ISSN 0082-4771

CODEN: TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL PEPORT

OF

THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

45

1994

"未病にして癒す"という言葉があります.治療の要諦は病気に罹らないようにすることだというほどの意味で、考えようによっては、これほど疾病対策の本質を衝いた言葉はないかも知れません.疾病対策の目的は病気の被害をできるだけ少なくすることです.ですから、病気が起こらない状況を作り上げて行くことは疾病対策の理想像にほかなりません.予防が究極の治療だといわれるのもそのためです.こうした表現の根底には、予防を治療の延長上に置く考え方がありますが、その一方で、予防と治療といずれの側から疾病対策を考えるかというのは、これから先、ことのほか重い内容を含んだ問い掛けになって行くように思えます.

それはさておき、予防という営みの根幹をなすのは、安全な生活環境の構築です。それがすべてだと断定するのは幾分か適切を欠くとしても、あながち大きな間違いではないでしょう。感染症から癌や成人病へ、さらには健康の維持増進へと、広義の疾病対策に対する社会の関心が時代によって遷り変わって行く中で、衛生研究所の業務の主題は常に生活環境の安全性というこの一点に置かれてきました。いわゆる学術研究がそのような変遷を誘導しあるいは追随する傾きにあるのとは対照的な性格を、衛生研究所の研究が持つゆえんです。知識の生産や技術の開発にも、目的や意義によっておのずと異なる領域が存在することはもっと明確に認識されるべきでしょう。

おりしも、厚生省は地域保健法の制定に続いて、旧臘、その基本指針を告示しました. その中で、地方衛生研究所は地域保健に関する調査研究と研修を行う科学的・技術的中核機関として再編成すべきものとされています. 再編成の目指すべき方向への示唆や萌芽を、この研究年報のそこここからあわせて読み取って戴ければ誠に幸いです.

多忙な時間を割いて編集に当たられたみなさんのご努力を多とすると共に,関係諸賢の渝ら ぬご理解とご支援を心からお願い申し上げます.

平成7年1月

東京都立衛生研究所長 倉 科 周 介

当

報文 I 感染症等に関する調査研究

キャピラリー電気泳動を用いた Campylobacter jejt	ıni の馬原	を酸加水									
	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •				千枝,					
			中斐	明美,	, 柳川	義勢,	伊滕	武・	••••••		3
Palcam 培地に発育する真菌の抑制及び培養温度	の検討										
		1	飯田	孝, *	神崎	政子,/	小久保	彌太郎,	丸山	務	7
ヒトふん便から分離された耐熱性芽胞形成ウェ									المريد		
								明美,		止天	11
	冶加	(百/心,	,一分旅	Æ \ ,	、八田) 连网,	上旅	%以正.			11
細菌学的精度管理に供試する各種菌株の基礎的	検討										
	遠藤	美代子,	,奥野	ルミ,	柏木	義勝,	五十	嵐英夫,	工藤	泰雄	16
東京都中のファマルテンルが会まで体 (1000年11月	10045	- 0 -									
東京都内のインフルエンザ検索成績 (1993年11月 			[] 山杏	涪	母族	中安	林	古士	思相	大正	1 Ġ
			trri uki	117,	IT MK	/E\/ > /	775	压,心,	IX/IX	ДШ.	10
東京都における1992年, 1993年の HIV 抗体検査											
•••••						由紀子,					
	山崎					大正,岂					00
	平田	一因, _	上膝	來雌…	*******	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	•••••		•••••	23
都立病院における先天性代謝異常症スクリーニ	ング成績	(1988-1	1993)				•				
	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••		…安部	昭子,	柴田	実,	高野	弘紀	28

報文Ⅱ 医薬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7報)	Anisaki	s I型	幼虫に	対する	有効生	薬より	単離さ	れた天	然化	
合物及び誘導体の最小致死濃度											
	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	…鈴木	淳,	村田	以和夫,	榎田	隆一,	安田	一郎	35
蛍光 X 線分析法による生薬中の総臭素の定量											
田儿 A 禄刀仰 伝による生栄中の称笑系のた鬼 	·····高野·	伊知郎。	長嶋:	直知子	瀬戸	隆子	高橋	奈穂子	浜野	朋子	
											42
キャピラリーガスクロマトグラフィー及び化学										7,	40
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	·····大負:	佘楒夫,	鈴不	助 冶,	森	谦一郎,	伊滕	弘一,	中村	弘	49
高速液体クロマトグラフィーによるフレグランン	ス製品中の	のサリョ	チル酸・	ベンジル	レの分析	沂(第1	報)		1		
							,	助治,	中村	弘	56
高速液体クロマトグラフィーによる育毛剤中の				Nete =≠	/m ste	=1	۸۸ ـ.۱ .	nt. s.A.	المال المال	3 /	20
	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •		"库平	 有十,	1尹 滕	5么一,	野不	现 冶,	中柯	54	οU
家庭用品の衛生化学的研究 (第30報)カビ取り剤	,漂白剤	りなどの	家庭用	塩素含	有製品	中の次	亜塩素	酸ナト	リウム	濃度	
とアルカリ濃度について											
	·····中村	義昭,	岸本	清子,	山野油	22秀夫,	観	照雄,	中村	弘	63

報文Ⅲ 食品等に関する調査研究

四五八	年間の検査成績からみた各種市販食品の細 				<u>†</u> 17	φĿ ┼┼:	糯姜	柚	ノカヱ	7 合	差々
											一 古 八 ······69
					ŕ						
	LISA キットによる畜水産食品中の残留テト								1 205 I 205 I		\#F ===
		••••••	••••••	〒 岡	润,不	甲1米 ,	膀彦,夕	小人保	. 隬太郎,	伸 澤	透 75
食品中	の銅クロロフィル分析法										
		•••••	······	…天川	映子,	荻原	勉,	大西	和夫,	二島	太一郎 79
ப் ஆர்	化妆果 91.)1.9度了呱必必库计 b.分。	t: 3+12	۲7±6	2.松玉	人民河记	534-D	しょまた				
日期が	化装置-フレームレス原子吸光光度法と従来							田端	66年	早野	公美
•											86
野菜・	果実類中の残留農薬実態調査(平成5年度)										
-3 //	7000 (100 m)		麻紀,	永山	敏廣,	塩田	寛子,	伊藤	正子,	森野	雅代
		田村	行弘·	••••••	•••••	• • • • • • • •		• • • • • • •	•••••	. 	92
輸入農	産物中の残留農薬実態調査-平成5年度-						-				
		田村	行弘·		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	98
輸入食	品中の放射能濃度(第5報)-平成5年度-				•			÷		•	
		・・観	公子,	冠	政光,	橋本	秀樹,	真木	俊夫,	田村	行弘105
/1. 35C #L	ᄄᄁᇄᄼᆒᅷᆝᇹᆝᇽᇫᅩᆂᄹᆓᅖᄱᅃᆝᄱᅝᇸᇸᄳ	\ ==:-		.							
	質及び自然毒による食中毒等事件例(第11報 		攻5年度 政光,		公子	極太	委樹	直木	俊士	田村	行弘111
		, G	٠,٧٠٠,	· Þ/L	24.19	liet v.I) 12J,	24/14	汉人,	1111	11777
食品用	天然香料の品質実態調査										
	······································										
		加口山	思巾,	女田	和劣,	川川间	双北.	• • • • • • • •			116
糖尿病	食調製用レトルトパウチ食品のビタミン分析	F									
		高橋	邦子…	• • • • • • • •		••••••	••••••		•••••	•••••	123
報文Ⅳ	生活環境に関する調査研究										
個人頭	髪中の元素含有量(第2報)(リン,カルシウ								## -	مادياد وماد	∃/ 100
	••••••	• • • • • • • •		. 	••••••	•••••	• • • • • • • • • •	·江波	尸攀秀,	中初	54·····129
東京湾	の環境汚染モニタリング (第12報) 平成 4 年度	 ミスズニ	ト及びら	フミネコ	コの調査	結果に	こついて	·			
			• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	·大久	保智子,	瀬戸	博133
分光測	色計による肺中炭粉濃度の測定									•	
)) JUIXI	と前による師子 灰切版及 シバのと			··大久(呆智子,	瀬戸	博,	大西	和夫,	鈴木	重任136
肺に残	留する黒色粒子とその蓄積要因について	海田	+書		[J 4u 구.	ेकं भा	/ 	· +===	4 π + -	<i>∞</i>	金化
	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••										- 単仕 ·····139
		- 10		, 13	,,ı,	7.11/41	,				100
ディー	ゼル排ガス粒子による核酸成分の損傷につレ										
	***************************************			· 獅 丁	埔	大久 4	早紀子	大邢	和丰	鈴木	番任149

幹線道路付近の窒素酸化物濃度への気象要素の影響
牧野 国義,福田 雅夫,小野塚春吉,大西 和夫154
室内塵(ハウスダスト)の性状とその挙動に関する調査
ある河川水におけるモニタリング物質の検索及び濃度レベル
家庭用浄水器によるアスベスト繊維の除去試験
力·拥ィ龙,上连一龙碑········
表現形質からみた Methylobacterium 属菌の分類学的検討
Пуш 110 X43, 154.1. 13-/2 т.с.
報文V 毒性に関する研究
十全大補湯の Salmonella typhimurium に対する変異原性について
黄耆の雄性マウスの行動に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
0.1 11.1 1.1 1.1 1.1 1.1 1.1 1.1 1.1 1.1
Salmonella thyhimurium TA97, TA102 を用いた食品添加物の変異原性試験(第9報)
tert-ブチルハイドロキノンのラット遊離肝細胞に及ぼす毒性
1711 7070, 110711 7070, 12 11750, 12 1
培養細胞を用いたチアベンダゾールのチュブリンに対する影響
·······小縣 昭夫,佐々木美枝子·····204
クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体のラットによる104週間吸入後終生飼育実験(第1報)呼吸器系の病理組 織学的観察
·····································
石綿繊維の経口摂取による生体影響(第6報)繊維の移行と動態
石神椒梅の柱口が状による生体影音(第0報) 繊維の参刊と動態
ラット肝初代培養細胞に対する 6 種の化合物の毒性効果
76 H 16 H 17 1 2 4 2 4 1 4 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
分光測色計を用いたラットの正常皮膚色および薬物刺激による紅斑の測定
・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
パーソナルコンピュータを用いた統計処理プログラムの作成
神谷 信行,坂本 義光,青木 直人,佐々木美枝子235
著書及び他誌発表241
⁻ 스 좌 主

CONTENTS

REPORTS I PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS AND OTHERS

Detection of Hippurate Hydrolysis by Capillary Electroph	oresis Technique for Campylodacter jejvni
	Y. Yanagawa and T. Itoh 3
Inhibition of Mold and Growth Temperature of Listeria or	
	T. Iida, M. Kanzaki, Y. Kokubo and T. Maruyama 7
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Spore-forming Clostridinm perfringens Isolated from Human Feces
	C. Monma, Y. Yanagawa, J. Kusunoki, A. Kai, M. Shingaki
	H. Obata, T. Itoh, K. Ohta and Y. Kudoh
Studies on Preparetion of Bacteria for Quality Control	
	and Y. Kudoh
Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Nov. 1993~)	
	K. Yamazaki, T. Ito, Y. Hayashi and H. Sekine 19
Serological Survey for Antibodies Against HIV During 19	92 and 1993 in Tokyo
	K. Yamazaki, K. Monma, H. Sekine, I. Yoshida, K. Suzuki
	I. Hirata and Y. Kudoh
Report on Mass Screening for Inborn Errors of Metabolis	
	A. Abe, M. Shibata and H. Takano 28
REPORTS II PAPERS CONCERNING ON PHARM	ACEUTICAL HYCIENE
MET ONTO IT AT EAST CONCERNING ON THAT	ACECTICAL ITULENE
	Lethal Concentration for 3rd Stage Larvae of Anisakis Sim-
plex with the Natural Compounds, isolated from Crude Dr	
	J. Suzuki, I. Murata, R. Enokida and I. Yasuda 35
X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Total	Bromide in Crude Drugs
	I. Takano, M. Nagashima, T. Seto, N. Takahashi
	T. Hamano, I. Yasuda, K. Hayano, H. Kamimura
	and M. Nisijima
	and in insignia
Analysis of Higher Alcohols in Cosmetics by Capillary Ga	as Chromatography and Chemical Ionization Mass Spectrometry
	N. Ohnuki, S. Suzuki, K. Mori, K. Itoh and H. Nakamura 49
Determination of Benzyl Salicylate in Fragrance Preparati	ion by HDLC (I)
	K. Ito, K. Mori, N. Ohnuki S. Suzuki and H. Nakamura 56
	K. 110, K. MOII, N. OHHUKI S. SUZUKI AND H. NAKAMUTA 50
Analysis of Minoxidil in the Hair Growth Product by High	a Performance Liquid Chromatography
	K. Kishimoto, K. Ito, S. Suzuki and H. Nakamura 60

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXX) Corhold Products Containing Sodium Hypochlorite	acentration of Available Chlorine and Alkali in House-
	Y. Nakamura, K. Kishimoto, H. Yamanobe, T. Kan and H. Nakamura
REPORTS III PAPERS CONCERNING ON FOOD HYG	IENE
A Evaluation of the Bacteriological Quality of Commercial Foods	s
	S. Morozumi and T. Nishima
The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Mothod for Detection	n of Tetracyclines in Meat and Fish Products J. Kataoka, K. Jinbo, Y. Kokubo and T. Umezu 75
Determination of Copper Chlorophyll in Foods	
	E. Amakawa, T. Ogiwara, K. Ohnishi, and T. Nishima 79
The Detection of Heavy Metals by Automatic Microwavedigester Present Analytical Method	r/Graphite Furnace Atomic Spectrometry Compared to
	Γ. Shimada, H. Kamimura, A. Ibe, S. Tabata, K. Hayano and Y. Tamura
Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits — Apr. 1	993 ~ Mar. 1994 —
	Kobayashi, T. Nagayama, H. Shioda, M. Ito, M. Morino
and	1 Y. Tamura
Survey of Pesticide Residues in Imported Crops $-$ Apr. 1993. \sim	
and	Shioda, T. Nagayama, M. Kobayashi, M. Ito, M. Morino 1 Y. Tamura
Radioactive Contamination in Imported Foods (V) — Apr. 1993~	~Mar.1994— Kan, M. Kanmuri, H. Hashimoto, T. Maki and Y. Tamura105
Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurri	
M.	Kanmuri, K. Kan, H. Hashimoto, T. Maki and Y. Tamura111
Survey on Quality of Natural Flavors	
У. На	
K. Fu	unayama, K. Yasuda and M. Kazama116
Studies on Vitamin Contents of Retortable Pouched Food for Die	
	Kikutani, K. Momma, M. Iguchi, T. Tomomatsu, Y. Kato K. Takahashi123
REPORTS IV PAPERS CONCERNING ON ENVIRONM	ENTAL HYGIENE
Elements Content in Private Human Hair(]]) Phosphorus, Calci	um, Chromium, Iron, Copper, Barium K. Ebato and H. Nakamura129
Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay(XII) Ro	esidue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1992T. Ohkubo and H. Seto133
Measurement of Elemental Carbon Deposited in Lung by Spectro	

Black Dust Matter in Human Lung and Causes of the Deposition	Vatanaha K Ohnishi S Suzuki
	and Y. Kawahara139
Chemical Modifications of Nucleic Acid Components by Diesel Particulate Matter	hkubo, K. Ohnishi and S. Suzuki149
Effects of Weather Factors on Concentration of Nitro Oxides around Arterial Roads	cuda, H. Onozuka and K. Ohnishi154
Study on Chemical Components and Amount in Daily Change of Indoor Dust	Y. Sato159
Identification of Organic Compounds for Monitoring a River and Their Concentrations	a, N. Hosokawa and Y. Tsuchiya165
Removal Studies on Asbestos-Fibers in Water using Household Water Purifier	T. Kowase and Y. Tsuchiya173
Some Approach to Identification of the Genus <i>Methylobacterium</i> Isolated from Drinking T ments	
	. K. Furuhata and A. Matsumoto176
REPORTS V PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY	
Mutagenicity of Juzen-taiho-to with Salmonella typhimurium	H. Fujita, N. Aoki and M. Sasaki185
Effects of Astragali Radix on Male Mice Behaviour	T. Tanaka and H. Ichikawa188
Mutagenicity Test of Food Additives with Salmonella typhimurium TA97 and TA102(IX)	H. Fujita, N. Aoki and M. Sasaki191
Cytotoxicity of tert-Butylhydroquinone on Isolated Rat HepatocytesY. Nakag	gawa, H. Ichikawa and M. Sasaki200
Effects of Thiabendazole on Tublin of BALB/3T3 Cells	A. Ogata and M. Sasaki204
Toxicological Studies on Rats Kept for Their Life Span after 104 Weeks Exposure to Kanto Loam Dust (I) Histopathological Observations of the Lung	
Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (VI) Migration and Behavior of Injected F	
Toxic Effects of 6 Chemicals on Primary Cultured Rat Hepatocytes	K. Fujitani and H. Ichikawa223
Measurement of Normal Skin Color and Chemically-induced Erythema in Rat Skin Using	-
Personal Computer Program for Statistical Analysis	akamoto N. Aoki and M. Sasaki235

PAPERS IN OTHER PUBLICATION	NS	241
THEMES PRESENTED AT CONFE	RENCES AND SOCIETY MEETINGS	251

報 文 I

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS CONCERNING ON INFECTIOUS AND OTHERS

I 感染症等に関する調査研究

感染症等に関する調査研究として 7 編の論文が掲載されている. これらのうち、4 編は食品媒介感染症の起因菌であるカンピロバクター、リステリア及びウェルシュ菌をそれぞれ対象とした検査法の検討あるいは疫学調査成績、及び精度管理用試料中における髄膜炎菌の安定性の検討などの細菌に関する論文、2 編は東京都内におけるインフルエンザ及びヒト免疫不全ウィルス (HIV) の疫学調査成績、他の 1 編は都内における先天性代謝異常症の疫学調査成績についての論文である.

Campylobacter jejuni と C. coli の鑑別は馬尿酸加水分解試験により行われ, C. jejuni は馬尿酸を利用してグリシンと 安息香酸に加水分解するが, C. coli ではこのような性状を示さない. 一般的にはグリシンをニンヒドリン反応により検出する方法が用いられているが, この反応は特異性に問題があることが指摘されている. 今回報告された安息 香酸をキャピラリー電気泳動により検出する手法は, 前処理なしに C. jejuni を容易に鑑別できる極めて実用性の高いことが示された.

リステリアは、現在では最も重要な食品媒介感染症の起因菌の一つになっているが、食品の汚染源として重要な 家畜の保菌状況を調べるための方法は未だ確立されていない。本論文では、分離培養は防黴剤のアンホテリシンB を加えた Palcam 培地が良いこと、培養温度は30℃が効果的であることを報告している。

ウェルシュ菌による食中毒の細菌学的診断は、患者糞便からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌を検出、同一血清型のウェルシュ菌を高頻度に検出及び発病初期に直接エンテロトキシンが証明できることが検査ポイントとされている。今回、ウェルシュ菌食中毒であることが否定された食中毒及び有症事例のヒト糞便を調査したところ、エンテロトキシン産生株の検出率は1%にすぎず、分離菌の血清型は極めて多彩であり、糞便からエンテロトキシンを直接検出しないという結果を得た。これにより、ウェルシュ菌食中毒であることの決定に当たっては、前記検査ポイントによる判断が重要であることが再確認された。

微生物に関する精度管理では、配布試料が安定であること及び調製された模擬試料ができるだけ実際に近いことが求められる。 髄膜炎の起因菌を含む5菌種を同時に接種した試料では、各菌の生存率は4℃保存が室温保存より高く、菌種による死滅率は時間の経過で異なったことから、試料は低温に保存し、できる限り速やかに検査を開始することが望ましいことが示唆された.

東京都内における1993年11月から1994年3月のインフルエンザの流行はAH3型ウィルスによる7年ぶりの単一型の流行であったが、このウィルスの生物学的性状はこれまでに分離されたAH3型ウィルスと一部異なることが認められた。また、その発生は例年に比較して分散する傾向がみられ例数も少なかった。

HIVによる後天性免疫不全症候群 (AIDS) の増加が世界的に問題になっている。当研究所では1993年末までに74,296例のHIV抗体調査を実施し、51例 (0.069%) が陽性であった。このうち42例は1992、1993年に検出されたものである。これら陽性例及び他機関からの陽性例の合計186例はいずれも血清学的にHIV-1型であったが、今後HIV-2型を含めた検査体制の整備が望まれる。

1988~1993年の6年間に52,727名の新生児を対象に6種類の先天性代謝異常症についてスクリーニング検査を実施した結果、ヒスチジン血症、ガラクトース血症各1名、副腎過形成症12名が陽性で、このうち精密検査でヒスチジン血症1名、副腎過形成症5名が陽性と確認された。副腎過形成症スクリーニングでは未熟児ほど17-OHP(17- α -hydroxyprogesterone) 濃度が高い傾向がみられたが、未熟児では様々な要因によるストレスで一時的に17-OHP値が高くなることがあることから、この値から副腎過形成症であるか否かを判断することは困難であることが示唆された。

キャピラリー電気泳動を用いた Campylobacter jejuni の 馬尿酸加水分解試験の検討

新 垣 正 夫*, 門 間 千 枝*, 尾 畑 浩 魅*, 只 野 敬 子* 甲 斐 明 美*, 柳 川 義 勢*, 伊 藤 武*

Detection of Hippurate Hydrolysis by Capillary Electrophoresis Technique for Campylobacter jejuni

MASAO SHINGAKI*, CHIE MONMA*, HIROMI OBATA*, KEIKO TADANO*, AKEMI KAI*, YOSHITOKI YANAGAWA* and TAKESHI ITOH*

Campylobacter jejuni strains hydrolyze sodium hippurate to glycine and benzoic acid, and this biochemical reaction is a useful characteristic for differentiating C. jejuni and C. coli.

The detection of glycine with ninhydrin reagent is most often used to measure this reaction. However, it detects not only glycine, but also other amino acids, peptides, and amines. These amino acids, peptides, and amines give falsepositive results.

In this report, we describe a capillary electrophoresis technique for hippurate hydrolysis in which benzoate is detected directly with neither addition of chromogenic reagents nor chemical derivatization before analysis. Benzoic acid was directly detected by capillary electrophoresis after 1 hour and 20 hours of incubation in 1% sodium hippurate at 37°C. This technique was more rapid and simpler than other gas-liquid chromatographic methods and hight-performance liquid chromatographic methods.

Keywords:カンピロバクター *Campylobacter*,馬尿酸 Hippuric acid,安息香酸 Benzoic acid,キャピラリー電気 泳動 Capillary electrophoresis.

終 量

Campylobacter 属を同定し分類するために各種の性状 試験が行われているが、これらの中で馬尿酸加水分解 試験はヒトや動物から多く分離される C. jejuni と C. coli の鑑別のために重要である1.2). 一般に馬尿酸加水分解 試験は、馬尿酸の分解生成物の一つであるグリシンを ニンヒドリン反応によって検出する方法が用いられて いる3). この方法は非常に簡便な方法であるが、グリシンに特異的ではなく他のアミノ酸やペプチド、アミン等も同じ反応を示す. さらに紫~青藍色の呈色の色合いや強度によって、しばしば判定の困難な場合が生じることが指摘されている4). このため、馬尿酸加水分解 生成物のもう一つの安息香酸をガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーによって検出する方法が報告されている4.5.6.7)

われわれは、高速液体クロマトグラフィーよりも分析時間が短く分解能が高いために近年多用されるようになったキャピラリー電気泳動(CE)を、馬尿酸及び安息香酸の検出に応用した結果、実用的な馬尿酸加水分解試験法を開発することが出来たので報告する.

材料および方法

1. 供試菌株と培養

今回の実験に用いた Campylobacter 属の菌株は,東京都立衛生研究所保存の C. jejuni 4 株 (HP8121, HP8151, HP8173, HP8175) と C.coli 7 株 (HP7674, HP7675, HP7713, HP7916, HP8001, HP8148, HP8165) の計11株である.各菌株は使用に当たって,普通寒天に馬血液を5%に加えた血液平板を用いて37 $^{\circ}$ C,微好気条件下 (O_2 : 5%, CO_2 : 10%, N_2 : 85%) で 2 日間の条件により 2 回継代培養を繰り返した.

^{*}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

2. 馬尿酸加水分解試験

馬尿酸加水分解試験は、血液平板で培養した各供試菌株の培養菌体を 1%馬尿酸ナトリウム溶液の0.5mlにMcFarland turbidity standard no. 3 に相当するように懸濁し、その菌液を37℃の恒温槽で1時間、2時間、4時間及び20時間と経時的に反応させた. 反応液は遠心分離後、フィルター(東洋濾紙、0.20μm)で濾過した上清をCE用の試料とし、馬尿酸およびその分解生成物の安息香酸の分析を行った. なお、試料は使用するまで-20℃で凍結保存した.

3. CE による馬尿酸および安息香酸の分析

CE は、ベックマン社製 P/ACE2000システムを用いて行った。キャピラリーは $50\text{cm} \times 75\,\mu\text{m}$ を用い、測定波長は214nm を使用した。分離は20mM ホウ酸緩衝液 (pH8.3)で、電圧30kv で行った。馬尿酸及び安息香酸量は、標準溶液のピーク高 20cm とretention time から検量線を作製してこれに試料のピークを当てはめることにより算出した。

成績

1. 馬尿酸および安息香酸ナトリウムの標準溶液による CE パターンと検量線の作製

標準溶液の馬尿酸ナトリウムと安息香酸ナトリウムについてそれらの 1%溶液の200倍希釈 (1.5pg) の CE パターンを Fig. 1 に示した.各標準溶液の retention time (分) は,馬尿酸が 3.4,安息香酸が 3.9 であった.次いで,濃度の異なる標準溶液 (0.75pg, 1.5pg, 3.0pg) を用いて CE を行い,得られた結果から検量線を作製した.Fig. 2 に馬尿酸ナトリウムと安息香酸ナトリウム溶液の検量線を示した.各標準溶液は原点を通る直線が得

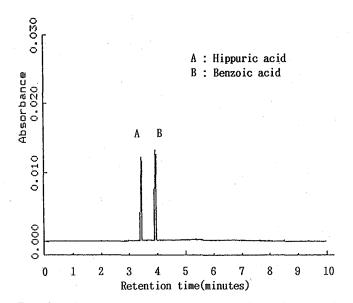


Fig. 1. Capillary electropherogram of a mixture of sodium hippurate and sodium benzoate.

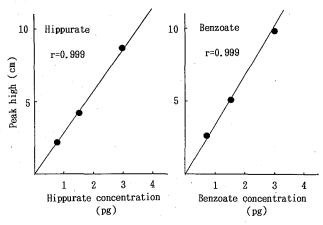


Fig. 2. Calibration curve of sodium hippurate and sodium benzoate in different concentration.

られた. 相関係数(R)はいずれも0.999であった.

2. *C. jejuni* および *C.coli* の馬尿酸加水分解能の CE パターン

C.jejuni と C.coli の CEパターンの推移を経時的に検討した成績をFig.3に示した。C.jejuni の反応液 (100倍希釈)では,馬尿酸加水分解能を示す安息香酸のピークが1時間で出現し,2時間,4時間の反応では馬尿酸のピークの減少と共に安息香酸のピークが増大した。20時間の反応では,馬尿酸は完全に分解され,安息香酸のピークだけが認められた。これに対して C.coli の菌株では,1時間,2時間,4時間の反応液では対照の馬尿酸のピークとほぼ同様のパターンを示し,馬尿酸を加水分解しないことが確認された。しかし,20時間の反応液ではわずかに安息香酸のピークが認められた。

3. 馬尿酸および安息香酸量の経時的変化

(C.jejuni と C.coli の合計11株について馬尿酸と安息香 酸を経時的に定量した成績を Table 1に示した.菌を 接種しない対照の1%馬尿酸ナトリウム溶液では、反応1 時間から20時間の間,239~262pgの馬尿酸量であった. C.jejuni では, 馬尿酸は反応 1 時間で248~290pg, 2 時 間で173~280pg, 4時間で91~242pgと経時的に減少し, 20時間ではいずれの菌株も検出されなかった. これに 対して、安息香酸は反応1時間から検出され、1時間で 14~38pg, 2時間で28~86pg, 4時間で62~157pg, 20 時間では210~227pgと経時的に増加した. 一方, C.coli の菌株では、馬尿酸は1時間で232~252pg, 2時間で 223~250pg, 4時間で229~264pg, 20時間で204~ 246pgと各反応時間で馬尿酸量に有意差は認められな かった. これに対して、安息香酸の量は、1時間でわ ずかに認められ,20時間では7.1~18.7pg の生成が認め られたが、その量は C.jejuni の量の約20分の 1 であった.

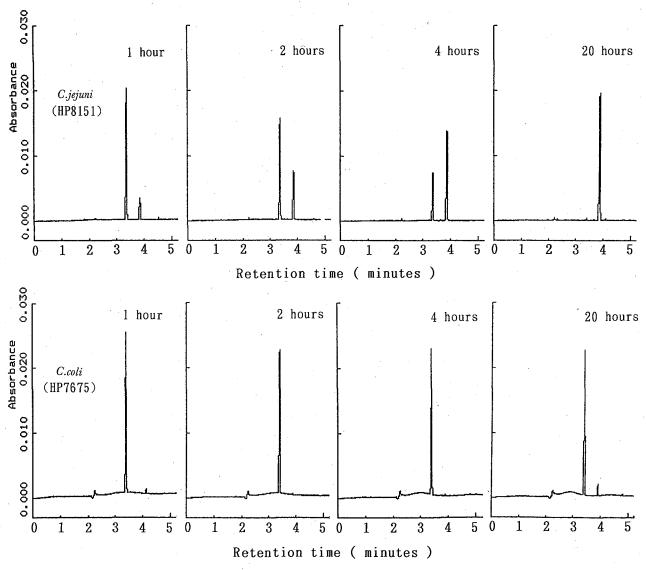


Fig. 3. Capillary electropherograms of hydrolysis of 1% sodium hippurate by C. jejuni and C. coli.

Table 1. Hippurate hydrolysis by capillary electrophoresis.

Strains		Hippur (p		·	Benzoic acid (pg)						
_	1h	2h	4h	20h	1h	2h	4h	20h			
C.jejuni						<u> </u>					
HP8121	272	263	186	- *	16	36	88	210			
HP8151	248	192	91	_	38	86	157	227			
HP8173	253	173	147	. —	22	40	113	222			
HP8175	290	280	242		14	28	62	212			
C.coli											
HP7674	247	232	250	245	0.48	1.12	3.10	18.7			
HP7675	252	223	229	229	0.44	1.57	2.26	12.8			
HP7713	247	245	242	228	0.33	0.76	1.53	8.8			
HP7916	232	230	226	204	0.67	0.60	1.06	7.1			
HP8001	239	250	264	243	0.49	1.14	2.19	12.9			
HP8148	248	244	245	246	0.45	1.04	2.33	14.2			
HP8165	233	242	20	234	0.78	1.52	2.78	13.6			
Control	262	239	250	258		_		_			

※ ∶ Not detected

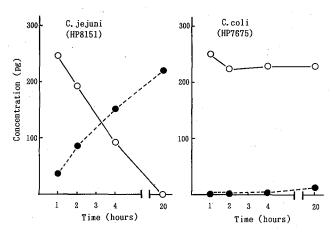


Fig. 4. Time-evolution of the concentration of hippurate (\bigcirc) and benzoate (\blacksquare) in incubation of C. *jejuni* and C. *coli* strains suspended in 1% sodium hippurate at 37%.

Fig. 4 は、C.jejuni と C.coli による馬尿酸加水分解における馬尿酸と安息香酸の濃度変化のパターンを経時的に示したものである。C.jejuni が馬尿酸を代謝するにつれて、馬尿酸量が減少して行き、20時間後にはすべて代謝されてゼロを示した。これに対して、安息香酸量は、馬尿酸が減少するに伴って上昇し、約3~4時間後に両者が交差し、20時間後には安息香酸と馬尿酸の濃度が完全に逆転するパターンが示された。これに対して C.coli では馬尿酸及び安息香酸は、ほとんど減少も上昇もない一定した平行線型のパターンを示した。

考察

馬尿酸の加水分解の終末産物である安息香酸を定量することによって,C.jejuni の馬尿酸加水分解性を測定する方法はこれまでにも Kodaka 6^{5} ,Wallace 6^{4} ,Werner 6^{6} によってガスクロマトグラフィーによる方法が報告されている.しかしガスクロマトグラフィーによる方法は試料の前処理を必要とするので,日常の検査に応用出来る実用的な方法ではない.一方,Marmet 6^{7})は Legionella 属菌の馬尿酸加水分解試験に,試料の前処理を必要としない高速液体クロマトグラフィーによる方法を報告した.

今回われわれが C.jejuni で検討を行った CE 法は高速 液体クロマトグラフィーを用いると同様に、試料の前 処理を全く必要とせずに安息香酸を簡易に検出する方 法である. 本試験に当たっては、1%馬尿酸ナトリウム 溶液に血液寒天平板で培養した菌体を McFarland turbidity standard no. 3 の濃度に接種し、37℃で1時間か ら20時間反応させ、遠心分離後上清をフィルターで濾 過したものを試料とした. 菌を接種した後反応 1 時間で検出に十分量の安息香酸量が生成されるので,C.jejuni の馬尿酸加水分解試験の判定を行うことが出来る。20時間反応させた場合は,馬尿酸は全て加水分解されて安息香酸のピークだけが認められた。なお C.coli でも20時間の反応により,安息香酸が小量検出されるようになるが,これは馬尿酸加水分解によるものであるのか,あるいは他の反応によるものかは明かではない。

われわれは、これまで広く用いられている馬尿酸加水分解生成物の一つのグリシンを、ニンヒドリン反応で検出する方法を決して否定するわけではなく、これらの従来法で判定の困難な場合の分析法として、CE 法は最も容易で有力な手段として用いることが出来ると考える。

結 論

C.jejuni と C.coli を鑑別するための馬尿酸加水分解試験にCE を応用する方法を検討した結果,以下の成績を得た. C.jejuni は,馬尿酸と1時間の反応で検出に十分量の安息香酸を生成し,その後時間の経過と共に馬尿酸の減少,安息香酸の増加が認められた.反応20時間では馬尿酸は全て分解され,安息香酸のみが認められた.

C.coli では、馬尿酸量は反応20時間後もほとんど減少せず、また検出された安息香酸量も少量であった.

以上の成績から、CE を使用すれば、C.jejuni が馬尿酸を速やかに分解することが容易に観察でき、C.jejuni の馬尿酸加水分解試験法として十分に実用的であることが明らかにされた.

文 献

- 1) 高橋正樹, 伊藤 武, 斉藤香彦, 他:東京都衛研 年報, **36**, 8-15, 1985.
- 2) Hebert, G. A., Hollis, D. G., Weaver, R. E. et al.: J. Clin. Microbiol., **15**, 1065-1073. 1982.
- 3) Harvey, S. M.: J. Clin. Microbiol., **11**, 435-437. 1980.
- 4) Wallace, P. L., Patton, C. M. and Moss, C. W.: J. Clin. Microbiol., **25**, 1766-1768, 1987.
- Kodaka, H., Lombard, G. L. and Dowell, V. R. Jr.:
 J. Clin. Microbiol., 16, 962-964, 1982.
- Werner B. and Gerulf F.: J. Clin. Microbiol., 25, 1776-1778, 1987.
- Marmet, D., Bornstein, N. and Fleurette, J.: J. Clin. Microbiol., 28, 2828-2829. 1990.

Palcam 培地に発育する真菌の抑制及び培養温度の検討

飯 田 孝*,神崎 政 子*,小久保 彌太郎*,丸 山 務**

Inhibition of Mold and Growth Temperature of Listeria on Palcam Medium

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

Keywords: Palcam 培地 Palcam medium, リステリア *Listeria*, リステリア モノサイトゲネス *Listeria* monocytogenes, アンホテリシンB Amphotericin B, 糞便材料 Fecal specimen, Oxford 培地 Oxford medium

はじめに

L. monocytogenes は自然界に広く分布し、ヒトや各種動物に髄膜炎、敗血症、流産などを起こすことが知られているが $^{1,2)}$ 、その感染経路や感染源は明らかではなかった。しかし、1980年のはじめに食品を介したL. monocytogenes による集団感染例が報告され $^{3,4)}$ 、ヒトへの感染源として食品が注目されるようになった $^{5)}$.このような食品によるL. monocytogenes のヒトへの感染を未然に防止するためには食品の汚染源や汚染経路を明らかにするとともに、食品以外の感染経路についても検討する必要がある.

著者らは、今までに食肉を対象にリステリア汚染について広範囲の調査を行った結果、と畜場における解体処理直後の枝肉及び解体処理器具などから高い頻度で L. monocytogenes が分離されることを認め、それらの汚染源として家畜の大腸内容物が重要なことを示唆した⁶⁾.このため、家畜のリステリア保菌実態を的確に把握する必要があると考え、検査法について検討を行ったところ、選択増菌培地に UVM 培地、分離培地に Palcam 培地を用いたときに大腸内容物からのリステリアの検出率が最も高かった。しかし、Palcam 培地にはしばしば真菌が発育するためにリステリアの分離が妨げられること、培養温度に問題のあることがわかった。今回は、これらの成績を示し、次いで問題を解決するための検討を行ったので報告する.

材料及び方法

1. 供試菌株

理化学研究所から分与を受けた血清型の異なる JCM7671~7682の計12株を供試した. これらの菌株は3 ml のトリプトース・ブロス (Difco) で37℃, 24時間の条件で2代継代培養してから供試した. CAMP テストには Staphyrococcus aureus (NCTC6571), Rhodococcus equi (89-387) を用いた.

2. 供試材料

と畜場に搬入されたブタの大腸内容物50検体及び埼 玉県の4ヶ所の養鶏場で採取したニワトリの糞便150検 体を供試材料とした.

3. リステリアの検出手順

検査材料 1 g を, それぞれ 9 ml の EB 培地 (Listeria Enrichment Broth; Difco), 又は UVM 培地 (Modified Listeria Enrichment Broth; Difco) に加えいずれも30℃で48時間増菌培養を行った。その後, Oxford 培地 (Listeria serective Ager Base/Oxford Formulation; Difco) とPalcam 培地 (Palcam Listeria Selective Ager; Merck)を用いていずれも30℃で48時間分離培養を行った。

分離培地上に発育したエスクリン分解のリステリアが疑われる集落は非選択培地のトリプトース寒天平板 (TA 培地; Difco) に単離し、斜光法によりリステリアの典型的な集落所見である真珠様青緑色を示すことを確認した。更に、グラム陽性短桿菌、VP試験陽性を示した菌をリステリア属とし、溶血性があり、その溶血性は CAMP 試験で S. aureus の β 溶血素により増強され、糖の発酵試験でラムノース陽性、キシロース及びマンニトール陰性のものを L. monocytogenes と同定した。

4. アンホテリシン B の真菌抑制試験

Palcam 培地上に真菌とリステリアの両者が同時に発育することを認めた豚(A-C), ニワトリ(D-F) 各3検

^{*}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

体ずつの UVM 増菌培養液を対象に、抗真菌剤のアンホテリシン B による真菌の発育抑制効果とリステリアへの影響を調べた。アンホテリシン B を Palcam 培地 1 ml 当たり 2, 6, 10, 14 μg の濃度になるように添加して平板を作成した。その表面に A~F の検体約10 μl をガラス棒で塗抹して30℃で48時間培養後に真菌とリステリアの発育の有無を観察した。また、血清型の異なるJCM 株 8 株を用い、2~14 μg/ml の各種濃度のアンホテリシン B を添加した Palcam 培地と無添加培地及び対照の TA 培地に約100個の菌をコンラージ棒で塗抹して30℃で48時間培養後に発育した集落数を比較した。評価は、非選択培地である TA 培地上に発育した集落数を100とした時の Palcam 培地上の集落数を百分率で表わした。

5. Palcam 培地の培養温度の検討

JCM 株12株を用い,約100個の菌を Palcam 培地,TA 培地にコンラージ棒で塗抹し,Palcam 培地は30℃と37℃,TA 培地は37℃で,それぞれ48時間培養後に菌の集落数を調べ,前項同様に評価した.

結 果

1. 使用培地別のリステリアの検出率

ブタ50検体とニワトリ150検体からリステリアの検出を増菌培地及び分離培地各2種類の組み合わせで行ったところ、表1に示したようにブタ、ニワトリともに検出率が最も高かったのはUVM 培地と Palcam 培地の組み合わせで、それぞれ24.0%、4.0%であった.最も低かったのはブタではEBと Palcam 培地の6.0%、ニワトリではUVM 培地とOxford 培地の0%であった.

2. Palcam 培地における真菌とリステリアの発育

Palcam 培地における真菌の発育は表2に示したように,動物種や増菌方法に関係なく12.0~24.0%であった.これら真菌の菌種は,主にムコール属とスコピュ

表1. 大腸内容物および糞便からの増菌培地と 分離培地の組み合わせによるリステリア の検出率の比較

		陽性検体数(%)									
動物種	検体数	UVM		本数 UVM		EB					
	•	Palcam	Oxford	Palcam	Oxford						
ブタ (大腸内容	50 字物)	12 (24.0)	6(12.0)	3(6.0)	4(8.0)						
ニワトリ (糞便)	150	6(4.0)	0	4(2.6)	5(3.3)						
合計	200	18(9.0)	6(3.0)	7(3.5)	9 (4.5)						

UVM, EB:增菌培地, palcam, Oxford:分離培地

ラリ属であった. これに対して、対照の Oxford 培地では真菌の発育は認められなかった.

1) アンホテリシンBを添加した Palcam 培地における 真菌の抑制効果

表 3 に示したように、真菌はアンホテリシン B を添加しない培地では 6 検体すべてに発育し、 2 μ g添加した培地では豚の 1 検体にのみ発育が認められたが、 6 μ g以上添加した培地では真菌の発育は認められなかった。これに対して、リステリアは14 μ g添加した培地でも添加しない培地と同程度に発育し、抑制は認められなかった。

2) アンホテリシン B を添加した Palcam 培地における *L. monocytogenes* の回収試験成績

血清型の異なる JCM 株 8 株のアンホテリシンB無添加 Palcam 培地による回収率は表 4 に示したように平均 $92.6\pm11.5\%$ であった.アンホテリシンBを 2μ g添加した培地では平均 $109.4\pm11.9\%$, 6 μ g では $96.9\pm11.4\%$, 10 μ g では $98.5\pm10.8\%$, 14 μ g では $95.7\pm10.7\%$ と TA 培地とほとんど同じ回収率であった.なお,参考のために調べた Oxford 培地では平均 $99.9\pm9.3\%$ の回収率であった.

表 2. 大腸内容物および糞便からの増菌培地と分離 培地の組み合わせによる真菌の発育状況

			陽性検体数	女 (%)	
動物種	検体数	UVM	EB	UVM	EB
		Pal	cam	Oxfo	rd
ブタ (大腸内容	50 字物)	12 (24.0)	6(12.0)	0	0
ニワトリ (糞便)	150	27 (18.0)	20 (13.0)	0	0
合計	200	39 (19.5)	26(13.0)	0	0

UVM,EB:增菌培地, Palcam,Oxford:分離培地

表3. Palcam 培地中のアンホテリシンBの添加量と 真菌およびリステリアの発育

	ア	ンオ	テリ	シン	Bの清	が加量	(μg,	/ml)	別発	育
検査材料		真真	類の多	発育		ij	ステ	リア	の発	育
	0	2	6	1,0	14	0	2	6	10	14
A	+	+		_		+	+	+	+	+
В	+		_	-	_	+	+	+	+	+
С	+	_		_	-	+	+	+	+	+
D	+		_	_	_	+	+	+	+	+
E	+	_	_	_	-	. +	+	+	+	+
F	+	_	_			+	+	+	+	+

菌 株 アンホテリシンBの添加量(μg/ml)別回収率* Oxord 培地* 血清型 (JCM) 0 14 7676 1/2b87.0 112.9 91.8 98.8 90.9 98.2 7672 1/2c87.2 118.6 106.8 100.0 90.4 104.5 7677 3b 89.7 94.9 81.8 77.9 76.6 80.8 7678 3c 81.2 113.4 107.5 112.2 104.0 106.3 7674 4a 94.5 104.5 100.0 98.1 98.4 96.7 92.4 90.1 92.7 96.3 7675 89.3 81.2 4b 7679 92.5 128.0 110.5 109.3 100.0 110.5 4c 110.6 7680 95.2 101.9 112.7 105.7 4d 119.2 平 均 92.6 ± 11.5 109.4 ± 11.9 95.7 ± 10.7 99.9 ± 9.3 96.9 ± 11.4 98.5 ± 10.8

表 4. 各種濃度のアンホテリシン B を添加した Palcam 培地における L. monocytogenes の回収率

*TA 培地の集落に対する発育集落%

表 5. Palcam 培地の培養温度とリステリアの発育

菌	株	血清型	palcam 培地にお	ける回収率 ¹⁾
(JC	M)		37℃培養	30℃培養
76	71	1/2a	02)	96.2
76′	73	3a	Ó	83.6
768	81	5	0	91.5
76′	76	1/2b	97.3	87.3
76′	72	1/2c	94.9	92.4
76′	77	3ъ	94.4	95.1
76′	78	3c	96.6	103.3
76′	74	4a	102.8	110.0
76′	75	4b	111.9	98.8
76′	79	4c	97.1	91.7
768	80	4d	119.2	106.9
768	82	6	82.5	83.1

- 1) TA 培地上の集落に対する発育集落%
- 2) 集落が出現しない

このように血清型によるアンホテリシンBの影響はほとんどなかった.

3. Palcam 培地の培養温度とリステリアの回収試験

Palcam 培地の培養温度は30~37° と規定されているが $^{7)}$, 37° では発育が抑制される菌株があることから、TA 培地を対照として回収率を比較してみた。その結果、表 5 に示したように、供試した JCM 株12株は30° で Palcam 培地上に全菌株発育し、集落の回収率は TA 培地と比較して83.1~110.1%であった。しかし、37° では JCM 株7671株(血清型1/2a)、7673株(血清型3a)、及び7681株(血清型5)の 3 株は全く発育が認められなかった。

考 察

家畜のリステリアの保菌状況を調べるための培地は, 糞便又は大腸内容物中の夾雑菌を効率よく抑制できる 強い選択性を有している必要がある。そこで市販の選択培地の中でも選択性が強いとされている分離培地のPalcam 培地⁷⁾について増菌培地のEB培地及び UVM 培地との組み合わせを比較検討した。

その結果, ブタの大腸内容物及びニワトリの糞便を 対象とした場合、最もリステリアの検出率が高かった のは UVM 培地と Palcam 培地の組み合わせで9.0%で あった. しかし、Palcam 培地と同様に広く使用されて いる Oxford 培地8) は UVM 培地との組み合わせで検出 率が3.0%と最も低かった(表 2). UVM 培地は、リン 酸塩を含むために緩衝作用があることから増菌に伴う pH の変動が少なく、また、選択性の強い培地で見られ る損傷菌への影響も少ないなどの特性を有することが 知られている⁹⁾. しかし、分離培地に Palcam 培地より も選択性の弱い Oxford 培地を用いると、その平板上に 多数のリステリア以外の集落が発育するために、目的 の菌を判別することが難しくなり、検出率が低下する と考えられる. したがって、UVM 培地と Palcam 培地 を組み合わせれば、両培地の特性が生かされ、効率よ くリステリアが分離できることがわかった.

ところが、Palcam 培地には、検体に由来する真菌が培地上に発育し、目的とする集落の確認や釣菌が難しいという欠点がある。今回の調査でも、動物種や増菌方法に関係なく真菌が12.0-24.0%発育することがわかった。しかし、同じ増菌培地を塗抹した Oxford 培地では真菌の発育はなく、この抗真菌作用は培地に添加されているシクロヘキサミド 10)によるものと思われた。そこで、われわれは、真菌の発育を抑制する目的でシクロヘキサミドよりも抗真菌スペクトラムが広く、カンピロバクターの分離培地に抗真菌剤として添加された実績 11 のあるアンホテリシンBを Palcam 培地に添加してみた。その効果は、 6μ g/ml添加した培地で真菌の

発育を完全に抑制し、 $14 \mu g/ml$ 添加した培地でもリステリアの発育に影響を全く与えなかった。したがって、糞便及び大腸内容物中のリステリアの分離には、アンホテリシンBを $6 \mu g/ml$ 添加した Palcam 培地の使用が推奨できる.

Palcam 培地は考案者である Van Netten ら⁷⁾が30~37℃で培養することを勧めている. しかし, われわれが標準菌株(JCM 株)を用いて30℃と37℃における回収率を比較したところ, 37℃培養では12株中3株が全く回収されなかった. これらの3菌株は30℃で培養すると, いずれも80~90%以上回収できた. Curtisらは¹²⁾培養温度が37℃の時にOxford 培地上で発育が抑制される菌があり, それらの菌を30℃で培養すると発育するものがあることを報告している. 今回のPalcam 培地でもこのような現象が認められたことから, 本培地の培養を30℃で行えばリステリアの検出率に影響を与えないことがわかった.

まとめ

食肉の汚染源として重要な家畜のリステリアの保菌 状況を調べるために、市販の培地の中でも選択性が強 いとされる分離培地の Palcam 培地について、ブタの大 腸内容物及びニワトリの糞便を対象にリステリアの検 出能を検討した。その結果、本培地は増菌培地の UVM 培地と組み合わせて使用すると、検出率が最も高かっ た。

しかし、Palcam 培地には材料に由来する真菌が発育してくるため、これを抑制する目的で培地 1 ml当たり6 μgのアンホテリシンBを加えたところ、リステリアに影響を与えることはなく真菌を効果的に抑制できた。また、Palcam 培地の培養温度は30~37℃とされているが、37℃では発育しないリステリアがあることから、30℃培養の良いことがわかった。

要 旨

食肉の汚染源として重要な家畜のリステリア保菌状況を調べるために用いる培地は、糞便又は大腸内容物中の夾雑菌を効率よく抑制できる強い選択性を有して

いる必要がある.この点,市販の培地の中でも選択性が強いとされる分離培地の Palcam 培地を増菌培地の UVM 培地と組み合わせて使用すると,検出率が最も高いことがわかった.

しかし、Palcam 培地には材料に由来する真菌が発育してくるため、これを抑制する目的で培地 1 ml当たり6 μgのアンホテリシンBを加えたところ、リステリアに影響を与えることはなく真菌を効果的に抑制できた。また、Palcam 培地の培養温度は30~37℃とされているが、37℃では発育しないリステリアがあることから、30℃培養の良いことがわかった。

文 献

- 1) Schuchat, A., Swaminathan, B. and Broome, V.: *Clin. Microbiol. Rev.*, 169-183, 1991.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A.et al.: N. Engl. J. Med. 308: 203-206, 1983.
- 3) Aiierberger, F.: Pecs. Hungary, 20, 22-26, 1988.
- 4) Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D. et al.: *New*. *Eng. J. Med.*, **319**, 823-828, 1988.
- 5) WHO Report. Bull. WHO, **66**, 421-428, 1988.
- 6) 水谷浩志, 飯田 孝, 丸山 務:日獣会誌, **43**, 602-605, 1990.
- 7) Van netten, P., Perales, I., Van de van, A., et al.: *Int. J. Microbiol.*, **8**, 299-316, 1989.
- 8) Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F., et al.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **8**, 95-98, 1989.
- 9) Golden, D. A., Beuchat, L. R., and Brackett, R. E.: Food Microbiol., 5, 17-23. 1988.
- Cassiday, P. K. and Brackett, R.: A Rev. J. Food Protect., 52, 207-214, 1989.
- 11) 伊藤 武, 斎藤香彦: Med. Technol., **10**, 219-226, 1982.
- 12) Curtis G. D. W., Nichols, W. W. & Falla, T. J.: Lett. Appl. Microbiol., 8, 169-172, 1989.

ヒトふん便から分離された耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の 血清型とエンテロトキシン産生性について

門 間 千 枝*, 柳 川 義 勢*, 楠 淳*, 甲 斐 明 美* 新 垣 正 夫*, 尾 畑 浩 魅*, 伊 藤 武*, 太 田 建 爾*, 工 藤 泰 雄*

Serotyping and Enterotoxin Production of Heat-resistant Spore-forming Clostrichium perfringens Isolated from Human Feces

CHIE MONMA*, YOSHITOKI YANAGAWA*, JUN KUSUNOKI*,
AKEMI KAI*, MASAO SHINGAKI*, HIROMI OBATA*,
TAKESHI ITOH*, KENJI OHTA* and YASUO KUDOH*

Keywords:ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens*, エンテロトキシン enterotoxin, 血清型 serotype, ヒトふん便 Human feces, 耐熱性芽胞 Heat-resistant spore

はじめに

ウェルシュ菌 Clostridium perfringens はヒト腸管内の 常在細菌叢を構成する細菌の一つである. そのために, 食中毒発生時のふん便検査では常在菌としてのウェル シュ菌と腸管起病性ウェルシュ菌との鑑別が重要であ る¹⁾. ウェルシュ菌食中毒事例では患者ふん便からは同 一血清型のウェルシュ菌が高率に検出されること、検 出ウェルシュ菌は下痢原性因子であるエンテロトキシ ンを産生すること²⁻⁴⁾、及び発病初期の患者ふん便から はエンテロトキシンを証明できること⁵⁾が本菌食中毒の 検査ポイントとされてきた1). 近年ラテックス凝集反応 を応用したエンテロトキシン検出用キットが開発, 市 販され、エンテロトキシン産生用の優れた培地が報告 されて6)エンテロトキシンの検査が容易となった.これ までの調査から、健康人におけるエンテロトキシン産 生性ウェルシュ菌の保菌率は極めて低く7-8),食中毒発 生時のふん便検査には、ウェルシュ菌の検出率よりも むしろエンテロトキシン産生性を重視する傾向にある. しかし、エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が低い 検出率で分離された食中毒事例では、それがウェル シュ菌に起因したものであるか否かの判断が困難であ ることがしばしばある.

