたものと推定される．他にウコン色素の使用が4件あり，このうちアントシアン色素またはアナトー色素の併用がそれぞれ1件ずつあった．また，コチニール色素も1件あった．ウコン色素はわずかに蛍光を有する黄色色素であり，酸性～中性では色調の変化はないが，アルカリ性では赤褐色[9]に変わる．しかし，酸性で橙色を呈しているあめが2検体あった．これは，ウコン色素に鉄塩を添加すると酸性溶液中でも橙色を呈することから，鉄塩等の色調安定剤[9]を併用していることが考えられる．

輸入されたあめのうち橙色のものからは，前述のごとく，アナトー色素，β-カロチンなど油溶性色素の使用が多かった．しかし，国内産[6]のあめでは水溶性色素のコチニール色素及びラック色素が大半を占めており，パプリカ色素の使用例は少ない．このように輸入食品と国内産で色素の使われ方に違いがみられた．

黄色のあめ24検体中17件からウコン色素が検出され，β-カロチンは5検体から検出された．他にクチナシ黄色素及びリボフラビンが検出されたものがそれぞれ1件あった．β-カロチンはウコン色素の次に多く用いられていたが，この色素は熱に対し安定であり，pHによる色調の変化もない[9]．しかし，光に対してはあまり安定でないが，酸味を出すため抗酸化作用のあるビタミンCなどを添加した比較的酸性の強いあめには，適した色素と考えられる．

緑色のあめ6検体から，ウコン色素が3件検出され，そのうち，1件は銅クロロフィルとの併用であった．このあめは輸入食品の見本市で入手したもので，わが国の食品衛生法で使用違反のものであった．また，β-カロチンに食用青色2号が併用されているものが2件あった．通常，緑色のあめには，その色調からクロロフィル系統のものが使用されていると思われたが，実際には，ウコン色素の使用が多く認められた．ウコン色素は酸性で，透明感のあるドロップなどに用いた場合，独特な青白い蛍光を発することがあるといわれている[9]．従って，この青白色の蛍光と黄色とが混じりあうことによって緑色にみえるものと推察される．天然色素の中で青色系統の色素として，クロロフィルやクチナシ青色素などあるが，他の色調の色素に比べ種類が少なく，しかも，これらの色素は比較的不安定でpHによる色調の変化や光分解[9]が生じやすい．従って，これらの色素を用いて緑色に着色するのが難しい場合が多いので，黄色のβ-カロチンと青色の酸性タール色素を併用して緑色に着色したと考えられる．

赤紫色のあめ7検体は，そのいずれからもアントシアン色素が検出された．おそらく，ムラサキトウモロコシ色素のような紫色の強い[10]アントシアン色素を用いたものと推察される．

桃色のあめ3検体のすべてからビートレッドが検出された．これらは，いずれもクリーム状の部分が多い試料であった．アントシアン色素はタンパク質によって紫色～灰色[9]に変色するのでタンパク質を多く含む食品には使用できない．そこで，タンパク質により変色することのない[9]本色素を利用したものと考える．

ゼリー20検体中5件からアントシアン色素が，4件からウコン色素が検出された．他に，コチニール色素が3件，クチナシ黄色素2件の使用が認められた．また，国内産のものには見られない使用例としてビートレッドの使用が1件あった．ゼリーは色調と鮮明度が要求されるので，比較的，透明感があり安定なこれらの色素が選ばれたものと考える．

グミキャンディは，最近，市場に多く出回っているゼリーの一種で，食感がゴム様であり，16検体のうち赤色の7検体からアントシアン色素が，6検体からクチナシ黄色素が検出された．グミキャンディーはゼリーと同様に透明な色調を保つことが重要であるため，食用黄色4号と似た色調[11]をもち，ゼラチンを多量に含有するためタンパク質に染着性のよいクチナシ黄色素が選択されたものと思われる．

砂糖菓子では，10検体中7件からウコン色素が検出された．赤色ではアントシアン色素が，橙色ではβ-カロチンの使用がそれぞれ認められ．あめの場合と同様の色素が用いられていた．また，ラムネ菓子には4検体中3件にアントシアン色素が，2件にリボフラビンが使用されていた．

揚げ菓子5検体から，アナトー色素，ウコン色素及びパプリカ色素がそれぞれ2件ずつ検出された．このうち，1件はアナトー色素とウコン色素，他の1件はウコン色素とパプリカ色素との併用であった．これらの色素はいずれも油溶性色素であり，熱に対し比較的安定である[9]ため用いられたものと考えられる．また，パプリカ色素を検出した試料には，辛味をつけるためトウガラシ粉がふりかけられていたことから，検出されたパプリカ色素は着色料だけでなく，トウガラシ由来のものを含むと考えられる．

ビスケットやチョコレートからもアントシアン色素や

コチニール色素が検出されたが，これらはいずれも本体に付着しているクリームあるいはジャム由来であった．

2．清涼飲料水

清涼飲料水15検体についての検査結果を表2に示した．

オレンジ飲料5検体中いずれからもβ-カロチンが検出され，このうち3件はパプリカ色素，リボフラビンあるいは酸性タール色素との併用であった．β-カロチンは原料のかんきつ類由来も十分考えられるが，飲料をやや混濁させ果汁らしさを出すため，乳化剤等と併用したとも考えられる．

オレンジ飲料の色調は橙色～黄色であり，液性は弱酸性である．国内産では[6]酸性で橙色を呈する水溶性のコチニール色素及びラック色素が多用されていたが，今回の輸入品の結果ではpH値によって色調の変化が少ない油溶性色素の使用が多かった．更にβ-カロチンにリボフラビンを添加することで，着色及び栄養強化の両方を目的としているものや，あるいは橙色の酸性タール色素を併用し，より赤味の強い色調を出しているものもみられた．

グレープ飲料5検体からはアントシアン色素が検出された．これはブドウ由来かあるいはブドウ果皮抽出物を添加したかいずれかであると考える．

イチゴ飲料は4検体のすべてからアントシアン色素が検出され，そのうち1件はビートレッドと併用であった．

バナナ飲料1件には，酸性では比較的安定[12]で，かつ色調の鮮やかなリボフラビンの使用が認められた．

3．食肉・魚介及び乳製品

食肉・魚介及び乳製品についての検査結果を表3に示した．

検出された色素はいずれも油溶性色素であった．ニシンのトマトソース煮からパプリカ色素を検出した．トマトソースの赤色はおもにトマト由来のリコピンによるものであるが，このリコピンの色を補うために，パプリカ色素を添加していると考える．

チーズ8検体中5件からβ-カロチンを検出した．また，アナトー色素が4件，パプリカ色素1件検出された．前報[6]で述べたバターの場合と同様に，チーズの色調は乳牛の飼料中のカロチノイド量の季節的変動によって左右され，一定しない[13]．従って，色調の補色を目的としてこれらの色素がチーズへ添加されていると推察される．

4．穀類・豆類・野菜及び果実加工品

穀類・豆類・野菜及び果実加工品についての検査結果を表4に示した．パスタ3検体中赤色のものからビートレッドが検出された．橙色のものにはアナトー色素とクチナシ黄色素が併用されていた．黄色ではアナトー色素の使用が認められた．

パスタは沸騰水中で加熱した後に喫食されるため，用いる色素には耐熱性を有することが要求される．従って，前述の揚げ菓子と同様に，熱に対して安定であるアナトー色素はパスタには適した色素であると考えられる．一方，赤色のパスタには熱に不安定なビートレッドが使

表2．清涼飲料水中の天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
オレンジ飲料	橙	5	β-カロチン（2），β-カロチン＋パプリカ色素（1）
			β-カロチン＋リボフラビン（1），β-カロチン＋Y5（1）
グレープ飲料	赤	5	アントシアン色素（5）
イチゴ飲料	赤	3	アントシアン色素（3）
	桃	1	アントシアン色素＋ビートレッド（1）
バナナ飲料	黄	1	リボフラビン（1）

Y5：食用黄色5号

表3．食肉・魚介及び乳製品中の天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
ニシンのトマトソース煮	橙	1	パプリカ色素（1）
プロセスチーズ	橙	1	β-カロチン＋パプリカ色素（1）
	黄	3	β-カロチン（2），アナトー色素（1）
ナチュラルチーズ	橙	3	アナトー色素（2），アナトー色素＋β-カロチン（1）
	黄	1	β-カロチン（1）

用されていたが，このような場合は加熱による分解を防ぎ美しい赤色を保持するために，アスコルビン酸やシステインなどの色調安定剤[9]を添加していると思われる．

赤キャベツ及びブルーベリーなど野菜・果実漬物12検体中11件からアントシアン色素が検出された．これは，原料由来かあるいはムラサキトウモロコシ色素などのアントシアン色素を添加したかいずれかであると考える．

5．調味料及び香辛料

調味料及び香辛料の検査結果を表5に示した．ラズベリーピューレなどの野菜・果実ソースからアントシアン色素，β-カロチンが検出された．これはおそらく原料由来の色素と考えられる．しかし，ソース類は原料を蒸煮し濃縮した後，香辛料などを加えて作られるため製造に際して加熱工程が入るので，原料由来の色素のみでは十分な色調が得られないこともある．そこでカロチノイド色素やアントシアン色素を添加した可能性もある．

チーズ及び牛肉を主原料としたソース5検体中2件からパプリカ色素が検出された．これは着色と辛味の両方を目的として加えられたトウガラシ抽出物によるものと考える．

6．食品群別による天然色素の検出状況

各食品群ごとに検出された色素をまとめて表6に示した．276検体について検査した結果202検体から10種類の総計219の色素が検出された．検出検体数と検出色素数の差は，2種の色素が1検体中で検出されていたことを示すものである．

菓子では，10種の色素が194検体中148検体に検出された．検出色素数において，水溶性色素と油溶性色素を比べると，水溶性色素の80件にたいし，油溶性色素77件でほぼ等しかった．また，水溶性色素ではアントシアン色素が52件と際だって多く，次いでクチナシ黄色素が9件であった．油溶性色素の場合もウコン色素が41件と多く，つぎのβ-カロチン17件とは大差をなしていた．しかし，国内産[6]のものについての調査結果では水溶性色素の検出頻度が油溶性色素より高く，コチニール色素が一番多く検出され，ラック色素，ベニバナ黄色素，アントシアン色素の順である．今回の輸入食品についての結果からは，油溶性色素が予想外に多く使われていることがわかった．更に，検出頻度もアントシアン色素とウコン色素が他の色素に比べて著しく高く，この点においても国内産のものとも差がみられた．食肉・魚介及び乳製品では，β-カロチン，アナトー色素及びパプリカ色素の3種類の油溶性色素のみが検出され，各食品群により，多用されている色素に特徴がみられた．

表4．穀類・豆類・野菜及び果実加工品中の天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
パスタ等穀類加工品	赤	1	ビートレッド（1）
	橙	1	アナトー色素＋クチナシ黄色素（1）
	黄	1	アナトー色素（1）
赤キャベツ等野菜漬物	赤	3	アントシアン色素（3）
	橙	1	パプリカ色素（1）
	赤紫	1	アントシアン色素（1）
ブルーベリー等果実のシロップ漬	赤	7	アントシアン色素（7）
その他の野菜果実加工品	赤	1	アントシアン色素（1）
	橙	2	β-カロチン（1），パプリカ色素（1）

表5．調味料及び香辛料中の天然色素検査結果

検体名	検体の色調	検体数	検出色素（検出検体数）
ラズベリー等の野菜・果実ソース	赤	4	アントシアン色素（4）
	橙	1	β-カロチン（1）
	黄	1	β-カロチン（1）
チーズ・牛肉等入りソース	橙	3	β-カロチン（2），β-カロチン＋パプリカ色素（1）
	黄	2	アナトー色素（1），ウコン色素＋パプリカ色素（1）
その他	橙	1	β-カロチン＋パプリカ色素（1）

表6．食品群別の天然色素の検出状況

食品群	検体数	検出検体数	検出色素数	水溶性天然色素									油溶性天然色素			
				アントシアン色素	コチニール色素	ラック色素	モナスカス色素	ビートレッド	クチナシ黄色素	ベニバナ黄色素	リボフラビン	クチナシ青色素	アナトー色素	ウコン色素	βーカロチン	パプリカ色素
菓子	194	148	157	52	6			6	9	3	4		10	41	17	9
清涼飲料水	21	15	18	9				1			2				5	1
食肉・魚介及び乳製品	12	9	10										4		5	1
穀類・豆類・野菜及び果実加工品	29	18	19	12				1	1				2		1	2
調味料及び香辛料	20	12	15	4									1	1	6	3
計	276	202	219	77	6			8	10	3	6		17	42	34	16

表7．原産国別の天然色素の検出状況

原産国名	検体数	検出検体数	検出色素数	水溶性天然色素									油溶性天然色素			
				アントシアン色素	コチニール色素	ラック色素	モナスカス色素	ビートレッド	クチナシ黄色素	ベニバナ黄色素	リボフラビン	クチナシ青色素	アナトー色素	ウコン色素	βーカロチン	パプリカ色素
アメリカ	53	35	41	11	2			1	4				5	5	8	5
イギリス	52	39	42	17									4	16	5	
ドイツ	35	28	30	14				1	6	1	2			1	4	1
オランダ	30	22	24	5	3			2			4		1	3	3	3
フランス	26	20	21	11									2	2	3	3
スイス	21	16	17	3									1	8	5	
スペイン	12	10	10	1				4					1	3	1	
ベルギー	11	11	11	7						2				1		1
イタリア	9	5	6	1	1								1	1	1	1
フィンランド	7	3	3	2											1	
オーストラリア	6	5	5	1									2	1	1	
デンマーク	3	1	1											1		
タイ	2	1	2												1	1
ポーランド	2	1	1	1												
中国	2	1	1													1
南アフリカ	1	1	1												1	
ニュージーランド	1	1	1	1												
スウェーデン	1	1	1	1												
マレーシア	1	1	1	1												
チリ	1	0														
計	276	202	219	77	6			8	10	3	6		17	42	34	16

食品群全体をみると今回の調査で多く検出された色素は，水溶性色素ではアントシアン色素が多く219件中77件で，ついでクチナシ黄色素10件，ビートレッド8件であった．油溶性色素ではウコン色素が42件，β-カロチン34件，アナトー色素17件，パプリカ色素16件であり，水溶性色素に比べて，個々の色素の検出頻度の差が小さかった．また，国内産[6]で検出されたラック色素，モナスカス色素及びクチナシ青色素は，輸入食品では1件も使用が認められなかった．これは，おそらくモナスカス色素及びクチナシ青色素はわが国特有の天然色素であるため，欧米では使用が少ないものと推察できる．

7．原産国別による天然色素の検出状況

各原産国ごとに検出された色素をまとめて表7に示した．20ケ国276検体について検査した結果19ケ国202検体から10種類の総計219の色素が検出された．

原産国別にみると，アントシアン色素がイギリス，ドイツ及びフランスなど15ケ国と最も多くの国の食品から検出された．ついて，β-カロチンがアメリカ及びイギリスなど12ケ国で，ウコン色素がイギリス及びスイスなど11ケ国，パプリカ色素がアメリカ及びオランダなど8ケ国と油溶性色素が予想外に多くの国で使用されていることがわかった．

また，コチニール色素など，アントシアン色素以外の水溶性色素は，ドイツ，オランダ及びアメリカなど6ケ国で使用されているが，他の色素に比べて使用頻度が低かった．

ま と め

天然色素の添加が予測される輸入食品を対象として，その使用実態調査を行い次の結果を得た．

1．供試食品276検体中202検体からアントシアン色素，ウコン色素，β-カロチン，アナトー色素，パプリカ色素などの10種類の天然色素が検出された．

2．輸入食品を5群に大別し，検出された天然色素の種類を検討した結果，各群により使用状況に特徴がみられた．特に菓子の場合は10種類と多くの色素が使用されており，それらは，単独で使用している例が多かった．食肉・魚介及び乳製品では，3種類の限定された色素が使用され，かつそれらの併用した例も認められた．

3．国内産のものでは水溶性色素のコチニール色素，ラック色素，ベニバナ黄色素などが多用されていたが，輸入品では水溶性色素のアントシアン色素，油溶性色素のウコン色素が多く用いられており，使用状況に差がみられた．

4．添加物として食品に用いられている天然色素は，物理化学的性質も多様である．しかし，それらの性質が食品の着色に巧みに利用されていることがわかった．

5．すでに毒性が報告されているパプリカ色素，クチナシ黄色素等が，今回の調査では，種々の食品に使用されていることがわかった．

今後，消費者の自然食指向や食品加工技術の開発に伴ない，天然色素の種類が更に増加し，より広範囲の食品加工に高頻度で使用されることは予測される．

従って，それらの天然色素の安全性確保のため，その基礎資料として，今後も継続してこれらの色素の食品における使用実態を十分把握しておくことが必要であると考える．

謝辞 試料を提供頂きました白鳥憲行氏はじめとする東京都食品環境指導センターの方々に深謝致します．

文 献

1）食品衛生研究，**41**，8，80-81，1991.
2）荻原 勉，野沢竹志，平田恵子他：食衛誌，**21**，207-213，1980.
3）平田恵子，荻原 勉，天川映子他：同上，**24**，1-6，1983.
4）天川映子，平田恵子，荻原 勉他：分析化学，**33**，586-590，1984.
5）天川映子，荻原 勉，大西和夫他：東京衛研年報，**41**，133-139，1990.
6）荻原 勉，天川映子，平田恵子他：同上，**36**，245-250，1985.
7）Inoue, H., Furuya, K., Watanabe, K., et al: *Analytical Science* **4**, 599-603, 1988.
8）月刊フードケミカル，7，20，1988，㈱食品化学新聞社.
9）谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，582-583，1979，光琳.
10）谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，279，1979，光琳.
11）谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，220，1979，光琳.
12）谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，467，1979，光琳.
13）谷村顕雄，片山 脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，193，1979，光琳.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 118-123, 1992

食品中のβ-アポ-8'-カロチナール及びβ-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル分析法

天川映子*, 荻原勉*, 大西和夫*, 加納いつ**
山岸達典*

Determination of β-apo-8'-Carotenal and Ethyl β-apo-8'-Carotenoate in Foods

EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*, KAZUO OHNISHI*, ITSU KANO**
and TATSUNORI YAMAGISHI*

An analytical method to determine β-apo-8'-carotenal (AL) and ethyl β-apo-8'-carotenoate (ES) in foods was studied using high performance thin layer chromatography (HPTLC) and HPLC.

AL and ES were extracted in diethyl ether from a mixture of sample and ethanol·water (1 : 1). The extract was concentrated by evaporation under reduced pressure at 45°C. The pigment extract was analyzed by TLC using a HPTLC silica gel plate (Merck, Kieselgel 60, 10×10cm) and chloroform as a developing solvent. Samples rich in fat were cleaned up with a SEP-PAK alumina N column to remove fat; i.e., after the pigment extract dissolved in hexane was dehydrated with anhydrous sodium sulfate and applied onto the column, the column was washed with hexane, whereupon the pigment was eluted with 0.1M ammonia/acetone solution. Samples found to contain AL or ES were subjected to analysis by HPLC. The conditions of HPLC analysis were as follows : Column, Unisil QC 18 column ; mobile phase, acetonitrile·methanol·dichloromethane·hexane (55 : 22 : 11.5 : 11.5); detection, 454nm and a photodiode array detector.

Recoveries of AL and ES exogenously added to commercial foods were 90.5－99.5 and 98.0－100.5%, respectively. The minimum detection limit in both cases was 2.0 μg/g. ES was detected in pasta imported from Italy at the level of 3.0 μg/g.

This method is considered to be useful for the rapid and sensitive analysis of AL and ES in foods.

Keywords：β-アポ-8'-カロチナール　β-apo-8'-carotenal, β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル　ethyl β-apo-8'-carotenoate, 食品添加物　food additives, 輸入食品　imported foods

緒　言

β-アポ-8'-カロチナール(ALと略す)は，米国，EC諸国，台湾など多くの国々で橙色の油溶性着色料として清涼飲料水，チーズ，フレンチドレッシングなど広く使用されている．また，β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル(ESと略す)はALの誘導体であり，EC諸国，カナダ，台湾，タイなどで黄色の油溶性着色料として，乳製品，菓子類，油脂類などに用いられている[1-3]．

添加物として使用されているAL及びESはいずれも化学的合成品である．ALは，自然界にもβ-カロチンの代謝産物として柑橘類や野菜などに存在するが，ESは，天然には存在しないといわれている[4]．

わが国では，AL及びESはいずれも食品添加物として許可されていないが，ESについては鶏卵，ブロイラーの皮膚，金魚や緋鯉などの色調を良くするための飼料用添加剤として利用されている[3]．

＊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

カロチノイド系色素の分析法に関する研究は，主に植物成分について行われて来ており，そのほとんどが高速液体クロマトグラフィー（HPLCと略す）を用いた方法[5-9]であるが，食品を対象とした報告例は少ない．ALについてはOsadcaらの報告[10]があるが，前処理に長時間を要するため光などで分解しやすいカロチノイド系色素の分析法としては問題がある．

著者らは食品中の天然着色料を中心に，その分析法の開発と市場での使用実態調査[11-16]を行うと共に，輸入食品を対象としてフマル酸鉄[17]，カンタキサンチン[15]等の法定外食品添加物の試験法の開発に取り組んで来た．今回はALとESについて，HPLC及び高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLCと略す）を用いた分析法を検討し，これらの着色料の使用が予想される市販の輸入食品を分析したので，その結果を併せて報告する．

実験方法

1．試料

平成3年4月から平成4年5月の間に都内の小売店より購入したALとESの使用が予測される菓子類等の食品計18試料を用いた．

2．装置

高速液体クロマトグラフは日本分光工業㈱製880-PU型，検出器は同社製紫外可視分光検出器870-UV型及び紫外可視多波長検出器MULTI-340型，データ処理には同社製データ処理システムDP-L340/98を用いた．

3．試薬

(1) 標準色素及び色素標準溶液

AL：Fluka社製β-アポ-8'-カロチナール（トランス型），純度99％以上．

ES：同社製β-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル（トランス型），純度99％以上．

カンタキサンチン：同社製カンタキサンチン（トランス型）純度98％以上．

クルクミン及びβ-カロチン：和光純薬工業㈱製特級品．

パプリカ抽出色素：東京化成工業㈱製カプサンチン．

ビキシン：同社製ビキシン．

ノルビキシン：アイゼン㈱製アナトーEX．

AL及びES標準溶液：Fluka社製β-アポ-8'-カロチナール（トランス型）及びβ-アポ-8'-カロチン酸エチルエステル（トランス型）をアセトンに溶解後，メタノールで適宜希釈して調製した，

他の色素標準溶液も同様にして調製した．

(2) HPTLC用シリカゲルプレート：メルク社製HPTLCプレート，キーゼルゲル60，10×10cm．

(3) HPTLC用展開溶媒：クロロホルム[18]．

(4) アルミナNカートリッジカラム：日本ウォーターズ社製SEP-PAKアルミナNカートリッジ．

(5) 色素溶出液：0.1Mアンモニア/アセトン溶液．

(6) HPLC用移動相：アセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン・ヘキサン（55：22：11.5：11.5）．

その他の試薬はいずれも特級品を用いた．

4．試験溶液の調製

試料からの色素の抽出は，既報[15]に準じて行った．すなわち液体試料はそのまま，固体試料はよく細切したもの2.0－5.0gを秤取後，分液ロートに移しエタノール・水（1：1）30mlとエーテル30mlを加え10分間振とう抽出した後，有機層を褐色のナシ型フラスコに移した．水層にはさらにエタノール・水（1：1）20mlとエーテル20mlを加え，有機層が着色しなくなるまで抽出操作を繰り返した．有機層を合せて，減圧下（45℃以下）で溶媒を留去し色素抽出物を得た．

油脂分の少ない試料の場合は色素抽出物を既知量のアセトンに溶解後メンブランフィルター（0.4μm）でろ過し，ろ液をHPTLC及びHPLC用試験溶液とした．

油脂含有量の多い試料の場合は，アルミナNカートリッジカラムを用いて油脂を除去したものを試験溶液とした．すなわち色素抽出物を約10mlのヘキサンに溶解後，無水硫酸ナトリウムを適量加え，約1時間放置し脱水した後，あらかじめヘキサン10mlで洗浄したアルミナカラムに注入した．流速約2ml/minで色素液を流して色素をカラムに吸着させた後，ヘキサン10mlでカラムを洗浄後，色素溶出液10mlを注入し色素を溶出した．色素液の溶媒を減圧留去後，残渣を既知量のアセトンに溶解したものを試験溶液とした．

5．HPTLCによる分析

シリカゲルプレートの下端より1.5cmのところにマイクロシリンジで試験溶液及び標準色素溶液を塗布した後，遮光して約6cmの高さまで展開した，展開後，直ちにドライヤーで溶媒を除き，Rf値と色調を自然光及び紫外線（365nm）照射下で観察した．

6．HPLCによる分析

HPTLCでALあるいはESが確認された試験溶液についてHPLCにより下記の条件で分析を行った．

カラム：ジーエルサイエンス㈱製Unisil QC18，5μm，250×4.6mm I.D.

移動相：アセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン・ヘキサン（55：22：11.5：11.5）

流速：1.0ml/min
検出波長：454nm
注入量：10 μl

得られたクロマトグラムについてピークの保持時間と多波長検出器で測定した吸収スペクトル(350－550nm)により確認するとともに，ピーク面積法で定量した．

結果及び考察

1．アルミナNカートリッジカラムによる油脂分の除去

油脂を多量に含む試料の場合は，HPTLCやHPLCの際，油脂の影響によりスポットの拡散やカラムの目づまりなどが起こるため色素抽出物中の油脂を除く必要がある．カロチノイド色素はアルミナによく吸着することと操作の簡便性を考慮してアルミナNカートリッジカラムを用いて油脂の除去について検討した．

ごま油1－5gにAL及びESをそれぞれ100 μg添加したものについて試験溶液の調製の項に従い操作した．ごま油2gまではいずれの色素も1本のカラムで十分保持されたが，3g以上の場合は色素を完全に保持するためにはカラム2本を接続する必要があった．回収率はESの場合ごま油1－5gで98.3－102.5%と良好であった．しかしALは完全に溶出されないためESに比べて若干低く85.2－90.4%であった．

2．HPTLC

AL及びESは食品に共に使用される可能性のある他の6種の油溶性色素，カンタキサンチン，β-カロチン，パプリカ抽出色素，クルクミン，ビキシン及びノルビキシンとはFig. 1に示したように分離出来た．Rf値はALが0.47，ESでは0.61であった．

また，検出限界は10 μlをスポットした場合，AL，ESともに4 μg/ml(0.04 μg)であった．本法により試料5gから試験溶液5mlを調製し，10 μlスポットした場合の検出限界は試料1g当たり4.0 μgであったが，試験溶液を濃縮することにより，さらに高感度の検出が可能と考える．

3．HPLC

分析条件について検討した結果，Unisil QC18カラムを用い，移動相にアセトニトリル・メタノール・ジクロロメタン・ヘキサン(55：22：11.5：11.5)[19-20]を使用することによりFig. 2に示したようなクロマトグラムが得られた．他の6種の油溶性色素，カンタキサンチン，β-カロチン，パプリカ抽出色素とも分離した．また，クルクミン，ノルビキシン及びビキシンは本条件下ではプレカラムに吸着されるため，これらの色素のピークは見られなかった．

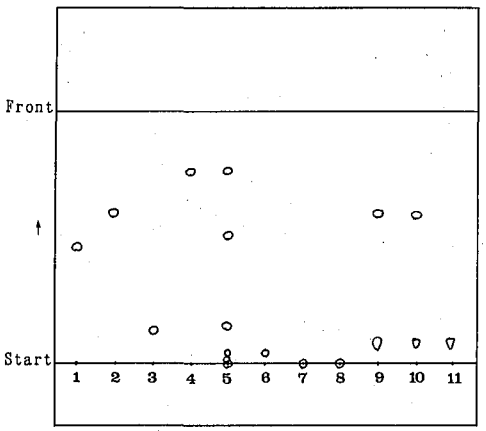


Fig. 1．HPTLC Chromatogram
HPTLC plate : silica gel 60. Developing solvent : chloroform.
1 : β-apo-8'-carotenal, 2 : ethyl β-apo-8'-carotenoate, 3 : canthaxanthin, 4 : β-carotene, 5 : paprika extract, 6 : curcumin, 7 : bixin, 8 : norbixin, 9 : pasta extract, 10 : pasta extract added to ethyl β-apo-8'-carotenoate, 11 : yolk extract

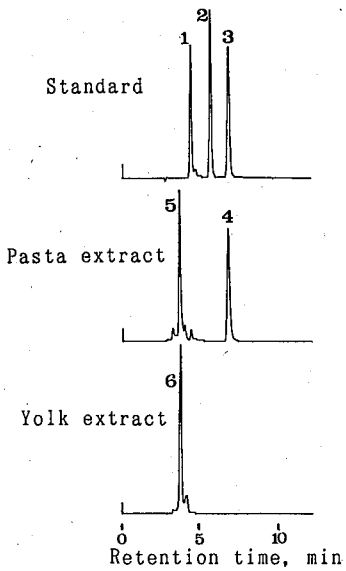


Fig. 2．HPLC Chromatogram
HPLC condition Column : Unisil QC 18,5 μm, 250 × 4.6mm I.D., mobile phase : acetonitrile·methanol·dichloromethane·hexane (55 : 22 : 11.5 : 11.5), detection : 454nm, flow rate : 1.0ml/min, injection : 10 μl
1 : canthaxanthin, 2 : β-apo-8'-carotenal, 3 : ethyl β-apo-8'-carotenoate, 4 and 5 : main peaks of pasta extract, 6 : main peak of yolk extract

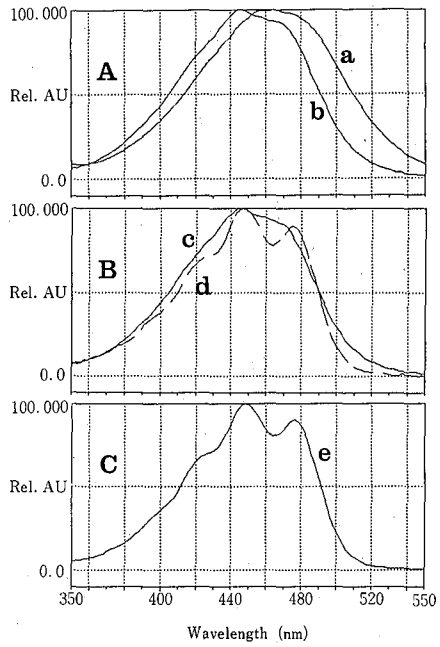


Fig. 3. Absorption Spectra by Photodiode Array Detector

A Standard

a : β-apo-8'-carotenal (λ_{max} 462nm)

b : ethyl β-apo-8'-carotenoate (λ_{max} 446nm)

B Pasta extract

c : HPLC peak No.5 in Fig.2 (λ_{max}446nm)

d : HPLC peak No.4 in Fig.2 (λ_{max} 447,475nm)

C Yolk extract

e : HPLC peak No.6 in Fig.2 (λ_{max} 447,475nm)

また，検量線はいずれも0.2－2.0 μg/ml(0.004－0.040 μg)の範囲のものを用いた．定量限界はAL，ESともに0.1 μg/ml(0.002 μg)であった．本法に従って試料5 gから試験溶液5 mlを調製した場合の定量限界は，試料1 g当たり0.2 μgであった．

紫外可視多波長検出器で測定した吸収スペクトル(350－550nm)をFig. 3に示した．ALは462nmに，ESは446nmにそれぞれ極大吸収波長を有し，紫外可視多波長検出器での検出限界はいずれも5 μg/ml(0.05 μg)であった．本法により試料5 gを用いて試験溶液5 mlを得た際の検出限界は，試料1 g当たり5.0 μgであった．

4．添加回収率

AL及びESの使用が予測される市販食品に試料1 g当たり20 μgの色素をそれぞれ添加し，回収率を求めた結果をTable 1に示した．

ESはいずれの試料についても98.0－100.5%と良好な回収率が得られた．ALは清涼飲料水や飴では98.5－99.5%と良好であったが，油脂分の多いクッキーやサラダドレッシングではやや低く，90.5%であった．これはアルミナカラムを用いて油脂分を除去する際，カラムからの溶出率がALはESに比べて若干低いためと考えられる．

5．市販食品への適用

本法を用いて主として市販の輸入食品を分析し，その結果をTable 2に示した．18試料について行ったところ，イタリー産のパスタ1試料からESを3.0 μg/g検出した．この試料についてのHPTLC及びHPLCでのクロマトグラムをそれぞれFig. 1及びFig. 2に示した．また，紫外可視多波長検出器で測定した吸収スペクトルをFig. 3に示した．

このパスタは橙黄色をしており，HPTLCのクロマトグラムからES以外に主色素として黄色色素を含有していることが分かった．表示によると原材料に卵を用いていることからこの黄色色素については，卵黄由来と推測

Table 1. Recovery of β-apo-8'-Caorotenal and Ethyl β-apo-8'-Carotenoate added to Commercial Foods

Sample	β-apo-8'-carotenal			ethyl β-apo-8'-carotenoate		
	Added (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery (%)	Added (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery (%)
Soft drink	20.0	19.9	99.5	20.0	19.7	98.5
Candy	20.0	19.7	98.5	20.0	20.1	100.5
Cookie	20.0	18.1	90.5	20.0	19.6	98.0
Salad dressing	20.0	18.0	90.5	20.0	19.7	98.5

Back ground values of β-apo-8'-carotenal and ethyl β-apo-8'-carotenoate were $<$2.0 μg/g in all samples

(n＝3 each)

Table 2. Analytical Result on Commercial Foods

Sample	Color[1] of sample	n	Country of origin[2]	Detected pigments[2]
Pasta	O-Y	1	Italy	ethyl β-apo-8'-carotenoate[3]
Biscuit	O-B	1	Netherlands	curcumin
Chewing gum	Y	1	U.S.A.	curcumin
Chocolate	O	1	Japan	paprika extract
Candy	Y	4	France, Japan, U.K., Netherlands	curcumin (3), β-carotene
	O	5	U.K. (2), France, Belgium, Japan	paprika extract (2), norbixin (2) paprika extract and β-carotene
Jelly	Y	1	Netherlands	curcumin
	O	3	Netherlands (2), Japan	paprika extract (3)
Soft drink	Y	1	U.S.A.	β-carotene

1) O-Y orange-yellow, O-B orange-brown, Y yellow, O orange
2) Values in parenthese indicate numbers of samples more than one.
3) Amount of ethyl β-apo-8'-carotencoate was 3.0 μg/g.

された.

そこで，市販の鶏卵の卵黄について本法に従い色素を抽出し分析を行ったところ，Fig. 1に示したように卵黄の色素はパスタの主色素と同一Rf値であった．HPLCでもFig. 2のように保持時間が一致した．また，Fig. 3で示したように，パスタの主色素と同様の吸収スペクトルが得られた．以上の結果から，パスタの主色素は卵黄由来の色素ルテイン[21]を主成分とするものと考えられる．

ESの使用が許可されている国では，通常，菓子類に2－5 μg/g，嗜好品では3－50 μg，乳製品，油脂類には2－20 μg/g程度用いられている[1]．本試料の場合，主色素が卵由来のものと考えられることから，飼料として鶏に与えられたESが，卵に移行したものかあるいは主色素を補う目的で添加物として用いられたかの二つの可能性が考えられる．

ALについては，いずれの試料からも検出されなかったが，オレンジの皮で0.9－3.4 μg/g，ほうれん草に0.01 μg/g，オレンジ果汁で0.005－0.02 μg/g含有されている[1-3]ので，これらを含んでいる試料の分析に際しては，注意する必要がある．

今回の分析結果では18試料中1試料についてのみESが検出されたが，AL及びESはFAO/WHO合同食品添加物専門家委員会により，いずれもADI(1日摂取許容量mg/Kg/体重)が0－5 mg/Kg/dayのA(1)クラス[1]に設定され，安定性が高いと評価されていることと，かなり広範囲の輸入食品に油溶性天然色素が使用されている[16]ことから，これらの色素についても種々の食品に使われている可能性がある．従って，さらに多種類の食品を対象に分析を行い調査する必要があると考える．

ま と め

食品中のAL及びESの分析法について検討した結果，下記のことが明らかとなった．

1) 油脂含有量の多い食品の場合，アルミナNカートリッジカラムを用いることにより，簡易に色素抽出物中の油脂分を除くことが出来た．

2) AL及びESは，HPTLC及びHPLCにより食品に使用される可能性のある他の6種の油溶性着色料と分離出来た．検出限界はいずれもHPTLCで0.04 μg，HPLCでは0.002 μgであり高感度な分析が可能であった．

3) 市販食品を用いての回収率はALは90.5－99.5%，ESは98.0－100.5%と良好であった．

4) 本法を用いて，主に市販の輸入食品18試料を分析した結果，イタリー産パスタ1試料からESが3.0 μg/g検出された．

以上の結果から本法は食品中のAL及びESの分析法として十分使用出来るものと考える．

謝辞 本研究をするに当たり御協力を頂いた麻布大学環境保健学部食品衛生学講座の安藤由紀子さんと標準色素を提供されたアイゼン㈱に深謝致します．

(なお，本研究は衛生局生活環境部食品保健課の輸入食品対策の一環として，指定外添加物に関する分析法開発の要請に基づいて行われたものである．)

文　献

1）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司編：天然着色料ハンドブック，236-240，1979，光淋，東京.

2）食品化学新聞社編：食品添加物合成天然総覧'87，214-262，1987，東京.

3）伊藤良仁：*New Food Industry*, **29**, 24-31, 1980.

4）日本薬学会編：衛生試験法・注解，378，1980，金原出版，東京.

5）Bailey, C. A. and Chen, B. H.: *J. Chromatogr.*, **455**, 396-400, 1988.

6）Daood, H. G., Czinkotai, B., Hoschke, A. et al.: *ibid.*, **472**, 296-302, 1989.

7）Juhler, R. K. and Cox, R. P.: *ibid.*, **508**, 232-235, 1990.

8）Biacs, P. A., Daood, H. G., Pavisa, A. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 350-353, 1989.

9）Heinonen, M. I.: *ibid.*, **38**, 609-612, 1990.

10）Osadca, M., Deritter, E. and Bunnell, R. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **49**, 1078-1083, 1966.

11）荻原　勉，野沢竹志，平田恵子，他：食衛誌，**21**, 207-213, 1980.

12）平田恵子，荻原　勉，天川映子，他：同上，**24**, 1-6, 1983.

13）天川映子，平田恵子，荻原　勉，他：分化，**33**, 586-590, 1984.

14）荻原　勉，天川映子，平田恵子，他：東京衛研年報，**36**, 245-250, 1985.

15）天川映子，荻原　勉，大西和夫，他：同上，**41**, 133-139, 1990.

16）荻原　勉，天川映子，野沢竹志，他：同上，**43**, 111-117, 1992.

17）天川映子，大西和夫，西島基弘：同上，**40**, 169-174, 1989.

18）日本薬学会編：衛生試験法・注解，374，1980，金原出版，東京.

19）Heinonen, M. I., Ollilalne, V., Linkola, E. K. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 655-659, 1989.

20）Khachihk, F., Beecher, G. R. and Lusby, W. R.: *ibid.*, **37**, 1465-1473, 1989.

21）服部静夫，下郡山正巳：生体色素，24，1971，朝倉書店，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 124-129, 1992

野菜・果実類中の残留農薬実態調査 —平成3年度—

小林麻紀*, 永山敏廣*, 塩田寛子*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits — Apr. 1991～Mar. 1992 —

MAKI KOBAYASHI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, HIROKO SIODA* and TAICHIRO NISHIMA*

Pesticide residues in 30 kinds of crops and 20 kinds of organically cultivated crops were investigated.

We detected residues of four kinds of organophosphorus insecticides, four kinds of organochlorine fungicides, one kind of organochlorine insectcide and two kinds of carbamate insecticides in several kinds of crops. Concentrations of organphosphorus insecticides(EPN, malathion, PAP, and ethylthiometon), organochlorine fungicides(chlorotalonil(TPN), procymidone, iprodion, and vincrozolin), organochlorine insecticide(benzoepin), and carbamate insecticides (BPMC, methomyl) were trace～1.3ppm, 0.009～4.0ppm, 0.096～0.61ppm, and 0.04～0.19ppm, respectively.

The level of PAP in mini-tomatos and TPN and benzoepin in parsley were higher than the maximum limits in standards for withholding registration.

Residues of organophosphorus insecticides (PAP and DMTP), organochlorine fungicides (procymidone and iprodion) and carbamate insecticides (methomyl) in four kinds of the organically cultivated crops were detected. Their concentrations were 0.03～1.5ppm, 0.03～0.30ppm, and 0.01ppm, respectively.

Keywords：残留農薬 pesticide residues, 野菜 vegetables, 果実 fruits, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, カーバメイト系農薬 carbamate pesticides, 殺虫剤 insecticides, 殺菌剤 fungicides, 除草剤 herbicides, 無農薬栽培 organic cultivation

緒　言

著者らは，生鮮野菜・果実類における農薬の残留実態調査を行ってきた[1-11]，今回は，平成3年度に調査した結果を報告する．

また，近年いわゆる有機栽培や無・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[10-11]．そこで，無・減農薬栽培作物について，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かった野菜・果実類の中心とし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・果実類

1991年4月から1992年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実類及び食用花等30検体について調査した．

(2)無・減農薬栽培野菜・果実類

1991年4月から1992年3月にかけて東京都内で販売，あるいは販売予定の野菜・果実類等20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)，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン(MEP)，フェンチオン(MPP)，フェントエート(PAP)，ホサロン，マラチオン，トリクロルホン(DEP)，サリチオン，エチルチオメトン(ジスルホトン)，ジクロフェンチオン(ECP)，シアノホス(CYAP)，クロルピリホスメチル，ホルモチオン，プロチオホス，メチダチオン(DMTP)，テトラクロルビンホス(CVMP)，プロパホス，EPBP，エチオン，イソキサチオン，チオメトン，シアノフェンホス(CYP)，ホスメット(PAP)，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($\alpha-$, $\beta-$, $\gamma-$, $\delta-$ 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($\alpha-$, $\beta-$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)，フェノブカルブ(BPMC)，メソミル　計3種

総計63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)，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　蛍光)

日本ミリポア・リミテッド　ウォーターズ製カルバメイト分析システム

(4)ガスクロマトグラフ質量分析計：Finigan Mat 社製 Incos−50

(5) 原子発光検出器　：　Hewlett　Packard 社製　AED HP5921A

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・果実類

(1)有機リン系農薬

野菜・果実類30検体中8検体(検出率：27%，以下同様)からEPN，マラチオン，PAP，エルチルチオメトン及びその酸化代謝物であるジスルホトンスルホンを検出した(Tablel 1)．

Table. 1．Residues of Organophosphorus Insecticidies in Crops

Sample	NO.of sample	NO.of positive	EPN (ppm)	Malathion (ppm)	Others[1] (ppm)
Vegetable					
Race ginger[NESYŌGA]	8	4	0.008	−[2]	0.02(Ethylthiometon) 0.04,0.17,0.16,(Disulfoton sulufone)
Parsley[PASERI]	4	3	1.1	Tr[3],0.76	−
Mini Tomato	8	1	−	−	1.3(PAP)
Pimiento[PĪMAN]	4	0			
Bean sprouts[MOYASHI]	2	0			
Fruit					
Fig[ICHIJIKU] (green)	2	0			
Edible flower					
Rose	1	0			
Snap dragon[KINGYOSŌ]	1	0			

1) Chlorpyrifos, CVP, DDVP, dimethoate, diazinon, parathion, MEP, MPP, PAP, phosalone, DEP, salithion, ethylthiometon, 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 0.005ppm

残留基準のある農薬は，マラチオン(検出作物名：パセリ)の1種が2検体(7％)から検出された．いずれも基準値以内であった．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬は，PAP(ミニトマト)，エチルチオメトン(根ショウガ)の2種が2検体(7％)から検出された．このうち，ミニトマトから検出されたPAPは，基準値0.1ppmを超えていた．PAPは劇物(3％以下の製剤は普通物)に指定されているが，1日摂取許容量(ADI)は0.003mg/kgであり，今回の結果は喫食上特に問題はないと考える．しかし，葉菜類，果菜類及び柑橘類の果皮において検出頻度が高い傾向にあるので[6-10,17]，その使用にあたっては充分な配慮が望まれる．

一方，根ショウガからエチルチオメトンが検出されたが，この根ショウガからは，その代謝物であるジスルホトンスルホンも同時に0.04ppm 検出された．ジスルホトンスルホンは，他の根ショウガ2検体からも検出されており，昨年度の調査でも検出されている[11]，従って，エチルチオメトンは根ショウガに比較的多用される殺虫剤であることが示唆された．

基準値の設定されていない農薬では，EPN(根ショウガ及びパセリ)1種が2検体(7％)から検出された．これらのうち，パセリから検出されたEPNは，他の野菜，果実に設定されている残留基準値0.1ppm の11倍量であった．EPNは，LD_{50}35～45mg/kg(ラット，雄，経口)の毒物(1.5％以下の製剤は劇物)である．比較的検出頻度の高い農薬であり[2,4,6-8,10,14,15,17]，煮る，炒める等の加熱調理後も70％以上が残存することから[13]，その残留には充分留意する必要がある．

(2)有機塩素系農薬及びカーバメイト系農薬

有機塩素系殺菌剤7種の調査結果を Table 2 に，有機塩素系殺虫剤17種及びカーバメイト系殺虫剤3種の調査結果を Table 3 に示した．

有機塩素系農薬は7検体(23％)から，TPN(パセリ，ミニトマト及びピーマン)，プロシミドン(ミニトマト及びピーマン)，イプロジオン(ミニトマト)及びビンクロゾリン(ピーマン)の4種の有機塩素系殺菌剤と，2検体(7％)から，ベンゾエピン(パセリ及びピーマン)1種の有機塩素系殺虫剤が検出された．

残留基準値を超えたものはなかった．

パセリから検出されたTPN及びベンゾエピンは登録保留基準値を超えていた．TPNは基準値1.0ppmの4倍量が検出された．TPNは登録保留基準値を超えて検出する例が多く見られ[6-11]，比較的残留性の高い農薬である．このことから，使用者側における正しい農薬の使用方法の遵守あるいは使用方法の改善等の対応が望まれる．ベンゾエピンは毒物に指定されているが，ADIは0.008mg/kgであり，今回の検出量では喫食上特に問題はないと考える．また，通常，検出量は低レベルであり[7-10,16]，基準値を超えて検出されることは少ない，今回の結果は，適正使用基準を守らずに，収穫時期に近接して使用したことによることも考えられ，その使用にあたってはなお

Table. 2． Residues of Organochlorine Fungicides[1] in Crops

Sample	NO.of sample	NO.of positive	TPN (ppm)	Procymidone (ppm)	Iprodion (ppm)	Vincrozolin (ppm)
Vegetable						
Race ginger	8	0				
Parsley	4	1	4.0	−[2]	−	−
Mini Tomato	8	3	0.03,0.009,	0.22,0.064	0.17,0.24	−
Pimiento	4	3	0.009,0.076	0.016,0.27	−	0.56
Bean sprouts	2	0				
Fruit						
Fig (green)	2	0				
Edible flower						
Rose	1	0				
Snap dragon	1	0				

1) Captan, captafol, TPN, procymidone, vincrozolin and iprodin are invetigaed.
2) −：not detected

Table. 3. Residues of Organochlorine[1] and Carbamate[2] Insecticides in Crops

Sample	NO.of sample	Oraganochlorine			Carbamate		
		NO.of positive	α-Benzoepin (ppm)	β-Benzoepin (ppm)	NO.of positive	BPMC (ppm)	Methomyl (ppm)
Vegatable							
Race ginger	8	0			0		
Parsley	4	1	–[3]	0.61	1	0.10	–
Mini Tomato	9	0	–	–	0		
Pimiento	4	1	0.19	0.096	2	0.04	0.19
Bean sprouts	2	0			0		
Fruite							
Fig (green)	2	0			0		
Edible flower							
Rose	1	0			0		
Snap dragon	1	0			0		

1) T–BHC(toatal of α–, β–, γ– and δ–BHC),T–DDT(total of pp'–DDT,pp'–DDE and pp'–DDD), op'–DDT, aldrin, endrin, benzoepin, chlorobenzilate, heptachlor and heptachlor epoxide are investigated.
2) NAC, BPMC and methomyl are investigated.
3) –: not detected

Table. 4. Details in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	NO.	Pesticide residues(ppm)
Race ginger	1	EPN(0.008)[1],Ethylthiometon(0.02)
Parsley	1	EPN(1.1), β–Benzoepin(0.61), BPMC(0.10)
	2	Malathion(0.76), TPN(4.0)
Mini Tomato	1	TPN(0.03), Procymidone(0.22)
Pimiento	1	Procymidone(0.016), BPMC(0.04)
	2	TPN(0.009), Procymidone(0.27), Methomyl(0.19)
	3	TPN(0.076), α–Benzoepin(0.19), β–Benzoepin(0.096)

1) The value in parentheses shows detected levels of pesticide.

一層の注意が望まれる.

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.

カーバメイト系殺虫剤は3検体(10%)から, BPMC(パセリ及びピーマン)とメソミル(ピーマン)の2種が検出された, これらのうち, ピーマンから検出されたメソミルは, 過去における調査[4]では検出されなかった農薬である. メソミルはADI0.01mg/kgの劇物である. 過去にモチに混入したことによる食中毒事件が起きているが[12], 今回の検出レベルは, ADIと比較して喫食上特に問題はないと考える.

(3)農薬複数残留実態

同一検体から2種類以上の農薬を検出した野菜類についてまとめ, Table 4. に示した.

複数残留は, 根ショウガ, パセリ, ミニトマト及びピーマンの4種作物7検体(23%)に認められた.

根ショウガは複数の有機リン系殺虫剤が残留していた. また, パセリでは有機リン系殺虫剤と有機塩素系殺菌剤の組合せによる, ピーマンでは有機塩素系殺菌剤とカーバメイト系殺虫剤の組合せによる複数の農薬残留が認められた.

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20検体について調査したところ, 4検体(20%)から有機リン系殺虫剤2種, 有機塩素系殺菌剤2種及びカーバメイト系殺虫剤1種が検出された(Table 5).

Table. 5. Residues of Pesticides[1] in Organic Cultivation Crops

Sample	NO.of sample	NO.of positive	Pesticide residues(ppm)
Young leaves of chinese cabbage[KOMATSUNA]	1	0	
Parsley[PASERI]	1	0	
Spinach[HŌRENSŌ]	1	0	
Japanese honeywort[MITSUBA] (leaf)	1	1	PAP(0.041)[2], Iprodion(0.30)
Pumpkin[KABOCHA]	1	0	
Cucumber[KYŪRI]	3	1	Methomyl(0.01), Procymidone(0.04)
Tomato	2	0	
Mini tomato	3	0	
Egg plant[NASU]	1	0	
Pimiento[PĪMAN]	1	1	Procymidone(0.03)
Strawberry	1	0	
Japanese pear[NASHI]	1	0	
Apple	1	0	
Mandarin orange[UNSHŪMIKAN] (flesh)	1	0	
(peer)	1	1	PAP(0.33), DMTP(1.5)

1) 53 kinds of insecticides(organophosphorus : 33, organochlorine : 17, carbmate : 3), 9 kindes of fungicides(organophosphorus : 2, organochlorine : 7) and one kind of herbicide(organochlorine) are investigated.
2) The value in parentheses shows detected leveles of the pesticivde.

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.

温州みかんから検出されたDMTPは，いずれの基準値も設定されていないが，一般流通栽培柑橘類の外果皮から高い頻度で検出され[6-9,17]，この傾向は温州みかんから検出されたPAPにも見られる[6,7,9,10,14,17]，しかし，これら外果皮は一般には喫食されない部分であり，喫食される場合はマーマレード等に加熱調理されることが多い．その製造過程で，DMTPは速やかに減少する[13]ため喫食時における残存量は非常に少ないと考えられる.

農薬を検出した作物は，全て減農薬栽培表示のものであり，16検体中4検体から検出された．一方，無農薬栽培表示のもの4検体からは農薬の検出は全く認められなかった.

葉菜類のミツバと果菜類のピーマンにおいて殺虫剤と殺菌剤の組合せによる，農薬の複数残留が認められ，一般流通作物と同様な傾向であった.

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

1991年4月から1992前3月までに都内に入荷した野菜・果実類50検体について，一般流通品(慣行栽培品)及び無・減農薬栽培品の残留農薬実態調査を行った.

1．一般流通野菜・果実類

有機リン系農薬は，EPN，マラチオン，PAP及びエチルチオメトンの4種が6検体から，痕跡～1.3ppmの範囲で検出された．ミニトマトからPAPが登録保留基準値を超えて検出された.

有機塩素系農薬では，TPN，プロシミドン，イプロジオン，ビンクロゾリン及びベンゾエピンが，0.009～4.0ppmの範囲で検出された．パセリから登録保留基準値を超えてTPN及びベンゾエピンが検出された.

カーバメイト系農薬は，パセリからBPMCが0.04ppm，ピーマンからメソミルが0.19ppm検出された．農薬の複数残留は，7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，PAP及びDMTPの2種がミツバとミカンの果皮から0.33～1.5ppmの範囲で検出された.

有機塩素系農薬では，プソロシミドン及びイプロジオンの２種が，ミツバ，キュウリ及びピーマンの３検体から0.03pp～0.30ppm の範囲で検出された．

カーバメイト系農薬は，ピーマンからメソミルが0.01ppm 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）小関正道，嶋村保洋，真木俊夫他：東京衛研年報，**31-1**，170-173，1980.

2）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**32-1**，172-176，1981.

3）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**34**，165-170，1983.

4）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，**35**，210-218，184.

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）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**42**，129-133，1991.

12）田村行弘，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**34**，171-177，1983

13）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：第11回農薬残留分析研究会　資料，41-46，1987.

14）杉山智世子，浅岡公江：静岡市衛生研究所年報，**2**，92-101，1986.

15）星野庸二，堀江正一，飯島正雄他：埼玉県衛生研究所報，**25**，218-221，1991.

16）佐藤郁子，鈴木　滋，高槻圭吾他：宮城県保健環境センター年報，**8**，71-73，1990.

17）吉田精作，村田　弘，今井田雅示：大阪府立公衆衛研所報，食品衛生編，**22**，59-68，1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 130-136, 1992

輸入農産物中の残留農薬実態調査
—平成3年度—

塩田寛子*, 永山敏廣*, 小林麻紀*, 二島太一郎*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
—Apr. 1991. ~ Mar. 1992.—

HIROKO SHIODA*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI* and TAICHIRO NISHIMA*

Pesticide residues in 230 imported crops were investigated. Residues of 10 kinds of organophosphorus insecticides were detected at trace ~ 0.93ppm. With organochlorine pesticides, 2 kinds of insecticides and 5 kinds of fungicides were detected at trace ~ 0.08ppm and 0.01 ~ 0. 88ppm, respectively. In the others one kind of carbamate insecticide, 2 kinds of herbicides and one other kind of fungicide were detected at 0.05 ~ 0.08ppm, trace ~ 0.18ppm and trace ~ 4.3ppm. Residues of these pesticides were at levels lower than the tolerance for pesticide residues in Japan and the origin and FAO/WHO tolerances for residues.

There were some regional characteristics about the pesticide. With the rate of pesticide detection, the imported crops from the Oceanic countries had the highest one among that from 5 regions such as the Americans, Africa, Asia, Europe and the Oceanic countries.

Keywords：残留農薬 pesticide residues, 輸入農産物：imported crops, 有機リン系農薬：organophosphorus pesticides, 有機塩素系農薬：organochlorine pesticides, カーバメイト系農薬：carbamate pesticides, ポストハーベ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報告してきた[4-8]．今回は平成3年度の調査結果を報告する．

実験の部

1．試料

1991年4月から1992年3月にかけて東京都内に入荷した輸入野菜・果実類等66種230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．一部の生鮮農作物は可食部，及び非可食部を含む全果について分析した．

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)，ジオメトン(-0, -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

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

Table 1. The List of Investigated food commodity

	Commodities		
Vegetables	Trevise[1](4), Chicory(4), SABOI(1), Asparagus(7), Garlic(stem)[NINNIKUNOKUKI](2), Okra(3), Pumpkin[KABOCHA](8), Tomato(1), Chinese pea[SAYAENDOU](3), String pea[SAYAINGEN][2](5), Baby corn(3), Sweet corn[2](4), Green pea[2](8), Green soybean[EDAMAME][2](4), Potato[3](5), Arrowhead[KUWAI][4](1), Bamboo shoot[TAKENOKO](3), Celeriac(2), Red Beet(1), Carrot[NINJIN](1), Japanese radish[NEWASABI](1), Leek[RIKI](2), Shallot[ESHAROTTO](4)	26 species	79 crops
Mushrooms	MATSUTAKE(4), SHIITAKE(1)	2 species	5 crops
Fruits			
Citrus[4]	Grapefruit(5), Lemon(5), Lime(3), Orange(5)	4 species	18 crops
Others	Avocado[4](3), Banana[4](5), Cherry[SAKURANBO](3), Grape[BUDOU](6), Kiwifruit[4](3), Litchi[4](6), Chestnut[MUKIGURI](2), Mango[4](3), Mangosteen(3), Melon[4](4), Papaya[4](3), Pineapple[4](5), Strawberry[ICHIGO][2](6)	13 species	52 crops
Beans	Soybean[DAIZU](6), Small red bean[AZUKI](2), Caffee bean(5), Other beans[5](11)	13 species	24 crops
Nuts	Cashew nut(5), Peanut(5)	2 species	10 crops
Cereals	Wheat[KOMUGI(GENBAKU)](4), Flour[KOMUGIKO](5), Bran[HUSUMA](8), Malt[BAKUGA](6), Corn[TOUMOROKOSHI](4), Corngrits(6), Buckwheat[GENSOBA](5), Buckwheat flour[SOBAKO](4)	8 species	42 crops
		Total 68 species	230 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) precooked frozen potato
4) This sample is analyzed both whole and flesh.
5) Other beans have 10 kinds of bean.

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)，ビンクロゾリン，ジクロラン，メトキシクロル　計20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，クロルプロファム(CIPC)，アルディカーブ　計5種

(4)その他の農薬：塩化メチレン，トリクロロエタン，クロロホルム，四塩化炭素，2.4-D，イマザリル　計6種

総計58種

これらのうち，穀類は有機リン系農薬について，柑橘類は有機リン系，カーバメイト系及びその他の農薬について調査した．また，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，トリクロロエタン及び四塩化炭素は，米国における収穫後使用農薬であり，クロロホルムは1989年まで同様に使用されていたことから，アメリカ地域産の農作物についてのみ調査した．また，2.4-D及びイマザリルは，米国において柑橘類に対する収穫後使用農薬とされているため柑橘類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(検出器：ECD)，GC-14A(検出器：ECD, FPD及び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,TSD)，3400(検出器：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：蛍光)，日本ミリポア・リミテッドウォーターズ製カルバメイト分析システム

(4)ガスクロマトグラフ—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：㈲廣澤鉄工所製ダンシングアジテーター

4．分析方法

昭和50年厚生省告示第309号，残留農薬分析法[9]，増補残留農薬分析法[10]及び残留農薬分析法 Draft [11]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ては，新しく開発した方法によった[12]．

結果及び考察

1．農薬残留実態

68種230作物中15種41作物(検出率19%，以下同様)から27種の農薬が検出された．農薬を検出した作物について，野菜・果実・豆類は Table 2 に，柑橘類は Table 3 に，穀類は Table 4 に示した．

(1)野菜類

26種79作物中 3 種 8 作物(9.5%)から 3 種の農薬が検

Table 2．Pesticide Residues in Vegetables, Fruits and Beans

Crops	Country	No.of sample	No.of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Green soybean	Taiwan	4	2	Ethion	0.01	0.3[1]
				Chlorpyrifos	0.03	0.2[2]
Potato	USA	2	2	CIPC	Tr[3],0.18	0.05[1],50[4]
	Canada	2	1	CIPC	0.10	0.05[1],15[4]
	Germany	1	1	CIPC	0.08	0.05[1],5[4]
Avocado (whole)	Mexico	1	1	Captafol	0.01	
Banana (whole)	Philippines	2	1	Chlorpyrifos	0.01	
Cherry	USA	3	1	Iprodione	0.12	10[1],20[4]
				Dicloran	0.61	15[2],20[4]
Kiwi (whole)	Newzealand	3	3	EPN	0.04	
				Chlorpyrifos	0.03	
				Diazinon	Tr,Tr,0.01	0.5[2]
				Pirimiphos-methyl	0.05,0.15,0.23	
				Iprodione	0.21	
				Vinclozolin	0.88	
Litchi (whole)	Taiwan	3	3	Parathion	0.24,0.30,0.36	0.5[2]
				NAC	0.17	
	China	3	2	Parathion	0.01,0.02	
(flesh)	Taiwan	3	3	Parathion	0.01,0.03,0.03	
				NAC	0.05	
Strawberry	USA	4	2	Captan	0.12	5[1],20[2],25[4]
				NAC	0.08	10[4]
Cashewnut	India	5	1	T-BHC[5]	0.08	
Peanut	China	5	4	Dimethoate	0.02	1[1]
				T-BHC	0.02,0.03,0.04,0.04	
				T-DDT[6]	Tr	

1) standard for withhoding resistration
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) Tr：below 0.01ppm
4) tolerance in each country
5) T-BHC：total of α-, β-, γ-and δ-BHC
6) T-DDT：total of pp'-DDT,pp'-DDE and pp'-DDD

Table 3. Pesticide Residues in Citrus Fruits

Crops	Country	No.of sample	No.of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Grapefruits						
(whole)	USA	5	5	Ethion	0.02,0.08	0.3[1],2[2],2[3]
				Imazalil	Tr[4],0.02,0.07,0.1,4.3	5[2],10[3]
				2.4-D	Tr	2[2],5[3]
(flesh)	USA	5	1	Imazalil	0.04	
Lemon						
(whole)	USA	5	5	Chlorpyrifos	0.06	0.5[1],0.3[2],1[3]
				Imazalil	0.02,0.39,1.7,2.4	5[2],10[3]
				2.4-D	0.01,0.04,0.09,0.13	2[2],5[3]
(flesh)	USA	5	3	Imazalil	0.02,0.12,0.21	5[2],10[3]
				2.4-D	Tr,0.01	
Orange						
(whole)	USA	5	4	Imazalil	0.30,1.0,1.4,2.0	5[2],10[3]
				2.4-D	Tr,0.02	2[2],5[3]
(flesh)	USA	5	3	Imazalil	0.03,0.07,0.08	5[2],10[3]

1) standard for withholding registration
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) tolerance in each country
4) Tr : below 0.01ppm

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, エチオン(検出作物名:エダマメ)及びCIPC(冷凍ポテト)の2種が5検体(6.3%)から検出された. これらのうち, 米国, カナダ及びドイツ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. しかし, 原産国である米国, カナダ及びドイツにおけるCIPCの生鮮ポテトに対する許容量は50,15及び5 ppmであり, 今回の検出値はこれらの1/60以下であった. また, 平成4年10月27日厚生省告示第239号で示されたCIPCの基準値は馬鈴薯に対し50ppmと設定されているが, 今回の検出値はその1/500以下であり, 喫食上特に問題はない. CIPCは諸外国において収穫後使用農薬として馬鈴薯の発芽抑制目的に直接使用されている[13, 14], 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(柑橘類を除く)

13種52作物中7種14作物(27%)から11種の農薬が検出された(Table 2).

喫食に供さない果皮等の非可食部を含む全果から, 比較的多数の農薬が検出された. 残留基準のある農薬は検出されなかった. 登録保留基準が設定されている農薬は, カプタホール(アボカドの全果), イプロジオン(チェリー, キウィの全果), クロルピリホス(バナナ, キウィの全果), ダイアジノン(キウィの全果), ビンクロゾリン(キウィの全果)及びキャプタン(イチゴ)の6種が検出された. これらの農薬のうち, キウィの全果2作物から検出されたピリミホスメチルは, 果肉に対する登録保留基準値0.01ppmを超えて認められたが, その果肉からは検出されなかった. 他の農薬は, いずれも基準値以内での検出であった.

チェリーから収穫後の使用も認められているジクロランが0.61ppm検出された. また, パラチオンがライチの果肉から0.01~0.05ppm及び全果から0.01~0.36ppmの範囲で検出された. 同一作物において, 全果での検出値は果肉の約10倍高い値を示した. ライチからはパラチオンが高頻度で検出される[7, 8]. しかし, その検出値は全果について基準が設けられているFAO/WHOの定めた最大残留許容量0.5ppm以内であった. パラチオンは日本では特定毒物に指定され, 取扱いが厳しく規制されており, 国内産の果実からは全く検出されていな

Table 4. Pesticide Residues in Imported Cereales

Crops	Country	No.of sample	No.of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Wheat	USA	2	2	Chlorpyrifos-methyl	0.02,0.08	10[1],6[2]
				Malathion	0.06,0.27	0.5[3],8[1],8[2]
Bran	USA	2	2	Chlorpyrifos-methyl	0.05,0.17	
				Malathion	0.19,0.26	
	Australia	5	5	Chlorpyrifos-methyl	0.80,0.87,0.93	
				Pirimiphos-methyl	Tr[4]	
				MEP	Tr,0.03	
				Malathion	0.05,0.14,0.17,0.20	
	USA&Australia	1	1	Chlorpyrifos-methyl	0.32	
Flour	USA&Canada	2	1	Malathion	Tr	
	USA	1	1	Malathion	0.01	
Malt	Australia	2	2	MEP	0.38,0.42	
	Canada	3	1	MEP	0.03	
Corn(grain)	USA	4	1	Pirimiphos-methyl	0.01	10[1]
				Malathion	0.02	0.5[3],8[1],2[2]
Corngrits		4	2	MEP	0.01,0.01	10[1]
				Malathion	Tr	0.5[3],8[1]
	USA	2	1	Malathion	Tr	0.5[3],8[1],8[2]
Backwheat flour	USA&China	2	2	MEP	0.01	
				Chloroform	0.08,0.11	

1) FAO/WHO tolerance for residues
2) tolerance in each country
3) standard for withholding resistration
4) Tr : below 0.01ppm

い[15-19]. このような農薬が輸入品から検出されることもあるため，農薬の残留実態把握には十分な留意が必要であると考える.

(3)豆類及び種実類

種実類2種10作物中2種5作物(50%)からジメトエート，総BHC及び総DDTが検出された(Table 2). これらの農薬のうち，ジメトエートには登録保留基準が設定されているが，今回の検出量は，基準値1ppmの1/50であった.

インド及び中国産のナッツ類から総BHCが0.02～0.08ppmの範囲で，中国産のピーナッツから総DDTが痕跡(0.01ppm未満)検出された. 現在，BHC及びDDTは，多くの国々でその使用が規制されている. しかし，土壌残留性が高い農薬であるため，使用されなくなった後15年以上経ても，それらの農薬が痕跡程度ながら検出されるとの報告がある[15-21]. 今回ナッツ類から検出された総BHCは，それらの報告による検出値と比較しやや高い値であり，土壌に残留していたものか，殺虫剤として使用されたものかの判断は難しい[22]. このように，農薬に関する情報が少ない国々における農薬の使用実態を把握するためには，今後も調査を続けていく必要があると考える.

(4)柑橘類

4種18作物中3種14作物(78%)から4種の農薬が検出された(Table 3). 残留基準のある農薬は検出されなかった.

登録保留基準のある農薬は，クロルピリホス(レモンの全果)及びエチオン(グレープフルーツの全果)が検出された. いずれの農薬も果肉(可食部)に対する登録保留基準値0.5及び0.3ppmの約1/5及び1/4であり，米国及びFAO/WHOの許容量以下であった. クロルピリホスについては厚生省告示第239号で示された値0.3ppmよりも今回の検出値は，全果ではあるが低い値であった. これら農薬は柑橘類から検出されやすい傾向をもつが，残留量は比較的低いレベルを示す[7, 8, 23].