そこで、ウェルシュ菌による集団下痢症の細菌学的 診断の基礎資料として、食中毒発生時に当研究室に搬 入されウェルシュ菌食中毒が否定されたふん便を対象 に、耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の検出状況、分離菌 株のエンテロトキシン産生性及び血清型について検討 した.

調査材料及び方法

1. ヒトふん便

1993年3月~9月の7ヶ月間に食中毒関連及び有症 苦情178事例の起因菌検査で搬入されたふん便1,774検 体を検査材料に供試した. その内訳は,有症者ふん便 823検体,非有症者ふん便289検体,関連施設の従業員 ふん便662検体である.

2. 耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の分離

ヒトふん便を TGC 培地(栄研化学)に接種し, 100℃, 10分間加熱冷却後, 37℃, 18~48時間好気培養した.

増菌培養後, TGC 培地で発育とガス産生が認められたものについてカナマイシン加卵黄 CW 寒天培地(日水製薬)に塗抹し,嫌気培養装置(テーハー式 アナエロ・ボックス ANX-1,平沢製作所)内で,37℃,18~24時間培養した.

CW 寒天培地上に発育したレシチナーゼ反応陽性のやや隆起した乳黄色の集落を釣菌し、卵黄 CW 寒天培地(日水製薬)に画線塗布した。それと直角に交わるように、乾燥ウェルシュ菌 A 型抗毒素ろ紙(日水製薬)を培地上におき、37℃、18~24時間嫌気培養装置内で培養した。ろ紙付近の被検菌のレシチナーゼ反応が抑制されたものをウェルシュ菌とした。

^{*}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 Reseach Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 169 Japan

レシチナーゼ抑制試験で不明瞭な反応を呈した菌株 については、好気培養試験及び嫌気性細菌同定用キット(Rap ID ANA、アムコ)を用いて同定した.

3. 分離菌のエンテロトキシン産生試験

耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌が発育したふん便 1 検体あたり 3 株づつウェルシュ菌を分離し、大谷らの報告した変法 DS 培地⁶⁾ に接種して、37℃、18~24時間嫌気培養装置内で培養した。培養後位相差顕微鏡下で芽胞形成が確認された培養液を3,000rpm、15分間遠心し、その上清について市販のウェルシュ菌エンテロトキシン検出用キット(PET-RPLA「生研」、デンカ生研)を用いてエンテロトキシンを調べた。

なお, エンテロトキシン産生量は, 変法DS培地の培養上清を希釈し, 上記同様にエンテロトキシン検出用ラテックス凝集キットを用いて算出した.

4. 分離菌の血清型別試験

エンテロトキシン産生性を調べたのと同じ菌株について血清型別試験を行った。市販 Hobbs の血清型別診断用血清(デンカ生研)と、当研究所において作製したTW の型別用血清⁹⁾を用いて、スライド凝集反応で行った。

5. ふん便中のエンテロトキシン検査

一部のふん便については伊藤らの方法⁵⁾に従って、ふん便中のエンテロトキシンを検査した。すなわち、ふん便を生理食塩水で10倍乳剤にし、12,000rpm10分間遠心後、その上清について上記同様にエンテロトキシン検出用ラテックス凝集キットにより行った。ふん便の場合、非特異反応が認められるため、80倍以上を陽性と判定した。

調査結果

1. ヒトふん便からの耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の 検出

表1に、有症者、非有症者及び従業員ふん便からの 耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の検出状況を示す.全体 では311検体(17.5%)からウェルシュ菌が検出された. 有症者からの検出率は13.6%であり、非有症者と従業 員ではこれよりも若干検出率が高くそれぞれに18.7%、 21.9%であった.

2. 分離菌のエンテロトキシン産生性

エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌は18検体から 検出され、検出率は供試検体1,774検体に対して1.0%, ウェルシュ菌が検出された検体311検体に対して5.8% であった。その内訳は、有症者、非有症者、従業員と も6検体ずつであった(表1).

表 2 に分離されたウェルシュ菌16菌株のエンテロトキシン産生量を示す. エンテロトキシン量は80倍~51,200倍であり,産生量が1,000倍以下の低い株が 2 株みられた. 対照に用いた食中毒由来ウェルシュ菌株のエンテロトキシン量1,600倍~102,400倍であった.

表1. ヒトふん便からの耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の検出と分離菌株のエンテロトキシン産生性

検査対象者	検査 件数	耐熱性芽胞形成 ウェルシュ菌 (%)	エンテロトキシン産生 ウェルシュ菌 (%)
有 症 者	823	112(13.6)	6(0.7)
非有症者	289	54 (18.7)	6(2.1)
従 業 員	662	145 (21.9)	6(0.9)
計	1,774	311 (17.5)	18(1.0)

表2. 血清型別エンテロトキシン産生株の本毒素産生量

血清型	9]	供 試		•		エンテロー	トキシン産	生量(RPL	A 力価)			
mr(14 3	E.	菌株数	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	102,400
Hobbs	1	2						2			-	
Hobss	3	4		1			1		. 2			
Hobbs	13	2						1			1	
TW	24	1								1		
TW	25	1									1 -	
TW	27	1	1									
TW	40	4							1		. 3	
TW	43	1							1			
Hobbs	3*	· 1	 									1
TW	19 *	4				1		1	1	1		

3. 分離菌の血清型別

表3,4に,検出されたウェルシュ菌の血清型別を示す.1検体につき3株を対象に血清型を調べたが,3株共同じ血清型であったもの217検体(69.8%),2株が同じであったもの74検体(23.8%),1株づつ異なった血清型が検出されたもの20検体(6.4%)であった. Hobbsの血清型では供試933株中268株が11型に型別され,そのうち13型が有症者,非有症者,従業員共最も多く192株を占めた. Hobbsの血清型に該当しなかった665株についてはTWの血清型別を行った結果は表4に示す通り372株が45型に型別され,2,9,27,40型がやや多く認められた。また,2種類あるいは3種類のTWの血清型に凝集の認められた株が61株あった.

エンテロトキシン産生性が確認されたウェルシュ菌の血清型は Hobbs 型 1, 3, 6, 13, TW 型 1, 19, 24, 25, 27, 37, 40, 43及び型別不能(1 検体)であった.

4. 有症者からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌 が検出された集団事例の概要及びふん便中のエン テロトキシン検査

表5に有症者からエンテロトキシン産生性ウェルシュ菌が検出された5事例の概要と起因菌を示す.事例Aでは有症者2検体中1検体,事例Bでは有症者145検体中2検体,事例Cでは有症者16検体中1検体,非有症者75検体中1検体,事例Dでは有症者3検体中1検体,事例Eでは有症者4検体中1検体からエンテロトキシン産生ウェルシュ菌が検出された.これらの

表3. ヒトふん便から検出された耐熱性芽胞形成 ウェルシュ菌のHobbs血清型別

, ,				
Hobbs の	由	来 菌	株	1
血清型	有症者	非有症者	従業員	計
1	2	6(6)	9(6)	17 (12)
2	3		2	5
. 3	4(3)		10(3)	14 (6)
5	5		1	6
6		2(1)		2(1)
8		3		3
9		3		3
10	1		1	2
11		3	- 7	10
13	60 (4)	28	104	192 (4)
15			4	4
16			2	2
17	5		3	8
型別不能	256 (7)	117(9)	292 (5)	665 (21)
計	336 (14)	91 (16)	205 (14)	441 (44)

^()内はエンテロトキシン産生菌株数再掲

表 4. ヒトふん便から検出された耐熱性芽胞形成 ウェルシュ菌の TW 血清型別

TW Ø	由	来 菌	株	
血清型	有症者	非有症者	 従業員	計
1	1	1	3(2)	5(2)
2	6	9	8	24
5			3	3
6	3	1		4
9	9	4	10	23
10	6	2	11	19
11	3	5	6	14
12	8		. 2	10
13		3	1	4
14	4		3	7
15	1			1
16	3		10	13
18	3		3	6
19	9 (3)	6	5	20 (3)
20		2	4	6
21	1	3	3	7
22		•	3 .	3
23	1		7	8
24	5(1)	•	1	6(1)
25	6	3(3)	-	9 (3)
27	9	3	14(1)	26 (1)
28	Ü	Ü	3	3
30			3	3
34	7	. 3	6	16
35	4	. 3	6	10
36	1	5	U	6
37	3	1	7(1)	11 (1)
38	3		3	6
39	J		3	3
40	15(3)		8(1)	23 (4)
			3	
41	1	2 (2)	3	4
43		3(3)	r .	3(3)
47	3	3	5	11
48	2	•	3	5
49	4		1	5
52		1	6	7
54	. =	6	. 0	6
55 5.5	5		2	7
56 57	2		3	5
57			1	1
59		1	1	2
60	3		6	9
62	2		1	3
63 ⁻			3	33
64			3	3
复数の血清型	20	7	34	61
型別不能	103	51 (3)	78	232 (3)
計	256 (7)	117 (9)	292 (5)	665 (21)

^() 内はエンテロトキシン産生菌株数再掲

事例	病因 物質	ウェルシュ菌 検査対象	検査 件数	ウェルシュ菌 陽性数(%)	エンテロトキシン産生性 ウェルシュ菌陽性数(%)	血清型
A	サルモネラ	有症者	2	1(50.0)	1 (50.0)	TW 24
	04	非有症者	2	0	0	
		従業員	9	1(11.1)	0	
В	SRSV*	有 症 者	145	22 (15.2)	2(1.4)	Hobbs 13
		非有症者	22	6(27.3)	0	
		従 業 員	32	4(12.5)	0	
С	 不明	 有 症 者	16	4 (25.0)	1(6.3)	TW 40
		非有症者	75	9(12.0)	1(12.0)	Hobbs 1
		従 業 員	5	0	0	
D	 不明	 有 症 者	3	2(66.7)	1 (33.3)	TW 19
		従 業 員	6	0	0	
E	不明	 有 症 者	4	1 (25.0)	1(25.0)	Hobbs 13
		従 業 員	18	6(33.3)	0	

表 5. エンテロトキシン産生性ウェルシュ菌を検出した有症者ふん便の事例の概要

*SRSV: small round stuctured virus

菌株はいずれも Hobbs 型または TW 型に血清型別された.

これらの検体を対象に、ふん便からのエンテロトキシン検出を行った。全例とも発病後2~3日のふん便であったが、検出量は80倍未満であり陰性と判定した。なお、対象としてウェルシュ菌食中毒と判定された患者7検体を対象に発病初期のふん便について検討した結果では、80倍2検体、320倍2検体、640倍以上3検体であった。

考察

一般健康人の耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌保菌率は、多くの研究者によって報告されており、東京では11.4~30.8%⁹⁾、他の県では20%~80%、諸外国では2%~60%と著しい差異があり、これは人種、年齢、食習慣、生活環境の違いなどが影響すると考えられている¹⁾、今回の調査ではウェルシュ菌食中毒以外の食中毒に関連するふん便を対象に、有症者、非有症者、従業員に分け解析を試みた結果、耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌検出率はそれぞれ13.6%、18.7%、21.9%、平均17.5%であった。この保菌率は以前に伊藤が報告した東京都内在住一般健康者からのウェルシュ菌検出率⁹⁾とは、ほとんど差が認められなかった。

ウェルシュ菌による集団下痢症の細菌学的診断には、 分離菌株のエンテロトキシン産生性が重要なポイント であり¹⁾、有症者や原因食品から分離された菌株につい てはエンテロトキシンの検査を実施している。今回の 調査では、ヒトふん便からのエンテロトキシン産生性 ウェルシュ菌の検出率は1.0%であり、土壌などの環境 や健康人を対象とした場合のエンテロトキシン産生株の検出率が、0%⁷⁾、0.8%⁸⁾であるいう報告と比較してやや高かった.この理由として、今回使用したエンテロトキシン産生用培地は、従来から使用されている DS培地に比較して芽胞形成能が優れていたためエンテロトキシン産生も良好であったのではないかと考える.また、Van Damme-Jongstenら¹⁰⁾はエンテロトキシン産生遺伝子を検出する DNA プローブ法を応用した場合、従来の培養法よりも高率にエンテロトキシン産生株が検出されることを報告しており、ヒトや動物のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の保菌率は検査法によって異なるものと思われる.

ウェルシュ菌による下痢症の際には患者ふん便中にもエンテロトキシンが存在することが指摘されている⁵⁾. エンテロトキシン産生株が検出された有症者ふん便6 検体についてふん便中のエンテロトキシンを検査したが、いずれも陰性であり、ウェルシュ菌が下痢症に関与していないことが推察された.

検出されたウェルシュ菌の血清型は、Hobbs 型が11 菌型、TW 型が45菌型と多岐にわたっていた。これら型別された血清型のうち Hobbs 型13に型別された菌株が最も多く、これら以外の血清型では特に著しい片寄りは認められなかった。ヒトふん便から Hobbs 型13が最も多く検出されることは22年前の伊藤の調査⁹⁾で指摘されていたが現在でも同様の傾向であった。

ウェルシュ菌食中毒は概して大規模な事例が多く, このような場合はエンテロトキシン産生性ウェルシュ 菌の検出,同一血清型のウェルシュ菌が高頻度に検出, 発病初期のふん便中からエンテロトキシンの検出などの検査ポイントを確認することは比較的容易である. 家庭内の食中毒のような小規模な事例の場合においても、このような検査ポイントの確認及びウィルスを含め他の病原菌の検出状況等総合的なデータのもとで判断すべきであろう.

要 約

ウェルシュ菌による食中毒の細菌学的診断のための基礎資料として,1993年3月~9月の7ヶ月間に食中毒関連及び有症苦情の起因菌検査で搬入されウェルシュ菌食中毒が否定されたふん便1,774検体を対象に,耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の検出状況,分離株のエンテロトキシン産生性及び血清型別について調査した.

- 1. 耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の検出率は全体で 17.5%であり、その内訳は非有症者と従業員では約 20%、有症者では13.6%であった.
- 2. エンテロトキシン産生株の検出率は1.0%であり, その内訳は有症者0.7%,非有症者2.1%,従業員 0.9%であった.
- 3. 分離菌株計933株の血清型は、Hobbs 型に268株、 TW型に433株が型別され、Hobbs 型13が最も高かった。エンテロトキシン産生株の血清型は、Hobbs 型1、 3、6、13、TW型1、19、24、25、27、37、40、43及

び型別不能(同一検体3株)であった.

4. エンテロトキシン産生ウェルシュ菌を分離したふん便6検体からはエンテロトキシンは検出されなかった.

文 献

- 1) 伊藤 武,坂井千三:ウェルシュ菌,食中毒Ⅱ,坂崎利一 編,270-337,1983,中央法規出版,東京.
- 2) Duncan, C. L. and Strong, D. H.: *Infect. Immun.* 3, 137-170, 1971.
- 3) Hauschild, A. H. W., Walcroft, M. J., and Campbellm, W.: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 1141-1143, 1971.
- 4) Strong, D. H., Duncan, C. L., and Perria, G.: *Infect. Immun.* **3**, 171-178, 1971.
- 5) 伊藤 武, 稲葉美佐子, 斎藤香彦 他: 感染症学雑誌, **53**, 409-416, 1979.
- 6) 大谷仁己, 氏家淳雄:食衛誌 28, 281-285, 1987.
- 7) 刑部陽宅:食衛誌, 19, 236-241, 1978.
- 8) 安川 章, 岡田陽一, 北瀬照代 他:食衛誌, **16**, 313-317, 1975.
- 9) 伊藤 武:東京衛研年報, 34, 7-39, 1972.
- 10) Van Damme-Jongsten, M., Wernars, K. and Notermans, S.: Antonie van Leeuwenhoek, **56**, 181-190, 1989.

細菌学的精度管理に供試する各種菌株の基礎的検討

遠 藤 美代子*, 奥 野 ル ミ*, 柏 木 義 勝*, 五十嵐 英 夫*, 工 藤 泰 雄*

Studies on Preparation of Bacteria for Quality Control

MIYOKO ENDO*, RUMI OKUNO*, YOSHIKATSU KASHIWAGI*, HIDEO IGARASHI* and YASUO KUDOH*

Keywords: 細菌学的精度管理 Bacterial Quality Control, 輸送培地 Transport Medium, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguis

はじめに

東京都は1982年より、都内の登録衛生検査所の精度 向上を目的とした外部精度管理事業を実施している¹⁾. 外部精度管理の対象項目は生化学、血液学、血清学、 微生物学である.供試される試料が調査の精度に大き く影響することが知られている.そのため外部精度管 理事業を実施するに当たっては、試料の調製や調達に 細心の注意が必要である.特に微生物学に関する精度 管理の供試試料は、検査材料別に生きた細菌を対象と するので、配布した試料の安定性が重要になっている. その上、検査材料別に調製される模擬検体は、できる だけ実際の検査材料に近い検体が求められている.

1993年9月に実施された第12回東京都衛生検査所精度管理事業において、私どもは"髄膜炎の疑い"の患者由来咽頭ぬぐい液スワブの模擬検体を調製し、配布試料とした。この模擬検体には病原菌以外に咽頭に常在する菌種を加えた5種類の菌種が含まれている。これまで私どもは模擬検体として1~3菌種を含む検体を調製した経験があるが、5種類の菌種を含む検体の調製の経験がなかった。そこで、5種類の菌種を含む模擬咽頭ぬぐい液スワブに含まれている細菌が、保存温度や時間経過にどのように影響を受けるかについて検討をしたのでその成績を報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

Neisseria meningitidis は当研究室保存株であり, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus salivarius および Streptococcus sanguis は東邦大学医学部山口恵三教授より分与された.

2. 供試菌の安定性試験

1) 個々の供試菌種の輸送用培地中での安定性

S. salivarius は、BHIブイヨンにて37℃20時間培養後、 約10⁷CFU/m1に発育した菌液を使用した. N. meningitidis および H. inflenzae はチョコレート寒天培地に塗抹し、 5% CO₂で37℃, 20時間培養後, M. catarrhalis および S. sanguis は血液平板にて20時間培養後、コロニーをかき とり、それぞれ滅菌生理食塩液で約10⁷CFU/mlの浮遊 液を作製した. これらの5菌種の菌液をさらに滅菌生 理食塩液で10⁵CFU/mlまで希釈して供試菌液とした. 滅菌綿棒を各供試菌液に浸し、それぞれをシードスワ ブ3号'栄研'に挿入後、4℃および室温で静置保存し た. 24, 48, 72時間および5日後に綿棒を下記の寒天 培地に塗抹した. すなわち N. meningitidis および H. inflenzae はチョコレート寒天培地に塗抹し、その他の供 試菌は血液寒天培地に塗抹後、それぞれ5%CO2で37℃、 20時間培養した. 結果の判定は平板上のコロニーが100 個以上: (+++), $100 \sim 30$ 個: (++), $30 \sim 1$ 個: (+), 集落形成0個:(一)とした.

2) 5菌種混合スワブでの各菌種の安定性

各供試菌種の約 10^7 CFU/mlの浮遊液を滅菌生理食塩液で希釈して、それぞれ5菌種の生菌数の最終濃度が 10^5 CFU/mlの混合菌液を調製した、滅菌綿棒をこの混合菌液に浸し、それを輸送用培地であるシードスワブ3号 '栄研'に挿入後、4 および室温で保存した。24 ,

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

^{*}東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

24, 48, 72時間後に綿棒を上記 1) と同様に血液寒天平板およびチョコレート寒天平板に塗布し, 5 %CO₂で37℃, 20時間培養した. 結果の判定は平板上で確認された供試菌のコロニー数が100個以上: (+++), 100~30個: (++), 30~1個: (+), 集落形成 0 個: (-)とした.

結 果

1. 各供試菌の安定性

輸送用培地中での保存試験成績を表1に示した.

1) N. meningitidis

室温保存では24時間後で(+),48時間後には菌の生存は確認されなかった。4 C保存では24,48,72時間後で(+++),5日後でも(++)の発育を認めた。

2) H. inflenzae

室温保存では24時間(+++), 48時間(++), 72時間(+)の発育を認めた. しかし5日後では菌の生存は確認できなかった. 4℃保存では, 24, 48, 72時間後で(+++), 5日後で(+++)の発育を認めた.

3) M. catarrhalis

室温保存では24時間(++),48時間(+),72時間(+)の発育を認めた.5日後では菌の発育は確認されなかった.4 \mathbb{C} 保存では、24,48,72時間後で(+++),5日後で(++)の発育を認めた.

4) S. sanguis

室温保存24時間では菌の若干の増加が認められ、 4℃保存での菌の減少傾向が認められた。室温および 4℃保存にて5日後まで(+++)の安定した状態で菌の 生存が確認された。

5) S. salivarius

室温および4℃保存とも5日後まで菌の増減は認められなかった。

2. 混合菌を浸漬したスワブでの5菌種の安定性

供試した 5 菌種の混合菌液に浸したスワブの輸送用培地中での保存試験成績を表 2 に示した.混合菌液に浸したスワブの調製直後の培養検査において,ウマ血液寒天平板およびチョコレート寒天平板の両平板でN. meningitidis,M. catarrhalis,S. sanguis は(++)の発育がみられた.しかし,H. inflenzae と S. salivarius は区別することはできないが(++)の発育を認めた.

N. meningitidis は 4 \mathbb{C} で24, 48時間後に(+)の発育が認められた. しかし、室温で24, 48時間後には N. meningitidis の発育は確認できず、S. sanguis が優勢に発育した. 72時間後には室温保存では S. sanguis, 4 \mathbb{C} 保存では S. catarrhalis が優勢に発育し平板全面を覆ってしまった.

考察

東京都内の登録衛生検査所の外部精度管理事業を実

			24時間	刂	48時間	間	72時間	-	5 日	
菌種	使用培地	直後	4.℃	室温	4 °C	室温	4 ℃	室温	4 °C	室温
N. meningitidis	チョコレート寒天	+++	+++	+	+++	_	+++	_	++	
M. catarrhalis	血液寒天	+++	+++	++	+++	++	+++	+	++	-
H. influenzae	チョコレート寒天	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++	
S. sanguis	血液寒天	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
S. salivarius	血液寒天	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++

表1. 供試細菌単独での保存試験成績

+++:集落数が100個以上, ++:30~100個, +:1~29個, -:0

表2.5菌種混合スワブでの各構成細菌の保存試験成績

•		24時		48	時間	72時間		
菌 種	直後	4 °C	室温	4 ℃	室温	4 °C	室温	
N. meningitidis	++	+	_	+	_	?	· ?	
M. catarrhalis	++	+++	+	++	+	++++**	?	
H. influenzae	++	++*	+*	++*		?	?	
S. sanguis	++	+	+++	+	+++	?	++++***	
S. salivarius	++	++*	+*	++*		?	?	

*: H.influenzae とS.salivarius はチョコレート寒天培地上では判別不可能

**: M.catarrhalis の発育が旺盛で他の菌種分離不能

***:S.sanguis の発育が旺盛で他の菌種分離不能

? :確認不可能

施していく中で、細菌検査における精度管理において、より実際の検査検体に近い模擬検体を調査試料として配布することによって、精度の高い調査が可能であろうと考えられる。このような背景から、1993年の第12回東京都衛生検査所精度管理事業の調査試料に"髄膜炎の疑い"の患者由来咽頭ぬぐい液スワブの模擬検体を配布した。この配布試料の調製の前に、ほぼ同規模の予備実験を実施して供試細菌の保存性を検討した。模擬検体の調製には髄膜炎の起因菌である N. meningitidis, H. inflenzae および M. catarrhalis の他に咽頭常在菌である S. salivarius と S. sanguis の 2 菌種を含めている。実際の検査材料の咽頭ぬぐい液スワブでは、共存している菌種の菌数に違いがあるはずであるが、今回の試料調製においては5菌種とも最終生菌数として約10⁵ CFU/ml とした.

これまでの報告では、髄膜炎の起因菌である N. meningitidis が低温に弱いことから、髄膜炎の疑いのあ る検体の輸送は室温で行うこととされてきた. しかし, 今回の実験では N. meningitidis を単独で輸送用培地に保 存した場合でも、また他の菌種と共存した状態で輸送 用培地に保存した場合でも、全て4℃保存が室温保存 より N. meningitidis の生存率が高い成績であった. 今回 使用したシードスワブ3号 '栄研'は、Neisseria 属菌、 Haemophilus 属菌および Streptococcus 属菌等の病原菌の分 離を目的とする検体の輸送用に開発されたものである. 小林²⁾ や山城ら³⁾ はこの輸送用培地を Neisseria gonorrhoeae に使用する場合は、低温での輸送が望ましいと報 告している. 私たちの N. meningitidis の保存実験におい ても, N. gonorrhoeae と同様な成績であった. その理由 としては、細菌は低温において静菌状態にあり、自己 融解酵素等の産生が少ないためではないかと考えられ ている.

N. meningitidis 以外の H. influenzae, M. catarrhalis, S. salivarius, S. sanguis の各菌種も4 $\mathbb C$ で保存すると,単独または共存状態でも48時間後まで,血液寒天平板あるいはチョコレート寒天平板のいずれかの培地で分離できることが確認された.しかし,室温条件ではN. meningitidis の死滅が著しく,混合菌液の試料では48時間後にはM. catarrhalis とS. sanguis 以外の各菌種の検出は困難となった.また,輸送用培地からの分離培養に種々のメーカーから市販されている血液寒天平板やチョコレート寒天平板の生培地を用いて検査したが,メーカーの違いによりコロニーの大きさや溶血環の大きさに多少の差異は認められるものの,どの市販生培地でも発育はすべて良好であった.このため今回精度

管理に供試した細菌は、輸送用培地中で死滅しない限り分離されると思われる.

これらの成績に基いて、1993年の第12回東京都衛生 検査所精度管理事業の調査試料に"髄膜炎の疑い"の 患者由来咽頭ぬぐい液スワブの模擬検体を調製して, 各登録衛生検査所に配布した. この調査試料には5菌 種が含まれているが、回答欄には髄膜炎の起因菌と考 えられる N. meningitidis, H. influenzae, M. catarrhalis の 3 種類を記入するように設問されていた. この精度管理 の成績が第12回東京都衛生検査所精度管理事業報告書1) に掲載されている. その成績によれば、オープン調査 では29施設中21施設(72.4%)が N. meningitidis, H. influenzae および M. catarrhalis を分離同定し, 29施設中25 施設(86.2%)が検査試料から N. meningitidis を分離同定 した. N. meningitidis が分離同定できなかった 4 施設は どうして分離同定できなかったのか、その理由は不明 であるが、試料の保存を室温で行ったかあるいは検査 までに48時間以上経過した可能性も考えられる.

まとめ

細菌検査の精度管理を実施するため、種類の違う複数菌種の共存状態の試料を調製し、各菌種の生菌数に及ぼす保存温度と保存時間の影響について検討し、下記のような成績を得た.

滅菌綿棒を Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus salivarpus および Streptococcus sanguis の 10^5 CFU/ml 混合液に浸したものをシードスワブ 3 号 '栄研'に挿入して 4 ℃で保存した場合, 24時間後または48時間後にこれらの菌を分離同定することができた. しかし, 室温で24時間保存した場合は, N. meningitidis は分離同定することができなかった. 48時間後には S. sanguis および M. catarrhalis 以外は検出できなかった.

細菌検査の精度管理を実施する場合は,調製した調査試料をできる限り速やかに検査開始することの重要性が改めて確認された.

文 献

- 1) 第12回東京都衛生検査所精度管理事業報告 平成 5年度,東京都衛生局医療計画部,1994.
- 2) 小林二一, 青柳智子, 後藤智子, 他:輸送培地に よる Neisseria gonorrhoeae の保存性, 特に保存温度の 影響について, 臨床病理, **3**, 223, 1986.
- 3) 山城華子,森脇久貴,小林二一,他:シードスワブ 3号 '栄研'の保存性に関する検討,臨床と微生物 **18**(2),247-251,1991.

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1993年11月~1994年3月)

山 崎 清*, 伊 藤 忠 彦*, 林 志 直*, 関 根 大 正*

Prevalence of Influenza Occurred in Tokyo (Nov. 1993~Mar. 1994)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, YUKINAO HAYASHI*
and HIROMASA SEKINE*

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, CF抗体 CF antibodies

緒 言

毎年、冬季になると東京都においても、インフルエンザA (AH1型、AH3型)型ウイルスあるいはB型ウイルスによる流行が認められている。過去、1982年から1986年まではこれら三型のウイルス単独による流行が確認されている $^{1-3}$. しかし、1987年から1992年における都内でのインフルエンザの流行は、AH1型、AH3型及びB型ウイルス三型のいずれかによる混在流行であった $^{4-8}$.

本報では、1993年11月から1994年3月までに、東京都内で発生したインフルエンザ様疾患による集団発生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 1993年11月下旬から1994年3月初旬までに、集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小学校の計29集団129名(1集団2~5名)の罹患学童を検査対象とした.

ウイルス分離試験 ウイルスの分離は急性期に個々の患者から得られた咽頭うがい液129例について,図1に示した方法により発育鶏卵及びRD,Hep 2,HeLa,Vero355,MDCKの各種培養細胞を用いて行った.

発育鶏卵培養法におけるウイルス分離の判定は、検査材料を接種した個々の鶏卵(一検体に付き4~6個)から漿尿液及び羊水を採取し、ニワトリあるいはモルモット赤血球浮遊液を添加し、試し凝集を行った。凝集(+)となった漿尿液あるいは羊水は型別同定試験を

行った. 凝集(-)は羊水を滅菌生理食塩水にて10倍に 希釈して再度発育鶏卵に接種し、3代継代して凝集(-)となったものは陰性とした. また、細胞継代培養法は個々の検査材料を上記各種培養細胞に接種し、それぞれの細胞に適した培養温度で7日間培養した. その間、顕微鏡で毎日観察を行い、CPE(細胞変性効果)が出現したものについては中和試験あるいはHI試験にて型別同定試験を行った. また、CPEが認められないものは再度それぞれの細胞に培養液を接種し、3代継代してもCPEが観察されないものは陰性とした.

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株を抗原として用いた.

AH1型: A/山形/32/89

AH3型: A/ 北九州 / 159 /93

A/東京 / 104 /94

B 型: B/ Bangkok / 163 /90

なお、A/東京/104/94は今冬期、1994年1月中旬に発生した集団事例から分離した株であり、他の3株は全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.

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

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

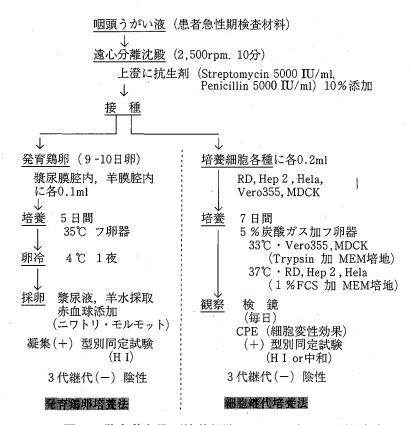


図1. 発育鶏卵及び培養細胞によるウイルス分離試験

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 今冬季のインフルエンザ様疾患の 集団例は、1993年11月に1集団、12月2集団、1994年 1月に10集団、2月13集団、3月3集団の合計29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、20集団例(患者 93名中50名)からインフルエンザ AH3型ウイルスを検 出した。また、ウイルス分離試験は陰性であったが、 血清学的試験の結果、AH3型ウイルスによる感染と診 断された集団例が3例(1994年2月上旬2集団、3月上 旬1集団)認められ、AH3型ウイルスによる事例は合 計23集団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 AH 3 型ウイルスによる事例は、29集団例中合計23集団例で AH 1 型ウイルス及びB型ウイルスによる事例は認められなかった。また、検索により病因が明らかとならなかった6集団例のうち2集団例(1994年1月上旬1集団、中旬1集団)では、アデノウイルスに対する CF 抗体価が急性期血清で既に $16\sim\geq128$ 倍と高値を示す患者が複数例認められた。

インフルエンザウイルス検出患者血清の HI 試験成績 インフルエンザ AH 3 型ウイルスが分離同定された患者

表 1. 1993~1994年冬季、東京都における 集団かぜ患者の病因検索

 発 生	検索対象	診 断 結 果	*****
年月旬	集団例数	インフルエンザ	不明
		AH1型 AH3型 B型	71,67
1993. 11下	1		1
. 12上	2 .	ν.	2
1994. 1中	3	2	1
下	7	6	1
. 2上	8	7*	1
下	5	5	
. 3上	3	3*	
計	29	23	6

*:7例中2例,3例中1例は血清学的試験による診断

のうち、ペア血清が得られた46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ワクチン株あるいは今期分離ウイルス株抗原に対して抗体価の有意上昇が認められた。なお、表中 AH 3型抗原に対する抗体価のうち # で示した 1 例は、急性期で既に2048倍 (π =8) と高い抗体を保有していた。この患者は前年インフルエンザワクチン接種を受けていたことが検体採取時の調査により明らかとなっている。しかし、ワクチン接種では抗体価の有意上昇をみない π S 抗原を用いた π C F では、インフルエンザ A 型抗原に

表 2 . インフルエンザウイルス検出患者由来血清46例の H I 試験成績

A/山形/32/89(AH1)

A/北九州/159/93(AH3)

		,			<u> </u>	[後	. 期						
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*	5+	1										6
	1		3	1									4
	2			14	6								20
急	3				8	2							1.0
	4					5							5
性	-5						1						1
	6												
期	7												
	8												
	9												
	>10												
	計	5	4	15	14	7	1.						46

					П	復	期	}					
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*				1			1		1			3
	1				1	1		2	2	2	1	٠	9
	2						2	1	1	2	2	1	9
急	3						1		1	5	2	1	10
	4								. 3	2		1	6
性	5								4		1		5
	6									2	1		3
期	. 7												
	8										1#		1
	9												
	>10	•		٠									
	計				2	1	3	4	11	14	8	3	46

B/Bangkok/163/90

A/東京/104/94(AH3)

				П	1	更期						
		<1* 1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*	3										3
	1		1									1
	2		2	3							•	5
急	3			6								6
	4				9	1						10
性	5					14						14
	6						5					5
期	7							2				2
	8											
	9											
	>10											
-	計	3	3	9	9	15	5	2			-	46

					ī	復	期	J					
		<1*	1	2	3	4	5	- 6	7	8	9	>10	計
	<1*												
	1									1			1
	2							1		1	1	5	8
急	3						1	1	2	1		3	8
	4								1	3	4	5	13
性	5									. 3	4	3	10
	6									1	1	1	3
期	7									1	1		2
	8										1#		1
	9												
·	>10												
	計						1	2	3	11	12	17	46

*:8×2°値(抗体価)

+:例数

#:同一患者

対して急性期は8倍以下であり、回復期では16倍と抗 体価の上昇を認め、インフルエンザA型の感染が血清 学的にも証明されている. 患者ペア血清において HI抗 体の有意上昇を急性期及び回復期の比を4倍以上とし た場合、AH3型抗原株に対する抗体の有意上昇例は、 - A/北九州/159/93株及びA/東京/104/94株に対して前述 の1例を除く45例(97.8%)に認められた. 今回供試した - 46例のペア血清の急性期血清では,AH3型ウイルス抗 原に対する HI 抗体価は、北九州株では全例64倍(n=3) から2048倍(n=8)以上を保有していた. また, 東京株に おいても16倍(n=1)が1例,他の45例では32倍(n=2)か ら2048倍(n=8)と高い H I 抗体価が認められている. こ の患者急性期における高い HI 抗体の保有は,20年以上 の長きにわたり繰り返し流行した AH3型インフルエン ザの感染既往歴あるいは頻回なるワクチン接種歴が原. 因であると考えられる. 他方, 前年と同様にウイルス 分離にあたって、発育鶏卵培養法と細胞継代培養法で

の分離率(分離株数/検査件数=%)の比較を行ったが、発育鶏卵法は9/129(7.0%)、細胞継代培養法では50/129(38.8%)と前年の流行期にみられた発育鶏卵培養法での分離率の低下が今流行期にも認められた⁸⁾. また、ウイルス分離試験に関連した他の特徴として、通常、分離ウイルスの試し凝集及び型別同定試験はニワトリ赤血球が用いられているが、今季分離ウイルスはニワトリ赤血球に対する凝集能が極めて低く、その判定にはモルモット赤血球を併用せざるを得なかったことである。これら二点の特徴から近年の流行ウイルス(AH3型)がこれまでに分離されたAH3型ウイルスと生物学的性状を一部異にしている可能性が考えられた.

今冬季のインフルエンザ流行の特徴としては、例年では集団発生例が続発し、流行期間中一時期に集中することが多いのであるが、今季は分散する傾向がみられ、発生例数も減少した。また、都内における届出患者数も前年に比べ約1/4(11,062/42,854)と激減したこ

となどから流行の規模は例年に比べ小さなものであったことを窺わせた.

以上のごとく東京都における今冬季の集団かぜは、インフルエンザ AH 3 型ウイルスによる流行で、1986年以来、7年ぶりの単一型の流行であった。なお、AH 1型及びB型ウイルスによる集団事例は1例も認められなかった。

一方、厚生省の調査による全国的なインフルエンザ 様疾患の発生は、1993年11月初旬北海道にて初発が確 認された. インフルエンザウイルスの初発例は12月下 旬に徳島県でB型ウイルス、大阪府ではAH3型ウイル スがそれぞれ同時期に検出の報告がなされ、いずれも 散発例からのものであった⁹⁾. 以後, 1994年1月中旬か ら3月下旬までに、36都道府県で集団例及び散発例で のAH3型ウイルスによる流行が確認された. そのうち 15県は散発例によるもので、集団例の発生は前年同期 に比べ 22/34(64.7%) と少ないものであった. また, B 型ウイルスの流行はそのほとんどが散発例によるもの で、集団例は青森県と福岡県のわずか2例のみであっ た. AH1型ウイルスによる集団例及び散発例は認めら れなかった. なお、今期の全国における集団発生によ る届出患者数は33,403人で,前年度(397,662人)の10% にも満たなかった 10 .

文 献

- 1) 坂井冨士子, 伊藤忠彦, 山崎 清, 他:東京衛研 年報, **34**, 60-64, 1983.
- 2) 坂井冨士子, 伊藤忠彦, 山崎 清, 他:東京衛研 年報, **35**, 69-72, 1984.
- 3) 山崎 清, 伊藤忠彦, 中村清純, 他:東京衛研年報, **39**, 32-34, 1988.
- 4) 山崎 清, 伊藤忠彦, 新開敬行, 他: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, 他:東京衛研年 報, **42**, 1-4, 1991.
- 7) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根大正:東京衛研年報, **43**. 8-11, 1992.
- 8) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根大正: 東京衛研年報, 44, 25-28, 1993.
- 9) 国立予防衛生研究所内日本インフルエンザセンター: 1993/94 シーズンインフルエンザ流行情報①
- 10) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課:インフルエンザ様疾患発生報告(第23報), 1994.

東京都における1992年、1993年の HIV 抗体検査

森 功 次*, 貞 升 健 志*, 田部井 由紀子*
稲 葉 美佐子**, 伊 藤 忠 彦*, 山 崎 清*, 門 間 公 夫*
関 根 大 正*, 吉 田 勲**, 鈴 木 敬 子**, 平 田 一 郎**
工 藤 泰 雄***

Serological Survey for Antibodies Against HIV During 1992 and 1993 in Tokyo

KOHJI MORI*, KENJI SADAMASU*, YUKIKO TABEI*
MISAKO INABA**, TADAHIKO ITOH*, KIYOSHI YAMAZAKI*, KIMIO MONMA*
HIROMASA SEKINE*, ISAO YOSHIDA**, KEIKO SUZUKI**, ICHIROH HIRATA**
and YASUO KUDOH***

Abstract

In Tokyo, we have investigated the serological survey for antibodies against HIV using ELISA, Particle Agglutination test, western blot assay, immunofluorescence assay and Synthetic Peptide EIA. Serum samples from 31,401 cases were collected in 1992, and 23,920 cases in 1993, from the Public Health Center. The frequency of a positive antibody response for HIV was 0.076% (24cases), and 0.075% (18cases) respectively, highly than positive case rate (0.048%) obtained from 1987 to 1991.

Samples of Seropositive sera were assayed for antibody testing to differentiate HIV-1 from HIV-2, and all of them were found to be HIV-1 antibody positive.

Keyword: 後天性免疫不全症候群 Acquired Immunodefficiency Sindrome: AIDS, ヒト免疫不全ウイルス Human Immunodefficiency Virus: HIV, HIV 抗体検査 HIV Antibody Testing, HIV-2 型 HIV-2

緒 言

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Sindrome: AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) による疾患であり、AIDS 患者、HIV 感染者の増加が世界的な問題となっている。AIDS が登場してから時間が経過するにつれ、感染者の人権の問題、サーベイランスやモニタリングのシステムの充実、感染予防のための正しい知識の啓蒙および教育の必要性などの多面的な課題も出現してきた。WHO の統計¹⁾ によれば1993年末の世界187ケ国の

AIDS 患者は851,628人, HIV 感染者総数は1,400万人以上と報告されている.

わが国で確認された患者を含む感染者数は、1993年末までの累計で3,599人であり、感染原因の内訳は凝固因子製剤2,189人(60.8%)、異性間の性的接触658人(18.3%)、同性間の性的接触283人(7.7%)、静注薬物濫用11人(0.4%)、母子感染9人(0.3%)、およびその他、不明449人(12.5%)となっている 2 、東京都においても凝固因子製剤による患者、感染者を除いても478人の感染者が報告されており、感染者の多い地域である.

- *東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169 東京都新宿区百人町 3 24 1
- *The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
- **東京都立衛生研究所多摩支所 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

都立衛生研究所では1987年2月より HIV 抗体検査を開始し、1993年末までに74,296件の検査を実施してきた。このうち1987年から1991年までの抗体検査の成績についてはすでに報告してきたので 10 、本報では HIV 抗体陽性者の急増してきた1992年、1993年両年の検査成績について報告する.

材料および方法

検査対象

1992, 93年の2年間に23区保健所由来の43,453件, 多摩地区および島しょの保健所由来の11,868件, 監察医務院由来の23件の計55,321件の血清を検査対象とした(都立衛生研究所多摩支所, および目黒区, 足立区スクリーニング検査分を含む). また, 当研究室に確認検査として依頼された民間検査機関の142件, 南新宿検査相談室の6件, および医療刑務所の9件, 計157件の血清についても検査を実施した.

HIV 抗体スクリーニング検査法

現在実施している HIV 抗体検査の工程を Fig. 1 に示す。すなわち,一次スクリーニング検査として酵素抗体法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA法,エラビアミックス,パスツール)を行い,キット添付のカットオフコントロール血清より OD 値の高い場合を陽性とした。次に二次スクリーニング検査としてゼラチン粒子凝集法 (Particle-Agglutination Test: PA法,セロディア HIV1/2,富士レビオ)を用い,感作粒子の均一な凝集,もしくは外周縁周辺に凝集の見られた場合を陽性とした。これらの一次,二次試験とも陽性と判定された例について確認検査を行った。

HIV 抗体確認検査法

確認検査としては、ウエスタンブロット法(Western Blot Assay: WB法)は、HIV-1型検出用としてオーソHIVウエスタンブロットキット(オーソ)および、ラブブロット1(パスツール)を用いた。判定はWHOの判定基準に従いgp160、gp120、gp41の3本のenvバンドのうち2本以上が出現した場合を陽性とした。HIV-2型検出用としてはラブブロット2(パスツール)を用い、キットの判定基準に従いgag、env、polの3種のバンドそれぞれが1本以上出現した場合を陽性とした。またHIV-1型検出用として間接蛍光抗体法(Immunofluorescence Assay:IF法、VIRGO HIV IFAコクサイ、国際試薬、および自家製)も用い特異的な蛍光が認められた場合を陽性とした。

また,確認検査陽性例で HIV-1 型, 2 型の鑑別が必要な際には,合成ペプチドによる EIA 法 (スロットブロット法,ペプチラブ 1 , 2 ,パスツール) を実施した.

結果および考察

HIV 坑体検査受診者数

HIV 抗体検査受診者数は、1987年2月から91年末までが18,841件に対し、1992年が31,401件、1993年が23,920件、計55,321件と急増してきた。1992年12月が受診者数のピークであり、同年11月より見られる受診者件数の突出は、11月15日から12月14日にかけてのエイズ予防月間に伴うマスコミ等の宣伝効果の影響と思われる。しかし、その後は受診者数は漸次減少しており、1993年4月の無料検査の開始時においても件数の増加は見られなかった。保健所受診者の HIV 抗体検査数

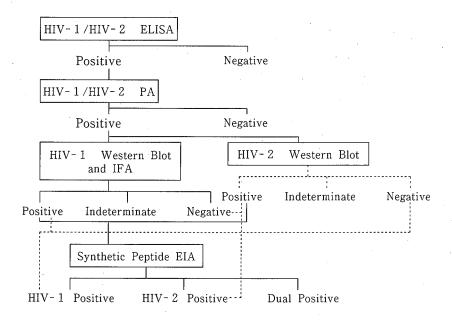


Fig. 1 Diagram of Serological Diagnosis for HIV Infection.

と陽性者数の推移を Fig. 2 に示した.

保健所受診者の HIV 抗体検査成績

保健所受診者における抗体検査の成績を Table 1 に示す.

陽性率は1992年が0.076%, 1993年が0.075%と1987年2月から1991年末までの0.048%よりも高率であった. 陽性例の見られた割合は1992年, 1993年とも約1300件に1例と両年に差が見られなかった. 全国を対象とした日赤の献血者におけるHIV 抗体陽性率による輸血感染危険率は採血10万回あたり0.45回(1992年)であり³⁾, 今回検索した保健所受診者の抗体検査の陽性率はこれ

に比べ著しく高率であった.

東京都から報告された AIDS 患者, HIV 感染者数は 日本全国の約3分の1を占める²⁾. 日赤の輸血感染危険率も首都圏では採血10万回あたり0.92回(1992年)と日本全国の場合の約2倍と高率である³⁾. このような大都市に患者, 感染者の集中する傾向は世界各国でも見られ, ニューヨーク市で報告された患者数はアメリカ全体の20%に相当し⁴⁾, フランスでは50%以上がパリ市に集中している²⁾. これらの大都市には人口の集中, 外国人の流入数や,接触の機会など,共通の要因が存在するものと思われる.

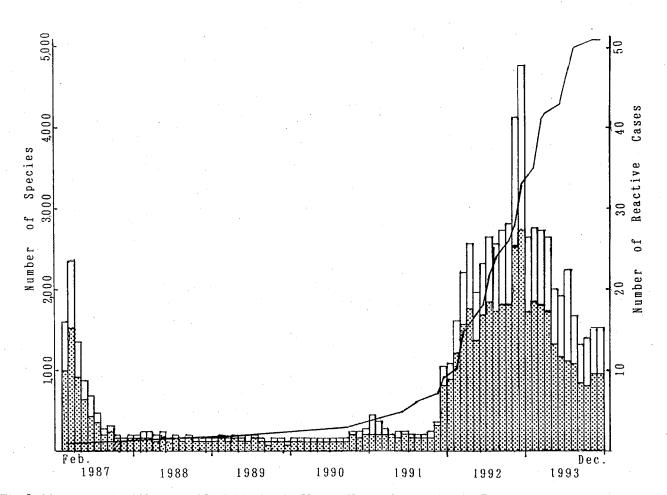


Fig. 2 Monthly shift of Number of Individuals who Visited Health Centers for the Test of Anti-HIV Antibody and Number of Reacted to Positive in Tokyo.

: Males : Females --: Number of Positive Cases (Total)

Table 1 Frequency of a Positive Antibody Response for HIV in the Sera from Health Centers.

Year	No. of Specimens	ELISA Positive	PA Positive	WB and IF Positive	HIV Positive	(%)
1987—1991	18,841	65	9	9	9	(0.048)
1992	31,401	301	24	24	24	(0.076)
1993	23,920	163	18	18	18	(0.075)
Sum	74,162	529	51	.51	51	(0.069)

^{*}Included some Samples from Medical Examiner's Office

厚生省の統計²⁾によると、全国的な傾向として1991年、92年の AIDS 患者、HIV 感染者の急増と93年に入ってからの減少が見られる。東京都における抗体検査陽性例数の推移もほぼこれと同様の傾向を示す。

1987年2月から1993年末までの保健所受診者の51例および後述する民間検査機関の123例,南新宿検査相談室の6例,医療刑務所の6例,計186例のHIV 抗体陽性例について鑑別用キットであるペプチラブ1,2を用いてHIV-2を検索したが,186例すべて血清学的にHIV-1型と判定された.

民間検査機関からの確認検査成績

1992年6月より民間検査機関からの確認検査依頼の検体について確認検査を実施している。1993年末までで142件中123例が陽性であったが、母数であるスクリーニング検査数が不明のため、陽性率は算出不能であった。保健所由来の陽性例との性別や年齢層の違いをFig. 3 に示した。保健所由来の場合には男性の陽性例は幅広い年齢層に分布している。それに対し、民間検査機関由来の例は性別等のデータ不明の例も多いが、陽性例に占める女性の割合の高さ(女性65例、男性12例、不明46例)が目立っている。

南新宿検査相談室からの確認検査成績

東京都では、全国に先駆けて夜間の HIV 坑体検査の常設センターを1993年9月に開設した(南新宿検査相談室). 当機関でも本研究所と同様のキットを用い一次、二次スクリーニング検査を行い、陽性検体については当研究科に確認検査の依頼がある. 開設から1993年末までに6件の確認検査を実施したがすべて HIV 抗体陽性となった. 受診者数が2,478件であることから、その陽性率は0.24%と保健所受診者よりも高率であった.東京に続き、他府県でも同様の施設が開設されたが、今後は HIV の潜在的な流行の把握を目的とし、休日にも対応した施設の設置も必要であろう. なお、医療刑

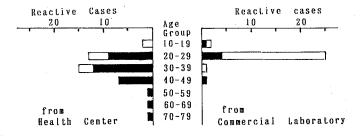


Fig. 3 Proportion of Cases that were Juaged Positive, from Age and Sex of HIV Positive Antibody Positive Cases by Health Center and Commercial Laboratory.

Males : Females

務所から依頼のあった9件に確認検査を実施したが、このうち6件が HIV 抗体陽性であった.

今回は1992年と1993年の2年間に当該研究科で取り 扱ったHIV 抗体検査成績を中心に述べたが、ELISA 法 によるスクリーニング検査陽性率は両年とも以前より 高くなった。これはELISA 法に使用するキットが1992 年1月から現行のエラビアミックスに変更されたため と考えられる。1987年2月から1988年3月まではア ボット anti HTLV-III、(アボット)、1988年3月から 1989年9月まではバイロノスチカ anti HTLV-III、(オ ルガノテクニカ)、1989年10月から1991年12月まではパ スツールエラビアEIA、(パスツール)の各キットを使 用してきたが、現行のエラビアミックスはウイルスの 培養上清(Virus Lysate)を抗原として使用し、HIV-1 型とHIV-2型について同時に検査できる特長がある。

PA 法においては1993年 7 月より、セロディア HIV から現行のセロディア HIV1/2 に変更したが、それに伴い PA 法を二次スクリーニングとして明確に位置づけした.

セロディア HIV1/2 に添付される HIV-1 型検出用の 感作粒子が陽性を示す場合, env のバンドが1本のみな ので確認検査の成績を判定保留とした例が民間検査機 関由来で1例見られたが、HIV-2型検出用の感作粒子 が陽性を示す場合でも,確認検査で必ずしも HIV-2 型 陽性となるとは限らなかった. これは HIV-1 型と HIV-2 型は蛋白成分の一部では約60%もの homology が あり、それにより HIV-1 型の単独陽性の場合であって も HIV-2 型用のキットに交叉反応が起きるためと考え られている. HIV-2 型検出用の WB 法キットであるラ ブブロット2において陽性の条件を満たしながら、鑑 別用キットであるペプチラブ1,2 において HIV-2 型 に特異的なバンドが出現しなかった例が2例, HIV-2 型に特異的なバンドが出現したが、同時に出現した HIV-1 型に特異的なバンドや発色コントロールより弱 い発色のバンドであったため HIV-1 型と判定された例 が3例見られた. また、PA 法において HIV-1 型陰性 であっても, HIV-1 型の WB 法を行うと p17, p24等の バンドが非特異に出現する場合が抗体検査受診者層に 限らず見られるが、PA法においてHIV-2型陰性で あっても HIV-2 型の WB 法で p26等のバンドが出現す るのも同様の理由によるものと思われる.

HIV-2 型は主に西アフリカを中心に高く分布している. アフリカ以外ではヨーロッパ(ポルトガル, フランス, ドイツ等), 南北アメリカ(アメリカ, カナダ, ブ

ラジル),アジア(インド等)で HIV-2 型感染者の報告がされているが,ポルトガル,フランスが大部分を占め,他の地域からの報告数は少ない.わが国においても厚生省から1993年7月に海外からの短期旅行者からではあるが,初めて HIV-2 型が検出されたという発表があり新聞等でも話題となったが,著者らの検討ではHIV-2 型は認められていない.しかし発生国への旅行者などにより国内に HIV-2 型が侵入してくる危険性があり,HIV-1 型と HIV-2 型を含めた検査体制の整備が望まれる.さらには血清学的な検査のみでは確実なHIV-1 型と HIV-2 型の鑑別は不可能との報告もあり50,抗体検査を含め新たな検査法の開発も必要であろうと思われる.

まとめ

1992年および1993年の2年間の保健所受診者55,321件中42件がHIV 抗体陽性であった. 陽性率は0.076%であり, 過去の1987年2月から1991年までの検査での陽性率0.048%よりも高い成績であった.

他機関から確認検査の依頼のあった,157件中135例が HIV 抗体陽性であった。この 2年間に HIV 抗体陽性であった177例についてペプチラブ 1, 2 において HIV-1 型と HIV-2 型の鑑別を行ったが、いずれも HIV-1 型であった.

(本報の概要は第10回国際エイズ会議/国際 STD 会議,

1994年8月で発表した.)

文 献

- 1) WHO: Weekly Epidemiological Record 69, 5-12, 1994.
- 2) HIV 感染者発症予防治療に関する研究班・情報委員会, HIV 疫学研究班学部会・検査情報普及グループ:HIV 最近の動向, 第11号, 1994, AIDS 医療情報センター.
- 3) 渡部準之助:HIV 疫学研究班報告書, 169-173, 1993.
- 4) Thomas P. A., Weisfuse I. B., Greenberg A. E., et al: *Am. J. Epidemiol.*, **137** (2), 121-133, Jan15, 1993.
- 5) 速水正憲:HIV疫学研究班報告書別冊, 1993.
- 6) 菱田靖, Magnusen AF, 薦田温子, 他:医学と薬学, **24**(4), 959-970, 1992.
- 7) Montagnier L, Clavel F, Guetard D, et al, : *Science* **233**, 343-346, 1986.
- 8) George J. R., Ou C. Y., Parekh B., et al, : *The Lancet* **340**, 337-338, 1992.
- 9) 大貫奈穂美, 貞升健志, 関根大正, 他:東京衛研 年報, **41**, 16-21, 1990.
- 10) 関根大正, 貞升健志, 大貫奈穂美, 他:東京衛研年報, **43**, 12-15, 1992.

都立病院における先天性代謝異常症スクリーニング成績 (1988-1993)

安 部 昭 子*, 柴 田 寒*, 高 野 弘 紀*

Report on Mass Screening for Inborn Errors of Metabolism in Metropolitan Hospitals in Tokyo (1988–1993)

AKIKO ABE*, MINORU SHIBATA*, HIROKI TAKANO*

Keywords:新生児マス・スクリーニング neonatal massscreening, 先天性代謝異常症 inborn errors of metabolism, 先天性副腎過形成症 congenital adrenal hyperplasia

緒 言

先天性代謝異常症の大部分は,先天的に遺伝子に異常があるためにある特定の酵素の欠損または活性低下が起こり,代謝過程に異常をきたす疾患である¹⁾.酵素の欠損によって異常に産生された物質が障害を起こす場合はその物質を含む食物の摂取を制限することにより,また欠損した物質による障害ではそれを補うことによって治療が可能である.

わが国では1977年から、治療困難な多くの先天性代謝異常症の中で、治療が可能で、ある程度の発症頻度があるフェニールケトン尿症等の5種の疾患を対象として、異常を早期に発見し、障害の発症を防止することを目的に新生児を対象としたマス・スクリーニングが実施されている。

東京都では1978年3月よりこれらの5種の疾患の検査を開始してきたが、1981年に先天性甲状腺機能低下症を、1989年には先天性副腎過形成症を加え実施してきた.しかし、厚生省通知により東京都では1993年1月1日付けで、ヒスチジン血症のスクリーニングが対象疾患から除かれた.現在は計6疾患について検査を実施している.

1978年から1987年の10年間については既に報告してきたので、今回は1988年から1993年まで 6 年間のスクリーニング成績をまとめた。さらに先天性副腎過形成症の成績では17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP) 濃度と出生時体重との関係について検討した。

調査対象と方法

1. 調査対象

対象者は都立病院13施設で出生または受診し、その 保護者が検査を希望する新生児である.検体は原則とし て生後4日から6日目に採血し、ろ紙に染み込ませた 乾燥ろ紙血液を用いた.

2. 方 法

1)検査方法

フェニールケトン尿症、メイプルシロップ尿症、ヒスチジン血症、およびホモシスチン尿症のアミノ酸代謝異常症は bacterial inhibition assay であるガスリー法でそれぞれのアミノ酸濃度を測定した。陽性基準値以上またはその前後を示した検体については、同一検体をアミノ酸分析機(共和精密 KK, K-202GO)を用い定量し確認した。ヒスチジン血症は薄層クロマトグラフィーによるウロカニン酸の検出の有無を調べた。

ガラクトース血症は、総ガラクトース量をペイゲン吉田法により測定し、併せてガラクトース血症 I 型の欠損酵素である galactose-1-phosphate uridyltransferase の活性の有無をボイトラー法により調べた。確認検査として、ガラクトースおよびガラクトース I リン酸を藤村法により定量し、それぞれの量の違いによって I 型及びII 型及びII 型に分類した。ガラクトース血症 II 型 の 疑 い に は uridine diphosphate galactose-4-epimerase の活性の有無を測定した。

先天性副腎過形成症は21-水酸化酵素欠損症を対象に スクリーニングし、21-水酸化酵素欠損によって増量す

^{*}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

る 17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP) を ELISA 法 (栄研キット)により測定した.

2) 陽性基準

陽性基準値以上を示した検体は疑陽性として,各医療施設に再採血を依頼した.再検の結果,再び疑陽性を示した検体は精密検査機関の受診を要請した.初回検査で異常高値を示した場合は,直ちに精密検査を要請した.

フェニルケトン尿症、メイプルシロップ尿症の陽性 基準はフェニルアラニン、ロイシンをそれぞれ4 mg/dl 以上、ホモシスチン尿症はメチオニンを1.5mg/dl以上 を疑陽性とした。ヒスチジン血症はヒスチジンを6 mg/dl以上およびウロカニン酸の非検出を疑陽性とした。 ガラクトース血症はペイゲン・ファージ法において総 ガラクトース値8 mg/dl以上とした。

先天性副腎過形成症は17-OHPを測定し(直接法),測定時の測定分布の高い値の上位から5%又は6.5ng/ml以上の検体について,エーテルで抽出し再測定を行い(抽出法),抽出法値4.0ng/ml以上を陽性とした.初回検査で直ちに精密検査を要請する基準値は,成熟児は抽出法値10.0ng/ml以上および未熟児は原則として抽出法値20.0ng/ml以上とした.尚,出生体重2500g,在胎週数37週未満を未熟児とし,それ以上を成熟児とした.

結果および考察

1. 先天性代謝異常症

1988年度より1993年度まで6年間のスクリーニング 受付総数は52,727名, およびヒスチジン血症は44,229 名であった. (表1)

初回検査で疑陽性として再採血を依頼した再検者は、ホモシスチン尿症2名、ヒスチジン血症3名、ガラクトース血症8名、その他として複数のアミノ酸またはスクリーニング対象以外のアミノ酸が異常値を示した5名を併せ計18名であった.

ヒスチジン血症, ガラクトース血症を除いて, いずれも低体重児であった. その中で, メチオニン, フェニールアラニン, ロイシンの複数のアミノ酸値が軽度に上昇した2名, およびアミノ酸分析機によってアラニンの異常高値が発見された1名は, 重篤な病態を呈した児であった.

再採血によって回収された再検者は15名で、そのうち13名は陰性となり、再度疑陽性を示したものは、ガラクトース血症およびヒスチジン血症各々1名であり、専門治療機関に精密検査を要請した.精密検査を要請したがラクトース血症の疑陽性者は約1ヶ月後の検査の結果正常となり、一過性のガラクトース高値と考えられた.再検者の中でガラクトース疑陽性者が最も多く、ガラクトース血症以外に肝機能障害、胆道閉鎖症によってもガラクトースが上昇することが知られている.

表 2 に既に報告済みの成績と合わせ1992年 3 月まで過去16年間のスクリーニング実施状況をまとめた $^{2)}$.

16年間に172,227名(ヒスチジン血症163,729名)を検査し、再検者は367名であった。再検者はスクリーニング開始初期に比べ、近年ではカットオフ値の変更、確認検査の確立等により著しく減少してきている。32名の精密検査を要請し、フェニルケトン尿症1名、ヒスチジン血症21名、ガラクトース血症3名の患者を発見した。

フェニルケトン尿症患者1名は、精密検査の結果軽度のフェニルケトン尿症と診断されたものである.

ヒスチジン血症の発見率は7,797人に1人と全国に比べ大きな差は見られなかった。ヒスチジン血症は日本では代謝異常症スクリーニングの中で最も高い頻度で発見されていたが、食事療法の有無にかかわらず心身発達が正常であることからスクリーニング対象疾患から除かれた疾患である.

•		1988年	Ξ.		1989年	Ē]	1990年	Ē		1991年	Ξ		1992年	Ξ		1993年	Ē .		合計	
•	ç	7501	牛	8	,637∤		8	,610化		8	,856 /	‡	8	,376作	*	8	,4981		5	2,727	<u>——</u> 件
疾患名	再検	精検	患者	再検	精検	患者	再検	精検	患者	再検	精検	患者	再検	精検	性者	再検	精検	患者	再検	精検	患者
フェニルケトン尿症	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	. 0	0	0	0
ロープルシロップ尿症	0	0	0,	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ホモシスチン尿症	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0 .	0
ヒスチジン血症	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0			-	3	1	1
ガラクトース血症	1	0	0	1	0.	0	2	0	. 0	0	0	0	1	0	0	3	1	0	8	1	0
その他*	1	0	0	1	0	0	0 .	0	0	2	0	0	1	. 0	0	0	0	0	5	0	0
副腎過形成症	_	-	_	20	2	1	21	5	1	26	0	0	28	2	1	39	3	2	134	12	5
	2	0	0	22	2	1	26	6	2	29	0	0	31	2	1	42	4	2	152	14	6

表1. 先天性代謝異常症スクリーニング実施状況

^{*2}種以上または対象外アミノ酸高値

	1978	8年~198	37年	198	8年~19	93年		合計		中北	7% El ::/a
	1	19,500件	*		52,727件	<u></u>	1	72,2271	——— 牛	忠有	発見率
疾患名	再検	精検	患者	再検	精検	患者	再検	精検	患者	都立病院	全国 ⁷⁾
フェニルケトン尿症	3	1	1	0	. 0	0	3	. 1	1	1/172,227	1/80,300
メープルシロップ尿症	9	0	0	0	0	0	9	0	0	. —	1/431,000
ホモシスチン尿症	61	3 - 2	0	2	0	. 0	63	3	. 0	_	1/171,700
ヒスチジン血症	89	20	20	3	1	1	92	21	21	1/7,797	1/9,100
ガラクトース血症	146	5	3	8	1	0	154	6	3	1/57,409	1/42,800
その他	41	1	0	5	0	0	46	1	. 0	. -	_
副腎過形成症	_			134	12	5,	134	12	5	1/10,744	1/20,500
計	349	30	24	152	14	6	501	44	30	· .	, —

表 2. 過去16年間の先天性代謝異常症クリーニング実施状況

表 3. 先天性副腎過形成症 体重別初回検査成績(1992年度)

出生時	17	7OHP値	(ng/ml)	· <u>I</u>	直接法17	OHP値基準以	 上検体	. ‡	由出法17	OHP値基準以	 L上検体
体重(g)	件数	(%)	直接法	件数	(%)	直接法	抽出法	件数	(%)	直接法	抽出法
<1,000	95	(1.2)	*6.9±4.1	39	(17.7)	25.5±2.8	5.4±2.6	14	(50.0)	68.3±2.3	14.5±2.1
1,000-1,499	212	(2.6)	4.8 ± 2.6	46	(20.9)	19.1 ± 2.2	3.8 ± 2.5	9	(32.1)	40.0 ± 1.5	10.9 ± 1.4
1,500-1,999	349	(4.3)	4.1 ± 2.0	52	(23.6)	11.8 ± 1.7	2.5 ± 2.0	3	(10.7)	27.6 ± 1.7	9.0 ± 1.3
2,000-2,499	628	(7.7)	3.0 ± 1.8	41	(18.6)	8.8 ± 1.3	2.2 ± 1.6	1	(3.6)	12.6	6.4
2,500-2,999	2,451	(29.9)	2.0 ± 1.7	18	(8.2)	6.9 ± 1.4	1.2 ± 2.3	0			_
3,000-3,499	3,222	(39.3)	1.9 ± 1.7	13	(5.6)	7.5 ± 1.6	1.4 ± 1.9	**1	(3.6)	155.5	93.8
3,500-3,999	1,013	(12.4)	1.8 ± 1.6	7	(3.2)	8.0 ± 1.3	1.7 ± 1.9	.0			<u></u>
$\geq 4,000$	132	(1.6)	1.9 ± 1.7	0				0			. —
体重無記入	92	(1.1)	2.5 ± 2.0	4	(1.8)	12.8 ± 1.6	$3.6\!\pm\!1.4$	0			-
計	8,194	(100)	2.1±1.9	220	(100)	13.1±2.2	2.8±2.5	28	(100)	50.6 ± 2.2	13.1±2.1

^{*}平均士標準偏差

ガラクトース血症3名は、いずれもガラクトースⅢ型4エピメラーゼ欠損症であった.

2. 先天性副腎過形性症

スクリーニングでは多くの未熟児において17-OHP濃度が高値を示すことをこれまで確認してきた $^{3,4)}$.

17-OHPの陽性基準の値によって、未熟児に偽陽性者の呼び出しが増加し、成熟児に異常者の見逃しの危険性がある。そのため、当所における17-OHP値の体重別分布を把握し、未熟児および成熟児のそれぞれの陽性基準の必要性について検討した。(表3)

1992年度の受付者は再検受付者を除き8,194名であった. 2500g未満の低体重児は1,284名でその率は15.9%であり、東京都の人口動態統計による低体重率(6.9%)と比べ高率であった.

17-OHP値の濃度別分布が対数正規分布に近いことから平均は幾何平均とした.

初回検査では、直接法による17-OHPの平均値は

2.1ng/ml, 標準偏差は1.9ng/mlで, 範囲は0.1ng/ml~300ng/mlであった.

出生体重別にみると2,500g~2,999g群の平均値±標準偏差が $2.0ng/ml\pm1.7ng/ml$ であり,それ以上の体重群と大きい差がないのに対して,2,500g未満の低体重児では,2,000g~2,499g群,1,500g~1,999g群,1,000g~1,499g群,1,000g未満群と体重が低下するに従って 17-OHP 平均値は $3.0ng/ml\pm1.8ng/ml$, $4.1ng/ml\pm2.0ng/ml$, $4.8ng/ml\pm2.6ng/ml$, $6.9ng/ml\pm4.1ng/ml$ と有意に高い値を示し,バラツキも大きかった.

直接法17-OHP値が陽性基準以上を示したものは220名(2.7%)あり、抽出法で再測定を行い、更に抽出法値が陽性基準以上を示した再検者は28名(0.35%)であった.このうち1名は出生時体重3,444g、在胎週数40週、採血日令3日の女児で直接法17-OHP値155.5ng/ml、抽出法値93.8ng/mlと異常高値を示し、再検査を待たず直ちに

^{**}精密検査要請

精密検査を要請した. 初回疑陽性者はこの1名を除き全て体重2,500g未満であり、その数は低体重児程多くなっている.

1989年から1993年まで42,977名について検査し、再 検者は134名であり、そのうち2,500g未満の低体重児の 占める割合は多く123名(91.8%)であった. (表4)

初回検査において異常値を示した精検要請者の10名中7名は成熟児で、臨床的に異常を疑われた4名が含まれ、そのうち2名は17-OHP抽出法値15.7ng/ml、23.0ng/mlと比較的低い値であった.

再検を実施した93名中2名は再検の結果再び疑陽性を示し精検を要請した.残りの91名は、2回または数回の再検で正常となった.その中には初回時異常値を示さず、再検時に上昇した7名含まれ、それらはいずれも604g~1470gと低体重児であり、抽出法17-OHP値は6.7ng/ml~20.2ng/mlであった.生後5日から7日位に採血可能であった低出生体重児の17-OHP値は、それ以降の採血時の値より低値を示す傾向があるという報告もあり、安定した状態にある低出生体重児の17-OHP値はそれ程高値ではなく、その後の合併症等によるス

表 4. 先天性副腎過形成症 疑陽性検体 検査実施状況

出生時体重		初検	 再検		
(g)	件数	精検要請	精検要請	陰性	未回収
<1,000	60	3	0	42	15
1,000-1,499	44	0	2	35	7
1,500-1,999	13	. 0	0	9	4
2,000-2,499	6	1	0	- 2	3
≥2,500	11	6	0	3	2
計	134	10	2	91	31

トレスにより比較的容易に値が上昇すると考えられた5.6.

要精密検査の結果,確認が可能であった患児は5名で,全員成熟児であった.(表5)患者発見率は10,7444人に1人と全国の20,500人に1人に比べほぼ2倍の高頻度であった.

先天性副腎過形成症スクリーニングの疑陽性者の大部分をしめる未熟児は、何んらかの感染症、疾患等のストレスにより容易に値が変動し、一時的に高値を示す傾向は成熟児に比べ強いように思われた。未熟児においても遺伝的疾患は成熟児と同等の確率であると考えられるので、異常値を先天性副腎過形成症によるものと一過性によるものとの区別をつけにくく、未熟児の正常値、陽性基準値を明確に決定することは困難であった。当所では未熟児については、17-OHP値高値である旨を連絡し疾病によるものかどうかは担当医に判断を委ねるようにしている。

まとめ

- 1. 1988年度より1993年度までの6年間に52,727名(ヒスチジン血症は44,229名, 先天性副腎過形成症は42,977名)をスクリーニングし, ヒスチジン血症1名, ガラクトース血症1名および先天性副腎過形成症12名を専門治療機関に精密検査を要請し, その結果, ヒスチジン血症1名および先天性副腎過形成症5名の患児を発見した.
- 2. 先天性副腎過形成症スクリーニングにおいて低出生体重児は体重2500g以上児に比べ17-OHP値は高値を示す割合は多いが、再検の結果陰性を示す割合も多い. このことは低出生体重児が様々な要因によるストレスがかかりやすく、17-OHP値が一時的に高値

表 5. 先天性副腎過形成症 精検要請検体スクリーニング成績

	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	出生	出生	在胎	初回	検査	再採』	
No	性別	年月	体重(g)	週数	直接法	抽出法	直接法	抽出法
1	女	93.7	726	24	106.1	45.3	110.6	40.0
2	女	90.4	788	24	121.5	66.5		
3	男	90.4	854	24	>300	69.4		
4	女	90.5	1,080	27	61.5	10.6	>300	70.0
5	女	92.6	1,148	34	49.3	16.7	>300	48.1
*6	女	89.12	2,482	37	>300	107.9		
7	女	90.12	2,720	39	27.2	15.7		
* 8	女	93.2	2,840	40	266.3	125.2		
*9	男	90.4	3,136	37	>300	>300	>300	>300 .
* 10	女	92.5	3,444	40	155.5	93.8	>300	>300
*11	男	93.11	3,500	40	>300	214.2	156.7	89.7
12	女	89.9	3,897	39	37.4	23.0		

^{*}先天性副腎過形成症 患児

を示す傾向は強いように思われた.

3. 臨床的に先天性副腎過形成症が疑われた成熟児の 17-OHPの抽出法値は15.7ng/mlと比較的低い値で あった.

文 献

- 多田啓也:先天代謝異常症スクリーニング.新生児マススクリーニングハンドブック(成瀬浩,松田一郎編),15-23,1989,南江堂,東京.
- 2) 柴田実, 安部昭子, 一言広:代謝異常スクリーニング研究会会報, 11, 26-34, 1989.

- 3) 柴田実,安部昭子,鈴木重任:東京都衛生局学会 誌,**75**,266-267,1985.
- 4) 高野弘紀, 柴田実, 一言広, 他:東京都衛生局学会誌, **84**, 30-31, 1990.
- 5) 下沢和彦, 矢田純一, 岡田紀三男, 他:代謝異常 スクリーニング研究会, **13**, 92, 1985.
- 6) 山本茂文, 大浦敏明, 楠田聡, 他:日本マス・スクリーニング学会誌, 1, (1), 139, 1993.
- 7) 青木菊麿, 圓山一, 芳田明子, 他:特殊ミルク情報, 27, 96-97, 1993.

報 文 Ⅱ

医薬品等に関する調査研究

REPORTS Ⅱ

PAPERS CONCERNING ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Ⅱ 医薬品等に関する調査研究

医薬品等に関する調査研究として 6 編の報告が掲載されている. このうち生薬及び漢方薬に関するものが 2 編, 医薬部外品及び化粧品の試験法開発に関するものが 3 編,家庭用品の実態調査に関するものが 1 編である.

寄生虫、アニサキス幼虫に殺虫効果を有する化合物を検索する目的で生薬、香辛料及び薬味類の抽出液を調査してきた。今回は生薬由来の天然物やその誘導体、食品添加物等を対象に検討した結果、ウコンより単離したセスキテルペノイド ar-turmerone に強い活性があることが明らかにされた。今後、その作用機序の解明や医薬品開発への基礎的研究の進展を期待したい。

生薬の害虫駆除には臭化メチルによるくん蒸処理が行われているが、これらの品質確保の上から総臭素量を測定する必要がある. そこで、蛍光 X 線分析装置を用いた簡易迅速分析法が開発された. 本法は試料の前処理が簡便で、且つ実用性に優れた定量法である.

医薬部外品や化粧品の行政試験は薬事法に基づく品質評価の手段として重要な位置をしめている.しかし、そのための公定試験法が設定されていないため、これらの試験に際して配合成分や有害物質の分析法を独自に開発している.ステアリルアルコールなどの長鎖アルコール類は化粧品にとつて重要な油性成分であり、定量をキャピラリーガスクロマトグラフィー、確認を化学イオン化質量分析法で行うことにより一斉分析が可能となり、行政検体の効率的な処理ができるようになった.

現在、わが国では育毛・養毛剤ブームにより市場に多くの製品が出回っている。そのため新規成分の開発が活発 に行われており、市場への参入も多い。近い将来登場が予想される新育毛成分・ミノキシジルの分析法が報告され た。

香料の保留剤として使用されるサルチル酸ベンジルは香水などのフレグランス製品に高濃度に配合されるが,皮膚障害の原因の1つと考えられている.そこで,高速液体クロマトグラフィーによるサリチル酸ベンジルの分析法が検討された.本法を用いて市販オードトワレのサリチル酸ベンジルの含有量調査を行っている.香水、オーデコロン等その他のフレグランス製品についても今後の調査が必要であることが報告された.

市販カビ取り剤は洗浄効果,事故防止等のための規格が定められているが,今回次亜塩素酸ナトリウムやアルカリ濃度が基準に適合しているかどうかを調査した。その結果,次亜塩素酸ナトリウムは調査した検体すべてにおいて適合していたが,アルカリ濃度は基準値(1%)を越えるものが認められた。また,その他トイレ用,排水パイプ用洗浄剤及び家庭用漂白剤の調査結果についても報告している。家庭用品の安全性を確保するためには,このような生活に密着した調査が重要であり、今後も継続してゆく必要がある。

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究(第7報) *Anisakis* I型幼虫に対する有効生薬より単離された 天然化合物及び誘導体の最小致死濃度

鈴 木 淳*, 村 田 以和夫*, 榎 田 隆 一*, 安 田 一 郎**

Effects of Chinese Medicine for Helminth (W)

Minimum Lethal Concentration on 3rd Stage Larvae
of Anisakis Simplex with the Natural Compounds,

Isolated from Crude Drugs and Several Kinds of Derivatives

JUN SUZUKI*, IWAO MURATA*, RYUITI ENOKIDA*,
and ICHIRO YASUDA**

SUMMARY

In this report, the results showed the Minimum Lethal Concentration (MLC) of 10 kinds of compounds, purified from 7 kinds of crude drugs.

Most MLC of larvicidal compounds for *Anisakis* larvae were shown to be $125~\mu g/ml$ to $500~\mu g/ml$. Especially, MLC of (+)-ar-turmeron, extracted from turmeric (*Curcuma longa*), was shown to be $25~\mu g/ml$ and effective most strongly against *Anisakis* larvae. On the other hand, MLC of paeonol, extracted from Moutan bark (*Moutan cortex*) was shown to be $500~\mu g/ml$. The MLC of (-)-menthol and (-)-menthyl ester were shown to be $250~\mu g/ml$ and $125~\mu g/ml$, respectively. MLC of the compounds of trans-anethole were shown to be $125~\mu g/ml$, santonin and dehydrosantonin had no effect on the larvae under $500~\mu g/ml$ concentrations.

In a new attempt, ivermection (Ivomec® injection, Merck and company Inc. Shionogi), used commercially as an animal insecticide or anti parasite drug, were compared with food additives, such as benzoic acid sodium salt, and benzoic acid, as positive control of the larvicidal effect on *Anisakis* larvae.

The results of ivermection and benzoic acid sodium salt, did not show larvicidal effects on *Anisakis* larvae under $1000 \,\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations, but the activity of larvae, treated with ivermectin, showed decreasing self movement and changed from S shape movement to coil shaped winding movement . Only $1000 \,\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of benzoic acid showed to have a larvicidal effect on *Anisakis* larvae.

Keyword: 最小致死濃度 MLC, 生薬由来天然化合物 Natural Compounds from Crude drugs, 誘導体 Derivatives, アニサキス *Anisakis simplex*, 第三期幼虫 3rd stage larvae

はじめに

大石ら $^{1)}$ (1971) の報告によれば,食品添加物であるサリチル酸および安息香酸ナトリウムはそれぞれ0.4g/l, 1.35g/l の濃度でアニサキス Anisakis simplex に対して致死的効果を示し,駆虫薬であるチモールおよびテトラ

クロロエチレンはそれぞれ0.05g/l, 1ml/lの濃度で100%致死を起すことを明らかにしている。また、回虫、鉤虫、鞭虫などヒトの消化管寄生線虫の駆虫薬である市販のサントニンは本幼虫に対して、全く効果のないことを明らかにしている。

^{*}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

しかしながら、これらの薬物は副作用および投与量の点で多くの問題があり、実用に供せないため過去30余年間に本症患者の累計が19,000例を越えると報告され、(石倉ら²⁾1994)が、現在でも薬物によるアニサキス症の治療法は依然として確立されていない。

1987年以来,著者ら^{3~9)} は生薬130種,スパイス類28種の抽出液の Anisakis simplex 第 3 期幼虫に対する殺虫または運動抑制効果について検討し、そのスクリーニング成績の一部について報告してきた。その成績によれば、Table-1に示した丁子、細辛、蘇葉、桂皮、茴香、山椒、ウコンから単離、精製された主として精油成分に含まれる種々の化合物が本虫に対し強い運動抑制作用または致死作用を示した。

そこで今回、生薬およびスパイス類から抽出、精製された化合物、市販の純品試薬、駆虫薬、一部分子修飾を行った化合物および動物用駆虫薬として市販されている半合成抗生物質について、本虫に対する100%最小致死濃度を測定して、薬物による本症治療の可能性について検討を行った。その成績および各被検薬の作用機序について若干の考察を記述する.

材料および方法

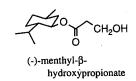
1. 材料

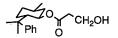
1) Anisakis I 型幼虫:スケトウダラの肝臓表面に被嚢しているAnisakis I 型幼虫を採取し、0.4% 生理食塩水中で、活発な S 字運動を呈するものだけを選び実験に用いた.

2)被検化合物:当所でウコンから単離した(+) -ar-turmeron, また, peaonol (和光純薬), transanethole (和光純薬), (-)-メントール(三晃製薬), (-)- α -サントニン(Aldrich Chemical Company Inc.), ivermectin (Ivomec® というivermectinを1.0%含有する注射製剤, Merck and company Inc., 塩野義), 安息香酸 (和光純薬), 安息香酸 (和光純薬), 安息香酸ナトリウム(和光純薬), および, 東京理科大学薬学部薬品製造化学研究室の西谷潔博士から供与された(-)-menthyl- β -hydroxypropionate (以下(-)-menthyl- β -hydroxypropionate (以下(-)-8-phenylmenthyl- β -hydroxypropionate (以下(-)-8-phenylmenthyl ester), dehydrosantonin の合計11種類である. これらのうち, いくつかの化合物について構造式を以下に示す.









(-)-8-phenylmenthylβ-hydroxypropionate



(-)-α-santonin

dehydrosantonin

なお、(+)-ar-turmeron は以下に示した方法により試 験に供した. すなわち, ウコンの粉末1.1Kgにメタノー ル31を加え2日間放置した後濾過した. 残留物につい てさらに同様の操作を2回行い, すべてのろ液を合わ せ60℃以下で減圧濃縮しメタノールエキス200gを得た. 次にそのメタノールエキスの50gを酢酸エチルエステル に溶解し、カラムクロマトグラフ用シリカゲル100gと 混和し常温で減圧乾燥しクロマトグラフ用試料とした. この試料をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにの せ、ヘキサン─酢酸エチル溶液(20:1→5:1)で溶出し、 微黄色油状物質(+)-ar-turmeron 200mgを得た。単離 した成分については下記に示したように $[\alpha]_D$ (比旋光 度), ¹H-NMR (¹H核磁気共鳴), ¹³C-NMR (¹³C核磁気共 鳴)スペクトル、MS(質量分析)を測定し構造を確認した. (+) -ar-turmeron : $([\alpha]_D : +61.1^\circ, 0.0638g, CHCl_3)$ (クロロホルム), 10ml, 100mm)

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.10 (2H, s, p-MeC₆H₄-), 7.00 (2H, s, p-MeC₆H₄-), 6.03 (1H, qq, J=1.3,1.3Hz, -CH=CMe₂), 3.31 (1H, m, C₇H₇CH (Me) -), 2.66 (2H, m, -CH₂CO-), 2.31 (3H, s, p-CH₃C₆H₄-), 2.11 (3H, d, J=1.3Hz, -COCH=C (CH₃)₂, methyl cis to carbonyl), 1.85 (3H, d, J=1.3Hz, -COCH=C (CH₃)₂, methyl trans to carbonyl), 1.26 (3H, d, J=5.0Hz, C₇H₇CH (CH₃) -) ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 199.6 (s), 154.8 (s), 143.5 (s), 135.3 (s), 128.9 (d), 126.5 (d), 124.9 (d), 52.5 (t), 35.1 (d), 27.4 (q), 21.8 (q), 20.8 (q), 20.5 (q)

MS m/z (%) : 216 (M⁺, 15), 201 (9), 132 (14), 119 (48), 105 (7), 91 (12), 83 (100), 77 (6), 55 (24)

2. 方 法

11種類の被検化合物をTable-2~4に示した濃度 (125~1000 μ g/mlおよび125 μ g/mlの2~8倍希釈) に 調製し、各被検液の20mlをガラスシャーレに分注し、それぞれ10~30虫体の Anisakis I 型幼虫を投入後、20℃のフラン器に収納する。本虫体の運動性および生存状態について1時間、24時間、48時間後に観察した。対照として0.4%生理食塩水における本虫体の運動性および生存状態について観察した。また、被検薬の速効性は1時間後、100%致死濃度(MLC) は24時間後、虫体の損傷状態は最終48時間後まで判定した。

 ${\it Table-1} \quad {\it Minimum Lethal Concentration of the Compounds from Crude Drugs} \\ \quad {\it for 3rd Stage Larvae of Anisakis Simplex}$

Structure				Isolated from Crude Dr	nigs
Compound name	MLC _{24h}	In Japa		In English	Scientific name
N=C=S Allyl isothiocyanate	125 μg/ml	Wasabi	山葵	houseradish	Wasabia japonika
CH ₃ O HO Eugenol	500 μg/ml	Chouji	丁子	clove	Syzgium aromaticum
CH ₃ O HO Isoeugenol	250 μg/ml	Chouji	丁子	clove	Syzgium aromaticum
CH ₃ O CH ₃ O Methyleugenol	250 μg/ml	Saishin	細幸	Asiasarum Root	Asiasarum sieboldi
O Safrole	250 μg/ml	Saishin	細幸	Asiasarum Root	Asiasarum sieboldi
OHC —(200 μg/ml	Soyou	蘇葉	Prilla Herb	Perilla frutescens
Cinnamic aldehyde	125 μg/ml	Keihi	桂皮	Cassia	Cinnamomum cassia
CH ₃ O-C	125 μg/ml	Uikyou	茴香	Fennel	Foeniculom vulgare
OH Geraniol	125 μg/ml	Sanshou	山椒	Zanthoxylum Fruit	Zanthoxylum piperitum
HO	500 μg/ml	Sanshou	山椒	Zanthoxylum Fruit	Zanthoxlum piperitum

実験結果

被検薬11種類の Anisakis I 型幼虫の運動性に及ぼす影響についてTable-2~4に示した.

Table- 2 に示すように(+)-ar-tormeronの Anisakis I型幼虫に対する MLC は $25\,\mu g/ml$ を示すとともに 1 時間判定で $125\sim500\,\mu g/ml$ の各濃度でマヒ状態(±)を示すものが過半数となり速効性が認められた.死滅状態は他の被検薬による死滅状態と全く異なり,すべてのアニサキスは直線的に伸び,硬直したものが大半を占めた.しかも62.5, 125, 250, $500\,\mu g/ml$ の 4 濃度では幼虫頚部の一部に変形が認められるものがそれぞれ $1\sim4$ 隻あった.これに対して,peaonol,trans-anetholeの MLC はそれぞれ500および $125\,\mu g/ml$ を示したにすぎず,1 時間判定における速効性は認められなかった.また,各濃度ともに虫体に損傷,変形等は認められなかった.

Table-3 に示すように(-)-メントール, (-)-menthyl ester の MLC はそれぞれ250, $125\,\mu\mathrm{g/ml}$ を示したが, (-)-8-phenylmenthyl ester および dehydrosantonin の MLC は $500\,\mu\mathrm{g/ml}$ 以下の濃度で致死的効果は得られな

かった. 虫体損傷作用として特筆されることは(-)ーmenthyl では250, $500 \, \mu g/ml$ 濃度においてすべての虫体が腹部破裂,頚部損傷, $125 \, \mu g/ml$ では7割が頚部に損傷が認められた. 一方,(-)-メントールでは $500 \, \mu g/ml$ 濃度で虫体の腹部破裂,頚部損傷が4割に認められた. しかし,(-)-8-phenylmenthyl ester では24時間後の判定で運動性が失われていないにもかかわらず $250 \, \mu g/ml$ では2割, $500 \, \mu g/ml$ では7割の虫体に頚部損傷が認められた. (-)- α -サントニンでは虫体に外傷は全く認められず,dehydrosantonin ではいずれの濃度においても2割に頚部損傷が認められたにもかかわらず,両者とも致死的効果が認められず運動性がわずかに減弱したにとどまった.

Table-4 に示すように ivermectin では致死的効果は認められなかった。しかし、虫体の入ったシャーレに衝撃を与えたとき、静置時のコイル状形態がさらに強く巻くという自発運動、およびピンセットで虫体を刺激したときのみわずかな動きが一部に見られ、虫体には外傷は認められなかった。一方、安息香酸の MLC は $1000~\mu g/ml$ を示したが、食品添加物として多用されて

Table-2 Effects of the Natural Compounds Isolated from Crude Drugs on Anisakis Simplex

	Concentra-						D	egree (of Lar	vae M	oveme	ent* af	iter				
Compounds	tion: μ g/ml	n**			1hr.					24hr.					48hr		
	$(\times 20 \text{ml})$		+++	++	+	± ·		+++	++	+	±	_	+++	++	+	土	_
(+)-ar-turmeron	500 μ g/ml	30				30						30		-			/30
	250	30			10	20	•					30					30
	125	30			11	19						30					30
	62.5	30		3	16	11						30					30
	31.3	30		30								30					30
	25.0	30		30								30				N.D.	
	20.8	30		30						1		29				N.D.	
	17.9	30		30							3	27				N.D.	
	15.6	30		30					7	19	2	2				N.D.	
paeonol	500 μg/ml	10			10							10	· · · · · ·				10
	250	10			10						2	8					10
	125	30	25	5				10	20							N.D.	
	62.5	30	29	1				8	22							N.D.	
	31.3	30	22	8				6	24							N.D.	
trans-anethole	250 μg/ml	10			10							10		· 			10
	125	10			10							10					10
	62.5	10		4	6				4	6				1	5	4	
0.4% NaClaq.		30	10	20					30					30			

Note) ★ : +++; Movement as S-shape strongly

++; Movement as coil moderately

+; A little movement by stimulus

±; Border between death and alive

-; Death

Note) **: No.of Samples tested

Table-3 Effects of the Natural Compounds Isolated from Crude Drugs and These Dervatives on Anisakis Simplex

	Concentra-					D	egree o	of Lar	vae M	oveme	ent* af	iter		,		-
Compounds	tion: μ g/ml	n * *			1hr.				24hr.					48hr.		
	$(\times 20ml)$		+++	++	+ . ±	_	+++	.++	+	土		+++	++	+	±	
(-)-menthol	$500 \mu\mathrm{g/ml}$	10			10						10					10
	250	10		2	8						10					10
`	125	10		3	7				10					10		
	62.5	10		4	6				10					10		
(-)-menthyl	$500 \mu \mathrm{g/ml}$	10		9	1						10					10
ester***	250	10	5	5					3		7					10
	125	10	7	3							10		*			10
	62.5	10	7	3				4	6					10		
(-)-8-phenylmenthyl	$500 \mu\mathrm{g/ml}$	10	- 3	7					10					3	7	
ester****	250	10	6	4				7	3					8	2	
(-) - α -santonin	500 μg/ml	10	5	5				10				1	8	1		
dehydrosantonin	$500 \mu \mathrm{g/ml}$	10	6	4					8	2	4			8	2	
	250	10	5	5				. 5	3		2		5	3		2
	125	10	7	3.			1	9					1	. 9		
0.4%NaClaq.		30	10	20				30					30		4	

Note) *: +++; Movement as S-shape shap strongly

++; Movement as coil moderately

+; A ittle movement by stimulus

 \pm ; Border between death and alive

-; Death

Note) **: No.of Samples tested

***: (-)-methyl- β -hydroxypropionate

***: (-)-8-phenylmethyl- β -hydroxypropionate

Table-4 Effects of Ivermectin, Benzoic acid sodium salt and Benzoic acid on *Anisakis Simplex*

·	Concentra-						D	egree c	of Lar	vae M	oveme	ent* at	fter				
Compounds	tion: μ g/ml	n**			1hr.					24hr.				48	3hr.**	**	
	$(\times 20 ml)$		+++	++	+	±	_	+++	++	+	±	_	+++	++	+	±	_
ivermectin***	1000 μg/ml	30		30		,	-		28	2				16		4	
•	500	30		30					29	1				18	2		
	250	30	4	26					30					16	4		
	125	30	5	25					30					17	. 3		
benzoic acid	1000 μ g/ml	30	20	10				2	28				2	28			
sodium salt	500	30	15	15					30				1	29		**	
	250	30	15	15				6	24				1	29			
	125	30	15	15					30	٠				30			
benzoic acid	1000 μg/ml	30	10	20								30			N.D.		
	500	30	12	18					25	4		1			N.D.		
	250	30	16	14				6	24						N.D.		
	125	30	16	14				6	24						N.D.		
0.4%Naclaq.		30	10	20	٠,			,	30		*****	-		30	4		

Note) ★ : +++; Movement as S—shape strongly

Note**: No.of Samples tested

++; Movement as coil moderately

+; A little movement by stimulus

 \pm ; Border between death and alive

-; Death

***: ivermectin; Ivomec* injection of Merck and company Inc. contained 0.1% ivermectin was used.

****: Degree of activity after 48 hours was tested 20 of Laevae about ivermectin of $1000 \sim 125 \,\mu\,\mathrm{g/ml}$.

いる安息香酸ナトリウムでは全く致死的効果が認めらず, 両化合物とも虫体の変形, 損傷作用は示さなかった.

考 察

Anisakis I 型幼虫を用いた in vitro の駆虫薬の薬理作用に関しては、Hamajima ら¹⁰⁾ (1969) によってワサビの辛味成分である allyl isothiocyanate にグルコース代謝および呼吸代謝を阻害されることが報告されている。その他、大石ら^{1,11)} (1971,1974) によりアニサキス亜科幼虫の殺虫効果について物理的条件、食品添加物、駆虫剤、香辛料精油および精油成分などに関する報告がなされているにすぎない。大石らは食品衛生対策に関する総説の中で、殺虫効果について食品添加物であるサリチル酸と安息香酸ナトリウム、駆虫剤であるチモールとテトラクロロエチレン、香辛料精油成分である eugenol (クローブ)、cuminaldehyde (クミン) およびcinnaic aldehyde (シナモン) に24時間以内に致死的効果が認められることを報告している。しかし、それらの有効成分の薬理作用について言及していない。

著者ら8)(1991)は、以前に生薬由来の8種類化合物の Anisakis I 型幼虫に対する致死および虫体損傷作用につ いて報告した. その成績によれば、150 μg/ml と 300 μg/ml に調製し、Anisakis I 型幼虫に作用させた24時間 後と48時間後の致死率と虫体損傷率は化合物の種類に よって異なった. allyl isothiocyanate 300 µg/ml の濃 度では6~24時間後の致死率が100%、48時間後の損傷 率は10%にすぎなかった. また, safrole, cinnaic aldehyde では致死率が前者と同様の傾向であったが、 損傷率は30%とやや高めであった.一方,被検薬の濃 度が300 μg/ml で48時間後の致死率と損傷率がともに 高率の被検薬は、eugenol、perilladehyde (致死率/損 傷率) (100/100), geraniol (100/90), isoeugenol (100/80) およびmethyleugenol (70/70) であった. このよ うにこれらの被検薬の本幼虫に対する作用機序は単に 神経系に影響を与えるだけでなく、虫体の外皮および 組織に対する浸透作用による損傷効果が複雑に関与し ていると考察される.

今回の実験では、Table-2 に示したように(+) -ar-turmeronの Anisakis I 型幼虫に対する MLC は 25 μ g/ml と最も低濃度を示し、特に 1 時間判定後における過半数のマヒ状態(±)が $125\sim500\,\mu$ g/ml に認められたことは速効性をうらづけるものとして注目される. 虫体の死滅状態は Anisakis I 型幼虫すべてが直線的に伸びきった状態で死滅したが、頚部破損や腹部破裂等の損傷が認められなかった.このことから本化合物は虫

体の神経系または、筋線維に対し何らかの作用をもつ ものと思われる. また, (-)-メントール, (-)-menthyl ester および(-)-8-phenylmenthyl esterの死滅状態を比 較すると、(-)-menthylester の殺虫効果は最も強く、 虫体に及ぼす損傷作用も大きかった. このことは本化 合物では(-)-メントールとは異なりカルボニル基が虫 体の外皮および細胞組織に作用し、その結果、虫体の 浸透圧調整が崩れ頚部破損や腹部破裂等の損傷が引き 起こるものと考えられる. 一方, (-)-8-phenylmenthyl ester が(-)-メントール, (-)-menthyl esterより致死効 果が弱かったのは、フェニル基の立体障害により細胞 組織のアミノ基等に対しカルボニル基が作用しにくい ためと考えられる. (-)-α-サントニンと dehydrosantonin の比較では(-) - α -サンドニンにおいては 500 μg/ml においても虫体に致死的損傷効果を示さず、虫 体の運動性の減弱が認められた. しかし、dehydrosantonin の 250 µg/ml は致死的効果が20%認められた. こ のことは dehydrosantonin の α -メチレン- γ -ラクトン の部分構造が酵素や核酸をアルキル化し、抗腫瘍活性 や抗菌性などを示すことと関係している. (-)-α-サン トニンが回虫に対し神経環に作用して運動麻痺効果を 示すこととは異なり、dehydrosantonin はアニサキスに 対して細胞毒として作用したためと考えられる.

ivermectin については 125~1000 µg/ml のいずれの 濃度においても, 虫体をコイル状に巻いたまま無刺激 での自発運動は認められなかった. ivermectin は牛や 豚の駆虫薬として開発された注射製剤である. I.S.Kass ら12)によれば、その作用機序は抑制性神経伝達物質 GABA に関連し、介在ニューロンからの GABA の放出 を刺激し、GABA のレセプターとの結合を促進させ虫 体を麻痺させていると考えらている. 実験結果から Anisakis I 型幼虫に対しても同様に ivermectin は致死的 効果は認められないものの、神経伝達系に作用してS 字状の自発運動を麻痺させコイル状の巻き状態で運動 停止に至ったものとと考えられる. また、保存料とし て用いられる安息香酸ナトリウムに関しては、大石ら の報告1)では本虫に致死的に作用するとされている。し かし、今回試みた濃度では虫体に期待したような結果 が得られなかった.

今回調査した各種薬剤で処理した Anisakis I 型幼虫はホットホルマリン固定標本とし、保存中であるので、今後、病理組織学的な検討を加えるとともに、実験動物による被検薬の有効性を検討していきたい。また、村田 13 (1993) が報告したようにアニサキスによるArthus 型アレルギーの発現および消化器の炎症反応を

押さえる抗ヒスタミン作用を合わせ持つ化合物等の検索を進めていく必要があると思われるので今後の検討 課題にしたい.

鎮 強

本研究は東京都衛生局東洋医学プロジェクト研究の一環として行われ、(+)-ar-turmeron の単離法に関して当所医薬品研究科の上原真一博士ならびに高野伊知郎氏からご指導を受けたことに対し深く感謝するとともに、本研究に際して一部の被検薬を快く提供してくださった東京理科大学薬学部薬品製造化学研究室の西谷潔博士に深く感謝いたします.

文 献

- 1) 大石圭一, 平沖道治:Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, Vol. 37, No. 10, 1020-1030, 1971.
- 2) 石倉 肇, 菊池浩吉, 佐藤昇志, 他:寄生虫学雑誌, **43**, 1, (補), 46-47, 1994.
- 3) 村田以和夫, 宮沢貞夫, 安田一郎, 他:東京衛研 年報, **39**, 15-18, 1988.
- 4) 村田以和夫, 宮沢貞夫, 安田一郎, 他:東京衛研 年報, **39**, 19-23, 1988.
- 5) 安田一郎, 高野伊知郎, 濱野朋子, 他:東京衛研

年報, **39**, 24-27, 1988.

- 6) 村田以和夫, 宮沢貞夫, 安田一郎, 他:東京衛研 年報, **40**, 46-52, 1989.
- 7) 安田一郎, 高野伊知郎, 濱野朋子, 他:東京衛研 年報, **40**, 53-57, 1989.
- 8) 村田以和夫:寄生虫学雑誌, **40**, 1, (補), 131, 1991.
- 9) 村田以和夫,安田一郎:プロジェクト研究報告書;漢方方剤および生薬の安全性・有効性に関する研究,東京都立衛生研究所,155-168,平成5年3月.
- Fusanori Hamajima et al : Jap. J. Parasit., Vol. 18
 (5), 498-504, 1969.
- 11) 大石圭一,森 一雄,西浦康雄:Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **40** (12), 1241-1250, 1974.
- 12) I. S. Kass, C. C. Wang, J. P. Walrond et al: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 77 (10), 6,211 ~6,215, 1980.
- 13) 村田以和夫:東京衛研年報, 44, 33-42, 1993.

蛍光 X 線分析法による生薬中の総臭素の定量

高 野 伊知郎*, 長 嶋 真知子*, 瀬 戸 隆 子* 高 橋 奈穂子*, 浜 野 朋 子*, 安 田 一 郎* 早 野 公 美**, 上 村 尚**, 西 島 基 弘*

X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Total Bromide in Crude Drugs

ICHIRO TAKANO*, MACHIKO NAGASHIMA*, TAKAKO SETO*
NAHOKO TAKAHASHI*, TOMOKO HAMANO*, ICHIRO YASUDA*
KUMI HAYANO**, HISASHI KAMIMURA** and MOTOHIRO NISHIJIMA*

An analytical procedure was developed for the analysis of total bromide residues in crude drugs, using X-ray fluorescence spectrometry. A 1.0g sample of powder was applied to a 20mm i. d. aluminum ring, then pressed for several minutes and set in the spectrometer. The recovery rates of bromide added to Ginseng, Paeony Root, Senna Leaf etc. were more than 93%, and the detection limit was 1 ppm. The present method was found to be satisfactory for the analysis of total bromide without influence of chlorine, and could be applied for various kinds of crude drugs.

Keywords: 蛍光 X 線分析装置 X-ray fluorescence spectrometry, 総臭素量 total bromide residues, 定量 determination, 生薬 crude drugs

はじめに

生薬は漢方薬原料として需要の高い医薬品である. また動物性あるいは鉱物性生薬を除く大半の生薬は薬用植物を乾燥して調製されたものであり,一種の農作物でもある. 生薬の害虫駆除あるいは発生予防の目的で臭化メチルによるくん蒸処理が行われている. この臭化メチルは沸点が4.5℃と低いために,くん蒸後はただちに揮散する. しかし,一部は農作物中に臭素化合物として残留することが確認されている^{注)}. FAO/WHO 合同残留農薬部会による臭素の一日摂取許容量(ADI)は1988年に1 mg/kg体重/日とされ,わが国においても,農作物については,既に一部の穀類,果実類に残留基準が設定されている¹⁾. しかし,生薬中の残留臭素についての残留基準はなく,その実態についての情報も不足している. そこで生薬中に残留する総臭素(以下 Br と略す)量を把握することが医薬品の品質確保

上からも重要と考えられる。Br の定量法については従来から,比色法 2),検知管法 3)等が使用されているが,これらの方法は前処理として灰化操作を伴うため,1 試料あたりの分析に $3\sim4$ 日を要する。また,試料中に塩化ナトリウム等に由来する塩素イオンが存在すると検出試薬の着色が妨げられ判定が困難になる。そこでこれらに代わる前処理が簡単で,かつ塩素等の妨害を受けない分析法の開発が望まれる。近年,筒井らの標準添加による蛍光 2 秋大島らのイオンクロマトグラフ法 3 が相次いで報告された。著者らは筒井らの方法をさらに改良し,より操作を簡略化した絶対検量線による蛍光 2 線分析法について検討した。

実 験 方 法

1. 装置

蛍光 X 線分析装置は理学電機工業 (株) 製の波長分散 型蛍光 X 線分析装置 RIX-3000, X 線管球はバリアンイ

- *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
- **同生活科学部食品研究科
- * * * The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,
 - 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
 - 注)上村 尚:全国衛生化学技術協議会関東甲信静大会,講演資料,1994(山梨).

ンスツルメント社製ロジウムクロムデュアルターゲット管球,検出器は重元素用にはシンチレーションカウンター(SC),軽元素用にはガスフロープロポーショナルカウンター(F-PC)を用いた.ペレット成型器は前川試験機(株)製の手動型油圧成型器,粉砕器は(株)シー・エム・ティー製試料粉砕器 TI-300を用いた.

2. 試 料

生薬はいずれも市販品を用いた. 根類生薬としてニンジン,シャクヤク,ボタンピを,葉類生薬としてセンナ,ゲンノショウコを,種子類生薬としてキョウニン,トウニン,ケツメイシ,ヨクイニンを,その他の部位としてブクリョウを検討した.

3. 標準品並びに標準溶液

標準品は試薬特級臭化カリウム(以下 KBr と略す,和 光純薬製)を用いた.標準品を水に溶かし,Br として 10,000ppm溶液を調製し,適宜水で希釈したものを標準 溶液として用いた.

4. Br の定性並びに定量

試料10gをロッドミル型粉砕器で2分間粉砕した.キョウニン等の油脂分に富む種子類については乳鉢中で砕き2,000μm(9号ふるい)以下の細切とした.市場生薬の分析は粉末あるいは細切試料約1.0gを正確に秤取し、内径20mmのアルミリングに移し、小型油圧式プレス器を用いて5kg/cm²次いで10kg/cm²,15kg/cm²の順で各約1分間徐々に加圧して測定用試料ペレットを作成した.測定用試料ペレットをステンレス製試料ホルダーに入れ、ステップスキャンによる含有元素の定性分析を行った.Brが陽性の試料については絶対検量線を用いて定量分析を行った.検量線作成のための試料調製法は次のように行った.ニンジン粉末2gを正確に秤取し、0、50及び100ppmのKBr標準希釈溶液を2mlづつ添加し、乳鉢で混和後、105℃、6時間乾燥し、放冷後再びロッドミル型粉砕器で2分間粉砕した.そ

の約1.0gを正確に秤取し、内径20mmのアルミリングに移し、小型油圧式プレス器を用い、同様に操作して各ペレットを作成した。各ペレットを測定し、得られたX線強度より検量線を作成した。この検量線を記憶装置内に保存し、Brの定量に用いた。検量線によって得られた各試料の定量値にTable 2に示す補正係数を乗じ、さらに日局生薬試験法により求めた乾燥減量から水分含量補正を行って乾燥試料1g換算量中のBr含量を算出した。

結果及び考察

1. 測定条件の検討

対象とした各試料についてBrの検出を妨害すると考 えられる共存元素由来のX線ピークの確認を行った. Br-Kα線は回折角 2 θ 29.950degに単独ピークとして検 出され、いずれの試料においても、その周辺に妨害 ピークは認められなかった. 一般に生薬の含有元素は 主としてカリウム、カルシウム等であるが、これらの 元素は妨害とならない. また従来法^{2,3)}では測定を妨害 する塩素についても、Br とは回折角が大きく異なるた め特に妨害にはならなかった. さらにスキャンニング 時間、データ取り込み時間については種々検討した結 果, Table 1 に示す測定条件で良好な結果が得られた. なお、定量には Br-Kα線の検出感度を高めるために データ取り込み時間を20秒間とした. Br-Kα線はテー リングピーク上のピークとして出現するため、バック グランド処理を行う必要があった. 前後に妨害ピーク が認められなかったことから2点法によるバックグラ ンド処理が可能であった. Br 濃度100ppm時のピーク開 始直前の回折角 2 θ 29.564deg 並びにピーク終了直後 の回折角 2 θ 30.300deg の 2 点をバックグランドの基 点として設定した. 2点間を結んでベースラインとし, Br-Ka線のX線強度からベースラインのX線強度を差 し引いた値を測定値とした(Fig. 1).