柑橘類に収穫後使用されることから比較的検出されや

Table 5. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No.of samples	No.of positive samples						Detected rate(%)
		Organophosphorus insecticides	Organochlorine insecticides	Organochlorine fungicides	Carbamate insecticides	Carbamate herbicides	Total	
America	90	7(5) [1)]	0	3(3)	1(1)	3(1)	14(10)	16
Asia	75	9(5)	5(2)	0	1(1)	0	15(8)	20
Oceania	30	10(7)	0	2(2)	0	0	12(9)	40
Europe	20	0	0	0	0	1(1)	1(1)	5
Africa	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	216	26(10)	5(2)	5(5)	2(1)	4(1)	42(19)	19

1) Value in parentheses indicate number of detected pesticides.

すい2.4-D及びイマザリルが[8,24]，それぞれ痕跡～0.13ppm及び痕跡～4.3ppmの範囲で検出された．これらの検出値は，いずれも米国及びFAO/WHOの許容量以内であった．

果肉から検出された農薬の種類は，昨年度と同様であり検査年度による違いは認められなかった．しかし，2.4-D及びイマザリルの検出率は，昨年度の31％及び63％に比較し，今年度は11％及び39％と低く，また検出値は，それぞれ昨年度0.01～0.06ppm(検出値の平均値0.03ppm，以下同様)及び0.01～0.52ppm(0.16ppm)，今年度痕跡～0.01ppm(痕跡程度)及び0.02～0.21ppm(0.08ppm)となった．両農薬の検出率及び検出値ともに，今年度は昨年度の約1/2であった．また，現在イマザリルについては，厚生省へ残留基準値及び食品添加物使用基準による残存量が答申されており，今後，さらに両農薬の残留状況の推移を観察していく必要があると考える．

(5) 穀類

8種42作物中6種21作物(50％)から5種の農薬が検出された(Table 4)．穀類からは，クロルピリホスメチル，ピリミホスチル，MEP及びマラチオンが比較的高頻度で検出され，収穫後に使用された可能性が高い．また，これら農薬が，玄麦よりフスマから比較的高濃度で検出された．これは，玄麦に残留する農薬の80％以上が，フスマに残存する[25, 26]ことによると考えられる．

MEP及びマラチオンは，厚生省が残留基準の設定にあたっている農薬であるが，今回の検出値はいずれもその基準値以内であった．

そば粉から微量のクロロホルムが検出された．クロロホルムは米国において，くん蒸殺虫剤として使用されていたが，1989年に使用禁止となった農薬である．今回検出されたクロロホルムは，くん蒸殺虫剤として収穫後に使用されたものか，他の何らかの汚染によるものかの区別はできないが，昨年度柑橘類から検出されたトリクロロエタンと同様揮散しやすい農薬であり，その残留原因の把握が大切と考える．

2．地域別による比較

輸入農産物の原産国を前報[8]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 5に示した．

農薬の検出率はオセアニア産が最も高く，次いでアジア，アメリカ及びヨーロッパ産の順であった．

オセアニア産の検出率は昨年度に比較して2倍以上になった．これは，検査対象農作物のうち農薬の検出率が他作物よりも比較的高い穀類の占める割合が高かったこと，また，果実類において全果を対象に調査，検討を加えたため，より多くの農薬の残留を把握できたことに起因すると考える．

まとめ

1991年4月から1992年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等68種230作物について，残留農薬の実態調査を行った．

1．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～0.93ppm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～0.08ppm，5種の殺菌剤が0.01～0.88ppmの範囲で検出された．

その他の農薬では，1種のカーバメイト系殺虫剤が0.05～0.08ppm，2種の除草剤が痕跡～0.18ppm及び1種の殺菌剤が痕跡～4.3ppmの範囲で検出された．

残留基準値，登録保留基準値，FAO/WHOの定めた

最大残留許容量及び各輸出国の農薬許容量を超えたものはなかった.

2．地域別による比較

検出された農薬に地域特異性が認められた．また，農薬の検出率はオセアニア産が最も高かった.

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）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）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：東京衛研年報，**42**，134-140，1991.

9）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.

10）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.

11）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.

12）未発表

13）平成元年度委託調査報告書　収穫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.

14）John Wiley and sons：1989 Crop Protection Chemicals Reference 5th edition, 1990, Chemical and Pharmaceutical Press, New York.

15）田村行弘，観　公子，永山敏廣他：東京衛研年報，**36**，199-205，1985.

16）永山敏廣，真木俊夫，飯田真美他：東京衛研年報，**39**，130-138，1988.

17）真木俊夫，飯田真美，観　公子他：東京衛研年報，**39**，139-143，1988.

18）永山敏廣，真木俊夫，飯田真美他：東京衛研年報，**40**，150-162，1989.

19）永山敏廣，真木俊夫，橋本秀樹他：東京衛研年報，**41**，119-124，1990.

20）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：東京衛研年報，**42**，129-133，1991.

21）吉田富美雄，山浦由郎：長野県衛公報告，**12**，48-51，1989.

22）中富美津江：広島県衛研年報，**34**，41-44，1987.

23）斉藤行雄，山本　敦，水上英一：富山衛研年報，**14**，199-201，1991.

24）高橋　悟，荒川善行，菊池憲夫他：岩手衛研年報，**33**，59-60，1990.

25）河村葉子，武田明治，内山充他：食衛誌，**21**，70-74，1980.

26）永山敏廣，真木俊夫，観　公子：食衛誌，**30**，438-443，1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 137-141, 1992

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第9報*）
—平成3年度—

真木俊夫**, 観公子**, 橋本秀樹**, 二島太一郎**

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (IX)
—1991—

TOSHIO MAKI**, KIMIKO KAN**, HIDEKI HASHIMOTO**
and TAICHIRO NISHIMA**

Keywords：化学性食中毒 chemical food poisoning, もやし soybean sprout, ヒスタミン histamine, カキシメジ *Tricholoma ustale*, エビ shrimp, ウニ sea urchin フグ pufferfish, ラパス貝 *Fissurella maxima* Sowenby

著者らは前報[1-4]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3年度に起きた化学物質による食中毒等事例4件, 自然毒による事例3件について報告し, 今後の食中毒発生防止のための参考に供する. 表1に事例の概要をまとめて示した.

1．もやし入り味噌汁による有症苦情事例

①事件の概要 平成3年7月もやし入り味噌汁とご飯を朝食に取った男性が1時間後から嘔吐, 腹痛を呈した. その後, 夕方まで食事を取らなかったが, 再び嘔吐, 発疹がみられた. 翌日医師の診察を受け急性胃腸炎と診断された. もやし入り味噌汁を飲んだ時, ジャリと音がし金属の固まりに気がついたが少し飲んでしまった. この味噌汁に入っていた固まりが何であるか調べて欲しいと保健所に届け出た.

②試料 もやし入り味噌汁残品と1㎝程度の金属の固まり.

③原因物質の検索 搬入された金属の固まりを検索するために蛍光X線分析機で定性分析を行った. その結果この固まりは鉄であることが判明した. その他の金属は検出されなかった. もやし入り味噌汁についても鉄及び重金属は検出されなかった.

④考察 蛍光X線装置によりこの金属の固まりは鉄片であることが分かった. しかし味噌汁から金属が検出されなかったことは, もやし, 味噌など材料からの由来とは考えにくかった. 恐らく味噌汁を作るときに容器素材の表面が剝がれたものと思われる. 古い容器の使用には注意をして欲しい事例であった.

2．マグロ照り焼きによる有症苦情事例

①事件の概要 平成3年7月飲食店でマグロの照り焼きを喫食した会社員3名が1時間後から吐気, 下痢及び発疹などヒスタミン様中毒症状を呈した.

②試料 マグロ照り焼き残品, 同ロット品及び豚肉の幸子味噌炒め.

③原因物質の検索 中毒はヒスタミン様症状に似ていた. そこで薄層クロマトグラフィーによるヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンの定性分析, これらの物質を液体クロマトグラフィーで定量分析を行った. 残品はヒスタミン450mg%, 同ロット品490mg%を得た. カダベリンは30mg%, 43mg%, チラミンは5mg%, 10mg%がそれぞれ検出された. プトレシン, スペルミジンは検出されなかった. 豚肉の幸子味噌炒めからはいずれも検出されなかった.

④考察 ヒスタミンによる中毒最少発症量は約50mg%と推定されている. しかし新鮮なマグロ等はヒスタミンの生成が認められないことから, 今回検出された高濃度のヒスタミンがアレルギー様中毒を誘発させたものと推定した. 同時に極めて鮮度の悪い状態であったと言えよう.

この飲食店では当日マグロ照り焼き10食が出ていたが,

---

*第8報, 東京衛研年報, **42**, 147-151, 1991.

**東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

表1．平成3年度に発生した化学性食中毒等事件の概要

No.	発生年月	患者数/喫食者数	原因食品	原因物質
1.	平成3年7月	1/1	もやし入り味噌汁	鉄
2.	7月	3/3	マグロ照り焼き	ヒスタミン
3.	10月	2/2	カキシメジ	自然毒
4.	10月	2/2	ムキエビ	鮮度低下
5.	4年1月	2/2	生ウニ	鮮度低下
6.	2月	1/1	魚肝，卵巣，胃内容物	フグ毒？
7.	3年4月	2/2	アワビ味付け	不明

そのうち3食分が事件に関与した．残りの7食分を喫食したヒトが中毒症状を呈したかどうか分からない．7食分のマグロだけが仕入その他において3食分と異なるマグロとは考えにくい．恐らく事件の届け出をしていないためと考えられる．毎年ヒスタミンによる食中毒が発生して後を断たないが，いずれにしても高濃度のヒスタミンが生成していたことは，保存状態に問題点を残す事例であった．

3．キノコによる食中毒事例

①事件の概要 平成3年10月他県の山にキノコ狩りに行った2名が，5種類のキノコ(キシメジ，クリタケ，サマツタケ，チョコタケ，マツタケ)を採集し家に持ち帰った．その2名がサマツタケと称するキノコを味噌汁に入れ，ナスの揚げ物と一緒に喫食したところ，老女が1時間後から吐気，嘔吐及び激しい下痢を呈し入院した．他の女性も4時間後から同様な症状を呈した．採集した時の残品キノコがあるので鑑定して欲しいと保健所に届け出た．

②試料 大型の残品キノコ1本．

③原因物質の検索 症状を呈したのは2名中2名であったことから，採集した時に毒キノコが混入していた疑いがもたれた．搬入されたキノコは茎の長さ10cm，傘の直径5cm程のキノコであった．傘はやや粘りのある茶褐色，無臭，ヒダは湾生，茎は中空，ツバ，ツボはない．さらに胞子及び菌糸について顕微鏡学的に調べた．胞子は広卵形，菌糸は，かすがい突起を有し非アミロイド[5]であった．以上の結果と中毒症状とを考え合わせ，残品のキノコをカキシメジと断定した．

④考察 搬入されたキノコは特徴をもたない地味なキノコであることから，キシメジ科と推定した．またかなり新鮮な状態に保たれていたので胞子を採集するには，他のキノコの混ざりもなく極めて都合がよかった．採集した5種類のキノコについて誰が鑑定したかはっきりしないが，このキノコはサマツタケと言って，大変珍しく美味なキノコであると採集現場で教えた人がいた．この話しを信じたことがそもそも中毒事件につながった．和歌山県にサマツをサマツタケと方言[6]で呼ぶ地方がある．今回方言で呼んだのか，それとも他のキノコと間違えたのかのどちらかと思われる．いずれにしてもサマツタケという和名のキノコは公式に存在しない．

カキシメジは我が国のキノコ中毒事件においてツキヨタケ，クサウラベニタケに次いで第3位と多い．中毒症状は吐気，嘔吐，下痢など胃腸障害を起こすが，毒成分についてはなお不明である．幸いこのキノコによる死亡者はいない．しかしキノコの鑑定に当たってはよく精通している人から学び，不明なキノコはできるだけ口にしないよう注意を呼びかけたい事例であった．

4．ムキエビによる有症苦情事例

①事件の概要 平成3年10月某スーパーでお好み焼きと焼きソバ1セットを購入し，夫婦で喫食したところ，妻は1時間後から嘔吐，下痢，目まい，さらに顔と胸に発疹を呈し，夫は5時間後から嘔吐，発疹を呈した．医師の診察を受け夫は入院した．お好み焼きから異臭がしたと保健所に届け出た．

②試料 お好み焼きのエビ残品及びムキエビの解凍参考品．

③原因物質の検索 喫食した時に腐敗臭を訴えていた．しかしお好み焼きのエビ残品は，その他の具と混ぜ合わせて焼いてあるので異臭を認めることは困難であった．ムキエビ解凍参考品は鮮度低下臭を認めた．そこで揮発性塩基窒素(VBN)を測定したところ，お好み焼き残品は14mg％，参考品は39mg％であった．ヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンは検出されなかった．

④考察 ムキエビ解凍品の臭及びVBN値から腐敗の初期状態を超えていることが確認された．お好み焼きの中にあるエビは加熱調理済みであったためか，VBNは高い値にはならなかった．嘔吐，下痢など主な中毒症状の他に激しい目まいが見られたが，この症状は二次的な

要因によるものと思われる．また2名とも発疹が見られたがヒスタミンの生成量には問題はなかった．ムキエビを解凍する際，調理場での長時間の放置に問題を残す事例であった．

5．生ウニによる有症苦情事例

①事件の概要 平成4年1月会社員2名が昼食に生ウニご飯を喫食したところ，1名が1時間後から腹痛，その後下痢，嘔吐，頭痛を呈した．他の1名は生ウニだけを喫食したが，同様に1時間後から腹痛，その後下痢を呈した．この生ウニがおかしいと保健所に届けられた．

②試料 残品と同ロット参考品の生ウニ．

③原因物質の検索 搬入された生ウニは，残品及び参考品ともすでにかた崩れを起こし鮮度低下臭を認めた．VBNは87mg％，不揮発性腐敗アミンのうちカダベリンは84mg％，プトレシンは97mg％であった，ヒスタミン，チラミン，スペルミジンは検出されなかった．

④考察 VBN値は参考品であるにもかかわらず，高い値を得た．正常な生もののVBNは10～15mg％を超えるようなことはないので，腐敗がかなり進んでいることを示した．ヒスタミンは検出されなかったが，他の不揮発性腐敗アミンが高濃度に検出され極めて悪い状態であった．ウニなど生ものは時間と共に急激に新鮮さを失っていくので，仕入から販売までの期間の保存には充分注意が必要な事例であった．

6．フグ様の煮物喫食による1事例

①事件の概要 平成4年2月フグ様の煮物を喫食した老人が激しい嘔吐，全身の痺れを呈し，救急車で病院に運ばれ死亡した．原因追求のため，残品についてフグ毒の検査を願いたいと管轄の警察から保健所を通して依頼があった．

②試料 パックに入った魚の煮物残品及び患者から採取した胃内容物．

③原因物質の検索 搬入された残品は形態的に2種類に分けられた．1種はややかた崩れを起こした肝様であり，もう1種はたらこ様であった．患者はどちらを喫食したか不明だったので，別々にフグ毒の試験を行った．後日，患者から採取した胃内容物が搬入された．ほとんど溶液に近い状態でpHは8であった(ペーハー試験紙による)．フグ毒は肝様が169MU/g，卵巣様117MU/g，胃内容物19.5MU/gが検出された．

④考察 患者は魚の煮物を喫食した直後から口の回りが痺れ出し，次に全身へと広がった．同時に激しい嘔吐がみられフグによる中毒症状に極めて似ていた．夫人は近所の医師を訪ねたが休診で，救急車を要請して病院に運んだ．しかし診察をした医師によると患者はすでに死亡していたと述べている．死因究明のため遺体は監察医務院で解剖された．胃中の消化物はほとんどなく，液状胃内容物のpHはすでに弱アルカリ性を示した．かなりの嘔吐であったことが示唆された．後日胃内容物のフグ毒検査の追加があった際，pHを調べたところ監察医務院と同様弱アルカリ性であった．テトロドトキシンは酢酸酸性でかなり安定だが，アルカリ性になると分解を起こすことが知られている．従って胃内容物のフグ毒はもはや検出されないのではないかと考えられたが，それでも19.5MU/gを検出した．かなりの煮物を喫食したことが推定される．

夫人によると夫はフグ(？)の白子をどこかで購入して来てはよく食べていた．今回も購入して来た白子を自分で調理し，1人で喫食したと説明をしている．しかしどこの店で購入したのか夫人は分らないと言っている．そこでこの魚の煮物が白子であるかどうか，残品の一部を市場衛生検査所で鑑定を行った．肝と卵巣が推定される旨の回答が得られ，我々が推定していた結果と一致した．さらに得られた毒力，卵巣様の外観，大きさからフグの内臓が疑われた．フグ毒によるヒトの最小致死量は10,000MU/gと推定[7]されているので，今回のフグ様の煮物を60g程度喫食すれば命をおとすことになる．

いずれにしてもフグの内臓等が自由に手に入ることは絶対にあり得ない．現実に起きてしまった以上は，これまで以上に監視を強化する必要のある事例であった．

7．ラパス貝による食中毒様事例集

①事件の概要 平成3年4月都下でアワビ味付け(通称ラパス貝)を喫食した男性が40分後から吐気，嘔吐，腹痛，水様性下痢を呈する事件が発生した．後日，妻も喫食したところ同様な症状を呈したと保健所に届け出た．その後，これに酷似する事件が散発しているので，原因物質が解明されていない現在だが，今後の監視強化並びに再発防止等のため，過去の事例も含めてここに紹介することにした．表2にラパス貝による事件の概要をまとめた．事件は昭和62年6月から平成3年11月までに15件発生している．アワビ味付けとして販売されていたラパス貝を喫食したものばかりである．

②試料 パック入りアワビ味付け(チリ産ラパス貝)．

③原因物質 潜伏時間は30分から数時間，共通の中毒症状は嘔吐，下痢，かゆみ，さらに重症の場合は動悸，呼吸困難が見られる．現在までにヒスタミン，テトラミン，不揮発性腐敗アミン，グルタミン酸，麻痺性貝毒，下痢性貝毒試験を行ったが，直接原因物質につながる結果は

表2．ラパス貝喫食による中毒様事件の概要

発生年月	原因食品名	発症時間	患者数/喫食者数	症　状
昭和62年6月	アワビ煮付け(ラパス貝)	3	2/3	かゆみ，頭痛，発熱，アレルギー
8月	ホタテ(乾燥)(ラパス貝？)	1～2	3/3	嘔吐，下痢，腹痛
63年6月	アワビ味付け(ラパス貝)	1	1/2	嘔吐，発疹，息苦しい，顔面蒼白，視力異常，歩行困難
平成元年5月	アワビ味付け(ラパス貝)	0.5	1/1	腹痛，水様性下痢，顔のむくみ，湿疹
5月	アワビめし(ラパス貝)	?	11/27	嘔吐，腹痛，下痢，発疹，息苦しい
11月	アワビ味付け(ラパス貝)	2～3	1/1	発疹，呼吸困難
11月	アワビ味付け(ラパス貝)	2～3	1/1	発疹，呼吸困難
2年10月	煮ガイ(ラパス貝)	2～3	2/2	嘔吐，腹痛，発疹，頭痛，発熱
12月	ツブ(？)	15	1/1	下痢
3年1月	アワビ煮付け(ラパス貝)	2	2/2	嘔吐，下痢，発熱
4月	アワビ味付け(ラパス貝)	0.7	1/1	嘔吐，腹痛，かゆみ
5月	マツブ貝(ラパス貝)	4	4/4	視力衰退，足のふらつき
7月	(ラパス貝)	?	2/2	かゆみ，顔のむくみ，目の充血，呼吸困難
11月	アワビ味付け(ラパス貝)	6	1/2	嘔吐，腹痛，軟便，膨満感，胸が苦しい
11月	アワビ煮付け(ラパス貝)	0.5	2/2	動悸，呼吸困難

得られていない．

④考察　ラパス貝はスソキレガイ超科スカシガイ属の草食性貝で，ペルーからチリに至るまで分布し潮間帯の岩礁に生息している[8]．前田らが報告[9]しているラパス貝は*Fissurella maxima* Sowerby(和名ダイオウスカシガイ)を当てている．英語一般名 grand keyhole limpet である．このダイオウスカシガイを含めた数種の貝殻が“傘”の形をしていることからラパス貝(Lapa 又は Lapas はスペイン語で傘の意味)と称しており，特定の貝を指してラパス貝と呼んではいない．従って分類学上から見てやや未確定な種がまだ存在するようだ．我が国に輸入されるラパス貝には近種の貝が混在していると思われる．しかしチリアワビと称するロコ貝(アワビモドキ)と混同され易いが，ロコ貝はアクキガイ科，コンコレパス属の肉食性貝でラパス貝とは別種である[10]．

中毒はやや激しいアレルギー様症状を呈する．森川らはラパス貝に含まれるヘモシアニンがアレルゲンであると述べている．アメリカ，特にハワイでもこの種の貝による中毒が57件発生している．FDA もヒスタミン等の検査を実施しているが原因物質の解明までには至っていない．

東京都以外では群馬県14件，静岡県2件，長野県2件，九州3件，香川県1件(死亡原因の疑い)が発生している．本事件は極端に多発しているわけではないが，重症の場合は呼吸困難におち入り，生命に係わる中毒である．原因物質を明らかにするには，今後の研究を待たねばならないが，事件がこれ以上拡大しないのよう監視を強化する必要のある事例であった．

以上，平成3年度に起きた化学性食中毒等のうち，もやし入り味噌汁による有症苦情事例，マグロ照り焼にきによる有症苦情事例，キノコによる食中毒事例，ムキエビによる有症苦情事例，生ウニによる有症苦情事例，フグ様の煮物喫食による1事例，ラパス貝による食中毒様事例の7事例を取り上げた．これらの調査は衛生局生活環境部食品保健課，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，他：東京衛研年報，**38**，229-232，1987.
2）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，他：東京衛研年報，**39**，126-129，1988.
3）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，他：東京衛研年報，**40**，163-168，1989.
4）真木俊夫，観　公子，永山敏廣，他：東京衛研年報，**41**，108-112，1990.
5）今関六也，本郷次雄：原色日本新菌類図鑑(Ⅰ)，79，1991　保育社，東京.
6）松川　仁：キノコ方言原寸原色図譜，133，1980，東京新聞出版局，東京.
7）衛生試験法・注解：日本薬学会編，420，1990，金原出版，東京.
8）アボット，R. T.，ダンス，S. P.，波部忠重，奥谷喬

司監訳：世界海産貝類大図鑑，32，1985，平凡社，東京.
9）前田昇三，森川昭廣，加藤政彦，他：アレルギー，**40**(11)，1415-1420，1991.
10）第7回有毒微生物国際シンポジウム，微生物汚染による食品の安全性に関する緊急の問題：食品衛生研究，**42**(3)，29，1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 142-148, 1992

輸入食品中の放射能濃度（第3報*）
—平成3年度—

観　公子**, 真木俊夫**, 橋本秀樹**, 川合由華**, 二島太一郎**

Radioactive Contamination in Imported Foods (Ⅲ)
— Apr.1991 ～ Mar.1992 —

KIMIKO KAN**, TOSHIO MAKI**, HIDIKI HASHIMOTO**,
YUKA KAWAI** and TAICHIRO NISHIMA**

Keywords：チェルノブイリ原発事故 Chernobyl reactor accident, 放射能汚染 radioactive contamination, 輸入食品 imported foods, 調査 survey, セシウム cesium, きのこ mushroom, 原産国 country of origin, 核種比 nuclide ratio, NaI (Tl) シンチレーションディテクタ NaI (Tl) scintillation detector

緒　言

1986年のチェルノブイリ原発事故を原因とする食品の放射能汚染が問題となり，著者らは，昭和63年度からNaI (Tl) シンチレーションディテクターを用いた方法で，都内市販食品のうち主に輸入食品について放射能汚染実態調査を行ってきた[1,2]．ひき続き今回は，平成3年度における放射能の調査結果を報告する．

実験方法

1．試料

1991年4月から1992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[1,2]に従った．

3．試料の調整

前報[1,2]に従った．

4．分析方法

前報[1,2]に従った．

結果及び考察

1．放射能汚染状況

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3試料であり，厚生省の暫定基準値370Bq/Kg 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

放射能濃度別の試料数及び検出率を表1に示した．

放射能濃度が51～100Bq/Kg のものが1試料(0.3%) 101 ～200Bq/Kg のものが2試料(0.6%)であった．また，201Bq/Kg 以上のものはなく，50Bq/Kg 以下のものは336試料で総試料の99.1%を占めていた．

50Bq/Kg を超えた試料数は平成2年度の7試料(2.1%)[2]と比較すると今年度は3試料(0.9%)とチェルノブイリ事故からの経過に伴い，試料数及び検出率共に減少していた．

このことから，今後，50Bq/Kg を超えて検出される試料の割合はさらに減少していくものと思われる．

2）食品群別

食品群別の検出状況を表2に，総検査試料の食品群別割合を図1に示した．

食品を14群に分類してみたところ，50Bq/Kg を超えて検出されたものは野菜・果実・加工品群の3試料のみで，野菜・果実・加工品群の4.9%，総試料の0.9%を占めていた．この群にはセシウムを蓄積し易いキノコが含まれており，検出数に影響していたものと思われる．

しかし，前年度まで検出数，検出率が高かった香辛料・ハーブ類群において今年度50Bq/Kg を超えて検出されたものは見られなかった．このことはチェルノブイ

＊第2報，東京衛研年報，**42**, 152-161, 1991.

＊＊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 Healty
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan

表1．放射能濃度別の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	336	99.1
51～100	1	0.3
101～200	2	0.6
計	339	100

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	21	0	0
2	野菜・果実・加工品	61	3	4.9
3	食肉・食肉製品	12	0	0
4	菓子類	32	0	0
5	乳・乳製品	40	0	0
6	蜂蜜	11	0	0
7	穀類	10	0	0
8	ナッツ類	12	0	0
9	酒類	30	0	0
10	魚介・加工品	19	0	0
11	ジャム・マーマレード類	54	0	0
12	油脂類	4	0	0
13	調味料	0	0	0
14	その他	33	0	0
	計	339	3	0.9

＊：^{134}Cs 及び ^{137}Cs の放射能濃度の合計が50Bq/Kgを超えた試料数

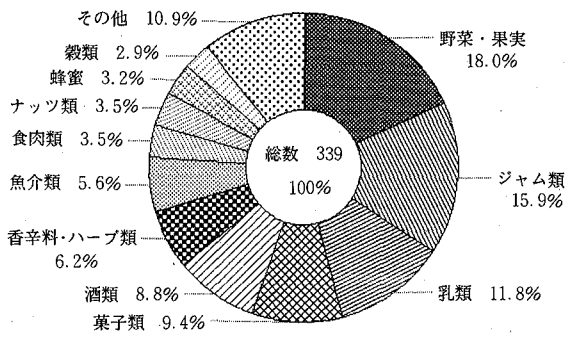


図1．放射能検査試料の食品群別割合

リ事故後6年が経過しており放射能汚染の影響も和らいできているものと考える．

ジャム・マーマレード類は54試料(約16%)，乳・乳製品は40試料(約12%)と比較的多く検査を行ったが50Bq/Kgを超えて検出されるものはなかった．

一方，今年，ブラジルにおいて，チェルノブイリ事故直後に輸入された牛肉で，放射能汚染の可能性があったため冷蔵保存されていたものの販売が許可された事があった．このことから，長期保存のできる食品については今後監視を強化する必要があるものと考える．

3）原産国別

原産国別の検査状況を表3に，検査資料の国別割合を図2に示した．

50Bq/Kgを超えて検出された3試料すべて原産国はフランスであった．これはフランス産の5.8%，総試料の0.9%を占めていた．フランスはチェルノブイリ事故による放射能汚染の高かった国であり，検査試料数もアメリカに次いで多く，検出数に影響したものと思われる．

原産国が判明している試料の内，約半数はチェルノブイリ事故放射能汚染の少なかった国のものであり，いずれからも検出されなかった．このことは放射能汚染食品が放射能低汚染国を経由して，わが国に輸入されていなかったものと考えられた．

わが国の食品輸入状況において，厚生省の調査した「輸入食品1990」[3]によるとソ連からのものは届出数量で第47位836件と比較的少なく，今年度は検査を実施しなかった．しかし，事故当事国であり，小さな原子力発電所の事故が時折報道されることから，旧ソ連産の食品も検査する必要があると考える．

4）放射能濃度が50Bq/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，セシウム-134及びセシウム-137の合計が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．

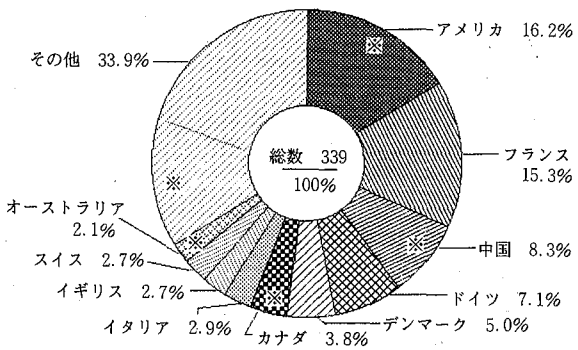


図2．放射能検査試料の国別割合
※：チェルノブイリ事故放射能汚染の比較的少なかった国

表3．国別の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*
アメリカ	55	0	メキシコ	2	0
フランス	52	3	トルコ	2	0
中国	28	0	ハンガリー	2	0
ドイツ	24	0	ユーゴスラビア	2	0
デンマーク	17	0	ギリシャ	2	0
カナダ	13	0	チェコスロバキア	2	0
イタリア	10	0	ノルウェー	2	0
イギリス	9	0	スウェーデン	2	0
スイス	9	0	ニュージーランド	1	0
オーストラリア	7	0	南アフリカ共和国	1	0
オランダ	6	0	ペルー	1	0
日本	6	0	韓国	1	0
ベルギー	5	0	ブルガリア	1	0
マレーシア	4	0	香港	1	0
タイ	4	0	ミャンマー	1	0
インド	4	0	キプロス	1	0
スペイン	4	0	シンガポール	1	0
スーダン	3	0	オーストリア	1	0
アルゼンチン	3	0	ブラジル	1	0
ポルトガル	3	0	ポーランド	1	0
フィリピン	3	0	フィンランド	1	0
エジプト	3	0	イスラエル	1	0
パキスタン	2	0	不明	35	0

*：^{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
：チェルノブイリ事故放射能汚染の比較的少なかった国

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	ジロル(アンズタケ)(生)	150	10	140	フランス	91.10.06
2	ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生)	138	8	130	フランス	91.10.06
3	セップ(ヤマドリタケ)(冷凍)	61			フランス	91.02.25

50Bq/Kgを超えた試料は全てキノコであった．これら試料のキノコは生のものであったが，これらを成分分析表[4]によるキノコの水分含量約90%とし，乾燥重量で試算するとそれぞれ1495Bq/Kg，1380Bq/Kg，610Bq/Kgとなり，暫定基準値の370Bq/Kgを大幅に超えてしまう．大量に摂取しないように注意する必要があると考える．

また，一般にキノコは土壌中のセシウムを大量に吸収し蓄積する事が判明している[5,6]．乾燥キノコ中には，セシウム同属体のカリウムが1～2%と比較的多く含まれており[4]，セシウムの取り込みに関与していると思われる．さらに，これらのキノコはセシウム-134が検出されていることから，チェルノブイリ事故によって汚染された土壌から採れたものと思われる．

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から放射能核種^{134}Cs及び^{137}Csを比較してみると^{134}Csと^{137}Csの比は事故後5年経った1991年では1：15と1：16であった．本来，放射能核種の半減期から考えると，事故当時1：2であった^{134}Csと^{137}Csの比は5年後では，およそ1：10のはずである．しかしこの様に^{137}Csの割合が多くなっている事は過去の核実験や

表5．放射能濃度が25Bq/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	シナモン	35	中国	91.03.10
2	セップ(ヤマドリタケ)(冷凍)	31	フランス	91.08.05
3	カルワイ	31	不明	不明
4	トロンペット(フロラッパタケ)(生)	29	フランス	91.10.06
5	キャラウェイシード	29	不明	92.02.27
6	セップ エクストラ(ヤマドリタケ)(生)	28	フランス	91.10.06
7	ペパーミント	28	ブルガリア	91.04.17
8	シャントレル(アンズタケの一種)(生)	26	フランス	92.02.23
9	ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生)	26	フランス	92.02.23
10	セイジ	25	キリシャ	91.08.20
11	ハイビスカス	25	中国	91.07.22

原子力利用の環境汚染により影響が考えられた．

50Bq/Kgを超えて検出されたこれらの試料を写真1から3に示した．

6）放射能濃度が25Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料

放射能濃度が25Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料の内訳を表5に示した．

食品中の低濃度放射能を調査するために，50Bq/Kg以下についても測定を行い，各試料の重量及び測定時間から算出し，各試料の検出限界値までの値を示した．

放射能濃度が25Bq/Kg以上50Bq/Kg以下の試料は香辛料とキノコで占められていた．香辛料は50Bq/Kgを超えて検出されるものはなかったものの，50Bq/Kg以下25Bq/Kg以上で検出されるものが比較的多かった．

しかし，事故の経過につれ汚染度も減少している事がわかった．今後，原子力施設の事故等が起こらない限り放射能汚染された食品はさらに減少していくものと思われる．

まとめ

1991年4月から1992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3試料(0.9%)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．

50Bq/Kgを超えて検出された試料はキノコ類の3試料であり，原産国は全てフランスであった．放射能濃度は各々150Bq/Kg，138Bq/Kg及び61Bq/Kgであった．

150Bq/Kg及び138Bq/Kgを検出した試料のセシウム核種割合は^{134}Cs：^{137}Csの比が1：15及び1：16であった．

放射能濃度が25Bq/Kgから50Bq/Kgの試料は香辛料・ハーブが6試料，キノコが5試料であった．

平成3年度における輸入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，前年度と比較し，50Bq/Kgを超えて検出される食品は減少していた．

前年度までは，香辛料等直接放射能落下物の混入が考えられる試料からの検出が多かったのに比べ，今年度検出されたものは，土壌からの移行が考えられるキノコであった．このことから，今後，汚染土壌から生産され，セシウムを取り込み易い農産物，及びそれらを飼料として生産される畜産物について放射能濃度調査を行っていく必要があるものと考える．

写真の説明

1．ジロル(アンズタケ)(生) Girolles

2．ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生) Pieds de Mouton

3．セップ(ヤトドリタケ)(冷凍) Cepes

文献

1）観 公子，真木俊夫，永山敏廣，他：東京衛研年報，**41**，113-118，1990.

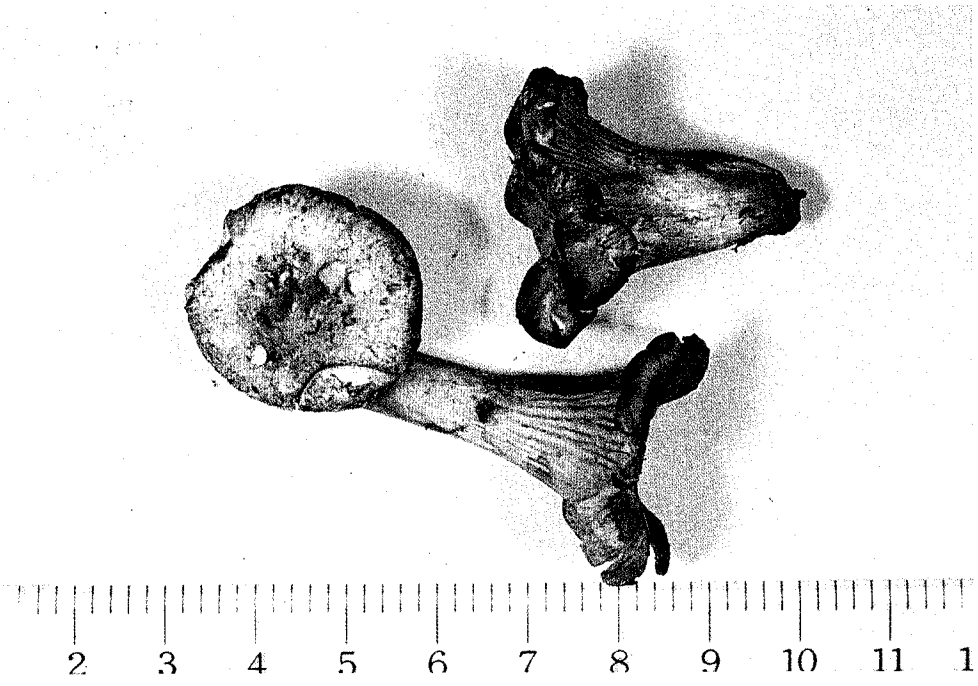
2）観 公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**42**，152-161，1991.

3）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室 厚生省輸入食品衛生監視員協議会，輸入食品1990，1991，㈳日本食品衛生協会，東京.

4）科学技術庁資源調査会，四訂日本食品標準成分表，1988，大蔵省印刷局，東京.

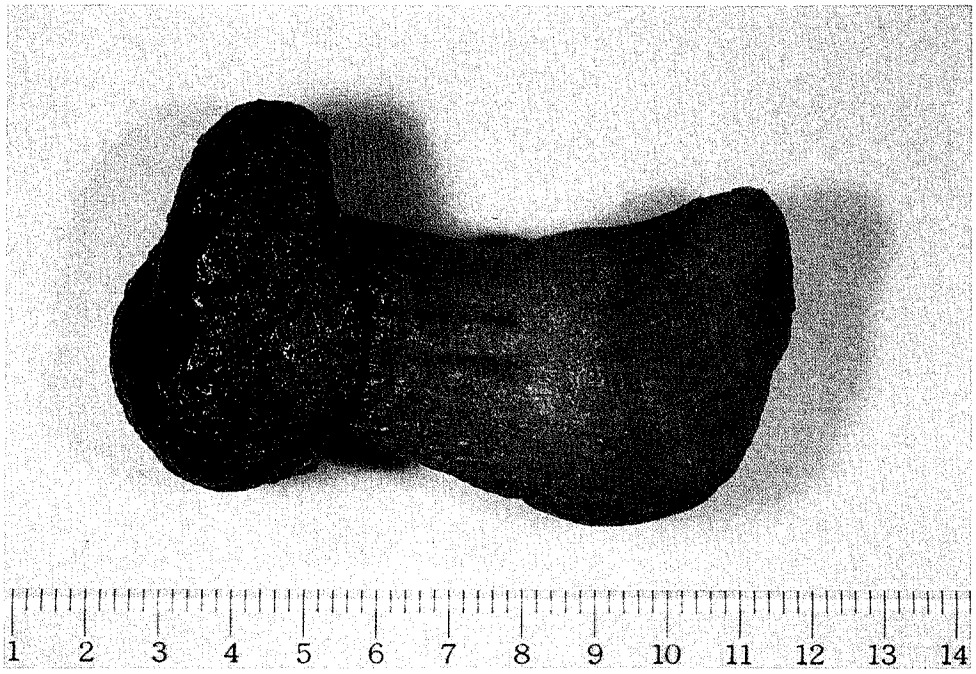
5）Korky J．k．, Kowaiki L.：*J. Agric. Fd. Chem.*, **37**. 568-569，1989.

6）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.



1

2



3

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 149-154, 1992

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第3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**, 植松洋子**
中島和雄**, 風間成孔**

Survey on Quality of Enzyme Preparations used in Food Processing (Ⅲ)
Measurement of Enzyme Activities and Analysis of Organic Subsidiaries in Enzyme Preparations

MASAKO HIROKADO**, KEIKO HIRATA**, YOKO UEMATSU**,
KAZUO NAKAJIMA** and MASAYOSHI KAZAMA**

Keywords：酵素製剤 enzyme preparations, アミラーゼ amylase, プロテアーゼ protease, セルラーゼ cellulase, ペクチナーゼ pectinase, リパーゼ lipase, 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．しかし，その品質の実態は明らかにされていない．また食品添加物としての公的な品質規格も全く設定されていない．

そこで我々は品質規格を作成するための基礎資料とするため昨年度に引続き，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3年度に酵素製剤製造メーカー18社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36種，プロテアーゼ25種，ペクチナーゼ9種，セルラーゼ7種，リパーゼ6種，ヘミセルラーゼ5種，ラクターゼ4種，レンネット2種，インベルターゼ，カタラーゼ，α－グルコシダーゼ，デキストラナーゼ，ナリンギナーゼ，ヘスペリジナーゼ，シクロデキストリントランスフェラーゼ各々1種の計101検体である．

Ⅱ．試薬及び試液：アミラーゼ(α－，β－，グルコー)，プロテアーゼ，リパーゼの活性試験には，前報[1]と同様のものを用いた．また他の試験用試液は全て日本薬局方及び酵素製剤製造メーカーの社内規格(以下社内規格)にしたがって調整し，試薬はJIS特級品を用いた．

Ⅲ．装置及び条件

1．モノード式振とう垣温槽：タイテック製

2．その他は前報[1]と同様の機器を用いた．

Ⅳ．実験操作法

1．活性試験法

1)アミラーゼのデンプン糊精化力試験：表1の条件でα－アミラーゼがバレイショデンプンに作用するとき，直鎖成分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した．全部の検体について，基質，温度，反応時間，単位を統一し，pHおよび試料調製は一部社内規格を用いた．単位は1分間にバレイショデンプンのヨウ素呈色の青色を10%減少させる酵素力を糊精化力の1単位とした．

2）アミラーゼのデンプン糖化力試験：表1の条件で，β－アミラーゼ，グルコアミラーゼがデンプンに作用するとき，生成してくる還元糖をソモギ法で測定した．全

---

*第2報，東京衛研年報，42，170-175，1991

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

表1．酵素活性試験条件

酵素名	活性試験法	基質	pH	温度	時間(分)
アラミラーゼ					
α－アラミラーゼ	デンプン糊精化力	1％バレイショデンプン	5.0,5.6,6.0	40	10
β－アラミラーゼ	デンプン糖化力	0.5％可溶性デンプン	5.5	40	30
グルコアミラーゼ	デンプン糖化力	0.5％可溶性デンプン	4.5	40	30
プルラナーゼ	プルラン糖化力	0.4％プルラン	5.0	40	30
プロテアーゼ					
酸性プロテアーゼ	蛋白消化力	0.6％カゼイン	2.7,3.0	30,37	10
中性プロテアーゼ	蛋白消化力	0.6,1.0,1.5％カゼイン	6.0,7.0,7.2	30,35,37	10,60
アルカリ性プロテアーゼ	蛋白消化力	0.6,1.5％カゼイン	7.5,8.0,10	30,37	10,60
リパーゼ	脂肪消化力	オリーブ油，トリブチン	5.6,6.0,7.0	30,37	20,30,60
ラクターゼ	乳糖分解力	0.17,0.19,0.20％オルトフェニル-β-D-ガラクトピラノシド 7.13％乳糖	4.5,6.5	30,37	10.15.30
セルラーゼ	繊維素糖化力	0.5％カルボキシメチルセルロースナトリウム	3.6,4.0,4.8	40	
	繊維素崩壊力	1 cm×1 cmろ紙	4.0,5.0	40	30
ヘミセルラーゼ	キシラン糖化力	0.5％キシラン	3.5,4.5	40	10
ペクチナーゼ	ペクチン糖化力	0.65％ペクチン	3.5,4.0,5.0	40	60
インベルターゼ	インベルターゼ力	20％ショ糖	5.0	30	10
カタラーゼ	カタラーゼ力	0.0375％過酸化水素	7.0	30	5
シクロデキストリングルコシルトランスフェラーゼ	デンプン糊精化力	1％バレイショデンプン	4.5	40	30
デキストラナーゼ	デキストラナーゼ力	2.5％デキストラン	5.1	40	30
トランスグルコシダーゼ	トランスグルコシダーゼ力	2％α-メチル-D-グルコシド	5.0	40	60
ナリンギナーゼ	ナリンギナーゼ力	0.1％ナリンギン	4	40	60

部の検体について，基質，pH，温度，反応時間，糖化力単位を統一し，試料調製は社内規格に従った．単位は1分間に1 mgのグルコースに相当する還元力の増加をもたらす酵素量を1糖化力単位とした．

3）プルラナーゼのプルラン糖化力試験：表1の条件で，プルラナーゼがプルランに作用するとき，生成してくる還元糖をソモギーネルソン法[2]で測定した．単位は1分間に1 μmolのグルコースに相当する還元力の増加をもたらす酵素量を1糖化力単位とした．

4）プロテアーゼの蛋白消化力試験及びリパーゼの脂肪消化力試験： 社内規格のあるものは，社内規格に従い，その他は薬審法[3]に準じて，表1の各条件下で行った．

5）ペクチナーゼのペクチン糖化力試験：表1の条件で，ペクチナーゼがペクチンに作用するとき，生成してくる還元糖を「飼料及び飼料添加物の成分規格」[4]に従って測定した．単位は60分間に1 μmolのガラクツロン酸に相当する還元力の増加をもたらす酵素量を1糖化力単位とした．

6）セルラーゼの繊維素糖化力試験：表1の条件で，セルラーゼがカルボキシメチルセルロースナトリウムに作用するとき，生成してくる還元糖をソモギーネルソン法[2]で測定した．単位は1分間に1 μmolのグルコースに相当する還元力の増加をもたらす酵素量を1繊維素糖化力単位とした．

7）セルラーゼの繊維素崩壊力試験：表1の条件で，セルラーゼがろ紙に作用するとき，ろ紙が完全に崩壊する時間を測定した．振とうは回転数60rpm，振幅60mmの条件で行った．単位は1分間に1 cm×1 cmの大きさの規定のろ紙2枚を完全に崩壊する酵素量を1,000 繊維素崩壊力単位とした．

8）その他の活性試験法：各社の社内規格に従い，表1の条件で行った．

2．有機態窒素定量法：前報[1]に従った．

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．酵素活性試験結果

1．アミラーゼのデンプン糊精化力試験結果

α－アミラーゼ13検体の結果を図1に示した．活性力が2,000以下のものが約7割を占め，10,000以上のものは3検体と少なかった．

2．アミラーゼのデンプン糖化力試験結果

β－アミラーゼ9検体及びグルコアミラーゼ11検体の結果を図2に示した．活性力2,000 以下のものが，β－アミラーゼ約8割，グルコアミラーゼ約9割と圧倒的に多かった．

3．プロテアーゼの蛋白消化力試験結果

プロテアーゼ25検体中20検体の結果を図3に示した．5検体については，社内規格の活性力単位算出法が異なるのでこのグラフから除いた．活性力は200から183,000まで種々の濃度のものがみられた．なお社内規格に従って試験した15検体は，すべて規格値にほぼ近い値を示した．

4．ペクチナーゼのペクチン糖化力試験結果

ペクチナーゼ9検体の結果を図4に示した．糖化力が10,000以下の検体が約6割あった．これらものについては，各メーカーでは崩壊力試験，粘度法，果汁の清澄試験など他の試験を採用していた．本報では，「飼料及び飼料添加物の成分規格」の糖化力試験[4]を統一試験法として採用したが，検体によっては，適切ではなかったと考えられる．なおペクチナーゼの作用は複雑でいまだ充分明らかにされていない部分もあると言われている[8]．

5．他の酵素の活性試験結果

リパーゼ，ラクターゼなど社内規格に従って試験したものは，すべて社内規格値にほぼ近い値を示した．それ

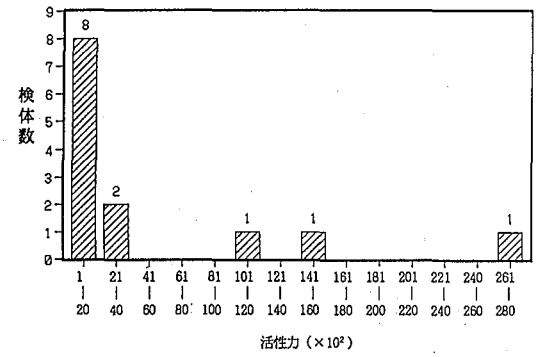


図1．α－アミラーゼ製剤のデンプン糊精化力の頻度図

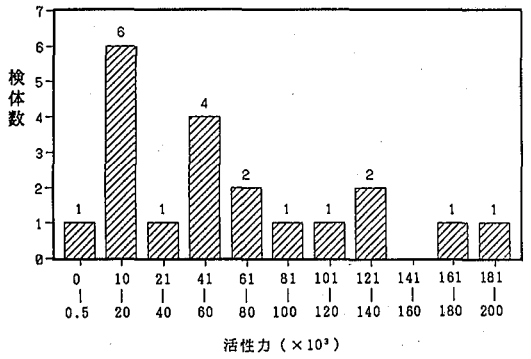


図3．プロテアーゼ製剤の蛋白消化力の頻度図

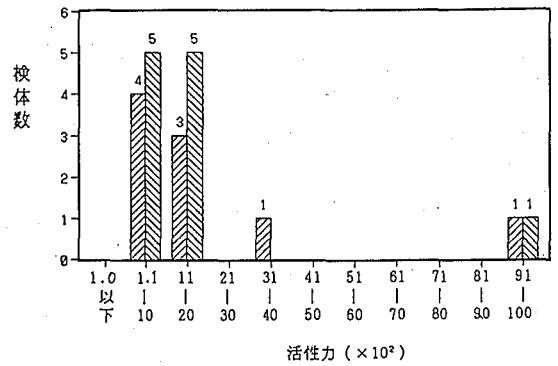


図2．β－アミラーゼおよびグルコアミラーゼ製剤のデンプン糖化力の頻度図

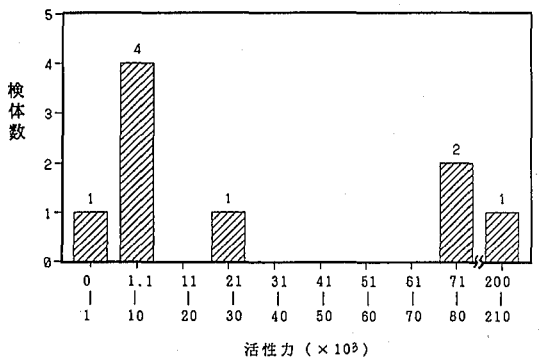


図4．ペクチナーゼ製剤のペクチン糖化力の頻度図

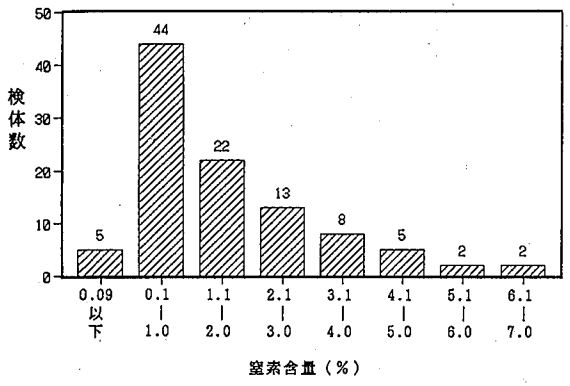


図5．全酵素製剤中の有機態窒素含量の頻度図

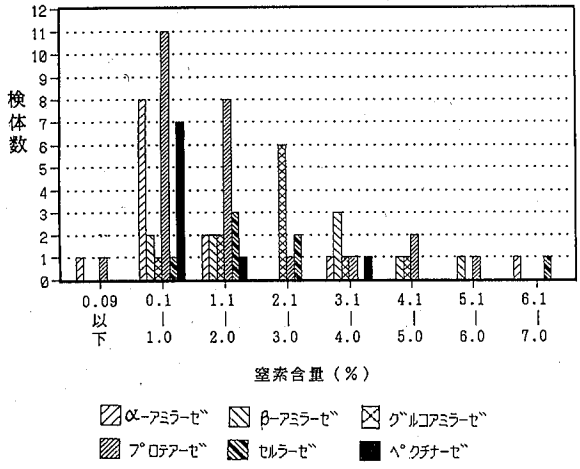


図6．アミラーゼ（α－，β－，グルコー），プロテアーゼ，セルラーゼ，ペクチナーゼ製剤中の有機態窒素含量の頻度図

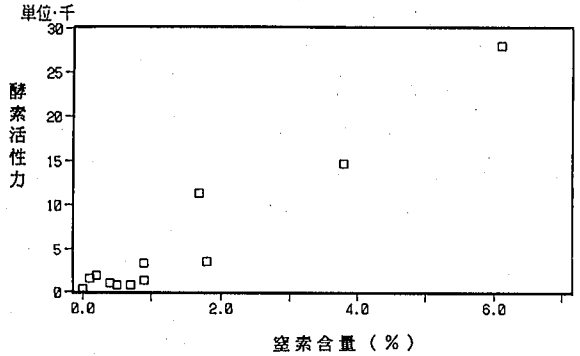


図7．α－アミラーゼ製剤中の有機態窒素含量と酵素活性力の相関図

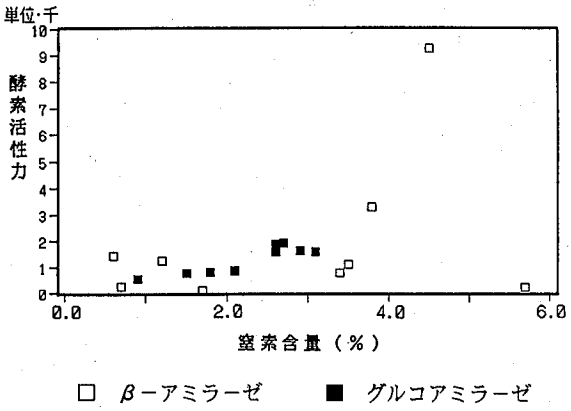


図8．β－アミラーゼ，グルコアミラーゼ製剤中の有機態窒素含量と酵素活性力の相関図

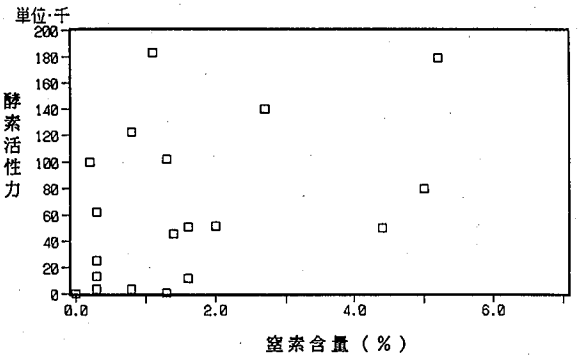


図9．プロテアーゼ製剤中の有機態窒素含量と酵素活性力の相関図

それの酵素について社内法を検討したところ，セルラーゼ，リパーゼ，ラクターゼなどは2種類の基質を用いる必要があった．したがってペクチナーゼと同様，基質特異性などを考慮したうえ，これらの酵素についても，今後は統一試験法の設定に向けて，薬審法[3]，FAO/WHO規格[9]及びFCC規格[10]などを参考にして検討していきたい．

Ⅱ．有機態窒素含量の測定結果

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，有機態窒素の含量を測定した．全酵素及び酵素の種類ごとの結果を図5及び図6（検体数が7以上のもの）に示した．窒素含量2％（蛋白質に換算して約12.5％）以下の検体が全酵素の約7割を占め，2％を超えたものは全酵素の約3割あった．種類別にみると，α－アミラーゼ，プロテアーゼ，ペクチナーゼ，リパーゼでは，2％以下のものが8

割と多かったが，β－アミラーゼ，グルコアミラーゼでは２％以上のものが６割あった．また含量の最高はセルラーゼの6.4％(蛋白質に換算して約40％)であった．なおプロテアーゼの活性力が最も高い検体から，水と溶剤併せて89.3％が検出されている．副剤を全て定量していないため，酵素含量は，100％から89.3％を差し引いた10.7％(窒素として約1.7％)以下であると言える．したがって窒素含量が少なくとも1.7％を超える２割のプロテアーゼ製剤には，酵素以外の窒素含有有機物の残留または添加が考えられる．

また有機態窒素含量と酵素活性力の間の相関をみるために，α－アミラーゼ，β－アミラーゼ，グルコアミラーゼ，プロテアーゼについて相関図を作成し，図７～９に示した．前年度と同様，α－アミラ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く，全体的にも相関が認められた(相関係数0.964)．しかしβ－アミラーゼ，グルコアミラーゼ，プロテアーゼでは，窒素量と活性力の間にほとんど相関は見られなかった．なお，そのほかの酵素については，試験法および単位を統一していないため，窒素含量との相関をみることは出来なかった．通常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，酵素以外の窒素含有有機物(微生物培養の栄養源として使われるふすま，大豆蛋白，脱脂大豆糟など及び食品添加物のカゼイン)の残留または添加の可能性が考えられる．

Ⅲ．副　剤

添加が予想される有機副剤(溶剤および糖類)について分析を行った．なお無機副剤については第４報[7]で報告する．

１．水及び溶剤　液体製剤21検体中の水，エタノール，グリセリン，プロピレングリコールの定量結果を積層グラフにし，図10に示した．これらの含量の合計が50％を超えるものが約８割あった．種類別にみると，全製品から水が38.1～86.1％，５検体からエタノールが0.3～5.5％，５検体からグリセリンが10.2～58.4％，１検体からプロピレングリコールが11.8％検出された．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，製剤への表示が必要であるが，検査した製品のうち表示がないものがほとんどであった．

２．糖類　101検体中の糖類の分析結果を図11および図12に示した．約６割の検体から単糖および二糖の何れかが検出された．ブドウ糖は36検体，乳糖は23検体，麦芽糖が９検体，ショ糖が６検体から検出され，ブドウ糖や乳糖が配合されたものが多かった．単糖及び二糖につ

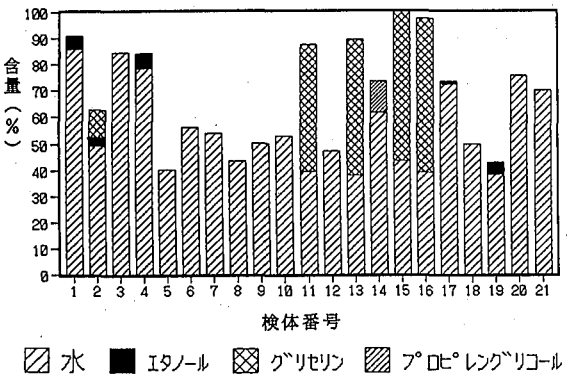


図10．液体製材中の水，エタノール，グリセリン，プロピレングリコール含量
検出限界：エタノール，プロピレングリコールは0.1％　グリセリンは１％

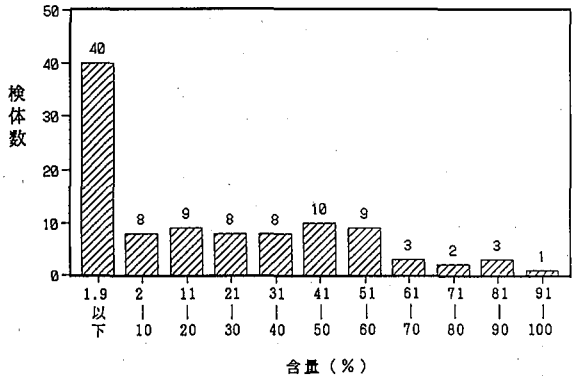


図11．全酵素製剤中の糖類の総含量の頻度図

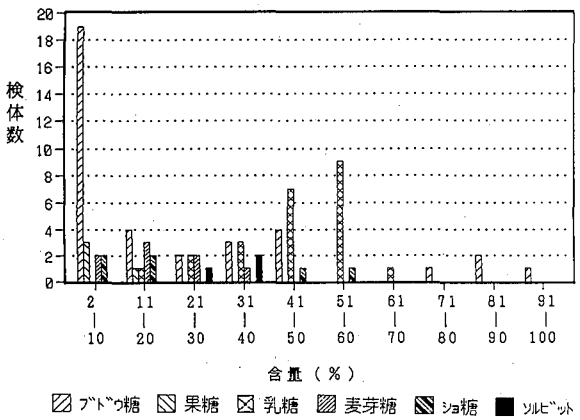


図12．酵素製剤中の糖類別含量の頻度図
検出限界：　2.0％

いては，粉末製品と液体製品の間には特に差はみられなかった．液体製品3検体からソルビットが22.5～34.3%検出された．この場合のソルビットは溶剤の目的で使用されたものと考えられる．ソルビットには表示が義務付けられているが，検査した製品には前年度同様表示がなかった．

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品101検体の酵素活性力の試験及び有機副剤の分析を行った．

1． アミラーゼ(α－，β－，グルコー各アミラーゼ及びプルラナーゼ)，ペクチナーゼの活性試験には各々統一試験法を適用したが，ペクチナーゼの場合は，試験法を統一することは困難であることが判った．

他の酵素については，各社の社内規格に従って試験した結果，すべて社内規格値にほぼ近い値を示した．今後これらについても，基質特異性を考慮し，統一試験法の設定に向けて，薬審法[3]，FAO/WHO 規格[9]及びFCC 規格[10]などを参考にして検討していきたい．

2． 有機態窒素含量を測定した結果，2%以下のものが約7割あった．プロテアーゼ活性が最も高い検体中の酵素含量が，多くても10.7%(窒素として約1.7%)であったことから，窒素含量が少なくとも1.7%を超えたプロテアーゼ製剤には，酵素以外の窒素含有物の混入が考えられる．また窒素含量と酵素活性力との相関をみたところ，α－アミラーゼ以外の酵素では相関がみられなかった．相関のない理由として，やはり酵素以外の窒素含有物の混入が考えられる．

3． 有機副剤を分析結果，ブドウ糖及び乳糖が配合されたものが多かった．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，前年度と同様，表示がないものが多かった．検体入手の段階では，表示義務が曖昧にされていたが，昨年7月に全面表示が義務付けられたため，今後は食品監視指導のもとで，副剤の製剤への表示は徹底されると思われる．

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感謝致します．

文 献

1) 広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：東京衛研年報，**42**，163-169，1991
2) 日本工業標準調査会編：日本工業規格，K7001，1990，日本規格協会発行，東京
3) 日本公定書協会編：改正かぜ薬・解熱鎮痛薬試験法［付録］座薬中の解熱鎮痛薬の定量，221-247，1986，薬業時報社，東京
4) 平成2年3月20日付官報(号外第28号)「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する法令」，厚生省
5) 植松洋子，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**40**，183-186，1989
6) 中島和雄，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**40**，175-177，1989
7) 安野哲子，栗原裕子，萩野周三，他：東京衛研年報，**43**，155-157，1992.
8) 辻阪好夫，山田透明，鶴大典，他：応用酵素学，50-51，177-178，講談社，東京.
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.*, **43**, 155-157, 1992

食品製造用酵素製剤の品質実態調査（第4報*）
製剤中の無機塩類及び不純物の分析

安野哲子**, 栗原裕子***, 荻野周三**
小関正道****, 風間成孔**

Survey on Quality of Enzyme Preparations Used in Food Processing (IV)* Determination of Inorganic Salts, Heavy Metals and Arsenic in Enzyme Preparations

TETSUKO YASUNO**, YUKO KURIHARA***, SHUZO OGINO**,
MASAMICHI KOSEKI**** 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

緒　言

前年度に引き続き食品製造用酵素製剤中の無機塩類及び有害性不純物[1]を分析し，配合添加物の表示の適否，酵素製造用剤の残留，製剤の安全性等について検討したので報告する．なお分析は前年度のカルシウム塩，マグネシウム塩，リン酸塩，アンモニウム塩，塩化物，強熱残留物，重金属，鉛，ヒ素[1]のほか，カリウム塩，硫酸塩，ケイソウ土についても行った．

実験の部

1．試料　平成3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18社，101検体[2]を試料とした．

2．試薬　グルタミン酸脱水素酵素液及びα-ケトグルタール酸ニナトリウム：Boehringer Mannheim 社製．トリエタノールアミン塩酸塩：Merck 社製．還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド：和光純薬工業製，生化学用．その他はすべて和光純薬工業製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，塩素イオン標準液，鉛標準液は前年度と同じ[1]に調製した．カリウム標準液：関東化学製原子吸光分析用カリウム標準原液（1,000 ppm）100 μlに10 %塩化セシウム溶液0.5 mlを加え，水で正確に50 mlとした（カリウム2 μg/ml）．硫酸イオン標準液：硫酸ナトリウム（無水）を105 ℃で4 h乾燥し，硫酸ナトリウム濃度5, 10, 15 μg/mlの水溶液列を調製して，これを硫酸イオン標準液とした．

4．装置及び条件　誘導結合プラズマ発光分光分析装置及びイオンクロマトグラフは前年度と同じ[1]である．自記分光光度計：島津製作所製 UV-240．原子吸光分析装置：Perkin Elmer 社製 2380，分析線 766.5 nm．蛍光X線分析装置：Kevex 社製 0600，管電圧 30 kV，管電流 40 mA，二次ターゲット S，測定時間　100 s．

5．分析方法　カルシウム塩，マグネシウム塩，リン酸塩，塩化物，強熱残留物，重金属，鉛，ヒ素は前年度と同じ[1]方法で分析した．

(1)　アンモニウム塩　食品衛生検査指針[3]中，アンモニア及びその塩類の試験法に従った．

(2)　カリウム塩　塩素イオンを検出した試料について行った．塩化物用検液[1]1.00 mlに10 %塩化セシウム溶液0.5 mlを加え，水で正確に50 mlとして，原子吸光分

＊第3報，東京衛研年報，**43**，149-154，1992.

＊＊東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
＊＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
＊＊＊東京都立豊島病院
＊＊＊＊山脇学園短期大学

析法によりカリウムを定量した．検量線はブランクとカリウム標準液の2点検量線とした．

(3) 硫酸塩　硫酸ナトリウムの配合表示があった試料について行った．塩化物用検液[1]を水で希釈し，イオンクロマトグラフィーにより硫酸イオンを定量した．検量線はブランクと硫酸イオン標準液の4点検量線とした．

(4) ケイソウ土　蛍光X線分析法でケイ素を定性したのち，顕微鏡（200倍）で，ケイソウ土に特有な多孔質のケイソウ骨格を確認した[4]．

結果及び考察

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，強熱残留物，ケイソウ土について，酵素別の分析結果を表1に示した．また，ケイソウ土を除いた各分析項目について，検出量毎の頻度分布を図1に示した．

1．配合添加物と表示　101試料中，無機性添加物の配合表示があったのは，アミラーゼ2試料，プロテアーゼ5試料，ペクチナーゼ1試料の計8試料であった．表示内容は表2に示したとおりである．表示があった添加物については，ほぼ表示どおりの分析結果が得られ，表示内容に間違いがないことが確認された．しかし，表示がなかった4試料からケイソウ土が検出されたほか，カルシウム塩やリン酸塩に関しても，表示がないにもかかわらず，表示のある試料と同等もしくはそれ以上のカルシウムやリンが検出された試料があり，前年度同様[1]，配合添加物の表示が完全に実施されていないことが推察さ

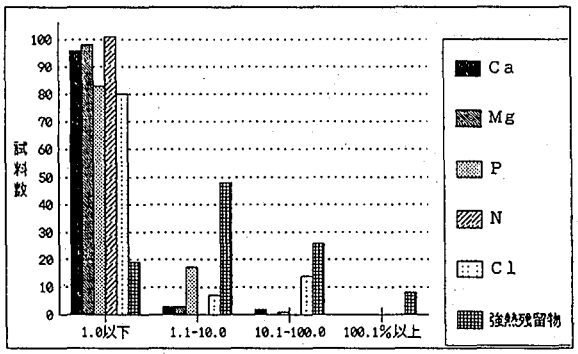


図1．無機塩類の含量レベル

表1．酵素製剤中の無機塩類

酵素名	形状	試料数	カルシウム塩*1 (Ca %)	マグネシウム塩*1 (Mg %)	リン酸塩*1 (P %)	アンモニウム塩*2 (N %)	塩化物*3 (Cl %)	強熱残留物*2 (%)	ケイソウ土
アミラーゼ	液体	11	0.002-0.7	ND-0.03	ND-0.3	ND-0.2	ND-13.1	1.1-27.5	
アミラーゼ	粉末	25	0.004-21.5	ND-1.0	ND-2.6	ND-0.7	ND-38.4	0.4-124.0	+(5試料)
プロテアーゼ	液体	2	0.007-0.07	0.004-0.009	0.04-0.005	ND	ND	0.5-2.2	
プロテアーゼ	粉末	23	0.005-8.3	0.002-2.3	0.004-21.1	ND-0.3	ND-59.4	0.4-127.3	
ペクチナーゼ	粉末	9	0.004-0.1	0.03-0.5	0.04-2.3	ND-0.2	ND	0.4-37.9	+(1試料)
セルラーゼ	液体	1	0.01	0.003	0.05	ND	3.4	7.4	
セルラーゼ	粉末	6	0.01-0.6	0.02-0.2	0.04-1.5	ND-0.2	ND	0.5-17.5	
リパーゼ	液体	1	0.01	0.002	ND	ND	ND	0.3	
リパーゼ	粉末	5	0.02-0.6	0.006-0.3	0.02-1.1	ND-0.5	ND	0.3-11.8	
ヘミセルラーゼ	粉末	5	0.005-0.04	0.01-0.1	0.02-0.3	ND	ND	0.3-73.6	+(1試料)
ラクターゼ	液体	1	0.01	0.002	0.01	ND	ND	2.4	
ラクターゼ	粉末	3	0.006-0.03	0.009-0.2	0.05-0.4	ND	ND	2.2-10.5	
レンネット	粉末	2	0.02-0.04	0.006-0.4	0.01-1.2	ND	ND-53.9	8.5-111.1	
インベルターゼ	液体	1	0.003	0.002	0.004	ND	ND	1.7	
カタラーゼ	液体	1	0.003	ND	0.008	ND	13.4	27.3	
α-グルコシダーゼ	液体	1	0.005	0.003	0.2	ND	5.0	12.7	
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	0.1	ND	0.02	ND	2.6	5.7	
デキストラナーゼ	液体	1	0.003	ND	0.003	ND	ND	ND	
ナリンギナーゼ	粉末	1	0.05	0.1	0.8	0.3	ND	7.7	
ヘスペリジナーゼ	粉末	1	0.002	ND	0.002	ND	ND	ND	
範囲	(液21,粉80)		0.002-21.5	ND-2.3	ND-21.1	ND-0.7	ND-59.4	ND-127.3	+(7試料)

*1：ND≦0.001，*2：ND≦0.1，*3：ND≦1.0

表2．配合添加物の表示内容

酵素名	形状	表示品名	表示量(%)
アミラーゼ	粉末	ケイソウ土	70
アミラーゼ	粉末	ケイソウ土	56
プロテアーゼ	粉末	硫酸カルシウム	17
プロテアーゼ	粉末	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	90
		硫酸ナトリウム	4
プロテアーゼ	粉末	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	30
		硫酸ナトリウム	32
プロテアーゼ	粉末	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	30
プロテアーゼ	粉末	硫酸ナトリウム	15
ペクチナーゼ	粉末	ケイソウ土	45

れた．また，添加物ではないが，塩化ナトリウムの配合表示(2.0-91 %)がアミラーゼ3試料とプロテアーゼ7試料にあった．表示のあった10試料のうち，アミラーゼ1試料からは塩素イオンが検出されなかった．一方，塩素イオンは塩化ナトリウムの表示がない試料からも多数検出されており，安定剤として，添加物の塩化カリウムが配合されている可能性もある[5]ことから，塩化ナトリウム表示の有無にかかわらず，塩素イオンを検出したすべての試料についてカリウムを定量したところ，いずれも1.0 %以下で，塩化カリウムの使用は否定された．

2．酵素製造用剤の残留　全試料とも，マグネシウム塩及びアンモニウム塩に関する配合表示はなかった．前出のカルシウム塩やリン酸塩と合わせ，表示上の不備か否かについて調査中であるが，検出されたマグネシウムと窒素が，培地成分や塩析剤を含む原材料に由来する[1]ものと考えると，それぞれの検出量の最大値は，培地成分の硫酸マグネシウム($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)及び塩析剤の硫酸アンモニウム ($(NH_4)_2SO_4$) [1]に換算した場合，23.3 %と3.3 %に相当する量となる．

3．有害性不純物　重金属，鉛，ヒ素について分析した．重金属に関しては，ヘミセルラーゼ1試料で銅が29 μg/g検出されたが，他はすべて，鉛として20 μg/g以下であった．鉛は全試料10 μg/g以下，ヒ素も全試料，三酸化ヒ素(As_2O_3)として2 μg/g以下であった．FAO/WHO及びFCCの酵素製剤の一般規格[6,7]では，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が，試料はすべて，この限度以下であった．

結　語

前年度に続き，食品製造用酵素製剤中の無機塩類及び重金属，鉛，ヒ素を分析して，品質に関する実態調査を行った．配合添加物の表示については，前年度同様一部の試料に不備がみられ，今後も監視，指導の強化が必要であると考える．また，酵素製造用剤については，同類の配合添加物の表示が無意味なものとならないよう，規格制定に際し，残留限度の設定が必要であろう．有害性不純物としての重金属，鉛，ヒ素については，全試料，FAO/WHOやFCCの規格値[6,7]以下であったが，酵素の機能活性の目的で金属イオンが配合されることも考えられるため，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，ご協力いただきました食品機動監視班の方々に深謝いたします．

文　献

1)安野哲子，荻野周三，小関正道，他：東京衛研年報，**42**，170-175，1991.
2)広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：東京衛研年報，**43**，149-154，1992.
3)厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針・食品中の食品添加物分析法，302-306，1989，日本食品衛生協会，東京.
4)石館守三，谷村顕雄監修：食品添加物公定書解説書，第五版，D298-D302，1987，廣川書店，東京.
5)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，347-350，1990，食品添加物表示懇談会，東京.
6)*FAO Food and Nutrition Paper*，**19**，214-216，1981.
7) *Food Chemicals Codex*，3 rd ed.，107-110，1981，National Academy Press, Washington, D. C..

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 158-165, 1992

生体試料中のトコフェロール抽出に及ぼす共存脂肪酸の影響

植田忠彦*, 市川久次**, 五十嵐脩***

Effect of Coexisting Fatty Acid on the Extraction of Tocopherols in Biological Specimens

TADAHIKO UEDA*, HISATSUGU ICHIKAWA** and OSAMU IGARASHI***

Keywords：ビタミンE vitamin E, トコフェロール tocopherol, 脂質 fatty acid, 生体試料 biological specimen

緒　言

天然に存在するビタミンE作用物質は，α，β，γ，δの4種のトコフェロール(Toc)と同じく4種のトコトリエノール(Toc-3)の合計8種の同族体が知られている．その分布は，一般の食品中ではα-，β-，δ-Tocが大部分を占めており，Toc-3は一部の穀類の種子あるいはパーム油などに限定される[1-4]．α-Toc-3の生物活性はα-Tocの約30%程度であり，その他のToc-3の生物活性は極めて低いと考えられている[5]．また，ヒトおよび動物組織中にその存在は認められていない．従って，天然に存在するビタミンEを分析する上で重要と考えられるのはToc類である．

Tocの定量は一般に高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて行われている．定量に際しては，分析の対象とする試料に適した前処理が必要である．即ち，油の場合はヘキサン等で希釈した後，直接測定することが可能である[6,7]が，食品あるいは生体組織は通常，ケン化した後適切な溶媒を用いてTocを抽出し，定量する[8,9]．著者らはこれまでに試料あるいは生体組織中のTocをケン化した後溶媒抽出する際に，溶媒の種類によって著しくこれらの抽出率が低下することに注目し，その原因が試料中の脂質によるものであることを明らかにしてきた[10,11]．そこで，Toc同族体に対する抽出妨害の原因について各種 C_{18} 脂肪酸塩のモデル系を用いて，これらがToc同族体あるいは内部標準物質の抽出に及ぼす影響ならびに生体試料への適用性について検討したので報告する．

実験方法

(1)試薬　標準物質はRRR-α-，β-，γ-，δ-トコフェロール，2, 2, 5, 7, 8-Pentamethyl-6-hydroxychroman(PMC)(エーザイ製，ビタミンE同族体セット)を用いた．トコールはエーザイより供与されたものを用いた．これらの純度はいずれも98%以上であった．ステアリン酸ナトリウム，オレイン酸ナトリウム，リノール酸ナトリウムおよびリノレン酸ナトリウムは半井化学薬品製のものを用いた．ピロガロールおよび水酸化カリウムは和光純薬製，特級試薬，その他，溶媒類は特級あるいは高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた．

(2)装置　HPLCは島津製作所製 Model LC-4A にオートサンプラーを接続して用いた．検出器は日本分光製ケイ光検出器を用い，測定波長は Ex.297nm, Em.327nm で測定した．試験液の注入量は20 μl とし，データ処理は島津製作所製 CR-5A により行った．また，分離カラムは Nucleosil 5 NH_2 (φ 4.5mm × 250mm, Macherey－Nargel Co.)，移動相はヘキサン/2-プロパノール(97：3, v/v)，流量は2 ml/minである．

(3)共存脂肪酸塩と抽出率　C_{18} 脂肪酸であるステアリン酸，オレイン酸，リノール酸およびリノレイン酸ナトリウム塩の各々16 mg/ml および54 mg/ml 濃度の水溶液を調製し，10mlテフロンパッキン付ネジ蓋遠心管にその

＊東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
＊＊　同　毒性部薬理研究科
＊＊＊お茶の水女子大学　生活環境研究センター
＊169 東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

2 mlを分取する．6％ピロガロールーエタノール溶液1 ml，α-，β-，γ-，δ-Toc，PMCおよびトコール各3 μg/mlを含有するエタノール溶液1 mlをそれぞれ添加する．60％ KOH溶液0.2mlを加えて，70℃で30分間加熱処理した後，氷水中で冷却し，1％ NaCl 2.7mlを加えて10％酢酸エチル含有ヘキサン3 mlで1回，1分間激しく振とう抽出する．遠心分離後，上層2 mlを分取し，N_2通気により溶媒を留去して，その残渣にヘキサン2 mlを加えて試験溶液とし，HPLCにより定量する．

(4)オレイン酸ナトリウム共存量と抽出率 オレイン酸ナトリウムの水溶液を調製し，その5～200mgを用いて(3)と同様にしてToc同族体およびPMCの添加回収率を求める．

(5) pHの影響 (3)で調製したオレイン酸ナトリウム54mg/ml溶液2 mlを取り，1N HCl溶液を加えてpHを，3.0，7.0，11.0に各々調整した後，6％ピロガロールーエタノール溶液1 ml，Toc同族体，PMCおよびトコール各々3 μg/mlを含有するエタノール溶液1 mlを加え，1％ NaCl溶液2.9mlを加えた後，10％酢酸エチル含有ヘキサンにより抽出し，同様にし抽出率を求める．

(6)標準物質のN_2通気による気散 α-，β-，γ-，δ-Toc，PMCおよびトコール各々2 μgを含有する10％酢酸エチル含有ヘキサン溶液2 mlを10mlスピッツロール試験管に取り，水温20℃の水槽中に立て，N_2を通気(50ml/min)する．溶媒がなくなった時点を0分として，それぞれの残存率を求める．同様にして，溶媒がなくなってから10分，30分および60分後の残存率を求める．次に，血漿(200 μl)および赤血球(400 μl，ヘマトクリット値＝48.0％)にα-TocおよびPMC各々3 μgを添加し，ケン化，抽出した後，この2 mlにN_2通気してα-TocおよびPMCの残存率を求める．

(7)実験動物および生体試料の調製 4週令のウィスター系雄ラットをオリエンタル酵母工業製NMF試料で2カ月間飼育した．一夜(16時間)絶食させ，麻酔下でヘパリン処理した注射筒を用いて採血，屠殺した後臓器を採取した．血液は3,000rpmで10分間遠心分離し，血漿を取り，赤血球は生理的食塩水で3回洗浄した後約50％の血球浮遊液とした．

(8)組織に対する添加回収試験 赤血球(hematocrit value＝47.0％，400 μl)，血清(200 μl)ならびに肝臓(100mg)，腎臓(100mg)，肺(100mg)および精巣周囲脂肪組織(30mg)の細切試料をテフロンパッキン付ネジ蓋試験管に秤取し，組織試料には1％ NaCl水溶液を100 μl加えて組織を十分に分散させた後，抗酸化剤として6％ピロガロールエタノール溶液1 mlを加えて混和する．試料中のToc同族体の含有量を測定するために内部標準物質のPMC 3 μg/mlエタノール溶液1 mlを加え，添加回収試験のためにα-，β-，γ-，δ-TocおよびPMC各々3 μg/mlエタノール溶液1 mlを添加する．赤血球はこの段階で70℃，約3分間の予備加熱を行う．

次に，60％ KOH水溶液0.2mlを加えて混和し70℃の水浴中でケン化を行う．ケン化時間は，血液が30分，組織が約60分必要であった．ケン化後，氷水中で冷却し，1％ NaCl水溶液4.5mlを加えてケン化層中のエタノール濃度を約30％とした後，10％酢酸エチル含有ヘキサン3 mlにより1回，1分間激しく振とう抽出する．3,000rpmで10分間遠心分離した後，上層2 mlを分取し，N_2通気により溶媒を留去し，残渣にヘキサン200 μlを加えて試験溶液とし，HPLCにより定量する．

(9)定量法 検量線を作成するために，内部標準物質としてPMCを1.0 μg/mlの濃度で含有し，α-，β-，γ-，δ-Tocの標準物質を，それぞれ0.5～3.0 μg/mlの濃度範囲で含有する濃度系列の混合溶液を調製する．

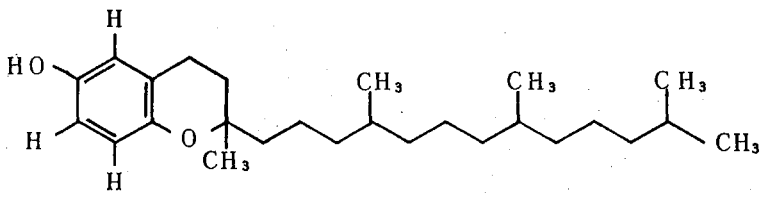
これらの溶液の20 μlをHPLCに注入し，そのHPLCクロマトグラムより，各Toc同族体とPMCの濃度比と各々に対応するピーク面積比より，α-，β-，γ-，δ-Tocの検量線を作成する．試験溶液を同様にしてHPLC測定でした後，この検量線を用いて定量する．

なお，α-Toc，トコールおよびPMCのメタノールとヘキサン中における相対ケイ光強度ならびにトコールおよびPMCの構造をFig. 1に示した．

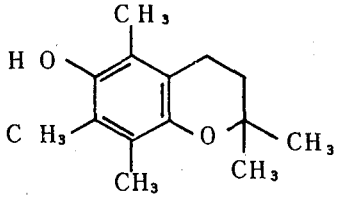
結果および考察

(1)脂肪酸の構造ならびに共存量と抽出率 Fig. 2はC_{18}脂肪酸塩各々32mgおよび108mgを用いて，二重結合数と抽出率の関係について調べたものである．32mgの脂肪酸塩量では抽出率に対する影響はほとんど認められなかったが，108mgではα-Tocを除いていずれも抽出率が低下した．しかし，二重結合数と抽出率の間に有意差は認められなかった．そこで，オレイン酸ナトリウムを用いて脂肪酸塩量が抽出率に及ぼす影響について更に詳細に検討を行った．

Table 1はオレイン酸ナトリウム量と添加回収率を示したものであるが，オレイン酸ナトリウムが約30mg以下であれば，いずれのToc同族体，PMC，トコールも良好な抽出率が得られることが明かとなった．しかし，共存脂質量が30mgを超えて増加するにしたがってTocの抽出率はα＞β＞γ＞δの順に低下し，特に，トコールの抽出率の低下は著しかった．



Tocol



PMC

	formula	mol. wt.	Methanol Ex. (nm)	Em. (nm)	RFI*	n-Hexane Ex. (nm)	Em. (nm)	RFI*
d-α-Toc	$C_{29}H_{50}O_2$	430.71	293	325	100	298	322	100
Tocol	$C_{26}H_{44}O_2$	388.61	299	328	174	300	323	167
PMC	$C_{14}H_{20}O_2$	220.31	293	325	104	298	322	99

* Relative fluorescence intensity/mol.
Toc : Tocopherol

Fig. 1. Fluorescence Excitation and Emission Wavelength of d-α-Toc, Tocol and PMC in Methanol and n-Hexane

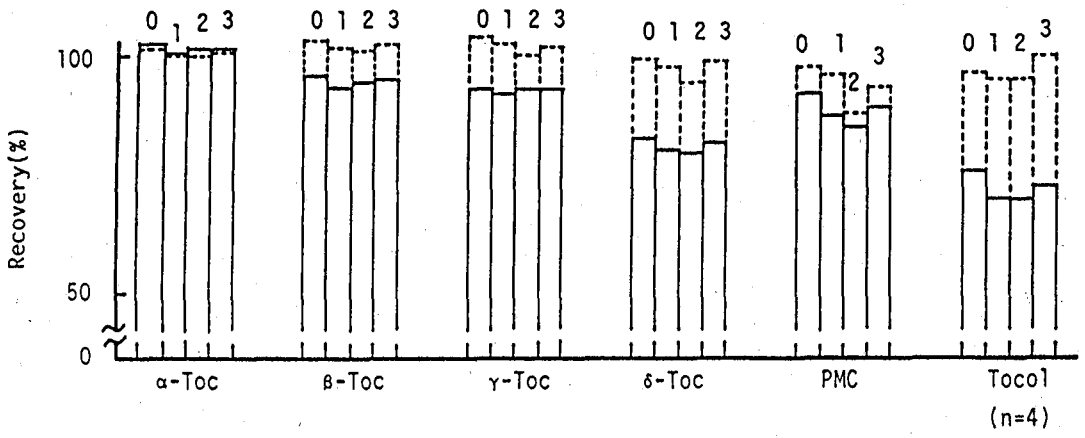


Fig. 2. Relationship Between Recoveries of Toc, PMC and Tocol, and an Amount of Coexisting Fatty Acid Salt

An amount of fatty acid salt; ▭ 108mg, ⬚ 32mg
Fatty acid salt ; 0 : Sodium stearate, 1 : Sodium oleate,
2 : Sodium linolate, 3 : Sodium linolenate
Extraction solvent; 10% ethyl acetate in n-hexane

Table. 1. Effect of Sodium Oleate on Extraction Recoveries of Tocopherols, PMC and Tocol with 3 ml of 10% Ethyl Acetate/n-Hexane

Sodium Oleate	α-Toc (%)	β-Toc (%)	γ-Toc (%)	δ-Toc (%)	PMC (%)	Tocol (%)
0mg	102.2±1.2	107.2±0.5	104.2±1.1	105.5±0.5	105.3±1.7	104.8±2.3
5mg	100.1±1.9	103.4±0.2	103.8±0.5	103.4±0.4	98.4±2.2	104.1±0.7
10mg	100.3±1.5	104.7±0.7	104.4±0.6	103.4±0.4	98.9±1.2	104.0±0.6
30mg	99.9±0.2	102.1±1.6	103.0±1.6	97.9±0.8	96.3±1.9	95.5±1.8
50mg	97.9±2.0	98.1±1.6	99.5±0.8	91.6±1.6	96.5±2.3	89.6±1.2
100mg	100.6±1.5	93.2±0.6	92.0±2.1	80.7±1.4	87.9±1.7	70.5±0.7
200mg	92.2±1.8	76.7±0.7	74.4±1.2	53.0±2.3	65.6±1.2	43.0±0.8

Mean±SD(n=4)
EtOH concentration in Sodium Oleate media=30%
Toc : Tocopherol

Table. 2. Effect of pH in the Sodium Oleate media on Extraction Recoveries of Tocopherols, PMC and Tocol with 3 ml of 10% Ethyl Acetate/n-Hexane

pH	α-Toc(%)	β-Toc(%)	γ-Toc(%)	δ-Toc(%)	PMC(%)	Tocol(%)
3	100.8±0.3	94.5±1.0	94.4±2.2	99.3±2.1	102.0±0.5	89.6±1.3
7	100.0±1.9	100.7±1.0	102.9±3.2	100.0±1.5	101.3±1.7	91.2±0.2
11	100.6±1.5	93.2±0.6	92.0±2.1	80.7±1.4	87.9±1.7	70.5±0.7

Mean±SD(n=4)
An amount of sodium oleate=100mg
EtOH concentration in sodium oleate media=30%
Toc : Tocopherol

(2)抽出率に及ぼすpHの影響 脂肪酸塩類のCritical micelle concentration(c.m.c.)は0.001～0.02mol/l, すなわち, 0.02～0.4(wt/v)%程度と考えられており, また, 二重結合あるいは側鎖が入るとc.m.c.値は大きくなり, 逆に, 無機強電解質の添加によりc.m.c.値は低下することも知られている[12].

そこで, オレイン酸ナトリウム108mgに塩酸を加えてpHを各々3.0, 7.0, 11.0に調製した後, Toc同族体, PMCおよびトコールを添加し, 同様にして回収率を求めたところ, Table 2に示すごとく, pHを中性あるいは酸性とすることにより各Toc, PMC, トコールの抽出率は向上することが明かとなった.

すなわち, 本試験法における脂質量30mgをケン化した際に生成するケン化層中の脂肪酸塩の濃度は約0.46(wt/v)%であり, これはミセル形成濃度と良く一致することから, 脂質ケン化物によるToc同族体, PMCおよびトコールの抽出妨害の主たる原因はケン化により生成した脂肪酸塩が形成するミセルによるものと考えられる.

ミセルによる妨害を除去するために, 酸を加えて中和すること, あるいは塩化ナトリム等の強電解質を加えることは有効な方法である. しかし, 中和法は多量の酸性脂溶性物質をもヘキサン層に抽出することとなり, 順相系カラムの劣化を引き起こすと共に電気化学検出器(ECD)にはこれらが妨害となるため使用できない. また, 多量の塩の添加は抽出時の予期しない影響や妨害物質の混入も考えられ, 特に未知の生体試料などに用いる場合には試料に応じた詳細な検討が必要となり, 実用的ではない.

(3)N_2通気とToc同族体, PMCおよびトコールの気散 一般に, 微量の物質を分析する際には, 試料の抽出液を濃縮あるいは溶媒置換するために, 一度, 溶媒を留去した後, 目的に応じた溶媒を加えて試験溶液を調製する. 溶媒を留去する際には目的物質の気散に十分注意することが必要である. トコフェロールの場合, 抽出液が数mlであれば, 酸化を防止するために, N_2通気により乾固するが, 抽出液が数十mlと比較的多い場合には, 一旦, ロータリーエバポレーターにより数mlまで濃縮し

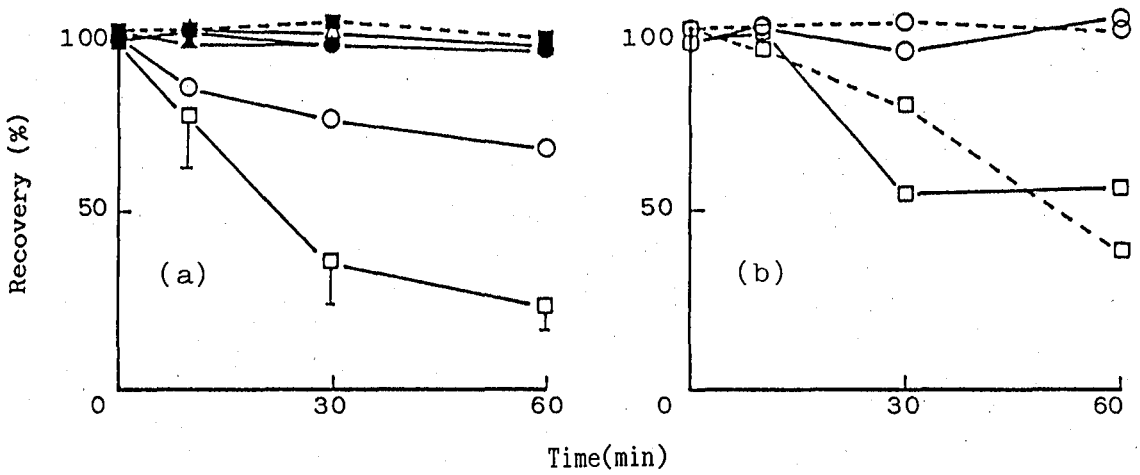


Fig. 3. Scattering Losses of Toc, Tocol and PMC under a Stream of N_2 by Time

(a) Standard solution (3 μg each)
—○—: α-Toc, —▲—: β-Toc
—●—: γ-Toc, —△—: δ-Toc
—□—: PMC, ---■---: Tocol

(b) Sample extracts (plasma and RBC, 1 μg of PMC was added)
·····: Plasma, ——: RBC
○: α-Toc, □: PMC

た後，N_2通気して乾固する．従って，溶媒を完全に留去した後，不必要に強い N_2通気を続けることは微量のTocあるいは添加した内部標準物質を気散させる危険性がある．

そこで，N_2通気によるToc同族体，PMCおよびトコールの気散の有無について検討した．

Fig. 3の(a)はToc同族体，PMCおよびトコールの10%酢酸エチル含有ヘキサン溶液2 mlにN_2(50ml/min)を通気した場合の，溶媒が乾固したのちの通気時間と残存量を示したものである．また，(b)は(a)において気散の認められたα-TocおよびPMCを血漿および赤血球に添加し，(8)の方法によりケン化後，抽出した溶液2 mlを用いて同様に試験した結果を示したものである．

(a)の場合，β-，γ-，δ-Tocおよびトコールは溶媒留去後60分間の通気によっても減少しないが，α-TocおよびPMCは10分間通気後，各々約80%および75%に減少し，60分後には約67%および24%に減少した．

一方，(b)の場合，60分後においてもα-Tocの減少は認められなかった．しかし，PMCは10分を越えると減少をはじめ，赤血球，血漿いずれの抽出液も60分後には約50%に減少した，すなわち，(b)の場合，試料由来の抽出物にこれらに対する保留効果があるために標準物質のみの場合に比べ，通気による気散が抑えられているものと考えられる．

実際に試料の分析を行うに当っては抽出液に1%n-デカンのヘキサン溶液を1 ml加えた後，N_2通気を行うことにより，n-デカンの保留効果によってToc同族体およびPMCの気散を完全に防止することができた．

(4)生体試料に対する添加回収率 試料のケン化は，血液の場合，70℃，30分間行えば十分であるが，組織の場合，細切試料であるために完全に試料をケン化するためには60分程度の時間を必要とした．また，抽出に際して，ケン化層中のエタノールの濃度は高抽出率を得るために約30%に下げる必要がある[11]が，エタノール濃度を下げることにより肝臓あるいは腎臓ではエマルジョンの形成することがありそれを抑えるために精製水の代わりに1% NaCl水溶液を加えた．ケン化に際しては試薬の添加順序とケン化温度も極めて大切であり，最初にピロガロール溶液，次いで，PMC溶液を加えて，約5分間の予備加熱後，60% KOH溶液を加え，ケン化することが大切である．ケン化温度が70℃を越えすぎるとToc同族体が分解することもあり，ケン化温度の設定にも十分注意することが必要である．

Fig. 4は混合標準物質およびラットの血液ならびに組織抽出物のHPLCクロマトグラムを示したものである．

Toc同族体および内部標準物質のPMCの分離は良好であり，試料のクロマトグラム上に定量の妨害となるピークは認められなかった．また，PMCを内部標準物

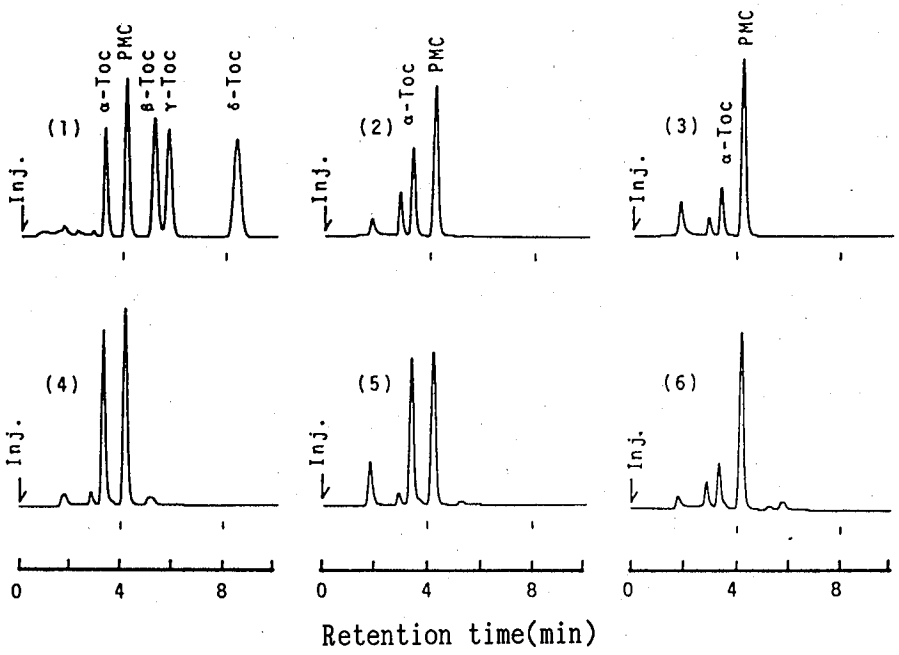


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Toc and PMC in 10% Ethyl Acetate in n-Hexane Extracts from Biological Specimens

(1) standard mixture of α-, β-, γ- and δ-Toc and PMC (2) RBC (3) plasma (4) liver (5) kindey (6) adipose tissue

質とする Toc 同族体の検量線はそれぞれ，0.5～3.0 μg/ml の濃度範囲において良好な直線性を示した．従って，Toc 同族体は PMC を内部標準物質として定量することが可能である．

Table 3 は血液および組織に対する添加回収試験の結果を示したものである．全試料に対する添加回収率は93%以上と良好であり，また，変動係数も最大7.88%(n＝4)と満足できる結果であった．

赤血球中の Toc 濃度 T(μg/ml packed cells)は次式により求めることができる．

$$T=\frac{Ps\text{-}p}{Ps\text{-}\alpha}\times\frac{C\alpha}{Cp}\times\frac{P\alpha}{Pp}\times Wp\times\frac{100}{Ht}\times\frac{1}{V}$$

ただし，

Ps-p ：標準溶液の PMC ピーク面積
Ps-α ：標準溶液の α-Toc ピーク面積
Cp ：標準溶液の PMC 濃度(μg/ml)
Cα ：標準溶液の α-Toc 濃度(μg/ml)
Pp ：試料の PMC ピーク面積
Pα ：試料の α-Toc ピーク面積
Wp ：試料に添加した PMC の μg数
V ：赤血球懸濁液量(ml)
Ht ：ヘマトクリット値(%)

本法は，生体試料などの少量の試料を多数処理するために有用な方法と考えられる．

要　約

C_{18}脂肪酸塩を用いて，その構造ならびに共存量のトコフェロール同族体ならびに内部標準物質として用いた PMC およびトコールの抽出率に及ぼす影響について検討した．

(1)ステアリン酸，オレイン酸，リノール酸ならびにリノレン酸のナトリウム塩各々32mg に対する Toc 同族体，PMC およびトコールの添加回収率は95%以上であったが，108mg に対するこれらの添加回収率は，α-Toc 102.6%，β-Toc 94.7%，γ-Toc 92.8%，δ-Toc 81.7%，PMC 88.8%，トコール 72.6%であり，共存脂質量の増加と共に抽出率は低下した．

(2)脂肪酸の二重結合数と抽出率の間には相関は認められなかった．

Table. 3. Analycal Recoveries of Tocopherols Added to Rat Tissues

Tissue	Toc	Endogenous (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recover (%)	CV (%)
RBC	α	0.690	3.0	3.535±0.123	94.9±4.07	4.29
(400 μl)	β	nd	3.0	2.919±0.114	97.3±3.79	3.90
	γ	nd	3.0	2.948±0.127	98.3±4.26	4.33
	δ	nd	3.0	2.958±0.126	98.4±4.13	4.20
Plasma	α	0.776	3.0	3.560±0.052	92.8±1.73	1.86
(200 μl)	β	nd	3.0	2.963±0.054	98.4±2.07	2.10
	γ	nd	3.0	2.961±0.074	98.7±2.45	2.48
	δ	nd	3.0	2.971±0.059	99.1±1.94	1.96
Liver	α	1.596	3.0	4.409±0.080	93.8±2.80	2.99
(100mg)	β	nd	3.0	2.991±0.060	99.7±2.13	2.14
	γ	nd	3.0	2.995±0.100	98.5±3.19	3.24
	δ	nd	3.0	2.905±0.040	96.9±1.33	1.37
Kidney	α	1.234	3.0	4.210±0.235	99.2±7.82	7.88
(100mg)	β	nd	3.0	3.068±0.161	102.3±5.35	5.23
	γ	nd	3.0	3.065±0.155	102.2±5.14	5.03
	δ	nd	3.0	3.016±0.155	100.6±5.19	5.16
Lung	α	2.432	3.0	5.421±0.142	99.6±4.72	4.74
(100mg)	β	nd	3.0	2.948±0.098	98.3±3.27	3.33
	γ	nd	3.0	2.962±0.090	98.7±3.00	3.04
	δ	nd	3.0	2.909±0.113	97.0±3.76	3.88
Adipose	α	0.306	3.0	3.459±0.195	106.1±6.05	5.70
(30mg)	β	nd	3.0	3.137±0.149	104.6±4.96	4.74
	γ	0.036	3.0	3.192±0.147	105.3±4.92	4.67
	δ	nd	3.0	2.993±0.183	99.8±6.13	6.14

Mean±SD (n=4)
Toc : Tocopherol

(3)ケン化層中の pH を中性あるいは酸性とすることによって Toc 同族体，PMC およびトコールの抽出率を向上させることが可能であった．しかし，生体試料等に適用した場合，多量の脂溶性物質を抽出することとなり，これらが定量上の妨害となった．

(4)Toc 同族体の抽出溶液より溶媒を留去する際に，溶媒を乾固した後，N_2通気を続けることにより α-Toc および PMC は10分後には85％と75％に減少し，60分後には67％と24％となった．しかし，β-γ-，δ-Toc およびトコールの気散は認められなかった．

(5)α-Toc および PMC の気散は n-ノナンまたは n-デカンを約10 μl 添加することにより，防止することが出来た．

(6)本法による Toc 同族体のラット血液および組織に対する添加回収実験の結果はいずれも良好であった．

文　献

1) Cort, W. M., Vicente, T. S., Waysek, E. H., Williams, B. D., *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 1330-1333(1983).

2) Piironen, V., Varo, P., Koivistoinen, P., Syvaoja, E-L., Salminen, K., *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 742-746 (1986).

3) Syvaoja, E-L., Salminen, K., Piironen, V., Koivistoinen, P., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **63**, 328-329 (1983).

4) 加藤秋雄，油化学，**37**，299-306(1988).

5) 五十嵐　脩，ビタミンＥ－基礎と臨床－，福場博保，美濃　真監修，五十嵐　脩編集，p. 22-32 (1987)医歯薬出版，東京.

6) Nierkerk, P. J., *Anal. Biochem.*, **52**, 533-537(1973).

7) 阿部皓一，勝井五一郎，栄養と食糧，**28**，453-457 (1975).

8) 日本薬学会編，衛生試験法・注解，p. 353-356 (1990)，金原出版，東京.

9) 石橋恭子，阿部皓一　他，ビタミン，**51**，415-422

(1977).

10) Ueda, T. & Igarashi, O., *J. Micronutr. Anal.*, 3, 15-25(1987).

11) Ueda, T. & Igarashi, O., *J. Micronutr. Anal.*, 3, 185-198(1987).

12) 北原文男, 他 著 界面活性剤・物理応用化学生態学, (1979), 講談社, 東京, その他 藤本武彦著, 新・界面活性剤入門, 三洋化成工業, (1973)京都, 西 一郎, 他 著, 界面活性剤便覧, (1969), 産業図書, 東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 166-170, 1992

アシタバ各部位のカロテン，トコフェロール，水溶性ビタミン含量およびその季節による違い

井口正雄*，菊谷典久*，門間公夫*，笠原利英**
友松俊夫*，村上泰城***，浦野元幸****

Tocopherol, Carotene and Water-Soluble Vitamin Contents and Seasonal Differences in the Different Parts of Ashitaba (*Angelica keiskei*)

MASAO IGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, KIMIO MONMA*, TOSHIHIDE KASAHARA**, TOSHIO TOMOMATSU*, YASUKUNI MURAKAMI***and MOTOYUKI URANO****

Carotene, tocopherols and water-soluble vitamin contents and the seasonal differences in the edible portion (leaf, stalk and root) of ashitaba *(Angelica keiskei)* grown in Hachijojima of the Izu-Islands in Japan were estimated. The samples were collected from both the field (wild) and the farm (cultivated) in spring and autumn in the same year.

Carotene and tocopherol contents of the ashitaba leaves harvested in autumn tended to have higher contents than those in spring. Seasonal differences were not significant in the water - soluble vitamin contents in the leaves.

Ascorbic acid (7 -12mg/100g fresh weight) and niacin (0.7-1.1mg/100g fresh weight) contents in the stalks of ashitaba were higher than those of celery from the data described in the standard tables of food composition in Japan. Tocopherol, riboflavin and thiamin contents in the stalks were similar to those of celery. The contents of pyridoxine (0.39mg/100g fresh weight) and niacin (2.3mg/100g fresh weight) in the root of the ashitaba showed higher values than other common root vegetables in Japan.

Keywords：アシタバ *Angelica keiskei*，カロテン carotene，トコフェロール tocopherol，ビタミン vitamin，葉菜 leafy vegetable，葉 leaf，茎 stalk，根 root，季節変動 seasonal variation

緒　言

アシタバは伊豆諸島，関東の東海岸などに自生するセリ科の多年草である．昭和57年には，日本食品標準成分表(四訂)[1](以下成分表と略す)に，はじめて，その成分組成が記載され，地方野菜の一種として広く知られるようになってきた．近年，島しょ地区では，自生だけでなく，ハウスによる栽培も盛んに行われるようになり，内地の市場にも出荷され，その生産量，消費量共に増加の傾向にある．

アシタバは主としてその若葉が葉菜として用いられるが，採取時期によっては他部位の茎および根も食用とされる．また最近では，これらの一部は乾燥，粉末化などの工程により加工され，健康志向食品として流通，販売されている．しかし，茎及び根の部位については成分表に記載がなく，また報告もなされていないため，これら部位の成分組成は明らかでない．

一方，野菜の成分組成は，生育条件，採取時期等の各種の要因により変動することが知られている．栄養摂取

＊東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 169 東京都新宿区百人町３－24－１
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
＊＊桜美林短期大学
＊＊＊東京都衛生局医療計画部医療対策課
＊＊＊＊元東京都衛生局　島しょ保健所

量を評価する際には，これらの要因による構成成分の変動を考慮する必要がある．従来，アシタバについて，このような観点から成分組成について比較検討した報告は著者ら[2]がミネラルについて検討した以外，ほとんどみられない．そこで，アシタバの葉，茎及び根のビタミンおよび一般成分含量を測定し，また採取時期によるこれら含量の差異について比較検討したので報告する．

実験方法

1．試料 伊豆諸島八丈島(東京都八丈町富士地区)において，春(5月)および秋(11月)に自生及び栽培により生育したアシタバを採取し，葉及び茎に分け試料とした．根については春(5月)栽培によるものを採取し試料とした．試料は成分表に記載されている前処理法[3]に準じ，可食部を細切あるいはすりつぶし，均一化し，その一部を分析に供した．

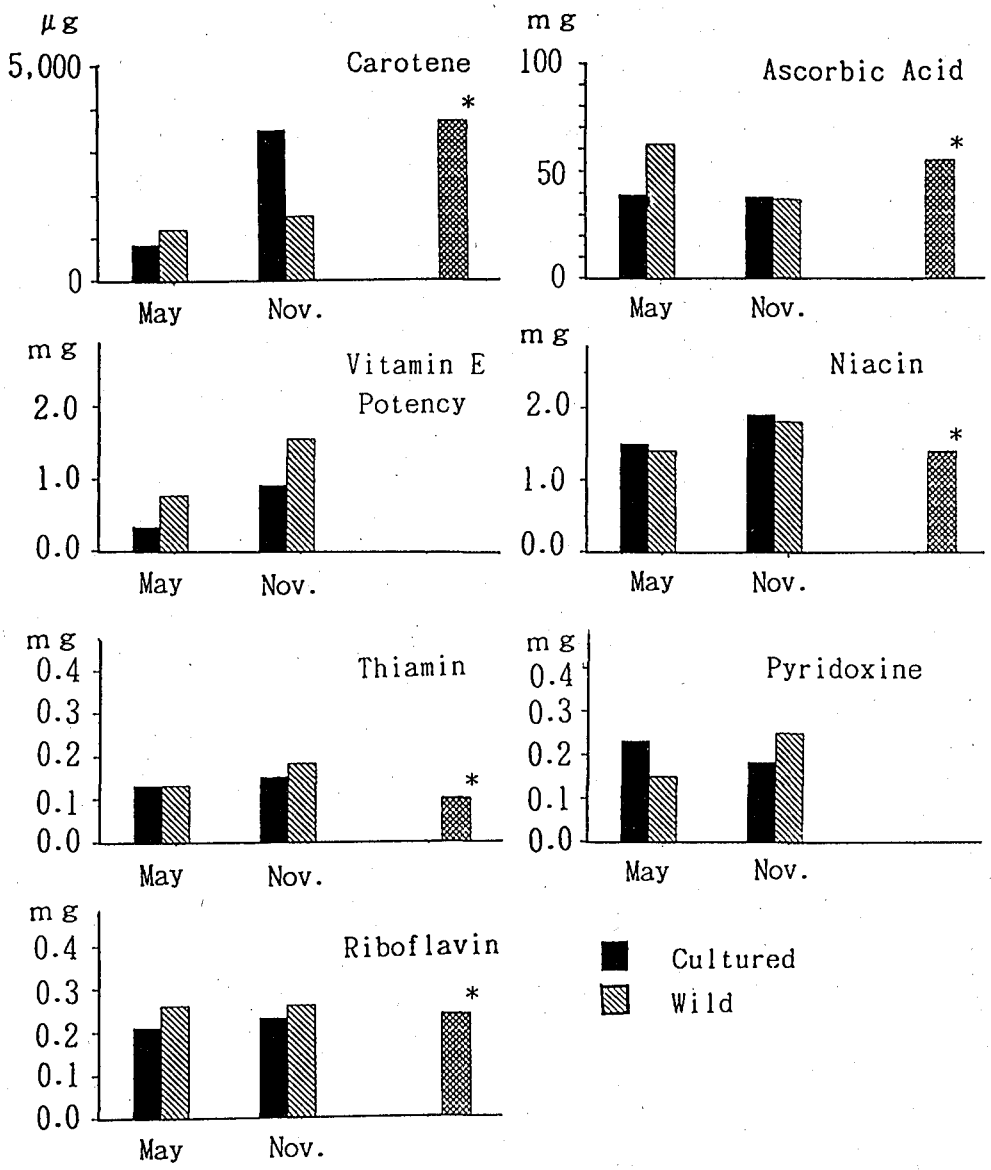


Fig. 1. The Differences of Vitamin Contents between the Leaves of the Ashitaba Harvested in Spring (May) and Those in Autumn (November).
*Data from Standard Tables of Food Composition in Japan (4th Revised Edition)[1].

2．ビタミンの分析 カロテン：成分表記載[3]の方法（クロマト分離吸光法），トコフェロール：高速液体クロマトグラフ法[4] チアミン，リボフラビン及びアスコルビン酸は前報[5]と同様にそれぞれ，チオクロム蛍光法，ルミフラビン蛍光法及びインドフェノール滴定法によった．ナイアシン及びピリドキシンは前報[6]と同様それぞれ *Lactobacillus arabinosus* 17-5，ATCC 8014 及び *Saccharomyces carlsberugensis* strain 4228，ATCC 9080を用いる常法[7]によった．

3．一般成分の分析 いずれも前報[8]と同様の方法によった．水分は70℃減圧乾燥法，脂質はクロロホルム－メタノール混液改良抽出法及び活性炭処理，タンパク質はセミミクロケールダール法（窒素－タンパク質換算係数 6.25），繊維はヘンネベルグストーマンの改良法，灰分は550℃直接灰化法，また糖質（Non-Fibrous Carbohydrates）は水分，タンパク質，脂質，繊維および灰分の合計を100gから差し引く計算値によった．

結果及び考察

葉のビタミン含量の採取時期による違い 春（5月）および秋（11月）に採取したアシタバ葉のビタミン含量の違いを栽培，自生別に Fig. 1 に，また，これら分析値を Table 1 に，それぞれ示した．なお Fig. 1 には成分表に記載のあるものについてはその値（以下成分表値と略す）をあわせて示した．Fig. 1 に示したように，採取時期あるいは栽培，自生の生育別により，比較的ビタミン含量に差異があったものは，カロテンとトコフェロールであった．カロテンは11月採取（栽培）が最も高く3,500 μg/100gであり，他はいずれも成分表値（3,700 μg/100g）の1/2以下と低い値であった．トコフェロールについて，Fig. 1 に，美濃らの換算式[9]により算出したビタミンE効力値を，また，Table 1 には，各異性体値をあわせて示した．異性体別では，いずれの試料においても，α－トコフェロール，γ－トコフェロールがほとんどを占め，β－トコフェロール，δ－トコフェロールは検出しないか，検出しても微量であった．換算式によれば，γ－トコフェロールのビタミンE効力はα－トコフェロールの1/20であることから，ビタミンE効力はα－トコフェロール値とほとんど同値であるといえる．葉のα－トコフェロール含量，ビタミンE効力はともに，11月採取したものが5月採取に比べ高い値であった．井崎ら[10]は，一連の市販野菜のトコフェロールの分析を実施し，在来野菜のα－トコフェロール含量が1 mg/100g

Table 1. Nutrient Compositions and Vitamin Contents in the Leaves of the Ashitaba.

		Cultured		Wild	
		May	Nov.	May	Nov.
Water	(g)	87.5	87.0	82.8	83.0
Protein	(g)	3.5	4.0	4.0	4.1
Lipid	(g)	0.1	0.1	0.1	0.1
Carbohydrates, Non-Fibrous	(g)	4.8	6.0	8.8	9.5
Crude-Fiber	(g)	2.2	1.5	2.2	1.9
Ash	(g)	1.9	1.4	2.1	1.4
Carotene	(μg)	850	3,500	1,200	1,500
α-Tocopherol	(mg)	0.30	0.81	0.70	1.47
β-Tocopherol	(mg)	ND	ND*b)	ND	ND
γ-Tocopherol	(mg)	0.67	2.16	1.60	1.87
δ-Tocopherol	(mg)	ND	0.05	0.13	0.07
Vitamin E Potency*a)	(mg)	0.33	0.92	0.78	1.56
Thiamin	(mg)	0.13	0.15	0.13	0.18
Riboflavin	(mg)	0.21	0.23	0.26	0.26
Ascorbic acid	(mg)	39	38	62	37
Niacin	(mg)	1.5	1.9	1.4	1.8
Pyridoxine	(mg)	0.23	0.18	0.15	0.25

Values are the means of 2*n* and expressed as amounts per 100g fresh weight.
*a) Vitamin E potency: α-Toc+0.25×β-Toc+0.05×γ-Toc+0.01×δ-Toc
*b) ND : Not Detected

以上のものをビタミンE高含量野菜であるとしている．今回の分析結果では11月採取(自生)(1.47mg/100g)がこれに該当したが，他の試料はこの値に満たなかった．著者らが行った分析例は少ないものの，葉のトコフェロール含量は，水溶性ビタミンなどに比べ，季節による変動が大きいことが推察された．次に，水溶性ビタミンについては，5月採取(自生)のアスコルビン酸が62mg/100gと他に比べ高い値であったことを除いて，採取時期，生育方法による顕著な違いはみられなかった．

茎及び根の成分組成 Table 2に茎および根の可食部のビタミン含量および一般成分の分析結果を示した．茎の成分組成を他の葉柄を食用とする野菜の成分表値と比較すると，水分含量(90.9-94.8g/100g)はセロリー(葉柄)，フキの成分表値(95.3及び96.1g/100g)とほぼ同じであった．繊維は栽培，自生共に5月採取が高い値(1.7および1.6g/100g)を示したが，これはセロリー(0.5g/100g)，フキ(0.6g/100g)にくらべ，約3倍高い値であった．カロテン(18-130 μg/100g)はセロリー(2,900 μg/100g)に比べ低く，むしろフキ(43 μg/100g)に近い値であった．チアミン及びリボフラビン(0.02-0.04mg/100g)はセロリー(0.03mg/100g)とほぼ同値であった．また，トコフェロールについては，ビタミンE効力として比較すると，11月採取(自生)茎(0.74mg/100g)を除いて，0.18-0.28mg/100gであり，セロリーの文献値[11](ビタミンE効力0.2mg/100g)とほぼ同じであった．アスコルビン酸(7-12mg/100g)はセロリー(6mg/100g)と同等あるいはそれ以上でフキ(4mg/100g)の2-3倍高い値であった．ナイアシン(0.7-1.1mg/100g)についてはセロリー(0.3mg/100g)の2-3倍，フキ(0.1mg/100g)の7-11倍の高含量を示した．ピリドキシン含量に関する報告は少ないが，文献値[12]によるとホウレンソウ0.08mg/100g，ニンジン0.1mg/100g，ミツバ0.2mg/100g，カブ0.11mg/100gと報告されている．茎(0.04-0.06mg/100g)はいずれより低い値であった．根について，他の根菜類のゴボウ，ダイコン，ニンジンと比較したところ，トコフェロールについては，ビタミンE効力(0.37mg/100g)はニンジン(0.4mg/100g)，ゴボウ(0.5mg/100g)の文献値[11]とほぼ同値であり，チアミン，リボフラビン，アスコルビン酸ともゴボウ，ダイコンの含量と顕著な違いはみられなかった．根のナイアシン(2.3mg/100g)はゴボウ(0.6mg/100g)，ダイコン(根)(0.3mg/100g)に比べ高く，また，ピリドキシン(0.39mg/100g)は，上記文献値[12]の

Table 2. Nutrient Compositions and Vitamin Contents in the Different Parts of the Ashitaba.

		Stalk				Root
		Cultured		Wild		Cultured
		May	Nov.	May	Nov.	May
Water	(g)	94.8	94.3	90.9	93.1	81.7
Protein	(g)	0.7	0.5	0.7	0.8	0.7
Lipid	(g)	0.1	⟨0.1	0.1	⟨0.1	0.1
Carbohydrates, Non-Fibrous	(g)	1.3	3.0	5.3	3.9	14.0
Crude-Fiber	(g)	1.7	1.1	1.6	1.1	2.2
Ash	(g)	1.4	1.1	1.4	1.1	1.3
Carotene	(μg)	24	130	18	70	ND*b)
α-Tocopherol	(mg)	0.22	0.24	0.17	0.72	0.37
β-Tocopherol	(mg)	ND	ND	ND	ND	ND
γ-Tocopherol	(mg)	0.19	0.81	0.11	0.33	ND
δ-Tocopherol	(mg)	ND	ND	ND	ND	ND
Vitamin E Potency*a)	(mg)	0.23	0.28	0.18	0.74	0.37
Thiamin	(mg)	0.03	0.02	0.04	0.04	0.06
Riboflavin	(mg)	0.03	0.02	0.04	0.03	0.04
Ascorbic acid	(mg)	12	7	9	7	28
Niacin	(mg)	0.7	0.8	1.1	0.7	2.3
Pyridoxine	(mg)	0.06	0.04	0.04	0.05	0.39

Values are the means of $2n$ and expressed as amounts per 100g fresh weight of edible portion.

*a) Vitamin E potency : α-Toc+0.25×β-Toc+0.05×γ-Toc+0.01×δ-Toc

*b) ND : Not Detected

ニンジン，カブの含量に比べ約4倍高い値を示した．ちなみにピリドキシンは近年，老化による痴保症の予防との関連で注目されていることから，ピリドキシン摂取源として健康志向食品素材の利用が考えられる．

すでに著者らは東京都の島しょにおける栄養摂取量評価のための基礎資料を得るために，小笠原諸島で独自に生産されているシカクマメ[8)13)]，パッションフルーツ[5)]の一連の成分調査を行い，また今回，伊豆諸島産アシタバについて調査を実施した．これらの関連調査として共同研究者である小沢ら[14)]は，小笠原諸島における生鮮野菜摂取量調査を実施し，島民一人当たりの摂取量が全国平均の75-88％であることを明らかにし，島しょにおける緑黄色野菜不足の解消の必要性を指摘している．野菜に含まれるカロテン，トコフェロールは近年，抗ガン作用，生体内抗酸化作用など成人病予防あるいは老化防止効果から，また種々のビタミン類はその多様な生理作用から注目されている．アシタバは島しょにおける，これら成分の重要な摂取源の一つであることから，新品種の開発，調理方法の工夫，加工による利用の拡大が望まれる．

文　献

1）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，190-191，1982，大蔵省印刷局，東京．

2）門間公夫，菊谷典久，笠原利英，井口正雄，他：東京衛研年報，**41**，158-161，1990．

3）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，1-36，1982，大蔵省印刷局，東京．

4）勝井五一郎：日本ビタミン学会編，ビタミン学実験法，212-215，1983，東京化学同人，東京．

5）菊谷典久，門間公夫，井口正雄，他：東京衛研年報，**39**，164-167，1986．

6）笠原利英，井口正雄，友松俊夫，他：東京衛研年報，**37**，232-236，1986．

7）前川昭男：小原哲二郎他監修，林淳三他編，改訂食品分析ハンドブック，356-357，1982，建帛社，東京．

8）井口正雄，菊谷典久，友松俊夫，他：東京衛研年報，**38**，253-256，1987．

9）㈱資源協会食品成分調査研究所：ひと目でわかる517食品表ビタミン E，コレステロール，脂肪酸，P/S：181-182，1989，第一法規，東京．

10）井崎やゑこ，吉田宏三，日高公雄，他：日栄食誌，**39**，(6)，485-493，1986．

11）㈱資源協会食品成分調査研究所：ひと目でわかる517食品表ビタミン E，コレステロール，脂肪酸，P/S：100-121，1989，第一法規，東京．

12）藤田秋二：ビタミン定量法，372-376，1955，南江堂，東京．

13）菊谷典久，佐藤直子，笠原利英，井口正雄，他：東京衛研年報，**37**，237-240，1986．

14）小沢　聖，和田　実，山下三雄：昭和60年度野菜試験報告書，31-35，1986，小笠原亜熱帯農業センター，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 171-174, 1992

健常人の血清中25- Hydroxyvitamin D_3 濃度

早 藤 知恵子*, 友 松 俊 夫*

Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D_3 of Normal Subjects

CHIEKO HAYAFUJI* and TOSHIO TOMOMATSU*

Serum samples were collected from thirteen volunteers with their agreement. Serum 25-hydroxyvitamin D_3 (25(OH)D_3) was assayed by high performance liquid chromatography, and other elements were assayed by auto analyzer. Serum 25(OH)D_3 levels showed the range of 19.4～29.8ng/ml, and the average value was 24.1±3.3ng/ml. The values of serum calcium, inorganic phosphate, alkaline phosphatase, albumin and creatinine showed almost mormal levels, in the ranges 9.5～10.6mg/dl, 2.7～3.5mg/dl, 102～220IU/l, 4.6～5.5g/dl and 0.8～1.4mg/dl, respectively. Serum 25(OH)D_3 levels of drinkers who were lacking in exercise were significantly lower than non-drinkers who exercised ($P<0.001$).

Keyword：25-ヒドロキシビタミンD_3 25- hydroxyvitamin D_3, カルシウム calcium, リン inorganic phosphate, アルカリフォスファターゼ alkaline phosphatase, アルブミン albumin, クレアチニンcreatinine, 運動 exercise, 飲酒 drinking, 高速液体 クロマトグラフィーhigh performance liquid chromatography

はじめに

近年，老年人口の増加に伴い，閉経女性の骨粗鬆症を中心に退行期骨粗鬆症が社会問題となっている．骨粗鬆症は骨吸収と骨形成の長期間にわたるアンバランスにより引き起こされ骨量の減少する疾患であり，加齢，遺伝的素因，内分必因子，運動不足，栄養障害が関与する．通常，副甲状腺ホルモン，活性型ビタミンD，カルシトニン等がバランスを保ちカルシウム代謝を正常にしている．特に女性は閉経によりエストロジェンの分泌が低下すると，急激に骨量が低下する．

平成2年の国民栄養調査によるとカルシウムの摂取量は一日531mgで，厚生省の推奨摂取量600mgに対して88.5%と低かった．富田ら[1]が54～74歳の閉経後骨粗鬆症患者の摂取した食物と排泄物を調べたところ，カルシウムの一日摂取量201mgにたいして排泄量は527mgであり326mgの不足であった．さらに，Souza ら[2-3]の研究でも，一日800mgあるいは16～17mg/kg体重のカルシウム摂取が必要であった．

このカルシウムの代謝に重要なビタミンDは，食物摂取の他に，皮下のコレステロールから紫外線照射によっても作られ供給される．ビタミンDは肝臓と腎臓で水酸化され25-hydroxyvitamin D_3(25(OH)D_3)，ついで1,25-dihydroxyvitanin D_3(1,25$(OH)_2D_3$)になり骨吸収や骨形成に関与している．退行期骨粗鬆症の診断の為に厚生省の研究班(班長：折茂肇)は，骨粗鬆症の診断基準を作成しており(Table 1)，血清カルシウム，リン，アルカリフォスファターゼ(以下ALP と略す)の測定を必要としている．そこで本研究では，骨粗鬆症予防のための情報を収集し総合的な指導に役立てるため，ビタミンDの栄養状態を反映する25(OH)D_3と，上記3項目に加えてアルブミンとクレアチニンを測定し，聞き取り調査もおこなった．

実験方法

1．試料 同意を得た健常人より採血し，その血清を試料とした．アッセイに供するまで-20℃に保存した．

2．試薬 25(OH)D_3は，Biomol Research Laboratories 社(アメリカ)の市販品を用いた．メチルアルコール，アセトニトリル，n-ヘキサン，イソプロピルアルコール，ジクロロメタンは液体クロマトグラフ用を用いた．カルシウム，リン，ALP，アルブミン，クレアチニン，は日

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

Table. 1. Diagnostic Criteria of Involutional Osteoporosis

		score
1) loss of bone mass (+)		3
2) fractures (+) spine	1	1
	≧2	2
femur		3
radius		1
3) age female	<55years	-1
male	<75years	-1
4) back pain		1
5) level of serum Ca,P,ALP		
all normal		1
one abnormal		0
2≦ abnormal		-1

definite	≧5	probable	4
doubtful	3	denial	≦2

exception :
primary·secondary hyperparathyroidism, rheumatoid arthritis, multiple myeloma, trauma secondary osteoporosis, osteomalacia, bone metastasis of malignancy

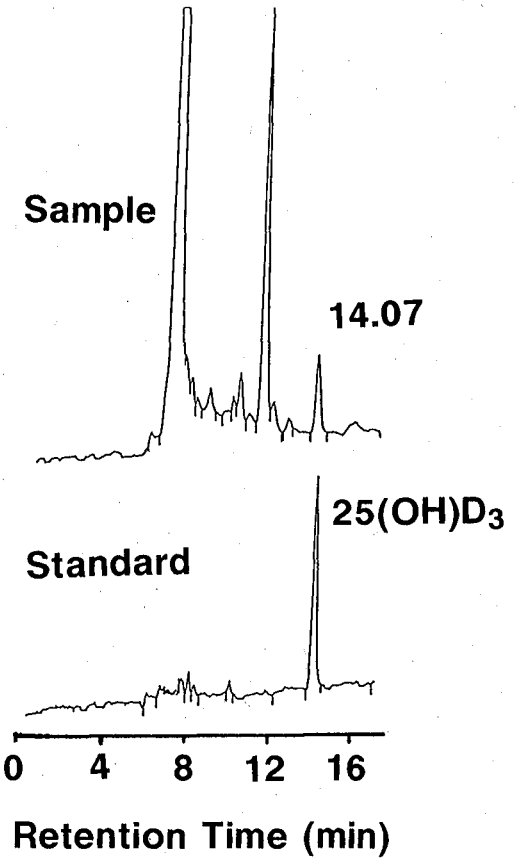


Fig. 1. Chromatogram of 25(OH)D_3 on HPLC

立705形生化学自動分析装置用の第一化学薬品製スタンダードと試薬を用いた．その他の試薬は特級品を用いた．カートリッジカラムはボンドエルートC18を用いた．

3．装置 1）高速液体クロマトグラフ(以下HPLCと略す) ポンプ：880-PU(日本分光製) UV検出器：870-UV(日本分光製) インテグレーター：クロマトパックCR3A(島津製) 2）日立705形生化学自動分析装置(日立製)

4．HPLC測定条件 1）逆相カラム：Unisil Q C18 (4.6×250mm, GLサイエンス社) 移動相：50%メチルアルコール/アセトニトリル 流速：0.4ml/min 測定波長：254nm 2）順相カラム：Wakosil 5SIL (4.6×250mm, 和光純薬) 移動相：12.5%イソプロピルアルコール/n-ヘキサン 流速：0.5ml/min 測定波長；254nm

5．25(OH)D_3の測定方法 Kao[4], Hollis[5], Okano[6]らの方法を参考にした．1）抽出 血清1 mlにアセトニトリル1 mlを加え攪拌後，4℃，2000rpmで10分間遠心した．これを2回繰り返し，それらの上清に0.4Mリン酸バッファー(PH10.5)を3ml加え室温で10分間インキュベートした．2）カートリッジカラムへの適用 カートリッジカラムは予めアセトニトリル5 mlで洗浄し水5 mlで平衡にしておいた．ここへ1)の抽出液を適用した．ついで水5 ml，30%メチルアルコール5 ml及び60%メチルアルコール5 mlで洗い，10%ジクロロメタン/n-ヘキサン5 mlで溶出する分画を25(OH)D_3定量用として採取した．3）HPLCへの適用 25(OH)D_3用分画を濃縮し逆相のカラムに展開しリテンションタイム13.3分の分画を回収した．これを濃縮し，さらに順相のカラムに展開しピーク高より直接測定した．

結果と考察

HPLCによる25(OH)D_3の定量は，Fig. 1よりピーク高で求めた．25(OH)D_3の抽出効率を血清量と比較検討したところFig. 2に示すように0.5ml～3 mlの間では，回帰式y＝−0.4+13.7x(r=0.99)となり良好な正の相関を得て，定量的に抽出できた．25(OH)D_3をHPLCで感度よく測定でき，同時に1,25$(OH)_2D_3$の定量が可能な血清量として，1 mlを採用した．今回の抽出操作におけ

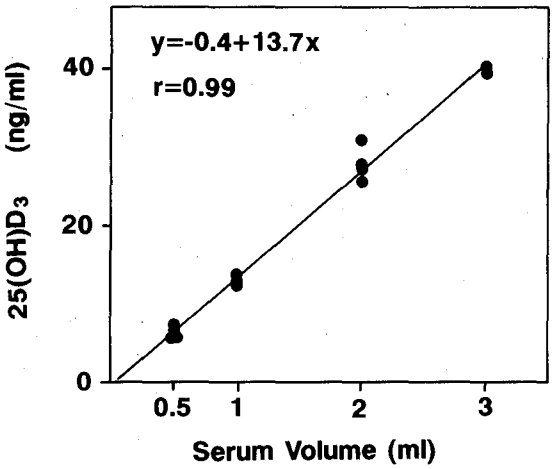


Fig. 2. Relationship between Serum Volume and Extracted 25(OH)D_3 by the Cartridge Column

Table. 2. Assayed Values of Ca, P, ALP, Creatinine, Alubumin, 25(OH)D_3 in Serum

		Range of Standard value	Range of Assayed value
Ca	mg/dl	8.2 ~10.8	9.5 ~10.6
P	mg/dl	2.5~5.5	2.7~3.5
ALP	IU/l	100~280	102~220
Creatinine	mg/dl	0.7~1.5	0.8~1.4
Albumin	g/dl	3.1~5.2	4.6~5.5
25(OH)D_3	ng/ml	10~29*	19.4~29.8
		10~40**	

*, **: Data from reference 8),9)

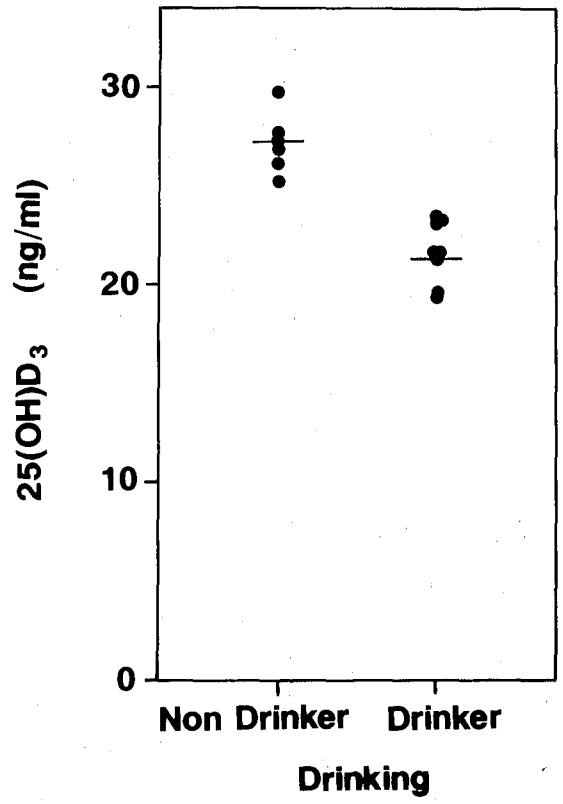


Fig. 3. Comparison of Serum 25(OH)D_3 Levels between Drinkers and Non-Drinkers
Significant Differences Drinkers and Non-drinkers at $P<0.001$

る添加回収試験として，健常人空腹時血清より作成したプール血清に，25(OH)D_3をそれぞれ12.5，25，50，100ng/ml 添加して血中25(OH)D_3として測定した．相関係数r=0.96の良好な正の相関が認められた．

年齢34-51才の男女(女性3名)13名より得た血清のカルシウム，リン，ALP，アルブミン，クレアチニンはほぼ正常値の範囲であった(Table 2)．25(OH)D_3は19.4～29.8ng/ml で平均24.1±3.3ng/ml (Mean±SE)であった．採血は7月で最高気温27℃の曇天に行った．増田ら[7]によると夏季は27.6±7.9ng/ml，冬季は18.8±5.4gn/ml であり，25(OH)D_3は皮膚で生成したD_3の量をよく反映しており曇天は晴天より低くなるという．測定方法や機関によっても値は異なる[8-11]と言われている．今回被検者は全員屋内におり同一の環境にあった．

血清25(OH)D_3と，聞き取り調査による飲酒，運動量，年齢等の関係についてまとめた．飲酒習慣のある人(n=7)の血清25(OH)D_3は19.4～23.3ng/ml で平均は21.4±2.31ng/ml，飲酒しない人(n=6)は，25.2～29.8 ng/ml で平均27.2±2.48ng/ml となった(Fig. 3)．両者の間には$P<0.001$で有意に差があった．しかし，1週間の運動量で分けるとFig. 4 のようになり，飲酒習慣のない人では良く日光にあたり運動している傾向があった．その内容はテニス，バレーボール，水泳，ジョギング等を1～2時間程度行っており，日光浴，散歩も含めた．ちなみにFig. 4 の中の1は魚をよく食べる人であり，2はスポーツマンであった．年齢と血清25(OH)D_3の関係は，Fig. 5 のように加齢とともに低くなり，相関係数(r=-0.77)で，回帰式y=47.9-0.55xを得た．これは，よく運動して飲酒の習慣がない若い人が多かったのに対して，年齢が増すにつれて運動量が減少し飲酒習慣のある人が多くなったためと思われる．

ま と め

25(OH)D_3の定量はカートリッジカラムと HPLC を用い

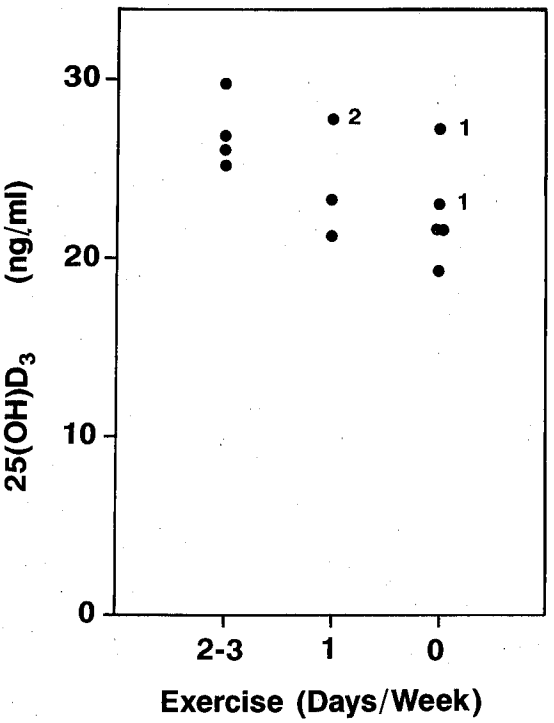


Fig. 4. Effect of Exercise and Other Factors on the Serum 25(OH)D_3 Levels

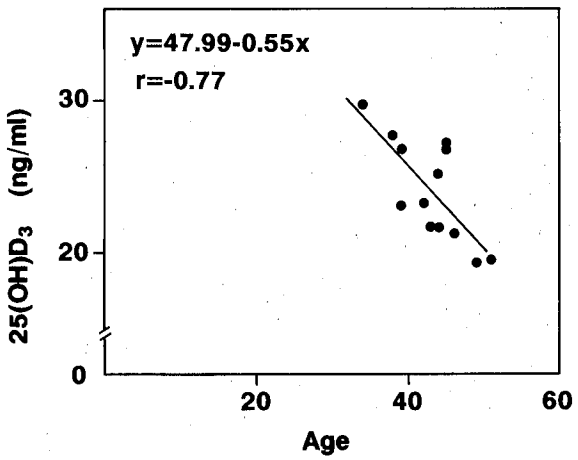


Fig. 5. Relationship between Serum 25(OH)D_3 Levels and Aging

Table. 3. Risk Factors of Osteoporosis

1)	female
2)	the oriental race, the white race
3)	family history of osteoporosis
4)	lack of Ca intake
5)	early menopause, artifical menopause
6)	lack of exercise, excessive exercise
7)	nullipara
8)	excessive intake of alcohol, salt, caffeine or fluoride
9)	smoking
10)	short stature, low weight
11)	lack of solar radiation

て感度良く測定できた．通常の検査で正常値の範囲の人でも，運動習慣がなく飲酒習慣のある人では，運動習慣があって飲酒しない人より血清25(OH)D_3が有意に低いことがわかった．骨粗鬆症の危険因子としてTable 3に示すように運動不足や過度のアルコール，日光不足があげられており，本実験の結果とよく一致していた．聞き取り調査と25(OH)D_3の測定をすることでビタミンD_3の栄養状態を知ることができた．今後はさらに他のビタミンD代謝物，副甲状腺ホルモン，性ホルモン，ミネラル，金属等との関係や，危険因子に関わる生活習慣，栄養状態等の個人情報を把握して，骨粗鬆症予防のための総合的な指導に役立てたいと考えている．

謝辞 本研究にあたり血液を提供していただきました当研究所の職員の方々に深謝します．採血，生化学自動分析装置の操作に御協力いただきました佐々木美枝子氏，蓑輪佳子氏，大石向江氏，小林千種氏に深謝します．

文　献

1) 富田明夫，根来良材：メディヤサークル，**36**，203-209.1991.
2) Souza, CA., Nakamura, T., Stergiopoulos, K., et al.：*Gerontology*, **37**(suppl 1), 43-47, 1991.
3) 白木正孝：老年医学，**29**，1139-1142，1991.
4) Kao, P.C. and Heser, D.W.：*Clini. Chem.*, **30**，56-61，1984.
5) Hollis, B.W.,：*Cl in. Chem.*, **32**，2060-2063，1986.
6) Okano, T., Mizuno, N., Shida, S., et al.：*J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **27**，43-54，1981.
7) 増田園子，岡野登志夫，小林正，他：ビタミン，**63**，311-319，1989.
8) 小林正(日本ビタミン学会編)：ビタミンハンドブック(Ⅰ)，31-48，1989，化学同人，京都.
9) Kobayashi, T., Okano, T., Shida, S., et al.：*J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **29**，271-281，1983.
10) 清野佳紀，久保俊英：臨床検査，**31**，1518-1524，1990.
11) 小林正：ビタミン，**64**，99-104，1990.