Table 1. X-ray Fluorescence Spectrometric Conditions for Br Analysis

Excitation	Target: Rh/Cr, Voltage(kv): 50, Current(mA): 50, Filter: off
Optics	Attenuator: 1/1, Slit: coarse, Crystal: LiF(200), Detector: SC, F-PC, Diaphragm: 20mm
PHA*	Lower limit: 100, Upper limit: 300
2θ Scan	Step mode, Sampling angle Start: 5.000 deg, End: 142.000 deg, Step: 0.050 deg, Sampling time: 0.4000
	sec
Quantitative	$Br-K_{\alpha}$ 2 θ : 29.950 deg, Sampling angle Start: 28.000 deg, End: 32.000 deg, Step: 0.020 deg, Sampling time
	: 20.000 sec
Analysis	Background (BG) correction: 2 point method
	BG 1 2θ : 29.564 deg, Sampling time: 5.000 sec
	BG 2 2θ : 30.300 deg, Sampling time: 5.000 sec

^{*:} pulse hight analyser

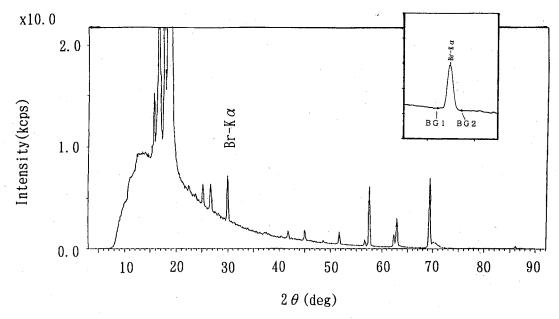


Fig. 1 . The X-ray Fluorescence Spectrum and the Background Correlation Points of Crude Drugs (Sample, Senna Leaf)

 2θ : diffraction angle, Analytical conditions were described in Table 1.

2. 測定用試料の調製

蛍光 X 線分析においては試料の水分含量, 粒度等が 測定値に影響を与えると言われている6). そこでまず試 料の乾燥状態とX線強度への影響について調べた. ニ ンジンの乾燥粉末約1gを正確に秤取し、水分含量を 各々0,5,10,15及び20%になるように水を加えた. 乳鉢中でよく混和した後、試料ペレットを作成し、各 試料のX線強度を測定した. その結果, Fig. 2 に示すと おり、水分含量0~20%の範囲では測定値に大きな違い は認められなかった. 生薬は乾燥物であり、その乾燥 減量も大半が10%未満であることから、測定用試料を調 製する際は、試料を粉砕し、そのままペレット成型で きることがわかった. また滑沢性に富むサンヤク等の ペレットの作成が困難な試料については、若干の水分 添加を行うことによりペレット成型を容易にすること も可能と考えられた. 乾燥操作を省略することにより、 分析に要する時間を大幅に短縮できた. なお, Brが陽 性の試料については別に乾燥減量を測定し、乾燥試料 1gあたりの含量を算出することとした.

試料粒度については細かく均一にすることによって 測定時の面積密度も一定になり、結果として定量精度 が向上することが知られている⁶⁾. 本法では300 µm (50 号ふるい)以下の粒度が得られるロッドミル型粉砕器を 採用することとした. なおトウニン、キョウニン等、 種子生薬の一部では、ロッドミル型粉砕器を用いると 種子に含有される油分が分離し、均一な試料ペレット

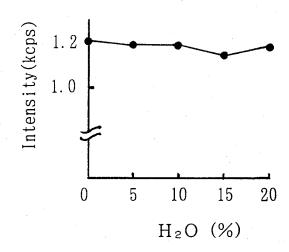


Fig. 2 . Effect of Water Contents on the Intensity of X-ray Fluorescence Spectrometry Analytical conditions were described in Table 1.

が調製できないものもあった. これらの油脂に富む生薬については別に乳鉢中で2,000 μm (9号ふるい)以下になる程度に粉砕することで油分の分離を避けることができた.

3. 検量線の作成

入手した生薬のうち、ニンジンの中でBrが検出されず、ペレット成型が容易なものがあったことから、これを選び検量線を作成することとした。ニンジンを粉末とし、各濃度のKBr標準希釈液を添加し、Br濃度 (ppm)を横軸に、Br-K ~ 線のピーク強度 (kcps)を縦軸

にとって検量線を作成した. その結果, Br濃度が0~ 200ppmの範囲で良好な直線Y=0.06X+0.10(r=0.999) が得られた. 同様に根類生薬シャクヤク及びボタンピ 並びに種子生薬トウニン、キョウニン及びケツメイシ 等についても検量線を作成したところ、ニンジンと同 様に0.06の傾きを持つ良好な直線が得られた.しかし, センナ、ゲンノショウコ等の葉類生薬では検量線に直 線性が得られるものの、傾きは0.05であり、ブクリョ ウでは0.07であった. このように生薬の使用部位によ り検量線の傾きが異なる傾向がみられた。さらに例数 を増やし検討した結果、生薬の種類によらず、使用部 位によって検量線の傾きが一定になることがわかった. この検量線の傾きの違いをもとに Table 2 に示すような 補正係数を算出した. すなわち, 傾き0.06の一群の補 正係数を1.00とした時, 葉類生薬では1.20, ブクリョ ウでは0.85となった. したがって根類あるいは種子生 薬の検量線を作成し、使用部位ごとに補正係数を乗じ ることによって各生薬の定量値を求めることができた.

4. 検出限界

ニンジンに KBr を添加し、本法に従って操作したところ、Br として検出限界は1ppmであった.

5. 繰り返し測定精度並びに装置の日差変動

装置の測定精度についてニンジンを用いて検討した. 繰り返し測定精度はBr 濃度1ppmで変動係数6%,5 ppmで5%,10ppmで4%,50ppmで1%いずれもn=6) であった.また日差変動はBr 濃度1ppmで変動係数7%,50ppmで1%(n=6)であった.現在,食品衛生法により農産物(食品)に設定されている残留農薬としてのBr 残留基準は20~180ppmであることから,本法は 十分な測定精度であると考える.

6. 添加回収率

各種生薬に KBr 標準溶液を50又は100ppmになるように添加し、検量線法による測定値から Br の添加回収率を求めた。その結果、いずれの生薬においても Table 3 に示すように93~104% (n=8)の回収率が得られた。

7. 他法との比較

蛍光 X 線分析法では試料中に重元素 (原子番号が22以上の元素) が共存する場合,装置の安定性,試料の均一

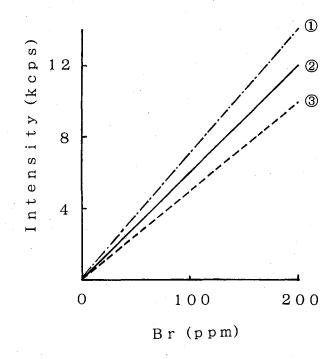


Fig. 3 . Calibration Curves of Various Crude Drugs ① Hoelen (n=6) , ② Ginseng (n=7) , ③ Senna Leaf (n=6)

Table 2. Slope Factors for the Quantitative Analysis of Br with the Calibration Curve Method

Part	Sample	Numbers	Slope(a)* Mean±S.D.	C.V. (%)	Slope Factors
Root	Ginseng	7	0.06 ± 0.001	1.6	1.00
	Peony Root	6	0.06 ± 0.001	2.8	1.00
	Moutan Bark	5	0.06 ± 0.002	4.7	1.00
Leaf	Senna Leaf	6	0.06 ± 0.004	7.3	1.20
	Geranium Herb	1	0.05 —	· · —	1.20
Seed	Apricot Kernel	2	0.06 —	<u>—</u>	1.00
	Peach Kernel	2	0.06 -	_	1.00
	Cassia Seed	2	0.06 -		1,00
	Coix Seed	4	0.06 ± 0.001	1.8	1.00
Others	Hoelen	6	0.07 ± 0.001	1.6	0.85

^{*:} y = ax + b y: Intensity of Br-K_{\alpha} (kcps), x: Br Contents (ppm)

性等の条件を満たしても定量できないことがある⁶⁾. 1 次 X 線によって励起されて発生した定量元素の蛍光 X 線は,試料中に共存する他の元素によって吸収され,また共存元素から発生する蛍光 X 線によって 2 次的に励起され強度が増減する,いわゆるマトリックス効果の影響を受けるためである.しかし,ニンジンの検量線が他の根類生薬のものと一致するという事実から,植物性生薬では実際のマトリックス効果は無視できる程小さいものであることがわかった.これは含有元素の多くが軽元素(原子番号が22未満の元素)であるためと考えられる.そこで本法では,ニンジンの検量線をそのまま定量に利用できるものをグループ化し,使用部位の違いから検量線の傾きが異なるグループについては,補正係数を求めて値を補正することで定量を行った.一般的に蛍光 X 線分析では,マトリックス効

果を相殺する手段として標準添加法や内標準法等の測定手法がとられることが多い. そこで, 本法と他法との相関性について検討することとした.

1)標準添加による蛍光 X 線分析法との比較 本法による測定結果と筒井らの標準添加法 4)に従って測定した結果との比較を行った.試料は定性分析の結果,Br の検出された市販生薬10検体をそのまま用いた.Fig. 4 a に示すように標準添加法では定量値が常に $1 \sim 3$ ppm高く出る傾向があった.したがって本法を横軸にとった両者の散布図において相関曲線は+1.92ppmの Y 軸切片を持つ一次回帰式を与えた.しかし,その傾きが1.00,相関係数 r=0.999であることから両者間には $3\sim64$ ppmの範囲において高い相関関係があることがわかった.この結果と装置の測定精度を考慮に入れ,本法の定量限界は3ppmとするのが妥当と考えられる.

Table 3. Recovery Test of Br in Crude Drugs

(ppm)

Part	Sample	Br Contents	Br Added	Calcd.	Found	Recovery (%)
Root	Ginseng	n.d.	50	50	50	100
	Peony Root	5	50	55	56	102
Leaf	Senna Leaf	18	50	68	63	93
	Geranium Herb	16	50	66	66	100
Seed	Apricot Kernel	n.d.	50	50	47	94
	Peach Kernel	n.d.	50	50	50	100
Others	Hoelen	n.d.	50	50	52	104
	Hoelen	n.d.	100	100	104	104

n.d.: < 1 ppm

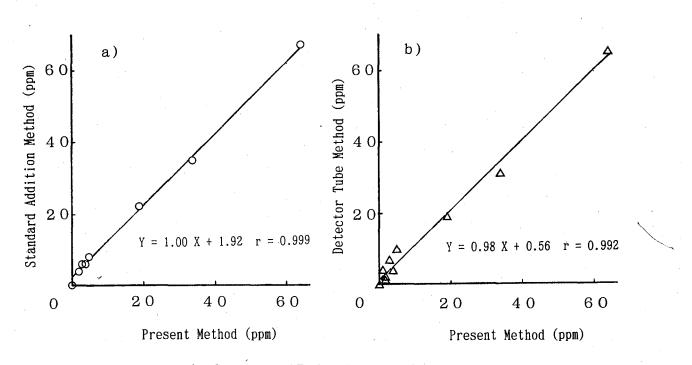


Fig. 4. Correlation of Each Br Determinative Method

2) 検知管法との比較 次に本法とは測定原理の異なる検知管法 3) との比較を行った. Fig. 4 b に示すように 両者間にも傾き0.98, 相関係数 r=0.992の良好な相関 関係が得られた.

以上の結果,本法は検知管法に比べ,複雑な前処理を必要とせず,塩素イオンの影響を受けることなく,Br含量3ppm~200ppmの濃度範囲で精度良く定量値が得られることがわかった.本法の1試料あたりの分析時間は試料の粉砕から測定,データ処理まで含めて約30分であり,従来法に比べ極めて短時間に結果が得られることがわかった.一般的な乾燥試料を対象としたBrの迅速分析法として本法は実用上使用できる方法と考える.なお,キョウニン,トウニン等,一部の種子生薬のように油分に富む試料についてはロッドミル型粉砕器は使用できないが,注意深く乳鉢で粉砕することでこれらについても定量が可能であった.

8. 市販生薬への適用

本法を市販生薬47検体に適用し、その結果を Table 4 に示した. 今回分析した試料中にはボタンピ、センナ、トウニン等に Br を含有するものがいくつか認められた. 使用部位別に比較すると Br 検出率は葉類で高く、根類並びに種子類では Br の検出されないものが多かった. センナでは分析した 6 件のうちいずれにも Br が検出され、その平均含量も19ppmと比較的高かった. シャクヤク、キョウニン、ケツメイシ、ブクリョウでは検出率、含量ともに低かった. 一般に農作物が土壌中から自然に吸収する Br 量は新鮮物では痕跡程度、多くても 6 ppm 以下と言われている⁷⁾. 生薬は乾燥物であるため、新鮮物に比べて Br が約 5~10倍に濃縮されている可能性もある. したがって60ppmまでは土壌由来と計算することもできるが、今回の測定値だけから生薬中の Br が

土壌由来なのかあるいは臭化メチルくん蒸によるものかを判定することはできない. しかし、ニンジンについてみると 7 件中 4 件では Br が検出されなかったものの 3 件では各20pm と比較的高含量で検出されている. したがって Br が検出された 3 検体については臭化メチルによるくん蒸処理が行われた可能性がある. 他にもボタンピ(2/5)、トウニン(2/7)、ヨクイニン(2/4)に同様な傾向が認められた.

また、分析結果と Br の ADI 値とを比較した. 例えば体重50kg の人の Br の ADI 値は50mg である. これは今回64ppm と最も高い値を示したヨクイニン780g 分に相当する. 通常の漢方薬一日用量中のヨクイニンの配合量は10g 程度であることから、今回分析した生薬中のBr 含量は ADI の1/78量以下であることがわかった.

まとめ

生薬中のBr 定量を目的とし、波長分散型蛍光 X 線分析装置を用いた簡易分析法について検討した. 試料を粉末とし、ペレットに加圧成型し、蛍光 X 線分析装置で測定し、ニンジンに KBr 標準溶液を添加して作成した検量線を用いて定量を行い、使用部位ごとに設定した補正係数を乗じて値を算出した. 本法の検出限界は1 ppm、定量限界は3 ppmであり、200 ppm までの範囲での迅速なBr 分析が可能であった. 本法は前処理に要する時間を大幅に短縮できることから、乾燥試料を対象としたBr の迅速分析法として実用上使用できる方法と考える.

分析の結果, Br 含量の比較的高い生薬もあったことから, 今後, 生薬中の Br 残留基準の設定等を検討する必要があると考える. なお, この点については, 生薬が乾燥物であること, 煎じて用いること等, 食品に比べ基準値を高く設定できる要因がある一方, 服用する

Table 4.	Br Contents	in Crude	Drugs on	the Market
----------	-------------	----------	----------	------------

(ppm)

Part	Sample	Numbers	Positive Numbers	Br content	Ave.
Root	Ginseng	7	3	n.d.~ 20	8
	Peony Root	6	2	n.d.~< 3	< 3
	Moutan Bark	5	2	n.d.~ 34	9
Leaf	Senna Leaf	6	6	9 ~ 40	19
	Geranium Herb	1	1	12	12
Seed	Apricot Kernel	3	0	n.d.	n.d.
	Peach Kernel	7	2	n.d.~ 55	8
1	Cassia Seed	. 2	0	n.d.	n.d.
	Coix Seed	4	2	n.d.~ 64	18
Others	Hoelen	6	3	n.d.~ 7	<3

n.d.: < 1 ppm

のが健常人ではなく、何らかの疾病を持った人である 等、考慮が必要な点もあると考える.

文 献

- 1) 日本食品衛生学会編:食衛誌, 35, 80-109, 1994.
- 日本薬学会編:衛生試験法注解,589-590,1990, 金原出版,東京.
- 3) 上村 尚, 西島基弘, 永山敏廣, 他:食衛誌, **21**, 214-218, 1980.
- 4) 筒井剛毅,太田真由美,茶谷祐行,足立 透:京 都府衛公研年報,**37**,19-24,1992.
- 5) 大島晴美,山田貞二,斉藤 勲,早川順子:第29 回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集,96-97, 1992.
- 6) 大野勝美,川瀬 晃,中村利廣: X線分析法, 168-173,1987,共立出版,東京.
- 7) 結田康一: 生態化学, 7(2), 3-12, 1984.

キャピラリーガスクロマトグラフィー及び化学イオン 化質量分析法による化粧品中の高級アルコールの分析

大 貫 奈穂美*, 鈴 木 助 治*, 森 謙一郎* 伊 藤 弘 一*, 中 村 弘*

Analysis of Higher Alcohols in Cosmetics by Capillary Gas Chromatography and Chemical Ionization Mass Spectrometry

NAHOMI OHNUKI*, SUKEJI SUZUKI*, KEN'ICHIRO MORI*
KOICHI ITOH* and HIROSHI NAKAMURA*

A gas chromatographic method for the analysis of higher alcohols in cosmetics was developed.

To a 1.0g cosmetic sample, 40ml of CH_2Cl_2 -acetone (1:1) and 2.5ml of internal standard solution (500 μ g/ml of squalene) were added. The mixture was dispersed in an ultrasonic bath for 10min and then diluted to 50ml volume with CH_2Cl_2 -acetone (1:1). 2 μ l of the sample solution was injected into gas chromatograph (GC). The conditions of the GC were as follows: column; DB-1 (0.53mm i.d.×15m), column temperature; 120°C (2 min)-10°C/min-280°C (10min), detector; FID (range 10^2 , attenation $3 \sim 4$).

The calibration curves obtained by plotting the peak area of alcohols were linear at levels ranging from 250 to 750 μ g/ml of $C_{12}\sim C_{28}$ higher alcohols. The detection limit was 20 μ g/ml for each alcohol in the sample solution. The average recovery rates (n = 5) of C_{16} , C_{18} , C_{22} and 2- C_{20} added to skin cream, milky lotion and hair rinse at levels of 3.0% were 95.5% $\sim 101.5\%$ with the coefficients of variation being 0.4 $\sim 1.6\%$.

The higher alcohols were identified with the quasi-molecular ion, $(M-H)^+$, and base peak, $(M+H-H_2O)^+$, by chemical ionization (isobutane) mass spectrometry on a GC-MS.

7 kinds of higher alcohols, C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{22} , $2 - C_{10}$, $2 - C_{20}$ and $29 - C_{18}$ were detected from 16 kinds of commercial cosmetics (561 samples) using this method. The method is useful for simultaneous determination of higher alcohols and suitable for routine analysis of cosmetics.

Keywords: 高級アルコール higher alcohol, 脂肪アルコール fatty alcohol, セタノール cetanol, ステアリルアルコール stearyl alcohol, 2-オクチルドデカノール 2-octyldodecanol, ベヘニルアルコール behenyl alcohol, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, ガスクロマトグラフィー・化学イオン化質量分析 gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry, 化粧品 cosmetic

緒 言

高級アルコールは油性基剤として化粧品の重要な構成原料の1つである。これらは主として天然油脂由来の炭素数 $C_{12}\sim C_{22}$ の脂肪アルコールであり、保湿剤、乳化助剤、粘調賦与剤としてクリーム、乳液、ファンデーション、口紅、ヘアーリンス等の化粧品に広範囲に使用されている $^{1)}$ 、現在、わが国の化粧品原料基準

(粧原基) $^{2,3)}$ 及び粧原基外成分規格 $^{4)}$ に収載されている高級アルコールは,表 1 に示すように直鎖アルコールとしてラウリルアルコール $(C_{12})^{2)}$,ミリスチルアルコール $(C_{14})^{4)}$,セタノール $(C_{16})^{2)}$,ステアリルアルコール $(C_{18})^{2)}$,セトステアリルアルコール $(C_{16})^{2)}$,グ枝アルコールとしてヘキシルデカノール $(^{2}-C_{16})^{2)}$,イソステアリルアルコールとしてヘキシルデカノール $(^{2}-C_{16})^{2)}$,イソステアリ

^{*} 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

Compound	Cosmetic ingredient ¹⁾	Abbreviation
Saturated		
1-Dodecanol	Lauryl Alcohol	C_{12}
1-Tridecanol		C ₁₃
1-Tetradecanol	Myristyl Alcohol	C_{14}
1-Pentadecanol		C ₁₅
1-Hexadecanol	Cetanol	C_{16}
1-Heptadecanol	· ·	C ₁₇
1-Octadecanol	Stearyl Alcohol	C ₁₈
1-Nonadecanol		C ₁₉
1-Eicosanol	Arachyl Alcohol	C_{20}
1-Docosanol	Behenyl Alcohol	C_{22}
1-Tetracosanol		C_{24}
1-Hexacosanol		C ₂₆
1-Octacosanol		C_{28}
2-Hexyldecanol	Hexyldecanol	2-C ₁₆
Isostearyl alcohol	Isostearyl Alcohol	2-C ₁₈
2-Octyldodecanol	2-Octyldodecanol	2-C ₂₀
Unsaturated		
(Z) -9-Octadecen-1-ol	Oleyl Alcohol	Z9-C ₁₈
(Z)-13-Docosen-1-ol		Z13-C ₂₂

Table 1. Higher Alcohols Used for the Experiment

ルアルコール $(2-C_{18})^{4}$, $2-オクチルドデカノール(2-C_{20})^{2}$ 及び不飽和アルコールとしてオレイルアルコール($Z9-C_{18}$) 2 がある。このうち C_{16} , C_{18} 及びセトステアリルアルコールは,化粧品による皮膚障害より消費者を保護する目的で薬事法により表示成分に指定されており,外箱や容器への成分名の記載が義務付けられている 2 .

化粧品領域における高級アルコールの分析はすでにガスクロマトグラフィー(GC)による原料分析5)が報告されているが、市販化粧品を対象にした製品分析の報告は見当たらない。薬事衛生上の観点より化粧品の品質評価を進めるためには、化粧品の基礎原料である高級アルコールの検査が重要となる。そのため、化粧品の検査において多数の試料の分析に役立つ簡易分析法と共に、高級アルコールは脂肪酸エステルなどの他の共存物質との分離が極めて困難なことから特に質量分析(MS)による正確な確認法の開発が必要である。

今回,著者らはワイドボアーキャピラリーカラムを用いた10種類の高級アルコールのGC簡易分析法の開発と四重極型GC-MS(化学イオン化CI)による確認法について検討した。また、本法を用いて市販化粧品の高級アルコールの実態調査を行ったので合わせて報告する。

実験方法

1. 試 料

平成3年4月~5年12月までに東京都内の小売店よりスキンクリーム、乳液、ファンデーション、口紅、眉目化粧品、洗顔料、石けん、白粉打粉、化粧油、パック、化粧水、ヘアーリンス、シャンプー、ヘアークリーム、ヘアーリキッドおよびポマードの16種561検体の化粧品を購入して試料とした。

2. 試 薬

①標準品: C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , $Z9-C_{18}$ 及び $Z13-C_{22}$ は東京 化成工業製を用いた。また, $2-C_{16}$ は日光ケミカルズ, $2-C_{18}$ はマツモト交商, $2-C_{20}$ はヘンケル社からの提供品を用いた。

②標準原液: C_{12} , C_{14} , C_{16} , C_{18} , C_{20} , C_{22} , C_{24} , C_{26} , C_{28} , 2- C_{16} , 2- C_{18} , 2- C_{20} , Z9- C_{18} は①の標準品1.0gをそれぞれ精密に量り,ジクロロメタンーアセトン(1:1)を加えて溶解し正確に100mlとする.これらをそれぞれの標準原液とする.

③内標準溶液:スクワレン(東京化成工業製)1.0gをとり、ジクロロメタンーアセトン(1:1)を加えて溶解し100mlとした液を内標準溶液とする. なお、スクワレンは溶液中で長期間保存すると分解しやすいため、内標準溶液は2カ月をめどに調製し直した.

¹⁾ Official name in the Japanese Standards of Cosmetic Ingredients (Shogenki).

④高級アルコール標準溶液:②の各標準原液を2.5, 5.0, 7.5mlとり,それぞれに内標準溶液5.0mlを加えてジクロロメタンーアセトン(1.1)で100mlとする.これらは内標準物質 $500~\mu g/ml$ を含有する250, 500, $750~\mu g/ml$ の標準溶液である.

3. 装置

ガスクロマトグラフ: (株) 島津製作所製, GC-9 A型, オートインジェクタ: AOC-9型, データ処理装置: クロマトパックC-R 5 A型.

四重極型GC-MS装置:ヒューレット・パッカード社 製, HP5980 Ⅱ型-日本電子(株)製, JMS-オートマス 150型.

GC測定条件

カラム:J&W Scientific 社製ワイドボアーキャピラリーカラム DB-1 (0.53mm i.d.×15m, 膜厚1.0 μ m), カラム温度:120 $\mathbb C$ (2min) -10 $\mathbb C$ /min-280 $\mathbb C$ (5min), 注入口温度:250 $\mathbb C$, キャリアーガス:He, 流速:20ml/min, 検出器:FID, 感度:Range 10^2 , ATTEN $3\sim 4$, 注入量:2 μ l.

GC-MS 測定条件

カラム:東京化成工業製キャピラリーカラム Ultra Alloy UA-1 (DB-1 相当) (ステンレス製, 0.25mm i.d. $\times 15$ m, 膜厚1.0 μ m), カラム温度:150°C (2min) -10°C /min-280°C (10min), 注入口温度:250°C, キャリアーガス:He, 流速:1ml/min, スキャン範囲:m/z70-600, 測定モード:CI, イオン化電圧:150eV, フィラメント電流:300 μ A, イオン源温度:184°C, インターフェイス温度:250°C, 反応ガス:イソブタン(真空度 1 ~ 3×10^{-1} Torr),注入量:1 μ 1.

4. 試験溶液の調製

試料約1.0gを精密に量り、これにジクロロメタンーアセトン(1:1)40ml及び内標準溶液2.5mlを加えて十分振り混ぜたのち、超音波浴中で10分間処理し、ジクロロメタンーアセトン(1:1)を加えて50mlとする。

5. 定性

標準溶液及び試験溶液について測定条件に従いGCを行い、保持時間よりアルコールを判別する. 更に確認するためにはGC-MSのCI測定を行い、各高級アルコールに特有な擬分子イオン及び脱水イオンを観察する.

6. 定量

試験溶液についてGCを行い、内標準物質(IS)に対するピーク面積比を求める。また、別にこれに相当する高級アルコールの標準溶液のGCよりISに対するピーク面積比を求めて検量線を作成し、これより試験溶液

中の高級アルコールを定量する.

結果および考察

1. GC カラムの選択

高級アルコールの GC 分析にはワイドボアーキャピラリーカラムを使用し、炭素数による分離傾向を観察した。カラムとして CBP -1 (島津製作所),DB -1 (J&W社),SPBTM -1 (スペルコ社)を用いて表 1 に示す化粧品原料を含む偶数炭素の高級アルコールについて検討したところ、いずれのカラムにおいてもほぼ同様の分離傾向を示すことがわかった。図 1 に DB -1 をカラムとして用いたときのガスクロマトグラムを示す。図 1 Aに示すように直鎖アルコールは炭素数の小さなものから順に溶出し、 $C_{12} \sim C_{28}$ で良好な相互分離が得られた。また、図 1 Bに示すように分枝アルコール 2 $-C_{16}$ 、2 $-C_{18}$ 、2 $-C_{20}$ と不飽和アルコール 2 9 $-C_{18}$ についても良好な分離が得られることがわかった。そこで、GCのカラムにはDB -1 を使用し、以下の検討を行った。

2. CI-MS による確認

アルコールの定性は GC の保持時間から判別できるが、 化粧品は油性基剤として高級脂肪酸エステル、スクワラン、流動パラフィンなどが配合されており、特に流動パラフィンは GC 上多数のピークが出現し、それらの妨害により高級アルコールを判別し難い場合がある。また、クリーンアップ操作を行っても妨害物質の除去は困難である。従って、直接 GCーMS によるアルコールの確認が必要である。GCーMS のカラムは GC と同種の内径0.25mmのステンレス製カラムを使用して CI モードで測定を行った。その結果を表 2 に示す。

 $C_{12} \sim C_{28}$ の飽和直鎖アルコール及び $2 - C_{16} \sim C_{20}$ の飽和分枝アルコールのいずれにおいても擬分子イオンピーク(M-H)+及び脱水ピーク $(M+H-H_2O)+$ が認められ、これらのイオンは高級アルコールの同定に有効であった。 C_{16} と $2 - C_{16}$, C_{20} と $2 - C_{20}$ は炭素数が同一であるため同様のマススペクトルを示すが、GC上の保持時間が異なることから判別ができる。 $Z9-C_{18}$, $Z_{13}-C_{22}$ の不飽和アルコールでは擬分子イオンピーク(M+H)+及び脱水ピーク $(M-H_2O)+$ が観察されたが、両ピークの強度は小さく低質量へ開裂し易いことがわかった。 C_{18} と $Z_{19}-C_{18}$ は GC 上保持時間が接近しているが、マススペクトルが異なり、判別が可能である。

高級アルコール以外の使用頻度が高い油性基剤の CI -MS は、スクワラン: $m/z421(M-H)^+$ 、ミリスチン酸イソプロピル: $m/z271(M+H)^+$ 、229 $(M+H-C_3H_7)^+$ 、ミリスチン酸オクチルドデシル: $m/z509(M+H)^+$ 、281 $(C_{20}H_{41})^+$ 、229 $(M+H-C_{20}H_{41})^+$ であり、

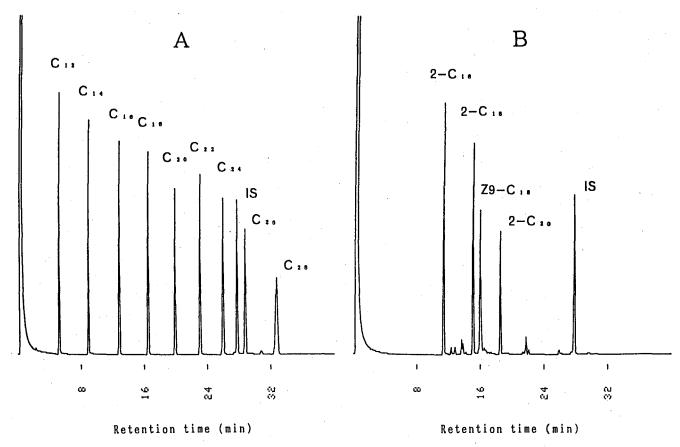


Fig.1. Gas Chromatograms of Higher Alcohols

Standard: 500 µg/ml.

Internal standard : $500 \mu \text{g/ml}$ of squalene.

A: straight chain alcohols $(C_{12} \sim C_{28})$.

B: branched alcohols $(2-C_{18}\sim 2-C_{20})$ and oleyl alcohol $(Z9-C_{18})$.

Table 2. CI-MS Data of Higher Alcohols

Compound	Ion	(m/z)
Saturated	[M-H] +	$[M+H-H_2O]^+$
C_{12}	185	169 *
C ₁₃	199	183 *
C ₁₄	213	197 *
C ₁₅	227	211*
C_{16}	241	225 *
C ₁₇	255	239*
C ₁₈	269	253*
C_{19}	283	267 *
C ₂₀	297	281 *
C_{22}	325	309*
C_{24}	353	337 *
C ₂₆	381	365 *
C ₂₈	409	393 *
2-C ₁₆	241	281 *
2-C ₁₈	269	253 *
2-C ₂₀	297	281*
Unsaturated	$[M+H]^+$	$[M-H_2O]^+$
Z9-C ₁₈	269	250 *
Z13-C ₂₂	325	306 *

*Base peak

高級アルコールとの判別が可能である。なお、IS として用いたスクワレンは $m/z411(M+H)^+$ であった。以上の結果より CI-MS の擬分子イオンピーク及び脱水ピークが高級アルコールの確認に有効であることがわかった。

3. 検量線及び回収率

高級アルコールの検量線は、Fig. 1 に示した C_{12} C_{28} , 2 - C_{16} ~ 2 - C_{20} 及び Z 9 - C_{18} について250, 500, 750 μ /mlの濃度範囲で作成したところ、いずれもほぼ原点を通る直線を示した.これらの相関係数は0.994~1.0000であり、検出限界は約20 μ g/mlであった.また、回収率は高級アルコールのうち市販化粧品に汎用されている C_{16} , C_{18} , C_{22} および 2 - C_{20} について検討を行った.表 3 に示すように市販のスキンクリーム、乳液、ヘアーリンスに各アルコールを3.0%のレベルで添加して回収実験を行ったところ、平均回収率 (n=5) は 95.5~101.5%、変動係数は0.4~1.6%であり、定量性及び精度共に良好な結果が得られた.

Table 3. Recovery of Higher Alcohols Added to Cosmetics

S1-	Average recovery (%) (n=5) ¹⁾						
Sample	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₂	2-C ₂₀			
Skin cream	98.0	97.9	99.8	98.4			
	$(0.4)^{2)}$	(0.5)	(0.5)	(0.5)			
Milky lotion	101.5	100.9	98.4	100.6			
	(1.4)	(1.2)	(1.0)	(1.2)			
Hair rinse	100.8	99.8	100.6	95.5			
	(1.3)	(1.6)	(0.7)	(1.0)			

¹⁾ C_{16} , C_{18} , C_{22} and 2- C_{20} were added at level of 3.0% to each sample.

4. 市販化粧品の分析

薬用化粧品を含む市販化粧品16種561試料について本法を用いて高級アルコールの分析を行った. 表4に高級アルコールの検出率(B/A, %)と個々のアルコールの検出数を,また表5にその主な分析結果を示す.

表 4 に示すように高級アルコールは561試料中184試料より検出され、全体的に見ると検出率は33%であった。そのうち検出率の高い試料はスキンクリーム64%(111試料中71試料)、乳液93%(42試料中39試料)、ヘアーリンス73%(49試料中36試料)であり、ファンデーション、口紅、眉目化粧品、洗顔料、化粧石けん、ヘアーリキッドでは検出率が $11\sim18\%$ であった。また、検出された高級アルコールの種類は大部分が C_{16} と C_{18} で

あり,次に C22, 2-C20が比較的多いことがわかった. それらの含有量は、表5に示すようにスキンクリーム が C_{16} の0.2~ C_{22} の6.9%, 乳液が C_{16} , C_{18} , 2- C_{16} の $0.1\% \sim C_{16}$ の1.8%, ヘアーリンスが C_{18} の0.1~2- C_{20} の17.6%であった. ファンデーション, 眉目化粧品およ び化粧石けんでも表5に示すとおり低濃度から高濃度 まで広範囲にわたっていることがわかった。これに対 してパック類、化粧水、シャンプーの検出率は10%以 下と低く、その含有量はほとんどのものが1%以下の 低濃度であった. 特に化粧水では82試料中検出したの は1 試料のみであり、含有量は $2-C_{20}$ の0.1%と少量で あった. 今回の分析結果により油性基剤としての高級 アルコールの使用実態が明らかになり、化粧品の種類 や使用目的によって配合量が大きく異なり、油性化粧 品の場合は主として C16, C18が使用されていることが わかった.

以上、本法はキャピラリーGC及びGC-MS(CI)による高級アルコールの簡易分析法として化粧品の日常検査に適用できる.

まとめ

化粧品基剤である10種類の高級アルコールについてワイドボアーキャピラリーカラムを用いた簡易 GC 分析法の検討を行った。市販のスキンクリーム、乳液、リンスに C_{16} 、 C_{18} 、 C_{22} 、 $2-C_{20}$ を3.0%レベルで添加したときの回収率は95.5~100.8% (C.V. 0.4~1.6%)で定量性及び精度共に良好であった。また化粧品中のアル

Table 4. Detection of Higher Alcohols in Commercial Cosmetics

C1-	Number o	fsamples	B/A	Number of alcohols detected						
Sample	Examined (A)	Detected (B)	(%)	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₂	2-C ₁₆	2-C ₂₀	Z9-C ₁₈
Skin cream	111	71	64	. 1	56	41	12		5	
Milky lotion	42	39	93		31	21	8	1	1	
Foundation	29	5	17			3			2	
Lipstick	24	3	13						2	1
Eye make up preparation	31	- 5	16		4	2	1			
Cleansing cream	31	4	13	1.	4	3				
Soap	22	4	18		3	1		•	1	
Face powder	6	1	17					1	1	
Cosmetic oil	8	1	13						1	•
Beauty mask	14	1	7		1 .	1				
Skin lotion	82	1	1						1	
Hair rinse	49	36	73		35	39	4		11	1
Shampoo	65	5	8	1	4	3			1	
Hair cream	8	3	38		4	1			1	
Hair liquid	36	3	8		3	3		1		
Pomade	3	2	67							2
Total	561	184	33	3	145	118	25	3	27	4

²⁾ C. V. (%) in parentheses.

Table 4. Representative Analytical Results of Higher Alcohols in Commercial Cosmetics

			Contents of higher alcohols (%)						
Sample			C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₂	2-C ₁₆	2-C ₂₀	Z9-C ₁
Skin cream		A	2.7*1)	3.2*					
		В		0.2*	0.3				
		C		0.9*	1.0*			1.3*	
		D E		1.1* 2.1*	3.5*			1.3*	
		F		4.9*	3.5 4.5		N.D. ²⁾ *		
		G		0.3	0.7*				
		H			2.4*			2.7*	
		I		*		0.7*			
		J			1.8	1.7*		2.7*	
		K			0.8	4.6*			
Milky lotion		L		0.1*	0.1*	6.9*			
Milky lollon		A B		0.1	0.5				
		C		1.1*	0.8*			0.2*	
		D		1.8* 0.2	0.7				
		E	•	0.2		0.3*			
		F				1.0*			
		G			o		0.1*		
Foundation		A			0.4* 0.5*				
		B C			0.5*				
		D			0.3			35.7*	
		E						41.7*	
Lipstick		A						3.3*	
		В						4.9*	
_		C		^ *	0.0				10.0*
Eye make up		A		0.4* 0.7*	0.2				
preparation		B C		0.7* 2.2*	0.8				
		D		2.6*			,		
		E			-	1.2*			
Cleansing		A	0.8	0.4	0.7	-		•	
cream		В		0.2*					
		C		0.6*	0.3				
~		D		0.7*	0.5				
Soap		A B		2.3* 6.3*	1.1				
		В С		6.6*					
		D		0.0			*	0.6*	
Face powder	•	-					2.8*	0.6* 2.7*	
Cosmetic oil					•			11.9*	
Beauty mask			0.9	0.7					
Skin lotion		A		1.0	1.0			0.1*	
Hair rinse		A B		1.9 0.5*	$\begin{array}{c} 1.9 \\ 0.2 \end{array}$			0.5*	
		. C		1 1*	0.4	0.7*		0.0	
		D		2.6*	0.1 2.2*	,			. /
		E	•	2.6* 3.8* 8.9* 0.3	1.8			2.5*	
•		F		8.9*	1.8 0.6 1.8*			2.5* 7.9*	
		G		0.3	1.8*				*
		H				3.1*		1.77 A*	
21		I	1.0	0.0	0.4			17.6*	
Shampoo	•	A B	1.3	0.6 0.5*	0.4 0.5* N.D. ²⁾ * 0.1*				
		, C		0.5 0.7*	N D 2)*				
		D		0.8*	0.1*				
		E						0.2*	
Hair cream		A		0.2*				,	
		- B		0.8*					
		С		1.2*	· .				
Hair liquid		A		0.5*	0.3 0.5*				
4		B C		0.7*	0.5		0.5*		
Pomade		A					0.5	2.6* 3.0*	
Julaue		B						٠.٠	

 ^{1) *:} Cosmetic ingredient in formula.
 2) Not detected in spite of including hexyldecanol for skin cream F and stearylalcohol for shampoo C in formula, respectively.

コールの確認は GC-MS (CI) により GC 分析と同様の条件で測定が可能であった。これらの主要なイオンとして擬分子イオンピーク (M-H) +及び脱水ピーク ($M+H-H_2O$) +が認められ、高級アルコールの識別に有効であった。本法を用いて市販化粧品の分析を行った。本法は、化粧品からの高級アルコールの同時検出とルーチン分析に有用である。

文 献

- 1) 田村健夫, 廣田 博:香粧品科学, 第1版, 123-126, 1990, フレグランスジャーナル社, 東京.
- 2) 日本公定書協会編:化粧品原料基準第二版注解,

- 241-243, 248-250, 598-600, 627-629, 915-918, 1220-1222, 1984, 薬事日報社, 東京.
- 3) 日本公定書協会編: 化粧品原料基準第二版追補注解, 92-95, 132-133, 1987, 薬事日報社, 東京.
- 4) 厚生省薬務局審査課第二課監修:化粧品原料基準 外成 分規格1993, 121, 1049-1050, 1993, 薬事 日報社, 東京.
- 5) 山田 実,吉田清一:フレグランスジャーナル臨時増刊 **No. 5**, 187-192, 1984, フレグランスジャーナル社,東京.

高速液体クロマトグラフィー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(第1報)

伊藤 弘 一*,森 謙一郎*,大 貫 奈穂美* 鈴 木 助 治*,中 村 弘*

Determination of Benzyl Salicylate in Fragrance Preparation by HPLC (I)

KOICHI ITO*, KEN'ICHIRO MORI*, NAHOMI OHNUKI*
SUKEJI SUZUKI* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords: サリチル酸ベンジル benzyl salicylate, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, フレグランス製品 fragrance preparation, オードトワレ eau de toilette

緒 言

近年,化粧品による皮膚障害の発生予防のために,原因成分の究明がおこなわれ,香水等フレグランス製品の調合香料用保留剤として使用されているサリチル酸ベンジル(以下 BS と略す)が原因物質の一つとしてあげられている.この BS はアレルギー性非苔癬型組織反応を呈する黒皮症の原因物質とされ 11 ,接触皮膚炎患者に施行される診断パッチテストの陽性率も高いといわれている 21 . 一方 BS は,人の maximization test では陰性であり 31 ,モルモットの感作試験でも低感作能物質である 41 との報告がある.このように BS が低感作能物質である 41 との報告がある.このように BS が低感作能物質であるにもかかわらず皮膚障害の原因物質とされている理由は,多くのフレグランス製品で高濃度に配合され.多量に使用されていることが指摘されている 21 .

そこで、著者らはBSの高速液体クロマトグラフ(以下 HPLCと略す)による定量法を確立し、フレグランス 製品として繁用されているオードトワレを分析し、BS の含有量調査を行ったので報告する.

実 験

1. 試 薬

- 1) BS:試薬特級 BS(東京化成工業, 純度99%以上)を 用いた.
- 2) BS 標準溶液: BS 約100mgを精秤し、メタノールに 溶かして正確に100mlとする.
- 3) 前処理用カートリッジ:固相抽出カートリッジ Supelclean LC-18 SPE(スペルコ, 3 ml)
- 4) メタノールおよびその他の試薬はすべて特級また

は HPLC 用を用いた.

2. 試 料

都内で1991年~93年に入手したオードトワレ14種を 試料とした.

3. 装置及び器具

HPLC:自動注入装置付島津 LC-6AD 型, 検出器:島津 SPD-6AV 型紫外可視検出器, データ処理装置:島津クロマトパック C-R6A 型

ガス・マス分析装置(以下GC/MSと略す)/ガスクロマトグラフ:Hewlett 5890型(Hewlett packard), 質量検出器:JMS-Automas 20型(JEOL), 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)

4. HPLC 条件

カラム:TSKgel ODS 80TM (4.6mm ID×150mm), 移動相:アセトニトリル/水(60:40), 注入量:10 µl, カラム温度:室温, 流速:1 ml/min, 検出波長: 310nm

5. 試験溶液の調製

Fig. 1 の操作法により試験溶液を調製した. すなわち 試料0.5~5mlをとり,これに同量の水を加え,必要によりメンブランフィルターを用いてろ過し,これをカートリッジにとおし,50%メタノール30mlで洗浄後,80%メタノール5 mlで溶離し,これを試験溶液とした.

6. 定量

試験溶液10 µ1を HPLC に注入し得られたクロマトグラムのピーク面積をはかり、別に作成した検量線から試験溶液中のBS 濃度を求め、試料中のBS 含有量を求

^{*}東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 169 東京都新宿区百人町 3 -24-1

^{*}The Tokyo metoropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

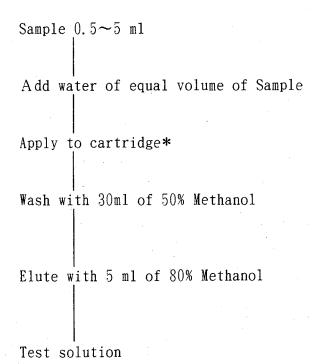


Fig. 1. Analytical Procedure for Benzyl Salicylate *) Condition the cartridge (Supelclean LC-18 SPE Tube 3ml) with 10 ml of 50% Methanol.

めた.

検量線の作成:BS 標準溶液を50%メタノール溶液で 希釈し、1.0、5.0、10.0、20.0 μ g/mlの標準系列を作 り、各10 μ lを HPLC に注入し、得られたクロマトグラ ムのピーク面積と濃度より検量線を作成した。

結果および考察

1. 固相抽出カートリッジの検討

本試験は前処理に固相抽出法を用いることとして、固相抽出カートリッジの検討を行った。カートリッジは ODS-C18系、固相充填量500mgの市販品を使用することとし、Accubond (J&W)、Bond Elute (バリアン)、Sep-Pak (ウォターズ)、Supelclean (スペルコ)を検討した。各カートリッジを50%メタノール溶液10mlでコンディショニングし、BS $500 \mu g/ml$ を1 ml吸着させた後、50%メタノール溶液10mlで洗浄後、75%メタノール溶液および100%メタノール溶液それぞれ5 mlにて溶離することとし、各カートリッジからのBS の回収率を検討した。

Fig. 2 に各カートリッジからの BS の回収率を示した. 75%メタノール溶離液では,回収率は Accubond25%, Bond Elute14%と低く,また Sep-Pak, Supelclean は それぞれ84%および89%を示した. 一方100%メタノールでは,いずれもほぼ100%に近い回収率であった.以上の結果より,前処理効果が最も良いことから,

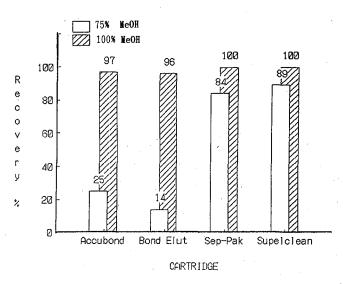


Fig. 2. Recoveries of Benzyl Salicylate from Cartrides

Apply: BS 500 μg, Washing: 50% Methanol 10 ml, Elution volume: 5 ml

Cartridge: Accubond (J&W), Bond Elut (Varian), Sep-Pak (Waters), Supelclean (SUPELCO)

Supelclean を用いることとした.

2. 試験溶液負荷および洗浄液量の検討

カートリッジへの試験液の負荷量および洗浄液量について検討した.

BS, $500 \mu g を 50\% メタノール 10 m l$ に溶かし、その液をカートリッジに付加した後、50% メタノールを流し、1フラクション 5 m l として、各フラクション中の BS の 濃度を測定した.

 $1 \sim 10$ フラクションでは BS は検出されず、11フラクションで1.7ppm、12フラクションで7.9ppmが検出された。このことにより、試験溶液及び洗浄液の合計量を50ml以内とすれば、BS のカートリッジよりの漏出を防ぐことが認められた。

3. 溶離液メタノール濃度の検討

Supelclean を用いた時の溶離液のメタノール濃度を検討し、その結果を Fig. 3 に示した.

溶離液量を 5 mlとし、メタノール濃度40~100%について検討したところ、80%以上において回収率は100%となることにより、溶離液のメタノール濃度を80%とした。

4. 添加回収率の検討

オードトワレに BS 濃度が $5 \mu g/ml$, $50 \mu g/ml$ 及び $500 \mu g/ml$ となるよう添加し、添加回収実験を行い、その結果を Table 1 に示した.各添加量とも回収率はほ 100%であり、変動係数は1.5~3.0%と、いずれの添加量においても満足できる結果が得られた.

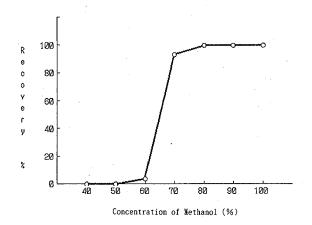


Fig. 3. Effect of Methanol Concentration on the Elution of Benzyl Salicylate from Cartridge

Apply: BS 500 μ g, Washing: 50% Methanol 10 ml, Elution volume: 5 ml, Cartridge: Supelclean (SUPELCO)

Table 1. Recoveries of Benzyl Salicylate from Eau De Toilette (n=5)

			, ()
Added (µg/ml)	Found (µg/ml)	Recovery (%)	R.S.D.* (%)
0	0	- .	<u> </u>
5	4.9	98.0	3.0
50	50.4	100.8	2.5
500	506.0	101.2	1.5

* : Relative Standard Deviation.

5. 市販製品中のBS 含有量

オードトワレの香料含有量は3~10%である⁵⁾ので、本分析ではこの含有量の製品を分析試料とした. 試料14種の使用方法は直接またはスプレーによるものであり、生産国は日本、フランス、イギリスおよびアメリカであった.

BS 標準液およびオードトワレ試験溶液(サンプルH) のクロマトグラムを Fig. 4 に示し、得られた結果を Table 2 に示した。BS の含有量は N.D. \sim 4900 μ g/mlであり、試料の半数から100 μ g/ml以上が検出された。高 濃度を示したもののうち、最高値は4900 μ g/ml (フランス製) であり、以下2500 μ g/ml (アメリカ製)、2100 μ g/ml (日本製)、1900 μ g/ml (フランス製)の順であった。また、フランスの製品には BS を含有していない製品もあった。

HPLC により BS を検出した試料について、GC/MS により得られたマススペクトルの 1 例を Fig. 5 に示した。マススペクトルはベンジル基の m/z 91 をベースピークとし、分子イオンピーク m/z 228を検出し、いずれの検出した試料とも BS を確認した。

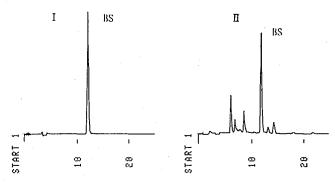


Fig. 4 . HPLC chromatograms of Benzyl Salicylate Standard (I) and Eau De Toilette Extract (II)

HPLC conditions: Column: TSK gel ODS-80T_M 5 μ m, 0.46m i,d. \times 15cm (TOSOH Co.,Ltd), Eluent: acetonitrile: water = 60: 40 V/V, Flow rate: 1.0ml/min, Inject. volume: 10 μ l, Temperature: ambient, Detection wavelength: 310nm

Table 2. Contents of Benzyl Salicylate in Eau De Toilette

Sample	Methods of ¹⁾ application	State ²⁾	Concentration (μg/ml)
A	D	Jap	14
В	D	Jap	860
C	D	Jap	32
D	D .	Jap	410
Е .	D	Jap	2100
F	. D	Jap	19
G	S	Fra	19
H	S	Fra	4900
I	S	Fra	1900
J	D	Fra	$ND^{3)}$
K	S	Fra	200
L	D	U.K.	62
M	S .	U.S.A.	2500
N	S	U.S.A.	52

- 1) D: direct application, S: application with spray
- 2) Jap: Japan, Fra: France
- 3) ND:less than $1 \mu \text{g/ml}$

以上、HPLC を用いた BS 分析法について検討し、市販のオードトワレ中の BS の含有量調査を行った.試料の前処理には ODS-C18系固相抽出カートリッジを用いたが、市販のカートリッジには吸着力に大きな差があり、分析試料により適切な選択が必要であった.また今回分析したオードトワレの BS 含有量は半数が100 μ g/ml以上であった.また塗布の方法と含有量は相関関係はなかった.今回の調査結果から、フレグランス製品全般に広く BS の使用が予想されることから、皮膚障害防止の目的のために、今後他のフレグランス製品

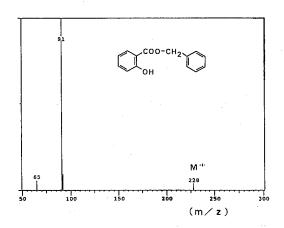


Fig. 5 . GC/MS Spectrum of Eau De Toilette Extract Operating conditions for GC/MS $\,$

GC ; Column : DB-17 0.25mm (i.d.) X30m (J&W) ,Int. temp : 100°, Int. time : 2min, Rate : $10^\circ/\text{min}$, Final temp : 250°, Inj. temp : 150°, Inj. split (1 :

50), Inj. vol: 1 μl

MS; Ionization: Electron impact, Ionization vltage: 70 eV, Ionization current: 300 μ A, Interface temp: 250°, Source temp: 150°

についても調査を行う必要がある.

文 献

- 1) 伊藤正俊:皮膚, 31, 增刊7, 52-60, 1989.
- 2) 伊藤正俊, 細野久美子, 関東裕美, 他:皮膚, **32**, 增刊 9, 131-139, 1990.
- 3) Opdyke DJL: Monographs on Fragrance Raw Materials 1st ed., 141-142, 1979, Pregamon Press, Oxford.
- 4) 伊藤正俊, 石原 勝:治療, 62, 1855-1859, 1980.
- 5) 田村健夫, 廣田 博:香粧品科学, 204, 1990, フレグランスジャーナル社, 東京.

高速液体クロマトグラフィーによる 育毛剤中のミノキシジルの分析

Analysis of Minoxidil in the Hair Growth Product by High Performance Liquid Chromatography

KIYOKO KISHIMOTO*, KOICHI ITO*
SUKEII SUZUKI* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords: ミノキシジル minoxidil,育毛剤 hair growth products,高速液体クロマトグラフィー HPLC,紫外 部吸収スペクトル UV spectrum,電子衝撃質量分析 EI-MS

緒 言

若禿防止や脱毛防止を目的とした育毛(養毛)剤が国産品をはじめ、外国製品も交えて多数市場に出回っている。特に育毛効果が期待される新成分の配合は育毛剤ブームを作りだし、需要の増大に大きく貢献している。このような中で近年、特にミノキシジルの育毛効果が注目されている。

ミノキシジルは血圧降下剤として米国で開発され、1979年にFDAの承認を受けた図1に示すような化学構造式を有する物質である。その後、副作用である多毛症や軟毛の硬毛化が着目され、さらに外用剤としての育毛効果が証明されるに至り、1988年には男性型脱毛症の治療薬として2%濃度溶液が認可された^{1).2)}.