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.*, **43**, 175-178, 1992

東京湾の環境汚染モニタリング(第10報*)
平成2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 (X)*
Residue Levels in Japanese Sea-bass and Gull in 1990

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)中の化学物質濃度の変化及び特徴を報告してきた[1)]．

スズキ，ウミネコに含まれるＰＣＢ，ＨＣＢ，ドリン類，ＤＤＴ類など有機塩素系化合物の濃度は，これらが第一種特定化学物質に指定され，使用禁止となったため，減少傾向は見られるものの，これらによる汚染は依然続いている．また，最近，有機スズ化合物の１つであるＴＰＴによる海洋汚染が問題となり，本調査においても，昨年度からＴＰＴ測定が開始された．その結果，スズキのＴＰＴによる汚染は，同じ有機スズ化合物の１つであるＴＢＴの7.5 倍(1.8 μg/g)という高濃度で検出され，ウミネコからは，鳥類で初めてＴＰＴが有機スズ化合物として0.04 μg/g検出された[1)]．高等動物においてもＴＢＴ以上にＴＰＴの汚染が進んでいることがわかった．今後とも，このような新たなる汚染に対応できるよう，本調査の内容を充実し，継続的に注意深く監視していく必要がある．

本報告は，平成２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２年10月神奈川県横須賀沖で捕獲された26尾を重量の順に５または６尾ずつまとめ５検体とした．ウミネコは，平成２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．鑑定及び試料の調整は，前報[1)]と同様に行った．試料の概要はTable 1，2に示した．

分析方法　環境庁で定めた分析法[2)]により行った．詳細な操作法，及び分析条件は報告書[3)]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．

試薬は，前報[1)]と同様のものを使用した．

分析装置は，前報[1)]のもののほか，ヒューレット・パッカード社製ＧＣ(ＦＤＰ，ＮＰＤ付)－ＭＳＤ 5890 Ⅱ，及びＭＳＤ 5971Ａ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．昨年度はスズキが大型(体重平均2560g)であったため，ＰＣＢ濃度は0.39 μg/gと高かったが，今年度は平均体重540gで，例年並みであったため，0.13 μg/gと汚染濃度も例年並みであった．ＨＣＢは今年度は検出されなかった．デイルドリン濃度は0.002 μg/gで，例年と同程度の汚染であった．ＤＤＴ類濃度は一昨年度と同程度の汚染であったが、ＤＤＴ原体は，今年度は検出されず，代謝物または分解物の*p, p'*－ＤＤＥと*p, p'*－ＤＤＤのみが検出された．クロルデン類の濃度は減少傾向が見られ，調査開始以来最低の値を示した．特に，オキシクロルデンは全く検出されなかった．ＨＣＨ類は残留性の高いβ－ＨＣＨのみが５検体中４検体から検出され，α，γ，δ－ＨＣＨは今年度も検出されなかった．塩素化ベンゼン類は，年度間の変動が激しい物質である．一昨年度は全く検出されなかったが，検体の

---

*第９報，東京衛研年報，42，210-213，1991.

**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町３－24－１

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

Table 1. Constitutions of Sea Bass Samples and Water and Fat Contents of the Muscle. (n=5 or 6)

group No.	body weight (g) mean±SD	length* (cm) mean±SD	water (%)	fat (%)
1	675±32	42.5±2.2	76.4	1.68
2	564±17	39.5±1.0	75.4	2.84
3	531±14	37.4±0.7	74.8	3.62
4	495±17	36.9±0.8	76.1	2.05
5	445±13	35.6±0.4	76.1	2.39
mean	542	38.4	75.8	2.52

*: not included the part of tail fin

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	619±43	36.4±1.4	67.7	5.74
2	mix	580±59	35.2±1.5	65.3	6.86
3	mix	539±58	34.1±2.2	66.4	6.78
4	mix	580±65	35.4±1.2	63.9	6.53
5	mix	553±70	35.6±2.0	65.2	5.70
mean		574	35.3	65.7	6.32

大きかった昨年度は平均0.11 μg/g検出され，今年度は検体が平年並みの大きさであったにも関わらず，平均0.15 μg/gも検出され，調査開始以来の最高値を示した．フタル酸エステル類，ＴＢＰは今年度も検出されなかった．ＴＢＴ濃度は，平均0.17 μg/gで，昨年度同様，減少傾向が見られた．ＴＰＴの濃度は平均0.25 μg/gで，昨年度の平均1.8 μg/g に比べ7分の1に減少した．これは，環境への放出量が減少したこと，及び，検体のスズキが昨年度に比べ小型になったことが一因と考えられる．

ウミネコについて ウミネコ胸筋の化学物質濃度をTable 3に示す．ＰＣＢ，ＨＣＢ，ディルドリン，ＤＤＴ類の濃度は，昨年度と同程度の汚染であった．これらの物質は，自然界において，極めて分解性が悪いことを示している．クロルデン類は，昭和61年9月に第一種特定化学物質に指定され，使用禁止となった．そのため，62年度を境にその汚染濃度は減少し，今年度は0.092 μg/gで，最高値を示した62年度の5分の1にまで減少した．しかし，難分解性であるから，今後とも環境中における残留状況を注意深く監視する必要がある．β－ＨＣＨ濃度は0.014 μg/g であり，5年前の昭和60年度に比べて，半分以下の濃度となった．塩素化ベンゼン類は，これまでp－ジクロロベンゼンのほかに，トリクロロベンゼンやテトラクロロベンゼンが検出されていた．しかし，今年度は，p－ジクロロベンゼンのみが5検体全てから検出され，他の塩素化ベンゼンは検出されなかった．フタル酸エステル類，ＴＢＰ，ＴＢＴは今年度も検出されなかった．ＴＰＴ濃度は平均0.03 μg/g で，昨年度と同程度の汚染であった．スズキに比較すると低濃度ではあるが，全検体から検出された．ＴＰＴは，ＴＢＴよりも代謝されにくく，蓄積性が高いと考えられる．

化学物質による環境の汚染は，化学物質本来の使用目的外の処理過程でも，非意図的に発生することがある．例えば，発ガン性や催奇性の高いダイオキシン類が，ごみ焼却場で有機塩素系化合物を含むプラスチックなどの焼却処理過程で生成され，灰に含まれて排出されている，紙パルプ製造工場でも漂白剤の塩素とパルプ中のリグニンとの反応で生成され，排水に含まれ排出されていると

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	0.07-0.17	0.13	1.0-2.0	1.6
PCN*1	nd	nd	nd	nd
HCB	nd	nd	0.008-0.011	0.010
aldrin	nd	nd	nd	nd
dieldrin	0.001-0.002	0.002	0.007-0.016	0.010
endrin	nd	nd	nd	nd
o,p'-DDT	nd	nd	nd-0.002	-
p,p'-DDT	nd	nd	nd-0.002	-
o,p'-DDE	nd	nd	nd	nd
p,p'-DDE	0.008-0.011	0.009	0.21-0.31	0.25
o,p'-DDD	nd	nd	nd	nd
p,p'-DDD	0.003-0.004	0.003	nd	nd
trans-chlordane	0.001-0.002	0.001	nd	nd
cis-chlordane	0.003-0.006	0.004	0.003-0.008	0.005
trans-nonachlor	0.005-0.009	0.006	0.038-0.078	0.053
cis-nonachlor	0.002-0.004	0.003	0.013-0.027	0.020
oxychlordane	nd	nd	0.011-0.018	0.014
heptachlor	nd	nd	nd	nd
HCE	nd	nd	0.003-0.005	0.004
α-HCH	nd	nd	nd	nd
β-HCH	nd-0.002	-	0.011-0.017	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	0.12-0.21	0.15	0.02-0.03	0.02
1,2,3-TrCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4-TrCB	0.001-0.003	0.002	nd	nd
1,3,5-TrCB	nd-0.003	-	nd	nd
1,2,3,4-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,3,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
1,2,4,5-TeCB	nd	nd	nd	nd
PeCB	nd	nd	nd	nd
DnBP*2	nd	nd	nd	nd
DEHP*2	nd	nd	nd	nd
TBP*1	nd	nd	nd	nd
TBT*3	0.12-0.21	0.17	nd	nd
TPT*4	0.16-0.45	0.25	0.02-0.04	0.03

a : (μg/g on wet weight basis)
＊1 : nd<0.01, ＊2 : nd<0.1, ＊3 : nd<0.05, ＊4 : nd<0.02
others : nd<0.001

言われている．化学物質は，我々の生活を便利に，そして豊かにする上で不可欠なものである．しかし，その生産から廃棄までの各段階において，環境汚染の原因となる危険性も持ち合わせている．したがって，使用を目的として生成された化学物質だけでなく，副次的に生成された化学物質による汚染をも含めた環境への汚染を未然に防ぐ必要がある．

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，**42**，210-213，1991.
2）環境庁編：生物モニタリング調査マニュアル，昭和62年5月.
3）東京都立衛生研究所：平成2年度生物モニタリング結果報告書，1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 179-186, 1992

パソコンで推定した東京都区部の200 mメッシュ別NO_2年平均濃度

牧 野 国 義*

Annual Mean Concentrations of NO_2 by 200-Meter Mesh in the Ward-Area of Tokyo Estimated with a Personal Computer

KUNIYOSHI MAKINO*

Annual mean concentrations of nitrogen dioxide by two hundred meter mesh were estimated in the ward-area of Tokyo by using a personal computer berween 1976 and 1990. For this estimation, data from twenty monitoring sites within the areas and from five sites in neighbouring surbarban areas were used. The presented method was developed so that it could be implemented with a personal computer of a small memory capacity without compromising the accuracy of estimation. Using this method, the concentrations of NO_2 at arterial road meshes were also estimated from 1988 to 1990.

The results of the approx. 15,400 meshes for the fifteen years indicates that the concentration was maximal in 1978 and minimal in 1985. Since 1985, the concentrations have increased gradually. Displaying a concentration map for each year, the screen provides quick and vivid information on the local distribution and time trends. The concentrations at arterial road meshes were higher than for the neighboring meshes.

Keywords：窒素酸化物 nitrogen dioxide, メッシュデータ mesh data, 補間法 interpolation, 画面表示 display mapping, 年次推移 annual trend

緒　　言

区市町村別の大気汚染物質濃度は，地域別の大気汚状況の実態を把握するためだけでなく，大気汚染による健康影響を検討する際や，健康影響のサーベイランスシステムにおいても不可欠な情報の一つとして利用される．その多くは常時測定局観測値が加工されることなく利用されている．東京都についてみると，一般環境の大気汚染物質が環境保全局の常時測定局35局で測定されており，区市別の濃度を算定する際には，この報告結果が利用されることが多い．しかし，区部についてみると，測定局は20局に過ぎず，4区(台東，墨田，豊島，北)では，一般環境測定局が設置されていない．また，区の面積や大気拡散を考慮すると，1区1局で大気汚染物質濃度が代表し得るとは考え難く，各測定局の測定結果は，区の代表値ではなく，測定局の地理的条件の影響を受けた測定値とみなすべきであろう．区の代表値を得るためには，区の地理的条件を考慮した大気汚染物質濃度を推定する必要がある．こうした事情から，従来においても地域をメッシュで区分し，補間推定法を利用した手法が報告された[1-3]．ただし，これらの手法は計算に大容量を要し，大型コンピュータにより算出されている．また，メッシュも500 m以上のことが多く，局所的な変化が激しい物質については必ずしも適切と思われない．また，近年パソコンの普及が著しいので，パソコンで計算し，表示した方が利用価値が高い．そこで，ここでは区部を200 mメッシュで区切り，パソコンにより比較的簡便に各区の濃度を推定する方法および表示する方法を検討し，NO_2について年平均濃度の推定を試みた．また，NO_2については幹線道路からの距離減衰の存在も知られているので，沿道地域についても後背地域と比較検討した．

研究方法

1）資料

環境保全局の常時測定報告結果では，一般環境測定局が区部に20局，区部に隣接した市部に5局ある．NO_2に

*東京都立衛生研究所環境保険部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

ついて，この25局の1976～90年度の年平均濃度資料を200 mメッシュ別の濃度推定に利用した．なお，沿道付近に設置されている自動車排出ガス測定局については，採気位置の沿道からの距離が距離減衰を考慮したとき重要となるが，必ずしも明確でないため，ここでは利用しなかった．また，幹線道路からの距離減衰については，大田区，渋谷区内の幹線道路の0 m，150m 地点で調査されている1990～1991年のNO_2測定資料を用いた．

2）対象地域と幹線道路

東京都区部は，東西に約32km，南北に約31kmの距離があり，200m メッシュにすると陸地のメッシュ数は約15,400となる．区部中最大面積の世田谷区は1550，最小面積の台東区は232である．幹線道路については，年代を追うにしたがい、その数が増加したと思われるので，濃度への影響の検討は1988～1990年度に留めた．なお，高架線が主体の高速道路については地表と高さが異なるので，ここでは幹線道路に含めなかった．

3）推定方法

ここではパソコンで十分計算可能であることを考慮して，あるメッシュを囲む3測定局メッシュによる濃度の平面方程式を求め，そのメッシュの位置の濃度を推定する比較的簡便な手法を採用した．平面方程式による方法は，計算は簡単だが，地域全部の濃度曲面は鋭角の変化が多く，平滑さに難点がある．そこで，以下のように平滑化を図る補助的な方法を加え，メッシュ毎の濃度を推定した．

①等間隔に節点を設定する．間隔は東西および南北に10メッシュ（2 km)毎に格子状にする(東西に17点，南北に，16点)．

②大気拡散が距離に関係することを考慮して，それぞれの節点について，3測定局メッシュとの距離の2乗和が最小となる三角形を決める．

③3測定局の位置座標を，$(x_1 . y_1)$，$(x_2 . y_2)$，$(x_3 . y_3)$，濃度をz_1，z_2，z_3としたとき，$z=ax+by+c$ で表される濃度の平面方程式は，連立方程式から定数a，b，cが得られ，任意の節点位置の濃度が推定される．

④より平滑な濃度曲面を得るために，任意のメッシュ位置の濃度については以下のようにする．その位置に近接する4カ所の節点の濃度と距離から(4番目の距離の節点より測定局が近接していれば5カ所)，1番目の節点または測定局の濃度をz_1，距離をd_1としたとき，そのメッシュの濃度zは，

$$z=\Sigma\,(z_1/d_1)/\Sigma\,(1/d_1) \quad (d_1\neq 0)$$
$$z=z_1 \quad (d_1=0)$$

各区の濃度は，区毎のメッシュ数の濃度を平均して得られる．

4）沿道からの距離減衰

自動車の走行は幹線道路に限らず，また，同じ街道でも地域により走行量はかなり異なる．さらに，道路幅は一定でない．特に，200m メッシュで区分する場合，道路幅によって推定値が大きく変化すると思われる．したがって，厳密に道路沿道からの距離減衰を推定するにはより詳細な道路状況を調査する必要がある．ここでは単純化し，メッシュの中心に50m道路が走るとして，沿道メッシュと隣接メッシュとを比較する．道路上は一般環境とはみなし難いので，沿道メッシュの道路からの距離は，0～75 m範囲となり，隣接メッシュは75～275m の範囲となる．沿道の濃度をa，減衰定数をbとすると，x m地点の濃度 F(x)は，$F(x)=a\cdot\exp(-bx)$となる．沿道メッシュと隣接メッシュの濃度比は，

$$\left(\frac{1}{75}\int_0^{75}F(x)dx\right)\Big/\left(\frac{1}{200}\int_{75}^{275}F(x)dx\right)$$

で得られる．なお，一般環境測定局はいずれも沿道メッシュには位置しない．

結　　果

1）1976～1990年度の23区のNO_2濃度

まず，区部市部の一般環境測定局25局のNO_2の1976～1990年度の年平均濃度をTable 1 に示した．この資料に基づいて東京都区部のメッシュ約15,400について濃度を推定すると，23区それぞれの平均濃度がTable 2 のように得られた．区内のばらつきは，変動係数が大半10%未満で小さかったが，濃度勾配が比較的大きい江戸川区は15年間のうち12年間で10%を越えた．$NO_2$25～40 ppbを5 ppb間隔で区切り，各年度の度数分布をみると(Table 3)，1978年度が15年間で最も高濃度で，その後減少して1985年度に最低となり，以後再び増加の傾向を示した．23区の中では，千代田区が1978年度以来最高濃度で，中央区，江東区，台東区がそれに続いた．区部全体で20測定局濃度平均とメッシュ濃度平均の15年間の推移はFig. 1 のようになり，その差は0～0.8 ppb であった．

2）メッシュ濃度の地図による図示

東京都区部のメッシュ約15,400による区の区分と幹線道路は，パソコンのディスプレイにFig. 2 およびFig. 3 のように示すことができる．メッシュ濃度の地図による図示の例として，期間中の高濃度時期の1980年度(Fig. 4)と，低濃度時期の1985年度(Fig. 5)，および1988年度(Fig. 6)と1990年度(Fig. 7)についてに示した．

Table 1. Annual Mean Concentrations of NO_2 (ppb)

Ward or City	Year														
	1976	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Chiyoda	38	38	46	49	46	42	45	43	42	40	37	47	48	45	49
Chuo	44	44	53	44	42	34	37	37	33	30	31	36	37	36	41
Minato	44	45	46	40	39	34	35	36	33	33	30	34	35	34	37
Shinjuku	34	24	30	35	28	31	31	31	27	24	31	33	33	31	32
Bunkyo	35	35	42	36	35	33	34	34	29	31	31	34	34	35	37
Koto	31	34	42	44	39	32	30	32	31	29	32	35	35	35	35
Shinagawa	41	39	41	33	35	37	37	29	29	27	30	29	29	33	31
Meguro	40	41	39	39	36	31	31	31	29	28	30	32	32	33	34
Ohta	30	31	33	32	31	30	30	33	31	29	34	36	37	36	38
Setagaya	35	36	39	36	33	30	31	30	26	26	30	32	32	33	32
Shibuya	33	32	39	39	42	43	38	35	38	31	31	33	35	36	34
Nakano	32	35	34	34	35	31	32	30	33	31	27	30	31	31	27
Suginami	39	33	44	40	32	28	29	28	28	28	28	27	27	28	30
Arakawa	37	31	33	32	35	34	34	35	33	32	32	35	37	35	29
Itabashi	38	40	42	40	38	38	35	35	32	32	35	36	36	36	37
Nerima 1#	29	28	22	29	31	30	31	31	31	30	30	28	27	29	30
Nerima 2#	38	34	39	34	32	28	31	30	29	30	26	28	29	32	32
Adachi	36	40	43	33	32	33	33	33	32	32	32	31	30	31	31
Katsushika	33	31	36	33	30	21	29	28	27	24	23	28	30	30	31
Edogawa	26	26	26	24	22	24	25	24	22	25	25	28	29	28	28
Komae	32	22	34	37	32	32	33	30	22	21	26	28	26	27	29
Chofu	26	29	30	25	25	28	25	28	30	27	28	26	26	24	27
Musashino	28	28	32	28	23	25	26	25	22	23	26	26	25	26	28
Tanashi	25	27	20	22	23	21	26	22	24	22	27	27	26	24	24
Kiyose	27	25	29	21	22	21	21	22	20	21	24	25	23	25	26

#: Nerima 1=Shakujii, Nerima 2=Nerimakita Monitoring Site

Table. 3. Annual Transition of Frequency Distribution in Ranged Concentrations of NO_2 (ppb)

NO_2(ppb) Range	Yr														
	1976	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
～25	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
25～30	1	3	0	1	2	5	3	4	6	15	7	5	6	3	4
30～35	7	9	6	8	10	10	13	13	14	6	14	11	8	13	8
35～40	13	8	7	8	7	7	6	6	2	1	1	6	7	6	8
40～	2	3	10	6	4	0	1	0	0	0	0	1	2	1	3

Table. 2. Estimated Annual Mesh-Mean Concentrations of NO_2 (ppb)

Ward	Yr	1976	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	Meshes
Chiyoda		37	37	44	45	42	39	41	39	38	36	35	42	43	41	44	315
Chuo		40	40	48	45	43	37	39	38	36	34	34	40	41	39	43	242
Minato		41	41	46	41	40	36	37	36	34	32	31	36	37	36	38	535
Shinjuku		35	29	35	38	34	34	35	34	31	29	32	36	36	35	35	472
Bunkyo		36	35	41	39	37	35	36	36	32	32	33	37	37	37	38	276
Taito		36	38	43	42	39	37	36	36	33	33	34	38	38	37	39	232
Sumida		34	35	41	41	37	32	32	33	31	30	31	35	35	35	36	324
Koto		40	40	53	46	43	34	37	36	33	29	32	37	38	37	42	940
Shinagawa		39	39	42	36	36	34	35	32	30	29	31	33	33	34	35	587
Meguro		38	39	40	38	37	34	33	32	31	29	30	33	33	34	34	349
Ohta		33	33	35	34	32	30	30	31	30	27	33	34	35	35	36	1286
Setagaya		35	32	38	37	34	31	32	30	26	25	29	31	30	31	32	1550
Shibuya		36	34	39	39	38	37	35	34	34	30	31	35	35	35	35	401
Nakano		33	31	34	35	33	31	32	31	30	28	29	31	32	31	30	397
Suginami		35	33	38	36	33	30	31	29	29	29	28	29	29	30	29	836
Toshima		35	30	34	34	33	33	33	33	30	29	31	34	35	33	32	269
Arakawa		37	35	39	33	33	32	33	33	31	31	30	32	32	33	31	593
Kita		37	38	41	38	37	36	34	32	31	33	35	35	35	35	36	245
Itabashi		37	34	38	32	31	28	31	30	29	30	27	29	30	32	30	831
Nerima		33	31	34	31	31	28	30	29	29	29	27	28	28	30	30	1205
Adachi		35	37	41	32	31	29	32	32	31	30	29	30	30	31	30	1401
Katsushika		32	30	35	29	27	20	28	27	26	24	22	26	28	28	29	874
Edogawa		28	29	33	31	28	29	27	27	25	27	29	32	32	31	32	1180

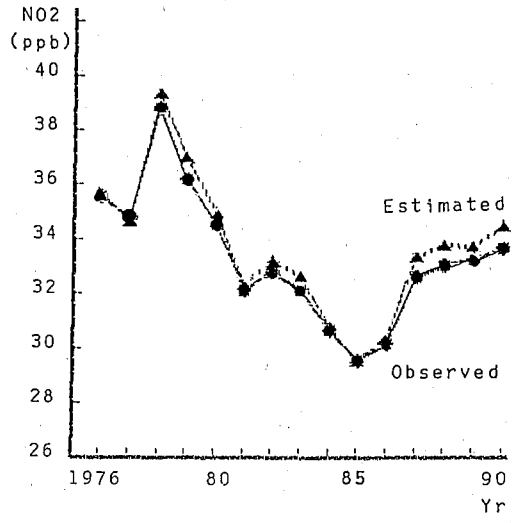


Fig. 1. Annual Transition of NO_2 Concentrations (ppb) in the Ward-Area of Tokyo Observed at 20 Monitoring Sites and One Estimated with an Interpolation Method

Table. 4. Concentrations of NO_2 (ppb) at a Monitoring Point by Distance from the Roadside

Year/ Month	Ohta 0m	Ward 150m	Shibuya 0m	Ward 150m
1990. 5	47	30	47	31
6	43	27	45	28
7	38	28	37	27
8	52	33	49	35
9	45	31	47	31
10	55	39	53	42
11	63	50	57	45
12	58	40	54	43
1991. 1	46	33	43	29
2	47	37	42	32
3	67	54	67	52
7	42	30	48	35
8	39	31	38	27
9	56	41	66	44
10	49	37	57	39
11	56	39	52	40
12	55	45	51	43

Table. 5. Comparison of Annual Mean Concentrations of NO_2 (ppb) by whether Effects of Arterial Roads (Local Source Area of NO_2) were considered or not

Yr	1988			1989			1990		
Ward	A #	B #	A-B	A	B	A-B	A	B	A-B
Chiyoda	45.4	42.9	2.5	43.3	40.9	2.4	46.4	43.8	2.6
Chuo	42.6	40.7	1.9	41.0	39.3	1.7	44.8	42.9	1.9
Minato	37.9	36.5	1.4	37.3	35.9	1.4	39.9	38.4	1.5
Shinjuku	37.7	35.9	1.8	36.2	34.5	1.7	36.9	35.2	1.7
Bunkyo	38.8	37.0	1.8	38.3	36.5	1.8	40.1	38.3	1.8
Taito	38.8	37.7	1.1	38.1	37.2	0.9	39.6	38.7	0.9
Sumida	36.3	35.1	1.2	36.0	34.9	1.1	36.9	36.0	0.9
Koto	38.5	37.9	0.6	37.6	37.1	0.5	42.5	41.9	0.6
Shinagawa	33.8	33.0	0.8	35.1	34.3	0.8	36.1	35.3	0.8
Meguro	33.3	32.7	0.6	34.1	33.5	0.6	34.7	34.1	0.6
Ohta	36.0	34.7	1.3	36.1	34.8	1.3	37.6	36.3	1.3
Setagaya	30.0	29.9	0.1	30.9	30.9	0.0	31.6	31.5	0.1
Shibuya	35.6	34.8	0.8	35.5	34.7	0.8	35.4	34.6	0.8
Nakano	31.8	31.7	0.1	31.4	31.4	0.0	29.7	29.6	0.1
Suginami	29.4	29.3	0.1	30.0	30.0	0.0	29.4	29.4	0.0
Toshima	36.1	34.5	1.6	34.9	33.3	1.6	33.2	31.7	1.5
Arakawa	33.3	32.4	0.9	33.9	33.0	0.9	32.3	31.4	0.9
Kita	35.3	35.1	0.2	35.3	35.1	0.2	35.8	35.5	0.3
Itabashi	30.9	30.0	0.9	32.7	31.8	0.9	31.2	30.4	0.8
Nerima	28.0	28.0	0.0	29.8	29.8	0.0	29.6	29.6	0.0
Adachi	30.3	29.7	0.6	31.2	30.5	0.7	31.0	30.4	0.6
Katsushika	28.5	28.0	0.5	28.7	28.2	0.5	29.3	28.8	0.5
Edogawa	32.8	31.9	0.9	31.9	31.1	0.8	32.4	31.6	0.8

#：A＝The effects were considered, B＝Not

3）道路沿道の影響

大田区，渋谷区内の幹線道路について，幹線道路の0m，150m地点の1990～1991年のNO_2測定データはTable 4のようであった．減衰定数(1/km)を算出すると，両区の平均と標準偏差はそれぞれ2.16±0.56，2.14±0.56(n＝17)と比較的近似した．そこで，減衰定数を2.15とすると，沿道メッシュと隣接メッシュの濃度比は1.34となった．沿道メッシュにこの比をかけて1988年度と1990年度について図示すると，Fig. 8およびFig. 9のように，沿道メッシュは隣接メッシュよりも高濃度区分になることを明示した(沿道メッシュが黄色や桃色にみえる部分は写真光で変化し，ディスプレイでは最高濃度区分の朱色)．区の平均濃度への影響について，1988～90年度の濃度差をTable 5に示した．今回のように幹線道路を設定すると，NO_2濃度に最も影響の強い千代田区で約6％増加し，中央区，新宿区，文京区がこれに続いた．一方，世田谷区，中野区，杉並区，練馬区ではその影響は僅かであった．この結果は，道路密度が高く，高濃度地域ほど自動車排気ガスの影響が強いことを示唆した．

考　察

大気汚染物質濃度の補間推定法としてはスプライン法がよく知られており[4]，他に著者が報告した大気拡散を考慮した方法[2]などが利用されている．その多くは大型コンピュータを利用し，複数の測定点の濃度から平滑な濃度曲面を得ることを主眼とした濃度推定方法である．ここで採用した方法は，平滑さにおいては前者の方法よりも若干劣るかもしれないが，パソコンで充分計算が可能である．従来の方法が考察された時期はパソコンが普及していなかったため，結果の図示は主にプリンタ出力であった．今回の方法は，計算された推定値を直接カラーディスプレイに表現して，より強力に視覚に訴えられるので，その意味では進歩した面もある．

NO_2の年平均濃度は1976年度から1985年度まで減少傾向を示し，その後増加に転じた(Fig. 1)．環境庁の報

告[5]によると，ガソリン車の窒素酸化物低減効果は，1973年の排気ガス規制開始以前に比し，1978年までの規制で約８％に減少した．また，ディーゼル車では，1987年までの規制で約30％に減少した．ただし，減少カーブは，予想されるように，規制開始時期が急激でその後緩やかになった．一方，わが国の自動車保有台数の推移をみると，1975年に2,915万台であったのが、７年後の1982年に4,269万台，さらに７年後の1989年には5,799万台と後半の方が増加が著しかった．このような規制や台数の状況の変化が上記の濃度推移をもたらしたと推察される．当面排気ガス規制の大きな効果は期待できないと思われるので，新たな効果的な対策を講じなければ，今後も漸増傾向が続くと考えられる(窒素酸化物の排出量は高速であるほど増加するので，渋滞しがちな都心部よりも周辺部で影響が大きい)．

ここではメッシュを200m 区画とした．既報[2]の500m 区画よりもかなり細分化したので，より緻密な解析ができ，局所性が比較的高いNO_2に適している．その反面，メッシュ数が多くなり，計算量が増加する．また，今回は東京都区部に限定したが，市部を含めた都全域でメッシュ別に推定することも可能である．ただし，基礎資料を提供する市部の測定局数が面積の割に少ないため市部の推定精度が低下することや，記憶容量，計算量などからのメッシュの大きさについても充分な配慮が必要である．

局所的な地域の濃度を推定する場合に，その地域の道路状況によりNO_2濃度が大きく異なることが沿道メッシュと隣接メッシュから示唆された．ここで利用した大田区と渋谷区の幹線道路の距離減衰定数は類似した結果が得られたが，他の地域や支線道路でも同様であるかは明らかでない．市部の距離減衰定数ではこれと異なった結果が得られており，したがって，より正確な濃度地理分布を得るためには，濃度の距離減衰調査や道路状況調査(道路幅，車種別自動車走行量，風向など）資料の収集と解析への利用が望まれる．

ま と め

東京都区部のNO_2濃度の地理分布について，パソコンで推定計算ができ，局所的な変動をもみられ，かつ，ディスプレイ上に表現できる方法を検討した．ここではメッシュを200m 区画とし，検討した補間推定法を実際に1976～1990年度に適用した．この方法によって濃度の地理分布が視覚的に見やすく表現できた．また，23区毎に年平均濃度が得られ，年次推移の実態をも把握することができた．区部全体の15年間の年次推移は，1978年度が最高で，1985年度に最低となり，以後再び増加の傾向を示した．区内の濃度のばらつきをみると，江戸川が最も濃度勾配の大きいことを示唆した．さらに，幹線道路の濃度距離減衰の影響を検討したところ，沿道メッシュは隣接メッシュよりも約30％濃度が高く，ディスプレイに表現した際もその影響が明瞭に現われた．区毎のメッシュ平均濃度でみると，その影響は特に千代田区で強く，世田谷区，中野区，杉並区，練馬区では僅かであった．

文　献

1）竹尾省二，沖野教郎：精密機械，**44**，307-313，1978.
2）牧野国義：東京衛研年報，**29-1**，305-310，1978.
3）新藤純子，松本幸雄：大気汚染分布図，1989，国公研，茨城.
4）大西行雄：日海誌，**31**，259-264，1975.
5）環境庁編：環境白書総説，158-196，1991，大蔵省印刷局，東京.

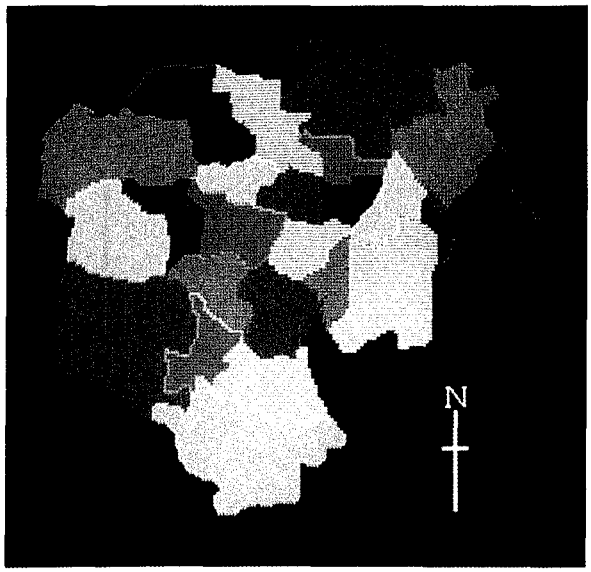


Fig. 2. The 23 Wards of Tokyo

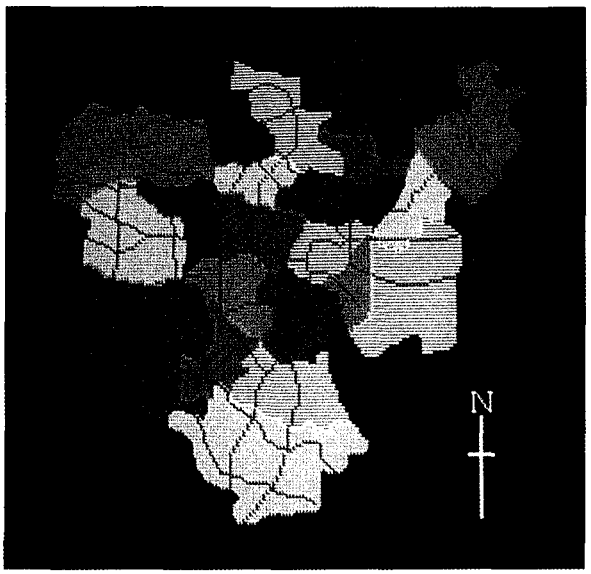


Fig. 3. Arterial Roads in the Ward-Area of Tokyo

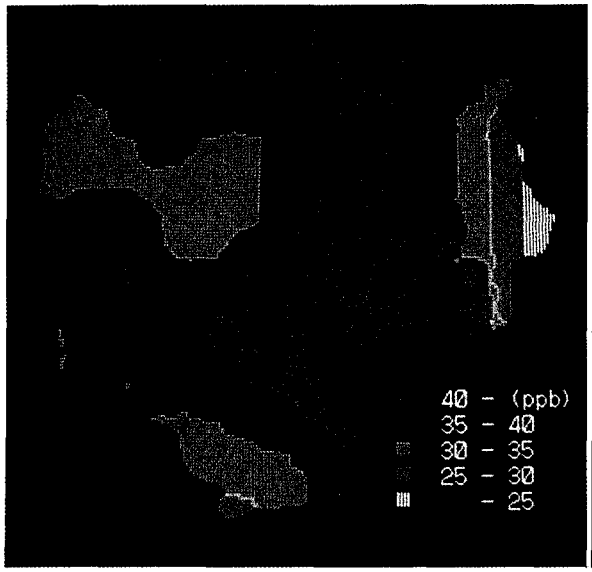


Fig. 4. NO_2 Distribution in 1978

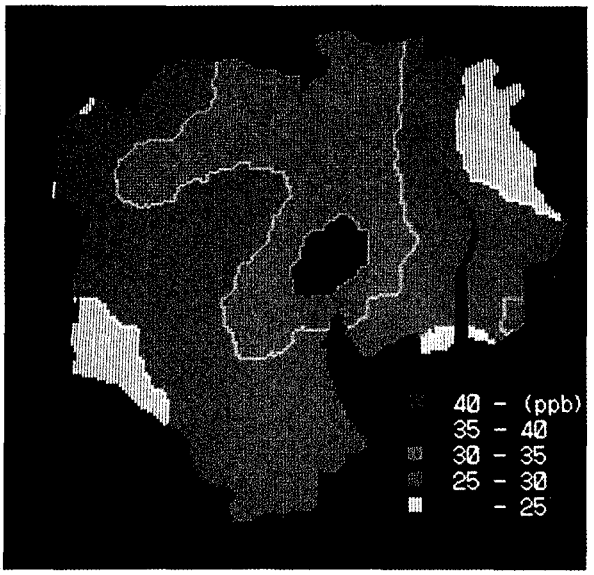


Fig. 5. NO_2 Distribution in 1985

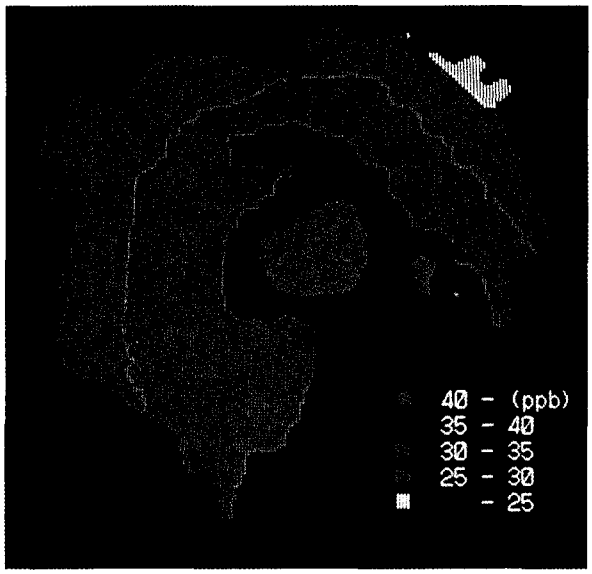


Fig. 6 . NO_2 Distribution in 1988

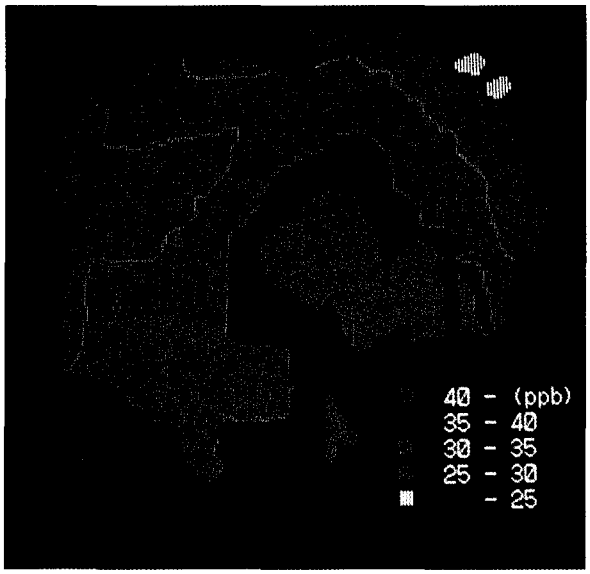


Fig. 7 . NO_2 Distribution in 1990

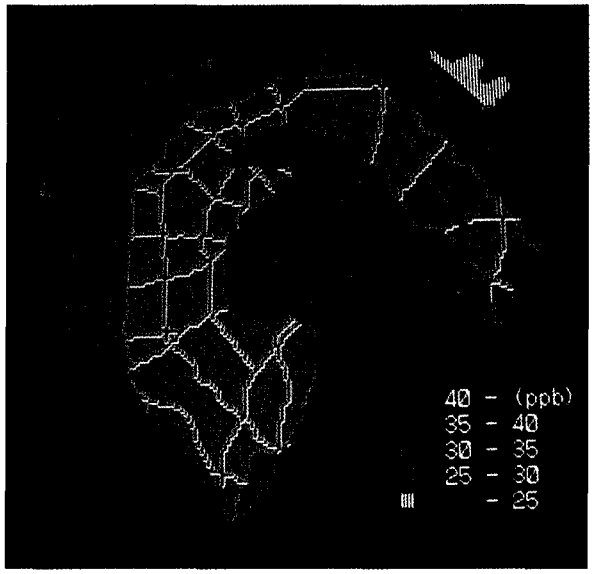


Fig. 8 . NO_2 Distribution in 1988
in Consideration of Effects of Arterial Roads

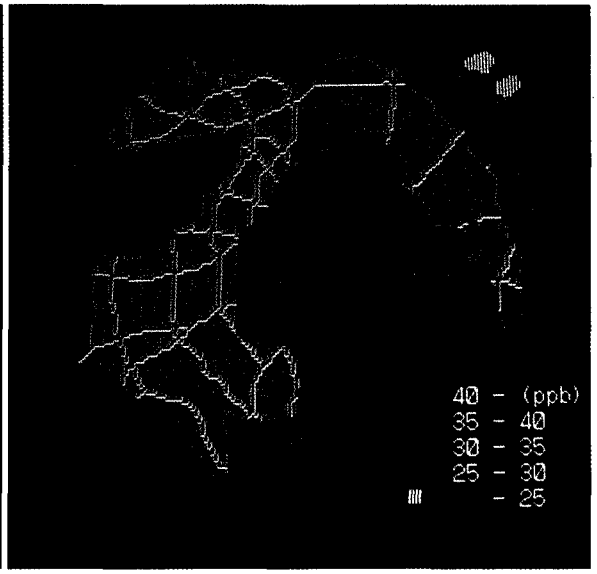


Fig. 9 . NO_2 Distribution in 1990
in Consideration of Effects of Arterial Roads

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 187-191, 1992

ディーゼル排気ガス暴露によるラット母乳成分に及ぼす影響

大澤誠喜*, 加藤紀子**, 山田達史**
加納堯子*, 森　憲二***

Effects of Diesel Exhaust Exposure on Components of Rat Breast Milk

MASANOBU OHSAWA*, NORIKO KATO**, TATSUSI YAMADA**,
TAKAKO KANO* and KENJI MORI***

Keyword：総脂質 total lipid, 脂肪酸 fatty acid, 母乳 breast milk, ラット rat, ディーゼル排気ガス diesel exhaust

緒　言

近年，様々な環境問題に関心が高まっているが，都市における大気汚染もその一つである．東京の大気汚染は，自動車交通を主な原因とする排気ガス汚染であるが，自動車の保有台数は年々増加し，特に，高馬力で経済性に優れたディーゼル車の増加が重なって，その改善は未だ厳しい状況にある．

更に，ディーゼル排気ガスにはガソリン車のそれに比べて，窒素酸化物，浮遊粒子状物質，多環芳香族炭化水素などが多量に含まれており，特に，幹線道路周辺に居住する都民への健康影響が懸念されている．

著者らは，大気汚染物質がもたらすであろう次世代への健康影響を検討するため，ディーゼル排気ガスの暴露をうけたラット母乳成分の組成変化を調べた．

母乳は，新生仔の唯一の栄養源であり，感染防御機能を乳仔に付与する理想的な食物である[1]．更に，母乳中の脂質は，必須脂肪酸，脂溶性ビタミンの供給源である．しかし，化学構造に二重結合をもつ脂質成分の不飽和脂肪酸は不安定な物質で，酸化性の強い物質を多量に含むディーゼル排気ガスを吸引すると生体内で何らかの影響を受ける可能性がある．母乳成分の組成変化は新生仔の発育に大きな影響を及ぼすと考えられることから本実験を試みた．

方　法

1．実験動物及び暴露方法

実験動物は，妊娠したF344フィッシャーラット(日本チャールスリバー社)15匹を，各群5匹の暴露群(H群)，除塵群(ND群)及び対照群(C群)の3群に分けた．暴露装置の暴露源には，ヤンマーディーゼルエンジン(NFAD 6型，排気量309cc，直噴型，回転数2400 rpm)，燃料は軽油(JIS 2号相当品，日本石油)を使用し，容積16m^3，温度23～25℃，湿度45～65%，換気回数15回／時にコントロールされた暴露チャンバー内でラットを飼育し，1日7時間，週5日間の排気ガスの暴露を行った．暴露ガスの濃度測定には，窒素酸化物測定器(8440型，Momitor Lobs. Co.)と粉塵濃度計(β線式質量濃度計BAM-102型，柴田科学機器KK)を用いた．排気ガスの暴露条件は表1に示した．なお，対照群には，活性炭層とヘパフィルターを通した室内空気を，除塵群には，ヘパフィルターを用いてディーゼル排気ガスを通し粒子状物質を除いた排気ガスを，それぞれの暴露チャンバー内に導入した．

2．ラット母乳の採取

母乳の採取は，搾乳前にオキシトシン(5単位，帝国臓器製薬 KK)0.1mlを皮下に投与，20分後にエーテル麻酔下で6対の乳房より手指を用いて搾乳した．母乳はサンプルチューブに移し分析時まで−80℃で凍結保存した．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3−24−1
*The Tokyo Mtropolitan Resarch Laboratry of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169, Japan
**東京農業大学農学部栄養学科
***東邦大学医学部

表1．ディーゼル排気ガスの暴露条件

	粉塵量(mg/m^3)	NO^2 (ppm)	NO(ppm)
対照群	0.01	0.02	0.06
暴露群	5.00	3.50	30.00
除塵群	0.01以下	3.50	30.00

3．総脂質分析

総脂質定量[2-4]は，ラット母乳1 μlをサンプルチューブに取り，クロロホルム/メタノール(2：1)混液1 mlを加えミキサーで攪拌した後，褐色試験管にろ過し，ろ液を蒸発乾固後，濃硫酸1 mlを加え，沸騰水浴中で20分加熱した．冷却後，フォスフォ・バニリン溶液(70%リン酸/0.6%バニリン水溶液　4：1)5 mlを加え1分間ミキサーで攪拌，20℃で10分間放置した後，波長530nmで吸光度を測定した．

4．総脂肪酸分析

総脂肪酸分析[5-6]は，母乳0.5mlをナスフランスコに取り，クロロホルム/メタノール(2：1)混液30mlを加え，軽く振とうして2時間放置，ロータリーエバポレーターで減圧乾固した．これに2N-水酸化カリウム/メタノール溶液2 mlを加え，還流冷却管をつけ沸騰水浴中で30分間加水分解を行った．加水分解後塩酸2 mlを加えて酸性とし，水と石油エーテルで洗浄しながら分液ロードに移し，石油エーテルで2回抽出，石油エーテル層を水洗し，無水硫酸ナトリウムで1晩脱水した．脱水後石油エーテル層を減圧乾固し，5%-塩化水素メタノール1 mlを加え，還流冷却管をつけ沸騰水浴中で5分間メチルエステル化を行った．これに石油エーテルを加えて抽出し，水洗，脱水後，減圧乾固してn-ヘキサン0.2mlに転溶し，その内1 μlをキャピラリーカラムガスクロマトグフィーの試料とした．なお，定量には，内部標準としてヘプタデカン酸(C17：0)を用い，表2に各脂肪酸の名称と，その炭素数及び二重結合の表を示した．

脂肪酸の同定は，標準物質のクロマトグラムの保持時間を参考にした．

ガスクロマトグラフィー条件は，以下のとおりである．

装置	津島 GC-7A
カラム	CP-sil88 0.25mm×50m
キャリア	He 100m/min
初期温度	160℃
昇温速度	6℃/min
注入口温度	250℃
検出器温度	260℃

表2．各種脂肪酸の名称

C 8：0	カプリル酸
C10：0	カプリン酸
C12：0	ラウリン酸
C14：0	ミリスチン酸
C15：0	ペンタデカン酸
C16：0	パルミチン酸
C16：1	パルミトレイン酸
C18：0	ステアリン酸
C18：1	オレイン酸
C18：2	リノール酸
C18：3	リノレン酸
C20：4	アラキドン酸
C22：6	ドコサヘキサエン酸
C24：0	リグノセリン酸

データー処理装置　津島 C-R1B

結果および考察

1．総脂質量の変化

各群の母乳中の総脂質量を搾乳時に区分して図1に示した．C群の，1週目の初乳期より2週目の母乳の総脂質量は増加したが3週目ではやや減少した．H群，ND群の総脂質量はC群のそれと同様なパターンを示した．しかし，C群及びND群の母乳中の総脂質量は，1週目と2週目及び1週目と3週目との間に各々危険率1%で有意な増加が見られた．一方H群における母乳中総脂質量は，1週目と2週目の間においてのみ危険率5%で有意な増加が見られた．

2．脂肪酸組成の変化

C群の母乳中の脂肪酸組成は図2に示した．脂肪酸の炭素数の順序と含有量で大別すると，炭素数が8で構造中に二重結合を持たないカプリル酸(C8：0)からミリスチン酸(C14：0)までの脂肪酸群(Ⅰ群)と，同じくパルミチン酸(C16：0)を中心とするⅡ群，及びステアリン酸(C18：0)とオレイン酸(C18：1)及びリノール酸(C18：2)を含むⅢ群の脂肪酸からなり，外に不飽和脂肪酸も検出はされたが微量であった．

採乳時による脂肪酸組成は，検出された脂肪酸の種類に変化は見られず，1週目から3週目までそれぞれの脂肪酸量に増減が見られたのみである．これらの脂肪酸を区分した3群でその変化を見ると，カプリン酸，カプリル酸を含むⅠ群の脂肪酸量は，採乳の時間経過と共に増加傾向を示し，Ⅱ群の脂肪酸量は，3週目の成乳で減少し，Ⅲ群及び不飽和脂肪酸群の量は経時的な変化を示さなかった．脂肪酸量の増加を示したのはカプリル酸とカ

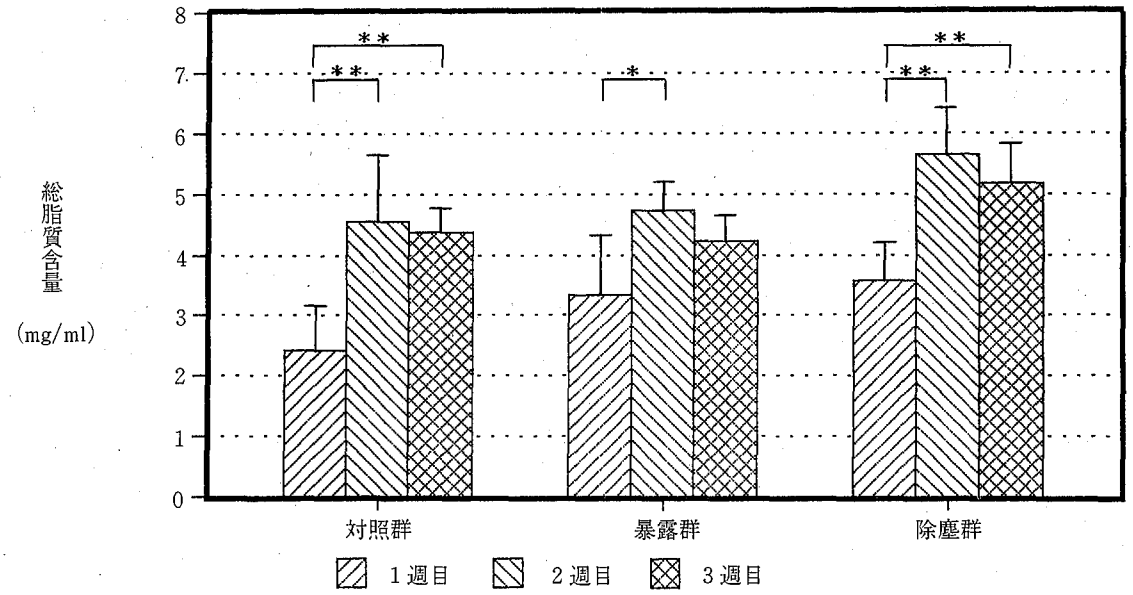


図1．ラット母乳中の総脂質量
＊ P〈5%　＊＊ P〈1%

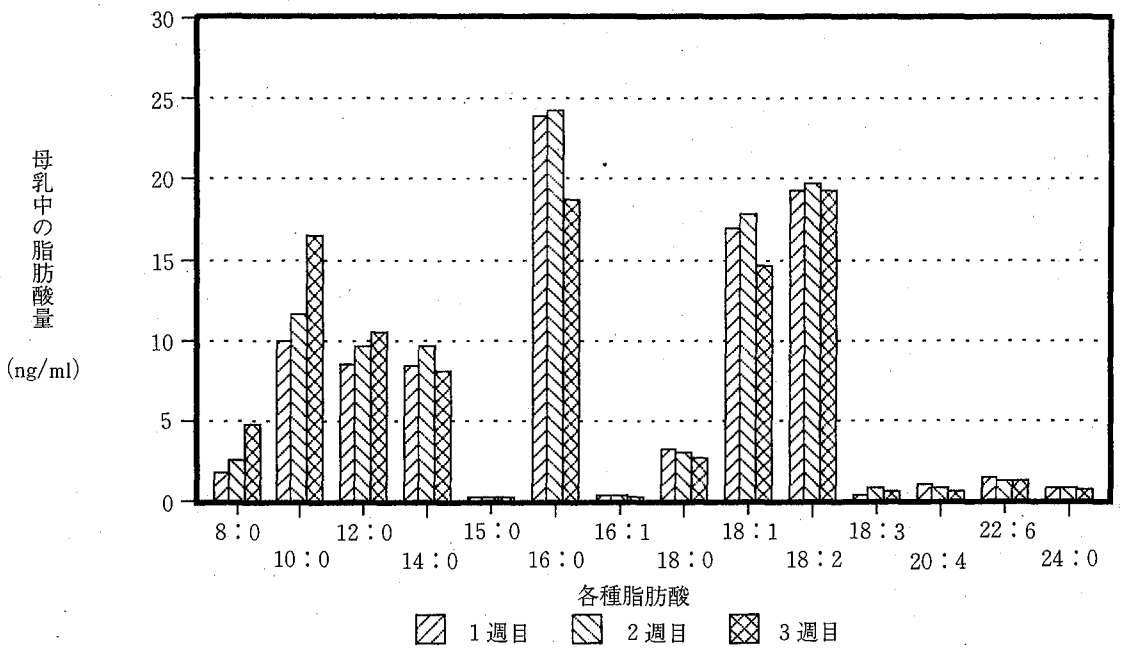


図2．ラット母乳中脂肪酸の組成変化（対照群）

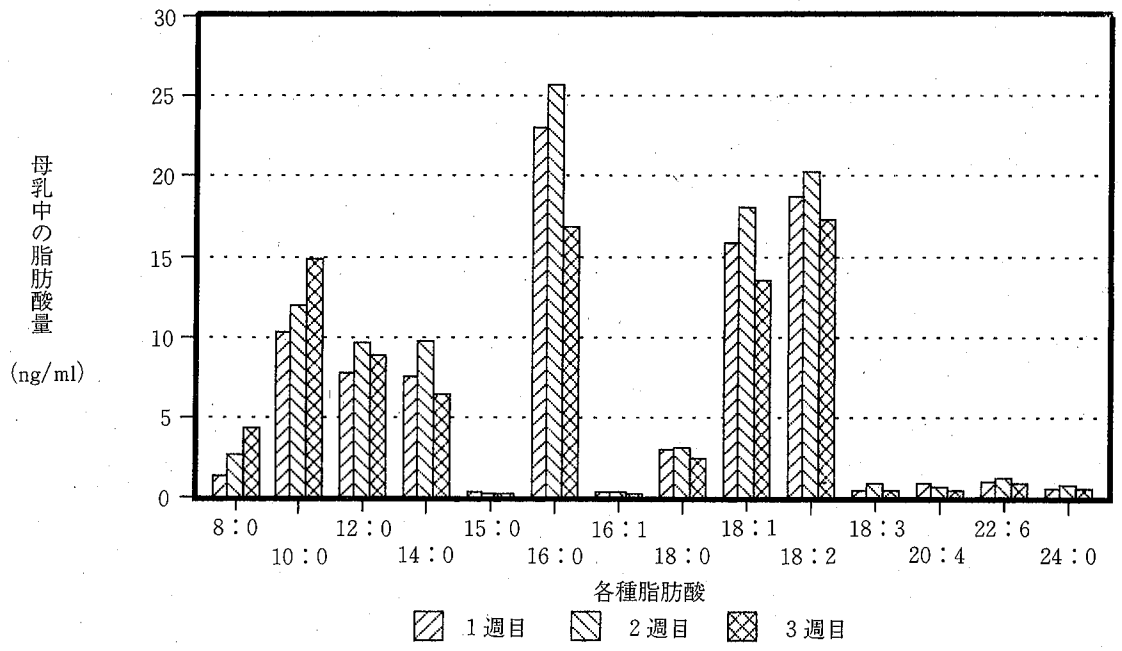


図3．ラット母乳中脂肪酸の組成変化（暴露群）

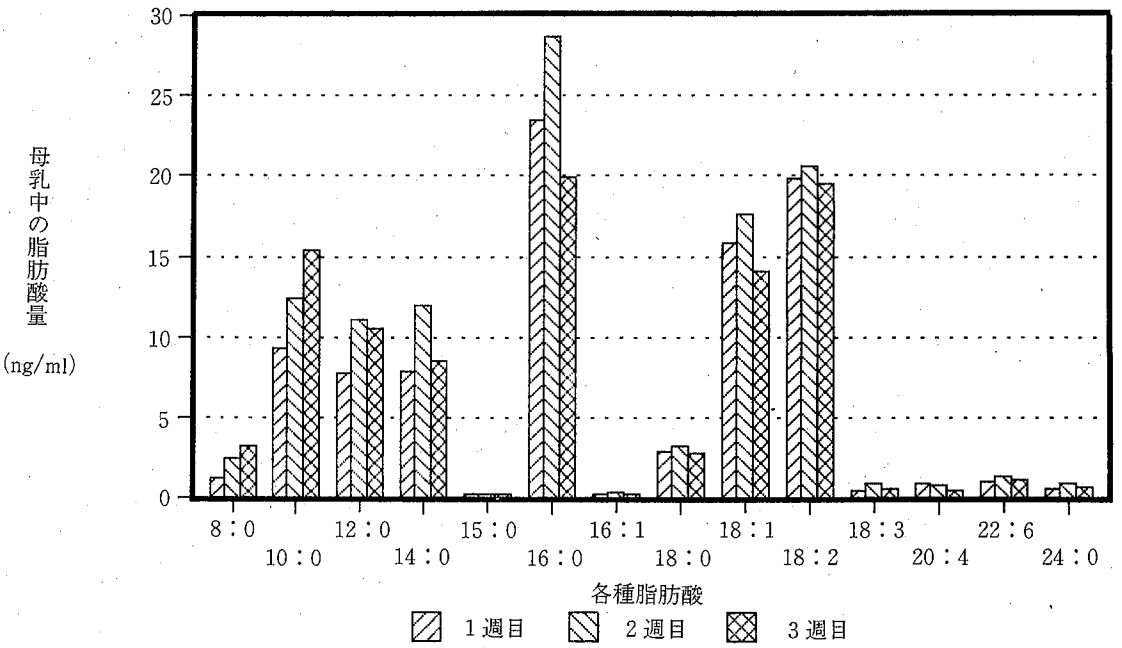


図4．ラット母乳中脂肪酸の組成変化（除塵群）

プリン酸で，パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸及びアラキドン酸(C 20：0)は減少傾向を示した．しかし，これら脂肪酸量の採乳時による各々の量の間には有意な差は認められなかった．一方，リノレン酸及びミリスチン酸は2週目の母乳中で増加し，3週目にはほぼ1週目の濃度に戻った．又，リノール酸には，採乳時による濃度変化は見られなかった．

以上，これら母乳中の総脂質量及び脂肪酸組成の変化は，おそらく乳仔の発育に合わせての変動と考えた．

H，ND群の1週目から3週目までの母乳中には，C群で見られた脂肪酸類が全て検出されたが，H，ND群にのみ検出された脂肪酸は認められなかった．更に，3群に区分した脂肪酸類の含有量パターンはC群のそれと非常に類似しC群と大差はなかった(図3，図4)．C群ラット母乳と比較してH，ND群のラット母乳中の総脂質量，及び，脂肪酸組成に変化が認められなかったのは，これまでに実施した同様な暴露実験で，実験動物に顕著な生体影響が見られたのは，多くは暴露3ヶ月前後であったから，今回の5週間の暴露実験条件下では生体に大きな障害をあたえなかったかもしれない．或いは，分泌乳量あたりの補正処理を行わなかったことに起因したのかも知れない．本実験で搾乳量を測定しなかった理由は，手指を用いて搾乳する時，分泌母乳の全量を採取できるとは限らないと考えたことからであるが，しかし，常に一定の条件下で搾乳した結果，各群の搾乳時における乳量に大きな差は見られなかった．

前述したように母乳量の変化，その成分組成の変化は乳仔の発育に大きな影響を与える．この経験を基に実験計画を検討し，新生仔の発育に及ぼすディーゼル排気ガスの影響を検討する予定である．

文　献

1）小林　登，多田啓也，藪内百治　編：新小児医学大系，**3**．97-100，1986，中山書店，東京．
2）清水隆作，岸田益美：臨床検査，**16**，84-87，1972．
3）久白英人，水口葉子，福井　巌：臨床病理，**14**，863-868，1966．
4）松宮和久，荒尾雅代：臨床病理，**19**，147-150，1971．
5）八尋政利，村上雄二，皆川憲夫，阿彦健吉：栄食誌，**41**，(4)，263-271，1988．
6）八尋政利，村上雄二，阿彦健吉：栄食誌，**41**，(4)，287-292，1988．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 192-196, 1992

高速液体クロマトグラフィーによる水中アシュラムの簡易スクリーニング法 ーシリンジタイプミニカラムの応用ー

鈴木俊也*, 近藤治美*, 関山　登*
矢口久美子*, 山岸達典*

Screening Method for Determination of Asulam in Water Samples by Reversed - Phase Liquid Chromatography with Syringe Type Minicolumn

TOSHINARI SUZUKI*, HARUMI KONDO*,
NOBORU SEKIYAMA*, KUMIKO YAGUCHI*
and TATSUNORI YAMAGISHI*

A syringe-type minicolumn containing C_{18} bonded silica was applied for the determination of asulam, a herbicide, in tap, ground, and river water by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). Asulam in water samples was adsorbed on the minicolumn under acidic pH and injected into HPLC by eluting directly in the loop with a small amount of eluent. The recoveries of asulam from 300 μl of water samples were more than 90 % at concentrations of 5 μg/l and 2 mg/l, and the detection limit of asulam was 1 μg/l (S/N=3). This method is suitable for the screening of asulam in water samples without tedious sample preparations.

Keywords：アシュラム asulam, 水試料 water sample, ミニカラム minicolumn, 液体クロマトグラフィー liquid chromatography

緒　言

アシュラムは日本では主にゴルフ場の芝用に用いられているカーバメート系の除草剤であり，東京都におけるその製剤の年間使用量はここ数年3トンを上回っている．

平成2年5月に厚生省と環境庁からアシュラムについての水道水の暫定水質目標値[1]とゴルフ場の排出水の暫定指針値[2]及び分析法[2,3]がそれぞれ設定され，これらに基づき東京都では平成2年度からゴルフ場農薬汚染実態調査を行っている．

現在，アシュラムの分析法はジクロロメタンや酢酸エチル等の有機溶媒を用いる液－液分配法[1-5]，またはオクタデシルランを結合させたシリカ担体[7]や強陰イオン交換体[6]を充填したカラムを用いる固相抽出法により試料を調整し，高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィー等の機器分析により定性定量するものである．これら既存の方法では100mlから1000mlの水試料を必要とし，抽出や濃縮等の試料調整に長時間を要すること，また，液－液抽出法の場合には大量の有機溶媒廃液がでる等の問題がある．

シリンジタイプのミニカラムは本間ら[8]によって開発された高速液体クロマトグラフ(HPLC)用試料直接注入装置であり，試料の前処理を簡略化し，少量の試料で高感度分析を可能にする．この装置の改良型は血清や尿中の薬物の分析に応用されている[9,10]．

我々はシリンジタイプのミニカラムの有用性に着目し，オクタデシルランを結合させたシリカ担体を充填したミニカラムによる水試料中のアシュラムの迅速かつ簡易な分析法について検討した．

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

実　　験

1．試　薬

アシュラム，メチル-N-(4-アミノフェニルスルフォニル)カーバメート，は残留農薬標準品(ジーエルサイエンス社製)を用い，アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用を用いた．シリンジタイプのミニカラム：Extrashot-ODS(シリンジ部：ステンレス製51 mm，固相抽出部：ポリプロピレン製ODSを45 μl充填)は草野科学器械製作所製を用いた．その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた．

2．装置および測定条件

HPLCシステムおよび測定条件は厚生省の検査方法[3]に準じて設定した．ポンプ：日本分光 880-PU型，検出器：日本分光 UVIDEC-3型(波長 270 nm)，インジェクター：Rheodyne 7125型(100 μlループ付き)，カラム：Beckman Ultrasphere-ODS(250 mm×4.6 mmid)，移動相：アセトニトリル－50mMリン酸一カリウム(pH 3.2)(30:70, v/v, 流速 1 ml/min)

3．分析操作

(1) 試験溶液の調整：水試料10mlを共栓試験管に採り，1％亜硫酸ナトリウム水溶液30 μlを添加撹拌した後，濃塩酸(35％)20 μlを加えたものを試験溶液とした．

(2) ミニカラムの前処理：ミニカラムに注射筒でメタノール250 μl，次いで0.035％塩酸水溶液500 μlを通した．

(3) アシュラムの吸着：ミニカラムに注射筒で試験溶液の300 μlを通水した．

(4) アシュラムの溶出およびHPLCへの注入：ミニカラムをHPLCのインジェクターに差し込み，アセトニトル－50mMリン酸一カリウム(pH 3.2)(10 : 90, v/v) 130 μlを注射筒で注入した．

結果および考察

1．吸着および溶出条件

蒸留水にアシュラムを添加し，ミニカラムによるアシュラムの吸着および溶出時の至適条件について検討した．

(1) 吸着時の至適 pH：アシュラムは弱酸性の化合物なので，逆相系の固相抽出法では試料の液性を酸性にし，アシュラムの解離を抑える必要がある．蒸留水を塩酸でpH 調整し，これにアシュラムを添加し回収率を調べた．図1－Aに示したように pH 3 以下で回収率は90％以上であったが，pH 5 以上ではほとんど回収できなかった．このことから，試験溶液の pH は 3 以下にする必要があることがわかった．

(2) 試験溶液のミニカラム通水量：蒸留水を塩酸でpH 3 に調整した水にアシュラムを添加し，通水量を変えて

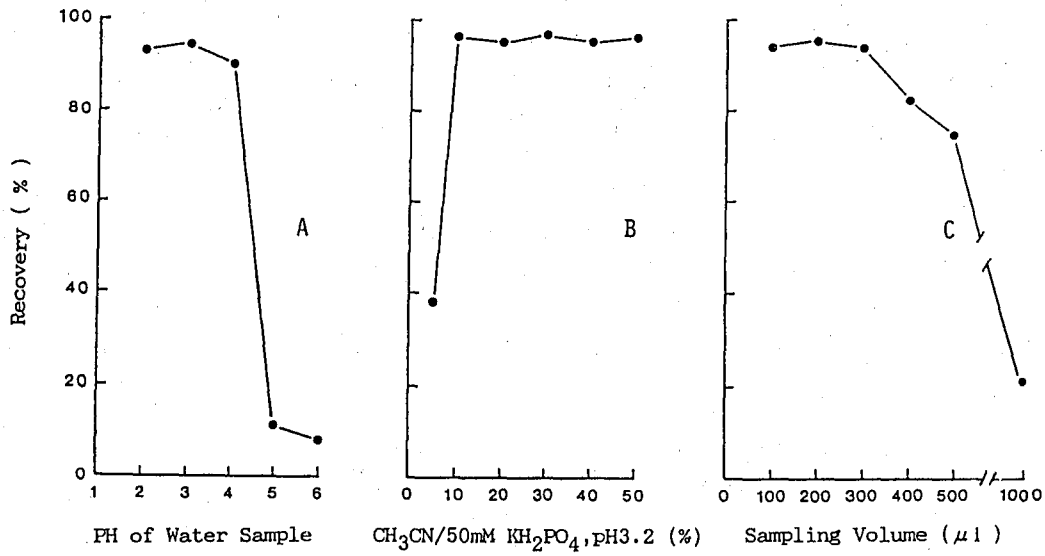


Fig. 1. Effects of pH, Sampling Volume, and Elution Solvent on Recovery of Asulam by Syringe-Type Minicolumn
A : Asulam concentration, 20 μg/l; sampling volume, 200 μl; elution solvent, CH_3CN-50 mM KH_2PO_4 at pH 3.2 (KPB) (30 : 70, v/v); pH of water was adjusted with HCl. B : Asulam concentraion, 2 mg/l; sampling volume, 200 μl; concentraion of CH_3CN in elution solvent was changed. C : Asulam concentration, 5 μg/l; pH of water was adjusted with HCl at 3; elution solvent, CH_3CN-KPB (10 : 90, v/v).

回収率を調べた．図1－Cに示したように300 μlまでは良好な回収率が得られたが，400 μlから回収率は減少し，1 mlではアシュラムは殆ど回収されなかった．このことから，試験溶液の通水量は300 μlとした．

(3) ミニカラムからのアシュラムの溶出：図1－Bに示したようにアシュラムの回収率はアセトニトリル濃度が10％から50％の間で90％以上であった．しかし，アセトニトル濃度の増加にともないアシュラムのピークの幅は広くなってくる(理論段数10％：3500，20％：2000)，より低濃度のアシュラムを検出するために，また，ミニカラム上で試料のクリーンアップをするためには，アセトニトリル濃度はできる限り低いほうがよいと考えられることから，アセトニトリル濃度は10％に決定した．

2．水道水，地下水，河川水の前処理の検討

蒸留水の実験から試料のpHを塩酸で3以下にする必要があることがわかった．つぎに，実試料を用いて塩酸添加がアシュラムの安定性に影響を及ぼすかどうかについて検討した．すなわち，処理しない水，塩酸を添加した水，および亜硫酸ナトリウムを添加後塩酸を加えた水のそれぞれにアシュラムを添加し，一部を直接液体クロマトグラフに注入することによりアシュラムの残存量を調べた．図2に示したように未処理の場合，地下水と河川水ではアシュラムの減少は認められなかったが，水道水ではアシュラムは5分で約半分になり，45分で消失した．塩酸を添加した場合，地下水では60分後でもアシュラム量に変化は認められなかったが，水道水では数分間で消失した．河川水でも塩酸添加によりアシュラムは時間と共に徐々に減少した．水道水におけるアシュラムの消失は水道水中に存在する残留塩素によるものと考えられたので，亜硫酸ナトリウムを添加し残留塩素を除去した後にアシュラムを添加したところ，アシュラムの消失を抑えることができた．河川水の場合には残留塩素は存在していなかったが，水道水の場合と同様に，亜硫酸ナトリウムを塩酸添加前に加えることによってアシュラムの消失は抑えられた．

3．回収率及び検出限界

これまでに設定された至適条件に基づき，水道水，地下水，河川水にアシュラムを添加し，回収率を調べた．表1に示したようにアシュラムの添加濃度5 μg/1及び2 mg/1においていずれの試料の場合にも回収率は90％以上で，その変動係数は4％以内(n＝5)であった．また，ミニカラムにより吸着した試料を4℃と25℃で，2日間放置した後の回収率は，4℃での場合にいずれの試料についても回収率は90％以上であり，このことから，

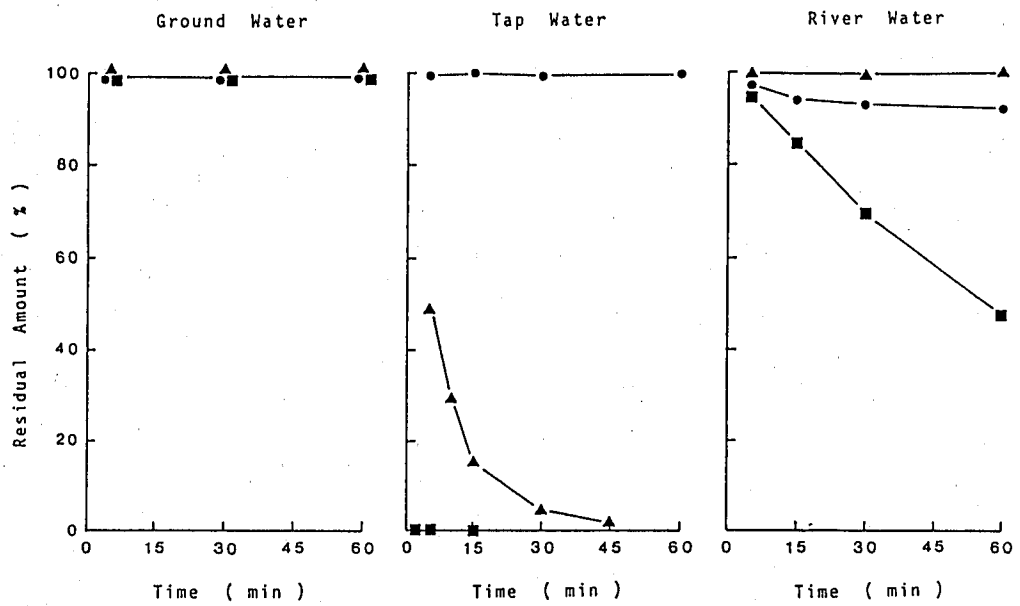


Fig. 2. Stability of Asulam in Ground, Tap, and River Water
Asulam was spiked to 10 ml of water samples at concentration of 200 μg/l after several sample treatment, and then 100 μl of the spiked water samples ware directly injected into the HPLC. (▲) No sample treatment. (■) Water sample was acidified with 20 μl of 35 % HCl. (●) Water sample was acidified with 20 μl of 35 % HCl after addition of 30 μl of 1 % Na_2SO_3.

Table. 1. Recovery of Asulam in Spiked Water Samples

Water Sample	Asulam Conc. [a]		Storage temp. for 48 h [b]	
	5 μg/l	2 mg/l	4 ℃	25℃
Ground Water	92.1±3.5	96.6±1.7	91.5±2.3	85.3±13.1
Tap Water	92.5±2.4	97.2±2.0	91.5±3.1	89.9± 2.3
River Water	90.0±3.0	92.7±2.3	95.0±7.5	75.0±12.5

a Values are mean±SD(n=5)
b Values are mean±SD(n=3)
Asulam conc. 5 μg/l

ミニカラムに吸着した試料の保存が可能であることがわかった．図3にアシュラムを添加した河川水のクロマトグラムを示した．河川水を直接注入した場合に認められた5分及び8分付近のピーク(図3－B)はミニカラム処理の場合には認められず(図3－A)，ミニカラムを用いることにより試料のクリーンアップとアシュラムの濃縮が同時に行えることがわかった．

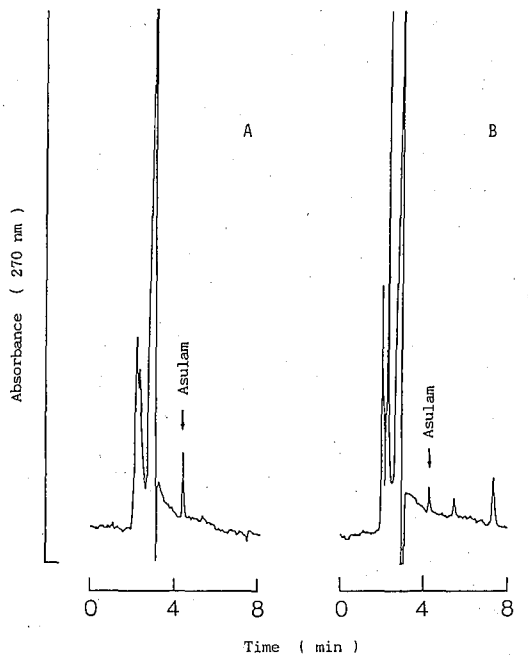


Fig. 3. Chromatograms of the River Water Spiked with 5 μg/l Concentration of Asulam
Asulam was spiked to the river water treated as shown in Fig.2 (●). A： A 300 μl of the river water was applied on syringe-type minicolumn and then asulam was directly injected into HPLC by eluting with 130 μl of CH_3CN-50 mM KH_2PO_4 (pH 3.2) (10：90, v/v). B： A 100 μl of the river water was directly injected into HPLC.

アシュラムの検出限界は，S/N＝3で1μg/1であった，この値は飲料水の暫定基準値200μg/1および排出水の暫定指針値2 mg/lに十分に満たしていた．また，本法による試料の前処理から分析終了までに要する時間は，1検体あたり約10分であった．

まとめ

シリンジタイプのミニカラムを応用した本分析法は，抽出時に使用する有機溶媒が極微量ですみ，少量の試料で高感度分析が短時間で行えることから，スクリーニング法として有用であると考えられる．また，抽出には簡易な器具があればよいこと，そして，ミニカラムに吸着させた試料の保存が可能なことから，屋外での試料調整にも利用できるものと考えられる．

文献

1) 厚生省生活衛生局：衛水第152号「ゴルフ場使用農薬に係る水道水の安全対策について」，平成2年5月31日．
2) 環境庁水質保全局：環水土第77号「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁防止に係る暫定指導指針について」，平成2年5月24日．
3) 厚生省生活衛生局：衛水第153号「ゴルフ場使用農薬に係る検査方法について」，平成2年5月31日．
4) Promode,C.B., Neal,P.T. and David,A.C. : *J. Assoc. Off.Anal. Chem.*, **63**, 511-516, 1980.
5) James,F.L., Luz,G.P. and Harry,A.M. : *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 1323-1325, 1980.
6) 月岡 忠,小沢秀明,武田陽一,他：環境技術，**19**, 44-47, 1990.
7) Putzien, J., *Z. Wasser Abwasser Forsch.*, **19**, 228-236, 1986.
8) Homma,M., Oka,K. and Takahashi,N. : *Anal. chem.*, **61**, 784-787, 1989.
9) Kouno,Y., Ishikawa,C., Takahashi,N., et al. : *J. Chro-*

matogr., **515**, 321-327, 1990.

10) Kanai,M., Kouno,Y., Homma,M., et al. : *J. Chromatogr.*, **567**, 415-424, 1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 197-204, 1992

都民からの苦情で持ち込まれた浴室，洗面台等に発生するスライムの細菌学的検討

古畑勝則*，松本淳彦*

Some Bacteriological Studies on the Pinkish Slimy Films Formed on Tiles using for Bathrooms and Washstands

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords：スライム slime，浴室 bathroom，洗面台 washstand

緒　言

近年，マンションなどの集合住宅はもちろん一戸建て住宅でもアルミサッシや断熱材などの多用によって気密性が高くなる一方，通気性が悪くなる等の弊害が生じている．ライフスタイルの面でも家電製品などの熱や湿度の発生源が増加したり，冷暖房機器の普及率も上昇している．このような居住環境の変化は，結露の発生やカビ，ダニの異常繁殖を招き，健康上の大きな問題となっている[1]．

なかでも，特に湿度が高い浴室や洗面所，台所等の水周りでは淡紅色を呈するヌルヌルしたスライムが方々で発生している．人々の生活水準の向上にともない，アメニティー，すなわち‘快適性’という概念[2]が広まる中で，こうしたスライムの外観や感触から不快感を感じて保健所や研究所に相談を持ち込む例が増加している．一般都民ばかりでなく建築関係者などからもこれらの発生原因や防止対策等について相談や調査を依頼される機会が多くなり，その数も1991年だけで十数件にもなっている．

スライムと称するものは，細菌類をはじめ，糸状菌，藻類，原生動物などの多くの微生物群から構成される粘液状物質で，一般的には水道管の内壁や貯水槽内あるいは工業用水の冷却系統などに非常に多く発生している[3]．通常は内壁に付着しているが，しばしば水流によって剝離され，給水栓から出現する例もある[4]．微生物の増殖が著しいときは流水量を低下させたり，ときに閉塞を起こすこともある．場合によっては，管材の腐食原因となったり，水に着色や異臭味をきたして水質の悪化を招いたり，消毒効果や熱伝導効果を低下させるなど様々な障害を引き起こしている．

家庭内の浴室，洗面所等に発生するスライムもこれらと同様に微生物の繁殖によるものと考えられるが，今までこれに関する詳細な調査報告はなされていない．

本報では，一般都民から相談を受けたスライムの代表的な5例について，構成菌種，分離菌株の粘液物質産生能や産生色素，さらに殺菌剤に対する感受性について検討を行った．

材料及び方法

1．スライムの発生事例　1)事例1　H市内にある3階建て12世帯入居アパートの1階の1世帯から，浴室の床及び壁面のタイルの目地付近にヌルヌルした付着物があり(図1－A)，清掃によって除去しても2，3ヶ月すると再び発生してくるので調べてほしいとの依頼があった．

2)事例2　同アパートの別の世帯から台所に設置してある食器水切り用の受け皿の底に褐色のドロドロした寒天質状のものが溜まり，洗い流しても1週間ほどで同じ状態になるとの苦情があった．

3)事例3　S区内にある4階建ての建物で，その3階の住人から洗面台の排水口付近に付着物が発生し(図1－B)，拭き取ると除去できるがどのようなものか知りたいので調べてほしいとの依頼があった．

4)事例4　T市内にある新築の4階建てアパートの1階の1世帯でユニットバスの排水口付近に付着物が発生し，調べてほしいとの依頼があった．

5)事例5　S区内の事業所内にある理髪店で，洗面台排水口付近が部分的にピンク色に染まり，清掃しても1週間後には再発生するのでどうしたらよいかとの相談

*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

があった.

2．スライムの採取と観察 現地に赴して調査した3例では，発生場所，位置，広がり，色調，感触等を調べたのち，発生したスライム(5×5 cm)を滅菌ガーゼで拭き取り，9 mlの滅菌生理食塩水に入れて搬入した．これを肉眼的に観察した後，その一部について顕微鏡観察を行った．その後，ボルテックスミキサーで撹拌し，分散させて細菌検査用の試料とした．

3．従属栄養細菌数の測定 試料を滅菌生理食塩水で10倍段階に希釈し，それぞれの1 mlを標準寒天培地で混釈して25℃で7日間培養後，集落数を計数して1 cm^2当たりの菌数に換算した．

4．菌株の分離と同定 試料1白金耳を標準寒天平板培地に画線塗抹して25℃，7日間培養し，独立集落を得た．形成した集落の色調，形状等を観察し，これら形態が異なる代表的な集落を釣菌して再分離した．得られた純培養株についてグラム染色，ブドウ糖OF試験，オキシダーゼ試験，カタラーゼ試験，運動性試験等を行った後，“医学細菌同定の手引き”[5]に準拠して属レベルで同定した．さらに，同定用キット(API20E，API20NE，API50CH，アスカ純薬)によって種の同定を行った．

5．粘液物質産生能の測定 供試菌株の相対粘度を測定し，1.0を超えた菌株は粘液物質産生能陽性と判定した．すなわち，Gotoら[6]が報告した相対粘度測定用培地(グルタミン酸ナトリウム20g，ブドウ糖25g，リン酸水素二ナトリウム・12水 1.5g，リン酸二水素カリウム 1.5g，硫酸マグネシウム 0.3g，寒天 15g，蒸留水 1,000ml)を用いてセロファン膜法で培養した．滅菌セロファン(市販の透明セロファンをシャーレの大きさに切り，水分を含ませて高圧蒸気滅菌したもの)を上記培地上に密着させ，これに供試菌の浮遊液(およそ10^8個/ml)0.2mlを全面に塗布し，30℃で5日間培養した．その後，セロファンを培地からはがして滅菌生理食塩水20mlに入れ，4℃で一晩放置した．翌日，十分に撹拌後，セロファンを取り除いてから 10,000rpmで20分間遠心分離した後，上清を試験管に移して粘度測定用の試料とした．粘度の測定にはオストワルド粘度計を用いて5 mlの試料が室温で毛細管を流下するに要する時間を測定した．この値を滅菌生理食塩水が要した時間に対する相対粘度に換算した．

6．抽出色素の吸光度測定 Satoらの報告[7]を参考に，スライム及び純粋培養した菌体(両者とも0.5g湿重量)をクロロホルムーメタノール(1：1，v/v)30mlに入れて室温で2時間放置し，色素を抽出した．その後，3,000rpm 15分間の遠心分離を行い，上清を蒸留フラスコに移してエバポレーターで減圧濃縮した．これを再びメタノール10mlに溶解させ，吸光度測定用の試料とした．自記分光光度計(HITACHI 320)を用いて，波長300～900nmにおける試料の吸収曲線を求め，物質を検索した．

7．殺菌実験 殺菌剤として汎用されている70%エタノール及び0.1%塩化ベンザルコニウム溶液各100mlをろ過滅菌したものを用いた．供試菌はあらかじめ標準寒天培地で前培養し，滅菌生理食塩水を用いて 3,000rpm，15分間の遠心分離を3回行って菌体を洗浄した後，浮遊液を調整した．これをおよそ10^5個/mlとなるように殺菌剤に接種して1分間接触させた後，その1 mlを採取して標準寒天培地で混釈し，30℃，5日間培養して菌数を求めた．なお，滅菌蒸留水(100ml)に同量の浮遊液を接種したものを同様に測定して初期接種菌数とした．

結　果

1．スライムの発生状況と外観

事例2を除いては，いずれのスライムも排水口付近の常にわずかな水が滞留しているタイル面に部分的に発生しており，単に水を流す程度では簡単に剝離されない状態であった．周囲にはカビの発生も認められ，共通的に湿度が高く，通気が不十分で，壁や天井，アルミサッシ窓には多量の結露がみられた．

色調は事例2の褐色系以外はいずれも淡紅色を呈し，異臭は感じられないが，その表面は湿潤性で，粘稠性が高かった．なかでも典型的な様相を呈していた事例5のスライムをカラー写真(図2)に示した．

2．スライムの顕微鏡観察

スライムを採取した状態で顕微鏡観察すると，図3に示したように2.6×0.9 μmから8.3×2.2 μmの大小様々な桿菌がズーグレア状に集合したものであり，細菌類以外の微生物の混在はなかった．

3．スライムの従属栄養細菌数

スライムの菌数は表1に示したとおりで，2.2×10^5～3.0×10^8個/cm^2であった．

4．スライムの構成菌種

各スライムから分離された細菌をその集落色調とともに事例毎に表2に列記した．

事例1のスライムからは5菌種が分離され，グラム陰性菌は *Methylobacterium* sp.，*A. baumannii*，*P. vesicularis*，*Moraxella* sp.の4菌種で，グラム陽性菌は *Corynebacterium* sp.の1菌種のみであった．

事例2のスライムからは5例中最も多い8菌種が分離

表1．スライムの従属栄養細菌数

事例No.	スライム発生場所	従属栄養細菌数* (個/cm^2)
1.	浴室床，壁面	3.0×10^8
2.	水切り受け皿	1.3×10^8
3.	洗面台排水口付近	3.5×10^7
4.	浴室排水口付近	2.2×10^5
5.	洗面台排水口付近	8.6×10^5

＊；25℃，7日間培養

され，グラム陰性菌は*Methylobacterium* sp., *E. sakazakii*, *F. breve*, *P. vesicularis*, *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp.の6菌種が，グラム陽性菌は*B. cereus*と*Corynebacterium* sp.の2菌種が分離された．

事例3のスライムからは7菌種分離されたが，いずれもグラム陰性菌であり，*Methylobacterium* sp., *A. calcoaceticus*, *X. maltophilia*の他，*Pseudomonas*属(*P. aeruginosa*, *P. vesicularis*, *P. acidovorans*, *P. paucimobilis*)が占めていた．

事例4のスライムは3菌種のみから構成されており，*Methylobacterium* sp., *P. diminuta*及び*Bacillus* sp.であった．

事例5のスライムから分離された細菌は事例3と同様にすべてグラム陰性菌で，*Methylobacterium* sp., *F. oryzihabitans*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, *Pseudomonas* sp.の5菌種であった．

これら主要なスライム構成菌の多くは淡紅色，黄色，黄緑色，緑色，褐色等の色素産生菌であった（表2）．なかでもスライムの色調に類似した淡紅色を呈するものは*Methylobacterium* sp.であり，すべてのスライムから共通的に検出された．黄色系の色素産生菌としては，*F. breve*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *X. maltophilia*, *Corynebacterium* sp.があり，この他，緑色系の*P. aeruginosa*, *P. diminuta*, *Alcaligenes* sp., *Corynebacterium* sp.などの菌種が分離

表2．スライムの構成菌種とその集落色調

事例 No.	分離菌種（属）	集落色調
1.	*Methylobacterium* sp.	淡紅色
	Acinetobacter baumannii	白色
	Pseudomonas vesicularis	黄色
	Moraxella sp.	白色
	Corynebacterium sp.	淡黄色
2.	*Methylobacterium* sp.	淡紅色
	Enterobacter sakazakii	白色
	Flavobacterium breve	黄色
	Pseudomonas vesicularis	白色
	Alcaligenes sp.	黄緑色
	Pseudomonas sp.	橙色
	Bacillus cereus	白色
	Corynebacterium sp.	黄緑色
3.	*Methylobacterium* sp.	淡紅色
	Acinetobacter calcoaceticus	白色
	Pseudomonas aeruginosa	緑色（蛍光色）
	P. vesicularis	白色
	P. acidovorans	白色
	P. paucimobilis	黄色
	Xanthomonas maltophilia	淡黄色
4.	*Methylobacterium* sp.	淡紅色
	Pseudomonas diminuta	黄緑色
	Bacillus sp.	白色
5.	*Methylobacterium* sp.	淡紅色
	Flavimonas oryzihabitans	茶褐色
	Pseudomonas aeruginosa	緑色（蛍光色）
	Xanthomonas maltophilia	淡黄色
	Pseudomonas sp.	黄色

された.

5．スライム構成細菌の粘液物質産生能

分離した16菌株について粘液物質産生能の有無を調べ，スライム自体の粘稠性との関連を検討した.

このうち，半数の8株が相対粘度1.1～1.4を示し，粘液物質の産生が認められた．これら粘液物質産生能を有する菌株は全スライムから1株ないし3株分離されており，事例1では*A. baumannii*, 事例2では*E. sakazakii*, 事例3では *Methylobacterium* sp., *A. calcoaceticus*, *P. aeruginosa*の3株，事例4では*P. diminuta*, そして事例5では *F. oryzihabitans*と*P. aeruginosa*であった．このように各スライムはそれぞれ菌種が異なるものの粘液物質産生能を有する菌株から構成されていた.

6．スライムと構成細菌から抽出した色素の類似性

事例5で採取した淡紅色スライムと，このスライムの主要構成菌であった淡紅色色素産生菌 *Methylobacterium* sp.の培養菌体から色素を抽出して各々の吸収曲線を求め，その類似性を検討した．図4に示したとおり，両者とも490nm付近に最大吸収があり，その前後に極大吸収がみられる一致した曲線を描いた．このことから両者の色素は同一物質であった.

7．スライム構成細菌の殺菌剤に対する感受性

スライムを構成していた主要28菌株のうち，粘液物質産生能が認められた株を中心に事例ごとに2株ずつ選択し，70％メタノールと0.1％塩化ベンザルコニウムに対する感受性を検討した.

A. baumannii, *P. vesicularis*, *E. sakazakii*, *F. breve*, *A. calcoaceticus*, *P. aeruginosa*, *P. diminuta*, *Methylobacterium* sp., *F. oryzihabitans*, *X. maltophilia*の計10菌株は，いずれも10^5個/mlの接種菌数が両殺菌剤に対して1分間の接触で100％殺菌された(表3).

考　察

今回調査を実施した室内環境の水周りに発生したスライムは，居住環境の高気密化，高断熱化によって生じたカビの発生に類似した現象の一つと考えられる.

いずれの発生事例でも顕微鏡観察及び培養試験の結果からスライムは細菌の集合体であることが確認されたが，上水や工業用水の給水系統に発生するスライムとは異なり，糸状菌，藻類，原生動物等の微生物はまったくみられなかった．これらのスライムは配管の内壁等で長時間に渡って徐々に形成され，多種類の微生物によって構成されているのに比べ，室内環境に短時間で頻発するスライムは，増殖速度が早い細菌のみから構成されている特徴があった．このようにスライムを構成する微生物叢が異なるのは，スライムが形成される環境，特に温度，湿度，栄養源等の条件が大きく影響していると考えられる.

スライムの構成菌種は3菌種から8菌種の複数種からなっており，これらの80％をグラム陰性のブドウ糖非発

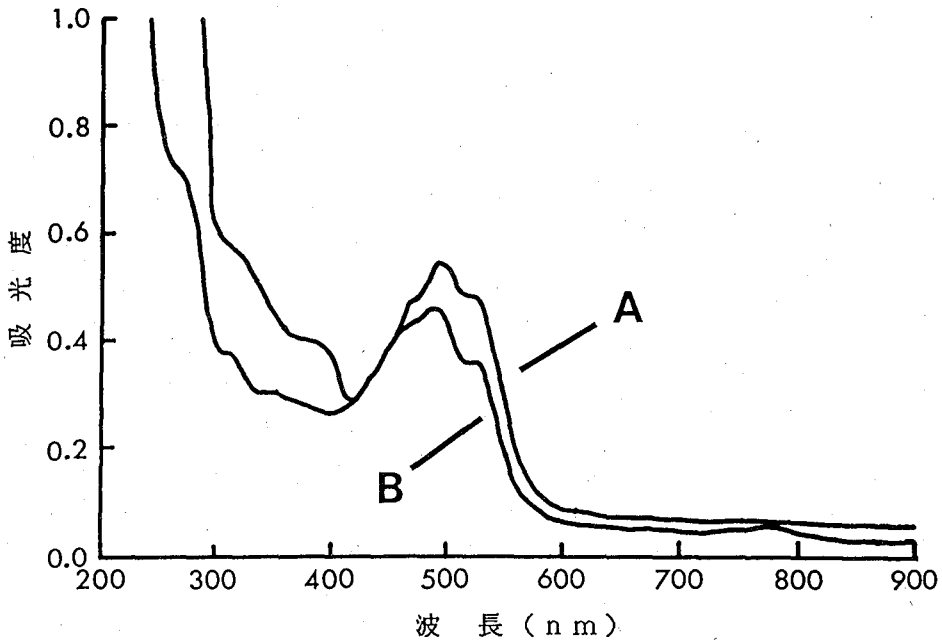


図4．スライム(B)及び *Methylobacterium* sp.の培養菌体(A)から抽出した色素の吸収曲線

表3．スライム構成細菌の殺菌剤に対する感受性

供試菌株	初期菌数 (個/ml)	1分経過後菌数 (個/ml)	
		70% メタノール	0.1%塩化 ベンザルコニウム
Acinetobacter baumannii	2.8×10^5	0	0
A. calcoaceticus	3.5×10^5	0	0
Enterobacter sakazakii	4.5×10^5	0	0
Flavimonas oryzihabitans	3.5×10^5	0	0
Flavobacterium breve	2.3×10^5	0	0
Methylobacterium sp.	1.4×10^5	0	0
Pseudomonas aeruginosa	4.8×10^5	0	0
P. diminuta	2.5×10^5	0	0
P. vesicularis	3.6×10^5	0	0
Xanthomonas maltophilia	1.8×10^5	0	0

酵性桿菌が占め，なかでも*Methylobacterium* sp.がすべてのスライムに共通的な構成菌種であった．本菌は増殖にともない菌体が凝集する性質があるため[8]，スライムの形成に重要な役割を果たしているものと考えられる．

スライム発生事例に共通した要件の一つはタンク水を使用していることである．塩素消毒された水道水でも受水槽や高置水槽を経由する間に何らかの外部汚染を受け，塩素抵抗性を獲得した*Methylobacterium* sp.が高い頻度で検出されている[9]．スライムの主要構成菌種である*Methylobacterium* sp.は，残留塩素が0.3mg/l以上存在しているタンク水中でも優占的に生残しているため，スライムの初期形成に関与する菌種になり得る可能性が大きい．

そのほか，粘液物質産生能を有する菌株がいずれの事例においてもみられるため，スライムの粘稠性が高いものと考えられる．*Methylobacterium* sp.の他，これら数種の細菌がタイル等にまず付着し，人の垢や石鹸等を栄養源に高温，多湿の条件下で短時間に増殖し，粘液物質を産生しつつ粘稠性の高いスライムが形成されていくものと推察される．

スライムは淡紅色を呈することが多いが，これに類似した色調の色素を産生する*Methylobacterium* sp.が構成菌種であったことから，本菌に由来する可能性が強く示唆された．スライムと*Methylobacterium* sp.の抽出色素を吸収曲線から比較すると，ほとんど一致しており，同一色素であると考えられる．*Methylobacterium* sp.の産生色素はカロチノイドとバクテリオクロロフィルであるが[7,10,11]，490nm付近に最大吸収を示すのは前者であるため，スライムの色調はカロチノイドによるものと考えられる．

スライムの発生状況を観察すると，高温多湿な場所で，通気が悪く，細菌類の増殖に必須な有機物が存在するなどの共通した要件が指摘できる．これらの物理的要因をコントロールすればスライムの発生を防止することができると考えられる．特に，湿度が高くなる浴室や台所では，頻繁に窓を開けたり，換気装置を設けて通風をよくすることである．清掃は頻繁に行い，細菌類の栄養源となる有機物をできるだけ除去することも有効である．この際，殺菌処理しておくとさらに効果的である．殺菌方法としては，70%エタノール及び0.1%塩化ベンザルコニウムの使用が効果が大きかったが，市販の塩素系殺菌剤でも十分であろう．

結　語

浴室，洗面台等の居住環境に頻発するスライムについて細菌学的な調査を行い，次のような知見を得た．

1．スライムは淡紅色を呈し，複数種の細菌から構成される集合体であった．

2．構成菌種は色素産生性で粘液物質産生能を有する*Methylobacterium* spp.や*Pseudomonas* spp.を主体とするグラム陰性菌であった．

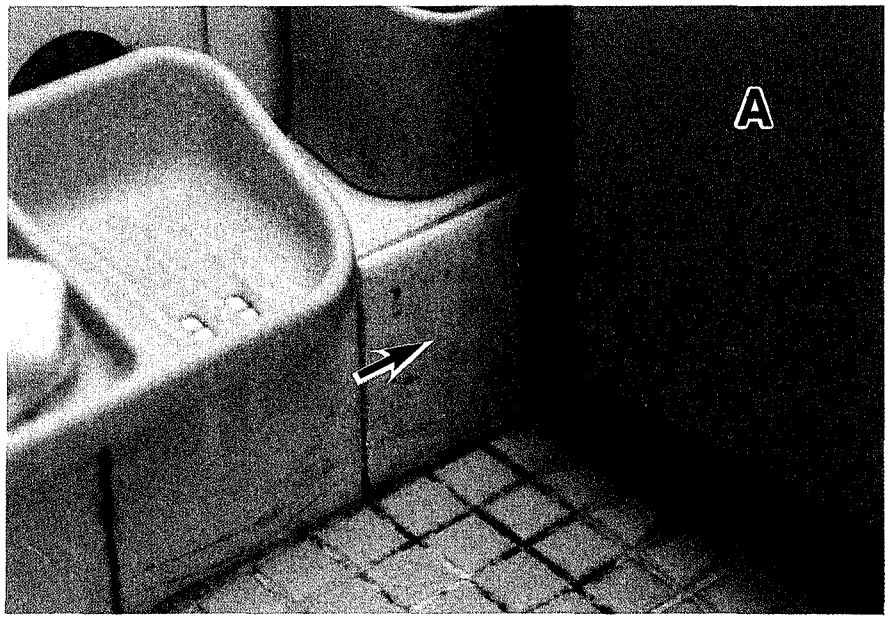
3．スライムの抽出色素と*Methylobacterium* sp.の産生色素は同一のカロチノイド系物質であり，スライムが淡紅色を呈する原因は本菌に由来するものと考えられた．

文　献

1）菊浦吉蔵：日本防菌防黴学会第19回年次大会要旨集，169，1992.

2）梶　秀樹：居住環境システム，河村　武，高原榮重編，環境科学Ⅱ(人間社会系)，118-134，1989，朝倉書店，東京.

3）松本淳彦：東京衛研年報，**22**，221-229，1970.
4）兼子万里枝，平石　明：水道協会雑誌，**60**(1)，23-34，1991.
5）Cowan, S.T.：医学細菌同定の手引き，坂崎利一訳，第2版，1981，近代出版，東京.
6）Goto,S., Murakawa,T. and Kuwahara,S.：*Japan J. Microbiol.*, **17**(1)，45-51，1973.
7）Sato,K., Mizutani,T., Hiraoka,M. and Shimizu, S.：*J. Ferment. Technol.*, **60**(2)，111-115，1982.
8）日下大器，高木喜子：防菌防黴，**20**(3)，125-130，1992.
9）古畑勝則，小池和子，松本淳彦：日本微生物生態学会報，**4**(1)，35-47，1989.
10）Sato, K.：*FEBS Letters*, **85**(2)，207-210，1978.
11）Urakami,T. and Komagata,K.：*Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**(2)，188-201，1984.



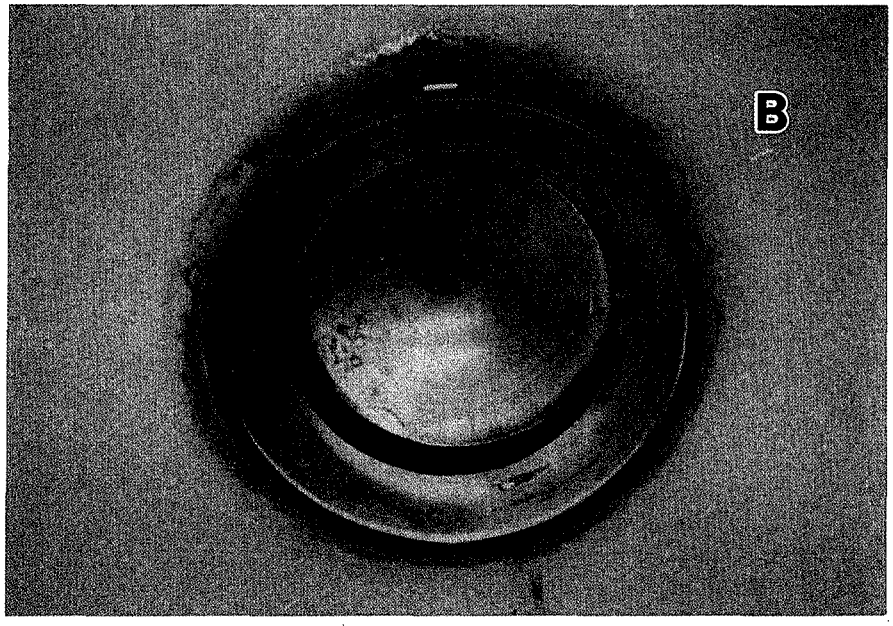


図１．スライムの発生状況　(A)浴室（事例１），(B)洗面台（事例３）

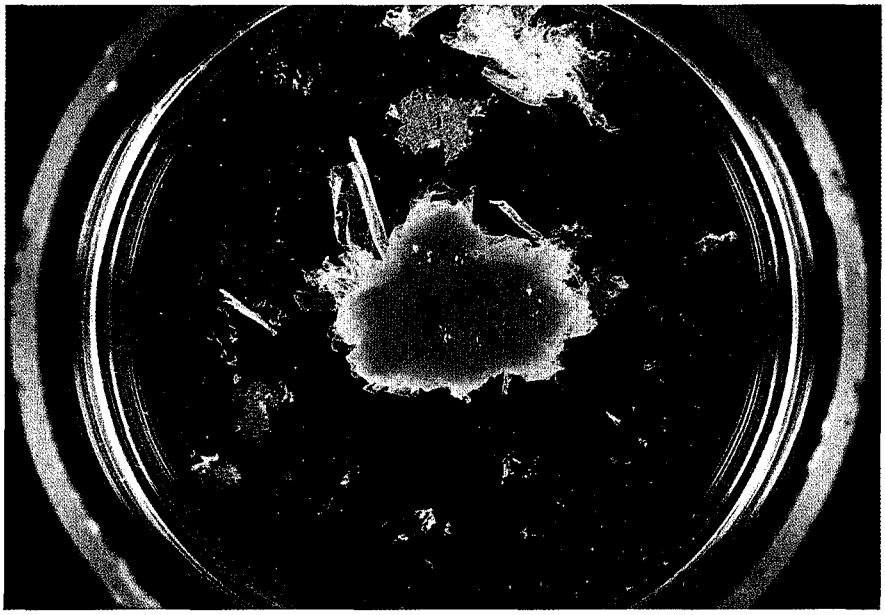


図２．スライムの外観（事例５）

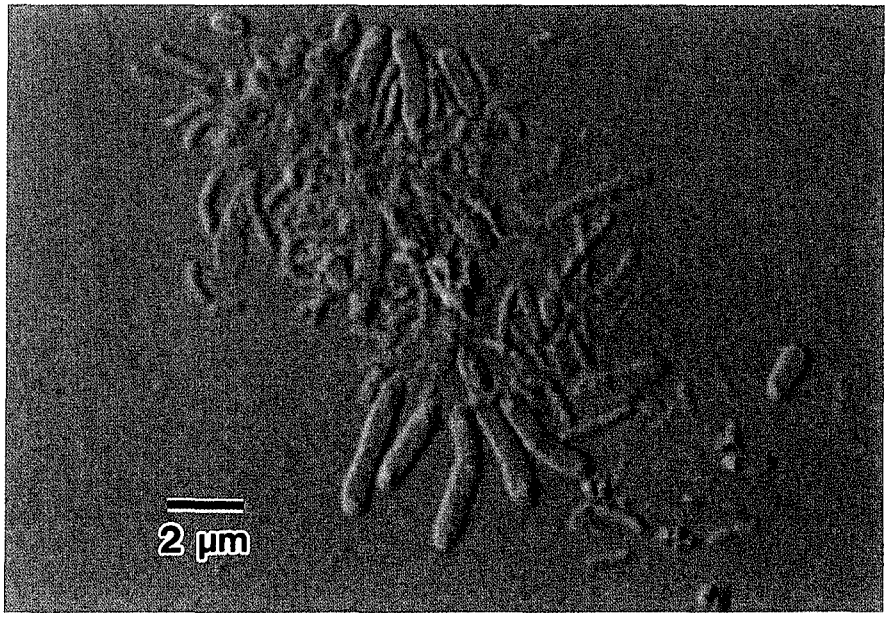


図３．スライムの顕微鏡写真（事例４）

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.*, **43**, 205-208, 1992

ラットを用いたブドウ球菌外毒素の単回投与毒性試験

藤井　孝*, 三栗谷久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*
長澤明道*, 角　千代*, 五十嵐英夫**

Acute Toxicity Test of Staphylococcal Enterotoxin in Rats by Single Intramuscular Injection

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, AKEMICHI NAGASAWA*, CHIYO SUMI* and HIDEO IGARASHI**

Staphylococcal enterotoxin A (SEA) that causes poisoning and toxic shock syndrome was intramuscularly to male F344/DuCrj rats.Each group, consinsting of 6 to 10 rats, was treated with a single injection of SEA at the dose of 1, 100 or 10,000 ng/kg and was sacrificed at 2, 4 or 7 days. Body weights of rats given 10,000 ng/kg were slightly lower than those of the control at day 1 and 2. Both absolute and relative weights of the spleen in 10,000 ng/kg group at day 2 were significantly higher than the control group. Histological examination demonstrated an increase in the number of lymphocytes in red pulp of these enlarged spleens.

Keywords：ブドウ球菌外毒素 A Staphylococcal enterotoxin A, 単回筋肉内注射 single intramuscular injection, ラット rats

緒　言

ブドウ球菌外毒素 (Staphylococcal enterotoxin, 以下, SEと略す)は, 血清学的にAからEの5型に分類され, 食中毒の原因物質とされている. 免疫学的にはT細胞を活性化し, 液性および細胞性免疫に対し抑制的に働き, さらに毒性ショック症候群 (toxic shock syndrome, 以下, TSSと略す)を発症することが知られている[1-3].

TSSは, ヒトでは発熱, 血圧低下, 肝・腎の機能障害, 血液凝固異常など急性全身性の多臓器障害を惹き起こすことを特徴としている[4,5]. ウサギを用いた実験的TSS症候群では, 心臓, 血管など多臓器の無菌性炎症, リンパ節のリンパ球増多または減少などが, 主な病理組織学的所見であり, その機序にT細胞の活性化が関与していると考えられている[3].

このように, SEは生体に種々の影響を及ぼすことから, 生物実験における陽性物質として使用できるか否かを検討することにした. この第1段階として, ラットを用いて, SEによるTSSの発症, 経過, 転帰を観察した.

今回は, SEのうちのタイプA(以下, SEAと略す)を, 経口投与ではなく筋肉内に単回投与した場合の急性的な影響を, 臨床症状観察ならびに解剖, 病理組織学的検査によって検討した.

実験材料ならびに方法

実験動物：4週齢の雄性 F344/DuCrj ラット(日本チャールス・リバー, 厚木)を購入, 検疫と環境への馴化のため1週間の予備飼育後, 実験に供した.

飼育条件：ラットは一般飼育区域内の, それぞれ室温22-24℃, 湿度50-60% 換気1時間に10回(効率 99.9% HEPAフィルター経由), 照明6:00-18:00に制御された飼育室において, アイソレーション・ラック内のポリカーボネート製ケージに, 3匹ずつ収容した. 試験期間中は基礎飼料CE-2(日本クレア：東京)と水道水(細菌ろ過器

*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
**東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科
*, **The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan

経由)は自由摂取とし，尾の着色による個体識別を行った．

被験物質および投与方法：小田[6]の方法に準じてSEAを精製した．投与は1回とし，マイクロ注射器を用いて，大腿部筋肉内に注射した．投与量は，1,100および10,000ng/kgの3用量とし，投与容量は，体重100g当り0.1mlとした．

投与群の設定：投与群は，1ng/kg投与をL群，100ng/kgをM群，10,000ng/kgをH群とし，対照群(以下，C群とする)には生理食塩水を投与した．対照群を含め各群とも6匹ずつとし，投与当日(0日とする)から，2および4日目で各群3匹ずつを屠殺解剖した(以下，各2および4日間試験とする)．さらに，解剖組織学的検索のみを目的とし，MおよびH群に相当する用量に，それぞれ3および4匹を割り当て，投与後，7日目に剖検した(以下，7日間試験とする)．

一般状態観察：瀕死，死亡および行動異常の有無，被毛および可視粘膜の観察は，1日3回行った．体重は，毎日測定した．

病理学的検査：観察期間終了後，動物は放血屠殺し，肉眼的検索を行った．心臓，肺，胸腺，脾臓，肝臓，腎臓，精巣は摘出し器官重量を測定した．摘出臓器は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，定法に従ってパラフィン切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン重染色，PASおよびアザン染色を施し，光学顕微鏡にて組織学的検索を行った．

統計学的分析：体重および臓器重量の測定値の検定は，Bartlett検定法にて分散の均一性を検定し，一元分散分析およびScheffeの多重比較検定を行った．危険率は全て5%においた．

結　果

一般症状観察では，H群(SEA10,000ng/kg)で投与直後からケージ内で蹲るなど自発運動の低下が散見されたが，他に明らかな所見はなかった．投与後1日目以降は，異常症状は認められず，全てのラットが観察期間終了時まで生存した．

投与直前から4日までの体重変動をTable 1に示した．実験期間を通して絶対重量および体重増加指数(投与直前体重を100とした指数)とも，C群と投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった．しかし，MおよびH群 (SEA100および10,000ng/kg)の体重増加は対照群に比べ終始低く推移した．とくにH群は1および2日で低かった．相対重量でみると，1から4日までの各測定時とも，用量に関連した体重増加量の低下が認められた．

臓器重量測定の結果をTable 2に示した．絶対および相対(体重比)重量とも，脾臓では投与群がC群に比べ大きく，精巣では反対に小さかった．脾臓重量の増加は，H群では2および4日間試験でみられ，2日間試験では絶対および相対重量とも有意であった．M群でもH群に比べ，ごく軽度ではあるが，同様の傾向が認められた．精巣重量の減少は，2および4日間試験ともH群のみで認められた．H群における脾臓重量の増加は，4日間試験よりも2日間試験で明らかであった．これに対し，精巣重量の減少は，4日間試験でより顕著になっていた．

解剖組織学的検査の結果，解剖時の肉眼的所見では全

Table. 1. Body Weight Changes in Rats Treated with Staphylococcal Enterotoxin A (SEA)

Group (SEA:ng/kg)	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Absolute weights[1]					
C (0)	96.8±4.3(6)[2]	102.3±4.8(6)	107.3±5.6(6)	110.7± 8.3(3)	114.7± 7.3(3)
L (1)	98.3±6.3(6)	103.3±6.7(6)	109.0±7.9(6)	115.3±10.7(3)	119.0±11.5(3)
M (100)	96.2±3.4(6)	100.3±4.0(6)	105.3±4.6(6)	106.7± 6.4(3)	111.0± 6.2(3)
H (10,000)	94.8±2.5(6)	96.5±3.0(6)	102.0±3.2(6)	106.0± 2.0(3)	109.3± 2.0(3)
Relative weights[3]					
C	100±0(6)	104.8±1.8(6)	110.3±1.5(6)	114.7±1.5(3)	118.7±1.1(3)
L	100±0(6)	104.7±1.0(6)	110.3±1.8(6)	113.7±0.5(3)	118.0±1.0(3)
M	100±0(6)	104.2±1.4(6)	109.2±1.6(6)	113.0±3.6(3)	117.3±3.7(3)
H	100±0(6)	102.0±2.3(6)	108.3±1.6(6)	109.7±1.5(3)	113.0±0 (3)

1) Absolute weights (Mean±SD). 2) Parentheses shows number of rats weighed.
3) Index of body weight gain compared to the initial weight (Mean±SD).

Table. 2. Organ Weight in Rats Treated with Staphylococcal Enterotoxin A (SEA)

Group (SEA : ng/kg)	Body weight[1] (g)	Liver (g)	Kidney (R) (mg)	Heart (mg)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Testis (R) (mg)
Absolute weights[2]							
2 days[3]							
C (0)	107.3±5.6 (3)[4]	4.54±0.17	494±13	437±19	335± 7	314±20	398±161
L (1)	109.0±7.9 (3)	4.48±0.75	498±17	415± 6	330± 9	289±22	400± 58
M (100)	105.3±4.6 (3)	4.66±0.24	491± 7	433± 5	340± 4	299±21	453± 34
H (10,000)	102.0±3.2 (3)	4.18±0.20	456±23	405±17	401±37*	280±10	297± 79
4 days[3]							
C	114.7± 7.3 (3)	5.03±0.55	533±29	451±31	347±41	329±31	435±126
L	119.0±11.5 (3)	5.40±0.53	554±49	455±39	352±36	318±26	491±179
M	111.0± 6.2 (3)	4.73±0.35	483±33	433±24	341±25	320±19	407±150
H	109.3± 2.1 (3)	4.69±0.12	502±13	438± 4	357±33	332± 4	282± 85
Relative weights[5]							
2 days							
C (0)		4.21±0.14	459±13	405±17	311± 5	291±18	369±148
L (1)		4.20±0.13	466± 7	389± 4	309±14	271±21	376± 63
M (100)		4.30±0.17	452± 2	400± 5	314± 5	276±16	401± 31
H (10,000)		4.15±0.60	453± 6	402±12	399±50*	278±13	294± 70
4 days							
C		4.32±0.11	459±17	388±11	298±9	282± 6	370± 78
L		4.60±0.97	472± 8	387± 2	299±9	271±19	411±124
M		4.26±0.16	434± 8	390±21	306±6	287± 7	362±114
H		4.29±0.19	461±23	401± 3	326±6	304±10	258+ 77

1) Final body weights (Mean±SD). 2) Absolute weights (Mean±SD).
3) Observation periods after the treatment. 4) Parentheses shows number of rats weighed.
5) Relative weights (weight/100g body weight, Mean±SD).
* Significantly different from C group ($P<0.05$).

群において著変は認められなかった．組織学的変化は，2日間試験のH群の脾臓，4および7日間試験のH群の精巣に観察された．脾臓では，赤脾髄を中心に脾小節周辺帯までの部位で，赤血球が僅かに減少し，小ないし中リンパ球の軽度な増加が認められた．細胞分裂像も散見された．これらの変化は，2日間試験ではH群の全例に見られたが，4および7日間試験では認められなかった．精巣では，精細管内の精細胞密度が対照群に比べ，低下していたが，細胞に萎縮，壊死等の障害は認められなかった．精巣での変化は，4日間試験では全例に，7日間試験では4例中2例に観察された．

考　察

ブドウ球菌外毒素(SEA)投与に関連して発生した明らかな変化は，主に10,000ng/kg投与群でみられた．変化は，投与直後の自発運動の低下，投与後1日目にみられた体重増加の抑制，2日間試験における脾臓の重量増加および赤脾髄でのリンパ球の増加，4および7日間試験での精巣の重量減少ならびに精細胞の密度低下であった．

脾臓の重量増加は，組織変化の観察結果から，リンパ球の増加を反映していると考えられた．摘出したマウス脾細胞は，黄色ブドウ球菌産生の毒素性ショック症候群毒素(TSST)による処置でリンパ球に分裂促進が起こり，増殖したと報告されており[7]，本実験結果と一致している．また，ウサギへのTSST連続投与実験で観察された変化[2]にも類似している．従って，SEAで処置されたラットの脾臓は，TSS発症の場の一つであり，その変化は，SEAが免疫機構に及ぼした影響の表現と考えられる．すなわち，本実験条件下では，SEAによるラットTSS症候群は，脾臓での反応が特異的であると推論された．

組織学的検索から，精巣重量の減少は精細胞の明らか

な障害を伴わない．細胞密度の低下に起因していた．また，このような所見を呈したラットは，投与後の体重増加が抑制されていた．以上の結果から，精巣の変化は，SEAの直接作用と言うより全身状態への影響を反映した非特異的反応と推定された．

以上は，主としてH群での変化であるが，体重増加指数でみられた増加抑制は，SEA投与量に比例して増強されており，SEAが用量-相関をもって生体に作用したことを明示していると考えられた．

本実験の結果から，SEAは陽性物質として，生物実験に使用できる要素を多く有していると思われる．このため，今後，各種の実験を重ね，SEA投与に伴う様々の生体反応の指標を定め，用量・反応関係を確立させることが必要と考えられる．これによって，SEAは，ラットTSS症の作出，その原因解明に用いられるだけでなく，陽性物質として，種々の物質の安全性または有効性の評価試験において有用性を発揮すると期待される．

文　献

1）八木淳二：代謝，**27**, 33-42, 1990.
2）内山竹彦：小児科診療，**54**, 1313-1321, 1991.
3）内山竹彦，厳　小傑：メディアサークル，**36**, 273-284, 1991.
4）内山竹彦，厳　小傑：MINOPHAGEN MEDICAL REVIEW, **35**, 1-15, 1990.
5）五十嵐英夫：医学細菌学2巻，三輪谷俊夫監，97-131, 1987, 菜根出版，東京.
6）小田隆弘：日細誌，**33**, 743-752, 1978.
7）Poindexter,N.J. and Schlievert,P.M. : *J.Infect. Dis.*,**151**, 65-72, 1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 209-218, 1992

石綿繊維の経口摂取による生体影響（第5報*）
クリソタイルの小腸内動態

福森信隆**, 角　千代**, 佐々木美枝子**

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (V)
Behavior of Injected Chrysotile Fibers

NOBUTAKA FUKUMORI**, CHIYO SUMI** and MIEKO SASAKI**

Chrysotile asbestos was injected into the ligated small intestinal canal of rats and movement of the fibers was observed at 10, 30, and 60 min by scanning electron microscope. Although a large number of fibers remained on the small intestinal villi after washing, no penetration of fibers through the villi of the mucous epithelium was observed. However, in the Peyer's patches, adhesion of fine fibers formed from chrysotile in situ to the fold was detected, and it increased in a time-dependent manner. Protrusions of short fibers appearing on the surface of microfold cells were observed at 60 min after the injection. It is considered that the fibers can penetrate the Peyer's patches by contact with its surface over a period of time.

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, パイエル板 Peyer's patches, ラット小腸 rat small intestine, 走査型電子顕微鏡 scanning electron microscope

緒　言

高濃度のアスベストの吸入曝露は，長期の潜伏期間を経て石綿肺，肺癌，悪性中皮腫等の重篤な疾患を惹起することが知られている[1]．これに関して Selikoffらは，断熱作業従事者の中に呼吸器系疾病以外の消化器系癌の多発を見出し指摘した[2]．アスベストの経口摂取による繊維自体の持つ有害作用は，疫学調査あるいは実験動物を使用した経口投与試験において明確な因果関係が認められていない．これまで，経口曝露による明らかな発癌性を立証した報告はみられない．しかしながら，消化器系を経由するアスベストの経口曝露は，飲料水，アルコール飲料，食物などに含まれる飲食物由来の他に，吸入されたアスベストの50％相当が再度嚥下に伴い食道へ移行することが明らかである[3]．このことは，アスベストの発癌性における消化器経路の重要性を示唆するものである．

Westlakeらは繊維の貫通機序を解明する目的でラットに6％のクリソタイル添加飼料を与えたところ，腸管の杯細胞から侵入している電顕像を確認し，粘膜固有層に分布することとあわせて考慮して，消化管発癌と密接に関連することを推測した[4]．これに対して，肺や胸腔内でのマクロファージにアスベスト繊維は貪食されるが，バターに混入したクリソタイルの摂取では，小腸壁の杯細胞に何ら繊維の存在を認めず，したがって消化管から侵入しないという報告がある[5]．このようにアスベストの消化管での侵入機序を把握することは非常に複雑であるが，摂取した繊維の組織内分布については，アスベストの蓄積を認める例が多い[6]．

先に生体影響に関する基礎的研究の一環として，経口投与したクリソタイルの胃及び空腸部での繊維の動態について観察した[7]．その結果，消化管壁で繊維の突出した貫通現象はほとんど認められなかった．ゆえに繊維の生体内侵入は，腸管固有の蠕動に伴う物理的運動あるいは消化吸収機構の生理的機能に起因する容易な侵入が起こらないと推察した．

今回，経口摂取におけるアスベストの侵入機序をさら

＊第4報，東京衛研年報，**40**，349-354，1989

＊＊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

に明確にするため，結紮した小腸部にクリソタイルを強制注入して，主に回腸部で点在する集合リンパ節のパイエル板と繊維の相関を走査型電子顕微鏡(走査電顕と略す)により観察した．同時に，小腸壁での繊維の動態と粘膜上皮に開口する杯細胞との関連について形態的観察を行った．

実験方法

実験：一晩絶食を行った体重約320gのF344/DuCrj 雄性ラットを使用し，ネンブタール麻酔を施した．開腹後，杉村の方法[8]に準じて胃幽門部から20cm 下部の小腸及び盲腸との境界部をクレンメで固定して腸管内容物の移動を止め，腸間膜機能を保持したいわゆる「生体腸管」の動物を作製した．投与は，UICC(Union International Contre le Cancer)の標準品クリソタイル繊維(Chrysotile A)を0.1 μmのフィルターでろ過した精製水に分散懸濁後，0.5mg/ラットの割合で，結紮した腸管上部に注射筒を用いて3 ml の強制注入を行った．注入後開腹部をとじ，動物の腹部を保温した．

10分，30分，60分経過後，各群2匹の腸管を摘出して切開したのち，一定の水量で同一時間腸管内容物を洗浄し，表面粘液や管腔内異物を除去した．試料は，直ちに細切を行わず，3％パラホルムアルデヒド液(0.1M燐酸緩衝液，pH7.3)で浸漬前固定を行った．その後，パイエル板及び腸管の一部を切り出し，1％オスミウム酸(0.1M燐酸緩衝液，pH7.3)で1時間の後固定を実施した．試料の組織片が大型であることから，走査電顕で観察する時のチャージアップを防止する目的で2％タンニン酸及び1％オスミウム酸処理の導電染色を行った．その後，定法に基づき，エタノール脱水，酢酸イソアミル浸漬を行い，二酸化炭素による臨界点乾燥をした後，白金・パラジウムで金属蒸着を施し導電被膜を作製した．

観察：電界放射型走査電顕(日立 S-800)を15kv の加速電圧で使用した．前報の観察方法[7]と同様に，1,000倍の倍率に設定した画面の中の囲繞部分を，他の画面でその5倍または10倍の部分強拡大(5,000-10,000倍)としたものを併用し，低倍像と高倍像とを同時に移動しながら検索した．

繊維の確認：クリソタイル繊維と他の繊維形状を呈する体毛や伸張した粘膜構造との識別は，繊維末端の断面や表面構造，繊維束の形成，繊維径などで判定が可能である．しかし，繊維に粘液が付着した状態で乾燥すると伸長した形状のみで識別することが困難な場合があるため，一部の試料を分析電子顕微鏡のバルクホルダーに装着して走査像観察装置で二次電子を得て結像した．繊維構造物の確認のため，エネルギー分散型微小部X線分析装置(Kevex-7500，EDXと略す)を用いて組成元素を分析検出し，クリソタイル繊維成分の元素と比較して同定識別を行った．

実験結果

クリソタイルの腸管内強制注入による動物の死亡は認められず，小腸の管腔内での出血もみられなかった．流水を用いた洗浄にもかかわらず，多量の繊維が小腸壁に付着していた．比較的に30-50 μmの長繊維が多く，カール形状をした繊維束を形成している像が散見された．繊維に粘液が付着して密集し，塊状を呈する像も認められた．乾燥の際に起こる粘液が伸展して長く伸びた構造に対しては，クリソタイル繊維と区別することが可能であった．走査電顕による観察では，長さ1 μm 以下の細い短繊維を検出することは，極めて困難であった．

表1は，注入後のクリソタイル繊維が腸管壁に付着していた残存量の概略を経時的に示した．一定条件の洗浄で流出しない繊維は，パイエル板では10分後に比べて30分，60分後で増加する傾向がみられた．小腸絨毛面では30分，60分後と比較して，10分後の付着が平均して多い傾向を認めた．しかしこの傾向は，管腔内で顕著な差ではなかった．全体として，小腸粘膜上皮の特定部位で繊維の突出した貫通像は認められなかった．

ラット腸管のパイエル板は，大小不同の大きさであるが，平均して約4 mmの長さで，中央に数個の円形の陥没した形状を有していた．周囲は背高が伸びた小腸絨毛で囲まれて，一段低い位置に点在していた．図1は，対照のパイエル板で微絨毛の間隙に microfold 細胞(M細胞と略す)の微小ひだが所々に開口していた．粘液が伸張して繊維に似た像は，少なかった．注入10分後では，

Table 1. Attachment of Injected Chrysotile Fibers in Rat Small Intestine

Sites	Cont	10 min	30 min	60 min
Peyer's patches	ND	+	++	++
Intestinal villi	ND	+++	++	++

ND:Not detectable, +:Slight, ++:Moderate, +++:Severe

Table 2. Relative amounts of Mg and Si in Chrysotile Fibers by Osmium Tetroxide

Cont	1 hr		2 hr	
	1%OsO_4DW	1%OsO_4PB	1%OsO_4DW	1%OsO_4PB
71.3±1.13	70.2±0.65	68.9±0.94	69.3±1.27	69.9±0.88

Values represent the mean±S.E. of $\frac{\text{signal intensity of Mg}}{\text{signal intensity of Si}} \times 100(\%)$
at 5 points by Student's *t*-test. DW:Distilled water, PB:Phosphate buffer

付着繊維数は比較的少量であるが，束状の形態を持つ繊維が多くみられた(図2)．30分後では，付着繊維数が軽度に増加した．繊維束末端から細い繊維に分離した像や短繊維の付着が観察された(図3)．さらに60分後のクリソタイル繊維は，細かく分断され，網状に絡まった様相を呈し付着していた．付着量の少ない部位においても細く短い形状を呈し，単繊維に近似している構造を認めた(図4)．高倍率でパイエル板を観察したところ，クリソタイル繊維がM細胞から突き出て単なる付着と異なる様相を呈した像が一部に散見された(図5，矢印)．この状態は，単一の形状あるいは繊維が分離して複数の密集した突出像として観察された．

繊維の確認法として，微小部元素分析を一部抽出した試料で実施した．導電染色に使用したオスミウム酸が酸であることからクリソタイル繊維のマグネシウム(Mg)の溶出が考えられたため，蒸留水ならびに 0.1M 燐酸緩衝液で溶解して，Mgとけい素(Si)の強度比率を検討した．オスミウム酸処理1時間，2時間とも各溶媒で対照に比べて Mg/Si 比の変動は，認められなかった(表2)．実際に小腸絨毛に付着している繊維の元素組成を分析した結果，後固定と導電染色に使用したオスミウム(Os)や導電性を増強する目的で金属蒸着に用いた白金(Pt)の分析スペクトルが大きく出現したため，クリソタイル成分の Siの検出ピークと接近する傾向を示した(図5，中央)．

小腸絨毛の多くの繊維は，絨毛間の間隙に繊維束の状態で残留し，クリソタイルの特徴でもあるカール形状を認めた(図7，8)．絨毛先端部では繊維の付着が少なかった．付着量の程度は，注入後10分で若干多い残存を認めたが，30分，60分後と顕著な差異は確認できなかった．高倍率の検鏡で，細く短い繊維は杯細胞からの球形分泌物の中に取り込まれる傾向がみられた(図7，右)．付着以外の，繊維が粘膜上皮に突き刺さる所見は，いずれの経過時間でも認められなかった．

考　察

経口摂取によるアスベストの毒性は，現在のところ未解明である[1]．消化管発癌の可能性は，不明瞭であるがそのことを明らかにするための前提として，アスベスト繊維が消化管粘膜上皮を貫通し，組織内に移行，蓄積するという動態の解明が重要である．アスベストの組織への移行を認める報告として，クリソタイルとクロシドライトを総量 800mg 摂取させたヒヒの胃，心臓，脾臓，膵臓，血液で蓄積を認めている[9]．またクリソタイルを妊娠母体ラットに投与し，その仔ラットにも与えた時，腎皮質で蓄積の増加がみられ，消化管壁での侵入を示唆した Millette らの報告がある[10]．しかし反面，ラットへのクリソタイルの21ヶ月高濃度曝露で発癌を認めず，また貫通もなく，さらに鉱山作業者で疫学的に繊維の腸管壁や腸間膜リンパ節への蓄積を調べたところ，何ら異常を認めていない例もある[11]．繊維の組織への移行に関して，現在のところ明確な結論が得られていない．

特に今回，アスベストの貫通現象に着目して腸管内での繊維の動態を調べる目的で，閉鎖された腸管の一部にクリソタイル繊維を強制注入した．この方法は，腸管機能が維持されているため，血管，リンパ管の遮断を認めず，粘膜上皮との反応を経時的に検索することが可能である．先に行ったクリソタイル繊維の胃内経口投与では[7]，胃から小腸まで繊維が移動する際，腸管での繊維の密集度が低くなり，検出状態が悪かった．腸管壁に残存した繊維は，粘液に絡まれ束状が多くみられた．10分後より60分後で細かく分離する傾向が認められたことから，腸管機能の影響が考えられる．太い束状の長繊維は，絨毛間の陥凹部に残留して粘膜上皮への突出した像を認めなかったことから，容易に生体内へ侵入する可能性はないと推察される．Sebastien らは，リンパ管からアスベストを回収し，その時，短繊維より長繊維で消化管壁への侵入が著しいと報告している[12]．このことは組織での蓄積からの推論であり，実際，消化管壁で形態的に貫通現象を捉えてはいない．カール状を呈するクリソタイル繊維が，長い形状を維持した状態で生体内に侵入することは，走査電顕を用いた管壁の表面観察からでは証明が不可能と考えられる．Stanton の提唱した 8 μm以

上の長さの繊維が強い発癌性を示すという仮設から[13]，吸入曝露に比較して，経口摂取で明確に発癌が認められないのは，長繊維の侵入がほとんどないからと推察される．

パイエル板は，異物の貪食機能を有し，免疫との関連が重要である．コレラ菌等の腸管壁侵入に際し，集合，貪食の作用が重要な役割を果たすといわれている[14]．また抗原に対しては，抗体産生を担っているリンパ装置である．クリソタイル繊維の付着は，パイエル板においても確認されたが，小腸絨毛表面と比べて特に多い量ではなかった．経時的観察で注入後の時間が長いほど，繊維が細かく分散され全体に広く瀰漫している態様であり，一部ではM細胞の開口部から突出した像が観察された．このことは，パイエル板がクリソタイル繊維の補集に関与していると思われ興味深い．走査電顕によるコレラ菌の観察で腸管と3時間反応させた後，小腸粘膜上皮への菌付着が認められると同時に，M細胞へと集合する[15]．このことは，クリソタイル繊維の注入後60分まででは接触時間が短く，十分に侵入が進行していなかったと考察される．

前述したが，Westlakeらは透過電顕法で結腸の上皮細胞や粘膜固有層にクリソタイル繊維を見出したことから，杯細胞の機能を介在して，その粘液分泌物に取り込まれ侵入すると報告した[4]．また他方では，走査電顕法でクリソタイルと異なるが，アモサイト繊維が空腸上皮に突き刺さった像を5例中3例で認めている[16]．しかし今回の観察では，粘膜上皮の杯細胞由来分泌物に繊維の集合は認めたものの，杯細胞を経由して組織内に貫通しているか不明であった．分泌物に含まれる繊維は全体に水平面に伸びて付着し，垂直に突出した像はみられなかった．管腔内へ分泌するという機能から，杯細胞が繊維の侵入に直接関与することはないと考える．このことは，繊維のマクロファージへの貪食は容易に行われるが，小腸上皮細胞の透過電顕による精査において，微絨毛面や上皮細胞間デスモゾーム，膜接合部，杯細胞で，繊維の残存が認められなかったという報告[5]に関連している．

走査電顕法では，表面の立体構築に限られ内部の把握ができないため，繊維の組織細胞への到達深度が確認できない欠点がある．元来，貫通現象を検索するためには走査電顕で広範囲に観察して，突出像が多くみられた部位を超薄切片法による透過電顕で検鏡すべきであるが，表面観察で標的部位を選別することが容易でない．また走査電顕の分解能が悪いために，細い繊維の検出が困難な場合がある．

オスミウム酸処理によるMgの溶出は，みられなかった．このことは，一般にクリソタイル繊維が酸の影響を受けて，Mg成分の低下を惹起させ識別を不明瞭にするが[17]，導電染色後も繊維の分別が十分に可能であることを意味している．オスミウム酸は，水の極性溶媒や四塩化炭素などの非極性溶媒にも良好な溶解性を示し，不飽和脂肪酸の非極性脂質と容易に反応する．しかし，導電率が極めて低いため，オスミウム酸自体イオンに解離しにくいことが，溶液が酸性を示さない理由といわれている[18]．そのため，蒸留水や緩衝液中でオスミウム酸の酸性度は溶媒に強く依存している．

アスベストの経口摂取による健康影響は，疫学的調査で消化管発癌の根拠が低いといわれている[19]．しかし一方では，主にクリソタイルを15％含有するアスベストセメント管の利用は，わが国では減少しつつあるが，発展途上国では必需品として汎用されている．これまでの米国やカナダの調査で，アスベストセメント管から給水中にクリソタイル繊維が排出されることは事実であり，経口的に消化管に入ったアスベストのうち1万あるいは10万本に1本の割合で生体内に侵入するという[20]．経口摂取によるアスベスト繊維の生体内侵入機序が，いまだ明らかにされていないが，その解明は，今後の毒性評価に有意義であると思われる．

結　語

クリソタイルのラット腸管への強制注入による繊維の動態を，走査電顕で観察した．小腸絨毛では，多量の繊維が残留していたが，粘膜上皮に貫通している像は，認められなかった．パイエル板では，時間経過に伴い繊維が細く分散して付着していた．少例ではあるが，M細胞の開口部で細い繊維の突出を認めたことから，アスベストの生体内侵入にパイエル板の関与が示唆される．

文　献

1) *Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres*, 1986, World Health Organization, Geneva.