わが国では現在、ミノキシジルは臨床治験段階にあるといわれており、今のところ認可に至っていない³⁾. しかし、既に数社から特許出願がなされている^{4),5)}など、近い将来育毛剤市場に登場することが予想されている。従って、ミノキシジル配合育毛剤の商品化あるいは輸入に備えて分析法の設定が必要と考える。製剤及び化粧品中のミノキシジルについては、Gagliardi、L. らが高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて他成分との同時分析法を報告している⁶⁾が、その他には見られない。そこで、著者らは育毛剤中のミノキシジルの分析法をHPLC を用いて検討したので報告する。

実 験 方 法

- 1. 試料 国産及び輸入の市販育毛剤10種10検体.
- 2. 試薬 ミノキシジル標準溶液:ミノキシジル(シ

グマ社製) 50 mg を精密に秤量し、メタノールー水(2:3) の混液に溶かして50 mlとし、標準原液とする。これを必要に応じてメタノールー水(2:3) 混液で希釈し、 $1,2,5,10,20 \mu \text{g/ml}$ 濃度に調製して標準溶液とした。

その他の試薬は試薬特級を用いた.

3. 装置 高速液体クロマトグラフ ポンプ:日本分光 PU-980型, 試料注入装置:日本分光 7125型, 検出器:日本分光 UVIDEC-100-Ⅲ型, データ処理装置:島津C-R1A型

自記分光光度計:島津UV-265FW型

質量分析計:DELSI NERMAG社製 AUTO MASS 50 型

4. 試験溶液の調製 試料約 1 gを精密に秤量し、メタノールー水(2:3)の混液を加えて正確に50mlとする。この溶液2.5mlをとり、メタノールー水混液を加えて正確に50mlとし、これを HPLC 用試験溶液とした.

添加回収試験については、試料約1gを精密に秤量し、 ミノキシジル標準原液5ml(または10ml)を加え、更に メタノールー水混液を加えて正確に50mlとし、以下同様に希釈して試験溶液とした.

5. 定量 試験溶液及びミノキシジル標準溶液の各 $5 \mu l e$ HPLC に付し、ピーク高 (mm) による絶対検量 線法により試験溶液中のミノキシジルを定量した.

HPLC 測定条件ーカラム:TSKgel-ODS $80T_M$, $5\mu m$, 4.6mm i.d.×15cm (東ソー製), カラム温度: 40° C, 移動相:メタノールー水(2:3), 流速:1ml/min, 検出波長:230nm.

^{*}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

図1. ミノキシジルの構造式

6. ミノキシジルの確認 試験溶液20 μ1を前述の測定条件で HPLC に付し、ミノキシジルのピークに相当する部分を繰り返し分取する. この画分について紫外部吸収スペクトルを測定する. さらにこの画分をロータリーエバポレーターで濃縮後、少量のメタノールー水(2:3) に溶解して、直接導入法により EI マススペクトル(イオン化電圧70eV) を測定する.

実験結果および考察

- 1. HPLC 測定条件 ミノキシジルの分析法につい て, Gagliardi, L らは長さ30cmの MicroPack-CN カラ ムを用い、過塩素酸ナトリウム含有アセトニトリルー 水系の移動相を使用しているが、著者らは逆相系の TSKgel-ODS 80T_M(5 µm, 4.6mm i.d.×15cm)を分離カ ラムとして用い、カラム温度40℃においてメタノール -水系の移動相を検討した. 図2にミノキシジル標準 溶液 (10 μg/ml) を用いたメタノールー水(2:2)、(2: 3) 及び(2:4) の移動相による HPLC クロマトグラムを 示した. メタノールー水(2:2)ではミノキシジルの保 持時間 (t_R) は3.8分とやや早く、また、(2:4)では9.1分 であり、ピークのテーリングが大きく、いずれも移動 相として適当ではなかった. メタノールー水(2:3)を 移動相とした場合 tr は5.8分でテーリングも少なく最も 良好なクロマトグラムが得られた. なお、検出波長は、 ミノキシジルの極大波長230nmに設定した.
- 2. ミノキシジルの確認 市販育毛剤にミノキシジルを 2% (w/v) 濃度に添加し、試験溶液の調製法に従って調製した溶液を用い、ミノキシジルの確認法を検討した. 本溶液を前述の条件で HPLC に付し、 $t_R5.8$ 分のミノキシジルに相当するピークを 5 回繰り返し分取した. この画分の紫外部吸収スペクトルを測定した. 図 3 に示すようにスペクトルは229, 262, 286nmに3 つの特徴的な極大吸収を示しており、ミノキシジルを確認した.

次に,この画分を濃縮後,直接導入法による EI マススペクトルを測定した.図4に示すように分子イオン

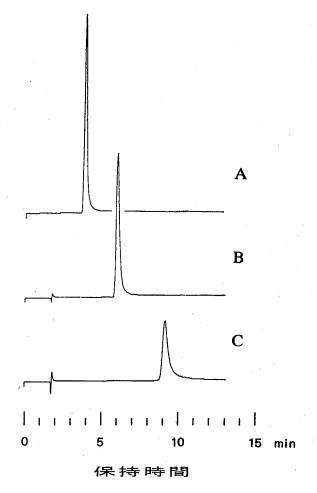


図2. ミノキシジル標準品の HPLC クロマトグラフ

移動相 A:CH₃OH-H₂O(2:2) B:CH₃OH-H₂O(2:3) C:CH₃OH-H₂O(2:4)

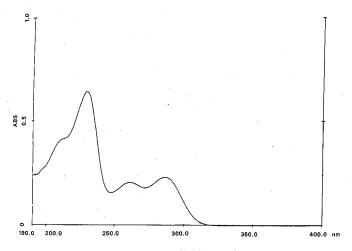


図3. ミノキシジルの紫外部吸収スペクトル

ピーク m/z 209 (M^+) 及び m/z193 (M-16), m/z84 (M-125, ピペリジン基) の特徴的フラグメントイオンが認められ、その他のフラグメントイオンもミノキシジルに特有の開裂パターンを示した.

このように、HPLC により分取し、紫外部吸収スペク

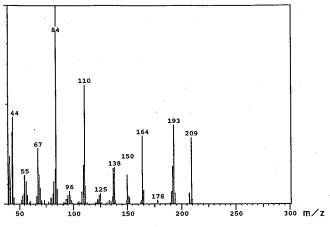
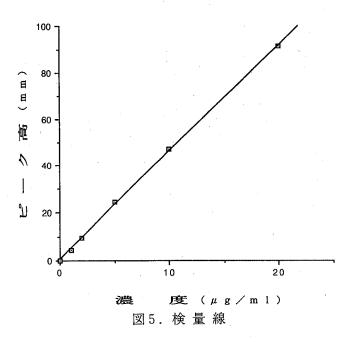


図4. ミノキシジルの EI マススペクトル



トル及び EI マススペクトルを測定することにより実際 試料中のミノキシジルを確認することができる.

3. 検量線及び添加回収率 HPLC によるミノキシジル標準溶液の検量線は、図 5 に示すように、1.0-20.0 μ g/mlの範囲で濃度とピーク高の間にほぼ原点を通る直線関係が得られ、相関係数も r=0.9993と良好であった。なお、本法における検出限界は約 5 μ g/gであった。

本法を用いて,市販育毛剤2種に0.5%及び1.0%となるようにミノキシジルを添加して回収率を求めた. その結果を表1に示す.それぞれ5回の平均回収率はいずれも98%以上,変動係数(C.V.)は2.2%以下であり定量性,精度共に良好な結果が得られた.

なお、わが国で市販されている育毛剤の国産品5検体、輸入品5検体(中国製3検体、イギリス製1検体、

表1. 育毛剤からのミノキシジルの回収率

試料 ¹⁾	添加量	回収率(%) n=5				
	(mg)	範囲	平均	C. V. ²⁾		
育毛剤 A	5	98.5-101.9	100.3	1.6		
	10	96.0- 99.4	98.0	1.3		
育毛剤 B	5	95.7 - 100.5	98.7	1.8		
	10	95.6 - 101.0	98.5	2.2		

- 1) 試料量:1.0g
- 2) 変動係数(%)

イタリア製1検体)を分析したがミノキシジルは検出されなかった.

また、これら市販育毛剤の分析において、HPLCクロマトグラム上ではミノキシジルのピークに対する直接の妨害は認められなかった。

今回,米国での反響も大きく,わが国でも大いに期待されている新育毛成分ミノキシジルの HPLC による簡易分析法を検討した.今後も新たな育毛成分が開発されると共に,未認可成分配合の育毛剤が市場に出回る可能性があるため,各国の情報を常に把握し,新成分の分析法を開発していく必要があると考える.

まとめ

育毛剤中のミノキシジルの分析法を検討した。HPLC によりミノキシジルの定量を行い、その分取画分について紫外部吸収スペクトル及びEI マススペクトルを測定して確認することができた。本法は精度及び感度とも良好であり、市販育毛剤の分析に適用することができる。

引用文献

- 1) Olsen, E. A., et al. : *J. Am. Acad. Dermatol.*, **13**, 185-192, 1985.
- 2) Olsen, E. A., et al. : J. Am. Acad. Dermatol., 15, 30-37, 1985.
- 3) 戸田浄:フレグランスジャーナル, No. 5, 110-115. 1989.
- 4) 鈴木建一, 今村康二, 岡島孝子他:公開特許公報, 特開平 5-4908 平成 5 年 (1993) 1 月14日.
- 5) 相川勝義:公開特許公報, 平 2-62818 平成 2 年 (1990) 3 月 2 日.
- 6) Gagliardi, L., Amato, A., Turchetto, L. and Tonelli, D.: *Anal. Lett.*, **24**, 1825-1835, 1991.

家庭用品の衛生化学的研究(第30報) カビ取り剤,漂白剤などの家庭用塩素含有製品中の 次亜塩素酸ナトリウム濃度とアルカリ濃度について

中 村 義 昭*, 岸 本 清 子*, 山野辺 秀 夫* 観 照 雄*, 中 村 弘*

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXX)

Concentration of Available Chlorine and Alkali in

Household Products Containing Sodium Hypochlorite

YOSHIAKI NAKAMURA*, KIYOKO KISHIMOTO*
HIDEO YAMANOBE*. TERUO KAN* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords: 家庭用カビ取り剤 household mold remover, トイレ用洗浄剤 detergent of lavatory, 排水パイプ用 洗浄剤 detergent of drainpipe, 漂白剤 Bleach, 次亜塩素酸ナトリウム Sodium Hypochlorite, 水酸化ナトリウム Sodium Hydroxide, アルカリ Alkali

緒 言

家庭用洗浄剤および住宅用洗浄剤は「有害物質を含有 する家庭用品の規制に関する法律」1)(以下「家庭用品法」 と略す)に基づきその安全性が確保されている.しかし, 1987年及び1989年の二度にわたり、次亜塩素酸ナトリ ウムを主成分とする「カビ取り剤」(家庭用洗浄剤)と酸 性タイプの住宅用洗浄剤の同時使用により, 二人の主 婦が死亡するという事故が相次いで発生した $^{2,3)}$.この ため、特に酸性タイプの洗浄剤と一緒に使用する危険 度の高い「家庭用カビ取り剤」については、その業界団 体である家庭用カビ取り・防カビ剤等協議会により自 主基準が制定された4). この自主基準では1.0ppm以上 塩素ガスを発生する製品について、その容器に「まぜる な危険」,「塩素系」の表示及び酸性タイプの製品との混 合あるいは併用禁止の絵表示をすることなど特別注意 事項の表示を義務づけている. また内容物の濃度限界 として、次亜塩素酸ナトリウムは4%以下、水酸化カ リウム叉は水酸化ナトリウムは1%以下とすることと 定めている. 我々が行った市販製品の容器の表示調査 ではアルカリについての濃度表示はあるものの、次亜 塩素酸ナトリウムについてはその成分名のみで、濃度 についての表示はなかった.

そこで、著者らは、市販されている家庭用カビ取り

剤を購入し次亜塩素酸ナトリウム及びアルカリの濃度を求め、実際に自主基準に適合するかどうかの調査を行った。また、自主基準が定められていないトイレ用及び排水パイプ用洗浄剤などの他の塩素含有製品についても同様に調査を行った。さらに、各製品の主成分である次亜塩素酸ナトリウムの濃度の経時変化についても調査を行ったので併せて報告する。

実験の部

1. 試料 平成4年9月-10月に「家庭用品法」の家庭用洗浄剤でアルカリ性洗浄剤に相当する塩素含有製品12社29検体を都内小売店より購入し試料とした. 用途別では(A)家庭用カビ取り剤(11検体), (B)トイレ用叉は排水パイプ用の洗浄剤(12検体), (C)台所などで使用する家庭用漂白剤,除菌剤及びまな板洗浄剤(合計6検体)の3種類に区分けした. これら製品の内容量は80-1,000mlで,いずれもプラスチック容器入りである.また「家庭用品法」で規制された水酸化カリウム叉は水酸化ナトリウムの濃度は基準の5%以下であり,容器試験(漏水,落下,耐酸,圧縮試験)の基準値も合格した製品であった. これら3種類の製品のうち,自主基準が定められているのは,(A)の家庭用カビ取り剤のみで,(B)トイレ用叉は排水パイプ用洗浄剤及び(C)の家庭用漂白剤等についてはいまのところ自主基準は制定

^{*}東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjku-ku, Tokyo, 169 Japan

されていない.

2. 試験操作

(1)定性反応 各製品に対して下記の(a)法及び(b)法を 行い,表1に示す変化により主成分の塩素剤を特定した.

- (a) 法(4)ンジゴカルミン酸化反応法 5) 試料溶液 1 mlに水 2 ml,炭酸水素ナトリウム 1 gを加えて混和したのち,インジゴカルミン試液(4)ンジゴカルミン0.18gに塩酸 10 ml加え水で100 ml としたもの)を 1 ml加え,色調の変化を観察する.
- (b) 法(ヨウ化カリウム反応法 6) 試料溶液 1 mlに水 2 ml, 炭酸水素ナトリウム飽和溶液 1 mlを加えて混和したのちヨウ化カリウムを 1 g加え, 色調の変化を観察する.

(2)定量方法

- (a) 次亜塩素酸ナトリウム 食品添加物公定書の次亜塩素酸ナトリウム定量法の項 7) に準じて操作を行った. すなわち,試料 2 g をヨウ素びんに精密にはかり取り,水50ml を加え,ヨウ化カリウム 2 g 及び酢酸 $(1 \rightarrow 4)$ 10 ml を加え,直ちに密栓して暗所に15分間放置し,遊離したヨウ素を0.1 mol/l チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定した(指示薬デンプン試液).別に空試験を行い補正した.なお,測定値は自主基準と同じ次亜塩素酸ナトリウムの濃度として算出した.
- 0.1mol/lチオ硫酸ナトリウム 1 ml=3.545mg有効塩素 (Cl)=3.723mg次亜塩素酸ナトリウム (NaClO)
- (b) 水酸化ナトリウム 「家庭用品法」別表第1, 水酸化カリウム叉は水酸化ナトリウムの項¹⁾ に準じて操作を行った. すなわち, 試料5gを精密に量り取り, 50mlのメスフラスコに入れ, 精製水を加えて正確に50mlとする. その10mlを正確に取り, かき混ぜながら3%過酸化水素水10mlを滴下した後, 直火で2分間煮沸し, これを0.1mol/l塩酸で滴定し,塩酸の消費量から水酸化ナトリウムの濃度を求めた(指示薬メチルオレンジ試液).
 - 0.1mol/l塩酸1ml=3.9995mg水酸化ナトリウム(NaOH)

表1. カビ取り剤及び漂白剤の有効成分 (塩素系,酸素系)の確認方法

定性反応	(a)インジゴカルミ ン酸化反応	(b)ヨウ化カリウム 反応
次亜塩素酸ナトリウム (NaCIO)	青色→無色	赤褐色になる
亜塩素酸ナトリウム (NaCIO ₂)	青色→黄色	変化しない (無色)
塩化イソシアヌール酸 (C ₃ N ₃ O ₃ C ₁₃)	青色→黄色	赤褐色になる
過酸化水素 (H ₂ O ₂)	変化しない (青色)	赤褐色になる

結果及び考察

- 1. 次亜塩素酸ナトリウムの確認 次亜塩素酸ナトリウムと同様に漂白・殺菌剤として使用される亜塩素酸ナトリウム、塩化イソシアヌール酸及び過酸化水素と区別するため、表1に示すように定性反応(a)及び(b)法を用いて行った. すなわち、次亜塩素酸ナトリウムの場合は(a)法のインジゴカルミン酸化反応ではインジゴを酸化し青色の溶液を無色透明とし、(b)法のヨウ化カリウム反応ではヨウ素を遊離して赤褐色を呈することで、他の成分と区別して確認した. 本試料29検体のうち28検体は次亜塩素酸ナトリウムであった. 1検体は亜塩素酸ナトリウムであると確認できた.
- 2. 添加回収試験 家庭用塩素含有製品のアルカリ 性洗浄剤は界面活性剤や無機化合物が配合されそれら の成分が定量値を障害する可能性があるので、添加回 収試験を行った.表2の(A)に示す家庭用カビ取り剤 No.1を2.0gはかり採り次亜塩素酸ナトリウム標準溶液 (9.61%)0.5gを添加し、前記定量法により測定し回収率 を求めた. その結果、5回の回収率はそれぞれ96.8%、 96.8%、95.6%、96.8%、96.3%であり、平均値96.5%、 変動係数0.57%と良好な結果が得られた.
- 3. 次亜塩素酸ナトリウム及び水酸化ナトリウム濃度並びに次亜塩素酸ナトリウム濃度の経時変化 家庭用塩素含有製品 2.9 検体を前記定量法に従い測定し、次亜塩素酸ナトリウム濃度及び水酸化ナトリウム濃度ならびに次亜塩素酸ナトリウム濃度の経時変化を表 2 に示した.
- (1) 購入直後の次亜塩素酸ナトリウム及び水酸化ナト リウム濃度 (A)家庭用カビ取り剤:4社11検体の次亜 塩素酸ナトリウム濃度は1.82-3.92%(平均3.18%),水 酸化ナトリウム濃度は0.12-1.16%(平均0.89%)であっ た. 次亜塩素酸ナトリウムはすべての製品で自主基準 の4%以下であったが、水酸化ナトリウムでは3検体が 自主基準の1%を超えていた. これら3検体はいずれも D社の製品で、D社はこの基準を制定した家庭用カビ 取り・防カビ剤等協議会に未加盟であった. 今回調査 した家庭用カビ取り剤には噴霧タイプの浴室用 (No.1-7), フェルトペン式の浴室用(No.8)の製品や, 三角コーナー及び排水口のカビ取りに使う台所用 (No.9-11)の製品があったが、次亜塩素酸ナトリウム及 び水酸化ナトリウムの濃度に大きな差異はなかった. しかし、濃度表示のあるNo.8では次亜塩素酸ナトリウ ム濃度が表示の約50%しかなかった.
- (B)トイレ用叉は排水パイプ用洗浄剤:12検体の次亜 塩素酸ナトリウム濃度は2.58-5.15%(平均3.70%),水

表 2. 家庭用塩素含有製品中の次亜塩素酸ナトリウム濃度及び水酸化ナトリウム濃度並びに 次亜塩素ナトリウム濃度の経時変化

			表	示		次更塩素酢	隻ナトリウム(♪	VaCIO) (%)		水酸化ナト リウム(%)
	No.	会社	用途	NaClO 濃度	購入直後	4カ月後	7カ月後	12カ月後	17カ月後	購入直後
	1	A	a	_	3.44	3.21	2.80	2.48	2.27	0.88
(1)	2	A	a	_	3.48	3.17	2.83	2.52	2.32	0.92
(A)	3	A	a	_	3.63	3.28	2.93	2.57	2.39	0.88
家庭	4	С	a	4.0	3.92	3.67	3.54	3.32	3.14	0.12
庭	5	D -	a	_	2.51	2.34	2.20	1.96	1.87	1.16
用口	6	D	a	· -	2.51	2.31	2.13	1.92	1.85	1.08
品	7	D	a		2.57	2.40	2.20	2.12	1.95	1.04
カ ビ	8	В	Ъ	3.6	1.82	1.77	1.68	1.55	1.51	0.98
	9	\mathbf{A}	c	-	3.86	3.62	3.27	3.01	2.77	0.92
取	10	A	c	· 	3.43	3.19	2.96	2.66	2.46	0.84
り 剤	11	Α	c	_	3.82	3.55	3.25	3.00	2.73	0.92
ΉI		·平	 均		3.18	2.96	2.71	2.46	2.30	0.89
					{100%}	{93.1%}	{85.2%}	{77.4%}	{72.3%}	
	1	H	ď	_	4.48	4.18	3.74	3.40	3.13	1.24
(B)	2	Н	d ·	-	4.47	4.18	3.76	3.41	3.14	1.28
<u>١</u> .	3	Н	d	— .	4.03	3.79	3.44	3.09	2.87	1.16
イ .	4	E	е		4.66	4.30	3.67	3.22	2.94	1.28
レ 用	5	E	е	- '	5.15	4.65	3.99	3.49	3.13	1.28
排	6	E	e	_	4.31	3.98	3.49	3.11	2.82	1.20
水	7	F	f		2.58	2.33	1.93	1.90	1.37	3.80
パ	8	F	f	-	2.78	2.57	2.20	1.88	1.60	3.96
イー	9	G	f		2.90	2.76	2.50	2.34	2.22	3.36
プ 用	10	G	· f		2.78	2.60	2.25	2.10	1.92	3.64
洗	11	G	f	· -	3.38	3.14	2.92	2.68	2.51	3.44
浄	12	I	f	<u> </u>	2.82	2.74	2.59	2.37	2.33	1.48
剤		平	均。		3.70 {100%}	3.44 {93.0%}	3.04 {82.2%}	2.71 {73.3%}	2.50 {67.6%}	2.26
	1	Н	g	_	5.68	5.23	4.58	4.01	3.67	1.16
(C)	2	Н	h	_	5.96	5.48	4.74	4.14	3.74	0.88
家	3	K-	h		5.96	5.31	4.40	3.89	3.52	1.04
庭	4	L	i	_ '	4.31	4.09	3.76	3.46	3.22	0.04
用		平	均		5.48	5.02	4.37	3.88	3.54	0.78
漂					{100%}	{91.6%}	{79.7%}	{70.8%}	{64.6%}	
白	5#	J	i	. —	10.45	10.10	9.84	9.80	9.73	0.08
剤 等					{100%}	{96.7%}	{94.2%}	{93.8%}	{93.1%}	·
₹ :	6	G	j		0.89	0.87	0.85	0.85	0.83	0.24

#:亜塩素酸ナトリウム含有製品

A, B, H, I社:家庭用カビ取り・防カビ剤等協議会加盟の会社

表示(用途)(A)家庭用カビ取り剤: a 浴室用(噴務タイプ), b 浴室用(フェルトペン式),

c 台所用(三角コーナー, 排水口用)

(B)トイレ用、排水パイプ用洗浄剤: d トイレ専用、 e トイレ及び排水パイプ用 f 排水パイプ専用

(C)家庭用漂白剤: g 衣料専用, h 台所専用, i 衣料及び台所用, j まな板洗浄用

酸化ナトリウム濃度は1.16-3.96% (平均2.26%)であった.12検体のうちNo.1-3はトイレ専用, No.4-6はトイレ及び排水パイプの両用使用の表示があり,いずれも次亜塩素酸ナトリウムは4%を超えていた。No.7-12は排水パイプ専用の表示のある洗浄剤で次亜塩素酸ナトリウムは4%以下であったが,水酸化ナトリウムは4%近い高濃度であった。

- (C) 家庭用漂白剤:4検体のうちNo.1は衣料用,No2,3は台所用,No.4は衣料,台所用の表示があった.No.1-4の次亜塩素酸ナトリウム濃度は高く4.31-5.96%(平均5.48%)であった。また,水酸化ナトリウム濃度は0.04-1.16%(平均0.78%)であった。しかし,衣料及び台所用漂白剤であるNo.5の容器には次亜塩素酸ナトリウムと表示されていたが、検査したところ、亜塩素酸ナトリウムを検出し、その濃度は10.45%であった。まな板用洗浄剤の表示のあるNo.6の次亜塩素酸ナトリウム濃度は0.89%,水酸化ナトリウム濃度は0.24%であり、他の洗浄剤に比べて次亜塩素酸ナトリウム,水酸化ナトリウムともいずれも低濃度であった。
- (2) 次亜塩素酸ナトリウム濃度の経時変化 購入直後 に次亜塩素酸ナトリウム濃度を求め、さらに暗所で室 温に放置し、4カ月後、7カ月後、12カ月後及び17カ 月後における次亜塩素酸ナトリウム濃度を測定した. 表2に示すように3種類の製品の各平均値を出し、購入 直後の濃度を100%とした場合,(A)家庭用カビ取り剤 では、4カ月後で93.1%、7カ月で85.2%、12カ月後 77.4%, 17カ月後72.3%, (B)トイレ用, 排水パイプ用 洗浄剤は, 4カ月後93.0%, 7カ月後82.2%, 12カ月後 73.3%, 17カ月後67.6%, (C)家庭用漂白剤は、4カ月 後91.6%, 7 カ月後79.7%, 12カ月後70.8%, 17カ月後 64.6%で、いずれも4カ月経過すると約8%、7カ月経 過で約18%、12カ月で約25%、17カ月で約30%分解減少 することが判明した. これらのことから製品の容器に 製造年月日叉は使用期限を表示することが必要と思わ れる.

また今回調査した製品の水酸化ナトリウム濃度は 0.04%から3.69%であったが、いずれの製品も次亜塩素 酸ナトリウムの分解減少率が4カ月後、7カ月後、12 カ月後、17カ月後で顕著な差が見られなかった.このことから、主として次亜塩素酸ナトリウムの安定剤として使用される水酸化ナトリウム濃度は、安全性の面からも家庭用カビ取り・防カビ剤等協議会の自主基準1%以下が適当な濃度ではないかと考えられる.

まとめ

家庭用塩素含有製品3種29検体(12社)の次亜塩素酸ナトリウム及び水酸化ナトリウム濃度の調査を行ったところ、次の結果が得られた.

- 1. 自主基準の制定された家庭用カビ取り剤(11検体)は次亜塩素酸ナトリウム濃度が基準(4%)以内であったが、水酸化ナトリウムは3検体が基準(1%)を超えていた.
- 2. 塩素含有製品 3 種29検体のうち、家庭用漂白剤 1 検体は次亜塩素酸ナトリウムの表示にもかかわらず亜塩素酸ナトリウムを検出した.
- 3. トイレ用叉は排水パイプ用洗浄剤及び家庭用漂白剤では次亜塩素酸ナトリウム濃度及び水酸化ナトリウム濃度の高い製品が多く認められた.
- 4. 塩素含有製品の次亜塩素酸ナトリウム濃度は室温放置で4カ月経過すると約8%,7カ月で約18%,12カ月で約25%,17カ月で約30%分解減少することが判明した.

文 献

- 1) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律:昭和48年10月12日法律112号.
- 2) 1987.12.26, 朝日新聞.
- 3) 1989.2.17, 読売新聞.
- 4) 家庭用カビ取り剤(塩素系)の自主基準,1988, 家庭用カビ取り・防カビ剤等協議会.
- 5) 長瀬雄三:基礎分析化学通論, 第3版, 519, 1967, 廣川書店. 東京.
- 6) 竹田由比子, 合田幸広, 川崎洋子, 他:食衛誌, **32**, 93-97, 1991.
- 7) 谷村顕雄, 鈴木郁生, 石館守三:食品添加物公定 書解説書, 第6版, 461-464, 1992, 広川書店, 東京.

報 文 Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS Ⅲ

PAPERS CONCERNING ON FOOD HYGIENE

Ⅲ 食品等に関する調査研究

食品等に関する調査研究として10編の報告が掲載されている。そのうち、食品の細菌汚染に関するものが1編、食品中の残留薬剤、重金属および食品添加物の分析方法に関するものが各1編、食品中の汚染物質実態調査に関するものが3編、化学性食中毒事件例、食品添加物の品質実態調査および病人食中のビタミン分析に関するものが各1編である。

食品の細菌検査は流通時の食品成分の変質や腐敗、食中毒防止の目的で行われている。細菌汚染に関するものでは、過去10年間に集積された検査結果を各種基準等に基づき解析・評価し、その結果を今後の検査および行政指導等に役立てるための報告である。汚染指標である生菌数、大腸菌群数が高いものは食肉、寿司種・刺身、調理パン及びサラダで、食中毒起因菌のブドウ球菌は広範囲の食品に分布し、サルモネラは食肉、腸炎ビブリオは寿司種・刺身における重要な汚染菌であることが示された。また、冷凍食品の凍結前未加熱・加熱後摂取食品では生菌数及び大腸菌群の規格不適、アイスクリームでは大腸菌群の規格不適等の不良品が多いことが明らかになった。

先行的調査、省力化、高精度化等の目的で常に分析法の検討が行われている。新たな分析法である酸素免疫 (ELISA)法が残留抗生物質の検出に対して検討された。畜水産食品中の残留テトラサイクリン系抗生物質の検査に、市販 ELISA キットは簡易系統別検査法の前処理を併用するならば実用性のあることが結論づけられた。次に、分析者の有害ガス暴露防止と省力化の目的で自動湿式灰化装置とフレームレス原子吸光光度計を組み合わせた重金属の分析法について検討された。灰化及び原子化条件の検討の結果、清涼飲料水において迅速で高感度が得られ、ルーチン分析に応用できることが明らかにされた。更に、食品衛生法の改正に伴い、あるいは急増する輸入食品に対する使用が予想される天然系添加物の一つである銅クロロフィルの分析法が検討された。天然物質の分析は標準品の確保や競合する食品成分との分離等の困難を伴うが、試料からの含水アセトン抽出により良好な回収率を得ることができ、検討した液体クラマトグラフの分析条件は分離・精度ともによく、幅広く市販食品に応用できる優れた分析法が確立された。

汚染物質実態調査に関するものは残留農薬及び放射能がある.残留農薬は国産の野菜果実類では一般流通品で有機りん系,有機塩素系,カルバメート系農薬が2~4種類,2~6作物から残留基準値を超えないが検出するものがあり,複数残留していたものも2作物に認められた.また,無・減農薬栽培作物からも有機塩素系農薬が3種類,4作物から微量であるが検出された.一方,輸入農産物では有機りん系殺虫剤が10種類,有機塩素系殺菌剤が2種類,カルバメート系農薬が3種類等,痕跡から0.61ppm検出された.しかし,検出率は各地域間の差がなくなり,同時にカルバメート系農薬が検出される地域が増加する傾向にあることが報告された.放射能はチェルノブイリ原発事故以来食品中の検査が実施されている.平成5年度分をまとめたものの中では国の暫定基準値370Bq/kgを超えたものはないが,50Bq/kgを超えたものがフランス産きのこ2種から見つかった.また,25から50Bq/kgのものは香辛料など5試料であった.検出率及び濃度共に年々減少する傾向にあるが,100Bq/kgを超えるものが今だにあることから食品の安全性を確保するためにも今後も検査は続ける必要性があることが示唆された.

化学性食中毒関係では、化学性食中毒4例、自然毒によるもの3例が報告された。食堂のやかんのふたの裏には さみ込まれたタバコの箱が原因で、そのお茶を飲んでニコチン中毒を起こした事例や、山野菜の誤認による食中毒、 あるいは正規のふぐ調理師のふぐ料理によるふぐ中毒事例などが報告された。

近年,天然系添加物の使用が増加しているが,わが国ではそれらの品質規格が十分に整備されておらず,その実態も明かでないものが多くある。今回は天然香料の柑橘系オイルを中心に米国 FFC 規格を基に品質評価が行われた. 旋光度は多くの検体で規格に適合しなかったが,その他の検査項目は 2 検体を除き適合していた。全ての規格

に適合しなかった2検体は香料成分が濃縮されたものと推測された.検体により規格の試験法が適用できないもの もあることが明らかにされたことから、早期に規格基準が整備されることが強く要望された.

手軽に利用できる病人用調理済み食品が市販されているが、その一部、糖尿病食調理用組み合わせ食品のビタミン含有量について調査が行われた。その結果、献立構成に改善の必要のあるものが見つかった。すなわちビタミンA、及び B_1 が極めて低いものがあり、またビタミンCでは日本食品標準成分表の換算値よりいずれの検体も顕著に低く、調理過程で分解したと考えられた。これらは食事管理の困難さを解消する便利な食品であるが、今回の報告ではその不足分を上手に補う必要があることを示唆している。

過去10年間の検査成績からみた各種市販食品の細菌学的品質評価

神 真知子,平田 一郎,新 井 輝 義,楠 くみ子, 入 倉 善 久,鈴 木 敬 子,諸 角 聖,二島太一郎

An Evaluation of the Bacteriological Quality of Commercial Foods

MACHIKO JIN, ICHIRO HIRATA, TERUYOSHI ARAI, KUMIKO KUSUNOKI, YOSHIHISA IRIKURA, KEIKO SUZUKI, SATOSHI MOROZUMI and TAICHIRO NISHIMA

Keywords: 市販食品 commercial foods, 市販食肉 commercial meat, 生菌数 standard plate count, 大腸菌群 coliforms, 食中毒起因菌 food poisoning bacteria

緒 言

近年の食品加工技術の進歩や流通・販売形態の変化に伴う食品の多様化はめざましく、包装形態や流通方式の異なる様々な食品が店頭を賑わしている. その中にはレトルト食品や冷凍食品のように微生物による被害を受けにくく、保存性の優れた食品が含まれている. しかし、このような加工技術・保蔵技術の応用不可能な食品は生鮮食品等をはじめ数多く残されており、加えて消費者の嗜好や食習慣の変化を反映して減塩や保存料を使用しないことでむしろ微生物による危害を受けやすくなった食品すら存在する. また、多様化した市販食品の安全管理は現在もなお完全とは言えず、細菌汚染による流通時の変質や腐敗を始め、食中毒などの微生物危害はほとんど減少していない1).

食品の安全性を確保するため、国は乳・乳製品、食肉・魚肉製品、冷凍食品などについては規格基準及び洋生菓子、弁当・そう菜などについては衛生監視上の指導基準ともいうべき衛生規範を設けている。また、都道府県ではこれ以外の一部の食品について指導基準をそれぞれ定め、それに基づいて食品の安全性維持を図っている。さらに、東京都では、夏・冬季一斉収去検査において、より適切な衛生指導を行う目安としての基準を設定している。今後、これらの基準は社会的及び行政上のニーズに従って変化してくるものと考えられる。われわれは、食品の安全性向上を目的とした適切な衛生指導の実施及び基準の作成には、予め食品それぞれの汚染実態の把握が不可欠であると考え、過去10年間に集積された主な食品約23,000検体の細菌検査

成績を解析し、前記各種基準に基づいて、これら食品 の品質評価を試みた.

材料及び方法

1. 調査材料

調査対象とした食品は、1983~1992年の10年間に東京都保健所及び食品機動監視班により搬入された市販食品14種類、22,970検体である。その内訳は弁当・そう菜4,628件、食肉・魚肉製品3,562件、洋生菓子2,497件、すし種・刺身1,871件、サラダ1,466件、調理パン1,475件、豆腐1,367件、アイスクリーム1,276件、和生菓子1,262件、ゆでめん1,098件、生食用カキ987件、冷凍食品の凍結前加熱済・加熱後摂取食品(以下カカと略す)384件、凍結前未加熱・加熱後摂取食品(以下カラと略す)500件計884件及び食肉597件である。

2. 検査方法

各食品の検査は、原則として成分規格、東京都の指導基準等に指定されている検査項目について実施した。また、各項目の検査は成分規格のある食品は公定法²⁾、その他の食品については食品衛生検査指針³⁾及び東京都食品衛生細菌検査マニュアル⁴⁾に準じて以下に示した手順で行った。

1) 生菌数測定法

標準寒天培地を用いて混釈培養を行い,原則として 35℃で48時間後の発生集落数から算定した.

2) 大腸菌群及び大腸菌検査方法

大腸菌群の検査は、成分規格のある食品については 公定法で定められた方法²⁾、その他の食品はデソキシコ レート寒天培地を用いて混釈培養を行い35℃で24時間 後の発生集落から菌数を算定した.

大腸菌の検査は、成分規格のある食品については、公定法に規定された EC 培地を用いる方法で行った.そ・の他の食品では、食品の10%乳剤10mlを BGLB 培地で35℃、48時間増菌培養し、乳糖を分解してガスの産生を認めたものを EMB 寒天培地で分離培養後、発育した定型的集落についてクリグラー寒天培地、LIM 培地、シモンズ・クエン酸塩培地及び VP 半流動培地を用いて生化学的性状試験を行って、大腸菌を鑑別同定した.

3) 食中毒起因菌の検査方法

滅菌生理食塩水を用いて調製した食品の10%乳剤を試料として,以下の方法に従って食中毒起因菌の検査を 実施した.

黄色ブドウ球菌:MSEY 寒天平板に試料0.1mlを塗抹し,35℃,48時間培養した.出現した集落のうち卵黄 反応陽性,マンニット分解陽性の光沢ある隆起した不透明の黄色集落について,コアグラーゼ試験を行い黄 色ブドウ球菌を同定した.

サルモネラ:倍濃度のラパポート培地30mlに試料30mlを接種し、35℃、24時間培養後、DHL 寒天平板を用いて分離培養を行った。出現した集落のうちサルモネラの疑われる集落について常法⁵⁾により同定した。なお、食肉についてはEEM ブイヨンで前増菌培養を行った。

腸炎ビブリオ:TCBS 寒天培地とビブリオ寒天培地平板上に試料をそれぞれ0.1mlずつ塗抹する直接培養法と、

試料1mlを3%食塩加アルカリペプトン水に接種する増 菌培養法を併用することにより分離し、以下常法⁵⁾に従 い腸炎ビブリオを同定した.

なお、食肉については、カンピロバクター、ウェルシュ菌の検査を追加して実施した.この際、カンピロバクターは増菌培地に CEM 培地、分離培地にバツラー寒天平板を用いて分離後、常法⁵⁾により性状を確認した.また、ウェルシュ菌はハンドフォード改良培地を用いて、試料10mlを混釈して嫌気培養する方法により検査した.

結果及び考察

1. 細菌検査成績

1) 生菌数及び大腸菌群(数)

各種食品から得られた生菌数分布の検体数の実測値を表 1 に示した。食肉・魚肉製品,アイスクリーム及び冷凍食品カカの生菌数をみると,いずれの食品においても65%前後が 1 g当たり 10^2 未満の菌数であったのに対し,弁当・そう菜を除く残りの10種類の食品の 1 g当たりの生菌数は,すし種・刺身では 10^2 ~ 10^8 ,豆腐及び生食用カキでは $<10^2$ ~ 10^7 ,それ以外はいずれも $<10^2$ ~ 10^8 の広い範囲に分布し, 10^3 ~ 10^5 をピークとする正規分布を示した。これらの食品のうち生菌数が 10^5 /g以上であった各食品の割合をみると,食肉が69.7%と最も高く,次いですし種・刺身が60.1%,調理パン43.6%,サラダ37.7%,和生菓子32.9%,洋生菓子29.0%,豆腐26.1%,ゆでめん20.5%の順であった。弁当・そう菜で

表1. 各種食品の生菌数測定成績

44.66.00	/#-=++ <u>\</u> _/*/-				生菌	数/g			
対象食品	供試検体数	≤10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10^{5}	10^{6}	10 ⁷	10 ⁸
A) 食肉・魚肉製品	3,562	2,476	347	295	219	102	69	49	5
アイスクリーム	1,276	768	278	143	65	19	3	-	- '
冷凍食品[カカ]	384	243	56	48	29	7	1		_
冷凍食品[カミ]	500	63	46	116	103	91	49	16	16
生食用カキ	987	22	281	575	92	6 .	8	3	-
B) 弁当・そう菜	4,628	1,005	849	1,054	841	538	256	74	11
洋生菓子	2,497	195	411	605	561	426	204	78	17
すし種・刺身	1,871	-	22	174	550	689	391	44	1
調理パン	1,475	122	163	216	331	383	168	70	22
和生菓子	1,262	147	157	262	281	265	124	24	2
ゆでめん	1,098	160	138	256	319	172	35	17	' 1
サラダ	1,466	80	131	261	442	341	155	52	4
豆腐	1,367	52	125	345	488	291	62	4	-
 食肉	597	1	5	27	148	218	168	29	1

A):成分規格が設定されている食品

B):東京都で衛生指導上の基準が設定されている食品

カカ:凍結前加熱済・加熱後摂取食品 カミ:凍結前未加熱・加熱後摂取食品

は $<10^2/g$ と 10^3 の2カ所にピークが認められ、生菌数が $10^{5}/g$ 以上を占めた検体の割合は19.0%であった.

生菌数の測定値から各食品の細菌汚染を考察すると, 汚染度の高い食品は、食肉、すし種・刺身、調理パン 及びサラダ等であり、特に食肉、すし種・刺身は高い 二次汚染を受けていることが推察された。また、弁 当・そう菜の生菌数が正規分布を示さず、2カ所に ピークが認められた理由は、潮田ら60も指摘しているよ うに、弁当・そう菜が複合調理食品であるため、検査 した食品の内容の違いによるものと思われる.

次に、各種食品の大腸菌群及び大腸菌の検査成績を みると、表2に示すように、定性的に大腸菌群を検査 したアイスクリームでは1,276件中118件(9.2%)から, 食肉・魚肉製品では3,562件中111件(3.1%),冷凍食品 カカでは384件中1件(0.3%)から大腸菌群が検出された. 一方、定量的に大腸菌群を検査した各種食品のうち、 すし種・刺身及び食肉以外の食品の大腸菌群数は大半 が1g当たり<10に集中し、上限 $が10^5 \sim 10^6$ と広い範囲 に分布が認められた. これら食品のうち大腸菌群数が <10を占める割合が最も多い食品はゆでめん79.1%であ り,次いで和生菓子72.7%,豆腐70.6%,弁当・そう菜 68.7%, 洋生菓子59.5%, サラダ40.8%の順であった. 残りのすし種・刺身及び食肉の大腸菌群数は102にピー クを示し、その範囲での分布率は約40%であった。大腸 菌群数の測定成績をみても生菌数と同様に、食肉、す

し種・刺身、調理パン及びサラダが汚染の高い食品で あった. これに対し、ゆでめんと豆腐は生菌数及び大 腸菌群数の低い食品であったが、これは、これらの食 品が加熱され、冷却後の処理工程が少なく、二次汚染 を受けにくいことを考えれば、当然の成績であると言 える.

大腸菌の検査成績をみると、冷凍食品カミは500件中 28件(5.6%)が陽性であった. 生食用カキでは大腸菌が 100g当たり230を超えて検出されたものは987件中32件 (3.2%)認められた. また、洋生菓子をはじめとする8 種類の食品の大腸菌の検出頻度は、サラダで1.6%、調 理パン1.1%, 弁当・そう菜0.7%, すし種・刺身及び豆 腐がそれぞれ0.5%、ゆでめん0.4%、洋生菓子が0.2%の 順であった. 各種食品における大腸菌群数と大腸菌検 出の関連性をみると、サラダ及び調理パンでは大腸菌 群の多い検体ほど大腸菌も検出される頻度が高くなる 傾向がみられたが、すし種・刺身ではこのような傾向 は認められなかった.

2) 食中毒起因菌檢查成績

各種食品からの食中毒起因菌の検査成績を表3に示 した. 黄色ブドウ球菌はアイスクリーム以外の全検体 について検査した結果、検出率はあまり高くなかった が,広範囲の食品に分布していることが認められた. そのなかで、食肉からの検出率が8.9%と最も高く、そ の他すし種・刺身4.0%, 和生菓子2.6%, 弁当・そう菜

北岳公口	/#-=\-\ <u>/</u> -\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\-\		大腸菌	育群(定性	<u>:</u>)			大腸菌郡	¥∕g			
対象食品	供訊快件级	大腸菌陽性	(+)	(-)	<10	10 ¹	10^{2}	10^{3}	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	
A)食肉・魚肉製品	3,562	. •	111(3.1)	3,451	•	. •	•	•	•	•	•	
アイスクリーム	1,276	•	118 (9.2)	1,158	•	•	•	•	• 1	•		
冷凍食品[カカ]	384	•	1(0.3)	383	•	•	•	•	* •	•	. •	
冷凍食品〔カミ〕	500	28(5.6)	• .	•	•	•	. • .	•	•	•	•	
生食用カキ	987	32(3.2) *	•		•	•	• '	•	•	•	•	
B) 弁当・そう菜	4,628	33(0.7)	•	•	3,179	629	461	231	80	38	10	
洋生菓子	2,497	5(0.2)	•	•	1,485	417	348	187	43	12	5	
すし種・刺身	1,871	10(0.5)	•	•	471	292	772	269	65	2	-	
調理パン	1,475	16(1.1)	•	•	696	279	272	135	56	21	16	
和生菓子	1,262	-0	•	•	918	100	98	83	49	12	2	
ゆでめん	1,098	4(0.4)	•	•	868	130	61	20	12	5	2	
サラダ	1,466	24(1.6)	•	•	598	315	325	147	50	24	7	
豆腐	1,367	7(0.5)	•	•	965	255	112	30	3	2	-	
· 食肉	597	•	•	•	129	65	219	139	35	9	1	

表 2. 各種食品の大腸菌群及び大腸菌検査成績

A):成分規格が設定されている食品

カカ:凍結前加熱済・加熱後摂取食品

*:100g当たり大腸菌230以上のもの

()内は%

B):東京都で衛生指導上の基準が設定されている食品

カミ:凍結前未加熱・加熱後摂取食品

社伍公 口	検査件数			陽性数(%)		
対象食品	次旦厂奴	黄色ブドウ球菌	サルモネラ	腸炎ビブリオ	ウェルシュ菌	カンピロバクター
A) 食肉・魚肉製品	3,562	10(0.3)	0	NT	NT	NT
アイスクリーム	1,276	NT	NT	NT	NT	NT
冷凍食品	884	10(1.1)	1(0.1)	NT	NT	NT
生食用カキ	987	1(0.1)	NT	18(1.8)	NT	NT
B) 弁当・そう菜	4,628	100(2.2)	0	NT	NT	NT
洋生菓子	2,497	37(1.5)	0	NT	NT	NT
すし種・刺身	1,871	75 (4.0)	0	135(7.2)	NT	NT
調理パン	1,475	29(2.0)	0	ŃT	NT	NT
和生菓子	1,262	33(2.6)	0	NT	NT	NT
ゆでめん	1,098	9(0.8)	. 0	NT	NT	NT
サラダ	1,466	22(1.5)	0	NT	NT	NT
豆腐	1,367	6(0.4)	0 .	NT	NT	NT
	597	53(8.9)	67 (11.2)	NT	165 (27.6)	61/254 * (24.0)

表3.各種食品からの食中毒起因菌検査成績

A):成分規格が設定されている食品

B):東京都で衛生指導上の基準が設定されている食品

NT:未検査

*:陽性数/検査件数

2.2%, 調理パン2.0%等であった. 入倉ら⁷⁾は, 各種食品取り扱い者における黄色ブドウ球菌の保菌状況を調査し, 食肉販売業者, 生鮮魚介類販売業者, すし調理人, 弁当・そう菜調理者及び菓子製造業者等が高率に黄色ブドウ球菌を保菌していることを明らかにしている. 今回の成績でも, これら業者が取り扱う食品からの検出率は高く, すし種・刺身及び弁当・そう菜, 和生菓子等の調理済み食品を汚染する黄色ブドウ球菌は主として食品取り扱い者に由来するものであろうと推察された.

サルモネラは食肉から11.2%の割合に検出されたほかは冷凍食品カミのハンバーグから1件検出されただけであった。また、腸炎ビブリオはすし種・刺身1,871件中135件(7.2%)、生食用カキ987件中18件(1.8%)から検出された。なお、その他食肉からウェルシュ菌が27.6%、カンピロバクターは鶏肉を主体として24.0%の割合に検出された。

以上のように、すし種・刺身からは黄色ブドウ球菌及び腸炎ビブリオが検出され、すし種・刺身が腸炎ビブリオ食中毒の原因食品として毎年数多く報告されていることを裏付ける成績であった。しかし、すし種・刺身を原因食とする黄色ブドウ球菌食中毒の発生はほとんど報告されていない。これは、すし種・刺身が低温で流通し、喫食するまでの時間が短い生鮮食品であるため、黄色ブドウ球菌の増殖が遅く、エンテロトキシンの産生量が少ないことに起因する8)ものと考えられる。

市販の食肉は生菌数や大腸菌群数が高いものが多く、ウェルシュ菌、カンピロバクター、サルモネラ及び黄色ブドウ球菌等の食中毒起因菌により高率に汚染されていることが明らかになった。しかし、食肉は加工調理をして喫食するものであり、適切な加工調理を行えば、安全性は確保できると思われる。しかし、汚染された食肉では、その保存及び加工調理時における腐敗の進行、食品間の相互汚染や二次汚染源となることが考えられるので、その取り扱いには十分注意する必要があろう。

2. 各種食品の細菌学的品質評価

各種食品の細菌汚染調査結果を表 4 に示すような成 分規格及び一斉収去時に業者指導の目安として設定さ れた基準に照合して評価した. なお, 今回は東京都指 導基準に基づく評価は行わなかった. この理由として, 東京都指導基準のうち食品一般は昭和36年, すし種・ 刺身は昭和45年に設定されたものであり、食品の製造 方法、流通販売形態等が当時より著しく変化した現在 の食品事情の中にあっては食品の監視あるいは指導を するうえで、現状に即していない基準であることが示 唆されたからである. 例えば, 成分規格の設定されて いないすし種・刺身をはじめとする8種類の食品の細 菌検査結果を指導基準に照合して評価した場合, いず れの食品においても約半数以上が不良品となる結果で あった. この事由は定性的に大腸菌群が検出されては いけないという基準によるものであった. そこで、こ れら8種類の食品については夏季及び冬季一斉収去検

表 4. 各種食品の成分規格, 東京都指導基準及び食品一斉収去時に業者指導の目安として設定された基準

小	此 址 */- /	上明 带 升 /			食中毒起因菌	
対象食品	生菌数/g	大腸菌群/g	大腸菌	黄色ブドウ球菌	サルモネラ	腸炎ビブリオ
食肉・魚肉製品	•	ND (/3g)	•	•		•
アイスクリーム	1×10 ⁵ 以下	ND(/0.2g)	•	•	•	•
冷凍食品[カカ]	1×10 ⁵ 以下	ND(/0.02g)	•	•	•	•
冷凍食品[カミ]	3×10 ⁶ 以下	•	ND(/0.03g)	• .	•	• •
生食用カキ	5×10 ⁴ 以下	•	230/100g以下	•	•	.•
東京都指導基準			·			
食品一般	1×10 ⁵ 以下	. ND	•	ND	ND	•
すし種・刺身	•	ND	•	•	•	ND
食品一斉収去時に業	者指導の目安とし`	て設定された基準	[
弁当・そう菜	1×10 ⁵ 以下	1×10 ³ 以下	ND	ND	ND	•
洋生菓子	1×10 ⁵ 以下	1×10 ² 以下	ND	ND	ND	•
すし種・刺身	1×10 ⁶ 以下	3×10 ³ 以下	ND	ND	ND .	ND
調理パン	1×10 ⁶ 以下	1×10 ³ 以下	ND	ND	ND	•
和生菓子	5×10 ⁵ 以下	1×10 ³ 以下	ND	ND	ND	• 1
ゆでめん	1×10 ⁵ 以下	1×10 ² 以下	ND	ND	ND	•
サラダ	1×10 ⁶ 以下	3×10 ³ 以下	ND	ND	ND	•
豆腐	5×10 ⁵ 以下	3×10 ² 以下	ND	ND	ND	•,

カカ:凍結前加熱済・加熱後摂取食品

カミ:凍結前未加熱・加熱後摂取食品

ND:未検出

表 5. 成分規格及び食品一斉収去時に業者指導の目安として設定された基準に基づく 各種食品の細菌学的品質評価

- 计40 全口	₩ ₩		不適の内	可訳(%)	
対象食品	検査件数	生菌数	大腸菌群	大腸菌	食中毒起因菌
食肉・魚肉製品	3,562		111(3.1)	•	. •
アイスクリーム	1,276	22(1.7)	118(9.2)	.•	•
冷凍食品[カカ]	384	8(2.1)	1(0.3)		•
冷凍食品〔カミ〕	500	66 (13.2)	•	28(5.6)	•
生食用カキ	987	63(6.4)	•	32(3.2)	, •
弁当・そう菜	4,628	868 (18.8)	336 (7.3)	33(0.7)	100 (2.2)
洋生菓子	2,497	690 (27.6)	567 (22.7)	5(0.2)	37 (1.5)
すし種・刺身	1,871	436(23.3)	171 (9.1)	10(0.5)	210 (11.2)
調理パン	1,475	260 (17.6)	226 (15.3)	16(1.1)	29 (2.0)
和生菓子	1,262	283 (22.4)	146 (11.6)	0	33 (2.6)
ゆでめん	1,098	225 (20.5)	100 (9.1)	4(0.4)	9(0.8)
サラダ	1,466	216 (14.7)	187 (12.8)	24(1.6)	22(1.5)
豆腐	1,367	175 (12.8)	107(7.8)	7(0.5)	6(0.4)

カカ: 凍結前加熱済・加熱後摂取食品 カミ: 凍結前未加熱・加熱後摂取食品

査時に業者指導の目安として設定されている基準に照合して評価した.この基準値は固定化されたものではなく、今後食品事情の変化や食品衛生の向上等によって変更されることがある.