2) Selikoff, I. J., Hammond, E. C. and Seidman, H. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **330**, 91-116, 1979.

3) Lee,D.H. :*Environ.Health Perspect.*, **9**, 113-122, 1974.

4) Westlake, G. E., Spjut, H. J. and Smith, M. N. : *Lab. Invest.*, **14**, 2029-2033, 1965.

5) Davis, M. G., Bolton, R. E. and Garrett, J. : *Environ. Health Perspect.*, 9, 255-260, 1974.

6) Cook, P. M. : *Environ. Health Perspect.*, **53**, 121-130, 1983.

7) 福森信隆，荻野周三，佐々木美枝子：東京衛研年報，**40**，349-354，1989.
8) 杉村文昭：*Nihon Univ. J. Med.*, **16**，25-37，1974.
9) Kaczenski, J. H. and Hallenbeck, W. H. : *Environ. Res.*, **35**，531-551，1984.
10) Patel-Mandik, K. and Millette, J. :*Environ. Health Perspect.*, **53**, 197-200, 1983.
11) Gross, P., Harley, R. A. and Swinburne, L. M., et al. :*Arch. Environ. Health*, **29**，341-347，1974.
12) Sebastien, P., Masse, R. and Bignon, J. : *Environ. Res.*, **22**，201-216，1980.
13) Stanton, M. F., Layard, M. and Tegeris, A. : *J. Natl Cancer Inst.*, **67**，965-975，1981.
14) Owen, R. L., Pierce, N. F. and Apple, R. T., et al. : *J. Infect. Dis.*, **153**，1108-1118，1986.
15) Yamamoto, T. and Yokota, T. : *J. Infect. Dis.*, **160**，168-169，1989.
16) Storeygard, A. R. and Brown, A. L. : *Mayo Clin. Proc.*,**52**，809-812，1977.
17) 福森信隆，荻野周三，中野雅行，他：東京衛研年報，**39**，335-342，1988.
18) 日本電子顕微鏡学会関東支部：医学・生物学電子顕微鏡観察法，106-134，1982，丸善，東京.
19) Edelman, D. A. : *Br. J. Ind. Med.*, **45**，75-82，1988.
20) Commins, B. T. : *Pipes Pipelines Int.*, **33**，7-14，1988.

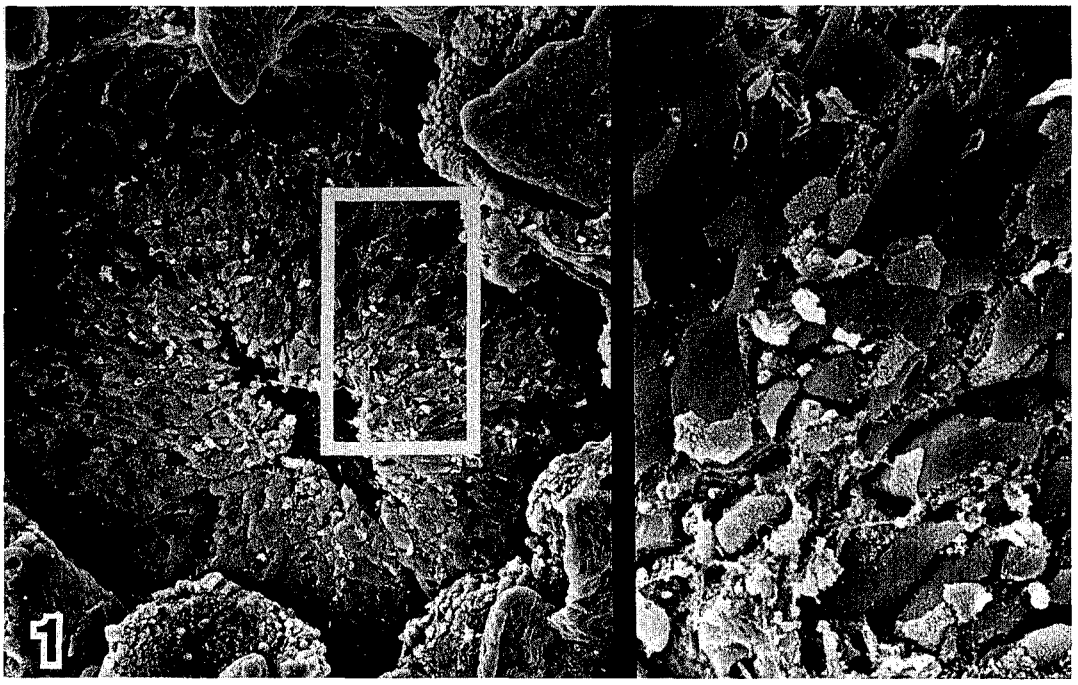


Fig. 1. Scanning electron micrographs of Peyer's patch from control rat. Right figure shows high magnification of square area in the left photograph. Lymphoid follicle surrounded by villi was seen on the surface of mucus in small intestinal canal. Left (x260), Right (xl, 300)

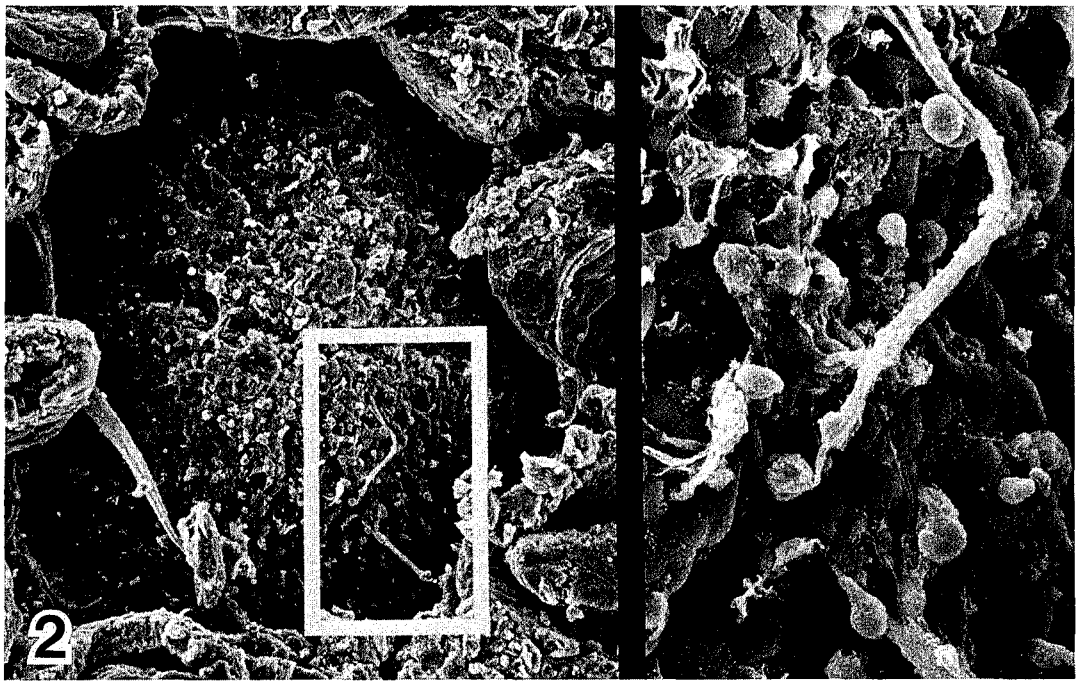


Fig. 2. Peyer's patch of rat small intestine 10 min after injection with chrysotile asbestos. Adhesion of asbestos fibers was observed on the surface of Peyer's patch. Left (x280), Right (xl, 400)

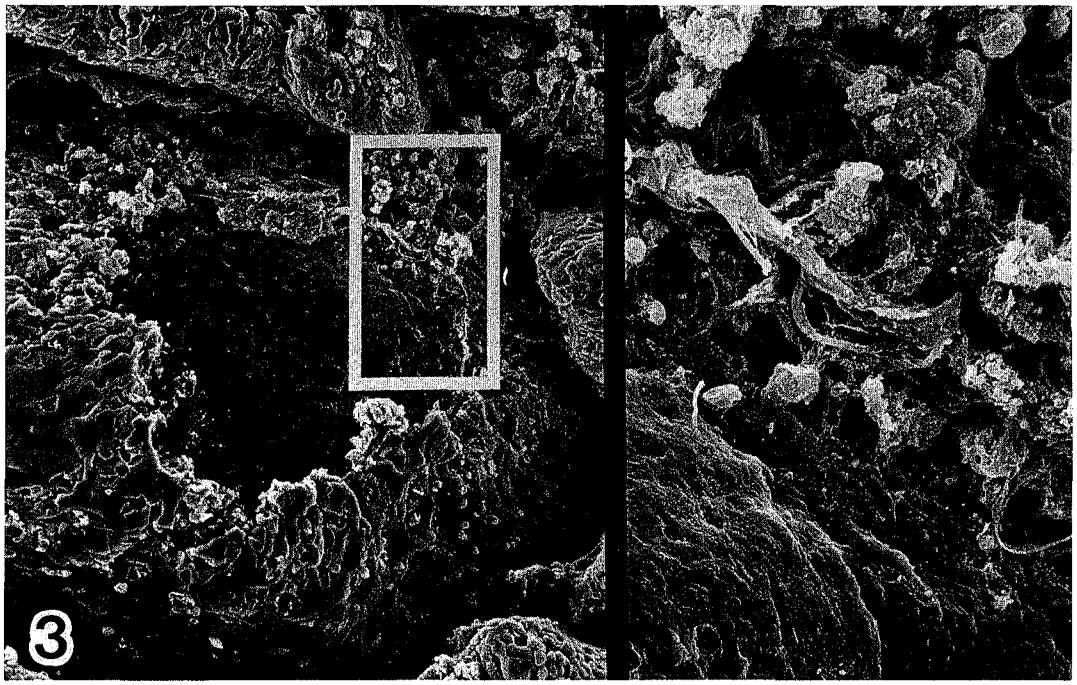


Fig. 3. Adhesion of fibers shortened in situ and those splitting to finer ones at the end 30 min after injection of chrysotile asbestos. Left (x260), Right (x1,300)

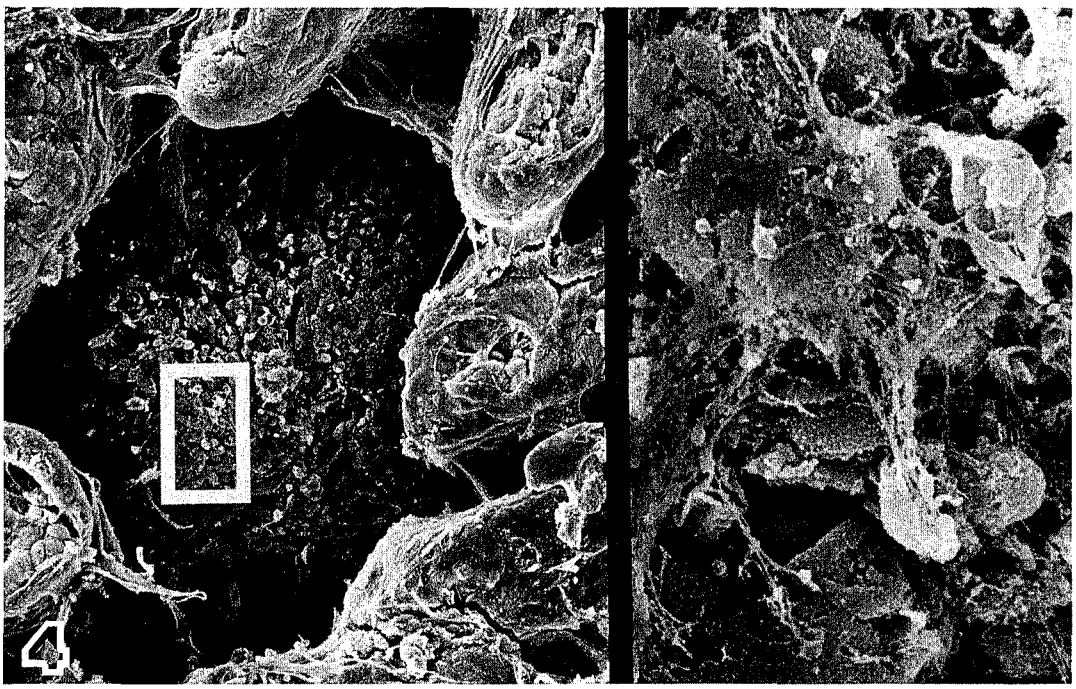


Fig. 4. After treatment for 60 min, finer and shorter fibers were twined. Left (x260), Right (x2,600)

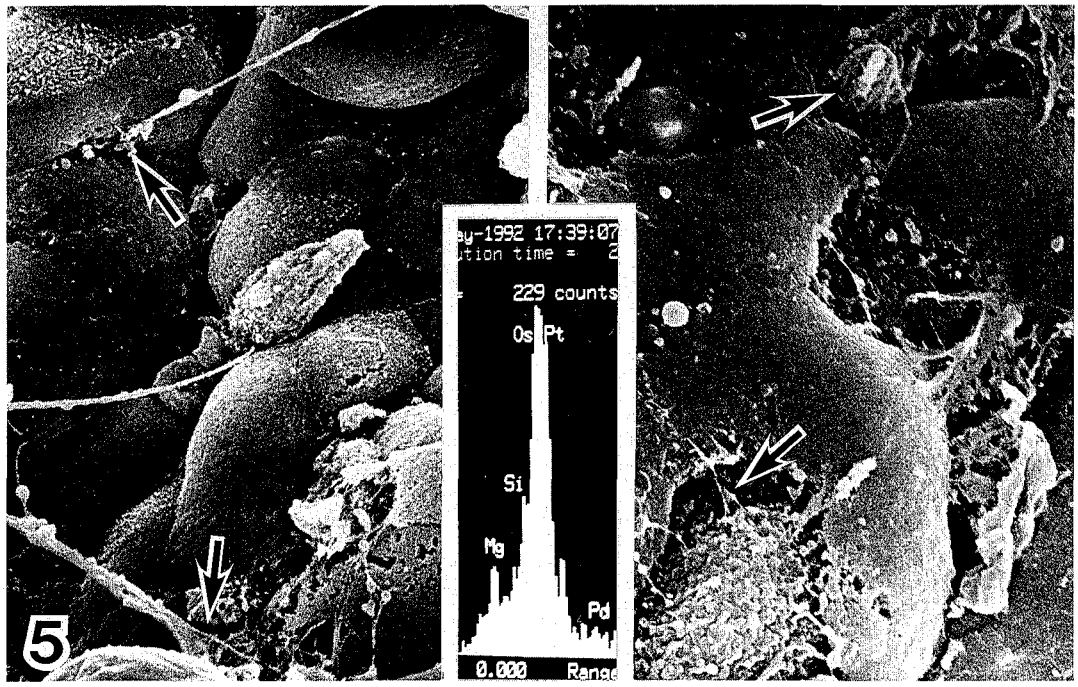


Fig. 5. Surface of Peyer's patch was observed at higher magnification after 60 min treatment with chrysotile asbestos. Note several protrusions of small fibers at the opening of the microfold cell (arrows). Spectrum of energy dispersive X-ray microanalysis of fibers irradiated with electron beam was shown in the middle between photographs. Left (x2,780), Right (x5,750)

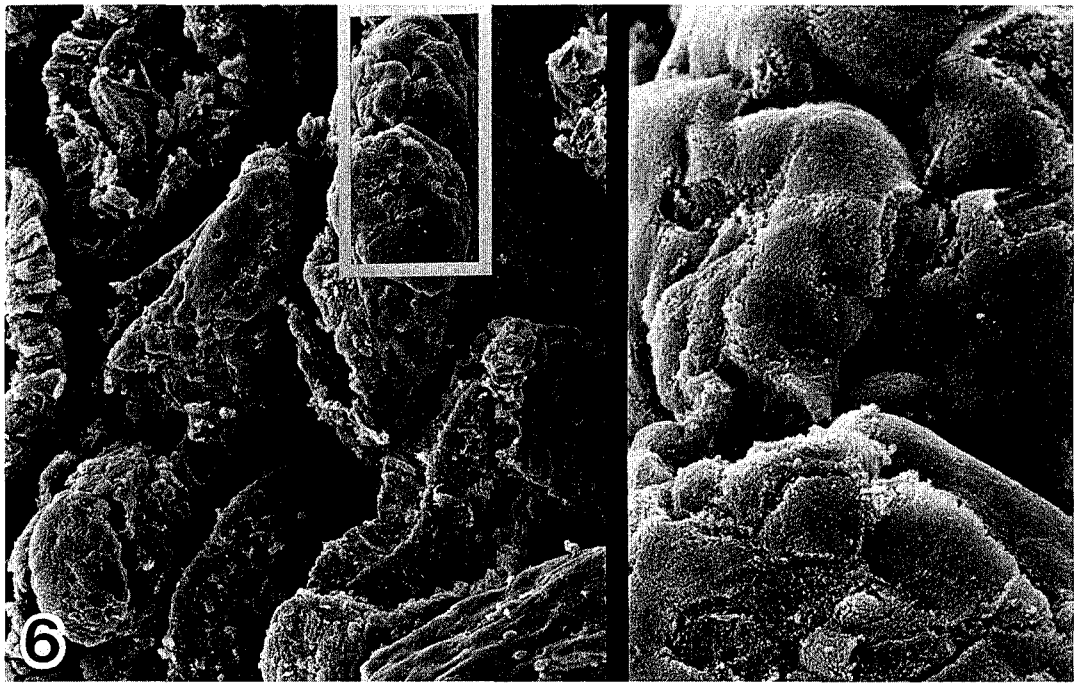


Fig. 6. Asbestos fibers were not observed on the surface of small intestinal villi from control rat. Left (x580) Right (x2,900)

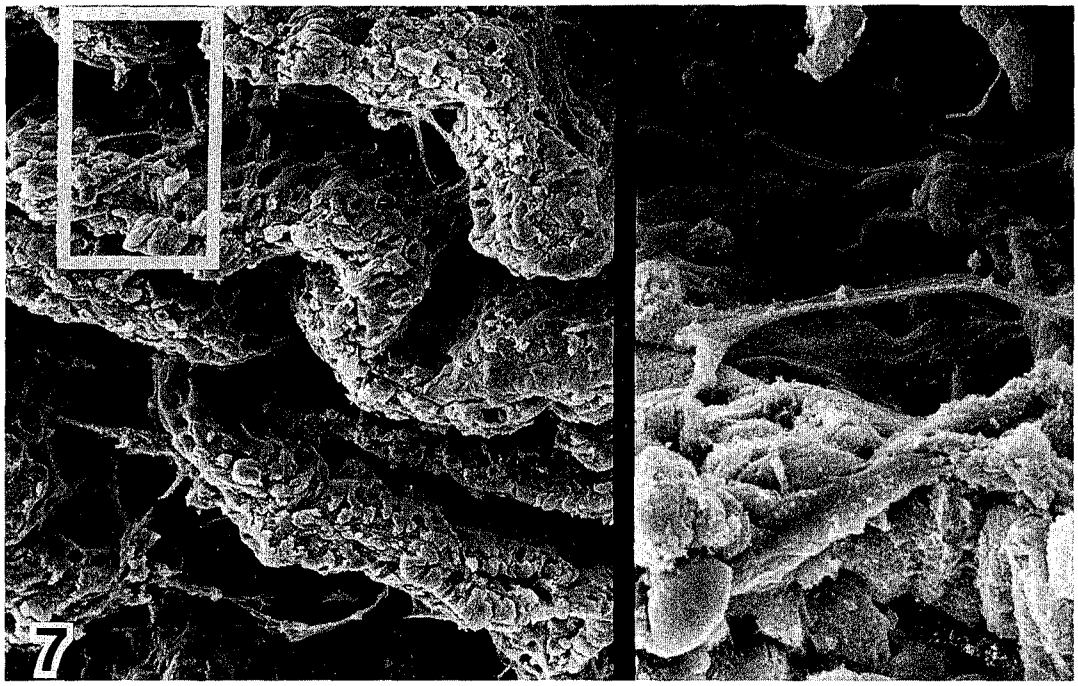


Fig. 7. A number of fibers tend to remain at the space between villi after 10 min treatment. Left (x590), Right (x2,950)

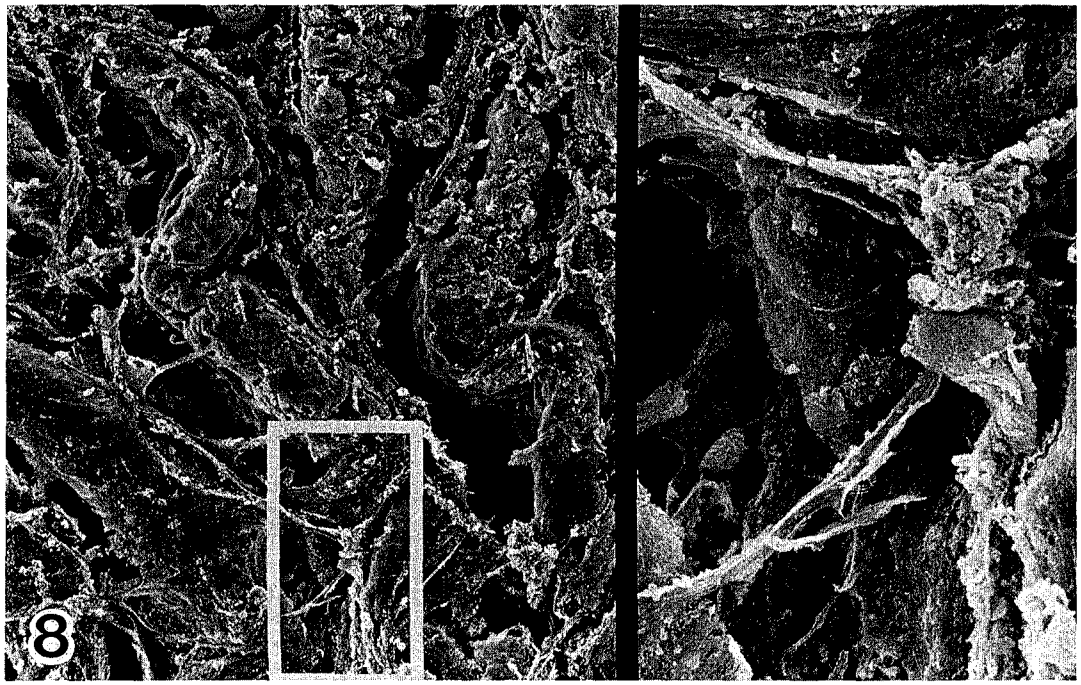


Fig. 8. Chrysotile asbestos showing curling-form were accompanied by surrounding mucus. Penetration of asbestos fibers was obscure around the villi of small intestine after 30 min treatment. Left (x580), Right (x2,900)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 219-227, 1992

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験（第7報*）

藤田　博**, 角　千代**, 佐々木　美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102 (Ⅶ*)

HIROSHI FUJITA**, CHIYO SUMI** and MIEKO SASAKI**

The mutagenicity of 34 food additives, including 16 flavoring agents, 10 seasonings, 3 acidulants, 2 antioxidants, and 3 others 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 (pH7.4) for 20 min. Maltol showed a weak mutagenicity in TA97 without S9mix. A weak mutagenic activity in erythorbic acid was detected with both TA97 and TA102 in the presence and absence of S9mix. The other 32 chemicals showed no mutagenicity in TA97 and TA102.

Keywords：変異原性 mutagenicity, マルトール maltol, エリソルビン酸 erythorbic acid, 食品添加物 food additives, 着香料 flavoring agents, 調味料 seasonings, 酸味料 acidulants, 酸化防止剤 antioxidants, 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いるが，その中でもAmesら[1-3]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，様々な変異原を検出するためには *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100およびTA102の4株を試験に用いるよう提案している[3]．ところが，TA98およびTA100を用いた試験報告は多数見られるが，後から開発されたTA97およびTA102を用いた試験の報告は少ない．さらにTA97は，TA98では検出しにくいフレームシフト型の変異原を検出でき[4]，TA102は酸化反応を伴う変異原に良く反応する[5,6]という特徴がある．従って，この2株を用いた試験を行うことにより，従来の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．

食品添加物についても，TA98およびTA100による試験報告は多いが，TA97およびTA102を用いた試験報告はほとんどなく，TA97およびTA102による試験を実施する必要があると考えられた．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[7-13]までに177種の試験が終了し，14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)，調味料(10種)，酸味料(3種)，酸化防止剤(2種)，抽出剤(2種)，食品製造用剤(1種)の計34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：ヘキサン酸アリル(Lot No. DSG 1179)，ベンズアルデヒド(Lot No. DSQ 3764)，ベンジルアルコール(Lot No. LKK 5230)，*d*－ボルネオール(Lot No. DSN 6945)，酪酸ブチル(Lot No. DSG 2124)，酪酸(Lot No. LKF 5926)，酪酸シクロヘキシル(Lot No. TWQ 1275)，酪酸エチル(Lot No. DSE 3573)，ヘキサン酸エチル(Lot No. DSM 4169)，フルフラール(Lot No. LKN 4666)，酪

---

*第6報，東京衛研年報，**42**，267-275，1991.

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

酸イソアミル(Lot No. DSP 3022)，リナロオール(Lot No. LKG 5096)，マルトール(Lot No. LKQ 0676)，l－メントール(Lot No. DSH 6724)，N－メチルアントラニル酸メチル(Lot No. ECJ 6661)，メチルβ－ナフチルケトン(Lot No. DSN 4843).

調味料：DL－アラニン(Lot No. DSR 2786)，5'－イノシン酸二ナトリウム(Lot No. DSJ 7653)，5'－グアニル酸二ナトリウム(Lot No. ECK 6065)，5'－ウリジル酸二ナトリウム(Lot No. DSM 5829)，塩化カリウム(Lot No. ELI 1742)，クエン酸一カリウム(Lot No. LKH 1305)，L－グルタミン酸カリウム(フルカ，Lot No. 305454 491)，L－アスパラギン酸ナトリウム(Lot No. DSH 1006)，クエン酸三カリウム(Lot No. LKQ 1867)，クエン酸三ナトリウム(Lot No. LKL 8222).

酸味料：酢酸(Lot No. LKF 7351)，フマル酸(Lot No. LKP 0152)，DL－リンゴ酸(Lot No. LKL 0650).

酸化防止剤：L－アスコルビン酸パルミチン酸エステル(東京化成，Lot No. AX 01)，エリソルビン酸(Lot No. KPL 4049).

抽出剤：アセトン(Lot No. DSH 4977)，ヘキサン(Lot No. EWL 1106).

食品製造用剤：水酸化カリウム(Lot No. DSJ 7715).

陽性対照物質：2－アミノアントラセン，9－アミノアクリジン，マイトマイシンC(協和発酵).

試料は，溶解性によって蒸留水(DWと略す)またはジメチルスルホキシド(DMSOと略す，同仁化学，吸収スペクトル用)に溶解した.

菌株 *Salmonella typhimurium* TA97[4]およびTA102[5,6]を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2，OXOID製)で一夜培養し用いた．これらの株は，B.N.Ames教授(カリフォルニア大)より1983年に分与を受けたものである.

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[3,14]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雄性SD系ラット(Jcl:SD 日本クレア)の肝臓ホモジネートから調整したS9[3]を用いた．S9 mix[3,14]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S9 mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(pH 7.4)0.5mlを加え，さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え，37℃で20分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[3] 2 mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[3]に重層した．37℃で2日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した.

各濃度にプレート3枚を用い，結果は，平均値で示した．統計解析は，Kruskal-Wallis検定[15]を行い，さらにMooreら[16]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

34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，試験菌株の増殖が認められる濃度を調べた．増殖が認められた濃度を最高濃度として希釈し，5段階濃度で試験を行った．大部分の着香料は強い増殖阻害性を示し，100μg/プレートが最高濃度であった.

着香料のマルトールでは，S9 mix無添加のTA97において復帰コロニー数は有意に増加した．TA102のS9 mix無添加においても有意ではないが，復帰コロニーの増加が幾分見られた．両株ともに5 mg/プレート以上では増殖阻害を受け，復帰コロニーは微小化し，減少した．最多復帰コロニー数を示したTA97のS9 mix無添加の1 mg/プレートでは対照群の2.0倍の増加が見られ，マルトールのnmolあたり0.02個の復帰コロニーが誘発された．これらの値から判断すると，マルトールの変異原性は陽性である．しかし，比較的高濃度であり，復帰コロニー数の増加も少ないことから，その変異原性は弱いものと考えられた.

マルトールの変異原性については，Bjeldanesら[17]がTA100において陽性としているが，石館ら[18]は陰性の結果を報告しており，結果が一致していなかった．今回TA97においては陽性の結果が得られた．一方，染色体異常試験[19]，姉妹染色分体交換(SCE)試験[19]および小核試験[20]においては，陽性の報告が得られ，マルトールは生体中でも変異原性を示すと考えられる．発ガン性についての報告は見いだせず，詳細な検討が必要な化合物であると考えられる.

酸化防止剤のエリソルビン酸では，TA97およびTA102両株の5 mg/プレート以上において，S9 mixの添加に関わらず復帰コロニー数が有意に増加した．S9 mixを添加した場合には，無添加の場合に比べて復帰コロニー数の増加は少なかった．TA97の場合，10mg/プレートのS9 mix無添加では対照群の復帰コロニー数の1.7倍に増加，同様にTA102では，1.9倍に増加した．それぞれエリソルビン酸のnmolあたりそれぞれ0.03個，0.02個の復帰コロニーが誘発された．わずかな増加であることから，陽性対照に比べ非常に弱い変異原性である

Table 1. Results of Mutation test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Flavoring agents						
Allyl Hexanoate	DMSO	0.1	111	116	198	324
		0.5	123	166	220	383
		0.01	134	167	241	443
		0.005	121	176	260	423
		0.001	127	189	275	435
		0	135	196	271	467
Benzaldehyde	DMSO	1	147	179	195	342
		0.5	150	195	243	411
		0.1	128	193	268	420
		0.05	136	206	259	424
		0.01	151	200	254	429
		0	127	215	269	411
Benzyl Alcohol	DMSO	1	166	202	264	426
		0.5	151	219	302	410
		0.1	148	227	281	415
		0.05	148	218	286	392
		0.01	138	223	277	404
		0	145	207	263	413
d-Borneol	DMSO	0.1	128	183	222	437
		0.05	152	181	243	412
		0.01	123	194	266	448
		0.005	129	179	273	436
		0.001	120	191	269	424
		0	135	196	271	467
Butyl Butyrate	DMSO	0.1	130	175	155	320
		0.05	134	190	172	326
		0.01	126	178	181	344
		0.005	139	194	168	316
		0.001	126	204	181	344
		0	131	177	176	375
Butyric Acid	DW	10	121	154	100	278
		5	149	190	191	365
		1	154	195	257	372
		0.5	133	175	245	352
		0.1	151	165	250	371
		0	137	184	254	368
Cyclohexyl Butyrate	DMSO	0.1	124	218	179	419
		0.05	154	213	217	435
		0.01	146	196	250	411
		0.005	152	186	262	431
		0.001	154	203	270	426
		0	143	183	281	454

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a]			
			TA97		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9
Ethyl Butyrate	DMSO	1	133	196	243	388
		0.5	155	180	252	445
		0.1	149	197	255	425
		0.05	146	200	256	399
		0.01	127	186	253	385
		0	162	210	288	389
Ethyl Hexanoate	DMSO	0.1	130	208	229	396
		0.05	138	208	228	389
		0.01	141	221	252	413
		0.005	127	193	268	435
		0.001	142	205	250	416
		0	157	224	294	446
Furfural	DMSO	1	103	173	256	430
		0.5	123	167	260	420
		0.1	122	210	263	446
		0.05	120	201	256	414
		0.01	145	229	276	416
		0	127	215	269	411
Isoamyl Butyrate	DMSO	0.1	104	183	151	347
		0.05	109	190	196	356
		0.01	87	196	208	343
		0.005	131	188	194	351
		0.001	135	185	221	345
		0	131	177	176	375
Linalool	DMSO	0.1	119	203	248	431
		0.05	138	195	263	447
		0.01	162	193	282	467
		0.005	154	211	288	414
		0.001	159	204	284	438
		0	143	183	281	454
Maltol	DMSO	10	72	8	26	4
		5	154	6	318	7
		1	270[b]	247	178	420
		0.5	171	247	220	416
		0.1	132	217	220	382
		0	138	213	269	396
l-Menthol	DMSO	0.1	134	212	225	447
		0.05	146	216	256	447
		0.01	171	198	299	407
		0.005	149	212	275	444
		0.001	156	227	264	455
		0	130	200	273	413

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Methyl N-Methylanthranilate	DMSO	0.1	158	207	218	501
		0.5	151	206	253	423
		0.01	156	191	289	433
		0.005	167	216	285	441
		0.001	155	203	293	434
		0	130	200	273	413
Methyl β-Naphthyl Ketone	DMSO	0.1	142	191	197	395
		0.05	139	220	236	388
		0.01	126	212	204	380
		0.005	154	190	232	386
		0.001	157	199	243	379
		0	138	213	269	396
Seasonings						
DL-Alanine	DW	10	182	207	232	363
		5	167	197	224	425
		1	163	203	269	447
		0.5	148	207	283	437
		0.1	144	217	275	443
		0	149	211	277	444
Disodium 5'-Inosinate	DW	10	168	193	304	423
		5	163	192	289	449
		1	138	215	305	431
		0.5	181	214	300	404
		0.1	165	206	284	404
		0	168	205	277	414
Disodium 5'-Guanylate	DW	10	166	204	248	391
		5	149	211	274	398
		1	172	205	289	389
		0.5	180	219	278	378
		0.1	176	221	266	381
		0	162	210	288	389
Disodium 5'-Uridylate	DW	10	174	203	280	417
		5	176	202	276	369
		1	177	210	282	432
		0.5	158	232	292	438
		0.1	163	224	303	428
		0	168	205	277	414
Potassium Chloride	DW	10	131	214	205	344
		5	146	213	223	341
		1	153	194	230	364
		0.5	149	199	250	345
		0.1	144	184	237	376
		0	162	211	227	378

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate[a)] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
Potassium Dihydrogen Citrate	DW	10	159	250	268	460
		5	145	220	306	341
		1	140	209	321	414
		0.5	156	209	305	432
		0.1	159	224	299	426
		0	155	228	332	443
Potassium L-Glutamate	DW	10	140	180	235	324
		5	137	184	237	350
		1	127	195	236	344
		0.5	110	202	236	311
		0.1	151	204	254	335
		0	144	194	212	369
Sodium L-Aspartate	DW	10	136	176	358	471
		5	139	188	346	470
		1	134	176	334	463
		0.5	143	188	335	484
		0.1	167	178	329	467
		0	155	228	332	443
Tripotassium Citrate	DW	10	152	217	218	214
		5	131	190	211	212
		1	147	211	236	333
		0.5	158	213	230	315
		0.1	143	187	232	356
		0	144	194	212	369
Trisodium Citrate	DW	10	194	216	238	255
		5	193	215	270	251
		1	186	247	226	377
		0.5	190	212	236	382
		0.1	183	213	256	438
		0	172	223	240	398
Acidulants						
Acetic Acid	DW	10	97	211	116	143
		5	127	210	181	340
		1	139	184	235	372
		0.5	140	192	259	384
		0.1	140	209	251	398
		0	137	184	254	368
Fumaric Acid	DW	1	143	201	287	435
		0.5	152	179	292	436
		0.1	150	222	293	448
		0.05	163	194	277	443
		0.01	145	213	312	434
		0	131	238	305	419

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg／plate	No. of Revertants／plate[a] TA97 −S9	TA97 +S9	TA102 −S9	TA102 +S9
DL-Malic Acid	DW	10	150	136	170	122
		5	156	220	223	289
		1	161	200	278	428
		0.5	179	190	251	451
		0.1	163	228	266	440
		0	172	223	240	398
Antioxidants						
L-Ascorbyl Palmitate	DW	10	153	169	162	317
		5	172	175	174	369
		1	154	176	211	381
		0.5	150	180	229	406
		0.1	154	209	248	394
		0	131	238	305	419
Erythorbic Acid	DW	10	255[b]	259[b]	407[b]	489[b]
		5	226	231	330	438
		1	186	194	257	391
		0.5	162	182	242	351
		0.1	162	214	215	377
		0	150	179	217	401
Solvents						
Acetone	DW	10	162	197	275	427
		5	127	198	258	409
		1	128	194	271	401
		0.5	142	229	246	417
		0.1	156	199	280	409
		0	145	207	263	413
Hexane	DMSO	1	142	215	156	416
		0.5	145	226	186	451
		0.1	134	203	251	387
		0.05	153	201	267	408
		0.01	151	218	264	409
		0	157	224	294	446
Base for processing						
Potassium Hydroxide	DW	1	159	200	232	354
		0.5	122	200	256	390
		0.1	153	201	239	351
		0.05	141	193	248	359
		0.01	148	215	250	350
		0	162	211	227	378
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50 (μg)	902±257[c]			
Mitomycin C	DMSO	0.2 (μg)			1,993±616	
2-Aminoanthracene	DMSO	5 (μg)		1,122±365		779±99

a) Mean of three plates.
b) Statistically significant difference by Kruskal-Wallis test ($p<0.05$) and dose-related increase by regression analysis ($p<0.01$).
c) Mean and standard deviation ($n=17$).

と考えられた.

エリソルビン酸の変異原性については, Ishidate らがTA100およびTA94において陽性[18,21]の報告をしている. 今回TA97およびTA102に対しても弱い変異原性が見いだされ, Ames 試験においては陽性であると考えられるが, 染色体異常試験[21], 小核試験[20]などの試験系においては陰性の結果が報告されている. 試験系による結果の違いが見られたことに対し, その原因を解明する必要があるが, 遺伝毒性の有無を判断するには, 上記試験系以外の試験方法も加えた検討が有効かもしれない.

その他の32種の試料については, 復帰コロニー数に増加が認められなかったことから, TA97およびTA102に対する変異原性は陰性と考えられた. これらの化合物について報告されている変異原性試験結果との比較検討をおこなう.

フルフラールは, TA100において陽性[22,23], 染色体異常試験[24], SCE 試験[25]において陽性であり, 明らかに変異原である. しかし, 今回のTA97およびTA102においては変異原性が検出できず, 大きく異なる結果となった. これはTA100とは反応性が異なるのが原因であろうと考えられる. なお, フルフラールには発ガン性の報告[23]がある.

ベンズアルデヒドは, SCE 試験[26]において陽性であるが, Ames 試験陰性[27,28], 染色体異常試験陰性[28-30]である. 変異原性の結果が一致しないが, 発ガン性の報告[28]があり, 変異原性についての十分な検討が必要であると考えられる.

5'ーイノシン酸二ナトリウム[21], 5'ーグアニル酸二ナトリウム[21], 5'ーウリジル酸二ナトリウム[21], 塩化カリウム[31,32], 酢酸[33], アセトン[21], ヘキサン[21], 水酸化カリウム[34]には染色体異常試験陽性の報告があるが, TA100などでの試験においては陰性[21]であり, 今回TA97, TA102においても陰性となった. この様な Ames 試験陰性, 染色体異常試験陽性と結果が一致しない化合物の例は比較的多く, これまで検索してきた食品添加物にもいくつも見られた.

ヘキサン酸アリル, ベンジルアルコール, *d*ーボルネオール, *l*ーメントール, リナロオールについては Rec-assay 陽性[35,36]の報告があるが, TA100などを用いた試験では陰性[21,35,36]であり, 染色体異常試験においても陰性[21]である. 今回の TA97, TA102においても陰性であり, 陽性の報告は Rec-assay だけである.

酪酸ブチル, 酪酸, 酪酸シクロヘキシル, 酪酸エチル, ヘキサン酸エチル, 酪酸イソアミル, Nーメチルアントラニル酸メチル, DLーアラニン, フマル酸, DLーリンゴ酸については, TA100などを用いた試験では陰性[21], 染色体異常試験においても陰性[21]で, 今回の TA97, TA102における結果とも一致し, おそらく変異原性はないものと思われる.

メチルβーナフチルケトン, クエン酸一カリウム, Lーグルタミン酸カリウム, Lーアスパラギン酸ナトリウム, クエン酸三カリウム, クエン酸三ナトリウム, Lーアスコルビン酸パルミチン酸エステルについては, 本実験では陰性の結果であったが, 変異原性に関する報告は十分ではない.

食品添加物の TA97およびTA102を用いた変異原性試験は, 前報[7-13]までに177種類が終了しており, 今回の34種を加えると211種類となる. これまでの結果を総合すると, TA97, TA102の両株かどちらか一方において変異原性が見いだされた化合物は, 亜硝酸ナトリウム[13], アスコルビン酸[7], Lーアスコルビン酸ナトリウム[12], エリソルビン酸ナトリウム[11], 塩酸ピリドキシン[8], オルトフェニルフェノール[7], 過酸化水素[13], Lーシステイン一塩酸塩[11], 臭素酸カリウム[9], チアベンダゾール[7], ニコチン酸アミド[8], ピペロナール[13], 没食子酸プロピル[10]およびリボフラビン[8]で, 今回のマルトールおよびエリソルビン酸を加えて16種類であった. 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または TA102において変異原性が検出されたが, 陽性対照に用いている変異原性物質に比べるといずれもかなり弱いものであった.

要　旨

34種の食品添加物について Ames の試験株 TA97, TA102を用いた変異原性試験を行った. その結果, マルトールおよびエリソルビン酸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32種の食品添加物には変異原性は見られなかった.

文　献

1) McCann, J., Spingarn, N.E. 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, 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) 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子：東京衛研年報, **42**, 267-275, 1991.
14) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
15) 石居 進：生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風館.
16) Moore, D. and Felton, J.S.：*Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
17) Bjeldanes, L.F. and Chew, H.：*Mutation Res.*, **67**, 367-371, 1979.
18) 石館 基：微生物を用いる変異原性試験データ集 1991, エル・アイ・シー.
19) Jansson, T., Curvall, M. and Enzell, C.R.：*Mutation Res.*, **169**, 129-139, 1986.
20) Hayashi, M., Kishi, M. and Ishidate, M. Jr：*Fd Chem. Toxic.*, **26**, 487-500, 1988.
21) Ishidate, M. Jr, Sofuni, T. and Yoshikawa, K.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
22) Zdzienicka, M., Tudek, B. and Szymczyk, T.：*Mutation Res.*, **58**, 205-209, 1978.
23) Irwin, R.：NTP Technical Report, TR 382, 1990.
24) Nishi, Y., Miyakawa, Y. and Kato, K.：*Mutation Res.*, **227**, 117-123, 1989.
25) Gomez-Arroyo, S. and Souza, V.S.：*Mutation Res.*, **156**, 233-238, 1985.
26) Jansson, T., Curvall, M. and Enzell, C.R.：*Mutation Res.*, **206**, 17-24, 1988.
27) 能美健彦, 宮田ルミ子, 石館 基：衛生試験所報告, **103**, 60-64, 1985.
28) Bishop, J.：NTP Technical Report, TR 378, 1990.
29) 祖父尼俊雄, 林 真, 石館 基：衛生試験所報告, **103**, 64-75, 1985.
30) Kasamaki, A., Takahashi, H. and Tsumura, N.：*Mutation Res.*, **105**, 387-392, 1982.
31) Hasegawa, M.M., Nishi, Y. and Inui, N.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 501-507, 1984.
32) Galloway, S.M., Deasy, D.A. and Bradley, M.O.：*Mutation Res.*, **189**, 15-25, 1987.
33) Morita, T., Takeda, K. and Okumura, K.：*Mutation Res.*, **240**, 195-202, 1990.
34) Morita, T., Watanabe, Y. and Okumura, K.：*Mutation Res.*, **225**, 55-60, 1989.
35) 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.
36) 兪 榮植：阪市医誌, **34**, 267-288, 1986.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 228-230, 1992

六味丸水抽出物の*Salmonella typhimurium*に対する変異原性について

藤田　博*，角　千代*，佐々木　美枝子*

Mutagenicity of Water Extract of Rokumigan with *Salmonella typhimurium*

HIROSHI FUJITA*, CHIYO SUMI* and MIEKO SASAKI*

Keywords：変異原性 mutagenicity，漢方薬 chinese medicine，六味丸 rokumigan，サルモネラ *Salmonella typhimurium*

近年，漢方薬の効用がみなおされ，多くの病院で患者に用いられるようになってきている．都立病院に対しても東洋医学診療の要望は高い．この様な傾向に対し，東京都では東洋医学事業として漢方薬の効用と安全性について検討を行っている．検討対象としては，老人性疾患に多用される漢方製剤の六味丸が中心にとりあげられた．

一般的に化学物質の安全性を評価する場合に，様々な毒性試験が行われるが，そのなかで遺伝毒性を明らかにするために変異原性試験が行われている．

漢方薬の変異原性については，Morimotoらが多くの生薬についての試験を実施し，45種の生薬抽出物に変異原性を見いだしている[1]．反対にいくつかの生薬抽出物には，発ガン物質の変異原性を抑制する作用があることも見いだされている[2,3]．

今回われわれは，Amesら[4-6]が開発した，いわゆるAmes試験を用い，漢方製剤の六味丸の水抽出物について変異原性の検討を行った．試験菌株としてはAmesら[6]が提案しているように，*Salmonella typhimurium* TA97，TA98，TA100およびTA102の4株を用いた．

実験材料および方法

試料　六味丸構成生薬は，地黄，山薬，沢瀉，茯苓，牡丹皮が中国産，山茱萸は韓国産を㈱ウチダ和漢薬から購入した．これらの原料生薬の品質および有害物質などの混入については，安田ら[7]ならびに藤井ら[8,9]によってすでに検討報告されている．六味丸水抽出物は，㈱ウチダ和漢薬において作製した．原料の地黄，山薬，山茱萸，沢瀉，茯苓，牡丹皮を細切し(山茱萸は全形のまま)，それぞれを六味丸処方の8：4：4：3：3：3に混合した．水を加え100℃まで加熱し，1時間抽出した．抽出液をろ過し，ろ液を60℃で減圧濃縮した後，凍結乾燥した．原料からの抽出率は36.0%(w/w)であった．

六味丸水抽出物は，蒸留水に溶解後，オートクレーブで120℃，10分の滅菌を行った後，試験に用いた．

酸化物の分解，消去には，カタラーゼ(シグマ製)，グルタチオン(和光純薬製)および亜硫酸水素ナトリウム(和光純薬製)をろ過滅菌後用いた．

陽性対照物質は，9－アミノアクリジン(和光純薬製)，2－ニトロフルオレン(アルドリッチ製)，2－アミノアントラセン(和光純薬製)を用いた．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA97[10]，TA98[4]，TA100[4]およびTA102[11,12]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年に分与を受けたものである．

変異原性試験　Ames法の変法であるプレインキュベーション法[6,13]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雄性SD系ラット(Jcl:SD　日本クレア)の肝臓ホモジネートから調整したS9[6]を用いた．S9 mix[6,13]中のS9量は，10%（50 μl／プレート）とした．

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ，代謝活性化する場合にはS9 mix 0.5 ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(pH 7.4)0.5 mlを加え，さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え，37℃で20分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[6] 2 mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[6]に重層した．37℃で2日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した．

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

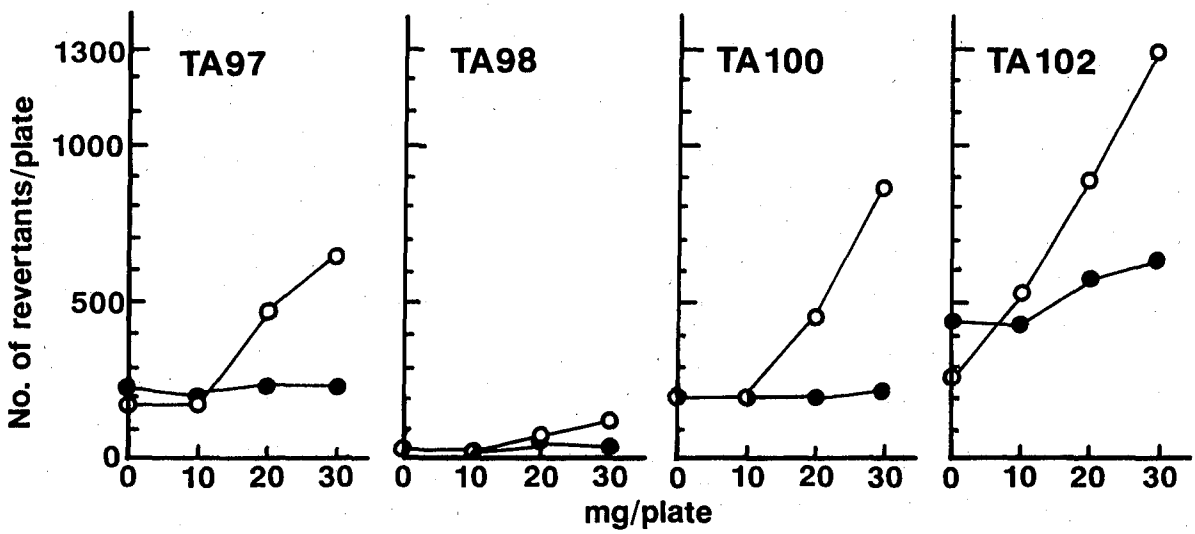


図1．六味丸水抽出物の Ames 試験における変異原性．○：S 9 mix 無添加，●：S 9 mix 添加．

各濃度にプレート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

変異原性試験の結果を図1に示した．4菌株のS 9 mix 無添加において復帰コロニーが増加した．その増加は，30mg/プレートにおいてコントロールの復帰コロニー数の3.6−4.7倍であり，変異原性は陽性である．ただし，用いた陽性対照物質(例えば2−ニトロフルオレン5 μg/プレート，TA100，794個復帰コロニー)に比べると高濃度であることから，その変異原性は弱いものである．各菌株に対する変異原性を比較してみると，TA97，TA98およびTA100は，20mg/プレート以上から増加が見られたが，TA102では10mg/プレートから増加が見られ，TA102に対する変異原性が強い．一方，S 9 mix を添加することにより，TA97，TA98およびTA100では，変異原性は消失したが，TA102ではわずかに変異原性が見られ，六味丸水抽出物の変異原性は，TA102においてよく検出されるようである．

なお，Ames 試験においては，ヒスチジンが多量に混入している場合，結果に影響し，陽性となる可能性がある．しかし，今回の試料抽出物のヒスチジン含量は，1 μg/10mg抽出物であった．この程度のヒスチジン量では復帰コロニー数の増加はわずかであり，ヒスチジンによる見せかけの変異原性ではないと考えられる．これは，

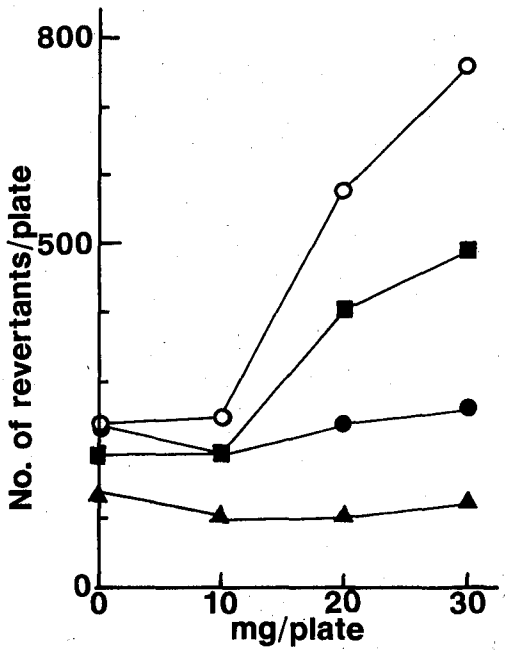


図2．六味丸水抽出物のTA100に対する変異原性の不活性化．
○：六味丸水抽出物，●：抽出物＋カタラーゼ(100 unit/plate)，■：抽出物＋グルタチオン(5 mg/plate)，▲：抽出物＋亜硫酸水素ナトリウム(5 mg/plate)．

S 9 mix 添加によって変異原性が失われることからも明らかである.

TA102において変異原性が良く検出されることから, TA102の検出特性を考慮すると, 酸化反応が関与している可能性が考えられた. そこで, 過酸化水素を分解するカタラーゼおよび活性酸素の消去にグルタチオン, 亜硫酸水素ナトリウムなどの還元剤を試験系に加えてみた. 図2にはTA100を用いた場合の結果を示した. グルタチオンの効果は弱いが, 何れの場合にも, 六味丸水抽出物の変異原性は, 減少した. これは, 六味丸水抽出物の変異原性には活性酸素等が関与している可能性を示している.

六味丸散剤としての変異原性についての報告は見いだせなかったが, その構成生薬の変異原性については, Morimoto ら[1]が山薬の水抽出物で TA100に対する変異原性が陽性であること, 山茱萸, 沢瀉, 茯苓, 牡丹皮水抽出物については陰性であることを報告している. また Sakai ら[2]が地黄水抽出物は Ames 試験において陰性であること, さらに, Xue-jun ら[16]は地黄, 牡丹皮, 茯苓水抽出物について Ames 試験で陰性であることを報告している. これらの報告から, 今回六味丸水抽出物に見られた変異原性は, 山薬に由来するのだろうと推定される. しかし, Morimoto ら[1]の報告では, TA98では山薬の変異原性が検出できないことから, 今回の六味丸水抽出物で見られた4菌株に対する変異原性は, 山薬単独の結果とは少し異なっている. 原料生薬, 抽出方法の違いに原因があるのかもしれないが, 六味丸が6生薬の混合物であり, 山薬単独以上に様々な物質の混合物であることから, 六味丸水抽出物では, 幾つもの化合物による相互効果により変異原性が生じている可能性も考えられる.

六味丸水抽出物の変異原性は, S 9 mix, カタラーゼを添加することにより, ほとんど失われることから, 生体中では, その変異原性を示さないのではないかと考えられるが, Xue-jun ら[16]は, マウスを用いた染色体異常試験, 小核試験において, 地黄, 牡丹皮で陽性の結果を報告している. これらの生薬については詳細な検討が必要かもしれない.

今後, 六味丸水抽出物の変異原性について, 酸化反応が関与している可能性が示唆されたことから, その本体の解明をふくめ, 相互効果が存在する可能性などについても検討する予定である.

要　旨

六味丸水抽出物についてサルモネラを用いた変異原性試験を行った. 試験には Ames らが開発した TA97, TA98, TA100および TA102の4試験菌株を用いた. その結果, 4試験菌株において, S 9 mix の無添加において変異原性が見られた. この変異原性は, S 9 mix, カタラーゼ, グルタチオン, 亜硫酸水素ナトリウムの添加によって減少した. これらのことから, 六味丸の変異原性には酸化反応が関与している可能性が示唆された.

文　献

1) Morimoto, I., Watanabe, F. and Okitu, T.: *Mutation Res.*, **97**, 81-102, 1982.
2) Sakai, Y., Nagase, H. and Yamada, F.: *Mutation Res.*, **174**, 1-4, 1986.
3) 渡辺富士雄, 森本　功, 興津知明: 生薬学雑誌, **41**, 248-252, 1987.
4) McCann, J., Spingarn, N.E. and Ames, B.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
5) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347-364, 1975.
6) Maron, D.M. and Ames, B.N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
7) 安田一郎, 浜野朋子, 高野伊知郎: 東京衛研年報, **42**, 27-32, 1991.
8) 藤井　孝, 佐々木美枝子, 角　千代: 東京都衛生局学会誌, **86**, 64-65, 1991.
9) 藤井　孝, 角　千代, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **42**, 235-242, 1991.
10) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
11) Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
12) Levin, D.E., Marnett, L. J. and Ames, B.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
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) Xue-jun, Y., De-xiang, L. and Hechuan, W.: *Mutation Res.*, **260**, 73-82, 1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 231-234, 1992

放射線感受性マウス細胞におけるDNA単鎖切断と修復に関するアルカリ溶出法による研究

金西信次*, 金城康人**, 渡部　真**
稲葉浩子***, 佐藤弘毅***

DNA Single-Strand Breaks and Repair in a Radiation-Sensitive Mutant of Mouse Cells as Revealed by Alkaline Elution

NOBUJI KANANISHI*, YASUHITO KINJO**, MAKOTO WATANABE**,
HIROKO HAMA-INABA*** and KOKI SATO***

The repair processes of x-ray induced DNA single-strand breaks were compared between mouse lymphoid cell line L5178Y and it x-ray sensitive mutant line LX830, applying an alkaline elution technique. The number of breaks was slightly greater in the parent line than in the mutant line. The single-strand breakes of L5178Y were rapidly rejoined in a biphasic manner, fast and slow, during post-irrandiation incubation. $T_{1/2}$, the time to repair half of the initial DNA scission, of L5178Y was 4 min. On the other hand, the rejoining of breakes in LX830 was delayed ($T_{1/2}$=15 min) owing to deficiency in the fast repair process.

Keywords：単鎖切断 single-strand break, 放射線感受性 radiation-sensitive mutant, DNA修復 DNA repair, マウス細胞 mouse cell, アルカリ溶出法 alkaline elution

緒　言

哺乳動物細胞における放射線損傷とその修復機構を解明するために，放射線損傷の修復能力を欠損する突然変異株が分離され，使用されている．我々はマウス白血病リンパ細胞L5178Yよりいくつかの放射線高感受性株を分離し，アルカリ蔗糖密度勾配沈降法で突然変異株におけるX線誘発単鎖切断について研究してきた[1]．この突然変異株の一つであるLX830細胞は，親株のL5178Y細胞と同様に効率よく単鎖切断を修復する事が分かった．しかしながらアルカリ蔗糖密度勾配沈降法は切断の検出に対して感度が低く，生存曲線を描くのに使われた線量と大きく異なって，非常に高い線量の放射線を必要とした．一方，アルカリ溶出法は，低線量の放射線で誘起した損傷を検出するのに十分な感度があるので，放射線感受性とDNA単鎖切断の修復との関連について，アルカリ溶出法を用いて再評価した．

方　法

細胞および培養：マウス白血病リンパ細胞L5178Yと放射線感受性突然変異株LX830，これらの細胞は10%馬血清添加Fischer培地で増殖させた．生存率に対して，200 μg/mlピルビン酸ナトリウム，0.3%寒天，15%馬血清添加Fischer培地にプレートした[3]．

照射：増殖期の細胞を遠心分離によって集め，Fischer培地に再懸濁し，その1ml（1×10^6細胞）をシャーレに入れ，0℃で軟X線(Softex, 50 kvp, 3 mA)を照射した．

アルカリ溶出法：アルカリ溶出法は基本的にはKohn等[2]とParodi等[4]の方法に拠ったが，前に報告したように一部変更した[5,8]．照射した細胞は種々な時間，37℃で培養した．

結　果

図1に示すように，突然変異株のLX830細胞は親株

*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 Pubulic Health
24-1, Hyankunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan
**東京都立アイソトープ総合研究所
***放射線医学総合研究所，遺伝研究部

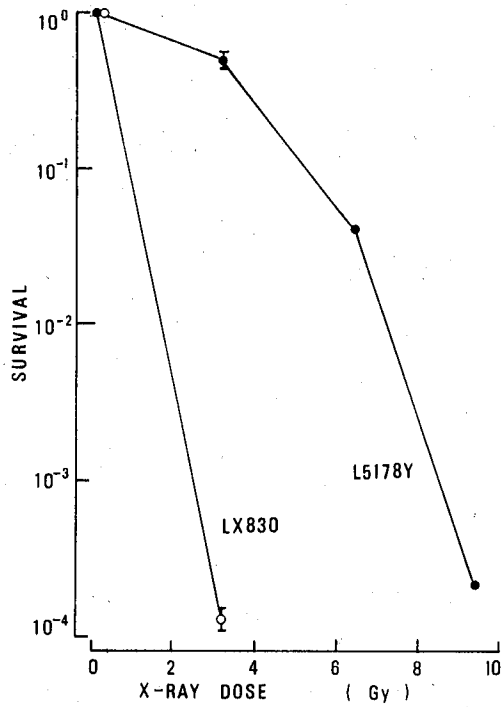


Fig. 1. Survival curves after x-ray exposure in radiation-sensitive mutant LX830 and wild type L5178Y.

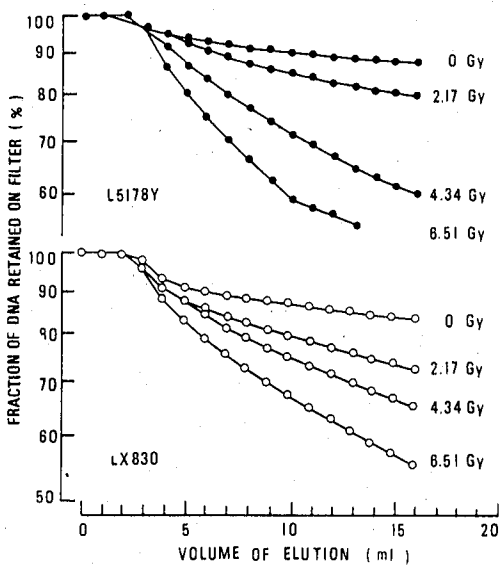


Fig. 2. Alkaline elutton curves after x -ray exposure in L5178Y and LX830.

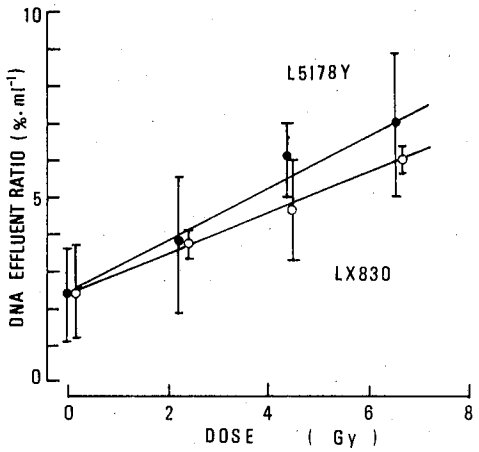


Fig. 3. Dose-responce curves of DNA effluent ratio (logarithmic value) in L5178Y and LX830. The DNA effluent ratio is the slope of each elution curve in Fig. 2. Each point represents the mean value with strand deviation given by 3 to 9 experiments.

(野生型)のL5178Y細胞に較べ，X線の細胞致死効果において高感受性であった．37%生存線量はそれぞれLX 830に対して0.35 Gy，L 5178 Yに対して3.53 Gyであった．

図2に0 Gy，2.18 Gy，4.34 Gy，6.51 GyのX線照射後の各細胞系列のアルカリ溶出曲線を示した．二つの細胞系列で照射線量の増加とともに溶出曲線の勾配の増加が観察された．

これらの結果を照射線量に対する溶出曲線の勾配，即ち1 ml当たりの溶出DNA量の対数値でプロットした(図3)．この線量効果曲線はLX 830とL 5178 Yの双方共に直線であり，照射によって誘起された溶出率，すなわちDNA単鎖切断が突然変異株よりも野生型株で明らかに高かった．各点は3～9回の実験の平均と標準偏差値であり，2組の回帰直線の勾配の差の検定では，勾配に対して$p<0.1$，4.34 Gyおよび6.51 GyのX線照射における溶出率の差の検定では，$p<0.05$でそれぞれ有意であった．

図4に示すように，X線で誘発されたDNA単鎖切断の再結合が観察された．4.34 GyのX線を照射した細胞は37℃で5，10，20，30分間培養した．その後アルカリ溶出を行ったところ，切断された単鎖のDNA量は培養時間とともに減少した．

このDNA溶出率と培養時間の関係について図4 Aにプロットした．この図から野生株L 5178 Y細胞の再結

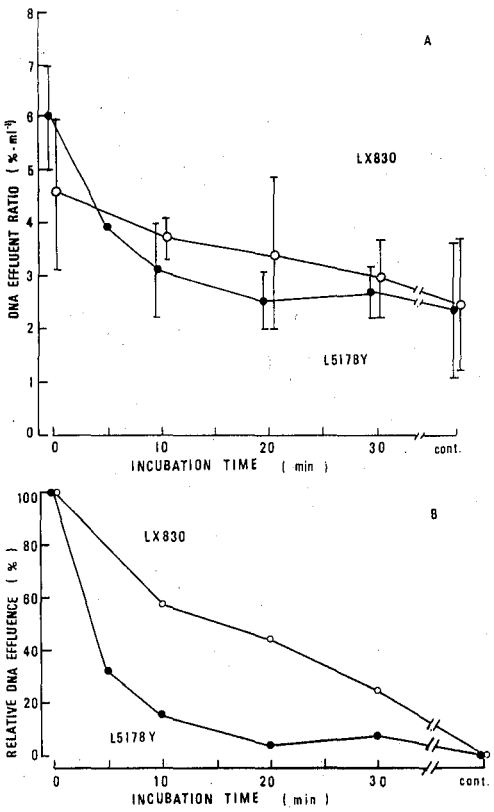


Fig. 4. Repair profiles of DNA lesion induced by 4.34 Gy of x-rays. In fig. 4 A, the DNA effluent ratio after postirradiation incubation is plotted against incubation time. In fig. 4 B, the DNA effluent of incubation time O min and control in fig. 4 A are replotted each as 100 and 0%.