成分規格のある食品についてみると、表5に示したように、アイスクリームでは生菌数と大腸菌群に基準

が設定されており、生菌数不適による不良品は1.7%, 大腸菌群不適による不良品は9.2%に認められた。また, 同様の規定がある冷凍食品カカにおける生菌数と大腸 菌群の不適率はそれぞれ2.1%, 0.3%であった。これに 対し、冷凍食品カミ及び生食用カキは生菌数と大腸菌 に基準が設定されており、冷凍食品カミでは生菌数不 適が13.2%,大腸菌不適が5.6%と成分規格のある食品の中では不良品の多い食品であった。生食用カキでは生菌数不適が6.4%,大腸菌不適が3.2%認められた。また,食肉・魚肉製品については,調査時点では大腸菌群のみ基準が設定されており,3.1%の不良品が認められた。

成分規格のない8種類の食品について、東京都の業 者指導の目安として設定されている基準に照合してみ ると、生菌数では、最も多く不良品が認められた食品 は洋生菓子であり、その割合は27.6%であった. 次いで すし種・刺身23.3%, 和生菓子22.4%, ゆでめん20.5%, 弁当・そう菜18.8%、調理パン17.6%、サラダ14.7%、 豆腐12.8%の順であった.一方,大腸菌群不適による各 種食品の不良品の割合をみると, 生菌数と同様に洋生 菓子が全体の22.7%と最も高率であった.次いで不良品 の多い食品は調理パン, サラダ, 和生菓子でいずれも 10%以上の不適率であった。また、大腸菌と食中毒起因 菌についてみると、すし種・刺身で食中毒起因菌検出 による不良品が11.2%認められた以外はいずれの食品に おいても低率 $(0\sim2.6\%)$ であった.以上のように、各食 品とも不良となる主な事由は、生菌数または大腸菌群 が基準値をオーバーしたことによるものであった.

近年の目まぐるしく変化する食品事情の中にあって、 食品の安全性を確保するためには実状に即した行政の 食品監視あるいは指導が必要であると思われる. その ためには、今後さらに食品それぞれの汚染実態を正確 に把握して行く必要があり、このための検査データの 集積、解析及びその活用を目的としたサーベイラン ス・データバンクシステムの確立が急務であると考え る.

結 論

1983~1992年の10年間に実施した各種市販食品14種類,22,970検体の細菌汚染実態調査成績から,それら食品の品質評価を試みた結果、次の結論を得た.

1. 汚染指標である生菌数, 大腸菌群数は各食品とも

- 1g当たりそれぞれ $<10^2 \sim 10^8$, $<10 \sim 10^6$ の広い範囲に認められた.なかでも食肉、すし種・刺身、調理パン及びサラダでは、これら菌数の高いものが多く認められた.
- 2. 食中毒起因菌では黄色ブドウ球菌が広範囲の食品から検出され、その他、サルモネラは食肉、腸炎ビブリオはすし種・刺身の重要な汚染菌であることが示された.
- 3. 成分規格のある食品のなかで、冷凍食品カミは生菌数及び大腸菌不適による不良品が多く、アイスクリームは大腸菌群不適による不良品が多かった。
- 4. 東京都の一斉収去時における基準値に照合すると、 洋生菓子が生菌数、大腸菌群いずれにおいても、最も 不適率が高かった. その他、すし種・刺身及びゆでめ んでは生菌数、調理パン、サラダ、和生菓子は大腸菌 群で不良品が多かった.

文 献

- 1) 厚生省大臣官房統計情報部編:食中毒統計, 13-34, 1992, 厚生統計協会.
- 2) 厚生省生活衛生局監修:食品衛生小六法,平成4年度版,141-462,1992,新日本法規,東京.
- 3) 厚生省生活衛生局監修:食品衛生檢查指針·微生物編,67-90,1990,日本食品衛生協会,東京.
- 4) 東京都立衛生研究所・特別区保健衛生試験検査主管課長会監修:食品衛生細菌検査マニュアル, 11-60, 1992.
- 5) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山 武他:腸管系病原菌 の検査法, 第4版, 171-265, 1985, 医学書院, 東京.
- 6) 潮田 弘, 五十嵐英夫, 藤川 浩他:東京衛研年 報, **38**, 133-138, 1987.
- 7) 入倉善久, 池島伸至, 平田一郎他:東京衛研年報, **38**, 145-149, 1987.
- 8) 厚生省生活衛生局食品保健課監修, 坂井千三編: 食中毒菌の制御, 14-26, 1988, 中央法規, 東京.

市販 ELISA キットによる畜水産食品中の 残留テトラサイクリン系抗生物質検出法の検討

片 岡 潤*,神 保 勝 彦*,小久保 彌太郎*,梅 津 透**

The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Detection of Tetracyclines in Meat and Fish Products

JUN KATAOKA*, KATSUHIKO JINBO*, YATARO KOKUBO*
and TORU UMEZU**

Keywords:残留テトラサイクリン系抗生物質 residual tetracyclines, 酵素抗体法 ELISA, 畜水産食品 meat and fish products

緒 言

家畜等に使用される抗菌性物質は、疾病の予防、治療あるいは発育促進などを目的として畜水産業の発展に大きな役割を果たし、その種類および使用量は年々増加している¹⁾. その中で特にテトラサイクリン系(TC系)抗生物質は安価であり、しかも広域にわたる病原菌に強い抗菌作用を有することから最も大量に使用されているため¹⁾、本薬剤の食用組織への移行残留が懸念される. われわれが市販畜水産食品を対象に残留調査した成績でも、最も検出率の高かった抗菌性物質は TC系抗生物質であった²⁾.

畜水産食品中の残留抗生物質の検査は、平成3年10月に厚生省が通知した微生物学的方法で行われている^{3,4)}.この方法は残留抗生物質を系統別に検出するものであり、その種類まで同定することはできない、残留抗生物質を同定する場合には、試験操作が煩雑で検出感度の低いマイクロバイオオートグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなどで行わなければならず、極めて多くの時間と労力を必要とする。一方、これらの方法に比べると、免疫学的方法は迅速で、特異性、検出感度ともに高いことから抗菌性物質の同定にしばしば応用されている⁵⁻⁸⁾.しかし、TC系抗生物質に関しては、特異抗体の得にくさなどから今まで実用化されていなかったが、最近、ELISAによるTC系抗生物質同定キットがわが国でも市販されるようになった。そこで、このキットが、畜水産食品を対象とした残留

TC 系抗生物質の日常検査に応用できるかどうかを検討した.

実験材料および方法

1. 抗菌性物質標準品

供試抗菌性物質として、TC系抗生物質は塩酸テトラサイクリン(TC)、塩酸クロルテトラサイクリン(CTC)、塩酸オキシテトラサイクリン(OTC)、塩酸ドキシサイクリン(DOXY)の4種類、その他にペニシリンGカリウム(PCG)、アンピシリン(ABPC)、硫酸カナマイシン(KM)、硫酸ジヒドロストレプトマイシン(DSM)、リン酸タイロシン(TS)、エリスロマイシン(EM)、サルファジメトキシン(SDMX)、サルファモノメトキシン(SMMX)、クロラムフェニコール(CP)の計13種類を使用した、いずれも製薬会社から分与された純品である。これらの抗菌性物質は、いずれもMIC法⁹⁾に従い希釈して使用した.

2. 供試検体

東京都内で採取した市販畜水産食品52検体(豚肉17検体, 牛肉3検体, 鶏肉3検体, 鶏卵2検体, 養殖魚25検体, はちみつ2検体)を使用した. なお, これらの検体はいずれも, 公定法である簡易系統別検査法^{3,10)}でTC系抗生物質が検出されたものである.

3. 市販 ELISA キットおよびその使用方法

実験に供試した市販 ELISA キットは、R-biopharm 社のRIDASCREEN Tetracycline である。本キットは、 マイクロプレートに TC 抗原を固相化し、一次抗体とし

^{*}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

 $[\]hbox{\bf *The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health}$

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

^{**}セティカンパニーリミテッド

て抗 TC ウサギ IgG 抗体と、二次抗体として抗ウサギ IgG 酵素標識抗体を用いた ELISA 競合法の原理に基づくものである 11 .

1) 畜水産食品からの試験溶液の調製

畜水産食品中のTC系抗生物質の抽出は、簡易系統別 検査法^{3,10)}で行い、その分画液Bをキット添付の希釈液 で10倍に希釈し、これをELISA用試験溶液として用い た.

2) ELISA キットの使用方法

キットの使用方法は、使用説明書(図1)に従い、TC 抗原が固相化されたマイクロプレートの各ウェルに試 験溶液または抗菌性物質標準溶液を分注し、さらにこ れに抗 TC ウサギ IgG 抗体を加えて反応させた. 各 ウェルを洗浄後、酵素標識二次抗体を分注して反応さ せ、再び各ウェルを洗浄後、基質と発色剤をそれぞれ 分注し、次いで反応停止液を加えてから、450nmで吸光 度を測定した.

図1 ELISA キットの使用方法

3) ELISA キットの判定法

TC 標準希釈溶液の吸光度を測定して検量線を作成した(図 2). 次に、試験溶液の吸光度を測定し、その値を検量線にスポットし、TC 系抗生物質であるかどうかを判定した.本キットによる TC の検出感度は $0.15 \mu g/l$ であり、そのときの吸光度は70.7%であったことから、吸光度が70.7%以下のものを陽性、それ以上のものを陰性と判定した.

実験結果

1. 各種抗菌性物質に対する ELISA キットの反応

各抗菌性物質に対して ELISA キットを使用したとき の吸光度を調べ、その結果を表 1 に示した。 $1.0 \mu g/10$ TC と CTC に対する吸光度はそれぞれ28.6%と30.9%, $10 \mu g/10$ OTC と DOXY に対する吸光度はそれぞれ 42.1%と41.0%であり、TC 系抗生物質に対してはいずれも特異的に反応し、陽性と判定された.

 $10 \mu g/1$ の PCG、ABPC、KM、DSM、EM、SDMX、SMMX、CP に対する吸光度は93.7%~100%以上であり、ほとんど反応せず、陰性と判定された. しかし、10

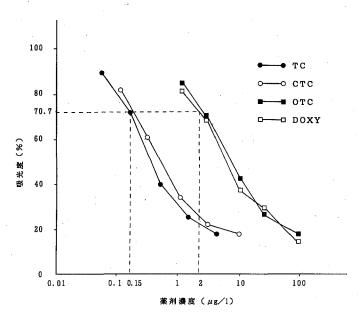


図2 ELISA キットによる TC 系抗生物質の標準検 量線

表 1. ELISA キットの各抗菌性物質に対する反応

						抗	菌性	物質					
	テ	トラサイ	イクリン	系	ペニシ	ノリン系	アミノグ	リコシド系	マクロ・	ライド系	サル	ファ剤	クロラムフェニコール
	TC ^{a)} .	CTC ^{a)}	OTC ^{b)}	DOXY ^{b)}	PCG ^{b)}	ABPC ^{b)}	KM ^{b)}	DSM ^{b)}	TS ^{b)}	EM ^{b)}	SDMX ^{b)}	SMMX ^{b)}	CP ^{b)}
吸光度 (%)	28.6	30.9	42.1	41.0	>100	94.0	>100	>100	38.8	>100	>100	93.7	>100
判定	+	+	+:	+	_		_		+.	. –		_	<u>.</u>
a)	1.	h)	1-	7H I	.,	• 17A Jul.						· ·· · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

 $^{^{}a)}$: 1 μ g/l $^{b)}$: 10 μ g/l +: 陽性 -: 陰性

 μ g/Iの TS に対する吸光度は38.8%であり、TC 系抗生物質と同程度の反応を示したことから、TC 系抗生物質との区別はできなかった.

2. TC 系抗生物質に対する ELISA キットの検出感度

TC 系抗生物質標準溶液および TC 系抗生物質添加食 肉からの抽出液に対する ELISA キットの検出感度を調 べた. その結果を表 2 に示した.

TC 系抗生物質標準溶液に対する ELISA キットの検出感度は、TC と CTC はともに $0.15~\mu g/l$ 、OTC と DOXY はともに $2.0~\mu g/l$ であった.

TC 系抗生物質を添加した食肉を対象にして、簡易系統別検査法により調製した試験溶液に対する ELISA キットの検出感度は、TC と CTC はともに $0.3\mu g/kg$, OTC と DOXY はともに $4.0\mu g/kg$ であった.

3. 畜水産食品中の残留抗菌性物質検査への応用

簡易系統別検査法によって TC 系抗生物質の残留が確認された畜水産食品52検体を対象に、ELISA キットを応用した。また、同時に公定法のマイクロバイオオートグラフィーにしたがって同定を行った。その結果を表3に示した。ELISA キットでは52検体中31検体が吸光度70.7%以下を示し、陽性と判定された。これら31検体すべてがマイクロバイオオートグラフィーで CTC あるいは OTC と同定された。ELISA キットで陰性と判定された21検体中4検体はマイクロバイオオートグラフィーで CTC あるいは OTC と同定されたが、残りの17検体については同定できなかった。

表2. ELISA キットの検出感度

薬 剤 一	検出感度	(μg/l·kg)
薬剤一	標準溶液	食肉抽出液 ^{a)}
ŤC	0.15	0.3
CTC	0.15	0.3
OTC	2.0	4.0
DOXY	2.0	4.0

^{a)}:簡易系統別検査法による分画液 B

表3. 簡易系統別検査法で残留 TC 系抗生物質が 認められた畜水産食品 (52検体) に対する ELISA キットとマイクロバイオオートグラ フィーによる成績の比較

判定	ELISA	去	マイクロバイオオートグラフィー				
刊疋	吸光度(%)	件数	CTC	OTC	* a)		
陽性	0~70.7	31	14	17	0		
陰性	70.8以上	21	1	3	17		

^{a)}:同定できず

考 察

最近、ELISA を残留抗菌性物質検査法に応用したキットがいくつか開発^{7,12)}されている。これらの方法は、抗菌性物質とその特異抗体との抗原抗体反応を利用しており、その特異性は極めて高いといわれている。今回、実験に供した ELISA キットは、抗原として TC を用いているがTC系抗生物質はいずれも構造式の側鎖の一部が多少異なるだけで互いに極めて類似しているため、TC 以外の TC 系抗生物質に対しても交差反応を起こす。このような特性を利用して、TC 系抗生物質全般の有無が判定できるが、それがいずれの種類であるかを識別することは困難であった。

TC 系抗生物質以外の抗菌性物質では、マクロライド系抗生物質の TS に対して TC 系抗生物質と同程度の反応を示し、それらを区別することはできなかった. しかし、試験溶液の調製に当たって畜水産食品からの抽出を簡易系統別検査法で行った場合、TS は分画液 Aに、TC 系抗生物質は分画液 B に抽出されるので、間違った判定をすることはないと考えられる. また、本キットは、これら以外の抗菌性物質に対して反応しなかったことから、試験溶液の調製を簡易系統別検査法で行えば、TC 系抗生物質を確実に検出できると考えられる.

ELISA の検出感度は、微生物学的方法および理化学的方法よりも高いといわれている。著者らが行った試験でも、本キットの検出感度を微生物学的方法^{3,10)}と比較すると、TC 系抗生物質標準溶液では100~300倍高く、TC 系抗生物質を添加した食肉抽出液では3~30倍高かった。このことから、本キットは、より低濃度にTC 系抗生物質が残留している可能性のある市販畜水産食品の残留検査にも応用できると考えられる。

簡易系統別検査法で残留 TC 系抗生物質が検出された 畜水産食品52検体を対象に本キットの使用を試みた結果,陽性を示したのは31検体であった.これらの検体 はすべてマイクロバイオオートグラフィーで CTC ある いは OTC と同定された.残りの21検体は陰性と判定され,簡易系統別検査法の結果と一致しなかったが,このうち4検体はマイクロバイオオートグラフィーで OTC あるいは CTC と同定された.この理由としては,本キットは TC を抗原としており,OTC や DOXY との交差率が $4\sim5$ % $^{11)}$ であるために,これら薬剤の検出 感度が低いこと,あるいは抽出された TC 系抗生物質の構造が生体内での代謝によって変化したために反応しなかったことなどが考えられる.このような問題点はあるが,本キットは,試験溶液の調製を簡易系統別検査法により行えば,畜水産食品中の残留 TC 系抗生物質

の同定法として応用できると考えられる. 今後,本キットがさらに改良されて,比色計により視外部吸収を測定して判定するのではなく,肉眼的に判定可能になり,しかも TC 系抗生物質の種類まで同定できるなら,より実用価値が高くなると考える.

結 論

畜水産食品中に残留する TC 系抗生物質を検出するために開発された市販 ELISA キット RIDASCREEN Tetracycline が日常検査に応用できるかどうかを検討し、次の結果を得た.

- 1. 13種類の抗菌性物質標準溶液に対する ELISA キットの反応は、TC 系抗生物質のTC, CTC, OTC および DOXY に対していずれも特異的であった. しかし、TS に対しては TC 系抗生物質と同程度の反応を示し、その区別はできなかった. その他の抗菌性物質に対しては、ほとんど反応せず、TC 系抗生物質と明らかに区別できた.
- 2. TC 系抗生物質を添加した食肉を対象とした ELISA キットの検出感度は、試験溶液の調製を簡易系統別 検査法で行った場合、TC と CTC はともに $0.3\,\mu\mathrm{g/kg}$, OTC と DOXY はともに $4.0\,\mu\mathrm{g/kg}$ であった.
- 3. 簡易系統別検査法で残留 TC 系抗生物質が検出された市販畜水産食品52検体を対象に,ELISA キットを応用した結果,31検体が陽性,21検体が陰性を示した. 陽性検体はすべて,マイクロバイオオートグラフィーで CTC あるいは OTC と同定された. 陰性と判定されたうちの4検体はマイクロバイオオートグラフィーで CTC あるいは OTC と同定されたが,残りの17検体は同定できなかった.

4. 本キットは、試験溶液の調製を簡易系統別検査法で行えば、TS は分画液 B に抽出されないので、畜水産食品中の残留TC系抗生物質の同定法として使用可能である.

文 献

- 1) 農林水産省畜産局:家畜衛生統計 90-97, 1992.
- 2) 神保勝彦, 片岡 潤, 門間千枝 他:食衛誌, **35**, 210-214, 1994.
- 3) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: "畜水産食品 の残留有害物質モニタリング検査の実施について" 平成3年10月11日,衛乳第94号,1991.
- 4) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: "輸入畜水産 食品の残留有害物質モニタリング検査の実施につ いて"平成3年10月11日, 衛乳第95号, 1991.
- 5) Foster, A. L., Park, B. K. and Coleman, J. W.: *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **84**, 271-276, 1987.
- 6) Dixin-Holland, D. E. and Katz, S. E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 1137-1140, 1988.
- 7) Nouws, J. F. M., Reek, F., Aerts, M. M. L. et al.: Archiv fur Lebensmittelhygiene, 38, 9-11, 1987.
- 8) Van De Water, C. and Haagsma, N.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 534-540, 1990.
- 9) 三橋 進ら:*CHEMOTHERAPY*, **29**, 76-79, 1981.
- 10) 神保勝彦, 門間千枝, 丸山 務 他:食衛誌, **32**, 86-92, 1991.
- 11) Lang, B., E, Martlbauer and G, Terplan. : Archiv fur Lebensmittelhygiene, 43, 77-79, 1992.
- 12) Cullor, J. S.: Vet. Med., 87 (12), 1235-1241, 1992.

食品中の銅クロロフィル分析法

天 川 映 子*, 荻 原 勉*, 大 西 和 夫**, 二 島 太一郎*

Determination of Copper Chlorophyll in Foods

EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*, KAZUO OHNISHI**
and TAICHIRO NISHIMA*

An analytical method for the determination of copper chlorophyll in foods was studied by using HPLC.

A sample was homogenized after the addition of extractant; acetone for a sample poor in fat content, 80% acetone aq. solution/hexane (3:1) for a sample rich in fat, and 80% acetone aq. solution/ethyl acetate (3:1) for chewing gum.

The extract was concentrated by evaporation under reduced pressure at 45° C. The residue dissolved in acetone was subjected to analysis by HPLC. The absorption spectra was measured by using the wave length scan mode of the detector (300-700nm). Samples rich in fat were cleaned up with a SEP-PAK silica column to remove fat before HPLC analysis; 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 acetone. The condition of HPLC analysis were as follows: Column, Unisil QC 18; mobile phase, acetone/acetonitrile (2:1); detection, 654nm; flow rate, 1.0ml/min.

Recoveries of copper chlorophyll a and the extract of copper chloropyll preparation added to commercial foods were 88.9-98.3%, and 90.5-102.1%, and the minimum detection limits were $5.0\,\mu\text{g/g}$ and $20\,\mu\text{g/g}$, respectively. Copper chlorophyll a was detected in processed edible wild plants, at the level of $10.2-56.4\,\mu\text{g/g}$ and extract of copper chloropyll preparation was detected in chewing gums at the level of $92.2-231.3\,\mu\text{g/g}$.

This method is considered to be useful for the analysis of copper chloropyll in foods.

Keywords:銅クロロフィル copper chlorophyll, 銅クロロフィルa copper chlorophyll a, 銅 copper, 食品 food, 液体クロマトグラフィー liquid chromatography

まえがき

銅クロロフィル(CL と略す)は、クロロフィルを原料に合成された緑色の油溶性着色料で、食品添加物として野菜類の貯蔵品、チューインガムなど限られた食品への使用が認められていたが、平成5年4月に食品衛生法が改正され、新たにチョコレート、生菓子、魚肉ねり製品など多種類の食品にも使用出来るようになっ

た. また、EC をはじめとする諸外国において、菓子類などに使用されている $^{1)}$ ことからも、今後はCL を使った様々な食品が市場に出回ることが予想される.

現在、わが国においては、CLの使用量が食品中の銅含有量により規制されているため、CLの分析は銅含有量のみの測定により行われている²⁻⁵⁾. したがって、これらの方法ではCL そのものが測定されず、正確なCL

^{*}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 Blanch 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

の定量値が得られない.

著者らは、数年来、食品に用いられる着色料について天然系の添加物を中心に、分析法を開発すると共に市場での使用実態調査を行って来た⁶⁻⁹⁾. 前報⁶⁾では、銅クロロフィリンナトリウム(CN と略す)に関して広範囲の食品を対象に、HPLC を用いた精度の高い分析法を検討し報告したが、今回は CL について同様の検討を行い、種々の食品に適用したところ、良好な結果が得られたので報告する.

実験方法

1. 試 料

平成2年1月から平成6年5月の間に、都内の小売店より購入したもので、CLの使用が予測されるチューインガム3試料、チョコレート4試料、魚肉ねり製品2試料、魚介乾製品2試料、山菜加工品4試料、海草加工品51試料の計66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(株)製880-PUを用いた. 検出器は同社製紫外可視分光検出器870-UVを,吸収スペクトルの測定には同機器の波長スキャンモード(300-700nm)を使用した.

また,冷却遠心機は佐久間製作所(株)製M160-IVを,ホモジナイザーは日本精機製作所(株)製DX-3を使用した.

3. 試薬

- 1) 銅クロロフィル $a(CLa \ と略す)$ 及び銅クロロフィル $b(CLb \ と略す): 和光純薬工業(株) 製スピルリナ製クロロフィル <math>a$ 及びクロレラ製クロロフィル b を原料に、Inoue 6^{10} の方法に従い、それぞれ合成したものを冷凍保存して用いた。
- 2) CL 製剤抽出物(EP と略す): 日本葉緑素(株)製食品添加物用銅クロロフィル製剤から緑色色素を抽出し、これを冷凍保存して用いた. すなわち、製剤を酢酸エチルに溶解後、色素溶液を分液ロートに移した. 次いで有機層を同量の水で3回水洗した後、有機層を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水した. 色素溶液の有機溶媒を減圧下で留去(45℃以下)して得た残留物を少量のクロロホルムに溶解後、ヘキサン50mlを加えシリカゲルカラム(メルク社製カラムクロマトグラフィー用シリカゲル60、70-230メッシュを内径2cmのガラス製カラム管に高さが8cmになるように、ヘキサンを用いて湿式充填したもの)に注入し色素を吸着させた. ヘキサン80mlでカラムを洗った後、アセトン20mlにより色素を溶出した. 色素溶液を減圧乾固して得た残留物を約16時間、真空デシケーターで乾燥したものをEPとした.

- 3) 前処理用カートリッジカラム: ウオーターズ社製 セップパックシリカ
- 4) CL 抽出溶媒: 下記3種のうちから試料により選択した。
 - (1) アセトン 山菜加工品など油脂量の少ない試料 に用いた.
 - (2) 20%含水アセトン/ヘキサン(3:1) チョコレート, 魚肉ねり製品など油脂分が多い試料に用いた.
 - (3) 20%含水アセトン/酢酸エチル(3:1) チューインガムに使用した.

他の試薬はいずれも市販の特級品,水は精製水を用いた.

4. 試験溶液の調製

よく細切した試料 2-5 gをホモジナイザーのカップに秤取した。これに CL 抽出溶媒20mlを加え、ホモジナイザー (10,000 回転/分,3分間)で色素を抽出した。次いで、カップの内容物を遠沈管に移し、遠心分離した(3,000 回転/分,10分間,5℃)。有機層をナシ型フラスコに分取した後、水層及び残さを再びカップに移し、抽出溶媒10mlを加え、同様の操作を繰り返し得られた有機層を先のものと合し、色素抽出液を得た。塩蔵わかめ、昆布など水分含有量の低い試料の場合は秤取後、少量の水を加え数分間、放置し含水させてからアセトンで抽出した。

次に,色素抽出液の溶媒を減圧下で留去し(45℃以下).色素抽出物を得た.

山菜加工品など油脂分の少ない試料は、色素抽出物をアセトンに溶解し5 mlにしたものをメンブランフィルター $(0.45\,\mu\text{m})$ によりろ過し、ろ液をHPLC 用試験溶液とした.

チューインガムは、色素抽出物に酢酸エチル及び水をそれぞれ5 ml加え、超音波発生器に約5 秒間かけた後、放置して上層を分取した。下層には酢酸エチル3 mlを加え同様の操作を行い上層をとり、先のものに合して酢酸エチルで10mlにし HPLC 用試験溶液を得た。

チョコレートなど油脂分の多い試料の色素抽出物については、前処理用カートリッジカラムを用いて油脂を除いた. すなわち、色素抽出物を少量のヘキサンに溶解後、無水硫酸ナトリウムを少量加え、1時間暗所に放置し脱水した. 色素溶液をガラス綿でろ過し、ろ液を予めヘキサン10mlで洗浄したカラムに注入し、色素を吸着させた. 次に、ヘキサン10mlでカラムを洗浄し、アセトン3mlで色素を溶出した後、アセトンで5mlとし HPLC 用試験溶液を得た.

5. HPLC による分析

下記の条件で HPLC を行った.

- 1) カラム: GLサイエンス(株)製 Unisil QC18, 5 µm, 250mm x 4.6mm I.D.
- 2) 移動相: アセトン/アセトニトリル(2:1)10)
- 3) 流速:1.0ml/min
- 4) 検出波長: 654nm
- 5) 注入量: 20 µ1

CLa 及び CLb はクロマトグラムのピークについて, EP の場合は4本の主ピークについて, それぞれの保持時間と検出器の波長スキャンモードで測定した吸収スペクトル(300-700nm)により確認するとともに, 4本の主ピークの面積の合計値を用いピーク面積法で定量した.

結果と考察

1. 抽出溶媒

CL は油溶性色素であり食品からの抽出には、酢酸エチルが繁用されている²⁾. 一方、植物のクロロフィルの抽出溶媒としてはアセトン、叉は含水アセトンが使用されている¹⁴⁻¹⁶⁾. そこで、CLa が検出された水煮のわらびを用い**実験方法**の4. 試験溶液の調製の項に従い、抽出溶媒として酢酸エチル及びアセトンを用いた際の各々のCL 抽出量を、測定して比較検討した.

その結果、酢酸エチルに比べて、アセトンでは約5倍のCLaが抽出され、アセトンが抽出溶媒としてより優れていることがわかった。そこで、本法ではCLの抽出溶媒にアセトンを用いることにした。

なお、CLb は酢酸エチル及びアセトン、いずれを用いた場合もほとんど検出されなかった。また、新鮮なほうれん草をアセトンで抽出したところ、クロロフィル a と b をほぼ3:1の割合で得た。このことから、もし水煮わらび中に CLb が含まれていたならば、CLa と同様にアセトンで抽出することが出来ると推測される。従って、水煮わらびには CLb がほとんど含有されていなかったものと考える。

次に、塩蔵わかめのような水分含有量の少ないもの にアセトンをそのまま用いてもクロロフィル a の抽出 率が低かったので、試料を秤取後、含水させてから抽 出したところ、良好な結果を得られた. これは水分の 少ない状態でアセトンを用いると、アセトンにより組織が脱水されて収縮するため、組織からの色素の抽出率が低下したものと考える.このことから、水分の少ない試料では含水させた後に色素を抽出することにした.

また、チョコレートなど油脂分の多い試料ではアセトンで抽出すると、色素がアセトンに不溶の油脂部分にとけこみ、抽出率が低下した。そこで油脂を溶解するためにヘキサンを加えた20%含水アセトンで抽出したところ、抽出率を上げることができた。

チューインガムにおいても含水アセトンのみでは抽 出が不十分であったので、ガム質に親和性のある酢酸 エチルを添加して用いたところ、良好な結果が得られ た.

以上の結果から、試料によりそれぞれ最適な抽出溶 媒を選択して使用することにした.

2. HPLC

クロロフィル関連化合物の標準品の HPLC クロマトグラムと CLa 及び CLb について、検出器の波長スキャンモードで測定した吸収スペクトルを Fig. 1 に示した.

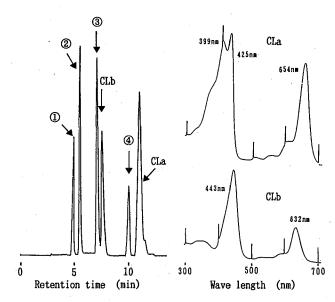


Fig. 1 HPLC Chromatogram of Standard Mixture and Absorption Spectra of Copper Chlorophyll by Using Wave Length Scan Mode

HPLC condition Column: Unisil QC18, 5 μ m, 250mmx4.6mm I.D.; mobile phase: acetone/acetonitrile (2:1); detection: 654nm; flow rate: 1.0ml/min; sample volume: 20 μ 1

- ①: chlorophyll b
- 2: chlorophyll a
- ③: pheophytin b
- 4: pheophytin a

CLb: copper chlorophyll b CLa: copper chlorophyll a

CLa 及び CLb は共存の可能性があるクロロフィル a, b 及びフェオフィチン a, b と分離出来た.

CLa の吸収スペクトルは399nm, 425nm, 654nmに, CLb は443nm及び632nmにそれぞれ極大吸収波長 (λ -max)を示した 10 . いずれの場合も短波長側の吸光度が長波長のものに比べて大きいため,検出波長に425nmを用いることで高感度に測定出来たとの報告がある 10 . しかし,この波長領域では黄色一赤色系の天然あるいは合成添加物由来の共存色素の影響をうけやすい.

例えば海草類には、クロロフィル以外にも多くの色素が存在し光合成で重要な役割を演じている。主なものに緑藻類の青のりでは黄色のルテイン、 β -カロチンなどのカロチノイド系色素が、褐藻類のわかめや昆布では、 β -カロチンや褐藻類特有の褐色のフコキサンチンがある13.17-18)。また、焼きのりの原料である紅藻類のあさくさのりには、ルテイン、 β -カロチンや紅色のフィコエリトリン、青色のフィコシアニンなどのフィコビリン類がある。そのため HPLC での検出波長を短波長側にすると海草や山菜の加工品の場合、これらのうちのカロチノイド系やクロロフィル系色素等の影響を受けて複雑なクロマトグラムになる。そこで、これらの共存物質の影響を避け、より選択的に CLa 及び CLb を測定するため、本法では CLa の長波長側の λ max、654nmを検出波長に用いることにした。

CLa の検量線は $5-20\,\mu\rm g/ml$,検出限界は $5\,\mu\rm g/ml$ であった。本法に従い,試料 $5\,\rm g$ から HPLC 用試験溶液 $5\,\rm ml$ を調製した時の定量限界は,試料 $1\,\rm g$ 当たり $5\,\mu\rm g$ であった。

3. 添加回収率

CL が使用される可能性のある市販食品に CLa を試料 1 g当たり 80 μ gとなるように添加し、本法に従って求めた回収率を Table 1 に示した.

回収率88.9-98.3%と満足のゆく結果が得られた.

4. 市販食品への適用

CLの使用が予想される緑色一暗緑色の市販食品計66 試料について本法により分析した結果を Table 2 に示 した.

チューインガム3試料及び山菜加工品4試料には,いずれもCLあるいは銅葉緑素を添加した旨の記載があった.前記のような表示はないが,クロロフィルの退色防止剤として,CLが使われる可能性のある海草加工品51試料,チョコレート4試料,魚肉ねり製品2試料及び魚介乾製品のこうなご2試料についても調査を行った.また,現行の食品衛生法ではCL使用量が,総銅含有量により規制されているため,使用表示があるものについては常法¹⁹⁾により試料を乾式灰化後,原子吸光光度法で銅を測定した.なお,タール色素についても毛糸染色法により分析した²⁰⁾.

1) チューインガム

チューインガム 3 試料から CL は確認されなかった. 3 試料とも、HPLC クロマトグラムは類似したピークパターンであり、これらのうちの 1 試料から得たクロマトグラムを Fig. 2 に示した. このクロマトグラムの4本の主ピークの保持時間は、食品添加物用 CL 製剤の抽出物 EP の主ピークと一致した. また、これら 4 本のチューインガム抽出物の主ピークについて吸収スペクトル(300-700nm)を検出器の波長スキャンモードで測定したところ、いずれもEPの主ピークのものと一致した. これらのことからチューインガムには CL 製剤が使用されていることが確認できた. また、EP の主成分がCLa 及び CLb とは異なる物質であり、CLa の保持時間にわずかにピークが認められたことから、製剤中の CL 含有量は極めて少ないことも併せて確認できた.

そこで、チューインガムを含めた広範囲の食品に添

Table 1. Recovery of Copper Chlorophyll a and Extract of Copper Chlorophyll Preparation

		Coppe	er chlorop	ohyll a		Extrac	t of Copp	er Chloro	phyll Prepa	ration	
Sample	Blank (μg/g)	Added (μg/g)	Found (μ g/g)	Recovery (%)	SD*	Blank (µg/g)	Added (μg/g)	Found (μg/g)	Recovery (%)	SD*	_
Chewing gum	0.0	80.0	76.5	95.7	1.05	0.0	400	408	102	1.84	_
Chocolate	0.0	80.0	78.6	98.3	1.10	0.0	400	396	99.0	1.60	
Cheese cake	0.0	80.0	75.9	94.9	1.20	0.0	400	378	94.5	2.02	
Boiled bracken	14.7	80.0	92.2	96.9	0.46	0.0	400	400	100	0.65	
Dried kondu	0.0	80.0	73.4	91.8	0.85	0.0	400	398	99.5	1.50	
Fish sausage	0.0	80.0	71.1	88.9	1.30	0.0	400	362	90.5	1.05	
Canned agar-agar "mitsumame"	0.0	80.0	77.3	96.6	2.00	0.0	400	404	101	1.30	

[★]Standard deviation (n=3)

Table 2. Analytical Result on Commercial Foods

Extract of col

Sample		Copper chlorophyll a	Extract of copper chlorophyll preparation	Total amount of copper
	n	$\mu g/g$	(μ g/g)	(μ g/g)
Chewing gum	. 3	ND	231.3,174.3,92.2	3.4,2.9,2.8
Processed edible wild plants				
Boiled ostrich ferm	1	56.4	ND	278.8
Soy-sauce zuke bracken	1	24.9	ND	32.4
Boiled bracken	1	10.2	ND	93.1
Boiled mixed wild plants	1	15.6	ND	18.1
Chocolate	2	ND	ND	
Fried satsuma-age	1	ND	ND	
Boiled yaki-chikuwa	1	ND	ND	
Dried sandeel	2	ND	ND	
Processed seaweeds				
Blanched and salted wakame	24	ND	ND	
Toasted purple laver	14	ND	ND	
Dried green laver	3	ND	ND	
Dried konbu	3	ND	ND ·	·
Soy-sauce zuke wakame	5	ND	ND	
Tsukudani Hitoegusa	. 2	ND	ND	***

Simultaniously used Food Yellow No.4 and Food Blue No.1 were detected in all of chocolates, soy-sauce zuke wakames and tsukudani hitoegusas. Food Blue No.1 was detected in all dried sandeels. Copper cholorophyll b was not ditected in all samples.

Fig.2 HPLC Chromatogram of Extacts of Chewing Gum and Copper Chlorophyll Preparation HPLC condition See foot-note of Fig. 1. 1-4: main peaks of extract of copper chlorophyll preparation

Retention time

(min)

CLb: copper chlorophyll b CLa: copper chlorophyll a

Copper chlorophyll a ND < 5 μ g/g Extract of copper chlorophyll preparation ND < 20 μ g/g

加物として、CL製剤が使用される可能性があると考え、本法が食品に使われたCL製剤の分析に適用出来るか否かについて検討するため、EPを用いてCLaの場合と同様の食品を対象に添加回収実験を行った。

EP を試料 1 g当たり 400μ g添加し回収率を求めたところ,Table 1 に示したように90.5-102%と良好な結果が得られた.試料抽出物から得られた HPLC クロマトグラムの4本の主ピークのパターンは,用いたEP標準品といずれも一致したため,分析操作中で成分の分解が起きなかったものと考える.また,検量線の範囲は $50-200 \mu$ g/ml,検出限界は 20μ g/mlであり,定量限界は試料 1 g当たり 20μ gであった.以上の結果から,本法が多種類の食品中の EP の測定に有効に使用出来ることがわかった.

そこで、EP を標準品として用い、チューインガムにおける含有量を測定したところ、 $92.2-231.3\,\mu g/g$ であった。次に食品衛生法では、CL の使用基準が食品中の総銅含有量により規制されているため、チューインガム中のEP に由来する銅の量を知る必要があると考え、まず、標準品として用いたEP の銅含量を測定したところ0.60%であった。この値を用いてチューインガムで検出されたEP 量を銅量に換算した結果、0.6-1.4

 μ_g/g であり、チューインガムの総銅含有量2.8-3.4 μ_g/g の21-41%に相当した。

これらの結果から、今回分析したチューインガムはいずれも銅量として0.05g/Kg以下であったことから食品衛生法に適合しているものと考える.

2) 山菜加工品

山菜加工品4試料すべてから $10.2-56.4 \mu g/g \sigma CLa$ が検出され、また、総銅含有量は $18.1-278.8 \mu g/g$ であった。これらのうち、最高値 $278.8 \mu g/g$ を示したものはこごみの水煮であり、山菜加工品における CL の使用量の基準0.10g/Kgを大きく上回っていた。なお、いずれからも CLb 及び EP は検出されなかった。

次に、CLa 中の銅量が理論値で6.8%であることを用いて、山菜加工品の CLa 量を銅量に換算したところ、 $0.7-3.8\,\mu\mathrm{g}/\mathrm{g}$ であり、総銅含有量の0.8-6.1%に相当した。前述のこごみの水煮では、 $56.4\,\mu\mathrm{g}/\mathrm{g}$ の CLa が検出されたが、これを銅量に換算すると $3.8\,\mu\mathrm{g}/\mathrm{g}$ であり CL の使用量の基準をはるかに下回っていた。これらのことは、山菜加工品中には CLa 以外の銅含有物が多く存在することを示している。例えば、Fig. 3 のわらびの水煮抽出物の HPLC クロマトグラムでは CLa だけでなく、他にも緑色の有機銅を含有する成分と見られるピークが認められ、これらの成分が総合して鮮やかな緑色を呈すものと推察される。今後は、これらの発色に関与している銅含有物質について、さらに詳細に検討する必要があると考える。

添加物表示で銅葉緑素と記載された場合, CL と CN

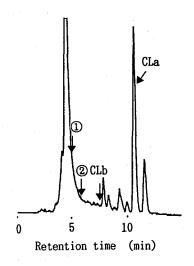


Fig.3 HPLC Chromatogram of Extract of Boiled

HPLC condition See foot-note of Fig. 1. ①: Chlorophyll b ②: Chlorophyll a

CLb: Copper chlorophyll b CLa: Copper chlorophyll a の両添加物が使われたことを意味する。山菜加工品にはこの使用表示があり、また、他の合成着色料は検出されなかったことから、実際には水溶性の緑色着色料である CN を使った可能性が大きい。しかし、CN は山菜加工品の製造工程中で分解されるため、最終製品から CN の使用を確認することは、非常に難しい⁶⁾。検出された CLa は CN 由来の銅か、あるいは製造時に用いた銅釜から溶出した銅イオンが、クロロフィルのマグネシウムと置換して、生成されたものと推定される。

3) チョコレート, 魚肉ねり製品及びこうなご

チョコレート, 魚肉ねり製品及びこうなごではいずれの場合も, CLa 及び EP は検出されなかったが, チョコレートで, 食用青色 1 号と食用黄色 4 号の併用がみられ, こうなごから食用青色 1 号が検出された.

4)海草加工品

海草加工品ではいずれの試料からも、CL 及び EP は 検出されなかった. しかし、醬油漬わかめ 5 試料との りの佃煮 2 試料から食用黄色 4 号と食用青色 1 号が検 出された.

緑色に着色された食品では、前記のような食用黄色 4号と食用青色 1号の併用がよく見られる.しかし、これらの色素はいずれも水溶性であるため、油脂分を 多く含む食品の場合、染着性に問題があると言われている²¹⁾. CL の使用基準の改正から日が浅いこともあり、CL は今回調査した魚肉ねり製品やチョコレートで検出されなかったが、比較的熱に安定な油溶性の緑色着色料として、今後、油脂含有量の多い食品に使用ざれる可能性がある.また、輸入食品を含めた多種の食品について、さらに、CL の使用状況を調査する必要があると考える.

以上述べたように、本法によって食品中のCLa及びEPの含有量を、精度よく測定することが可能であった.しかし、食品のCLa及びEP含有量を銅量に換算した値と食品から直接求めた総銅含有量とは食品によっては、山菜加工品に見られたように大きく異なる場合もあった.従って、現状ではCNの場合と同様に食品の総銅含有量を測定し、同時に本法による定性、定量の結果を考え合わせて食品衛生上問題があるか否かを総合的に判定する必要がある.

まとめ

食品を対象に HPLC を用いた銅クロロフィル a (CLa) 及び CL 製剤抽出物 (EP) の定性及び定量法を検討し,以下の知見が得られた.

1. 食品より CLa を抽出する際の溶媒について検討した結果、アセトン、20%含水アセトン/ヘキサン(3:

- 1),20%含水アセトン/酢酸エチル(3:1)の3種類の抽出溶媒を試料によって選択して用いることにより,効率良く抽出できた.
- 2. HPLC の分析条件について検討した結果、検出波長 は共存物質の影響を避け、選択的に CLa を測定する ために CLa の長波長側の極大吸収波長である654nm とした。 CLa 及び EP の検量線の範囲はそれぞれ5ー $20\,\mu\mathrm{g/ml}$, $50-200\,\mu\mathrm{g/ml}$, 検出限界は $5\,\mu\mathrm{g/ml}$, $20\,\mu\mathrm{g/ml}$ であった(注入量 $20\,\mu\mathrm{l}$).
- 3. 食品における添加回収率は、CLa 及び EP で各々 88.9-98.3%、90.5-102.1% であった。また、定量 限界は試料 1 g当たりそれぞれ 5 μ g、20 μ gであった。
- 4. 本法により、市販食品66試料について使用実態を調べたところ、山菜加工品 4 試料から CLa を10.2-56.4 μ g/g、チューインガム 3 試料から、EP を92.2-231.3 μ g/gが検出された.

以上の結果から、本法は食品中の CLa 及び CL 製剤の分析法として十分使用できるものと考える.

謝辞 本研究をするに当たり CL 製剤を提供して頂いた日本葉緑素 (株) 及び試料の入手に御協力を頂いた府中保健所の佐藤忠治氏をはじめとする食品衛生監視員の皆様に感謝致します.

文 献

- 1) 食品化学新聞社編:食品添加物合成天然総覧'87, 241-262,1987,東京.
- 2) 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,174-176,1989,日本食品衛生協会,東京.
- 3) 牛山博文, 西島基弘, 安田和男, 他: 食衛誌, **27**, 416-420, 1980.
- 4)米山 嶢,中野文夫,植松恒男,他:食品衛生研究,

- **30**, 678-681, 1980.
- 5) 角田光淳, 井上典子, 立花光雄, 他: 食衛誌, **34**, 25-31, 1993.
- 6) 天川映子, 荻原 勉, 竹内正博, 他: 東京衛研年報, 44, 131-137, 1993.
- 7) 天川映子, 荻原 勉, 大西和夫, 他: 同上, **43**, 118-123, 1992.
- 8) 荻原 勉, 天川映子, 野沢竹志, 他:同上, **43**, 111-117, 1992.
- 9) 天川映子, 荻原 勉, 大西和夫, 他:同上, 41, 133-139, 1990.
- 10) Inoue, H., Furuya, K., Watanabe, K., et al.: Analyt. Sci., 4, 599-603, 1988.
- 11) 石館守三, 谷村顕雄監修: 食品添加物公定書解説書, D-649, 1987, 広川書店, 東京.
- 12) 谷村顕雄, 片山 修, 遠藤英美, 他編: 天然色素ハンドブック, 404-412, 1979, 光琳, 東京.
- 13) 同上: 同上, 508-520, 1979, 光琳, 東京.
- 14) 片瀬隆雄,和田英太郎: BUNSEKI KAGAKU, **39**, 451-456, 1990.
- 15) 芳竹良彰, 谷野道夫, 森重清利, 他 *ibid.*, **38**, 182 -187, 1989.
- 16) 渡辺 正,小林正美:油化学,**38**,10,132-140,1989.
- 17) 服部静夫,下郡山正己:生体色素,26-27,1971,朝倉書店,東京.
- 18) 同上: 同上, 158, 1971, 朝倉書店, 東京.
- 19) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解,567-568,1990, 金原出版,東京.
- 20) 同上: 同上, 351-366, 1990, 金原出版, 東京.
- 21) 佐藤健一: 月刊フードケミカル, 4, 43-46, 1993.

自動灰化装置-フレームレス原子吸光光度法と従来法 による有害性重金属測定法の比較

 嶋 田 照 江*, 上 村 尚*, 井 部 明 広*

 田 端 節 子*, 早 野 公 美*, 田 村 行 弘*

The Detection of Heavy Metals by Automatic Microwavedigester/Graphite Furnace Atomic Spectrometry Compared to Present Analytical Method

TERUE SHIMADA, HISASHI KAMIMURA, AKIHIRO IBE SETSUKO TABATA, KUMI HAYANO and YUKIHIRO TAMURA

Keywords: スズ tin, 鉛 lead, カドミウム cadmium, 重金属 heavy metal, 自動灰化装置 automatic microwavedigester, 原子吸光光度法 atomic absorption spectrometry, フレームレス原子吸光光度法 graphitefurnace atomic absorption spectrometry, ポーラログラフ法 polarography

はじめに

食品には、多くの成分とともに有害な金属も存在している。これら金属の混入経路は、自然界や環境汚染に由来する場合と、食品の製造過程や容器等を通じ混入する場合がある。

近年,保存性や運搬性などの利便性が認められ,缶詰食品類が数多く普及している.缶詰食品中に溶出した金属を摂取したことによる食中毒事件が過去に発生していることから,食品中の有害性重金属については、食品衛生上重大な関心が持たれている.食品衛生法では清涼飲料水に成分規格を設け、ヒ素、鉛及びカドミウムを検出するものであってはならない。また、スズの含有量は150.0ppmを超えるものであってはならないとしている.

さらに食品衛生法では、鉛及びカドミウムの試験法は原子吸光光度法またはポーラログラフ法で、スズはサリチリデンー2ーチオフェノール法またはポーラログラフ法を記載している。また、試験溶液の調整についても湿式分解法または乾式灰化法を併せて記載している¹⁾.しかし、これらの方法は、多量の酸の使用、抽出操作が複雑で多くの時間を要すること、ポーラログラフ法で使用する水銀などの揮散あるいは分析者への有毒ガスの暴露の危険等の問題を抱えている。

今回,自動湿式灰化装置及びフレームレス原子吸光 光度計を用いて清涼飲料水中の重金属を測定し,従来 法と比較検討したところ、十分活用できる結果が得られたので報告する.

実験方法

1. 試 料

市販の清涼飲料水のうち,50%の果汁飲料及びスポーツ飲料の2種を用いた.

2. 試 薬

金属標準品:スズ,鉛及びカドミウム(以下 Sn, Pb, Cd と略す)標準品は、関東化学社製の原子吸光分析用を用いた。

1%ジエチルジチオカルバミン酸溶液:ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(和光純薬製・原子吸光分析用)1.0gを精密に秤取し、再蒸留水に溶解して正確に100mlとした.

クエン酸緩衝液:クエン酸二アンモニウム(和光純薬製)25gを秤取し、蒸留水に溶解して100mlとした.

干渉抑制剤(Modifier):リン酸二水素アンモニウム, 硝酸マグネシウム,硝酸パラジウム(関東化学製・原子 吸光分析用)をそれぞれ50mgを精密に秤取し,再蒸留水 に溶解して正確に250mlとした.

その他の試薬:塩酸、硝酸、硫酸は、和光純薬製の有害金属測定用を用い、メチルイソブチルケトンは、和光純薬製の原子吸光分析用を用いた。その他の試薬は、和光純薬製の特級を使用した。

3. 器具及び装置

^{*}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, Shinjku ku, Tokyo, 169 Japan

- 1)フレームレス原子吸光光度計:パーキンエルマ社 製グラファイトファーネス原子吸光分析装置 4100ZL
- 2) フレームレス原子吸光光度計用ランプ:パーキンエルマ社製ランプ
- 3) 自動湿式灰化装置:アースト・ハンセン商会 MICRO-DIGEST
- 4) フレーム原子吸光光度計:バリアンインスツルメンツリミッテド製AA-975型
- 5) フレーム原子吸光光度計用ランプ:浜松ホトニクス製ホロカソードランプ
- 6) 矩形波ポーラログラフ: 柳本製作所製P8-D型
- 7) 使用のガラス器具はいずれも硝酸処理をした後, 再蒸留水で洗浄したものを用いた.

4. 試験溶液の調製

1) フレームレス原子吸光測定用

試料約1.0gを正確に秤り取り硝酸を加えた後,自動湿式灰化装置を使用し,高周波により食品を分解し,分解条件に従い透明な溶液を得て,Sn,Pb,Cd測定用の試験溶液とした.

2) フレーム原子吸光及びポーラログラフ測定用

試料約20.0gを正確に秤り取り、硫酸及び硝酸により常法に従い湿式分解後、飽和シュウ酸アンモニウムを加え残存する硝酸を分解し、1 N塩酸を用いて20mlに定容した^{1,2)}.このうち 5 mlを.Sn の試験溶液測定用として、電解フラスコに移し、ポーラログラフィーにより測定した。一方、フレームレス原子吸光分析用として1 N塩酸20mlで定容したものから10mlを秤り、ブロムチモールブル-を2滴加えアンモニア水で中和後、クエン酸緩衝液を加え1%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムでキレート化合物としたものをメチルイソブチルケトンで抽出し、PbとCd測定用の試験溶液とした.

5. 測定条件

1) フレームレス原子吸光光度計

装置の測定条件はアルゴンガス流量 3.1Kg/m^2 , スリット巾0.7 mm, バッグランド補正はゼーマン法により $0.5 \sim 1.0 \, \text{A}$ まで行った。注入量は試料 $20 \, \mu \text{I}$, Modifier の量は $5 \, \mu \, \text{I}$, 測定時間は $2 \, \nu$, 1回測定とした。各元素の測定条件は表 $1 \, \mu$ に示した。

2) フレーム原子吸光光度計

ランプの電流値は Pb で 5 mA, Cd で 3 mA, 測定波 長はそれぞれ283.3nm, 228.8nm, スリット巾はいずれ も0.5mmで行った. また, 燃焼ガスなどの条件はバリ アン社の標準条件に準じた.

3) ポーラログラフ

試験溶液 5 ml を電解びんに取り滴下水銀電極を挿入後,矩形波ポーラログラフを使用し,水銀プール対極で $0 \sim -1.2 \text{V}$ のポーラログラフグラムを作成した.ここで得られた還元波の還元電位から金属を判定した²⁾.

結果及び考察

1. 自動湿式灰化による分解と回収率に及ぼす影響

フレームレス原子吸光光度法で金属を測定する場合, 最適な試料を調製することにより再現性や測定精度の 良いデーターが得られる.フレームレス中の原子化条 件は金属によつて異なり目的金属を高感度で測定する には、食品成分すなわちマトリックスの影響を除去す るための前処理操作が重要である.

そこで、Sn、Pb 及び Cd の最適な試料調製方法を決定するために、サンプルを自動湿式灰化装置で湿式分解し、その分解程度に応じて調製した試料について、各々をフレームレス原子吸光により測定を行い比較検討した。まず、①サンプル1.0gを秤取し再蒸留水で20倍に希釈したものを試料液とした場合、次に、②サンプル1.0gに1%硝酸を加え、軽く加熱し、試料中の繊維成分等がある程度まで分解された状態を試料液とした場合、さらに、③サンプル1.0gを秤取し硝酸で熱分解させ、完全に分解したものを試料液とした場合について各々添加回収試験を行い、その結果を表2に示した。

		Sn			Pb			Cd	
	温度	昇温秒	 保持 秒	————————————————————————————————————	昇温 秒	保持 秒	温度	 昇温 秒	保持
乾燥	130	1	30	120	. 5	30	120	10	30
	150	40	40	150	10	40	150	5	40
灰化	1000	40	40	700	10	30	700	10	20
原子化	2200	0	4	1600	0	4	1500	0	5
クリーニング	2400	1	2	2400	1	2	2400	1	2
測定波長		286.3 nm			283.5 nm	 !	- 	228.8 nm	
ランプ電流		30 mA			30 mA			30 mA	

表1. 各金属のフレームレス原子吸光測定条件

表 2. 灰化状態とフレームレス原子吸光度法による 添加試験の関係

MW/JH HP V		120 111						N=5
		添加量	検出量	(ppm)	平均值	回収率	CV	SD
		(ppm)	最小值	最大值	(ppm)	%	%	
希釈のみの場合	Sn	40.0	18.9	20.1	19.5	49	2	0.46
	Pb	2.00	1.33	1.41	1.37	69	2	0.32
	Cd	1.00	0.51	0.63	0.60	60	8	0.05
途中まで灰化し	Sn	40.0	26.9	28.1	27.5	69	2	0.36
た場合	Pb	2.00	1.39	1.46	1.42	71	2	0.26
	Cd	1.00	0.68	0.76	0.74	71	5	0.03
完全に灰化した	Sn	40.0	32.1	34.5	33.2	83	3	0.49
場合	Pb	2.00	1.85	1.89	1.87	94	1	0.16
	Cd	1.00	0.85	0.88	0.87	87	1	0.01

Sn, Pb 及び Cd の測定を行った場合, いずれの金属も自動湿式灰化装置で完全に分解した試料の回収率が最も良かった. これは, 図1に示したようにサンプルを希釈したのみで測定した場合は, 目的とする金属ピークの近傍に妨害ピークが観察され, 定量できないことが判った. また, サンプルを途中まで灰化した場合には, バックグランド(波線)の影響を受け良好な測定結果を得ることができなかった. サンプルを完全に灰化した場合には, バックグランドの影響もなく,金属標準液と同様にシャープなピークが得られ, 高い回収率を得えることができた. これは, 自動湿式灰化装置により試料を完全に分解してしまうために有機物などによるマトリックスの影響がなくなりバックグランド値が低くなったためである.