合修復の過程は二相性であることが分かる．すなわち再結合修復には，最初に早い時期に作用する修復相とそれに続く，より長い時間を要する遅い修復相の二相がある．それに対して突然変異株 LX 830細胞は早い修復相を欠如しているが，最終的に DNA 単鎖切断量は L 5178 Y 細胞のそれと同じレベルに修復された．

しかし，図 3 および図 4 A に示したように，L 5178 Y 細胞と LX 830細胞とで，照射線量が同じでも，再結合が行われない最初の DNA 単鎖切断量は異なっている．修復の程度をこの 2 種の細胞間で比較するために，図 4 A に示した 0 時間の溶出分を100%とし，また非照射のコントロールを 0 %として，溶出曲線をプロットし直したものが図 4 B である．この図から明らかな通り，L 5178Y 細胞は早い修復があり，最初の DNA 切断の半分を修復するのに要する時間は約 4 分($T_{1/2}$ = 4 min)であった．対照的に LX 830細胞は早い修復相を欠如しており，$T_{1/2}$ は15分であった．30分培養後における切断の残存率は L 5178 Y 細胞で 5 %程度，LX 830細胞では25%であった．

考　察

この報告で我々は野生株 L 5178 Y 細胞と放射線感受性突然変異株 LX 830細胞における DNA 単鎖切断を調べ，L 5178 Y 細胞では LX 830細胞より明らかに大きな DNA 単鎖切断が誘発される事を明らかにした(図 3)．この DNA 単鎖切断が L 5178 Y 細胞において LX 830細胞より多い理由は明かでないが，放射線で損傷された塩基の除去修復が L 5178 Y 細胞で行われ，この除去修復に伴い，DNA 単鎖切断が生じる可能性がある．それに対して LX 830細胞では，この除去修復の働きが少ないか，その修復機構が欠失しているためと考えられる．

X 線によって誘発された DNA 単鎖切断は，その後の細胞の培養によって再結合され，アルカリ溶出は小さくなる．この切断の再結合は L 5178 Y 細胞の場合，短時間で働く修復過程とゆっくり働く修復過程の二つの機構を持っている(図 4 A，B)．一方突然変異細胞 LX 830では早い再結合の修復機構は欠除しており，遅い修復機構のみを持っている．

アルカリ溶出法によって 2 ～6.5 Gy X 線照射で誘発された切断を検出したが，アルカリ蔗糖密度勾配沈降法によって切断を検出するためには160 Gy もの高い線量が必要であった．この様な高線量照射の場合に，野生株と突然変異株とでほぼ等しい効率で単鎖切断の修復が行われることが調べられている．しかし生存曲線を求める場合は，この様な高線量ではなく，2 ～6.5 Gy 程度の線量が使用されている．アルカリ溶出法で得られた結果は，生存曲線で使用された線量と同じオーダーの線量を用いていることに，生物学的に一層大きな意義がある．

突然変異細胞 LX 830と同様に放射線感受性の例として，Ataxia terangiectasia(AT，毛細血管拡張運動失調症)の患者から分離された細胞がある．この AT 細胞の DNA 単鎖切断とその修復がアルカリ溶出法によって調べられているが，LX 830細胞の結果とは異なり，誘発された切断量と修復の割合は AT 細胞と正常ヒト細胞とで違いはないと報告されている[6]．AT 細胞と LX 830細胞とでは，欠損している修復機構が異なっているものと考えられる．

X 線による DNA 損傷をアルカリ分離法を使って調べた例では，三つの修復の過程がある事が示唆されている[7]．修復可能な早い修復(fast-repairable)と，遅い修

復(slow-repairable). そして修復不可能(nonrepairable)の過程である. 修復不可能な損傷は細胞致死に関連する事が示されている. この結果は我々の今回の結果と一致しており, 野生型細胞L 5178 Yには早い修復と遅い修復の二相の修復パターンがある. そして30分培養後でも非照射コントロールより切断のレベルは高く, 5%程度の切断が残存している. それは修復不能のフラクションに相当するものと思われる. 放射線感受性突然変異株LX 830では早い修復機構は欠除しているが, 遅い修復機構はまだ存在している. またLX 830細胞の30分培養後における切断は25%が残っており, 修復速度は遅い. このようにLX 830細胞は早い修復機構を欠除し, 修復速度が遅いことが放射線に高感受性である原因の一部をなしていると考えられる.

文　献

1) Sato, K., Hama-Inada, H., *Mutat. Res.*, 140, 159-163, 1984.
2) Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, A. G., Friedman, C. A., *Biochemistry*, 15, 4629-4637, 1976.
4) Parodi, S., Taninger, M., Santi, L., et al, *Mutat. Res.*,54, 39-46, 1978.
5) 金西信次, 金城康人, 渡部　真, その他, 東京都立衛生研究所年報, 34, 399-405, 1983.
6) Fornace, A. J., Little, J. B., *Biochim, Biophys. Acta*, 607, 432-437, 1980.
7) Sakai, K., Okada, S., *Radiat. Res.*, 98, 479-490, 1984.
8) 金西信次, 金城康人, 渡部　真, 東京都立衛生研究所年報, 40, 319-323, 1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 235-238, 1992

ブラジル産ガラナの Na, K-ATPase 活性におよぼす影響*

佐藤 かな子**, 中村ジュリア小夜子*,**, 長井 二三子**
牛山 慶子**

The Effect of Guarana of Brazirian Growth on Na, K-ATPase Activity*

KANAKO SATOH**, JULIA SAYOKO NAKAMURA*,**,
FUMIKO NAGAI** and KEIKO USHIYAMA**

Keywords: Na, K-ATP アーゼ Na, K-ATPase, ガラナ Guarana, ガラナ子 Guarana Semen

緒　言

ガラナ(Guarana), 学名パウリニア・クパナ(*Paullinia Cupana*)は, 南米ブラジルのアマゾン流域を原産地とするムクロジ科(Sapindaceae)のつる性の低木樹である. 果実はぶどう大で10月から11月に熟し, 1本の木から約15kg前後収穫される. その中に含まれる径約1cm, 褐色球形のとちの実様の種子がガラナ子(Guarana Semen)と呼ばれる. ガラナは昔からインディオの間では, 不老長寿の名薬といわれており, 現在でもブラジルでは偏頭痛, 胃や腸, その他の消化器管及び心臓疾患, 並びに神経衰弱症の治療薬として利用されている[1]. ガラナ子の水性エキス(ガラナ茶)はし好飲料としても用いられている. 日本でも昭和35年頃よりガラナは炭酸飲料などに配合され, ガラナ飲料として発売されている. ガラナはコーヒーの約3倍のカフェイン(3～4%)を含む[2]ため, 興奮性飲料としての用途が広い. 他の含有成分としては, カテキン, カテコール, テオブロミン, テオフィリン, タンニン, サポニン, 油脂, 糖質などがある[2].

Na, K-ATPase は動物細胞膜に存在し, 細胞内外のナトリウムイオンとカリウムイオンの能動輸送を行う酵素である. この酵素活性に対する薬物・毒物の作用は, 細胞膜毒性の指標として用いられている. 今回, 粉砕したガラナ子およびガラナ末の50%エタノール抽出液を調製し, それらの Na, K-ATPase 活性に及ぼす影響を調べた. また, Na, K-ATPase 活性の特異的な阻害剤であるウアバインの作用と比較検討した.

実験方法

試料および試薬　ガラナ子(G-Ⅰ)およびガラナ末製品(G-Ⅱ)は, ブラジルサンパウロ市の薬店で購入した. ヨウ化ナトリウム処理イヌ腎臓 Na, K-ATPase, ウアバインはシグマ社, ATP はオリエンタル酵母, その他の試薬はいづれも和光純薬社製を用いた.

エキスの調製法　G-Ⅰは粉砕して粉末にした. 粉末にしたG-ⅠおよびG-Ⅱを3倍量の50%エタノール[2]で3回振とうし, 抽出液を凍結乾燥したものをエキスとした. 種々の量のエキスを DMSO に溶かして, Na, K-ATPase 活性の測定に用いた.

Na, K-ATPase 活性測定方法　実験に供したヨウ化ナトリウム処理イヌ腎臓 Na, K-ATPase のウアバイン感受性活性は95%であった. Na, K-ATPase 2.5 μg, 3 mM ATP, 140mM NaCl, 14mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 0.5mM EDTA, 1 mM EGTA (ethyleneglycol bis (2 -amino-ethylether)-N, N, N′, N′- tetraacetic acid), 50mM イミダゾール塩酸緩衝液(pH7.2)中に, ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したガラナエキス10 μl を加え, 全液量500 μl として反応を開始した. 37°C で15分間反応後, 遊離してきた無機リン酸を測定した[3,4].

重金属の測定方法　エキス4.5mg に2 ml の硝酸を加え, 常法[5]により Ca^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+} および Hg^{2+} を測定した.

---

*本研究は, 平成3年度東京都海外技術研修員中村ジュリア小夜子が東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科において行ったものである

**東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
**The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome,Shinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan

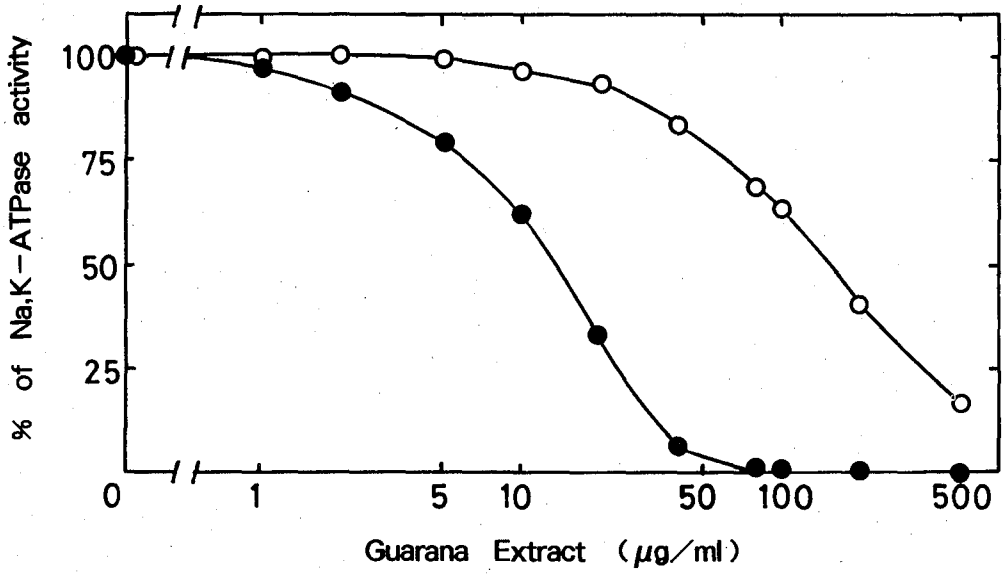


図1．ガラナエキスのNa, K-ATPase活性に対する影響
種々の濃度のガラナエキス溶液を加え，実験の部で述べた方法でNa, K-ATPase活性を測定した．エキスを加えない時の酵素活性値（6.2μmol Pi/mg蛋白/分）を100%とした．●;ガラナ（G-Ⅰ）○;ガラナ（G-Ⅱ）

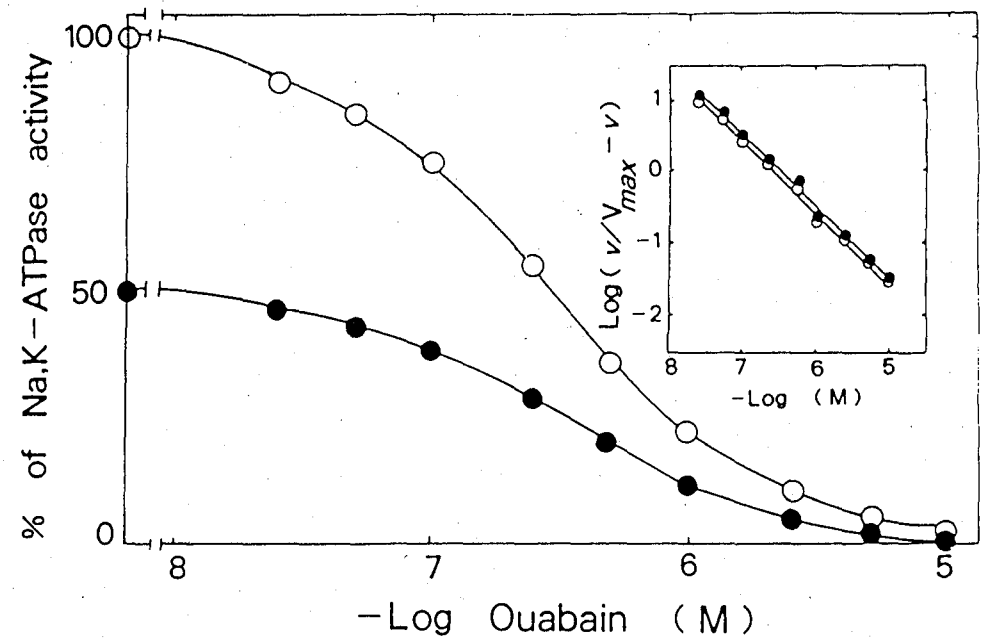


図2．ウアバインのNa, K-ATPase活性阻害におよぼすガラナ（G-Ⅰ）エキスの影響
G-Ⅰエキス13.3μg/ml存在下（●）又は非存在下（○）で，種々の濃度のウアバインを加え，実験の部で述べた方法でNa, K-ATPase活性を測定した．エキス，ウアバイン共に存在しない時の酵素活性値（5.8μmol Pi/mg蛋白/分）を100%とした．Hillプロットに変換した図を挿入した（Vmax，最大活性値：v，活性値）．

結　果

ガラナエキスのNa, K-ATPase活性に対する影響

ガラナG-ⅠおよびG-Ⅱエキスの Na, K-ATPase 活性に対する影響を，エキス存在下で Na, K-ATPase 活性を測定することにより調べた．ガラナエキスを含まない DMSO 10 μl を加えて反応した時の酵素活性値を100%とし，エキス量を変えた時の酵素活性の変化を図1に示す．G-Ⅰエキスは1 μg/ml から酵素活性を阻害し始め，80 μg/ml で完全に阻害した．G-Ⅱエキスは5 μg/ml から阻害し始め，加えた最大エキス量500 μg/ml では，85%の阻害率であった．図1から求めた50%活性を阻害するエキス量（I_{50}値）は，G-Ⅰが13.3 μg/ml，G-Ⅱが150 μg/ml であり，G-Ⅰの方が約11倍低い値であった．

ウアバインのNa, K-ATPase活性阻害作用におよぼすガラナ（G-Ⅰ）エキスの影響　Na, K-ATPase 活性を50%阻害するG-Ⅰエキス13.3 μg/ml 存在下で，ウアバインによる活性阻害作用を調べた(図2)．ウアバインは，その濃度の上昇に従ってG-Ⅰエキスの有無にかかわらず酵素活性を阻害した．図2に挿入したHillプロットより求めたウアバインの50%活性阻害値(Ki)および結合定数は，エキスの有無にかかわらず同じ値を示し，それぞれ2.8×10^{-7}Mと1.1であった．

ガラナエキス中の重金属　重金属イオンは，微量で Na, K-ATPase 活性に影響を与えるため，ガラナG-ⅠおよびG-Ⅱのエキス4.5mg中に含有する重金属イオンの量を測定した．両エキス共，Ca^{2+}，Cd^{2+}，Cu^{2+}，Pb^{2+}は1.0 μg未満で，Hg^{2+}は0.1 μg未満であった．

考　察

薬用または飲料用等に用いられているガラナの50%エタノールエキス[2]を調製し，イヌ腎臓 Na, K-ATPase 活性に対する作用を検討した．ガラナ種子を購入し，粉砕，調製したG-Ⅰエキスに非常に強い Na, K-ATPase 活性阻害作用があり，G-Ⅰエキスに酵素活性を強く阻害する物質が含まれていることが示唆された．粉末状で購入したガラナ末より調製したG-Ⅱエキスの活性阻害作用は弱かったが，この理由としては，購入したガラナ末(G-Ⅱ)には，ガラナ以外の物が混入していることが考えられる．

強い阻害作用を示したG-Ⅰエキスの Na, K-ATPase 活性阻害機構についてウアバインの作用と比較検討した．キョウチクトウ科の植物，ストロファンツスに含まれる強心配糖体のウアバイン[6]は細胞膜の外側から作用して，Na, K-ATPase 活性を特異的に阻害する物質であり，本酵素の反応機構研究のためによく使われている．G-Ⅰはウアバインの Na, K-ATPase に対する Ki 値および結合定数を変えないことから，ガラナに含まれる阻害物質の酵素への結合部位および，阻害機構はウアバインとは異なることが示唆された．

次にガラナエキスの含有成分として知られているカフェイン，カテコール，カテキン，テオフィリン，テオブロミンについて Na, K-ATPase 活性に対する影響を検討したが，阻害作用は認められなかった(結果，省略)．微量で Na, K-ATPase 活性に影響を与える金属イオン(Ca, Cd, Cu, Pb, Hg)[7-10]は，ほとんど含んでおらず，活性阻害の原因とは考えられなかった．今後，ガラナの成分分析を進め，Na, K-ATPase 活性阻害物質を突き止め，阻害機構を解明する必要があると考える．また細胞膜に対するガラナの作用を解明するためには，その他の細胞膜酵素への作用についても検討しなければならない．

南米において，古くから，胃腸等消化器の疾患，心臓疾患の治療薬，強壮剤または興奮性飲料等として用いられているガラナが，細胞内外のナトリウムイオンとカリウムイオンの能動輸送を担う Na, K-ATPase 活性を強く阻害することを見出した．このことは，ガラナの作用機構を科学的に解明するための手がかりの一つになると考えられる．

要　約

1)ガラナ子を粉砕し，50%エタノールで抽出しエキスを調製した．そのエキスによる腎臓の Na, K-ATPase 活性におよぼす影響を検討し，酵素活性を強く阻害することを見い出した．

2)ガラナエキス中に含まれる Na, K-ATPase 活性阻害物質の酵素への結合部位および阻害機構は，本酵素の特異的な阻害剤であるウアバインのそれとは異なることを示唆した．

文　献

1) 堤野高史：*New Food Industry*, **25**, 20-23, 1983.
2) 佐藤宗衛，松崎隆一，尾本薫，他：*関税中央分析所報*, **26**, 69-75, 1986.
3) Satoh, K., Nakao, T., Nagai, F., et al.：*Biochim Biophys. Acta*, **994**, 104-113, 1989.
4) 佐藤かな子，安田一郎，長井二三子，他：*薬誌*, **111**, 138-145, 1991.
5) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，35-408, 1980, 金原出版，東京.
6) Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C.：*Pharmacol. Rev.*, **27**, 3-134, 1975.
7) 中尾順子：*医学のあゆみ*, **97**, 76-80, 1977.

8) Vasallo, P. M. and Post, R. ,L. : *J. Biol. Chem.*, **261**, 16957-16962, 1986.

9) Anner, B. M., Moosmayer, E. and Imesch, E. : *Biochem. Biophys. Res. Commum*, **167**, 1115-1121, 1990.

10) Maier, W. E. and Costa, L. G. : *Toxicol. Lett.*, **51**, 175-188, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 239-244, 1992

ファーマコキネティクスのモデリングと解析法(第1報)
微分方程式の数値解法と最小2乗法における最適化法の改良

深野駿一*

Analytical Methods of Pharmacokinetics and its Modelings(I) Modifications of Numerical Solutions of Differential Equations and Least Squares Solutions

SHUNICHI FUKANO*

Keywords：薬物速度論 pharmacokinetics，最小2乗法 least squares method，微分方程式の数値解法 numerical solution of differential equations

緒　言

毒物，薬物等の薬理あるいは毒性を知る上で，その物質の体内動態(吸収，分布，代謝，排泄)に関する知識は不可欠である．これを知るために動物実験を行い，各臓器中の濃度変化を求め，生物学的半減期などの体内動態についての知識を得ている．実験についてはGLP基準を設け統一的に行われつつあるが，結果を人に外挿する時点で，無影響濃度に漠然と安全率(×100)を乗じ許容摂取量を決めるなど，実験での厳密さが意味の少ないものになっている．人への外挿における用量ー反応評価をもっと厳密行う必要があり，これまでも各種の外挿式が提案されている．しかし現在最も信頼出来るものはファーマコキネティクスに基づくシミュレーションモデルによる解析と思われる．シミュレーションによれば体重，臓器重量，血流量の差異や，酵素欠損などの種差の補正が容易に出来，より正確な評価が可能になる．

シミュレーションを行うには，その物質についての各臓器中の真の半減期を求める必要がある．半減期を求めるには見かけの半減期を設定し連立常微分方程式を解き，実験値と比較してその差が大きければ見かけの半減期を修正し，再度計算をしなおすという最適化法を行う．このため連立常微分方程式を数千回以上計算することになり，マイコンでは莫大な時間がかかる．シミュレーションによる半減期の計算が一般化しにくい理由に微分方程式の複雑さと最適化法の計算時間の長さに問題があった．

そこで微分方程式の解を簡易化し，プログラムを工夫して最適化法の計算時間を大幅に短縮して，マイコンでも充分解けるようにしたので，簡単な応用例を用いてその解法を報告する．

方　法

1．連立常微分方程式の数値解法の簡易化

ファーマコキネティクスの分野では微分方程式を解くのにRunge-Kutta-Gill法又はGear法で解くのが一般的である．これらの方法ではまず微分方程式を定義する必要がある．図1の山岡ら[1]のコンパートメントモデルを例にすると各コンパートメントの濃度の微分方程式は

$$\frac{dC_0}{dt} = -V_m * C_0/(K_m + C_0) - k_0 * C_0$$

$$\frac{dC_1}{dt} = -(k_{12} + k_1) * C_1 + k_{21} * C_2 + V_m * C_0/(K_m + C_0)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = -k_{21} * C_2 + k_{12} * C_1$$

で表すことが出来る．これらの式をRunge-Kutta-Gill法のプログラムに入れて解くことになる．プログラムを実行するときの式は

```
DA=KA(0)*G(0)/(KA(9)+G(0))-KA(1)*G(0)
DA=-(KA(2)+KA(4))*G(1)+KA(3)*G(2)+
```

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

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

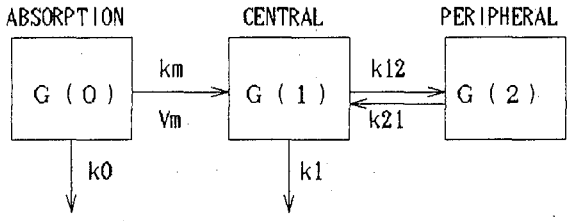


図1．薬物のコンパートメントモデル例
G(0)；薬物の吸収部位の濃度，G(1)；中枢（血液）部位の濃度，G(2)；末梢部位の濃度，k_{12} k_{21} k_1 k_0は移行係数（速度定数），K_m，V_m；Michaelis-Menten 式

```
KA(0)*G(0)/(KA(9)+G(0))
DA=-KA(3)*G(2)+KA(2)*G(1)
```

となる．ただし，KA(0)＝V_m，KA(1)＝k_0，KA(2)＝k_{12}，KA(3)＝k_{21}，KA(4)＝k_1，KA(9)＝K_m，G(0)＝C_0，G(1)＝C_1，G(2)＝C_2 とする．

このような簡単なコンパートメントモデルにおいても微分方程式を定義し解いていくことは，わずらわしさがある．代謝調節などをモデル化するにはコンパートメントに相当する部分が数十もあり複雑で式が長くなり間違え易くなる．

そこで一つの反応(図で一つの→に相当)を簡単な一つの式に置き換え，反応を進めていくと極めて簡単にプログラミングすることが出来る．例えば図1のモデルは次のようなプログラムとなる．

```
N=KC(0)*G(0)/(KM+G[0]):G(0)=G(0)-N:G(1)=G(1)+N      ....1)
N=KC(1)*G(0):G(0)=G(0)-N                            ....2)
N=KC(2)*G(1):G(1)=G(1)-N:G(2)=G(2)+N                ....3)
N=KC(3)*G(2):G(2)=G(2)-N:G(1)=G(1)+N                ....4)
N=KC(4)*G(1):G(1)=G(1)-N                            ....5)
```

1) は Michaelis-Menten 式にしたがう反応を，KM は K_m を，2) は k_0，3) は k_{12}，4) は k_{21}，5) は k_1の反応をそれぞれ示している．KC(i)はKA(i)をキザミ数(数千以上)で割った値である．すなわちコンパートメントの薬物量に KC(i)を乗じて，その値をその反応にあずかるコンパートメントに加えるか減じればよく，極めて簡単に表すことが出来る．速度定数に値を入れて本法で解くと，図1のモデルの濃度－時間曲線は図2となり Runge-Kutta-Gill 法と同じ結果となる．

原理は一次反応において速度定数 k，基質濃度 a，とすれば反応速度 V は

$$V = k * a$$

である．X を生成物量とすれば

$$v = \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

$$\therefore \lim_{\Delta t \to 0} \frac{\Delta x}{\Delta t} = k * a$$

ここで Δt 極めて小さくすると

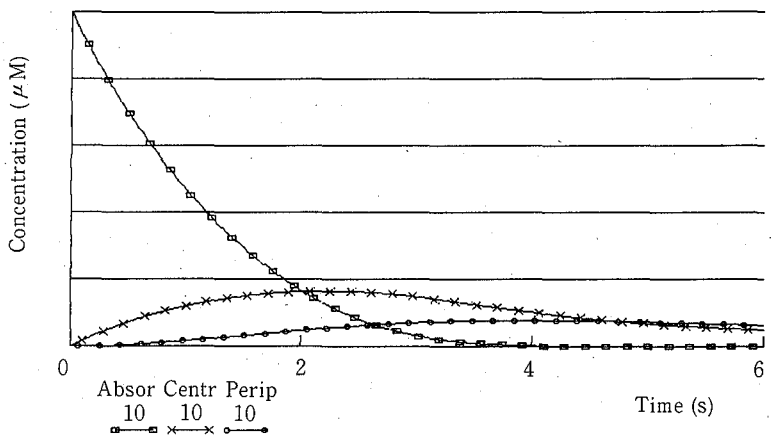


図2．本法による図1のモデルの解法例
（各成分の濃度変化）
Absor；吸収部位，Centr；中枢部，Perip；抹消部位
K_m＝1.0，V_m＝2.0，k_0＝0.5，k_{12}＝0.3，k_{21}＝0.4，k_1＝0.5
G(0)の初期濃度　10.0μM
各部位共10.0がフルスケールである．

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} \fallingdotseq k * a$$

$$\therefore \Delta x \fallingdotseq k * a * \Delta t$$

となる．ここで ΔX をプログラム中の N に置き換えれば反応を進めることが出来る．Δt を小さくとると，すなわちキザミ数を多くすると精度はあがるが計算時間は長くなる．キザミ数の決定は，本法においても，Runge-Kutta-Gill 法においてもキザミ数を変化させて実行し，結果が求める有効数字以内の変動幅であれば良しとする．本法による図1のモデルの計算時間は約0.1秒である．(マイコンは NEC PC-H98s を使用し，演算プロセッサーを実装して，C 言語で実行した．)演算は総て有効数字16桁の倍精度実数型変数を使用して計算した．

次に Gear 法の解法例と本法とを比較するため，江口ら[2]の2次反応を含む酵素反応例を示す．

$$E + S \underset{k_1}{\overset{k_0}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

微分方程式でこの反応を表すと

$$\frac{dES}{dt} = k_0(E_0 - ES) * S - (k_1 + k_2) * ES$$

$$\frac{dS}{dt} = -k_0(E_0 - ES) * S + k_1 * ES$$

この式をプログラム式にすると

```
DA(1)=KA(0)*(E0-G(0,2)*G(0,1)-(KA(1)+
KA(2))*G(0,2)
DA(2)=-KA(0)*(E0-G(0,2))*G(0,1)+(KA(1)*G(0,2)
```

となり，更に質量保存則

$$ET = E + ES$$

$$S0 = S + P + ES$$

の式により E と P を求める必要がある．

ただし，ET，S0はそれぞれ酵素(E)，基質(S)の初期濃度を表す．ES，P は酵素基質複合体(ES)，生成物(P)それぞれ表す．プログラム中の KA(0) は k_0 を，E0は E_0 を，G(0,2)，G(0,1)は ES，S をそれぞれ表し，以下のプログラムの記号も同様に微分方程式の記号にそれぞれ相当している．

この酵素反応を本法で C 言語でプログラミングすると

```
n=kc(0)*g(0)*g(1):g(0)-=n:g(1)-=n:g(2)+=n  ‥1)
n=kc(1)*g(2)      :g(2)-=n:g(0)+=n:g(1)+=n  ‥2)
n=kc(2)*g(2)      :g(2)-=n:g(0)+=n:g(3)+=n  ‥3)
```

(g(0)--n は G(0)=G(0)-N と同じ意味である．)

となる．1)，2)，3)はそれぞれ k_0，k_1，k_2の反応を示す．g(0)は E，g(1)は S，g(2)は ES，g(3)は P，kc(i)は速

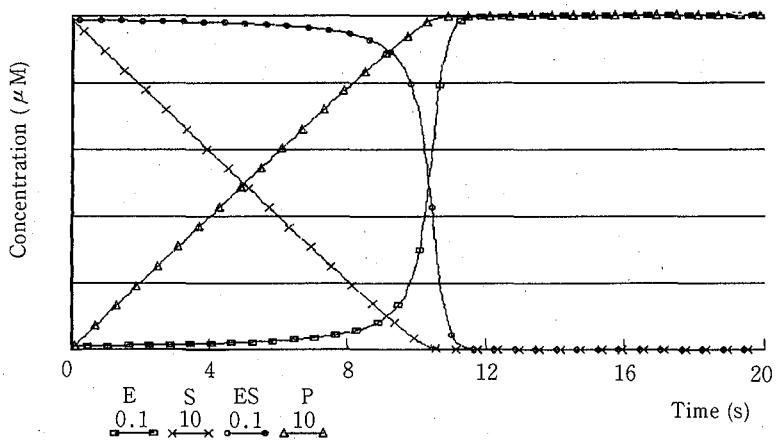


図3．本法による酵素反応の解法例
(各成分の濃度変化)

$$E + S \underset{k_1}{\overset{k_0}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

k_0=1000，k_1=100，k_2=10，
E，Sの初期濃度は E_0=0.1μM，S_0=10.0μM，
E，ES は0.1がS，P は10.0がフルスケールである．

度定数をキザミ数で割った値である．実際に速度定数に値を入れて計算した結果を図3に示した[注)]．このように本法では微分方程式を求める必要がなく，反応にあずかった部分(n)を反応物質から減じるか加えればよく，極めて簡単にプログラミングすることが出来る．

注)本法で求めた結果では図3に示すように，含まれる酵素のほとんどが瞬時(0.05秒以下)にES複合体になっているが，江口らの結果では0.5秒ほど時間を要している．江口らのGear法のプログラムを使用すると確かに0.5秒ほどになるがこれはまちがえである．同じGear法で解いても反応時間を20秒から10秒に変えると結果は異なってくる．Gear法による解法では，反応が急に進む段階でステップを細かし，反応が緩やかになると荒くするなど計算が高速化され精度を高くする工夫がされているが，プログラムをブラックボクスと考え，結果をそのまま信ずると解答が異なっていることもあるので注意が必要である．またプログラムによっては単精度を使用していることもあり，速度定数が互いに極端に違う場合には信頼性があるか必ずチェックする必要がある．

2．非線形最小2乗法の高速化

反応速度定数あるいは臓器の移行係数を求めるには[注)]，一般的に1つの反応だけを取り出し各成分の濃度変化を観察するが，煩雑なことが多い．そこで反応系全体の各成分の濃度変化から最小2乗法により速度定数(移行係数)を推定する方法を試みた．求め方は適当な速度定数(初期値)を設定し，微分方程式を解いて各成分の濃度を求め，この濃度と実測値の濃度との差の2乗和が最小になるように初期値の速度定数を少しずつ修正していく，最小2乗法によって速度定数を推定した(最適化)．この方法は微分方程式を数千回も反復解法するため多くの時間を要する．また求められた最小の2乗和は極小値であって最小値ではない．推定する速度定数の数が多いほど極小値がいくつも存在し，その中から真の解答を推定することになる．したがって速く計算するためのプログラミング上の工夫が必要である．

注)薬物の体内動態においては速度定数とは言わず，移行係数と一般的に呼ばれている．

1)速度定数の修正法1

速度定数の修正法は，一般的にはGauss-Newton法，Fletcherの修正Marquardt法，Damping Gauss-Newton法，Simplex法，その他各種の改良法があるようである[1,3]．ここでは求める速度定数値を一定の簡囲内で図4のように振り子のように振らせる方法で最適化を行い速度定数を推定した．図4の例は計算のアルゴリズムを

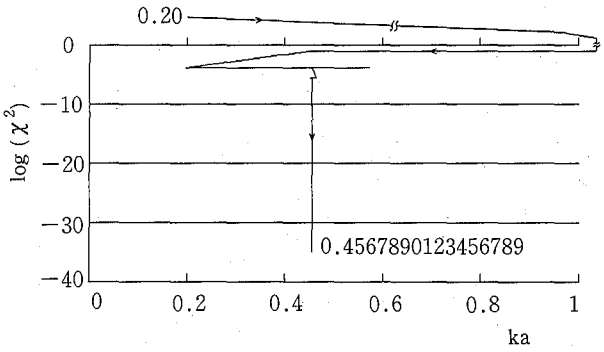


図4．極小値計算アルゴリズム
初期値0.20から始め，求める値が0.4567890123456789の場合

説明するもので，最適値(kam)を0.4567890123456789として，初期値0.2，キザミ幅(st)0.5から計算を始めてこの最適値を求めるための変数(ka)の変動を示している．縦軸はkaとkam間のχ^2値(x2b，kaとkamの差の2乗をkaで割った値)を，横軸はkaの変動値である．このアルゴリズムは収束が速いため，振り子のように振れる前に図のように一点に収束している．

このアルゴリズムを以下，C言語で示す．

```
for(j=0;j<80;j++){                    //80回くり返す
ka+=st                                //キザミ幅をkaに加える
cycle(ka, x2b)                        //χ²を求める
if(x2a<x2b){ka-=st;st=-st*.5;}        //χ²が前の値x2aより大きい場合はkaの値を元に戻し，キザミ幅を半分にしてキザミ方向を逆にする
else x2a=x2b;                         //その他の場合はx2aをx2bに置き換える
}
```

初期値0.2から始めて0.7，1.2，0.45，0.2，0.575，0.387，0.481と順にkaが変化し，80回目で図4に示すように0.4567890123456789を求めることが出来る．一般によく行われる方法は，キザミ幅を例えば0.1から初めて順次計算し，次のステップで1/10にして0.01キザミにする計算法である．この方法と計算速度を比べるために，求める値を0.0123‥‥，0.987‥‥など20種類について計算したところ，本法は約3倍速い計算速度であった．本法で15桁まで求める時間は，精度long doubleを使用した場合，約2.6msである．

2)速度定数の修正法2

計算を進めるとキザミ幅が極端に小さくなるので，計

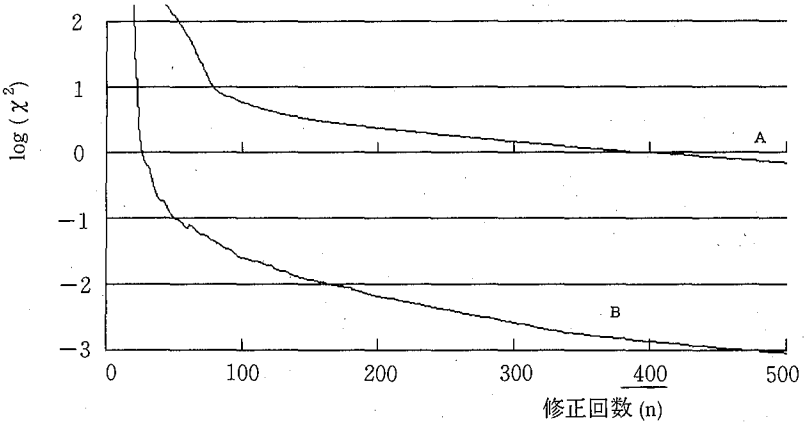


図５．キザミ幅修正方法によるχ^2減少の差
A：キザミ幅を順次1/2にしていく方法のみの場合
B：A の方法にキザミ幅を10回毎に10倍する方法を加えた場合
（第２報[6]，図１のシミュレーションモデルの移行係数を求める計算例）

算速度が大幅に遅くなる．これを補うために計算の途中でキザミ幅を野牛[5]の行っているように元の値に戻すと速く収束する．これは微分方程式で求める定数が一つではないので，一つの定数が変わると他の定数の最適値が大きく変わることがあるためである．野牛は修正回数200回毎にキザミ幅を元の値１に戻しているが，本法では収束が速いので，10回毎にキザミ幅を10倍する方法をとっている．10回毎に10倍する方法(B)とキザミ幅を半分にしていく方法のみの場合(A)を比較し図５に示した．移行係数を500回修正後，A は$\chi^2=0.68$であるが，この値に到達するのに B では30回修正でこの値になっており，10倍以上高速になっている．

収束が良くないときは更に100～200回毎にχ^2値に相関した値でキザミ幅を倍加すると有効なこともある．これは一つの極小値の穴から別の極小値の穴へ移動させる試みである．

3）キザミ数の修正方法

微分方程式を解くときにキザミ数を多くすると解の精度が増すが，計算時間は長くなる．しかし速度定数を変化させながら求めている間は，χ^2が大きいのでキザミ数を多くして精度を高める必要はない．そこでχ^2とキザミ数の関係を求めて，χ^2が小さくなるにしたがい自動的にキザミ数を多くするプログラムとした．χ^2とキザミ数の関係を求めると図６の関係が得られた．図６は第２報[6]図１のモデル例で，求める移行係数が12個の場合である．１日のキザミ数を x，χ^2値を y，ln を自然対数とすると，

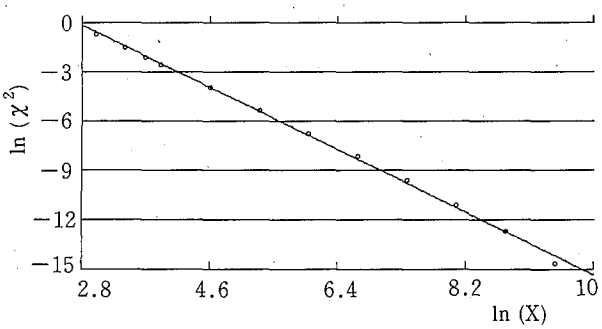


図６．キザミ数（x）とχ^2の関係
求める速度定数が12個の場合

$$x=\exp(-0.4747*\ln(y)+2.714)$$

の関係が得られる．したがって自動補正プログラムはχ^2を xx2，キザミ数を ikt3として C 言語で示すと

```
ikt3＝exp(－log(xx2＊0.5)＊0.4747＋2.714);// χ²に対応したキザミ数を求める
if(ikt3<ikt2)ikt3＝ikt2;　　//前回のキザミ数 ikt 2 より ikt 3 が小さいときには ikt2を採用する．
```

となる．xx2を1/2にしているのは，キザミ数による精度と移行係数のフレによる精度が同じでは収束しないためである．条件によって変わるのでいちがいに計算時間の短縮率を示せないが，10^{-3}オーダーのχ^2を求めるのに，キザミ数が20回からχ^2の値によって500回と自動的に変わるので初めから500回に固定して計算するより相

当速いことになる．またキザミ数を固定するとある値以上のχ^2値は求められないが，本法ではその制約はなくなり計算回数に応じて精度は上がることになる．

4）その他の計算時間短縮法

① キザミ数を少なくする方法としては，投与初期(反応初期)にはキザミ数を多くし，一定時間後，キザミ数を数分の1にすることもある．この方法はキザミ数を少なくしただけ計算時間は短縮される．これは一般に投与初期(反応初期)には急激に各成分が変動するが，時間が進むに従い変動は少なくなる性質を利用したものである．

② 速度定数を求めるときに加えるキザミ幅(st)もlnに変換するとχ^2と直線関係にあり，キザミ数と同様自動補正可能である．

5）最小2乗法使用上の一般的注意

数値計算法[3]にも使用上の注意が示されているが，特におちいり易い注意点を記す．

① 本法によってもGear法，Runge-Kutta-Gill法のいずれの方法で求めてもχ^2値は極小値であり，最小値ではない．移行係数(速度定数)の初期値によっていくつもの解答が存在する．同じコンパートメント数では求める移行係数が多いほど極小値の数は多くなる．したがって求められた係数が必ずしも最適値ではなく，たとえ最小値であっても(数学的には最適であるが)，最適値とは限らない．そこで初期値を乱数で決めるか，あるいはいろいろな初期値から計算し，その解答の中から応用する分野の諸条件を充分考慮して最適値を決定する必要がある．よりよい解答を得るためには，求める係数の範囲を限定するか，予想される初期値から計算することが望まれる．

② 本法以外の方法では特にキザミ幅の修正法によって発散する場合もあり，キザミ幅の値を必ずチェックする必要がある．

③ シミュレーションモデルの予測が間違っていると，当然良い収束値は得られない．

④ 実験誤差が大きいと当然収束し難い．また測定値の中で大きい値が誤差を大きくしているときには，実験値に重み(w)づけをする必要がある[1,4]．

実験値をy_0，計算値をy_1とすると残差平方は

$$(y_0-y_1)^2/y_1^w$$

となり，下記のような誤差に対して補正をする必要がある．

w＝0　測定値の誤差が絶対誤差で，値が小さいときに信頼性が低い場合．

w＝1　wが0と2の中間の場合．χ^2値に相当する．

w＝2　測定値の信頼性が値の大きさにかかわらず同じ場合．

⑤ コンパートメントの数が一定の条件では，移行回路を増やし求める係数を多くすれば当然χ^2値は小さくなるので，χ^2値が小さいからといって最適なモデルとは限らない．そこで残差平方和(SS)と，係数(m)，測定点の数(n)から統計的に割だした赤池の情報量基準(AIC＝n＊ln(SS)＋2m)がある．この値が小さいほどモデルが最適とされ，モデルの良否の判定に用いることも出来る．しかし生理学的モデルを使用する場合には，モデルの回路がある程度特定されるため利用が限られる．その他参考文献を参照されたい[1,3,4]．

ま と め

薬物動態モデル，代謝回路モデルなどをシミュレーションするには非線形微分方程式をたて，解法しなければならないが，代謝回路などフィードバックが多くある場合は式が複雑になり解法が困難であった．そこで1つの反応を

n＝kc(i)＊g(i)；g(i)－＝n；g(j)＋＝n；

で表す簡単なプログラムにより解法出来るようにし，一般の研究者にも充分応用出来るようにした．

薬物動態における移行係数の決定，臓器－血液分配率の決定，あるいは化学反応系における反応速度の決定には最小2乗法を利用出来るが，計算時間が長く一夜かかるなどの欠点があり，あまり普及していなかった．そこで最適化法のアルゴリズムとキザミ数の変更方法を改良し，大幅に計算時間を短縮した．

文　献

1）山岡　清，谷川原祐介：マイコンによる薬物速度論入門，33-83，1983，南江堂，東京．
2）江口至洋，麻生陽一：BASICによる生化学，202-209，1985，共立出版，東京．
3）大野　豊，磯田和男：新版数値計算ハンドブック，743-789，1990，オーム社，東京．
4）花野　学編：ファーマコキネティクス　応用編，49-74，1989，南山堂，東京．
5）野牛　弘：FACOMのEDP論文集，第9集　適用技術とその応用，263-275，1976，富士通，東京．
6）深野駿一：東京衛研年報，**43**，245-252，1992．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **43**, 245-252, 1992

ファーマコキネティクスのモデリングと解析法（第2報*）
生理学的モデルの実際例と実験計画

深野駿一**

Analytical Methods of Pharmacokinetics and its Modelings (II)
Physiological Models and Experimental Plannings

SHUNICHI FUKANO**

Keywords：生理学的モデル physiological model, 薬物速度論 pharmacokinetics, 最小2乗法 least squares method, シミュレーション simulation, 分配率 partition coefficient

緒　言

薬物，毒物の生体影響を知るには，その物質の生体内動態(吸収，分布，代謝，排泄)をまず解析する必要がある．この解析方法としてコンパートメントモデルに代わり，最近では生理学的シミュレーションモデルが一般的になりつつある[1~4]．これは動物実験によって得られた結果を人に外挿していく上でより正確で，理解し易いことによっている．このモデルは動物の生体に近づけるために，血流によって各臓器が連結されているものとし，各臓器の生理学的パラメータ(組織容積，組織内血流量，組織/血液分配係数，代謝定数)によって物質が移行するという考えに基づいている．動物種による組織容積，血液流の差異，運動による血流量の変化，酵素阻害による代謝速度の乱れなどを再現するのにこのモデルはそのまま適用でき，体内動態の予測に適している．この報告では，生理学的モデルの応用例を，第一報の解法手段を用いて示し，その有効性とこれに基づく実験計画の方向性について検討した．

解　析　法

1．生理学的シミュレーションモデル

対象物質によって生理的作用及び標的臓器が変わるため，異なったモデルがいろいろ考えられるが，ここでは基本的な生理学的シミュレーションモデル(図1)を応用例として解析した．このモデルは5つのコンパートメント(血液，消化管，肝臓，腎及びその他の組織，脂肪組織及び皮膚)よりなっており，経口投与された物質(ここでは仮にPCBとする)が腸管①を経由して全身に分布するものとした．腸から吸収されたPCBは，門脈を経て肝臓②に入り(ka0, 移行係数を示す)，肝臓に一部は蓄積して血中に移行する(ka1)．また，親油性のPCBは脂肪と共にリンパ管を経由して血中に入る(ka2)．血液に入ったPCBは腎臓③及び脂肪組織④に移行し(ka3, ka4)，消化管にも血流を通して分布する(ka5)．肝臓に蓄積したPCBは，輸胆管を経て腸管に排泄され(ka6)，再吸収されて(ka0)，腸肝循環することになる．また，腎③及び脂肪④組織から血中に移行し(ka7, ka8)再循環する．排泄は消化管(ka9)，腎臓(ka10)，皮膚(ka11)から行われるものとした．

2．分布データから移行係数の決定法

図1のモデルについて各臓器の分配率を求めることが必要であるが，分配率と移行係数とは一定の関係にあるため，ここでは移行係数による生理学的モデルの解析を試みた．動物実験より得られる結果は，一般的に各臓器中の時間経過毎の濃度変化である．そこでこの濃度変化から第一報の最小2乗法[5]を利用して移行係数を決定した．例えば表1のような動物実験結果が得られたものとする[注1)]．図1のモデルを第1報で述べた簡易化法[5]でプログラミングすと以下の式になる(一般の報告では微分方程式の定義に相当する)．

```
for(t=1;t<=tm;t++){        //tm(=56)日間計算
```

---

*第1報，東京衛研年報，43，239-244，1992.

**東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1

**Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincyo 3 cyome,Sinjuku-ku,Tokyo, 169 Japan

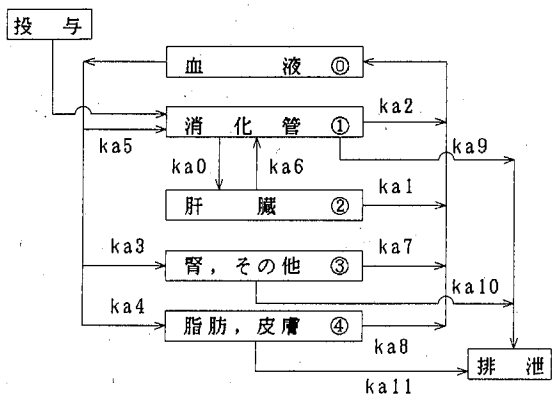


図1．生理学シミュレーションモデル例1

表1．薬物25 mg 1回投与後の臓器内濃度変化(動物実験例)

	3日後 μg/g	28日後 μg/g	56日後 μg/g	臓器容量 g
血　液	19.4868090	0.5968228	0.1368398	8.716
消　化　管	23.7282423	0.1559760	0.0635115	16.405
肝　臓	28.2266033	18.9519325	11.8209526	8.159
腎，その他	12.6913995	0.1804870	0.0385326	142.937
脂肪，皮膚	60.1340926	14.2978502	2.5923613	41.785

注）移行係数が表2の値のときの各臓器の蓄積データを計算で求め，実験値とした．

表2．図1のモデルの移行係数値（設定値，1/h）

ka 0	0.0005800	ka 6	0.0004600
ka 1	0.0002500	ka 7	0.0029200
ka 2	0.0170000	ka 8	0.0007400
ka 3	0.0550000	ka 9	0.0444000
ka 4	0.0467000	ka10	0.0110000
ka 5	0.0160000	ka11	0.0022500

する

```
for(k＝0，k＜ikt2；k＋＋)｛　　//1日をキザミ数ikt2で計算する
  n＝kc[0]＊g[1]；　g[1]－＝n；　g[2]＋＝n；
  n＝kc[1]＊g[2]；　g[2]－＝n；　g[0]＋＝n；
  n＝kc[2]＊g[1]；　g[1]－＝n；　g[0]＋＝n；
  n＝kc[3]＊g[0]；　g[0]－＝n；　g[3]＋＝n；
  n＝kc[4]＊g[0]；　g[0]－＝n；　g[4]＋＝n；
  n＝kc[5]＊g[0]；　g[0]－＝n；　g[1]＋＝n；
  n＝kc[6]＊g[2]；　g[2]－＝n；　g[1]＋＝n；
  n＝kc[7]＊g[3]；　g[3]－＝n；　g[0]＋＝n；
  n＝kc[8]＊g[4]；　g[4]－＝n；　g[0]＋＝n；
  n＝kc[9]＊g[1]；　g[1]－＝n；
  n＝kc[10]＊g[3]；　g[3]－＝n；
  n＝kc[11]＊g[4]；　g[4]－＝n；
                    ｝｝
```

ただし，kc[i]＝ka[i]＊24/ikt2；ka[i]は図1の ka0～ka11を示す．；ka[i]の単位は1/h

まず初期値として ka[i]の値を総て0.001として本法の簡易化法で計算し(常法では Runge-Kutta-Gill 法又は Gear 法で解く)，得られた各臓器の濃度と動物実験結果との差の平方和を求める．この平方和が小さくなるように第1報の最小2乗法で ka[i]を修正し，表3，Aの移行係数を得た．また表3，Aの移行係数によって計算された臓器内濃度変化を図2と表4に示した．実験値と計算値間の χ^2 値は0.001985と極めて小さいため表1と表4の濃度変化の値は実験値と計算値がほとんど一致している．計算時間は約1時間で移行係数が求まり，第1報の数値解法が実用に充分耐える計算方法であることを示している．本法の最小2乗法における移行係数の修正過程を図3に示した．12個の移行係数が初期値0.001から始めて大きく振れながら χ^2 が極小値に近づくに従い，一定の値に収束するのが観察される．

第一報で示したように初期値によって極小値がいくつ

表3．表1の実験値から第1報の最小2乗法により求めた移行係数値（1/h）

	A	B		A	B
ka0	0.0005774	0.0005780	ka6	0.0005103	0.0004838
ka1	0.0001980	0.0002259	ka7	0.0014751	0.0031353
ka2	0.0164709	0.0168445	ka8	0.0007081	0.0007624
ka3	0.0480138	0.0573669	ka9	0.0444382	0.0440881
ka4	0.0439870	0.0473956	ka10	0.0107778	0.0114442
ka5	0.0135467	0.0144793	ka11	0.0022155	0.0022390

A；ka0～ka11の初期値を総て0.001として求めた値．
B：0.005以下の乱数を初期値として求めた値の一例．
移行係数修正回数500回．

表4．表3のAの移行係数から求めた臓器内濃度変化（最小2乗法によって求めた計算）

	3日後 μg/g	28日後 μg/g	56日後 μg/g
血　液	19.4987842	0.5915607	0.1363935
消　化　管	23.7307032	0.1505297	0.0656835
肝　臓	28.2310066	18.9380232	11.8250061
腎，その他	12.6751949	0.1874713	0.0390909
脂肪，皮膚	60.1686872	14.2086244	2.6376914

χ^2＝0.01985（実験値と計算値間）

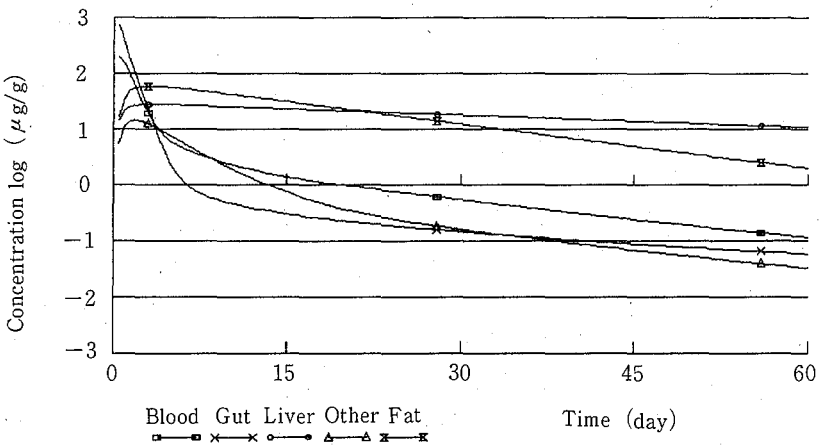


図２．計算で得られた臓器内濃度変化と実験値の比較
△等の印：実測値，——：計算値
表１の実験値から図１のモデルを組立，本法により移行係数を求めた後，その値を基にシミュレーションを行い実験値と比較した．

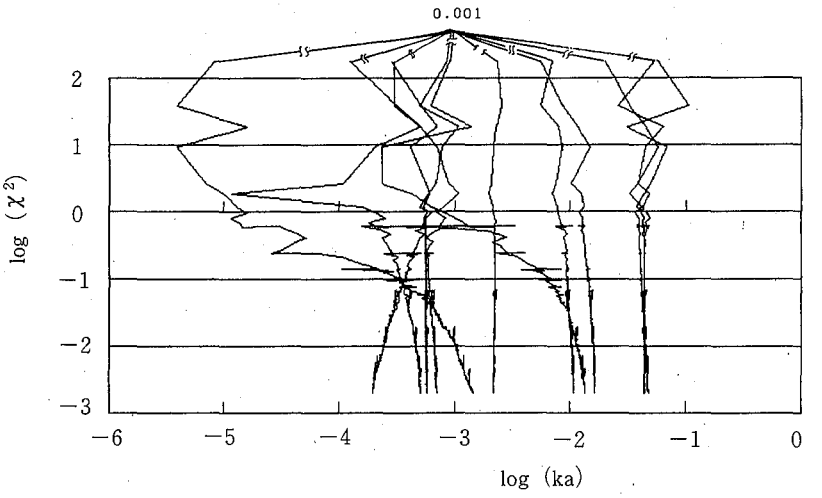


図３．最小２乗法における移行係数の修正過程
図１のモデルの12個の移行係数を本法により修正しながら極小値を求める過程を示した・（移行係数の初期値0.001）

も存在し，求められた移行係数が真の値とは限らない．0.001から始めた場合，表３の結果のように設定値(真の値)に極めて近いが，実際の実験では真の値は不明である．そこで他の値から始めたときの χ^2 値を表５に示した．初期値によって χ^2 値が低い値の数千倍も高いものもある[注2)]．χ^2 値が低いのは，初期値が0.004のときの0.000310と，乱数で初期値を決めたときの0.000176である．これらの値は初期値が0.001のときよりも χ^2 値が低く真の値に近いようである．しかし χ^2 が低いからといって求める移行係数が真の値とは限らないので，設定値(真の値)と求めた移行係数値(ka)間の残差平方和を表５に示した．この値が低いほど真の値に近い係数値が求まったことになる．残差平方和が一番小さい0.00000877のときの移行係数値を表３のＢに示したが設定値と極めて近い値であった．このことは本法が真の値を求める有効な手段であることを示している．なお表５

表5．初期値の違いによる χ^2 値と残差平方和

初期値	χ^2	残差平方和	計算時間
0.001	0.001985	0.00006461	3459 s
0.002	0.005760	0.00014930	2230 s
0.003	0.002010	0.00005155	3509 s
0.004	0.000310	0.00002069	6958 s
0.005	0.236890	0.01118711	549 s
0.008	0.373838	0.06511038	455 s
0.016	0.978255	1.915218	1053 s
乱数	0.005164	0.00019740	2808 s
乱数	0.106666	0.00822726	740 s
乱数	0.001361	0.00004793	3819 s
乱数	0.001079	0.00001334	3736 s
乱数	0.000176	0.00000877	9036 s
乱数	0.008646	0.00027202	1693 s

移行係数修正回数500回.

0.01；ka0～ka11の初期値が総て0.001である(以下同様).

乱数；0.005以下の乱数を12個の係数値とも初期値とした.

残差平方和；表2の設定値と最小2乗法から求めたka値間の残差平方和

の計算時間は係数を500回修正したときの所要時間であるが，χ^2 の値によって異なっている．これは第1報で述べたように χ^2 値が下がらない場合は計算精度を上げても無意味なため，キザミ数を自動的に変えているためである．500～9000秒と18倍も差があり，それだけ計算時間を短縮していることになる．

注1）この例は，野牛のコンパートメントモデル[6]で使用したラットPCB投与実験例を参考にして作成した蓄積データである．濃度値は，各臓器の移行係数が表2の値のときの各臓器の蓄積データで，計算によって得られた仮の実験値である．したがって第一報の数値解法によって実験値から逆に表2の移行係数が求まれば，この解法手段は有効であることが証明されたことになる．

注2）χ^2 が高い値のときに移行係数の修正回数を多くしても高い値の極小値に収束し，χ^2 値を下げることが出来ない場合が多い．したがっていろいろな初期値より始めて計算した方が良い結果が得られる．またどの係数値から修正を行うかによっても当然収束状況は異なってくる．

3．生理学的シミュレーションモデル例2

先に述べたシミュレーションモデルでは脂肪の吸収としてリンパの流れを考慮したが，一般的に生理学的モデルではリンパの流れを考慮していない．そこで腸管から

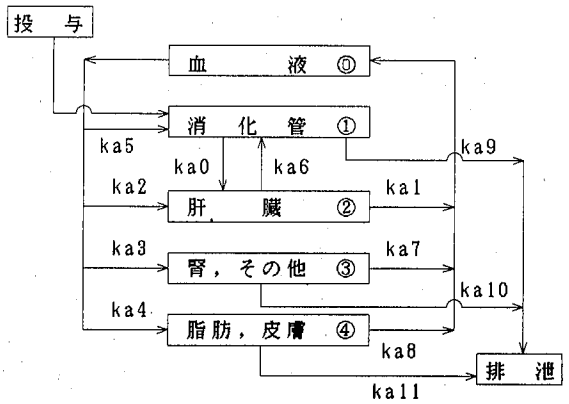


図4．生理学シミュレーションモデル例2

乳び管への脂肪の流れ(ka2)除き，生理学モデルの常法である肝臓への血流を入れたモデル(図4)を例2として最小2乗法を試みた．その結果，乱数などいろいろな初期値から始めても χ^2 値は31.0以上と大きく，先のモデルのような小さい極小値は得られなかった[注)]．したがって例2のモデルはPCBの体内動態を示すモデルとしては適当とはいえないことになる．この実験値は移行係数の設定値から得られた仮の実験値ではあるが，実測値に近い値を設定しており，一般的な生理学モデルでは説明出来ない場合のあることを示している．このようにシミュレーションを利用して，自分で思考した薬物の代謝モデルが間違っていないか検定することが出来る．

注）χ^2 分布から得られる $\chi^2_{14}(0.05)=23.685$，$\chi^2_{14}(0.95)=6.571$ の値を考慮すると χ^2 値が23以上であるから適合しているとはいえない．6.57以下が望ましい．

4．臓器機能低下による見かけの半減期の変動

図1のモデルにおいて肝機能が半分に低下したものとして，シミュレーションを試みた．機能低下の仮定として，肝臓の単位組織当たりの機能が半減して移行係数が半減したものとした．したがってka0＝0.00058/2，ka6＝0.00046/2，ka1＝0.00025/2の値を入れて同様に計算した．機能低下の仮定として血流量が半減したとしても同様に移行係数を1/2にすればよい．なお肝臓の機能低下による全身の血液量は変わらないものとした．これらの条件下で得られた臓器毎の濃度変化から，下記の式により見かけの半減期を計算し，図5に正常時の，図6に肝機能低下時の半減期の変動を示した．

$$T=(t_2-t_1)\ln 2/(\ln C_1-\ln C_2)$$

(Tは半減期，t1，t2は2点の測定時間，C1，C2は測定時の臓器濃度を表す.)