2. フレームレス原子吸光分析における測定条件の検 討

1) 加熱温度による影響

フレームレス原子吸光法の測定には、乾燥温度、灰化温度、原子化温度等の条件により分析値が大きく変動することが知られている。そこで、これらの最適条件を知るために種々検討した。乾燥温度は、試料の突沸を防ぐために低い温度で穏やかに昇温させて、130℃で30~40秒保持して乾燥を十分に行う必要がある。次いで、灰化及び原子化の温度は、Snの場合には灰化温度を150~1000℃まで80秒間で上昇させ灰化した。温度を一挙に上げると試料が炉から吹きこぼれるために回収率の低下をきたすことから、穏やかに温度を上昇させ有機物などの灰化をおこなった。通常 Sn の原子化温度は1800~2000℃である。今回、原子化温度について1600~2300℃まで検討したところ、2200℃程度が良好であった。

Pb の場合, 灰化温度は150~700℃で十分灰化され, 原子化温度は1600℃が最良であった. Cdの場合もPbと

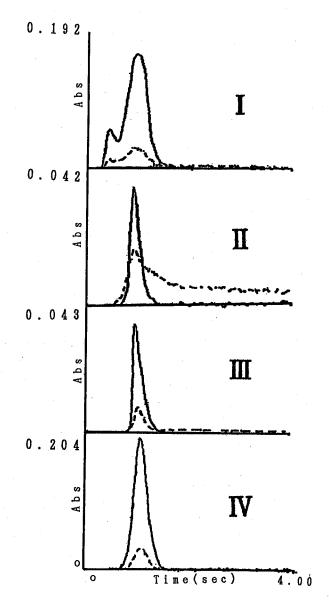


図1 フレームス原子吸光法で測定したピークパ ターン(鉛について)

I サンプルを希釈のみで行った場合
Ⅱ サンプルを途中まで灰化した場合
Ⅲ サンプルを完全に灰化した場合
Ⅳ 標準品

---- 原子吸収 ---- バックランド

同様150~700℃の灰化温度で、1500℃の原子化温度で 十分測定できることが分かった。

さらに分析終了後、炉のクリーニングが十分に行なわれないと、試料の一部が炉内に残存してしまい次の試料の測定に妨害となる。検討の結果、2400℃2秒間で十分であることが分かった。

2) 酸濃度の影響

フレームレス原子吸光分析を行う際,酸の濃度により回収率が影響されることが考えられるため各金属における酸の影響を検討し、その結果を表3に示した.

表3.酸の濃度による回収率への影響

							14- 0
	酸の濃度	0.5	%	1.0)%	10	%
		回収率	SD	回収率	SD	回収率	SD
金属	属濃度	%		%		%	
Sn	25ppb	70	1.67	95	1.68	79	1.73
	50ppb	69	1.90	93	1.95	83	3.16
	100ppb	72	2.28	92	1.41	80	2.45
Pb	10ppb	68	1.90	91	1.87	78	1.91
	30ppb	75	1.63	89	3.39	72	2.23
	40ppb	72	2.39	90	2.18	70	2.25
Cd	1.0ppb	80	3.28	95	1.50	82	3.35
	5.0ppb	82	1.78	. 90	2.55	85	1.15
	10ppb	85	1.18	91	1.20	87	1.22

(1) Sn

Sn を25ppb, 50ppb及び100ppb含むように0.5%, 1.0%及び10%の硝酸にて試料溶液を調製し,フレームレス原子吸光により測定を行った. 1%の硝酸濃度では,25ppb添加で95%,50ppb添加で93%,100ppbで92%と良好な回収率が得られたが,それに比べ0.5%及び10%では低い回収率であった. 硝酸濃度10%における回収率の低下は,過剰の硝酸ガス等の影響により十分に原子化されない為に起こると考えられる. また,カーボンチューブの劣化が早まり,それに伴い温度が十分に上がらなくなることも原因の一つであると思われる.

(2) Pb

Pbの含量が10ppb, 30ppb及び40ppbとなるように 0.5%, 1.0%及び10%の硝酸にて試料溶液を調製し, 測定を行った. その結果は, Sn と同様であり, 1%の酸濃度で最も高い回収率が得られた.

(3) Cd

Cd の含量が1.0ppb, 5.0ppb及び10ppbとなるように 0.5%, 1.0%及び10%の硝酸にて試料溶液を調製し, 測定した. 前両者の結果と同様に1.0%の酸濃度で最高の回収率が得られた. すなわち, 1.0ppbの Cd 濃度の回収率は95%, 5.0ppbでは90%, 10ppbでは91%であった. また, 10%の硝酸濃度でも80%以上の回収率が得られ, Sn 及び Pb の場合と異なり, Cd は酸の濃度にあまり影響されないことが分かった.

3) Modifier の種類と濃度

目的とする金属を最も良好に原子化させるために使用される Modifier は、金属に応じてリン酸二水素アンモニウム、リン酸一水素アンモニウム、クエン酸、硝酸マグネシウム、硝酸バナジウム等が使用されている。自動湿式灰化装置により分解した試料に Sn、Pb、Cdがそれぞれ50ppbとなるように加え、Modifier の干渉抑制作用の効果について検討行い、その結果を表4に示した。

表 4. Modifier の種類と濃度の回収率に及ぼす影響

					IN=0
Sn		F	°b	Cd	
250	500	250	500	250	500
86%	73%	78%	67%	87%	63%
73%	67%	69%	58%	72%	52%
90%	79%	89%	71%	92%	69%
	250 86% 73%	250 500 86% 73% 73% 67%	250 500 250 86% 73% 78% 73% 67% 69%	250 500 250 500 86% 73% 78% 67% 73% 67% 69% 58%	250 500 250 500 250 86% 73% 78% 67% 87% 73% 67% 69% 58% 72%

(1) Sn

酸性溶液中のSn は、 Sn^{4+} と Sn^{6+} という状態で平衡を保っている Sn^{3} . この形は他の微量金属や有機酸と結合しやすく、原子化させた時、一律に基底状態にすることができず、励起が不十分となり、原子化できるSn の割合が下がるため回収率や再現性が低下してしまう.

そこで、各 Modifier を単独に加えたものと、リン酸 二水素アンモニウムと硝酸マグネシウムを混合したものについて検討した。 Modifier の種類としては、リン酸二水素アンモニウムと硝酸マグネシウムとの組み合せが最もよく、次いでリン酸二水素アンモニウム単独であった。リン酸二水素アンモニウムに硝酸マグネシウムを加えたことにより原子化が増強されるとともにマトリックスの干渉抑制効果が高まったことが推察される^{4,5)}.

今回,250ppmのリン酸二水素アンモニウムを使用したが,500ppm以上の濃度では灰化の段階で残ってしまい,この残余のModifier自身が影響を及ぼし,回収率が低下することが分かった.

(2) Cd 及びPb

Cd 及び Pb の Modifier について検討したところ,Sn の場合と同様の結果が得られた.特に,Cd は Sn や Pb より感度が高く 1 ppb レベルでも測定が可能であった.

3. 従来法との比較検討

1)添加回収試験

従来法として、湿式灰化した試料をポーラログラフ 法及びフレーム原子吸光法で測定するとともに、自動 湿式灰化装置で分解した試料をフレームレス原子吸光 で測定し、それぞれを比較検討し、その結果を表 5 及 び表 6 に示した.

(1) Sn

Sn を 40ppm及び100ppm添加した試料の回収率は, 従来法ではそれぞれ92%及び93%, フレームレス原子吸 光法では93%及び87%であった. また, CV値は, 従来 法では1.1%及び2.7%, フレームレス原子吸光法は 1.3%及び1.5%と満足できる結果であった.

表5. フレーム原子吸光度及びポーラログラフ法 による添加回収試験結果

		- •••			•		D=0
	添加量	———— 検出量	(ppm)	平均値	回収率	CV	SD
	(ppm)	最小值	最大値	(ppm)	%	· % _	
Sn	100	92	94	93	93	1.1	1.00
	40	36	38	37	92	2.7	1.00
Pb	2.0	1.87	1.89	1.88	94	0.4	0.01
	0.4	0.37	0.38	0.38	94	1.5	0.01
Cd	1.0	0.78	0.87	0.84	84	5.1	0.04
	0.5	0.45	0.48	0.47	93	3.0	0.01

表 6. フレームレス原子吸光度法による 添加回収試験結果

			N=5				
	添加量	検出量	(ppm)	平均值	回収率	CV	SD
	(ppm)	最小值	最大値	(ppm)	%	%	
Sn	100	85.5	88.6	86.9	87	1.3	1.12
	40	36.0	39.0	37.0	93	1.5	1.17
Pb	2.0	1.54	1.96	1.74	87	8.4	1.47
	0.4	0.30	0.35	0.32	81,	5.9	0.02
Cd	1.0	0.64	0.78	0.73	73	7.4	0.05
	0.5	0.43	0.46	0.43	84	4.9	0.02

(2) Pb

Pb を0.4ppm及び2.0ppm添加した試料の回収率は, 従来法ではそれぞれ94%及び94%, フレームレス原子吸 光法では81%及び87%, CV 値は, フレームレス原子吸 光法は5.9%及び8.4%であり従来法に比べ若干高い値を 示した.

(3) Cd

Cd を0.5ppm及び1.0ppm添加した試料の回収率は, 従来法ではそれぞれ93%及び84%が得られ,一方,フレームレス原子吸光法では,それぞれ84%及び73%であった.フレーム原子吸光法に比べるとフレームレス原子吸光法では若干回収率が低下することが分かった.しかし,フレームレス原子吸光の CV 値は,4.9%及び7.4%であり,従来法との間に大きな差は認められなかった.

2) 市販品への応用

清涼飲料水及び缶詰食品について本法を適用するとともに、従来法との比較を行った結果を表7及び表8に示した。従来法では、缶詰食品からSnが128ppm検出されたが、Pb及びCdは検出されなかった。また、清涼飲料水からはいずれの金属も検出されなかった。一方、フレームレス原子吸光法を用いた本法では、従来法と同様に缶詰食品からSnが128ppm検出された他、缶詰食品及び清涼飲料水いずれからもSn、Pb、Cdの金属が微量検出された。検出量はいずれも低くppbレベルであり、従来法では検出不可能であった濃度である。

表7. フレーム原子吸光度及びポーラログラフ法による市販品への応用 N=5

						14-0
試料名	金属	検出量	(ppm)	平均値	CV	SD
		最小値	最大値	(ppm)	%	
清涼飲料水	- Sn	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
	Pb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
	Cd	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
缶詰	Sn	126	129	128	1.0	1.29
	Pb	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
	Cd	0.0	0.0	.0.0	0.0	0.00

表8. フレームレス原子吸光度による市販品への 応用

- 71	J					N=5
試料名	金属	検出量(ppb)		平均値	CV	SD . 1
		最小値	最大値	(ppb)	%	
清涼飲料水	Sn	2.2	5.8	4.7	3.6	1.71
	Pb	4.2	5.1	4.8	6.2	0.30
	Cd	1.1	1.4	1.3	9.4	0.12
缶詰	Sn	123000	136000	128000	4.1	5.24
	Pb	5.1	7.3	6.7	12.0	0.81
	Cd	1.2	1.3	1.2	8.3	0.10

今回,果実入りシロップづけ缶詰の Sn についてのみ本法と従来法とで数値が得られ比較することが出来た.フレームレス原子吸光法の数値はポーラログラフ法とよく一致していることから,新たなる試験方法として,清涼飲料水中の金属分析に十分適用できることが分かった.

まとめ

自動湿式灰化装置による分解とフレームレス原子吸 光法を用いて、清涼飲料水中のSn、Pb、Cdの定量法 について検討した.

本法では、湿式灰化時に生成される有毒ガスのヒトへの暴露を完全に防ぐことができ、また、湿式灰化により有機物を分解して測定するため、食品からのマトッリクス等の影響が除去でき、試料毎に測定条件を検討する必要がなくなり簡易に測定できることが分かった.

3種類の金属について従来法と比較したところ,本法は再現性(標準偏差0.02~1.47, CV1.3~8.4%)も良く,また感度も従来法のppmからppbのオーダーで測定できるなど非常に良いことが判明した.

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局監修:食品衛生小六法, 1993, 新日本法規出版, 東京.
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法注解,1980,金原出版,東京.
- 3) 不破敬一郎, 下村 滋, 戸田昭三:最新原子吸光

分析Ⅲ, 1988, 廣川書店.

- 4)保田和雄,長谷川敬彦:原子吸光分析,1972講談社.
- 5) 安田明美, 小泉英夫, 鈴木忠直, 堤 忠一:分析 化学, 35, T115, 1968.

野菜・果実類中の残留農薬実態調査 (平成5年度)

小 林 麻 紀*, 永 山 敏 廣*, 塩 田 寛 子* 伊 藤 正 子*, 森 野 雅 代**, 田 村 行 弘*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
- Apr. 1993 ~ Mar. 1994 -

MAKI KOBAYASHI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*
HIROKO SHIODA*, MASAKO ITO*
MASAYO MORINO** and YUKIHIRO TAMURA*

Pesticide residues in 30 kinds of crops and 21 kinds of organically cultivated crops were investigated. We detected residues of four kinds of organophosphorus insecticides, one kind of organochlorine fungicide, two kinds of organochlorine insectcides and two kinds of carbamate insecticides in several kinds of crops. Concentrations of organophosphorus insecticides (DDVP, diazinon, malathion, and pirimiphos-methyl), organochlorine fungicide (procymidone), organochlorine insecticides (benzoepin and chlorobenzilate), and carbamate insecticides (methomyl and thiodicarb) were trace — 0.26ppm, trace — 0.16ppm, trace—0.10ppm, and 0.10—9.0ppm, respectively.

The level of thiodicarb in chrysanthemum (relish) was higher than the maximum limits in standards for withholding registration.

Residues of organochlorine fungicides (chlorothalonil (TPN), procymidone and captan) and organochlorine herbicide (chlornitrofen (CNP)) were detected. Their concentrations were trace — 0.38ppm, and trace, respectively. Organophosphorus insecticides and Carbamate insecticides were not detected.

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¹⁻¹³⁾. 今回は、平成5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農作物が市販されている。しかし,これら野菜・果実類の農薬使用の有無はほとんど明らかにされていない¹⁰⁻¹³⁾。また,1993年4月に農林水産省により

「有機農産物に係わる青果物等特別表示ガイドライン」が設定された.これらの表示は商品の付加価値を高めるために使用されることも多いことから、農薬残留の実態を把握する必要がある.そこで、無・減農薬栽培表示作物について、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・果実類を中心として残留農薬を調査したので、併せて報告する

^{*}東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

^{**}東京都南部薬事衛生事務所 150 東京都渋谷区広尾 5 - 7 - 1

^{**}The Tokyo Metropolitan (Nanbu) Pharmaceutical Sanitation Office 7-1, Hiroo 5 chome, Shibuya-ku, Tokyo, 150 Japan

実験の部

1. 試 料

(1)一般流通(慣行栽培)野菜・果実類

1993年4月から1994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10種30作物について調 査した.

(2)無・減農薬栽培野菜・果実類

1993年4月から1994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12種21作物について調査した.

2. 調查農薬名

(1)有機リン系農薬:EPN, クロルピリホス, クロルフェンビンホス(CVP-E, -Z), ジクロルボス(DDVP), ジメトエート, ダイアジノン, パラチオン, フェニトロチオン(MEP), フェンチオン(MPP), フェントエート(PAP), ホサロン, マラチオン, トリクロルホン(DEP), サリチオン, エチルチオメトン(ジスルホトン), ジクロフェンチオン(ECP), シアノホス(CYAP), クロルピリホスメチル, ホルモチオン, プロチオホス, メチダチオン(DMTP), テトラクロルビンホス(CVMP), プロパホス, EPBP, エチオン, イソキサチオン, チオメトン, シアノフェンホス(CYP), ホスメット(PMP), ピリダフェンチオン, ピリミホスメチル, ジアリホール, エディフェンホス(EDDP), IBP 計35種

(2)有機塩素系農薬:総BHC (α -, β -, γ -, δ -BHC の総和), 総DDT (pp'-DDT, pp'-DDE, pp'-DDDの総和), op'-DDT, ディルドリン, エンドリン, アルドリン, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキサイド, ジコホール(ケルセン), ベンゾエピン(α -, β -ベンゾエピン), 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, クロルニトルフェン(CNP)

(3)カーバメイト系農薬:アルジカルブ,エチオフェンカルブ,オキサミル,カルバリル(NAC),クロルプロファム(CIPC),ジエトフェンカルブ,チオジカルブ,ピリミカーブ,フェノブカルブ(BPMC),ベンダイオカルブ,メソミル 計11種

(4)その他の農薬:キノメチオネート,クロフェンテジン,ジクロフルアニド,ビテルタノール,フルシトリネート 計5種

総計76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:(株)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10種30作物中3種6作物(検出率:20%,以下同様)からDDVP,ダイアジノン,マラチオン,及びピリミホスメチルを痕跡~0.26ppmの範囲で検出した(Table 1).

残留基準のある農薬は、DDVPが2種3作物(10%) (検出作物名:キュウリ及び食用菊)から、また、マラチオンが食用菊1作物(3%)から検出された。いずれも基準値以内であった。しかし、キュウリから検出された DDVPは、基準値0.1ppmと同値であり、また、食用菊では基準値の2/5から9/10と比較的基準値に近い値であった。DDVPは1日摂取許容量(ADI)が0.004mg/Kgであり、揮発性が高い性質のため、調理加工時の加熱により消失することが考えられる。また、水洗いにより除去されやすい¹⁴⁾農薬であるため、喫食時における残存量は非常に少ないと考えられる。

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では、ピリミホスメチルがトマト1作物(3%)から検出されたが基準値以内であった.

基準値の設定されていない農薬では、ダイアジノンが食用菊1作物(3%)から検出された。食用菊(その他のきく科野菜)としての基準は設定されていないが、ほかの野菜の基準値及び登録保留基準値は0.1ppmであり、今回の検出値はその1/10であった。

(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, 有機塩素系殺虫剤17種及び カーバメイト系殺虫剤11種の調査結果を Table 2 に示 した

有機塩素系農薬は殺菌剤であるプロシミドンがキュウリ及びピーマンの2種3作物(10%)から、また、殺虫

Sample	NO.of sample	NO.of positive	DDVP (ppm)	Diazinon (ppm)	Others ¹⁾ (ppm)
Vegetable					
Japanese Radish[DAIKON]					
(root)	1	0	_2)		· _ =
(top)	1	0	_		_
Letucce [RETASU]	4	0	- ·		· <u> </u>
Carrot [NINJIN]	4	0	- .	<u>:</u>	_
Cucumber [KYŪRI]	6	1	0.10	_	_
Eggplant [NASU]	1	0	- .	<u> </u>	
MiniTomato	3	0	_	_	_
Pimiento [PĪMAN]	5	0	_		- .
Tomato	1	1		_	Pirimiphos-methyl(Tr. ³⁾)
Edibleflower					
Chrysanthemum [SYOKUYŌGIKU]	3	3	0.04,0.09	0.01,0.01	Malathion (0.26)
Chrysanthemum (relish) [KOGIKU]	1	0	. —	_ ,	_

Table 1. Residues of Organophosphorus Insecticides in Crops

剤 (殺ダニ剤) であるクロルベンジレート, α -ベンゾエピン及び β -ベンゾエピンがキュウリ,ピーマン及び食用菊の3種4作物 (13%) から検出された.しかし,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.

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メソミル及びチオジカルブの2種がレタス及び刺身のつまに用いる小菊の2種2作物(7%)から検出された.このうち、小菊から検出されたチオジカルブは、登録保留基準値2ppmの4.5倍量の残留が認められた.チオジカルブは劇物に指定されているが、1日摂取許容量(ADI)は0.03mg/kgである.また、小菊は刺身の盛り合わせなどに添えられるのみで、通常喫食することはなく、問題はないと考える.しかし、接触した他の食品への移行も考えられ、また、登録保留基準値を超えて残留していたことから、今後、農薬の正しい使用法の遵守や使用方法の改善などの対応が望まれる.また、メソミルはチオジカルブの分解生成物であり15)、検出されたメソミルはチオジカルブに由来する可能性が考えられる.

(3)農薬複数残留実態

同一検体から2種類以上の農薬を検出した野菜類についてまとめ、Table 3に示した.

複数残留は、果菜類のキュウリと、食用菊及び小菊の2種3作物(10%)に認められた。

キュウリは有機塩素系殺菌剤及び有機塩素系殺虫剤の組み合わせによる農薬残留が認められた. また, 食用菊からは複数の有機リン系殺虫剤による, 小菊からは有機塩素系殺虫剤及びカーバメイト系殺虫剤の組み合わせによる農薬の複数残留が認められた.

食用菊は昨年度¹³⁾も農薬の複数残留が認められている. しかし,残留していた農薬の種類は異なっていたことから,今後も引き続き実態把握に努める考えである.

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12種21作物について調査したところ,有機塩素系殺菌剤3種及び有機塩素系除草剤1種が検出された(Table 4).しかし,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.

有機塩素系殺菌剤では、プロシミドン、TPN 及びキャプタンが、レタス、コマツナ、ピーマン及びキュウリの4作物(20%)から、また、有機塩素系除草剤ではCNP がレタス1作物から検出された。

有機リン系農薬及びカーバメイト系農薬はいずれの作物においても検出されず、一般流通(慣行栽培)作物と異なる傾向であった. 農薬を検出した作物は、販売者独自の基準による無農薬栽培表示のもの3種3作物(レタス、コマツナ及びピーマン)及び表示ガイドラインによる減化学肥料表示のもの1作物(キュウリ)で

¹⁾ Chlorpyrifos, CVP, dimethoate, 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 0.01ppm

		, Organochlorine Insecticides ²⁾	and
Carbamate Insecticides ³⁾	in Crops		

	NO.of	NO.of	Organochlorine Fungiside	Organ	ochlorine Inse	cticide	Carbamat	e Insecticide
Sample	sample	Positive	Procymidone (ppm)	Chlorbenzilate (ppm)	α-Benzoepin (ppm)	β-Benzoepin (ppm)	Mthomyl (ppm)	Thiodicarb (ppm)
Vegetable						11111		
Japanese Radish								
(root)	1	. 0	_4)		_	_		·
(top)	1	0	_	_	_		_	
Letucce	4	1	<u> </u>	_	_		0.42	.—
Carrot	4	0			- -		_	
Cucumber	6	1	Tr. ⁵⁾	Tr.	_	_	 .	
Egg plant	1	0	· <u></u>	<u> </u>	· —			, - .
Mini Tomato	3	0	- .	— .		-	_	·
Pimiento	5	4	Tr.,0.16	_	0.02	0.02,0.05	_	
Tomato	1	. 0 ,	_	_		_		_
Edible flower								
Chrysanthemum	3	0	_	_	_	_		_
Chrysanthemum								
(relish)	1	1	. · · · · <u>-</u> · · · .	_	0.10	0.02	0.10	9.0

- 1) Captan, catafol, TPN, PCNB, procymidone, vincrozolin and iprodion are investigated.
- 2) T-BHC (total of α -, β -, γ and δ -BHC), T-DDT (total of pp'-DDT, pp'-DDE, and p'-DDD), op'-DDT, dieldrin, aldrin, endrin, α and β -benzoepin, chlorobenzialate, dicofol, heptachlor and heptachlor epoxide are investigated.
- 3) Ardicarb, bendiocarb, diethofencarb, ethiofencarb, NAC, BPMC, methomyl, oxamyl, primicarb and thiodicarb are invesigated.
- 4) − : not detected
- 5) Tr.: below 0.01ppm

Table 3. Details in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	NO.	Pesticide residues (ppm)
Cucumber	1	Chlorbenzilate (Tr.) 1), Procymidone (Tr.)
Chrysanthemum	1	DDVP (0.04), Diazinon (0.01), Malathion (0.26)
Chrysanthemum	1	α -Benzoepin (0.1), β -Benzoepin (0.02)
(relish)		Methomyl (0.10), Thiodicarb (9.0)

1) The value in parentheses shows detected levels of pesticide.

あった. 一方,表示ガイドラインによる有機栽培表示のものからは農薬は全く検出されなかった.

レタスから検出された除草剤 CNP は、0.01ppm未満とごく微量であった。CNP は平成6年3月に農林水産省から原則として CNP 剤は使用しないこととの通知が出された。農林水産省の残留農薬安全性評価委員会において「仮にごく微量の CNP が検出された場合においても人の健康に影響を及ぼすものとは考えられない」との意見も出されており、今回の検出量では特に問題はないと考える。

農薬の複数残留は昨年度¹³⁾ は認められなかったが、 今年度は葉菜類のレタス1作物において、殺菌剤と除 草剤の組合せによる農薬の複数残留が認められた. 無・減農薬栽培表示作物における農薬の検出割合は 年々減少傾向にある¹⁰⁻¹³⁾.この傾向が継続するもので あるか、また、表示ガイドラインが周知された効果で あるか、今後の動向を注意深く調査していく考えであ る。

まとめ

1993年4月から1994年3月までに都内に入荷した野菜・果実類16種51作物について、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、DDVP、ダイアジノン、マラチオン及びピリミホスメチル4種が3種6作物から、痕跡 \sim 0.26ppmの範囲で検出された.

Sample	NO.of sample	NO.of positive	Organochlorine Fungicides			Organochlorine Herbicides
			Captan (ppm)	TPN (ppm)	Procymidone (ppm)	CNP (ppm)
Vegetable	-					
Radish[HATSUKADAIKON]					
(root)	1	0	_2)	_	· <u> </u>	_
(top)	1	0	· —		- .	_
Crown Daisy [SYUNGIKU]	. 1	1	0.02	-		_
Letucce	4	1	_	0.38	0.04	Tr. ³⁾
Spinach [HÖRENSÖ]	1	0				_
Young leaves of chinese ca	abbege					
[KOMATSUNA]	1	0	- :	_	_	- .'
Cabbege [KYABETSU]	1	0	_			_
Carrot [NINJIN]	. 1	0	_	_ `		_
Cucumber	4	1		, —	Tr.	_
Mini Tomato	1	0		_		· <u>—</u>
Pimiento	3	1			0.04	_
Fruit			e e e e e e e e e e e e e e e e e e e			
Grape	1	0	_	_		<u> </u>

Table 4. Residues of Pesticides¹⁾ in Organic Cultivation in Crops

- 1) 63 kinds of insecticides (organophosphorus: 33, organochlorine: 17, carbamate: 10, others: 3), 11 kinds of fungicides (organochlorine: 9, others: 2), one kind of carbamate sprouting inhibitor and one kind of organochlorine herbicides are investigated.
- 2) -: not detected
- 3) Tr.: below 0.01ppm

有機塩素系農薬では、プロシミドン、クロルベンジレート及びベンゾエピンが、痕跡~0.16ppmの範囲で3種6作物から検出された.

カーバメイト系農薬は、メソミル及びチオジカルブ 50.10 ~9.0ppm の範囲で 2 種 2 作物から検出された.

農薬の複数残留は、2種3作物に認められた.

2. 無・減農薬栽培野菜・果実類

有機塩素系農薬では、プロシミドン、TPN 及びキャプタンの 3 種が、レタス、コマツナ、ピーマン及びキュウリの 4 種 4 作物から、痕跡 \sim 0.38ppmの範囲で検出された。

有機リン系農薬及びカーバメイト系農薬は検出されなかった.

本調査は東京都衛生局食品環境指導センターと共同で実施したものである。

- 1) 小関正道, 嶋村保洋, 真木俊夫他:東京衛研年報, **31-1**, 170-173, 1980.
- 2) 小関正道, 田村行弘, 真木俊夫他:東京衛研年報, **32-1**, 172-176, 1981.

- 3) 永山敏廣, 田村行弘, 真木俊夫他:東京衛研年報, **34**, 165-170, 1983.
- 4) 永山敏廣, 観 公子, 田村行弘他:東京衛研年報, **35**, 210-218, 1984.
- 5) 田村行弘, 観 公子, 永山敏廣他:東京衛研年報, **36**, 199-205, 1985.
- 6) 永山敏廣, 真木俊夫, 観 公子他:東京衛研年報, **37**, 173-183, 1986.
- 7) 永山敏廣, 真木俊夫, 観 公子他:東京衛研年報, **38**, 222-228, 1987.
- 8) 永山敏廣, 真木俊夫, 観 公子他:東京衛研年報, **39**, 130-138, 1988.
- 9) 永山敏廣, 真木俊夫, 観 公子他: 東京衛研年報, **40**, 155-162, 1989.
- 10) 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) 小林麻紀, 永山敏廣, 塩田寛子他:東京衛研年報, **43**, 124-129, 1992.
- 13) 塩田寛子, 永山敏廣, 小林麻紀他:東京衛研年報,

- **44,** 150-154, 1993.
- 14)「植物防疫講座 第2版」編集委員会:植物防疫講座題2版一農薬・行政編一,229,1989,(社)日本植物防疫協会,東京.
- 15) The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration: *Code of federal-regylations* **40** Parts 150 to 189, 1990.

輸入農産物中の残留農薬実態調査 ー平成5年度ー

塩 田 寛 子*, 永 山 敏 廣*, 小 林 麻 紀* 伊 藤 正 子*, 森 野 雅 世**, 田 村 行 弘*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops - Apr. 1993. ~ Mar. 1994. -

HIROKO SHIODA*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*
MASAKO ITO*, MASAYO MORINO** and YUKIHIRO TAMURA*

Pesticide residues in 215 imported crops were investigated. Residues of ten kinds of organophosphorus insecticides were detected at trace-0.61ppm.

Two kinds of organochlorine fungicides were detected at 0.02-0.06ppm. As for carbamate pesiticides, two kinds of insecticides, and one kind of carbamate herbicide were detected at trace-1.4ppm and, 0.01-0.16ppm respectively. In the others, two kinds of fugicides and one kind of herbicide were detected at trace-2.8 ppm and 0.01-0.11ppm respectively.

As for the rate of detection of pesticides in imported crops, there is scarcely any difference among American, Asian, European and Oceanic regions.

Over the last five years the difference of detected pesticides in five regions has decreased and the regions of carbamate pesticide detection have increased.

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⁴⁻¹⁰⁾。今回は平成5年度の調査結果を報告する。

実験の部

1. 試 料

1993年4月から1994年3月にかけて東京都内に入荷 した輸入野菜・果実類及びそれらの加工品等66種215作 物について調査した.これら試料の内訳を 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, アジンホスメチル,

- *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
- **東京都南部薬事衛生事務所 150 東京都渋谷区広尾 5-7-1
- **The Tokyo Metropolitan (Nanbu) Pharmaceutical Sanitation Office 7-1, Hiroo 5 chome, Shibuya-ku, Tokyo, 150 Japan

Table1. The List of Investigated Imported Crops

	Commodities
Vegetables	Artichoke (1) 1), Trevise (4), Chicory (2), Saboi (1), Spinach [HOURENSOU] 2) (5), Carrot [NINJIN] 2) (2), Asparagus (5), Garlic (2), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] (16), Onion [TAMANEGI] (2), Leek [RIKI] (2), Shallot [ESHAROTTO] (2), Cerliac (1), Ginger [SHOUGA] (1), Salsify [SEIYOUGOBOU] (1), Okra (7), Pimento [PIMAN] (6), Pumpkin [KABOCHA] (11), Baby corn (4), Sweet corn ²⁾ (2), Chinese pea [SAYAENDOU] (2), String pea [SAYAINGEN] 2) (4), Green pea 2) (2), Green soybean [EDAMAME] 2) (3), Potato 3) (3), Mashed potato 4) (5), Taro [SATOIMO] 2) (2) 27 species 98 crops
Fruits	
Citrus ⁵⁾ Others	Grapefruits (3), Lemon (4), Lime (3), Orange (5) Avocado ⁵⁾ (2), Banana ⁵⁾ (9), Cherry [SAKURANBO] (3), Grape [BUDOU] (5), Kiwifruit ⁵⁾ (3), Litchi ⁵⁾ (1), Chestnut [MUKIGURI] (1), Mango ⁵⁾ (6), Melon ⁵⁾ (3), Papaya ⁵⁾ (3), Pineapple ⁵⁾ (2), Pomegranate [ZAKURO] ⁵⁾ (1), Strawberry [ICHIGO] (5), Blueberry (2), Persimon [KAKI] ⁵⁾ (1), Dragonfruits ⁵⁾ (1)
Beans	Soybean [DAIZU] (3), Small red bean [AZUKI] (2), Lima bean (1), Coffee bean (3)
Nuts	4 species 9 crops Almond(1), Cashew nut(1), Hazelunt(1), Peanut(3), Pumpkin seed [KABOCHANOTANE] (1), Sunflow-
Cereals	er seed [HIMAWARINOTANE] (1), Walnut (1) 7 species 10 crops Flour [KOMUGIKO] (5), Malt [BAKUGA] (9), Corn [TOUMOROKOSHI] (2), Corngrits (5), Corn meal (2), Backwheat [GENSOBA] (6), Backwheat flour [SOBAKO] (4) 7 species 33 crops
	Total 66 species 215 crops

- 1) Values in parentheses indicate numer of individual samples.
- 2) include the cutted or frozen commodity
- 3) precooked frozen potato
- 4) precooked and dried potato
- 5) This sample is analyzed both whole and fresh.

エチオン, オメトエート, クロルピリホスメチル, ジメトン(-O, -S), テトラクロルビンホス(CVMP), ピリミホスメチル, ホスメット(PMP), メカルバム, メチダチオン(DMTP), エトプロホス, エトリムホス, エデイフェンホス(EDDP), メチルパラチオン, キナルホス,トリクロルホン(DEP), フェンスルフォチオン

計29種

(2)有機塩素系農薬:総BHC (α-, β-, γ-及びδ-BHC の総和), 総DDT (pp'-DDT, pp'-DDE及びpp'-DDDの総 和), ディルドリン, アルドリン, エンドリン, キャプ タン,カプタホール(ダイホルタン),クロルベンジ レート, ジコホール(ケルセン), イプロジオン, エン ドスルファン $(-I, -II; \alpha -, \beta - ベンゾエピン)$, ビンク ロゾリン、ジクロラン、メトキシクロル (3)カーバメイト系農薬:カルバリル(NAC), カルボ フラン, アルジカルブ, エチオフェンカルブ, オキサ ミル, クロルプロファム(CIPC), ジエトフェンカルブ, ピリミカーブ, ベンダイオカルブ . 計9種 (4)その他の農薬:アトラジン、プロメトリン、塩化 メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、トリクロロエ タン, 2.4-D, イマザリル, ビテルタノール 総計67種

これらのうち、穀類は有機リン系、アトラジン及びプロメトリンについて、柑橘類は有機リン系、カーバメイト系及びその他の農薬(アトラジン及びプロメトリンを除く)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:(株) 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: (株) 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ー質量分析計:Finigan Mat 社製 Incos-50
- (5) 原子発光検出器:Hewlett Packard 社製 AED HP5921A
- (6) 粉砕器: (有) 廣澤鉄工所製 ダンシングアジ テーター

4. 分析方法

平成4年厚生省告示第239号, 残留農薬分析法¹¹⁾, 増補残留農薬分析法¹²⁾及び残留農薬分析法 Draft¹³⁾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14).

結果及び考察

1. 農薬残留実態

農産物66種215作物中20種52作物(検出率24%,以下同様)から26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 4 に,穀類は Table 5 に示した.

(1) 野菜類

野菜類では、27種98作物中8種18作物(検出率18%、以下同様)から8種の農薬が検出された(Table 2).

Table 2. Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Vegetables						
Spinach	Taiwan	1	1	Chlorpyrifos	0.39	$0.01^{1)}, 1.0^{2)}$
Celeriac	Australia	1	1	Pirimicarb	$\mathrm{Tr}^{3)}$	$2.0^{1)}$
Pimento	Holland	6	2	Pirimicarb	Tr,0.03	$1.0^{1)}$
Okra	Thailand	5	4	Chlorpyrifos	0.07	$0.1^{1)}$
				Dimethoate	0.02	1 ⁴⁾
				Phosalone	0.06	1 ⁴⁾
				NAC	0.04,1.4	
String Pea	China	3	2	Dimethoate	0.02,0.22	1 ⁴⁾
Green soybean	Taiwan	3	. 3	Ethion	0.08	$0.3^{4)}$
				Chlorpyrifos	Tr	$0.1^{1)}$
				EPN'	Tr	
Potato	Belgium	2	2	CIPC	0.80,0.20	$50^{1)}, 0.5^{3)}$
Mushed potato	Canada	2	1	CIPC	0.01	$50^{1)}, 15.0^{3)}$
_	France	. 1	1	CIPC	0.06	50 ¹⁾
	USA	1	1	CIPC	0.16	$50^{1)}$, $50^{3)}$
Fruits					•	
Banana						
(whole)	Ecuador	3	3	Bitertanol	0.14,0.21,0.31	$0.5^{1)}, 1^{3)}, 0.5^{5}$
	Philippines	6	6	Chlorpyrifos	Tr,Tr,Tr,0.01,0.01	$0.5^{1)}$
				Bitertanol	0.22,0.31,0.31,0.47,0.79	$0.5^{1)}, 1^{3)}, 0.5^{5}$
(fresh)	Ecuador	3	. 3	Bitertanol	Tr,0.01,0.02	
	Philippines	6	5	Bitertanol	Tr,Tr,Tr,Tr,Tr	
Grape	Chile	2	1	Iprodione	0.06	$25^{1)}, 10^{5)}$
Kiwifruits	Newzealand					
(whole)		3	3	Pirimiphos-methyl	Tr,0.41	$1.0^{1)}, 2^{3)}$
				Diazinon	0.02	$0.1^{4)}, 0.5^{5)}$
				Vinclozolin	0.14	$20^{4)}, 10^{3)}$
Litchi				· ·		
(whole)	Taiwan	1	1	Parathion	0.61	$-0.5^{5)}$
(fresh)	Taiwan	1	1	Parathion	0.20	
Melon						
(whole)	Mexico	1	1	Diazinon	Tr	$0.1^{1)}, 0.5^{5)}$
Strawberry	USA	4	3	Malathion	Tr	$8.0^{1)}, 8^{5)}$
-				Iprodione	0.02	25 ¹⁾
				NAC	0.05	

¹⁾ tolerance for pesticide residue

²⁾ Tr; below 0.01ppm

³⁾ tolerance in each country

⁴⁾ standard for withholding resistration

⁵⁾ FAO/WHO tolerance for residues

食品衛生法による残留基準のある農薬ではクロルピリホス(検出作物名:オクラ),ピリミカーブ(ピーマン及びセルリアック)の2種が4作物(8%)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では、エチオン(枝豆)、ジメトエート(オクラ及びサヤインゲン)及びホサロン(オクラ)の3種が9作物(9%)から検出された、いずれも基準値以内であった。

一方、CIPC(冷凍ポテト及びマッシュポテト)及びク ロルピリホス(冷凍ホウレンソウ)の2種が6作物(12%) から検出された. CIP Cは調査したポテトの約八割から 検出されたが、その検出値はいずれも生鮮ポテトに対 する基準値以内であった. この農薬は昨年度は検出さ れなかった $^{10)}$ が、ポテトからは高頻度で検出される $^{8.9)}$ ため、引き続き残留状況の推移を観察していく必要が ある. また, クロルピリホスが冷凍ホウレンソウから その生鮮物に対する基準値を超えて検出された. クロ ルピリホスは国内では主に果実類に使用される有機リ ン系殺虫剤であり、その一日摂取許容量(ADI)が 0.01mg/kg/dayの劇物である. しかし, その ADI 及び 冷凍ホウレンソウの調理加工を考慮すると、今回の検 出値は喫食上特に問題はないと考える. 冷凍ホウレン ソウのような冷凍された野菜素材が、以前に比べ多く の国から多種類輸入・市販されている. このような半 加工品に対し、今後、より一層実態把握に留意する必 要があると考える.

(2) 果実類(柑橘類を除く)

果実類16種50作物中 6 種18作物(36%)から 9 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 はクロルピリホス(バナナの全果), ビテルタノール(バ ナナの全果及び果肉), イプロジオン(ブドウ及びイチ ゴ), ピリミホスメチル(キウィの全果), ダイアジノン (メロンの全果) 及びマラチオン(イチゴ)の6種類が12 作物(24%)から検出された. いずれも基準値以内であった.

ビテルタノールは今年度から検査を始めた殺菌剤であるが、バナナから89%の高い検出率で認められた.本調査では、輸入量の多いフィリピン産及びエクアドル産について時期を限定せずに検査した.その結果、輸出国及び時期による検出率の違いは、ほとんど認められなかった.バナナの輸入量には多少の季節変動はあるがほぼ一定量が一年を通して輸入されており、その一年間の総輸入量は、例年、全果実輸入量の約50%を占めている²⁾.また、輸出国ではフィリピン産が最も多く総輸入量の約七割を占め、次いでエクアドル産が二割弱を占めている。今回の検出値は、基準値以内ではあるがそれに近い値を認めたものもあった。そこで更に、種々の輸出国からのバナナ21作物についてビテルタノールの調査検討を加えた(Table 3).

その結果、台湾産のバナナからはビテルタノールが検出されなかったが、その他の輸出国のバナナからは0.10ppm~0.79ppmの範囲で検出された. 特に、フィリピン産バナナの全果2作物から基準値0.5ppmを超えるビテルタノールが検出された. また、これらバナナの果肉中の残留量は0.02ppm以下であった. ビテルタノールはADI 0.0015mg/kg/dayの普通物であり、今回の検出量では喫食上特に問題はないと考える. バナナから検出されるビテルタノールは、果肉への移行はほとんど認められないが、全果における残留量は基準値に近接している場合も多く、今後さらに検出状況を調査していく考えである.

登録保留基準のある農薬は、ダイアジノン(キウィの全果)及びビンクロゾリン(キウィの全果)の2種類が2作物(4%)から検出された、いずれも基準値以内であった。

ライチの全果からパラチオンが0.61ppm及び果肉から

Table	3.	Bitertanol	Residues	in	Whole	Banana
-------	----	------------	----------	----	-------	--------

Country	No. of samples	No. of positives	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Philippines	. 11	11	0.19,0.22,0.25,0.27,0.29,0.33	$0.5^{1)}, 0.5^{2)}$
			0.37,0.51,0.52,0.60,0.79	
Ecuador	4	4	0.10,0.24,0.28,0.36	$0.5^{1)}, 0.5^{2)}$
Indonesia	2	2	0.23,0.32	$0.5^{1)}, 0.5^{2)}$
Taiwan	2	0		$0.5^{1)}, 0.5^{2)}$
unclearance	2	2	0.29,0.52	$0.5^{1)}, 0.5^{2)}$

¹⁾ tolerance for pesticide residue

²⁾ FAO/WHO tolerace for residues

0.20ppm検出された. 従来からライチはパラチオンが高 頻度で検出されている⁷⁻¹⁰⁾. パラチオンは ADI が 0.005mg/kg/dayであり,日本では特定毒物に指定され ている農薬である.今回の検出値は可食部である果肉 でみると,体重50kgの大人が一生涯にわたり毎日約 1.3kg食べ続けても健康に影響を及ぼさない量に相当す る.また,パラチオンは水洗浄により約五割から七割 除去されるため¹⁵⁾,一般的な食生活を送る上ではライ チの喫食に問題はないと考える.パラチオンのように, 国内では現在使用が禁止されている農薬が海外では使 用されていることもあり、農薬の残留実態の把握には 十分な留意が必要である.

(3) 豆類及び種実類

豆類及び種実類から農薬は検出されなかった.しかし、これらの作物類からは、ほぼ毎年有機塩素系殺虫剤などの農薬⁷⁻¹⁰⁾が検出されている.今回農薬が検出されなかったことは、原産国で使用する農薬の種類及び方法の変化、土壌残留量の減少、あるいは調査対象作物の種類及び原産国の多様化など種々の事柄に起因

すると考える。また、農薬の使用は自然環境などの毎年変化する要因に大きく左右されるため、今後も農薬を検出しない状況が続くとの判断は難しい。そこで、継続して残留状況の推移を観察していく必要がある。

(4) 柑橘類

柑橘類 4 種15作物中 4 種13作物 (87%) から 7 種の農薬 が検出された (Table 4).

残留基準のある農薬は、クロルピリホス(グレープフルーツ、オレンジ及びレモンのいずれも全果)及びイマザリル(グレープフルーツとレモンの全果及び果肉、オレンジの全果)が検出された. いずれも基準値以内の検出であった. イマザリルは平成2年度から昨年度まで検出率、検出値ともに減少傾向にあった. 今年度は、検出率77%、検出値0.01~2.8ppm(平均0.73ppm)となり、平成2年度の検出率63%及び検出値0.01~0.52ppm(0.16ppm)を上回る結果であった. これは、平成4年9月にイマザリルなどの殺菌剤の収穫後使用は食品衛生法違反との通知が出たが、その後同年11月及び平成5年9月に食品添加物使用基準による残留量の設定及び

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Grapefruits	-					
(whole)	USA	3 -	3	Ethion	0.05,0.38	$2^{1)}, 2^{2)}$
				Chlorpyrifos	$\mathrm{Tr}^{3)}$	$0.3^{1)}, 0.3^{4)}$
e e				Imazalil	0.77,0.93,1.7	$5^{1)}, 5.0^{4)}, 10^{2}$
(fresh)	USA	3	3	Imazalil	0.01,0.02,0.05	
Lemon						
(whole)	USA	4	4	Chlorpyrifos	Tr,0.02	$0.3^{1)}, 0.3^{4)}$
				Dimethoate	0.03	$2^{1)}$
				Imazalil	1.9,2.0,2.8	5 ¹⁾
	•			2,4-D	0.01,0.03,0.04,0.08	$2^{1)}, 5^{2)}$
(fresh)	USA	4	3	Imazalil	0.06,0.08,0.11	
Lime						
(whole)	USA	1	1	Ethion	0.03	$2^{1)}$, $2^{2)}$
	Mexico	1	1	Ethion	0.22	$2^{1)}$
Orange						
(whole)	USA	4	4	Chlorpyrifos	0.07,0.09	$0.3^{1)}, 0.3^{4)}$
				Imazalil	0.56,0.86,1.1,1.4	$5^{1)}, 5.0^{4)}$
				NAC	2.1	$7^{1)}$, $10^{2)}$
	Australia	1	1	DMTP	0.06	$2^{1)}$
				2,4-D	0.11	$2^{1)}$, $5^{2)}$
(fresh)	USA	4	4	Imazalil	0.02,0.04,0.05,0.06	

NAC

Tr

Table 4. Pesticide Residues in Citrus Fruits

¹⁾ FAO/WHO tolerance for residues

²⁾ maximum residues in each country

³⁾ Tr: below 0.01ppm

⁴⁾ tolerance for pesticide residue

残留基準値の設定がなされ、基準値以内での使用が認められたことも一因であると考える.

登録保留基準のある農薬は、エチオン(グレープフルーツとライムの全果)、ジメトエート(レモンの全果)及びDMTP(オレンジの全果)の3種が6作物(46%)から検出された.グレープフルーツ全果1作物からのエチオンのみが、その基準値を超えて検出された.検出値はFAO/WHOの許容量以下であり、果肉からは検出されていないため、喫食上特に問題はないと考える.

2.4-D は検出率38%,検出値 $0.01\sim0.11$ ppm (平均0.05ppm)で認められた.その検出値は FAO/WHO の許容量2ppmの1/18以下であり,果肉からは検出されなかった.しかじ,その検出率及び検出値は,イマザリル同様,過去最も高い値を示した平成2年度の31%及び $0.01\sim0.06$ ppm (0.03ppm)を上回っていた $^{8-10}$).イマザリルとともに,今後も引き続き残留状況を把握していく必要があると考える.

(5) 穀類

穀類7種33作物中2種3作物(9%)から3種の農薬が 検出された(Table 5). 穀類からは、クロルピリホスメ チル、ピリミホスメチル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. 今 回の検出量は、ピリミホスメチルでは、麦芽に対する 残留基準値1.0ppmの1/10以下,また,クロルピリホスメチルとマラチオンについては小麦粉中に痕跡程度の残留であった. 昭和63年度から昨年度までの検出結果を比較してみると,農薬の種類にはあまり変化はみられず,検出値にも一定の傾向は認られない. しかし,検出率は昭和63,64及び平成元年度をまとめたものから今年度まで順に約80%,67%,50%,19%及び9%と減少傾向が認められた. このことは,作物の品種変化や貯蔵庫及び輸送中の条件整備などが一要因と考えられる. 穀物自給率の低い日本では,今後も大量の穀物が各国から輸入されると考えられ,農薬の検出率の減少傾向が続くのか,さらに残留実態の動向を観察する必要がある.

2. 地域別による比較

今年度は柑橘系果実も含め輸入農産物の原産国を前報¹⁰⁾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 6 に示した.

農薬の検出率は、オセアニア、アジア、アメリカ及 びヨーロッパ産ともに近似した値であった.

その他農薬の中ではビテルタノール,イマザリル及び2.4-Dが検出された.これらは、柑橘類及びバナナからの検出である.検出された農薬の種類には、地域差はほとんど認められない.

Table 5. Pesticide Residues in Cereals

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Malt	Newzealand	1	1	Pirimiphos-methyl	0.08	$1.0^{1)}, 10^{2)}, 5^{3)}$
Flour	Canada	2	2	Chlorpyrifos-methyl	$\mathrm{Tr}^{4)}$, Tr	
	*			Malathion	Tr,Tr	

- 1) tolerance for pesticide residue
- 2) FAO/WHO tolerance for residues
- 3) tolerance in each country
- 4) Tr: below 0.01ppm

Table 6. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

		No. of positive samples							
Area	No. of samples	Organophosphorus	Organo	ochlorine	Carba	mate	0.13		Detected
	samples	insecticides	fungicides	insecticides	insecticides	herbicides	Others	Total	rate(%)
America	92	13(5)1)	2(1)	0	2(1)	2(1)	16(3)	25 (11)	27
Asia	73	15 (5)	0 -	0	2(1)	0	5(1)	17(7)	23
Oceania	21	4(3)	1(1)	0	1(1)	0	1(1)	6(6)	28
Europe	25	0	0	0	2(1)	3(1)	0	5(2)	20
Africa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	213	32 (10)	3(2)	0	7 (2)	5(1)	22(3)	53 (26)	25

¹⁾ Value in parentheses indicate number of detected pesticides.

有機塩素系農薬殺虫剤を検出した地域はなかった. 一方,カーバメイト系殺虫剤は4地域で検出された. 今年度と過去5年間⁷⁻¹⁰⁾を比較してみると,有機塩素 系殺虫剤はアジア地域のみで検出されていたが,その 検出率は減少傾向にあり,カーバメイト系殺虫剤は検 出される地域が増加傾向にある.また,全体的に検出 農薬の種類についてみると,地域差が小さくなる傾向 にある.このことは,検査作物の種類及び数量の年度 による相違などの影響を受けている他,各地域で実際 に使用されている農薬の種類が変化したためと考えら れる.

その他農薬を含めた検出農薬の地域的動向を観察することは、使用農薬の種類だけでなく使用方法を推察し、残留状況を把握する上でも大切であると考える.

まとめ

1993年4月から1994年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等66種215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~0.61ppmの範囲で検出された

有機塩素系農薬では2種の殺菌剤が0.02~0.06ppm, カーバメイト系農薬では2種の殺虫剤が痕跡~1.4ppm 及び1種の除草剤が0.01~0.16ppmの範囲で検出された. その他の農薬として2種の殺菌剤が痕跡~2.8ppm及び 1種の除草剤が0.01~0.11ppmの範囲で検出された.

2. 地域別による比較

農薬の検出率はアメリカ、アジア、オセアニア及び ヨーロッパ産ともに近似した値を示した.

また,検出農薬の地域差は小さくなる傾向がみられる,と同時にカーバメイト系殺虫剤は検出される地域が増加傾向にある.

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,(社)日本食品衛生協会,東京.
- 2) 1993年度(平成5年)輸入青果物統計資料(バナナ・ シトラス・パインその他), 1993, (社)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4年東京都中央卸売市場年報 農産物編,1992,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) 塩田寛子, 永山敏広, 小林麻紀他: 東京衛研年報, 43, 130-136, 1992.
- 10) 小林麻紀, 永山敏広, 塩田寛子他:東京衛研年報, 44, 155-161, 1993.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 未発表
- 15) 戸張真臣, 笠井 裕, 西田 敦:食品衛生研究, **40 No. 2**, 67-84, 1989.