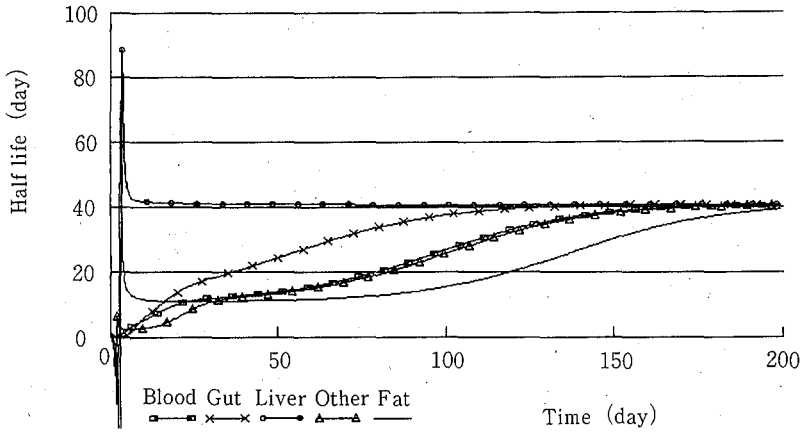


図5．正常時の見かけの半減期の変動
図1のモデルと表2の移行係数を使用した時の各臓器の半減期の変動を示した．

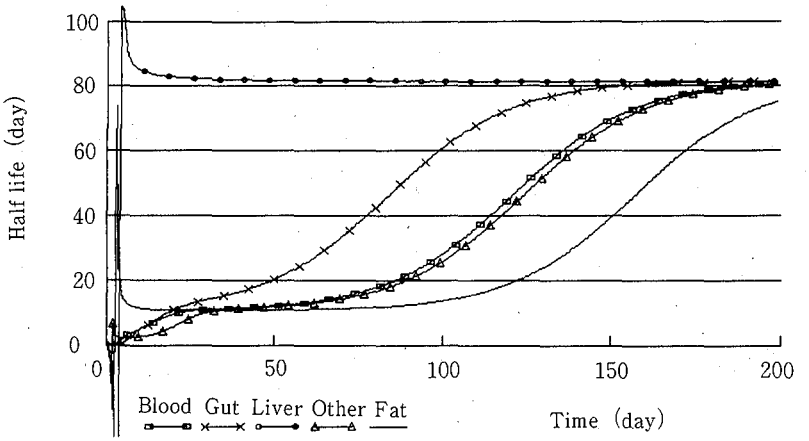


図6．肝機能が半分に低下した時の見かけの半減期の変動
図5の代謝条件で肝機能が半分に低下したと仮定し，シミュレーションした．

このモデルでは正常時の肝臓の半減期が41日と他の臓器と比べ最も長く，この長い半減期によって他の臓器の見かけの半減期が左右されていることが観察される．なお肝臓固有の半減期は

$$T_2 = \ln 2 / (ka6 + ka1)$$

によって示される．この式に表2の移行係数値 ka6＝0.00046，ka1＝0.00025を代入すると肝臓の真の半減期は40.68日となる．野牛[6]も指摘しているように，長期間飼育し，排泄が早ければすべての臓器の見かけの半減期は最も長い臓器の真の半減期に収束することが観察される(図5)．この正常時の各臓器の見かけの半減期とくらべ肝機能が低下したときの半減期は，図6に見られるように大幅に長くなっている．したがって薬物の体内滞留時間が長くなっており，この場合も最も長い肝臓の半減期80日に収束している．

また肥満などにより脂肪容量が増した場合，脂肪組織の真の半減期が長いと同様にその他の見かけの半減期も影響を受けることになる．このように通常の動物実験で観察している見かけの半減期は観察時間，臓器の病的状態によっても大きく異なることが理解される．

5．移行係数と臓器分解係数との関係

生理学的モデルでは一般的に組織あるいは臓器の薬物濃度(C)と臓器内毛細血管中の薬物濃度(D)とは常に平衡であると仮定し，この比 k＝C/D をその組織の分配率とよび，固有の値としてシミュレーションを行っている．この分配率を求めるには①薬物を一定速度又は瞬時に静

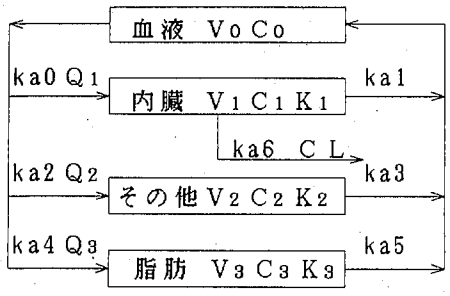


図7．分配率決定のためのモデル例
ka 0～ka 6　移行係数
K_1～K_3　組織-血液分配係数
V_0～V_3　組織容積
C_0～C_3　組織濃度
Q_1～Q_3　組織血流量
CL　クリアランス

脈に注入し，濃度変化が定常状態になった後，血中と組織濃度及び血流量から一定の式により求める．②臓器を取り出し還流しながら分配率を求める．③組織ホモジネートをつくり平衡透析法などにより物理化学的に求める．などの方法が一般的である．①では分配率は組織と組織内の静脈血と濃度比であるが，動脈血濃度を代用することが多い．また平衡に達する時間が正確に把握できない．②と③は組織特有の性質を調べることが出来るが生体内と必ずしも同じではないといえる．

そこで移行係数から分配率を求める方法を試みた．先に述べた「移行係数の決定法」に従い移行係数 ka を求めることになるが，ka は臓器の血流量が一定のため規制される．そこで最小2乗法で求める値を ka と一定の関係にある分配率にした方が良い．計算が複雑になるためここでは算出例として図7の簡単なモデル[7]について述べる．内臓の分配率 k_1 を求めるには，内臓から静脈に移行する薬物量に注目する．移行係数からその薬物の絶対量を求めると $V_1*C_1*k_1$ となり分配率から求めると C_1*Q_1/K_1 である．したがって

$$V_1*C_1*ka1=C_1*Q_1/K_1$$

$$\therefore\quad K_1=Q_1/(V_1*ka1)$$

ここで血流量 Q_1，組織容量 V_1 は文献値から得られるので内臓の分配率 K_1 を求めることが出来る．同様にして

$$K_2=Q_2/(V_2*ka3)$$

$$K_3=Q_3/(V_3*ka5)$$

より他の組織の分配率が求められる．クレアランスは

$$CL=ka6*V_1*K_1$$

と表すことが出来る．このようにして移行係数から分配率を求めることが出来る．一般的に生理学的モデルではこの分配率，組織容量，組織血流量からシミュレーションすることが多い．「4．臓器機能低下による見かけの半減期の変動」の解析も分配率を基にして算出する方が一般的であるが，先に示したように移行係数を利用しても同様な結果を得ることが出来る．移行係数に基づいて計算する場合は分配率の変わりに単位容積当たりの移行係数，すなわち移行係数率（1/min＊ml）を組織の固有値として使用すれば良い．人に外挿するときは分配率に基づく計算が理解され易いが，最終的に移行係数に換算した方が式が簡単なため計算速度は速くなる．

6．実験計画とシミュレーション

薬物の毒性を知る一要素として，組織中の毒物の蓄積状況を知ることが重要なため，組織濃度-時間曲線を示すか，組織の見かけの半減期，あるいはクリアランスを報告している例が多い．図4，5で示したようにこの見かけの半減期は時間と共に変化し，実験動物の年齢，飼育状況により変わってくる．したがってその薬物の真の性質を表す指標ではなく，ある実験状況下での一つの目安に過ぎない．実験は再現性がなければならないが，見かけの値では他の実験と比較することも困難である．筆者も無機錫の組織半減期を文献から得ようとしたが，報告は多いが納得出来る値を得ることが出来なかった．従来，組織固有の半減期を得るには，そのための実験をしなければならず手間が大変であった．しかし本法で示した蓄積データから最小2乗法で移行係数又は分配率を求めればその必要はなく，実験を簡素化することが出来る．

本法で移行係数を求めるには個体内の薬物分布全体を把握していなければならない．例えば図1の「その他の組織」の濃度が求められていないと本法が適用出来ない．ところが多くの報告は個体内に含まれる薬物量を把握していないものが多く以下の問題がある．①各臓器の濃度-時間曲線は細かく報告されているが，その他の部分に薬物が蓄積しているか全く不明である．測定されていない組織に標的臓器がある可能性もあるが確認出来ない．②測定臓器の濃度分布比(%)で報告されているものもあるが，一部の組織が不明であったり，たとえ全体が測定されていたとしても，標準臓器重量から個体内に含まれる薬物の絶対量を計算すると投与量と比べ矛盾する結果となることがある．③放射性物質を使用し，投与量の%分布表示であっても，投与部位の腹腔内又は皮下に多くの薬物が滞留している実験では，この部分から徐々に血中内に薬物が補給されることになり，各臓器の半減期は真の値では有り得ない．このような場合は投与部位も一

つの臓器と考え，この部分にある薬物の絶対量を把握する必要がある．以上のように投与量の何％が個体内に蓄積しているか把握出来る報告は極めて少く，見かけ上の値しか得られず他の報告と比較することが出来ない．また薬物の動態報告は濃度で示すのではなく，組織に含まれる絶対量で報告すべきで，濃度で報告する場合は臓器重量を付録として載せることが望まれる．臓器重量は薬物投与により変化することもあり，濃度表示の場合投与薬物の全体の動態を把握出来ず実験の信頼性もチェック出来ない．投与量に対する組織当たり含有％で表示すれば，体内滞留量が把握でき信頼性もチェック出来る．この値のトータルが排泄量も含め100％前後になる報告が理想的で，200％あるいは50％であれば信頼性が少ない実験となる．本来実験ではこれらの値がまず測定されるが，濃度あるいは臓器含有％と換算することにより情報量を少なくしている報告が多い．基礎データを載せた上でグラフ化し，実験の目的に応じて説得力のある報告にすべきである．

薬物の性質を知る上で体内蓄積の絶対量の測定が必要であり，実験計画の際には排泄物を正確に測定するか，測定組織以外の部分を凍結粉砕あるいは溶解して含まれる量を知る実験を含めるべきである．また移行係数あるいは分配率を知れば表1の56日間の飼育データから，表4に示した200日間の飼育データ予測が10秒以下の計算で簡単に出来る．このシミュレーションの結果を利用して，薬物の定常状態になる期間を予測し今後の飼育計画を立てることが出来る．慢性実験では長期間飼育のため個体毎に体重が異なり，本来の目的である臓器に対する薬物の動態を知ることが困難になるが，この補正などにも利用出来る．1回投与実験から，連続投与実験を予測したり，静脈投与実験を基にして，経口投与実験の予測が吸収率が分かれば可能である．

これらの予測がどの程度正確かは，インプットするデータにもよるが，生理学モデルの限界もある．例えば①生体は複雑であり，単純なモデルで再現することは不可能である．②モデルを精緻にしてもそれに対応した血流量などの生理学データに信頼出来るものが少なく文献によって異なっている．③最小2乗法で得られた結果は解が複数あるから，選んだ値は真の値ではない可能性がある．これらはいずれも今後解決出来る問題である．①に対しはコンピュータの進歩を考えれば，複雑な計算も今後高速に処理出来る．複雑なモデルにし，係数を更に加えても結果に影響がないときには，薬物の動態にあまり関与しないとも考えられるので，単純なモデルで代用出来ることになる．②は血流の画像解析，MRIを利用するなど最近血流量を容易に正確に測る技術が進歩しており生理学データも蓄積されていくと思われる．③については，真の値ではなくても実験値とはよく合うのであるから実用上問題はないともいえる．また血流量と血中濃度が正確に得られれば，コンパートメントに流入する薬物量は最小2乗法によらず決定出来る．このようにして求める係数を少なくすれば，解の数が少なくなりより真の値が得れる．

動物実験の値は再現性が少ないと言われているが，再現性の少ないデータは価値が少ないとも言える．この誤差の要因を生理学的モデルを利用して解釈し，実験に基づいてシミュレーションし，その予測に基づいて実験を行うという互いの協力が動物実験を経済的に行うためにも，動物愛護の立場からも今後必須と思われる．

ま と め

生理学的モデルは薬物の体内動態を把握し，毒性を評価するのに優いることが広く認められている．しかしモデルが提唱されて20年余りになるが多方面に利用されているとは言い難い．これは組織分配係数の決定の困難さと，微分方程式が理解しにくい点にあると思われる．そこで①第1報の微分方程式を用いない非線形モデルの解法を利用して，12個の移行係数を持つ生理学的モデルについての解法例を示し，②組織濃度-時間曲線から第一報の最小2乗法を利用し，移行係数を求め，この値から分配率の決定法を示した．これにより体内分布の動物実験データから組織分配率を特別な実験をすることなく求めることが可能になり，生理学的モデルがより身近なものとして活用出来るものと思われる．

生理学的モデルのシミュレーション結果から①動物実験から得られる見かけの半減期は，測定時期あるいは病態により大きく変わり，真の半減期又は分配率を求めなければ意味のないことを示した．②真の半減期を知るには投与薬物全体の行方を把握しなければならず，実験報告は濃度表示ではなく臓器当たりの％投与量で表すことが望ましいことを示した．

有害性を論ずるには用量-反応関係を定量的に評価する必要があり，生理学的モデルとこれに基づくシミュレーションは，個体差，病的状態，種差間の外挿などを統一的に解釈する方法として，また実験計画を立てる手段として，今後多方面に利用されていくものと考える．

文 献

1) Leung, H. W.: *Toxcol. Lett.* **51**, 147-162, 1990.
2) Leung, H. W., Paustenbach, D. J., Murray, F. J.,

Andersen, M. E. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**, 399-410, 1990.
3) Yokogawa, K., Nakashima, E., Ichimura. F. : *Drug Metab. Dispos.* **18**, 258-263, 1990.
4) 遠藤和志，金子　誉，佐藤章夫：産業医学，**31**, 335-341, 1989.
5) 深野駿一：東京衛研年報，**43**, 239-244, 1992.
6) 野牛　弘：FACOM の EDP 論文集，第 9 集　適用技術とその応用，263-275, 1976，富士通，東京.
7) 花野　学編：ファーマコキネティクス　入門編，79-80, 1987，南山堂，東京.

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1991.4—1992.3)

著書

寺山　武：***Staphylococcus***, 坂崎利一編，**食水系感染症と細菌性食中毒**，336-359，1991，中央法規出版，東京.

工藤　泰雄：**下痢症の細菌検査**，猪狩　淳，浦野　隆，山口　英世，**感染症診断のための臨床検査ガイドブック**，栄研学術叢書第14集，103-122，1992，栄研化学，東京.

Motohashi, N., Kamata, K. and Meyer, R.: **Chromatographic Methods for Determining Carcinogenic Benz［c］acridine,** *In* Giddings, J. C., Grushka, E. and Brown, P. R. (eds.), ***Advances in Chromatography***, Vol. 31, 337-381, 1992, Marcel Dekker, New York.

Motohashi, N., Sakagami, Y., Kawajiri, K., Meyer, R. and Kamata, K.: **The Interaction of Potential Antitumor Chlorpomazine with 2'-Deoxyribonucleotides by ^{1}H-NMR**. *In* Keyzer, H. et al. (eds.), *Thiazines and Structurally Related Compounds*, 293-302, 1992, Krieger Publishing Company, Florida.

植田　忠彦，市川　久次，五十嵐　脩：**d-α-Tocopherol高用量投与ラットの組織内蓄積特異性とその影響**，ビタミンE研究会編，**ビタミンE研究の進歩Ⅱ**，140-144，1992，共立出版，東京.

松本　昌雄：**動物用医薬品，飼料添加物**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針，理化学編**，343-355，460-479，1991，日本食品衛生協会，東京.

伊藤　武：**細菌性食中毒**ほか，田島　治郎，鈴江緑衣郎編，**健康づくりの栄養辞典**，1991，ダイレック，東京.

伊藤　武：**カンピロバクター**，坂崎利一編，**食水系感染症と細菌性食中毒**，123-153，1991，中央法規出版，東京.

宮崎　奉之：**動物用医薬品・飼料添加物**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針，理化学編**，452-459，1991，日本食品衛生協会，東京.

Kimura, F., Koizumi, N., Yoshida, K., Nakajima, S., Itoh, T., Takahashi, M., Kai, A. and Yanagawa, Y., **Rapid Identification of *Campylobacter jejuni/coli* in a Latex Agglutination Test Using Monoclonal Antibody**, *In* Ruiz-Palacions, G. M., Calva, E. and Ruiz-Palaciop, B. R. (eds), ***Campylobacter V.*** 123-124, 1991, Instituto Nacional de la Nutricion, Mexico.

Itoh, T., Yanagawa, Y., Takahashi, M., Kai, A., Saito, K., Ohashi, M., Nakamura, A. and Mutoh, T.: **Characterization of a New Thermophilic *Campylobacter* Isolated from Rabbit**, Ruiz-Palacios, G. M., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B. R. (eds), ***Campylobacter V,*** 424-425, 1991, Instituto Nacional de la Nutricion, Mexico.

Itoh, T., Shingaki., Hirata, I., Takahashi, S., Ishiyam, N. and Igarashi, H.: **Immunological Specifity of *Helicobacter mustlae* Ureace and Isolation of the Organisms in Gastric Mucosa of Ferrets,** *In* Takemoto, T., Kawai, K. and Shimoyama, T. (eds), ***Hericobacter pylori and Gastroduodenal Diseases,*** Vol. 345-51, 1992, Iji Publishing, Tokyo.

Takahashi, S., Nakano, N., Ishiyama, N., Igarashi, H., Nakamura, K., Ozaki, M., Masubuchi, N., Komori, N., Miura, Y., Kobayashi, Y., Takagi, Y., Ito, M., Saito, S., Aoyagi, T., Yamagishi, I., Itoh, T. and Hirata. I.: ***Helicobacter pylori* and Ammonia in Gastric Juice**, *In* Takemoto, T., Kawai, and Shimoyama, T. (eds), ***Helicobacter pylori and Gastroduodenal, Diseases*** ,Vol. 3, 118-125, 1992, Iji Publishing, Tokyo.

Itoh, T., Shingaki, M., Hirata, I., Takahashi, S., Ishiyama, N. and Igarashi, H.: **Immunological Specifity of *Helicobacter mwstrlae* Urease and Colonization in Gastric Mucosa of Ferrets with the Organisms.** *In* Tsuchiya, M., Nagura, H., Hibi, T. and Moro, I. (eds), ***Frontiers of Mucosal Immunology,*** Vol. 1, 677-680, 1991, Excerpta Medica, Oxford.

真木　俊夫，二島太一郎：**カーバーメイト系農薬**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針，理化学編**，116-119，1991，日本食品衛生協会，東京.

永山　敏廣，二島太一郎：**イプロフェンホス，エディフェンホス**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針，理化学編**，121-127，日本食品衛生協会，東京.

風間　成孔：**器具・容器包装試験法**，厚生省生活衛生局監修，**食品衛生検査指針・理化学編**，565-569，611-612，628-630，1991，日本食品衛生協会，東京.

吉川　翠，戸矢崎　紀紘，田中　正敏，須貝　高：**寝室・寝具のダニ・カビ汚染**，1991，井上書院，東京.

小久保彌太郎，丸山　務：***Listeria***，坂崎利一編，**食水系感染症と細菌性食中毒**，434-472，1991，中央法規出版，東京.

他　誌　発　表

松下　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　誠：**東京において最近10年間（1980-1989年）に分離された海外及び国内由来赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性**，感染症学雑誌，**65**，857-863，1991.

Shimada, T., Kosako, Y., Inoue. K., Ohtomo, M., Matsushita, S., Yamada, S. and Kudoh. Y.: ***Vibrio fluvialis* and *V. furnissii* Serotyping Scheme for International Use,** *Current Microbiology*, **22**, 335-337, 1991.

永井美勢穂，市川　広美，伊藤　哲也，水谷　文彦，安藤　光広，川北　章，鈴木　賀巳，西村　豊，高橋　正樹，甲斐　明美：**水平感染が疑われた新生児 *Campylobacter jejuni* 敗血症の1例**，日本新生児学会雑誌，**27**，1001-1003，1991.

川口　新暉，松山　友彦，日野　治子，田渕　健一，潮田　弘：**Necrotizing Fasciitis の2例**，皮膚科の臨床，**34**，747-752，1992.

松下　秀，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　誠：**東京において1980-1989年に分離された海外及び国内由来サルモネラの血清型と薬剤耐性**，感染症学雑誌，**66**，327-339，1992.

斉藤　香彦，新垣　正夫，高橋　正樹，工藤　泰雄，伊藤　武，大橋　誠，森田　盛大，斉藤志保子，船橋　満，石原　政光，小林　一寛，田口　真澄，佐々木実已子，片山　淳，松崎　静枝，原田　誠也：***Campylobacter jejuni/coli* の血清型別に関する研究：Lior の血清型別システムの導入**，感染症学雑誌，**66**，340-348，1992.

諸岡　達也，安元　佐和，柴田　昌彦，小田　禎一，百田　敏彦，村上　紀之，甲斐　明美，工藤　泰雄：**Verotoxin 産生性大腸菌（O157：H 7）による散発性腸炎の2小児例**，福岡大学医学紀要，**19**，77-80，1992.

Fujikawa, H., Ushioda, H. and Kudoh, Y.: **Kinetics of *Escherichia coli* Destruction by Microwave Irradiation,** *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 920-924, 1992.

橋本　篤，清水　賢，五十嵐英夫：**生理的リン酸**

緩衝液中に浮遊する細菌に及ぼす遠赤外線の影響，化学工業論文集，**17**，627-633，1991.

Uchiyama, H., Imanishi, K., Araake, M., Yan, X-J., Saito, S. and Igarashi, H.: **Characterization of Toxicshock Syndrome Toxin-1-Binding Structure Expressed on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. HLA Class Ⅱ Molecules Expressed on Accessory Cells Bind the Toxin and Present Its Triggering Signal to T-cells**, *Zbl. Bakt. Suppl.*, **21**，291-294，1991.

柏木　義勝：**猩紅熱患者分離Ａ群溶血レンサ球菌の薬剤感受性の変遷（1956～1978年）**，感染症学雑誌，**65**，820-832，1991.

遠藤美代子，柏木　義勝，奥野　ルミ，天野　祐次，小野川　尊：**臨床材料および健康学童から分離されたＡ群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と菌型について（1986-1988年）**，感染症学雑誌，**65**，919-927，1991.

榊　美代子，土井　秀之，桑原　正雄，山田　純子，柏木　義勝，遠藤美代子：**広島県内で分離された臨床材料由来溶血レンサ球菌の血清型別と薬剤感受性について（1987～1989）**，感染症学雑誌，**65**，953-959，1991.

大石　向江，小林　千種，蓑輪　佳子，河野　均也，町田　勝彦：**東京都衛生検査所精度管理調査における1982～1988年の血液型検査の結果**，医学検査，**40**，1425-1429.

野呂　新一，佐藤七七朗，桜田　教夫，藤田　宣哉，石崎　　徹，神村　紀子，吉田　幸雄，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，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，関根　大正，大貫奈穂美，貞升　健志，藪内　　清，三木　隆，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　Ⅱ．1989年度報告**，衛生試験所報告，**109**，107-110，1991.

渡辺　悌吉，石原　　裕，大久保さつき，小野　正恵，浦野　純子，河野　弘子，岩崎　謙二，藪内　　清，矢野　一好，林　　志直，吉田　靖子：**小児の急性呼吸器疾患，発疹性疾患の臨床ウイルス学的分析：８年間の分離成績からみた分離ウイルスの臨床的疫学的パターンの比較検討Ⅰ　分離ウイルスとその疫学的分析**，臨床とウイルス，**20**，71-79，1992.

Yoshimi Tomota, Akira Fuse, Hiromasa Sekine, Hiroshi Shirasawa, Bunsiti Simizu, Masanobu Sugimoto and Shinichi Funahashi: **Human Papillomavirus Type 6 and 11 E4 Gene Products in Condyloma Acuminata**. *Journal of General Virology*, **72**，731-734，1991.

瀬戸　隆子，秋山　和幸，砂金　信義，久保田和彦：**地黄の生理活性成分に関する研究（Ⅰ）乾地黄から得られたモルモット心機能抑制成分，**和漢医薬学会誌，**8**，115-124，1991.

Motohashi, N., Sakagami, H., Kamata, K. and Yamamoto, Y.: **Cytotoxicity and Differentiation-Inducing Activity of Phenothiazine and Benzo [a] Phenothiazine Derivatives,** *Anticancer Research*, **11**，1933-1938，1991.

Kamata, K., Motohashi, N., Meyer, R. and Yamamoto, Y.: **Determination of 7-Methylbenz [c] acridines by Capillary Gas Chomatography with Electoron-Caputure Detection.** *J. Chromatogr.*, **596**，233-239，1922.

上原　真一，安田　一郎，竹谷　孝一，糸川　秀治：**市場品鬱金および栽培植物の成分組成による比較，**生薬学雑誌，**46**，55-61，1992.

松本 昌雄：**畜産物中の残留抗菌性物質の検出と同定方法**，食品衛生研究，**41**，5，7-24，1991.

Yuki, N., Sato, S., Itoh, T., and Miyatake, T.: **HLA-B35 and Acute Axonal Polyneuropathy following *Cammpylobacter* infecton**, *Neurology*, **41**, 1561-1563, 1991.

福山 正文，上村 和雄，伊藤 武，原 元宣，田淵 清，村田 元秀，光崎 研一：**運動性 *Aeromonas* 感染症に関する研究：2）運動性 *Aeromonas* 属のファージ型別に関する検討**，感染症学雑誌，**65**，813-819，1991.

仲真 晶子，小久保彌太郎，飯田 孝，梅木富士郎，丸山 務：**DNA ロープ法キットによる食品からの *Listeria* 属菌検査**，日本獣医師会雑誌，**44**，851-855，1991.

神保 勝彦，門間 千枝，丸山 務，松本 昌雄：**バイオアッセイによる食肉中の残留抗菌性物質の簡易系統別検査法**，食衛誌，**32**，86-92，1991.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S.: **Wild Animals as the Source of Infection with *Yersinia pseudotuberculosis* in Shimane Prefecture, Japan,** *Cont. Microbiol. Immunol.* **12**, 1-4, 1991.

Kaneko, S., Maruyama, T., Fukushima, H.: **Comparison of Plasmid DNA among Different Serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis*.** *Cont. Microbiol., Immunol.*, **12**, 75-79, 1991.

Iida, T., Kanzaki, M., Maruyama, T., Inoue, S., Kaneuchi, C.: **Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Intestinal Contents of Healthy Animals in Japan**, *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873-875, 1991.

Inoue, S., Iida, T., Tanikawa, T., Maruyama, T., Morita, C., **Isolation of *Listeria monocytogenes* from Roof Rats (*Rattus rattus*) in Buildings in Tokyo**, *J. Vet. Med.Sci.*, **53**, 521-522, 1991.

Fujimoto, S., Yuki, S., Itoh, T. and Amako, K.,: **Specific Serotype of *Canpylobacter jejuni* Associated with Guillain-Barre Syndrome**: *J. Infnfec. Dis.*, **165**, 183, 1992.

伊藤 武，新井 義輝，平田 一郎：***Bacillus thuringiensis* serovar 3a, 3b (Kurstaki) の家兎腸管結紮試験およびサル経口感染実験**，基礎と臨床，**26**，209-220，1992.

福山 正文，本間 和代，田口 真，村上 一，伊藤 武，原 元宣，田淵 清，光崎 研一，村田 元秀：**食肉における運動性 *Aeronas* 汚染状況および分離菌株のファージ型**，食品と微生物，**8**，221-225，1992.

福山 正文，川上久美子，今川 八束，伊藤 武，原 元宣，田淵 清：**運動性 *Aeromonas* 感染症に関する研究：3）ヒト下痢症から分離された運動性 *Acromonas* 属のファージ型別**，感染症学雑誌，**66**，628-631，1992.

竹葉 和江，松本 昌雄：**乳・乳製品中への肝蛭駆除剤ニトロキシニールの移行と残留**・日本公衛雑誌，**39**(2)，75-82，1992.

神保 勝彦，松本 昌雄：**畜・水産食品中に残留する抗菌性物質の微生物学的検査法の基礎的検討**：食品と微生物，**8**，227-232，1992.

北島 拓弥，上寺 裕之，山崎 悦子，神崎 政子：***Pasteurella multocida* が検出された猫による咬症の一**

例：皮膚病診療，**14**(2)，147-150，1992.

Ibe, A., Saito, K., Nakazato, M., Kikuchi, Y., Fujinuma, K. and Nishima, T.: **Quantitative Determination of Amines in Wine by Liquid Chromatography**, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 695-698, 1991.

守安　貴子，斉藤　和夫，中里　光男，石川ふさ子，藤沼　賢治，二島太一郎：**食品中のアセスルファムK，サッカリン及びアスパルテームの分析法**，衛生化学，**37**，97-102，1991.

Nakazato, N., Morozumi, S., Saito, K., Fugimura, K., Nishima, T. and Kasai, N.: **Production of Aflatoxins and Aflatoxicols by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasticus* and Metabolism of Aflatoxin B_1 by Aflatoxin-non producing *Aspergillus flavus***, *EISEI KAGAKU* **37**, 107-116, 1991.

Nakazato, M., Morozumi S., Saito, K., Fujinura, K., Nishima, T. and Kasai, N.: **Enzymatic Interconversion of Aflatoxin B_1 and Aflatoxicol by *Rhizopus* sp.**, *EISEI KAGAKU* **37**, 288-295, 1991.

井部　明広，田村　行弘，上村　尚，田端　節子，橋本　秀樹，飯田　真美，二島太一郎：**市販味噌及び醤油中の不揮発性アミンの分析法及びその含有量**，衛生化学，**37**，379-386，1991.

斉藤　和夫，西島　基弘，早川　和彦，宮崎　利夫：**マンネンタケ（*Ganoderma lucidum*）の培養基および子実体部位の違いによる抗腫瘍活性の比較**，*Trans. Mycol. Soc. Japan*, **32**, 355-361, 1991.

只野　敬子，安田　和男，牛山　博文，二島太一郎：**麻痺性貝毒のマウス試験におけるカルシウムの影響**，食品衛生学雑誌，**32**，402-407，1991.

永山　敏廣：**農産物中の残留農薬**，都薬雑誌，**13**(11)，19-28，1991.

Ibe, A., Nishima, T. and Kasai, N.: **Formation of Tyramine and Histamine During Soybean Paste (Miso) Fermentation**, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.* **38**, 181-187, 1992.

Saito, K., Nishijima, M. and Miyazaki, T.: **Structure of a Heterglycan Isolated from the Fungus *Omphalia lapidescens***, *Carbohydrate Research*, **224**, 209-217, 1992.

Saito, K., Nishijima, M., Ohno, N., Yadomae, T. and Miyazaki, T.: **Structure and Antitumor Activity of the Less-Branched Derivatives of an Alkali-Soluble Glucan Isolated from *Omphalia lapidescens* (Studies on Fungal Polysaccharide. XXXVIII)**, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 261-263, 1992.

Nagayama, T., Kikugawa, K.: **Influence of Frying and Baking on Chloropham Residue,** *Japanese Journal of Toxicology and Euvironmental Health*, **38**, 78-83, 1992.

吉川　翠：**家屋内生息性ダニ類の生態および防徐に関する研究(1)**，家屋害虫，**13**(2)，75-85，1991.

牧野　国義：**東京都の長期間の死亡データから得られる構成要素について**，公衆衛生，**56**(2)，126-131，1992.

Seto, H. and Ohkubo, T.: **Determination of a Guanosine-malonaldehyde Adduct in Urine by High-performance Liquid Chromatography with a Thiobabituric acid Reaction Detector,** *Journal of Chromatography* (Biomedical Applications), **570**, 301-307, 1991.

古畑　勝則，小池　和子，小池　淳平，岸川　正剛，

福山 正文, 田口 英昭, 土屋 悦輝, 松本 淳彦：**飲料用タンク水から高頻度に分離された *Protomonas extorquens* の塩素抵抗性機構**, 防菌防黴, **19**, 395-399, 1991.

Tsuchiya, Y., Watanabe, M. F. and Watanabe, M.: **Volatileorganic Sulfur Compounds Associated with Blue-Green Algac from Inland Waters of Japan**, *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 123-130, 1992.

岡本 寛, 大橋 則雄, 笹野 英雄：**GC-MS による環境試料中の *N, N*-ジメチルホルムアミドの定量**, 環境化学, **2**, 45-51, 1992.

Watanabe, M. F., Tsuji, K.,Watanabe, Y. Harada, K. I. and Suzuki, M: **Release of Heptapeptide Tox in (Microcystin) During the Decomposition Process of *Micyocystis aeruginosa***., *Natural Toxins*, **1**, 48-53, 1992.

Fujitani, T., Yoneyama, M., Ueta, T., Mori, K. and Ichikawa, H.: **New Metabolites of Thiabendazole and the Metabolism of Thiabendazole by Mouse Embryo In Vivo and In Vitro**, *Ed. Chem. Toxic.*, **29**, 265-274, 1991.

佐々木美枝子：**判り易い毒性学**, 皮膚と美容, **23**(2), 3789-3794, 1991.

Nakagawa, Y., Cotgreve, I. A. and MOLDEUS, P.: **Relationships between Ascorbic Acid and α-Tocopherol during Diquat- Induced Redox Cycling in Isolated Rat Hepatocytes**, *Biochemical Pharmacology*, **42**, 883, 1991.

Nakagawa, Y. and Kramer R.: **Nephrotoxicity of 5-(N-phenylcarboxamido)-2-thiobarbituric acid in the Fischer 344 Rat**, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **25**, 109-113, 1991.

Tanaka, T.: **Effects of Piperonyl butoxide on F_1 Generation Mice**, *Toxicology Letters*, **60**, 83-90, 1992.

Nakagawa, Y., Moldeus, P. and Moore, G. A.: **Cytotoxicity of Ortho-Phenylphenol in Isolated Rat Hepatocytes**, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 159-165, 1992.

Nakagawa, Y., Tayama, S., Moore, G. A. and Moldeus, P.: **Relationship between Metabolism and Cytotoxicity of *ortho*-Phenylphenol in Isolated Rat Hepatocytes**, *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1431-1437, 1992.

Fujii, T., Mikuriya, H., Sasaki, M.: **Chnonic Oral Toxicity and Carcinogenicity Study of Thiabendazole in Rats**., *Fd. Chem. Toxicol.* **29**, 771-775, 1991.

三栗谷久敏, 藤井 孝, 佐々木美枝子：**マウスにおけるオルトフェニルフェノール及びチアベンダゾールの同時投与による慢性毒性試験**, 食品衛生学雑誌, **33**(3), 274-282, 1992.

平田 一郎, 鈴木 敬子, 池島 伸至, 新井 輝義, 神真 知子, 楠 くみ子, 入倉 善久, 伊藤 武：**Oxoid Salmonella Ra-pid Test セットによる食肉からのサルモネラ迅速検査法の検討**, 食品と微生物, **8**, 151-156, 1991.

大石 充男, 池島 伸至, 入倉 善久, 古川裕季子, 大西 和夫, 寺山 武, 西島 基弘, 中澤 裕之：**食肉中のニコチン酸アミドからニコチン酸生成に関与する細菌の検討**, 食品衛生学雑誌, **32**, 25-29, 1991.

田口 信夫, 天川 映子, 大西 和夫, 西島 基弘,

鈴木　雅子，宮沢　文雄，濱田　　昭：**生鮮野菜に使用されたリン酸の簡易検査法**，衛生化学，**37**，405-410，1991.

竹内　正博：**ガスクロマトグラフィーによる環境中の有機スズ化合物の分析（Ⅰ）臭化水素酸処理カラムを用いる直接分析法**，環境と計測技術，**18**(6)，32-42，1991.

竹内　正博：**ガスクロマトグラフィーによる環境中の有機スズ化合物の分析（Ⅱ）東京湾の有機スズ汚染調査**，環境と計測技術，**18**(7)，57-67，1991.

矢口久美子，渡辺　　学，平田　一郎，伊藤　　武，濱田　　昭：**嫌気性士壌細菌によるテトラクロロエチレンの分解に関する研究**，水質汚濁研究，**14**，479-486，1991.

Wang, G. -H., Yan, K. -T., Feng, X. -M., Chen, S. -M., Liu, A. -P., Kokubo, Y.: **Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Retail Meats in Beijing.**, *J. Food Protec.*, **55**, 56-58, 1992.

総 説・解 説

大橋　　誠，宮村紀久子，倉科　周介：**わが国における感染症の情報システムの沿革，(1)病原微生物検出情報システム誕生の前夜**，公衆衛生，**55**，642-644，1991.

寺山　　武：**食べものに由来するいろいろな病気，野菜・穀類，その他で起こる病気**，保健の科学，**33**，758-762，1991.

工藤　泰雄：**Vero 毒素産生性大腸菌O157：H 7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毒素産生性大腸菌）とその疾病**，感染症，**21**，81-90，1991.

工藤　泰雄：**腸管出血性大腸菌**，*Medical Corner*, **89**，22-25，1991.

甲斐　明美：**目でみる保健衛生データ，食中毒**，公衆衛生，**55**，342-343，1991.

松下　　秀，工藤　泰雄：**コレラ菌（*Vibrio cholerae* 01）の検査法**，*Medical Technology*, **19**，749-754，1991.

工藤　泰雄：**特集・細菌性食中毒，最近の傾向と対策**，*Medical Tribune*, **24**，No, 24，1991.

甲斐　明美，工藤　泰雄：**下痢原性大腸菌（腸管病原性大腸菌）の分類**，臨床と微生物，**18**，493-498，1991.

工藤　泰雄，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌（ベロ毒素産生性大腸菌）とその疾病**，日本医事新報，**3510**，164-165，1991.

工藤　泰雄：**わが国における細菌性食中毒発生の現状と今後の問題点**，東京都予防医学協会年報（1990年度），**21**，1992.

清水　　賢，橋本　　篤，五十嵐英夫：**遠赤外線技術**，*New Food Industry*, **33**，23-30，1991.

伊藤　武：***Helicobacter pylori* に関する最近の知見**，*Medical Technology*, **19**, 892-893, 1991.

伊藤　武：**サルモネラ食中毒の現況と予防対策**，食品衛生，**35**, 12-18, 1991.

伊藤　武：**豚肉・豚肉製品の安全性**，養豚の友，(6), 20-24, 1991.

金沢　裕，伊藤　武，深見トシエ：**カンピロバクター（含：ヘリコバクターピロリー）**，化学療法の領域，**7**，2363-2371, 1991.

伊藤　武，甲斐　明美：**Vero 細胞毒素産生性大腸菌の細菌学的特徴と感染症**，メディヤサークル，**36**, 149-161, 1991.

伊藤　武，新井　輝義，平田　一郎：***Bacillus thuringiensis* の人体に対する下痢原性について**，植物防疫，**45**, 510-514, 1991.

伊藤　武：**食中毒の予防**，公衆衛生，**55**, 617-621, 1991.

伊藤　武：**食品と細菌汚染-食品中における病原細菌の動態**，食品と微生物，**8**，85-94, 1991.

仲真　晶子：**乳・乳製品汚染とリステリア症**，獣医畜産新報，**44**(12), 21-26, 1991.

伊藤　武，高橋　信一：**カンピロバクターとヘリコバクター感染症に関する研究の進展**，モダンメディア，**38**, 139-152, 1992.

松本　昌雄：**乳及び乳製品による病気**，保健の科学，**33**, 752-757, 1991.

中澤　裕之，藤田　昌彦，堀江　正一，竹葉　和江：**畜水産食品中の抗菌性物質などの残留問題**(1), (2)，畜産の研究，**46**(1), 135-139, (2), 287-294, 1992.

風間　成孔：**「医療用成形パップ剤製造管理及び品質管理に関する基準」（外用剤開発研究会自主基準）制定の経緯と概要**，外用剤開発研究会会報別冊，1-5, 1991.

田中　誠：**植物を用いた江戸時代の書籍害虫防除法**，家屋害虫，**13**(2), 89-90, 1991.

吉川　翠：**住宅近代化の盲点**，住サイエンス，28-32, 1991.

吉川　翠，入江　建久：**ダニ検知シートおよび吸引法による家屋内生息ダニ類・ダニアレルゲン調査**，環境管理技術，**10**(1), 15-19, 1992.

古畑　勝則：**空間用冷却塔水によるレジオネラ感染症について**，都薬雑誌，**13**(12), 38-47, 1991.

小久保彌太郎：**食品を対象とした *Listeria monocytogenes* の検査法**，食品と微生物，**8**，1-11, 1991.

小久保彌太郎：**Zoonosis としてのリステリア症-乳・乳製品以外の食品汚染とリステリア症**，獣医畜産新報，**44**, 775-778, 1991.

矢口久美子：**有機塩素化合物の微生物による分解除去**，用水と廃水，**33**, 38-43, 1991.

小久保彌太郎：**畜産食品のリステリア汚染**，畜産の研究，**46**，168-174，1991.

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1991.4—1992.3)

学会発表

松下　秀，工藤　泰雄，大橋　誠：**東京において最近10年間（1980-1989）に分離された赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

松下　秀，甲斐　明美，楠　淳，工藤　泰雄，大橋　誠：**下痢症患者からの既知病原菌（EPEC）血清型に該当しない細胞付着性大腸菌（EAEC）の検出状況と分離株の諸性状**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

甲斐　明美，山田　澄夫，松下　秀，尾畑　浩魅，柳川　義勢，楠　淳，高橋　正樹，新垣　正夫，工藤　泰雄，大橋　誠，相楽　裕子，正司　房：**東京における集団・散発下痢患者からのVero毒素産生性大腸菌の分離状況とその分離例について**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

工藤　泰雄，松下　秀，稲葉美佐子，楠　淳，山田　澄夫，大橋　誠：**東京において分離された国内及び海外由来 *Salmonella* ser. Enteritidis のファージ型分布ー1981-1989年の調査成績ー**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

楠　淳，尾畑　浩魅，甲斐　明美，柳川　義勢，高橋　正樹，新垣　正夫，工藤　泰雄，大橋　誠：**1990年東京において発生した *Salmonella* ser. Enteritidis による食中毒事件について**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

蛭田　徳昭，日守満里子，羽布津雅子，岡村　登，松下　秀，工藤　泰雄：**B群赤痢菌の新しい血清型が疑われる海外旅行者下痢症の一例**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

熊坂　一成，工藤　泰雄，山口　恵三，大橋　誠，河野　均也：**微生物検査外部精度管理の現状と問題点ー第8回東京都衛生検査所精度管理結果報告ー東京都衛生検査所精管理検討委員会**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

伊藤健一郎，G.K.D. Karunaratne，渡辺　治雄，伊藤文明，岸本　亜弓，荻野　武雄，松下　秀，工藤　泰雄，小坂　哲也，豊里　満了，水野　耕治：**混合プライマーを用いたPCR法による腸管病原性大腸菌の病原遺伝子同時検出法**，第65回日本感染症学会総会（1991，4）.

田代　博一，三浦総一郎，黒瀬　厳，福村　大，鈴木　秀和，芹沢　宏，吉岡　政洋，末松　誠，今枝　博之，塩崎　裕士，土屋　雅春，大橋　誠，甲斐明美：**Verotoxin(VT)による出血性腸炎発症機序における脈管作動性物質の役割**，第16回日本微小循環学会（1991，4）.

藤川　浩，潮田　弘，五十嵐英夫，工藤　泰雄：**溶液浮遊細菌に対するマイクロ波の殺菌作用**，日本食品衛生学会第61回学術講演会（1991，5）.

戸島由美子，近藤　誠一，井口　穀裕，久垣　和仁，松下　秀，工藤　泰雄：**新型O抗原を持つ *Shigella flexneri* 88-893のO抗原リポ多糖（LPS）の免疫化学**，第65回細菌学会関東支部総会（1991，6）.

井上　栄，工藤　泰雄：**シンポジウム「細菌感染症診断法の進歩」（司会）**，衛生微生物技術協議会第12回研究会（1991，7）.

Kudoh, Y., Kai, A., Yamada, S., Obata, H., Matsushita, S. and Ohashi, M.: **Chracterization of Verotoxin-producing *Escherichia coli* Isolated in Japan.** The 27th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel（1991，9）.

鈴木　雅之，三浦総一郎，末松　　誠，福村　　大，黒瀬　　厳，土屋　雅春，大橋　　誠，甲斐　明美：***Helicobacter pylori*** **による胃粘膜障害発症の機序－好中球由来活性酸素 monochloramine の関与**，第33回日本消化器病学会（1991，10）．

工藤　泰雄：**特別講演，疫学からみた腸炎ビブリオ食中毒の現状と問題点**，第25回腸炎ビブリオシンポジウム（1911，11）．

松下　　秀，工藤　泰雄，島田　俊雄：***Vibrio fluvialis/furnissii*** **の血清型別について**，第25回腸炎ビブリオシンポジウム（1991，11）．

山田　澄夫：シンポジウム，**コレラ，腸炎ビブリオ以外のビブリオ感染症**，第12回食品微生物学会（1991，11）．

潮田　　弘，藤川　　浩，五十嵐英夫，工藤　泰雄：**各種調理済食品からの黄色ブドウ球菌検出法の検討**，第12回食品微生物学会（1991，11）．

柳川　義勢，高橋　正樹，甲斐　明美，楠　　淳，新垣　正夫，尾畑　浩魅，稲葉美佐子，斉藤　香彦，伊藤　　武，工藤　泰雄：**1978年-1990年の13年間に東京都内で発生したウェルシュ菌食中毒について**，第12回食品微生物学会（1991，11）．

諸角　　聖，和宇慶朝昭，田村　行弘，工藤　泰雄：**石油臭の発生した市販煮豆の臭気発生原因に関する真菌学的検討**，第12回食品微生物学会（1991，11）．

Kudoh, Y., Kai, A., Yamada, S., Obata, H., Matsushita, S., Kusunoki, J. and Ohashi, M.: **Diarrhea due to Verotoxin- producing *E. coli* (VTEC) in Japan and Characterization of VTEC Isolates**, 第7回有毒微生物国際シンポジウム（1911，11）．

戸島由美子，井口　穀裕，近藤　誠一，久垣　和仁，松下　　秀，工藤　泰雄：**新型抗原を持つ *Shigella flexneri* 88-141のO抗原（内毒素）リポ多糖（LPS）の化学的，血清学的性状**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）．

甲斐　明美，尾畑　浩魅，楠　　淳，高橋　正樹，新垣　正夫，柳川　義勢，山田　澄夫，工藤　泰雄，大橋　　誠：**Vero 毒素産生性大腸菌 OUT: H 19によると推定された集団下痢症の疫学的・細菌学的検討**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）．

山田　澄夫，松下　　秀，甲斐　明美，工藤　泰雄，大橋　　誠：**Vero 毒素産生性大腸菌による散発・集団下痢症および溶血性尿毒素性症候群における細菌学的・毒素学的検討**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）．

工藤　泰雄，松下　　秀，稲葉美佐子，楠　　淳，山田　澄夫，尾畑　浩魅，甲斐　明美，柳川　義勢，高橋　正樹，新垣　正夫，大橋　　誠：**東京において分離された国内及び海外由来 *Salmonella* ser. Enteritidis のファージ型，薬剤感受性及びプラスミドプロファイル**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）．

松下　　秀，山田　澄夫，稲葉美佐子，楠　　淳，工藤　泰雄，大橋　　誠：**東京において1980-1990年に分離された海外及び国内由来サルモネラの血清型と薬剤耐性**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）．

内山　竹彦，荒明美奈子，厳　　小傑，宮永　幸実，今西　健一，五十嵐英夫：**MHC クラスⅡ結合性細菌外毒素によるT細胞活性化の機序－血管内皮細胞のアクセサリー活性と血管炎のモデル実験－**，第38回毒素シンポジウム（1991，8）．

五十嵐英夫，潮田　　弘，藤川　　浩：**1981～85年に臨床材料から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別および toxic shock syndrome toxin-1 ならびにエ**

ンテロトキシンの産生性，第36回ブドウ球菌研究会（1991，9）.

橋本　篤，清水　賢，五十嵐英夫：**遠赤外線照射による湿潤固体表面および内部に存在する細菌の殺菌効果**，第24回化学工業会秋季大会（1991，10）.

井上　豊，奥山　雄介，柏木　義勝，遠藤美代子，奥野　ルミ：**健康学童からの溶血レンサ球菌分離状況と薬剤感受性**，第40回日本感染症学会東日本地方会総会（1991，10）.

村井　貞子，稲積　温子，柏木　義勝，遠藤美代子，奥野　ルミ，徳丸　実，縣　俊彦：**一地域で分離された上気道感染症由来A群溶レン菌の抗生剤感受性の推移に関する研究ー松山市における16年間の観察ー**，第40回日本感染症学会東日本地方会総会（1991，10）.

村田以和夫：**1985～90年間のアニサキス，宮崎肺吸虫及び剛棘顎口虫の水揚げ地・産地別及び魚種別寄生状況**，第51回寄生虫学会東日本大会（1991，10）.

五十嵐英夫，藤川　浩，潮田　弘：**市販ブドウ球菌エンテロトキシン検出用キットの比較検討**，第12回食品微生物学会（1991，11）.

玉内　秀一，五十嵐英夫，西村　孝司，垣生　園子：**胸腺ストローマ細胞株（TNC-R 3・1）に依存したSEAによる（CD 4＋，CD 8＋）未熟胸腺細胞の分化誘導**，第21回免疫学会総会（1991，11）.

厳　小傑，季　暁宇，宮永　幸実，今西　健一，五十嵐英夫，内山　竹彦：**スーパー抗原特性を有するブドウ球菌外毒素によるT細胞サブセット（CD 4＋，CD 8＋細胞）の活性化の機序**，第21回免疫学会総会（1991，11）.

今西　健一，小野　澄子，五十嵐英夫，内山　竹彦：**A群レンサ球菌発熱性外毒素のヒトT細胞活性化とHLA クラスⅡ分子への結合性**，第21回免疫学会総会（1991，11）.

木村　昭夫，五十嵐英夫，奥住　捷子，小林　寛伊：**全国国立大学病院より分離された黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別，毒素産生性及び抗菌剤感受性に関する疫学的研究**，第7回日本環境感染学会総会（1992，2）.

加藤　秀人，小幡　文弥，成松　久，八木　淳二，今西　健一，柏木　登，五十嵐英夫，内山　竹彦：**T細胞受容体Vβ特異的プライマーを用いたPCR法によるスーパー抗原活性T細胞のVβ定量**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

厳　小傑，季　暁宇，今西　健一，熊沢　義雄，宮永　幸実，五十嵐英夫，内山　竹彦：**スーパー抗原特性を有するブドウ球菌外毒素によるT細胞サブセットの活性化機序の解析**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

季　暁宇，厳　小傑，今西　健一，八木　淳二，五十嵐英夫，内山　竹彦：**ブドウ球菌外毒素応答性T細胞クローンとハイブリドーマを用いてT細胞活性化の機構の解明**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

五十嵐英夫，宇佐美博幸，今西　健一，内山　竹彦，大国　寿士，川畑俊一郎，岩永　貞昭：***Streptococcus pyogencs* 18が産生する発熱性毒素の精製とその性状について**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

一山　智，太田美智男，加藤　延夫，五十嵐英夫：**パルスフィールド電気永動によるMRSA院内感染の疫学的研究（続報）**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

高田春比古，田村　正人，川畑　義裕，新垣理恵子，

五十嵐英夫，小谷　尚三：**口腔レンサ球菌発熱毒素のサイトカイン誘導作用**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

留目　優子，水瀬　　学，大国　寿士，橋本　安弘，江崎　孝行，五十嵐英夫，小谷　尚三：**川崎病患者の咽頭並びに歯面より分離される緑色レンサ球菌の性状に関する研究**，第65回日本細菌学会総会（1992，3）.

清水　裕幸，山口　輝彦，上原　俊男，初鹿　野浩，浅村　信二，林　　志直，太田　建爾，関根　整治，中村　清純：**保育園で起きたエコーウイルス30型による無菌性髄膜炎の集団発生**，第86回東京都衛生局学会（1991，5）.

秦　　和寿，坂下　一則，柿崎　征夫，猪俣　陽子，宮下　　潔，渡辺　　稔，赤谷　　勇，伊藤　忠彦，山崎　　清，太田　建爾：**東京の山地における病害動物とその人体被害（第2報）**，第86回東京都衛生局学会（1991，5）.

角田　隆文，相楽　祐子，新田　義朗，片野てい子，町井　　彰，松原　義雄，坪井　義昌，伊藤　忠彦：**紅斑熱群リケッチア症の1症例**，第40回日本感染症学会（1991，10）.

関根　整治，林　　志直，安東　民衛，太田　建爾，柳川　義勢，楠　　淳，甲斐　明美，高橋　正樹，新垣　正夫，尾畑　浩魅，工藤　泰雄，井元　浩平，小西伸義：**東京都で発生したC群ロタウイルス下痢症の集団例**，第87回東京都衛生局学会（1991，10）.

勢戸　祥介，安東　民衛，春木　孝祐，木村　輝男，林　　志直，関根　整治，岡田正次郎，太田　建爾，三木　　隆，Xi Jiang, J. wang, Mary K. Estes：**免疫電顕法により9種類に分類されたSmall round structured virus (SRSV) のRNAポリメラーゼ領域における遺伝子の相同性について**，第39回ウイルス学会総会（1991，10）.

関根　整治，安東　民衛，林　　志直，太田　建爾，三水　　隆：**SRSV血清診断法として利用されているELISA法とウエスタンブロット法の比較**，第39回日本ウイルス学会総会（1991，10）.

貞升　健志，大貫奈穂美，関根　大正，太田　建爾，三木　　隆：**HIV-1抗体検査におけるウエスタンブロット判定保留例の二段PCR**，第39回ウイルス学会総会（1991，10）.

岡田　裕之，高浜　英人，渡辺　理恵，奥田　　賢，渡辺　晋一，高橋　　久，伊藤　忠彦：**恙虫病の2例**，日本皮膚学会第678回東京地方会（1991，11）.

金　　台東，本多　裕之，白神　直弘，海野　　肇，矢野　一好：**活性汚泥によるウイルスの除去に及ぼす温度及びpHの影響**，第26回日本水環境学会（1992，3）.

大貫奈穂美，関根　大正，貞升　健志，中村　　弘，太田　建爾，三木　　隆，岡田　嘉仁，奥山　　徹：**天然由来抗HIV活性物質に関する研究（Ⅱ）マクリ水抽出物の抗HIV作用機序**，日本薬学会第112年会（1992，3）.

Cuuningham, A., Yeung, S., Kazazi, F., Randle, C., Howard, R., Rizbi, N., Donovan, B., Cooper, D., Sekine, H., Dwyer, DE.: **Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Have Low Levels of Virus in Saliva Even in the Presence of Periodontal Disease**, Proceeding of 3rd Annual Conference on Medical and Scientific Aspects of the Australian Society for HIV Medicine 1991 (1991, 7).

Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., kaneko, M., Moniwa, T., Tosa, K. and Taguchi, K.: **Removal Efficiencies**

of Microorganisms in Wastewater Treatment Processes, Proceedings of 3rd IAWPRC Regional Conference Asian Waterqual' 91 (1991, 11).

浜野 朋子, 安田 一郎, 瀬戸 隆子, 高野伊知郎, 高橋奈穂子, 渡辺四男也, 秋山 和幸：**六味丸（散剤）に関する研究ー調製と経時変化についてー**, 日本生薬学会第38年会（1991, 9）.

宮武ノリエ, 上原 真一, 重岡 捨身, 長嶋真知子, 渡辺四男也：**プラスチック容器入り外用液剤の内容量と成分含量の経時変化について**, 第28回全国衛生化学技術協議会年会（1991, 10).

高野伊知郎, 瀬戸 隆子, 安田 一郎, 浜野 朋子, 高橋奈穂子, 渡辺四男也：**牛黄清心丸中の水銀及びヒ素の分析**, 第28回全国衛生化学技術協議会年会（1991, 10).

久保 秀一, 吉永 和恵, 安田 一郎：**中医学的軟膏剤の製造と基礎研究**, 第87回東京都衛生局学会（1991, 11).

吉永 和恵, 石田 洋子, 升水 達郎, 久保 秀一, 安田 一郎：**中医外用剤の研究（その2）ー臨床応用についてー**, 第87回東京都衛生局学会（1991, 11).

萩原 輝彦, 渡辺四男也：**tert- Butylidimethyl- sily化ーキャピラリー GC によるサンヤク中のアラントインの定量**, 日本薬学会第112年会（1992, 3）.

上原 真一, 安田 一郎, 竹谷 孝一, 糸川 秀治：**クルクマ属におけるビサボラン型セスキテルペノイド及びクルクミノイドの分布**, 日本薬学会第112年会（1992, 3）.

高野伊知郎, 上原 真一, 安田 一郎, 渡辺四男也, 竹谷 孝一, 糸川 秀治, 北川 勲：**市場品葵朮の品質評価**, 日本薬学会第112年会（1992, 3）.

池田 一夫, 倉科 周介, 大橋 誠：**世代マップー人口動態統計の情報表現ー**, 日本人口学会第43回大会（1991, 5）.

植田 忠彦, 市川 久次, 五十嵐 脩：**HPLC による生体試料中の all-rac-α-Tocophrol 立体異性体分析法について**, 日本ビタミン学会第43回大会（1991, 5）.

Ueda, T., Ichikawa, H. and Igarashi, O.: **Determination of α- Tocopherol Stereoisomers in Biological Specimens by Chiral Phase High Performance Liquid Chromatography**, International Symposium on Vitamin E (1991, 9).

森謙 一郎, 中村 義昭, 金子 正美, 観 照雄, 雨宮 敬, 鈴木 助治, 中村 弘：**家庭用エアゾル製品中の1，1，1-トリクロロエタン及び1，4-ジオキサンの分析法**, 第28回衛生化学技術協議会年会（1991, 10).

岸本 清子, 池田 一夫, 鈴木 助治, 中村 弘：**HPLC 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及びジヒドロカプサイシンの定量**, 第28回衛生化学技術協議会年会（1991, 10).

伊藤 弘一, 佐藤 憲一, 鈴木 助治, 中村 弘：**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タール色素の分析**, 第28回衛生化学技術協議会年会（1991, 10).

水石 和子, 竹内 正博, 山野辺秀夫, 中村 弘：**有機スズ化合物の魚類体内分布**, 平成3年度日本水産学

会秋季大会（1991, 10）.

池田　一夫，荻野　周三，神谷　信行，倉科　周介：**疾病動向予測システムの開発**，第87回東京都衛生局学会（1991, 11）.

池田　一夫，倉科　周介：**政策支援システム**，Proceedings of Advanced Database System Symposium '91（1991, 12）.

池田　一夫，倉科　周介：**疾病動向予測システム**，第5回公衆衛生情報研究協議会定期研究会（1992, 1）.

観　照雄：**家庭用品に使用される化学物質の検索と使用実態調査**，平成3年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部理化学部会（1992, 2）.

植田　忠彦，市川　久次，五十嵐　脩：**α-トコフェロール立体異性体のラットの生体内動態**，第3回ビタミンE研究会（1992, 2）.

伊藤　弘一，雨宮　敬，鈴木　助治，中村　弘：**HPLCによるフレグランス製品中のサリチル酸ベンジルの分析**，日本薬学会第112年会（1992, 3）.

中村　弘，関根　大正，大貫奈穂美，貞升　健志，太田　健爾，三木　隆，岡田　嘉仁，奥山　徹：**天然物由来抗HIV活性物質に関する研究（I）マクリ及びその他の紅藻中の多糖について**，日本薬学会第112年会（1992, 3）.

金子　誠二，小久保彌太郎，丸山　務，福島　博：**ヒトおよび各種動物から分離された *Yersinia pseudotuberculosis* に保有されるプラスミドの比較**，第111回日本獣医学会（1991, 4）.

飯田　孝，神崎　政子，小久保彌太郎，丸山　務：***Listeria* 属菌検出用ELISAキットの評価と動物の腸内容物への応用**，第111回日本獣医学会（1991, 4）.

井上　智，森田　千春，谷川　力，清水　隆行，飯田　孝，丸山　務，：**関東近辺に生息するドブネズミ（*Rattus norvegicus*）の *Listeria* 保菌**，第111回日本獣医学会（1991, 4）.

沢田　拓士，吉田　孝治，高橋　敏雄，Pathanasophon, P.，神崎　政子，鈴木　祥子，田中まゆみ，後藤　彰，高橋　勇：**最近わが国で分離された豚丹毒菌の血清型と薬剤感受性**，第111回日本獣医学会（1991, 4）.

神保　勝彦，門間　千枝，丸山　務，松本　昌雄，木内　正光，園田　康行，山田　隆昭：**抗菌性物質のニジマス体内における残留と加熱調理による消長について**，日本食品衛生学会第61回学術講演会（1991, 5）.

橋本　常生，宮崎　奉之，丸山　務，松本　昌雄：**EIAキットによる牛肉ゼラノールの測定**，日本食品衛生学会第61回学術講演会（1991, 5）.

宮川　弘之，堀井　昭三，井草　京子，丸山　務：**蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによるピリメタミンの分析**，日本食品衛生学会第61回学術講演会（1991, 5）.

Iida, T., Maruyama, T. and Kanzaki, M.: **Isolation of *Listeria monocytogenes* from Intestinal Contents of Healthy Animals in Japan**, International Conference Listeria and Food Safety（1991, 6）.

Miyazaki, T. Hashimoto, T. Maruyama, T. Matsumoto M.: **Determination of Anabolic Agents in Beef by High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry / Gas Chromatography**. 24th

World Veterinary Congress (1991, 8).

竹葉 和江, 村上 文子, 松本 昌雄, 中澤 裕之：**電気化学検出 HPLC による牛乳中のニトロキシニールの分析**, 日本食品衛生学会第62回学術講演会 (1991, 10).

仲真 晶子, 金子 誠二, 梅木富士郎, 小久保彌太郎, 井上 智, 丸山 務：**PCR 法によるチーズからの *Listeria monocytrgenes* の検出**, 第112回日本獣医学会 (1991, 10).

金子 誠二, 小久保彌太郎, 丸山 務：**PCR 法を用いた *Yersinia enterocolitica* と *Yersinia pseudotuberculosis* の病原性評価**, 第112回日本獣医学会 (1991, 10).

井上 智, 柳 忠湖, 五十君静信, 熊谷 進, 仲真 晶子, 飯田 孝, 森田 千春, 内貴 正治：**PCR 法による *Listeria monocytogenes* の同定方法の検討**, 第112回日本獣医学会 (1991, 10).

村上 睦子, 飯田 孝：**生食用馬肉における *L. monocytogenes* 汚染状況**, 平成3年度九州地区獣医公衆衛生学会 (1991, 10).

梅木富士郎, 仲真 晶子, 伊藤 武, 松本 昌雄：**嫌気性乳酸菌の簡易測定法とはっ酵乳, 乳酸菌飲料の品質評価について**, 第12回食品微生物学会 (1991, 11).

宮崎 奉之, 丸山 務, 松本 昌雄：**牛肉中の蛋白同化ホルモン HPLC 及び GC/MS による定量**, 平成3年度日本獣医公衆衛生学会 (1992, 2).

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)**, 平成3年度獣医公衆衛生学会 (1992, 2).

河野 一義, 飯田 孝, 加藤 行男, 金内 長司：**東京都内のレストランに生息するネズミにおける *Listeria monocytogenes* の保有状況と分離菌株の血清型**, 平成3年度日本獣医公衆衛生学会 (1992, 2).

桃沢 洋三, 竹葉 和江：**移相動・固定相交互変換交流クロマトグラフィー (CACC) のオキシクロザニド精製への応用**, 日本薬学会第112年会 (1992, 3).

Kamimura, H.: **A Survey of Mycotoxins in Commercial Foods**, ROC- Japan Seminar on Mycotoxins (1991, 9).

上村 尚, 田端 節子, 井部 明広, 飯田 真美, 嶋田 照江, 田村 行弘, 二島太一郎：**食品保管時におけるアフラトキシンの消長**, 日本食品衛生学会第62回学術講演会 (1991, 10).

飯田 真美, 上村 尚, 井部 明広, 田端 節子, 橋本 秀樹, 嶋田 照江, 田村 行弘, 二島太一郎：**アルコール飲料中のカルバミン酸エチル**, 日本食品衛生学会第62回学術講演会 (1991, 10).

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 二島太一郎：**輸入農産物における農薬残留の実態**, 第28回全国衛生化学技術協議会 (1991, 10).

永山 敏廣：**ポストハーベスト農薬をめぐる最近の話題**, 平成3年度地衛研全国協議会関東甲信静支部理化学部会 (1992. 2).

小関 正道, 関 比呂伸, 舟山 恵市, 栗原 裕子, 荻野 周三, 安野 哲子, 風間 成孔：**食物繊維の生理作用**, 第28回全国衛生化学技術協議会年会 (1991, 10).

門間　公夫，菊谷　典久，井口　正雄，友松　俊夫：**水耕栽培野菜中のミネラル含量**，第86回東京都衛生局学会（1991，5）.

門間　公夫，菊谷　典久，井口　正雄：**水耕野菜の栄養学的評価ー無機質含量についてー**，第38回日本栄養改善学会（1991，10）.

横山　知子，牛尾　房雄，井口　正雄，菊谷　典久，門間　公夫：**外食料理の栄養成分について**，第38回日本栄養改善学会（1991，10）.

牧野　国義：**東京都における1972-87年の呼吸器疾患死亡率月変動の特徴**，第61回日本衛生学会（1991，4）.

小野塚春吉：**環境化学物質の安全性評価における安全係数について**，第17回日本環境学会（1991，7）.

牧野　国義，丹後　俊郎：**大気汚染の健康影響の検出方法に関する考察**，第50回日本公衆衛生学会（1991，10）.

佐藤　泰仁：**室内塵（ハウスダスト）の性状及び挙動に関する調査研究（第一報）**，第50回日本公衆衛生学会（1991，10）.

吉川　　翠：**球形シリカ入りの畳による防ダニ法**，第50回日本公衆衛生学会（1991，10）.

瀬戸　　博，大久保智子，加納　堯子：**ヒト肺臓中の多環芳香族炭化水素の蓄積調査**，第32回大気汚染学会（1991，10）.

瀬戸　　博，大久保智子，加納　堯子：**ディーゼル排ガス中の粒子成分による8-ヒドロキシグアノシンの生成（Ⅰ）**，第32回大気汚染学会（1991，10）.

瀬戸　　博，大久保智子，加納　堯子：**ディーゼル排ガス中の粒子成分による8-ヒドロキシグアノシンの生成（Ⅱ）**，第32回大気汚染学会（1991，10）.

牧野　国義，鈴木　孝人，大沢　誠喜，池田　真吾，加納　堯子：**交絡要因を考慮したHOP指標について**，第32回大気汚染学会（1991，10）.

田中　　誠，吉川　　翠：**最近のダニ・昆虫関係の事故事例4例**，第13回日本家屋害虫学会年次大会（1992，1）.

土屋　悦輝，大橋　則雄，笹野　英雄，佐藤　美香：**内部標準法による農薬分析の検討**，日本薬学会第112年会（1992，3）.

大橋　則雄，土屋　悦輝，笹野　英雄，永嶋　太郎，濱田　　昭：**水中における有機リン農薬MPPのオゾン酸化**，日本薬学会第112年会（1992，3）.

大橋　則雄，土屋　悦輝，笹野　英雄，永嶋　太郎，濱田　　昭：**水中における農薬のオゾン分解スクリーニングと反応生成物の検索**，第26回日本水環境学会年会（1992，3）.

高橋　保雄，笹野　英雄，森田　昌敏：**MEP (Fenitrothion) 水溶液の塩素処理**，第26回日本水環境学会年会（1992，3）.

渡辺真利代，原田　健一，近藤　文雄，加藤　辰巳，渡辺　真之，鈴木　真言：***Microcystis* 毒素の変異と酵素多型**，第56回日本陸水学会大会（1991，11）.

Yoneyama, T., Fujitani, T. and Ogata, A.: **Metabolism of Thiabendazole by Mouse Embryo In Vitro and In Vivo**, The 11th International congress of Pharmacology, Amsterdam, Netherland (1990, 7).

藤谷 知子, 樺島順一郎, 高橋 省, 大石 真之, 米山 允子, 中野 雅行：**ピペロニルブトキシドのラットにおける亜急性博性**, 第18回日本毒科学会学術年会 (1991, 7).

田中 豊人, 大石 真之, 高橋 省：**Piperonyl Butoxide のマウスの後世代に及ぼす影響**, 第18回毒科学会学術年会 (1991, 7).

佐藤かな子, 長井二三子, 牛山 慶子, 安田 一郎, 秋山 和幸, 加納 いつ：**馬腎臓 Na, K- ATPase 活性に対する β -オイデスモールの作用**, 第64回日本生化学会大会 (1991, 10).

長井二三子, 牛山 慶子, 佐藤かな子, 加納 いつ：**ジブチルヒドロキシトルエンおよび代謝物による DNA 切断作用の検討**, 第64回日本生化学会大会 (1991, 10).

牛山 慶子, 長井二三子, 佐藤かな子, 加納 いつ：**^{32}P -ポストラベル法によるオルトフェニルフェノールおよびその代謝物の DNA 付加体について**, 第64回日本生化学会大会 (1991, 10).

藤井 孝, 佐々木美枝子, 角 千代, 安田 一郎, 他：**漢方方剤六味丸の安全性, 有効性に関する研究**, 第86回東京都衛生局学会 (1991, 5).

Sumi, C., Fukumori, N., Tada, Y.: **Infuluence of Androgen on the Function of Rat Pancreas**, Gordon Research Conference (1991, 7).

田山 邦昭, 坂本 義光：**高転移性ラット膀胱腫瘍移植株 (TKE B - 1) の樹立**, 第50回日本癌学会総会 (1991, 9).

神谷 信行, 小嶋 昭江, 中川 好男, 佐々木美枝子, 荻野 周三, 池田 一夫, 倉科 周介：**都衛研における LA 化の試み (第 2 報)**, 第43回情報処理学会 (1991, 10).

平田 一郎, 鈴木 敬子, 榎田 隆一, 池島 伸至, 甲斐 明美, 伊藤 武：**井戸水中における腸炎起病性大腸菌の生存と増殖**, 日本感染症学会第65回総会学術講演会 (1991, 4).

Takahashi, S., Igarashi, H., Ishiyama, N., Itoh, T., Hirata, I.: **Serial Change of Gastric Mucose after Challenge with *Helicobacter pylori* in the Cynomolgus monkey**, The 4 th International Symposium on *Helicobacter pylori* and its Disease. (1991, 5).

増田十茂子, 岩屋 美枝, 高良 実之, 秀永 将之, 中田 均, 三浦 平吉, 大久保 智, 木村 豊彦, 小久保彌太郎, 丸山 務：**鮮魚介類の *Listeria* 属菌ならびにその他の細菌汚染の実態**, 日本食品衛生学会第61回学術講演会 (1991, 5).

Kokubo, Y., Iida, T., Kaneko, S., Maruyama, T.: **Incidence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meat and Poultry in Japan**, The international conference on *Listeria* and safety (1991, 6).

高橋 真一, 五十嵐秀之, 石山 業弘, 中村 孝一, 伊藤 武, 平田 一郎：***Helicobacter pylori* と萎縮性胃炎-血清ペプシノゲンからの検討**, 日本消化器病学会第33回大会 (1991, 10).

Takahashi, S., Igarashi, H., Ishiyama, N., Itoh, T., Hira-

ta, I.: ***Helicobacter pytori* and Ammonia in Gastritis**. VI. International Workshop on *Campyobacter, Helicobacter* and Related Organisms (1991, 10).

Igarashi, H., Takahashi, S., Ishiyama, N., Itoh, T., Hirata, I.: **The Pathogenic Significance of *Hecicobacter pylori* in the Duodenal Ulcer**. VI. International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter* and Related Organisms (1991, 10).

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，中村　　弘：**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含有量**，日本水産学会平成3年度秋季大会（1991, 10).

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，中村　　弘：**有機スズ化合物のガスクロマトグラフィー－質量分析法（I）有機スズハライドの GC- EI- MS**，日本分析化学会第40年会（1991, 11).

竹内　正博，水石　和子，山野辺秀夫，中村　　弘：**新腹足目類における有機スズ汚染の影響（Ⅲ）バイにおけるトブチルスズ及びトリフェニルススズ含有量**，環境科学会1991年会（1911, 11).

小久保彌太郎：シンポジウム　**潜在的有害細菌と食中毒－*Listeria monocytogenes***，食品微生物学会第12回学術講演会（1991, 11).

神　真知子，平田　一郎，池島　伸至，新井　輝義，楠　くみ子，入倉　善久，鈴木　敬子，伊藤　　武：**食品および井戸水における下痢原性大腸菌の生存性に与える温度の影響**，食品微生物学会第12回学術講演会（1991, 11).

新井　輝義，平田　一郎，池島　伸至，神　真知子，楠　くみ子，入倉　善久，鈴木　敬子，伊藤　　武：**水中における下痢原性大腸菌の生存性に与える共存細菌および塩類の影響**，食品微生物学会第12回学術講演会（1991, 11).

小久保彌太郎：特別講演　**低温発育性病原菌と食品衛生－リストリア**，平成3年度日本獣医公衆衛生学会（1992, 2).

鈴木　俊也，矢口久美子：**シリンジタイプのミニカラムを利用した高速液体クロマトグラフィーによる水中のアシュラムのスクリーニング法**，日本水環境学会第26回年会（1992, 3).

矢口久美子，鈴木　俊也，平田　一郎，伊藤　　武，濱田　　昭：**嫌気性土壌細菌（T株）培養上清のテトラクロロエチレン分解性に及ぼす諸因子の影響**，日本水環境学会第26回年会（1992, 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
一　瀬　秀　樹
五十嵐　英　夫
中　村　　弘
風　間　成　孔
笹　野　英　雄
土　屋　悦　輝
加　納　い　つ
小久保　彌太郎

1992年12月　発行

規格表　第２類
印刷番号（４）419
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第43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）