輸入食品中の放射能濃度(第5報*) ー平成5年度ー

Radioactive Contamination in Imported Foods (V*)
- Apr. 1993~Mar. 1994 -

KIMIKO KAN**, MASAMITSU KANMURI**, HIDEKI HASHIMOTO**
TOSHIO MAKI** and YUKIHIRO TAMURA**

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, 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により、放射性降下物は近隣地域をはじめジェット気流に乗って地球の多くの地域を汚染した.

我が国では、その後輸入食品等に高濃度の放射能汚染されたものが発見され、食品中の放射能濃度の暫定限度値(セシウム-134とセシウム-137の合計で1kg当たり370ベクレル以下)を規定し、検査体制が強化された.

東京都は事故直後より行政対応し、放射能濃度が国の定めた暫定限度値を超える食品の排除及び放射能汚染実態調査を行ってきた¹⁻⁴⁾. 引き続き本報では、都内市販輸入食品を中心に、平成5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

1993年4月から1994年3月までに東京都内に流通していた輸入食品等329試料を検査した.

2. 器具及び装置

前報1-4)に従った.

3. 試料の調整

前報¹⁻⁴⁾に従った.

4. 分析方法

前報 $^{1-4)}$ に従った。検出限界値は各試料の重量及び測定時間により換算して20-45Bq/kgであった。

結果及び考察

1. 放射能污染状況

都内に流通していた輸入食品等329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2試料であり,国の暫定限度値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1試料(0.3%)であった. また, 201Bq/kg以上のものはなく,50Bq/kg以下のものは327 試料で総試料の99.4%を占めていた.

昭和63年度から平成5年度までの50Bq/kgを超えた試料の検出率を図1に示した. 検出率は,昨年度(平成4年度)については僅かに上昇したものの全体的にみて,チェルノブイリ事故から時間の経過に伴い減少してきた.

今後、チェルノブイリ事故による放射能汚染で50Bq/kgを超えて検出される試料は100Bq/kg前後あるいは100Bq/kg以下の値で検出され、検出割合は1%以下でさらに少なく推移するものと思われる.

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

^{*}第4報, 東京衛研年報, **44**, 166-173, 1993.

^{**}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. 放射能濃度別の検出試料数および検出率

放射能濃度(Bq/kg)	検出試料数	検出(%)
0~ 50	327	99.4
51~100	1.	0.3
101~200	1	0.3
計	329	100

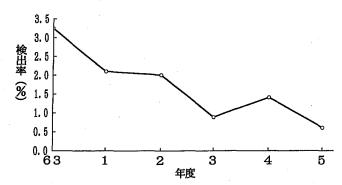


図1. 放射能濃度が50Bq/kgを超えた試料の年度推移 別割合を図2に示した.

食品を14群に分類したが、50Bq/kgを超えて検出された2試料は野菜・果実・加工品群に含まれた。検出率は野菜・果実・加工品群の中で9.5%、総試料数に対して0.6%を占めた。50Bq/kgを超えたものはセシウムを蓄積し易いキノコ $^{5.6}$ であった。

国は1993年1月,放射能検査の見直しを行い,数種の品目は検疫所において放射能検査を行わない事にしたが $^{7)}$,キノコは依然として全品目が検査対象品目になっている.著者らもキノコからの検出率が高いために注目しており $^{1-4)}$,今後も監視が必要であるものと考えている.

昨年度まで比較的検出率が高かった香辛料・ハーブ類は64試料(約20%)検査を行ったが50Bq/kgを超えるものはなかった。また、食肉・食肉製品は56試料(約17%)、穀類は33試料(約10%)、乳・乳製品は30試料(約9%)と多数の検査を行った。これらは食物連鎖によって放射能の蓄積が考えられるもの、あるいは土壌からの放射能の取り込みが考えられるものであるが、いずれも50Bq/kgを超えるものはなかった。

3) 原産国別

原産国別の検査状況を表3に、検査試料の国別割合 を図3に示した.

50Bq/kgを超えて検出された2試料の原産国は全てフランスであった. 近年のグルメブームでフランスからは珍しいキノコが多く輸入されている. これらは, 今後とも検査対象として注目していく必要がある.

原産国別の検査数割合の多い国は日本,アメリカ,フランス,中国の順である.日本産は各種茶類や香辛

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	64	0	0 .
2	野菜・果実・加工品	21	2	9.5
3	食肉・食肉製品	56	0	0
4	菓子類	1	0	0
5	乳・乳製品	30	0	0
6	蜂蜜	1	0	0
7	穀類 .	33	0	0 ,
8	ナッツ類	21	0 .	0
9	酒類	25	0	0
10	魚介・加工品	18	0	0
11	ジャム・マーマレード類	0	0	0
12	油脂類	3	0	0
13	調味料	0	0	0
14	その他	56	0	0
	計	329	2	0.6

*: ¹³⁴Cs 及び¹³⁷Cs の放射能濃度の合計が50Bq/kgを超えた試料数

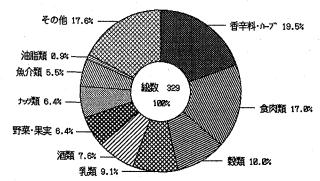


図2. 放射能検査試料の食品群別割合

料を,アメリカ及びフランス産は肉類,中国産は茶類を多く検査した.

本年度も旧ソ連産のものは検査されなかった. 1990年度厚生省の統計によれば輸入食品の届出数量は1,344件,62,319t輸入されている. 旧ソ連は爆発事故の当事国であり,環境汚染濃度は高いことも推定される. 核保有や原子力発電依存度の高い国80としても関心が高く調査する必要がある.

また、日本海への放射性廃棄物投棄が問題にされている。原子力潜水艦の原子炉の解体では、セシウム-137、ストロンチウム-90、コバルト-60等エネルギーの高い放射線を出す核種が多いと言われている。このことから、日本海海域で捕獲され、輸入される魚介類・同加工品についても調査が必要であると考える。

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は精密検

原産国名	試料数	検出数*	原産国名	試料数	検出数*
自然本	52	0	3 0000	3	0
アメリカ	43	0	ポルトガル	3	0
フランス	33	2	大韓民菌	3	. 0
中兴国	31	0	オーストリア	2	0
イタリア	17	0	XXX	2	0
ドイツ連邦	15	0	ハンガリー	2 -	0
デンマーク	13	0	*****	2	0
オランダ	9	. 0	香港(英)	2	0
为主ダ	9	0	*****	1	0
ニュージーランド	9 .	0	发生 旁	1	0
未完本来ラリア	6	0	ギリシャ	1	0
各 公湾	6	0	トルコ	1	0
スペイン	6	. 0	美沙文 家	1	0
ブラジル	4	0	スリランカ	1	0
チェコスロバキア	4	0	南文文文为	1	0
イギリス	4	0	约主义多义	1	0
ベルギー	4	0	スウェーデン	1	0
スイス	3	0	アイルランド	· 1	0
75 2	. 3	0	インドネシア	1	0
ノルウェー	3	0	アルバニア	1	0
英家教育	3	0	不明	21	0

表3. 国別の測定試料数と検出数*

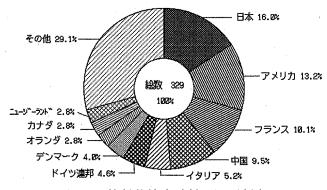


図3. 放射能検査試料の国別割合

査のため都立アイソトープ総合研究所で測定した値で ある.

50Bq/kgを超えた試料はピエ・ド・ムトン(カノシタ) 及びシャンテレル(アンズタケの一種)の2種類のキノコであった。これらの試料を写真1及び2に示した。 これらキノコは生鮮のものであったが、乾燥品として流通する事も考えて、これらを成分分析表による⁹⁾キノ コの水分含量約90% とし、乾燥重量で試算するとピエ・ド・ムトン1220Bq/kg、シャンテレル610Bq/kgとなる。暫定基準値の370Bq/kgを大幅に超えてしまう事も考えられる。

セシウム核種をみたところ,セシウム-134:セシウム-137の比は事故当時1:2であったが半減期から算出して,1993年の12月に測定した時はおよそ1:23の割合である.放射能濃度が122Bq/kg検出されたキノコの放射能核種をみたところ,セシウム-134が検出されなかった.この事からこのキノコはチェルノブイリ事故による汚染土壌から採れたものではなく,生育環境において,過去の核実験や原子力利用の環境汚染による土壌から採れたものと考えられる.

5) 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

表4. 放射能濃度が20Bq/kgを超えた試料の内訳と検出値

<th +="" 10="" 10<="" cs="" rowspan="3" th="" =""><th>No.</th><th></th><th>AZ .</th><th></th><th>検</th><th>出値(Ba/kg</th><th>g)</th><th>四本日</th><th>製造または</th></th>	<th>No.</th> <th></th> <th>AZ .</th> <th></th> <th>検</th> <th>出値(Ba/kg</th> <th>g)</th> <th>四本日</th> <th>製造または</th>	No.		AZ .		検	出値(Ba/kg	g)	四本日	製造または
		NO	No 品 名			¹³⁴ Cs+ ¹³⁷ Cs	¹³⁴ Cs	¹³⁷ Cs	- 原连国	輸入年月日
2 シャンテレル(アンズタケの一種)(牛) 61 ー ー フランス 93 11 1		1	ピエ・	ド・ムトン(カ	ノシタ)(生)	122	0	122	フランス	93.11.18
	2	シャン	テレル(アンズ	(タケの一種) (生)	61	<u> </u>	_	フランス	93.11.18	

2 シナモンスティック 37 インドネシア 93.07	No 品 名	検出値(Bq/kg) 134Cs+ ¹³⁷ Cs	原産国	製造または 輸入年月日
	1 ブラジルナッツ	38	ブラジル	93.09.22
3 シナエン 22	2 シナモンスティック	37	インドネシア	93.07
3 2) ~ 93.00.20	3 シナモン	33	不明	93.08.20
4 麦 芽 27 カ ナ ダ 不 明	4 麦 芽	27	カーナーダ	不明
5 ホワイトペッパー 27 ドイツ連邦 93.09.15	5 ホワイトペッパー	27	ドイツ連邦	93.09.15

表 5. 放射能濃度が25Bq/kg以上50Bq/kg以下の試料

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以下の試料はブラジルナッツ,シナモンスティック,シナモン,麦芽,ホワイトペッパーの5試料であった.

香辛料・ハーブは50Bq/kg以下で検出されるものが3 試料あった.他の食品に比べ依然として検出されるものがあり注意を要する食品である,又カナダ産麦芽から検出されたことは汚染と関連があるのか興味ぶかい.

ナッツ類では過去にヘーゼルナッツやアーモンドに 暫定限度値を超えたものが発見された事や,著者らの 調査¹⁾でアメリカ産のヘーゼルナッツから50Bq/kgを超えて検出された事があった.ブラジルナッツは特にラジウムを好んで根から吸い上げると言われている¹⁰⁾. 今後ナッツ類について調査を強化していきたい.

50Bq/kg以下と濃度的に低いレベルのものが、チェルノブイリ事故による汚染とは関係ないと思われる国のものにみられた. これらは過去における核実験の影響によるものと推定される.

今後も原子力施設の事故及び放射能廃棄物不法投棄 等が起こらない限り、低濃度の放射能汚染食品もさら に減少していくものと思われる.

まとめ

1993年4月から1994年3月までに都内で流通していた輸入食品等329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2試料 (0.6%)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2 試料であり、原産国はフランスであった。キノコの放射能濃度はピエ・ド・ムトン122Bq/kg、シャンテレル61Bq/kg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3試料, ブラジルナッツ及び麦芽の計5試料であった.

平成5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、明らかに年々減少傾

向を示していた.

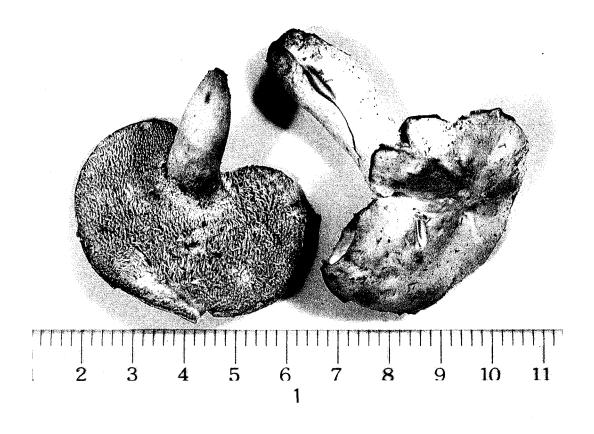
チェルノブイリ事故による放射能汚染食品は、わが 国では1991年3月に暫定基準値を超えて検出されて以 来、基準値を上回るものはない、我々の調査からも、 今後、基準値を超える試料が流通するような事はない と推定される。しかし、国が検疫所の放射能検査をゆ るめた事により、原発事故当事国の製品や放射能汚染 された長期保存可能食品の市場流通が懸念されるとこ ろである。今後は、今までの調査結果からみて放射能 検出率の高い食品を主に監視を続けていく必要がある ものと考える。

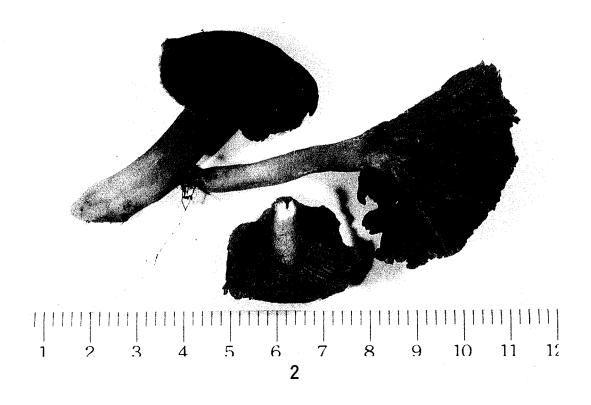
写真の説明

- 1. ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生)PIEDS DE MOUTON
- 2. シャンテレル(アンズタケの一種) (生) CHANTERELLES

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) 観 公子, 真木俊夫, 橋本秀樹, 他:東京衛研年報, **43**, 142-148, 1992.
- 4) 観 公子, 真木俊夫, 橋本秀樹, 他:東京衛研年報, **44**, 166-173, 1993.
- 5) Korky J. K., Kowaiki L. : J. Agric. Fd. Chem., 37, 568-569, 1989.
- 6) 杉山英男:第21回放医研環境セミナー予稿集, 27-28, 1993.
- 7) 厚生省生活衛生局食品保健課,衛検第10号,平成5年1月11日.
- 8) 吉澤康夫,草間朋子訳,国連環境計画(UNEP)編: 放射線ーその線量・影響・リスク,1988,同文書 院、東京.
- 9)科学技術庁資源調查会,四訂日本食品標準成分表, 1988,大蔵省印刷局,東京.
- 10) 山県登:放射能その不安と危険の解析, 1969, 講談社, 東京.
- 11) 河端俊治: New Food Industry, 30, 1-9, 1988.





化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(第11報*) - 平成5年度-

冠 政 光**, 観 公 子**, 橋 本 秀 樹** 真 木 俊 夫**, 田 村 行 弘**

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toixicants in Tokyo(XI*) -1993-

MASAMITSU KANMURI**, KIMIKO KAN**, HIDEKI HASHIMOTO**
TOSHIO MAKI** and YUKIHIRO TAMURA**

Keywords: 化学性食中毒 chemical food poisoning, バイケイソウ *Veratrum album*, ヒスタミン histamine, フェザリング現象 feathering phenomenon, カキシメジ *Tricholoma ustale*, ニコチン nicotine, フグ pufferfish, スズ tin

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5年度に起きた化学物質による食中毒等の事例, 1. ヒスタミンによる有症苦情2件, 2. コーヒー飲料のフェザリング現象による有症苦情, 3. タバコ(ニコチン)の混入による食中毒, 4. スズによるタケノコの有症苦情合計5件及び自然毒による食中毒の事例, 1. バイケイソウの誤食による食中毒, 2. キノコ(カキシメジ)の誤食による食中毒, 3. フグによる食中毒合計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ことにする. 表1に事例の概要をまとめて示した.

1. ヒスタミンによる有症苦情事例

事件概要 事例 1:平成 5年 7月,スーパーで会社の同僚(男性)3名がイワシ丸干しを購入し、当日冷凍して、4日後に自然解凍し、焼いて喫食したところ全員が口唇の痺れを呈した。直ちに喫食をやめ、残品を保健所に届け出た。

事例2:平成5年11月,デパートで夫婦がウルメイワシを購入し,当日,夫が2匹を焼いて喫食したところ,喉にピリピリ,イガイガ等の刺激感と腹の不調を呈した。また,翌日夫婦が喫食したところ,口が痺れ,喉がしめつけられ腫れる感じを呈し,水様性の下痢又

は軟便を3~4回繰り返した.

①試料事例1は患者が食した残品及び納入業者から持ち込まれたロットの異なる参考品のイワシ丸干し

事例2は患者が焼いて食した残品,デパートで売られていた残品と同一ロットのウルメイワシ(参考品A)及び納入業者から収去した同一ロットの製品(参考品B)

②原因物質の検索 患者の中毒症状がいずれも典型的なヒスタミンによるものと推測された. そこで薄層クロマトグラフィー(TLC)によりヒスタミン及び不揮発性腐敗アミンの定性分析を行った. 陽性のものについては液体クロマトグラフィーによる定量分析を行った.

事例 1 のイワシ丸干しではヒスタミン182 mg%, チラミン75 mg%, カダベリン7 mg%, プトレシン7 mg%, 及びスペルミジン7.2 mg%を検出した. しかし, 参考品からは全く検出されなかった.

事例 2 のウルメイワシではヒスタミンは残品が490mg%, 参考品 A が294mg%, 参考品 B が277mg%であった. チラミンは24mg%, 18mg%, 18mg%, カタベリンは117mg%, 138mg%, 147mg%, プトレシンは13mg%, 12mg%, 18mg%を検出した. なお, スペルミジンはいずれの試料からも検出されなかった. また事

^{*}第10報,東京衛研年報,44,162-165,1993

^{**}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

No	発生年月	患者数/喫食者数	原因食品	原因物質
化学性物質				
1	平成5年7月	3/3	イワシ丸干し	ヒスタミン
2	9月	$1 \angle 1$	コーヒー飲料水	品質劣化(異臭等)
3	11月	5 / 5	茶	タバコ(ニコチン)
4	11月	2/2	ウルメイワシ	ヒスタミン
· 5	12月	1/1	タケノコ	スズ
自然毒	•			
. 1	平成5年4月	2/2	バイケイソウ	プロトベラトリン等
2	9 月	4 / 4	カキシメジ	キノコ毒
3	12月	5 / 7	フグ	フグ毒

表1. 平成5年度に発生した化学性食中毒等事件の概要

例 2 の場合については揮発性塩基窒素を測定したところ, 残品では110mg%, 参考品Aでは102mg%, 参考品 Bでは98mg%であった.

③考察 ヒスタミンによる中毒最小発症量は文献値では100mg%とされているが⁵⁾,患者の感受性や健康状態により異なり,また過去の事例から約50mg%と推定される⁴⁾.この値は喫食量,他の不揮発性腐敗アミン含有量等,他の因子により影響を受ける.今回の事例1,2のいずれの場合も高濃度のヒスタミンを含有していたことから,ヒスタミンが発症原因物質であり,また他の不揮発性腐敗アミンも比較的多量に含有していることから,イワシの鮮度がかなり低下しており,保存状態が悪かったことが推察される.

ヒスタミンによる有症苦情は都内だけでも毎年数件 発生している。その症状は喫食した時にピリピリ等の 口唇の痺れを感じる場合が多い。今回、いずれの場合 も口にイワシを入れた直後に異常を感じ、事例1の場 合は喫食をすぐ取りやめたが、事例2の場合はヒスタ ミン中毒に対する情報がなく、更に喫食してしまい下 痢まで起こしている。ヒスタミン中毒を起こす魚、特 にイワシ類の製造、販売業者は製品を新鮮に保つこと が必要であるが、消費者はあらかじめヒスタミン中毒 の情報を得て、事例1の場合の様に初期症状で喫食を やめることが大切である。

2. コーヒー飲料による有症苦情事例

事件の概要 平成5年9月,男性1名が平成4年11月製造のクリーム入りコーヒー飲料を自動販売機で購入し、開缶後ひといきに飲んだところ、香りと味がおかしいことに気づいた。しかし既に喫飲した後であり、15分後に嘔吐し、4時間後に水様性の下痢症状を呈した。

①試料 患者が喫飲したものと同一ロットの未開封コーヒー飲料及び平成5年4月製造の参考品

②原因物質の検索 缶を開封し、試料をビーカー内に移した時の外観は参考品と比較し全体的にコーヒーの褐色が濃く、白色の凝固物が液面に浮いていた。また味は苦味が強く、臭いは酸敗様変質臭を呈していた。pHは5.5と参考品の6.6に対し低く、酸度は30と参考品の8に対し高い値を示した。なお酸度は試料100gの中和(pH8.3)に要する0.1N水酸化ナトリウム量(ml)である。これらの結果から、苦情品はフェザリング現象を起こした製品であると確認された。

③考察フェザリング現象は自動販売機によりコーヒー飲料が売られ始めた頃多発した事例である. クリーム入りコーヒー飲料を長期加熱することにより、pHが下がり、酸度が上昇し、タンパク質等が凝固する(ママコ)現象である. コーヒー飲料に対する嗜好は時代と共に変わり、酸味、クリーム量も変化している. それにともないフェザリング現象を防止する対策は考えられているが、生じやすい製品もある. 今回の製品は製造日から約9ヶ月間加熱された後、更に冷却され合計10カ月間と長期保存されて販売されたためにフェザリング現象が生じたものと思われる. この現象は嘔吐等の中毒症状と直接関連づけることは難しいが、同様な事件が東京都内だけでも昭和61年、63年及び平成元年と3件起きていることから、酸敗様変質臭等に感受性の強いヒトが、症状を呈した可能性が推察された.

3. ニコチンによる食中毒事例

事件の概要 平成5年11月,会社の同僚(男性)5名が食堂で茶を飲みながら昼食を取ったところ,茶の味に異常を感じ,10分後に全員がめまい,立ち眩み,吐き気,嘔吐を,3名が麻痺,2名が足の痺れの症状を呈し,全員が医師の診察を受けた.

①試料 患者の吐物,尿及び患者が喫飲した茶の茶葉と同一ロットの参考品.

②原因物質の検索 患者が茶を喫飲した際に舌の痺

れを訴えていることから、茶を原因物質と推定した.しかし、茶葉に異常は認められず、その後の現場調査によりヤカンの中からタバコが発見された.そこで原因物質はタバコ中のニコチンであると推定し、残留農薬分析法⁶⁾に従い患者の吐物及び尿中のニコチンを抽出し、GC-MSにより測定した.その結果、患者の吐物からニコチン1ppmを検出した.尿中からは全く検出されなかった.

③考察 患者の吐物中のニコチン含有量が1ppmと少ないのは、嘔吐した時に胃内容物が全て出てしまった後の吐物であったことが推察される. 患者は非喫煙者であり、本来ニコチンは検出されないはずなのに検出されたことから、ニコチンが中毒原因物質であることが推定され、症状もニコチン中毒と一致した. なおニコチンは生体内でコチニン等へ短時間で代謝されることから77、尿中からは検出されない.

今回事件は現場調査により解決された事例である. 当該飲食店で茶を用意する係りの者が事件前にタバコを箱ごと紛失していたこと, また事件後にヤカンの茶こしからタバコが箱ごと見つかったことが明らかになった. 更にタバコの混入経路は当該タバコの大きさとヤカンの蓋の内径がほぼ同じであったことから, タバコを置きその上に濡れたヤカンの蓋を置いて, 蓋にはさみ込まれて混入したものであるということが明らかにされた. 今回の事件は喫煙する従業員のいる飲食店の衛生管理上の不注意から発生した事件である.

4. スズによるタケノコの有症苦情事例

事件の概要 平成6年12月,両親と子供(1才6カ月)の3名が飲食店で長崎チャンポン及びお子様ランチを喫食した.その際子供が長崎チャンポンの具として入っているタケノコを集めて食べたところ,45分後に嘔吐した.なお患者はタケノコに白い付着物があることを訴えている.

①試料 患者が喫食した長崎チャンポン中のタケノコの残品及び飲食店で使用していた参考品のタケノコ

②原因物質の検索 タケノコ水煮缶詰に白色斑点物質が付着したり、液が白濁したりする現象はタケノコ成分のチロシンが水に難溶のため折出することが良く知られている。そこで子供の嘔吐に着目して、缶詰から溶出する重金属の分析を行なったところ、残品からスズを132 µg/g、参考品から174 µg/gを検出した。

③考 察 タケノコの白色斑点物質はチロシンの化合物であることが明きらかであり、嘔吐することは考えられない。そこで中毒症状を考慮して重金属を測定

した. その結果,スズが残品と参考品から100ppm以上 検出された.スズは清涼飲料水の成分規格⁸⁾として基準 値150ppmが定められているが,他の食品では基準は定 められていない.なお,本品から亜鉛,銅,鉛及びカ ドミウムは検出されなかった.

今回の事例は喫食量が長崎チャンポンの具のタケノコで比較的小量であったが、患者が1才6カ月の子供であったことから軽く吐く症状を示した可能性が示唆された。食品は幼児も喫食することから缶詰は内面塗装するか、または開缶後すぐに他の容器に移し換え金属の溶出を防ぐことが必要である。

5. バイケイソウによる食中毒事例

事件の概要 平成5年4月, 奥多摩の御前山にて友人と野草を採取した. 翌日の昼食に採取した野草を母親と2人で天ぷら, 酢みそあえにして喫食したが苦味が強いため一口で食べるのをやめた. しかし食後約1時間で口唇及び舌の痺れ, 腹痛, 吐き気, 嘔吐(3回)の症状を呈したため, 2名とも救急車で入院した. なお, 他県に住む友人も帰宅後, 喫食し同様に苦味を感じ喫食をやめたが吐き気, 嘔吐の症状を呈した.

①試料 患者が採取した野草で葉の一部がついた数本の茎

②原因物質の検索 搬入された野草の茎と葉の一部 は形状が保たれていた. 葉は葉脈が葉の付け根より先 端に走っており、縦しわでアコーディオン状に折りた たまれた深い溝が見られ、葉の裏側に毛が生え、基部 は鞘状を呈していた. この形態学的な観察から食用と して採取される同じユリ科のオオバギボウシ、ギョウ ジャニンニクの若芽とは異なり、中毒症状からもバイ ケイソウであることが疑われた. そこで、バイケイソ ウは有毒成分のベラトリウムアルカロイドを含有して いることから、この成分の確認をオオバギボウシを対 照に用いておこなった. 分析法は前報⁹⁾に従い, アルカ ロイド抽出画分を TLC により展開した. 試料では Rf 値が標準品のベラトリン及びプロトベラトリンA、B と同一スポットを示し、その他にもベラトリウムアル カロイドと推定される10個以上のスポットを検出した. しかし、オオバギボウシではこれらのスポット及び他 の呈色するスポットは全く認めなかった.

後日,バイケイソウの確認方法として,顕微鏡を用い,葉の裏面表皮細胞を観察する方法¹⁰⁾は良好であり,加熱処理後の少ない切片でも確認できることを明らかにした.バイケイソウでは細胞の積層状態が規則的なブロック様を呈し,孔辺細胞は楕円形であったのに対しギボウシでは細胞が不規則に入り組んだモザイク様

を呈し、孔辺細胞は円形であった。本法を用いて試料 がバイケイソウであることを再確認した。

③考察 バイケイソウによる食中毒は4~6月の 若芽を誤まって採取することにより発生する. その中 毒症状は一口食しただけで口唇の痺れ、腹痛、吐き気、 嘔吐の症状が現れ、手足から全身の痺れを引き起こし 非常に強烈である. また苦味を呈することから多量に 食することは少ないと思われるが、喫食すると血圧降 下を起し、呼吸困難から死に至る. バイケイソウによ る食中毒は東京都内だけでも昭和57年に2件⁹⁾,61年に 1件11)発生している。今回も前回と同様に患者がギボ ウシと間違えて喫食した事件で, 野草の不確実な鑑別 によるものであった. 山菜取りは十分な知識と経験を 必要とするものであり、鑑定が不確実な植物を喫食す ることは避けたい. また近年, 自然食ブームにより山 菜取りが盛んになり多くの図鑑や指導書が出回ってい る. これらの書物の中で有毒野草の項目にバイケイソ ウが全く記載されていないものがある. この様な書物 が出回ることは食中毒を誘発する可能性もあることか ら、植物性食中毒の中でも発生件数の多いバイケイソ ウは必ず記載しておく必要がある.

6. キノコによる食中毒事例

事件の概要 平成5年9月,親戚の者が富士山四合目付近で採取したキノコを患者が譲り受け,家族と友人4名で吸物として喫食したところ,1~2時間後に全員が悪寒,吐き気及び嘔吐を,そのうち3名が下痢の症状を呈し救急車で入院した.

①試 料 患者が喫食したキノコの吸物の残品及び キノコを湯どうしした残品

②原因物質の検索 食中毒症状は吐き気,嘔吐及び下痢を呈し、典型的な消化器系障害型症状を示していた.この症状を示す日本のキノコは主にカキシメジ,ツキヨタケ,クサウラベニタケ,イッポンシメジの四種である.今回の試料は、キノコを調理したもので原形を保ったものが少なかった.そこでキノコを吸物から全て取り出し観察したところ¹²⁾、比較的原形をとどめたキノコの中から傘の表面が粘性で平滑、栗褐色、中央部は暗色、肉は白色、柄は上下部が同じ太さで中程がふくらみ、繊維状で内部が中空のキノコが1本見つかった.そこでヒダの付け根の部分を取り出し胞子を顕微鏡で観察したところ、広卵形を呈していたことから、総合的に判断してカキシメジと判定した.

③考察 今回の試料は加熱加工されたものであり 判定は極めて難しかった. 吸物中のキノコ及びキノコ の破片68個を取り出し,鑑定したところ大部分がキシ

メジ属のキノコであった. 消化器系障害症状を示すカ キシメジが1本.カキシメジの破片と思われるもの1 個が見つかった.一方、湯どうししたもの65個からカ キシメジは全く見いだせなかった. 患者もクリタケ. ショウゲンジ,アシナガ(ナラタケ)を採取したと供述 していることから、多数の食用キノコの中に数本のカ キシメジが混入し、それを誤食して中毒を起こしたも のと思われる. 山野で採取したキノコを食する場合, 十分な知識と経験を積むことはもちろんであるが、キ ノコを1本ごとに食用であることを確認して,不確実 なものは絶対に食べないことが必要である。また、キ ノコ及び植物性の中毒は友人から譲り受けて発生して いる場合が比較的多いことから、正確な知識を持った 者から分けてもらうことも大切なことである。なおカ キシメジの中毒原因になる成分は明らかにされていな いことから、化学的確認法は確立されていない.

7. フグによる食中毒事例

事件の概要 平成5月12月,フグ調理師のいるフグ取扱い認可の寿司店で友人4名のグループと夫婦1組の2グループがフグチリ,小鉢に入った切り身(お通し)等のフグ料理を喫食した。約2時間後に友人グループの場合は4名とも,夫婦の場合は夫1名が口唇の痺れ・麻痺,手足の痺れ等を呈した。数名は呼吸困難も呈し,1名は意識不明の重体になった。患者5名はすべて救急車で総合病院に運ばれ入院した。

①試料 患者が喫食したフグ鍋の残品,寿司店で冷蔵庫に保管されていた湯でたフグ肝の残品3種及び生の筋肉,フグを調理後ごみ箱に廃棄したフグ残品(A:皮,B:心臓及びエラ,C:腎臓と思われる部分,D:生殖腺と思われる部分,E:その他の臓器),患者の血液,尿,吐物及び胃の洗浄物

②原因物質の検索 患者の中毒症状は典型的なフグ中毒であった.食品衛生検査指針 13 に従い生物学的方法で検査した.患者の血液中のフグ毒は 2 0.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 1.3 3 2.5 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 3.3 3 4.3 3 5.3 3 5.3 3 6.3 3 7.3 3 8.3 3 9.3 3 8.3 3 9.3

ことが明らかにされた.

③考察 フグ中毒の多くは釣人が釣ったフグを素人が調理し、喫食して起きている。また平成元年には当時可食とされていた輸入ナシフグの皮に高濃度のフグ毒が含有し、スーパー等でフグ刺しセットとして売られ中毒を起した事例もあった。

今回の事例はフグ調理師のいるフグ取扱い認可店で調理し、フグの肝臓を客に提供し中毒を起している. 当日この店では3組の客が同じフグ肝料理を喫食したが小鉢に入ったフグ肝の切り身を食べた2グループ5名が食中毒を起した.しかし、同じフグ肝を食べた別の1グループ2名は中毒を全く起していない.これは冷蔵庫内のフグ肝のフグ毒が6,000MU/g以上と非常に濃度が高いものと、34MU/gと低いものと二種類有り、1グループ2名は低濃度のフグ肝を喫食したために発症しなかったものと考える.

このフグ肝の6,100と7,300MU/gの値はこれまでの測定値及び文献値 $^{14)}$ と比較しても高い値であった。フグ毒の最小致死量は10,000MUと言われていることから、このフグ肝を2g喫食するとこの値を上回ることになる。

中毒症状は口唇の痺れ、手足の痺れから全身の運動麻痺、呼吸困難となるが、今回の事例では患者1名が意識レベル(JCS)が1になり、痛覚の刺激に対しても全く反応がなくなり、瞳孔も開き、重体で生命も危ぶまれた.しかし酸素吸入、点滴等の懸命な治療によりフグ中毒のクリニカルタイム8時間¹⁵⁾を越えたことから死亡には至らないと判断した.患者は回復し4日後に退院した.患者の話から中毒症状について、体は動かなくても聴覚は正常で人の話は全て聞こえていたことを明らかにしている.またフグ中毒は喫食してから発症するまでに20分から数時間がかかることから¹⁵⁾、発症した患者の近くに他の人がいない場合は体の自由がきかず、手遅れになる可能性も考えられる危険な中毒である.

なお、この寿司店は当該区長から10日間の営業停止の行政処分をうけ、保健所長から食品衛生法第4条及び東京都ふぐ条例第11条に違反することで告発された。また都知事から、ふぐ調理師は免許を取り消され、ふぐ取扱い認可店もその認可を取り消された。

以上, 平成5年度に起きた化学性食中毒等のうち,

魚介類の鮮度劣化(ヒスタミン)による有症苦情事例 2 件, コーヒー飲料のフェザリング現象による有症苦情 事例, タバコ(ニコチン)の混入による食中毒事例, ス ズによるタケノコの有症苦情事例, バイケイソウの誤 食による食中毒事例, キノコ(カキシメジ)の誤食によ る食中毒事例, フグによる食中毒事例の8事例を取り 上げた.

これらの調査は衛生局環境衛生部食品保健課,各関連の保健所と協力して実施したものである.

汝 献

- 1) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 飯田真美, 他:東京衛研年報, **40**,163-168,1989.
- 2) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 橋本秀樹, 他:東京衛研年報, **41**,108-112,1990.
- 3) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 橋本秀樹, 他:東京衛研年報, **42**,147-151,1991.
- 4) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 橋本秀樹, 他:東京衛研年報, **43**, 137-141, 1992.
- 5) 日本薬学会編:衛生試験法・注解,287,1990,金 原出版株式会社.
- 6) 後藤真康, 加藤誠哉:残留農薬分析法, 138, 1980, ソフトサイエンス社.
- 7) 浦川成美, 永田武明, 工藤恵子:日本医用マススペクトル学会講演集, 18, 1993.
- 8) 厚生省生活衛生局:食品衛生小六法,178,1994,新日本法規社.
- 9) 田村行弘, 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 他:東京衛研年報, **36**, 192-198, 1985.
- 10) 角田紀子,太田彦人:第15回日本中毒学会総会プログラム・抄録集,36,1993.
- 11) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 飯田真美, 他:東京衛研年報, **38**, 229-232, 1987.
- 12) 今関六也, 本郷次郎:原色日本新菌類図鑑(I), 79, 1987, 保育社.
- 13) 日本食品衛生協会:食品衛生検査指針・理化学編, 296, 1991.
- 14) 原田禎顕,阿部宗明:フグの分類と毒性,123, 1994,恒星社厚生閣.
- 15) 内藤裕史:中毒百科, 270, 1991, 南江堂.

食品用天然香料の品質実態調査

鳩 岡 友 紀*, 植 松 洋 子*, 平 田 恵 子*, 広 門 雅 子* 安 野 哲 子*, 船 山 恵 市*, 安 田 和 男*, 風 間 成 孔*

Survey on Quality of Natural Flavors

YUKI HATOOKA*, YOKO UEMATSU*, KEIKO HIRATA* MASAKO HIROKADO*
TETSUKO YASUNO*, KEIICHI FUNAYAMA*, KAZUO YASUDA* and MASAYOSHI KAZAMA*

Thirty-four natural flavors on the market were tested in accordance with Food Chemicals Codex (FCC) specifications, which are the official specifications for food additives in the United States. As a result, most of the 34 samples met the specifications of refractive index, specific gravity, ultraviolet absorbance and assay of flavoring substances. As for angular rotation, only a few of them met the FCC specifications. Two samples did not meet any FCC specifications. As both of them had higher flavoring substance levels, it is thought that they were concentrated in the production process. In addition, some of the flavors were found not to have been given enough specifications by FCC. Also some FCC methods were found to be difficult to apply to several samples tested.

Keywords: 天然香料 natural flavor, 規格 specification, オレンジオイル orange oil, レモンオイル lemon oil, グレープフルーツオイル grapefruit oil, ライムオイル lime oil, 香料成分 flavoring substances, 旋光度 angular rotation, UV吸光度 ultraviolet absorbance, 屈折率 refractive index

緒 言

近年,食生活の変化に伴い,加工食品の利用が増加している.加工食品の製造には多種多様の食品添加物が使用されているが、中でも風味付けを目的とする食品用香料は使用頻度が高い.更に、自然に近い香りを持つことから合成香料より天然香料を好む傾向が年々強くなり、その大半を輸入に頼っている¹⁾.しかし、日本ではまだ天然香料の公的な品質規格が定められておらず、その品質実態も明らかではない.

そこで、著者らは成分規格を作成する際の基礎資料とするため、市販の天然香料素材のうち柑橘系オイルを中心に、アメリカの食品添加物規格である Food Chemicals Codex (FCC 規格)²⁾ に従った規格試験を行うことにより、品質評価の実態調査を行ったのでその結果を報告する.

実験の部へ

1. 試 料:平成4~5年度に香料製剤製造メーカー 10社から、都食品機動監視班が収去したもの及び任意 に提出されたもの計34検体の食品用香料(柑橘系 4種類 23検体, その他10種類11検体)を試料とした.

2. 試 薬

1. d-リモネン標準品:東京化成㈱製,純度99%以上のものを用いた. 2. その他の試薬は全て市販の試薬特級品を用いた.

3. 装置

1. アッベ屈折計:(株島津製作所製 2. 旋光度計:日本分光(株)製 DIP-181. 3. 冷却器:(株)東京理化製クールエース CA-111 4. pHメーター:(株)東亜電波製 HM-20B 5. 紫外可視分光光度計:(株)島津製作所製 UV-2200 6. 自動滴定装置:平沼産業(株)製オートタイトレーター COM-900 7. ガスクロマトグラフ:ヒューレットパッカード社製 HP5890シリーズ II (FID 検出器付)

4. 実験操作法

1) 屈折率: アッベ屈折計を用いて FCC 規格²⁾ に従って測定した.

^{*}東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169 東京都新宿区百人町 3 - 24 - 1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

- 2) 旋光度: 旋光度計を用いて FCC 規格に従って測定した. (測定温度は第6版食品添加物公定書³⁾に従い20℃とした.)
- 3) 比重:第6版食品添加物公定書に記載されている 浮きばかりによる比重測定法に従って20℃で測定した.
- 4) UV 吸光度:試料 250mgを精密にはかりエタノールで正確に100mlにした.この溶液について260~400nmの紫外部吸収曲線を測定し、この間の極大吸収波長及びその波長における吸光度とベースラインとの差(UV 吸光度)を求めた.
- 5) 香料成分: 1)アルデヒド類含量;オレンジオイルはデシルアルデヒド,レモンオイル及びライムオイルはシトラール,クミンオイルはクミンアルデヒドとして測定した. 2)エステル含量;ウィンターグリーンオイルはサリチル酸メチル,ペパーミントオイルは酢酸メンチル,ジンジャーオイルはケン化価として測定した. 3)フェノール類含量;クローブオイルはオイゲノールとして測定した.これらの測定方法はいずれもFCC 規格に記載された方法に従った.
- 6) ヒ素:第6版食品添加物公定書に記載されている ヒ素試験法の第3法,装置Aに従って測定した. 試料 量は1gとした.
- 7) 重金属, 鉛:第6版食品添加物公定書に記載されている重金属試験法の第2法に従って測定した. 試料量は2gとした.
- 8) リモネンの定量:試料をエタノールで適宜希釈し、ガスクロマトグラフィーにより定量した. 測定条件;カラム DB-WAX (内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.5 μm, J & W社製), 注入方法 スプリット注入法,カラム温度 70℃(1分)から毎分3℃で220℃まで昇温,注入口及び検出器温度250℃,スプリット比50:1

結果及び考察

FCC 規格に定められている各オイルの試験項目の内,今回試験対象とした項目とその基準値を Table 1 に示した. また,FCC 規格で規定されている,いないに関わらず,試験対象とした項目を行った全ての結果を Table 2 に示した. 更に,Fig. 1 から Fig. 4 にはそれぞれ屈折率,比重,UV 吸光度及び香料成分含量の分析結果と規格値の関係を示した.

1. 各オイルの品質実態

- 1) 屈折率, 旋光度, 比重, UV 吸光度及び香料成分
- (1) オレンジオイル

旋光度は全ての検体で FCC 規格値より大きく, 1 検体 (No.10) を除く 6 検体の測定値は $+114.3^{\circ}$ ~ $+116.8^{\circ}$ であった. これらのうち 2 検体についてオレンジオイ

ルの主成分である $^{4)}$ d-リモネンを定量をしたところ,約 100%であった。 d-リモネンは $+125^\circ$ の旋光度を示すといわれている $^{5)}$ ことから,d-リモネンが試料の旋光度に影響することが考えられるため,今後,他の試料についても d-リモネンの定量をし,旋光度に及ぼす影響を明らかにする必要があると考える。旋光度を除く 4 項目ではほぼ FCC 規格に適合していた。

「濃縮天然精油100%」の表示があった 1 検体 (No.10)は、d-リモネンが93%と他のオレンジオイルに比べると少なく、濃縮操作による d-リモネンの除去が推察される. 特に、アルデヒド類含量は他の 6 検体よりも多く、FCC 規格の上限値2.5%を超えていた. 屈折率、比重及び UV 吸光度は規格値より大きかったが、逆に旋光度では規格値より小さかった.

次に、アルデヒド類含量も屈折率、旋光度、比重及び UV 吸光度に影響を及ぼすと考えられたため、これらとの相関関係を調べた。 UV 吸光度との間には Fig. 5 に示したとおり、正の相関 (相関係数 r=0.859, 危険率 $p\leq0.05$) がみられた。屈折率、旋光度及び比重との間にも相関がみられた。 $(r=0.729, -0.966, 0.935, p\leq0.05)$ このことから、アルデヒド類含量とこれらの項目にはそれぞれ何らかの関連があると考えられた。

UV 吸光度では品種(カリフォルニアタイプとフロリダタイプ)の違いによって規格値が異なるが、試験した9 検体はいずれも品種の表示がなかった。また、両タイプの規格値と比較してみると、いずれの検体も双方の規格に適合していた。

(2) レモンオイル

7 検体中ターペンレスオイルである 1 検体 (No.17) を除いて結果をみてみると、屈折率は 6 検体で、比重及び UV 吸光度は 5 検体で、FCC 規格に適合していた.アルデヒド類含量については、distilled oil である 1 検体 (No.12) を除いた coldpressed oil のうち、最も測定値が低い 1 検体 (No.15) でも値は2.1%と、規格に定められたカリフォルニアタイプの下限値2.2%にほぼ近い値を示した.旋光度は 6 検体とも FCC 規格値の+65.6°を超えていたが、これはオレンジオイルと同様にレモンオイルにもリモネンが80~90%含まれているため 4 、旋光度に影響を及ぼしていると考えられる.

一般に、柑橘油の前留部50%を除去したり、有機溶媒で抽出除去したりして、リモネンを一部除去したものをターペンレスオイルという⁶⁾. 今回試験したターペンレスオイル(No.17)でも、リモネン含量が約45%と少ない値を示した. 一方、アルデヒド類含量は他 6検体に比較して6.8~18倍と高かった. この検体については、

Table 1. FCC Specifications of Natural Flavors

Flavors		Refractive Index	Angular Rotation	Specific Gravity	Ultraviolet	Assay of Flavoring	Arsenic	Heavy Metals	Lead
			(°)		Absorbance	Substances (%)	as As (ppm)	as Pb	(ppm)
Orange Oil, Coldpress	sed	1.472~1.474	+94~+99	0.842~0.846	Ca:>0.130	1.2~2.5(A)	<3	<0.004%	<10
•					F1:>0.240				
Orange Oil, Distilled		1.471~1.474	+94~+99	0.840~0.844	<0.01	1.0~2.5(A)		Passed test	
Lemon Oil, Coldpress	ed	1.473~1.476	+57~+65.6	0.849~0.855	Ca.: >0.2	Ca.: 2.2~3.8(A)	<3	< 0.004%	<10
e e e e e e e e e e e e e e e e e e e		-	·		It.:>0.49	It.:3.0~5.5(A)			
Lemon Oil, Distilled		1.470~1.475	+55~+75	0.842~0.856	<0.01	1.0~3.5(A)		Passed test	
Grapefruit Oil, Coldp	ressed	1.475~1.478	+91~+96	0.848~0.856			<3	<0.004%	·<10
Lime Oil, Distilled		1.474~1.477	+34~+47	0.855~0.863		0.5~2.5(A)		Passed test	
Cardamon Oil		1.462~1.466	+22~+44	0.917~0.947				Passed test	
Clove Oil		1.527~1.535	-1.30~0	1.038~1.060	·	>85 (P)	-	Passed test	,
Peppermint Oil		1.459~1.465	-18~-32	0.896~0.908		>5.0(E)		Passed test	
Cumin Oil		1.501~1.506	+3~+8	0.905~0.925		45.0~52.0(A)		Passed test	
Wintergreen Oil		1.535~1.538	Levorotatory	1.176~1.182		>98.0(E)		Passed test	
			but<-1.5						
Nutmeg Oil	EI	1.474~1.488	+8~+30	0.880~0.910				Passed test	
	WI	1.469~1.476	+25~+45	0.854~0.880					
Fennel Oil		1.528~1.538	+12~+24	0.953~0.973				Passed test	
Thyme Oil		1.495~1.505	Levorotatory	0.915~0.935		>40 (P)		Passed test	
			but<-3						
Cassia Oil		1.602~1.614	-1~+1	1.045~1.063		>80 (A)		Passed test	
Ginger Oil		1.488~1.494	-28~-47	0.870~0.882		<20 (E)	,	Passed test	

Coldpressed Oil: Volatile oil obtained by expression from fresh peel or whole crushed fruit.

Distilled oil: Volatile oil obtained by distillation from juice, peel or whole crushed fruit.

Ca: California Type, Fl: Florida Type, It: Italian Type, EI: East Indian Type, WI: West Indian Type,

A: Aldehyde Content, P: Phenol Content, E: Ester Value

Table 2. Analysis of Natural Flavors

	No.	Sample	Country	Refractive	Angular	Specific	Ultraviolet	Assay of Flavoring
	110.	Sample	of origin	Index	Rotation (°)	Gravity	Absorbance	Substances(%)
1	1	ORANGE C. P. OIL	U. S. A.	1.474		_	0.44	1.9(A)
	2	ORANGE ESSENCE OIL	U. S. A.	1.473	+116.0	0.844	< 0.1	1.2(A)
	3	ORANGE OIL	Switzerland	1.474	+114.3	0.844	0.53	1.5(A)
(77)	4	ORANGE OIL C. P.	U. S. A.	1.473	+115.9	0.844	0.37	1.4(A)
ORANGE	5	NAVEL ORANGE OIL	U. S. A.	1.474		_	0.36	1.1(A)
	6	VALENCIA ORANGE OIL	U. S. A.	1.473	<u> </u>	-	0.33	1.3(A)
	7	ORANGE OIL	U. S. A.	1.474	+115.2	0.843	0.38	1.2(A)
	8	ORANGE OIL	U. S. A.	1.474	+116.8	0.844	0.46	1.0(A)
	9	ORANGE OIL	U. S. A.	1.474	+115.6	0.845	0.47	1.5(A)
	10	ORANGE OIL	Holland	1.477	+104.8	0.848	2.33	2.6(A)
	11	LEMON C. P. OIL	U. S. A.	1.475	+76.5	0.854	0.44	2.3(A)
	12	LEMON ESSENCE OIL	U. S. A.	1.474	+83.2	0,850	<0.1	1.9(A)
Z	13	LEMON OIL	Switzerland	1.474	+72.5	0.849	0.29	5.0(A)
LEMON	14	LEMON OIL	U. S. A.	1.475	+73.8	0.850	0.40	2.2(A)
17	15	CALIFORNIA LEMON OIL	U. S. A.	1.475	-		0.44	2.1(A)
	16	LEMON OIL .	Italy	1.475	+74.2	0.848	0.24	4.1(A)
L	17	LEMON OIL TERPENELESS	France	1.476	+46.3	0.866	0.12	34.3(A)
JIT	18	GRAPEFRUIT C. P. OIL	U. S. A.	1.476	+109.2	0.855	3.03	1.5(A)
FR	19	GRAPEFRUIT OIL	France	1.477	+108.4	0.855	2.93	1.3(A)
GRAPEFRUIT	20	FLORIDA GRAPEFRUIT OIL	U. S. A.	1.475			1.30	1.3(A)
GR	21	GRAPEFRUIT OIL	U. S. A.	1.477	+110.1	0.853	2.87	0.7(A)
LIME	22	LIME OIL	Holland	1.480	-0.7	0.937		2.5(A)
	23	LIME OIL	Peru	1.477	+38.7	0.862		0.5(A)
	24	CARDAMON SEED OIL	Europe	1.466	<u> </u>	_		
ļ.	25	CLOVE BUD OIL	Europe	1.532				86.7(P)
	26	CLOVE OIL	U. S. A.	1.539	-0.7	1.060		93.0(P)
MISCELLANEOUS	27	PEPPERMINT MITCHAM OIL	France	1.460	-36.7	0.909		12.1(E)
NE	28	CUMIN SEED OIL	Europe	1.502				46.6(A)
LA	29	WINTERGREEN OIL	U. S. A.	1.537	-	_		98.4(E)
	30	NUTMEG OIL	U. S. A.	1.482	+7.2	0.898		
MIS	31	FENNEL OIL	U. S. A.	1.537	+19.9	0.956		
	32	THYME OIL	England	1.500	-1.1	0.914		40.0(P)
	33	CASSIA OIL	Holland	1.605	-0.1	1.062		- <u>- </u>
	34	GINGER OIL	Holland	1.493	-36.1	0.888		21.3(E)

For all the samples, heavy metal levels were lower than 20 ppm (as Pb), lead levels were lower than 10 ppm and arsenic levels were lower than 1 ppm (as As_2O_3).

C. P.: Coldpressed, A: Aldehyde Content, P: Phenol Content, E: Ester Value, -: not measured

屈折率以外の試験項目はFCC 規格に適合しなかったが、この規格はリモネンを除去していないものを対象としているため、ターペンレスオイルであるこの検体には適用できないと考えられる.

アルデヒド類含量と他の 4 項目との相関をみてみると、屈折率との間には相関がみられなかった $(r=0.716, p \le 0.05)$ が、旋光度及び比重との間ではそれぞれ相関がみられた。 $(r=-0.969, 0.933, p \le 0.05)$ UV 吸光度との間には Fig. 5 に示したとおり、オレンジオイルと異なり、負の相関があることがわかった。 $(r=-0.818, p \le 0.05)$ これらの相関から、アルデヒド類含量がレモン

オイルの性状に影響を与えていることが推測される.

UV 吸光度及びアルデヒド類含量については、品種 (カリフォルニアタイプとイタリアンタイプ)により規格値が異なるが、試験した7検体はいずれも品種の表示がなかった。また、両タイプの規格値と比較してみると、試験項目によって適合する品種が異なる場合があった。

(3) グレープフルーツオイル

旋光度はどの検体も FCC 規格値の+96°を超えていた. グレープフルーツオイルにもリモネンが約90%含まれていることから⁴⁾, リモネンが旋光度に影響を与えてい

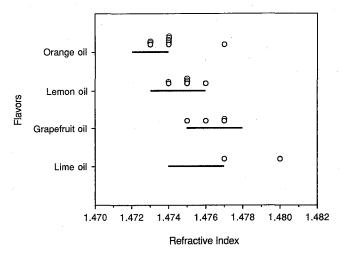


Fig. 1. Refractive Indexes of Natural Flavors

- O: Refractive Indexes of Samples
- —: Ranges of Refractive Index in FCC Specifications

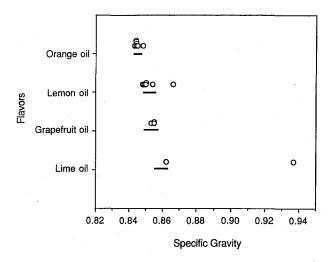


Fig. 2. Specific Gravities of Natural Flavors

- Specific Gravities of Samples
- Ranges of Specific Gravity in FCC Specifications

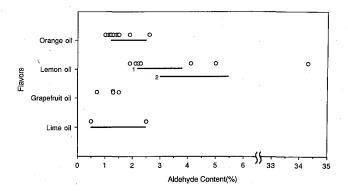


Fig. 4. Aldehyde Contents in Natural Flavors

- : Aldehyde Contents of Samples
- —: Ranges of Aldehyde Content in FCC Specifications
- 1 : California Type
- 2 : Italian Type

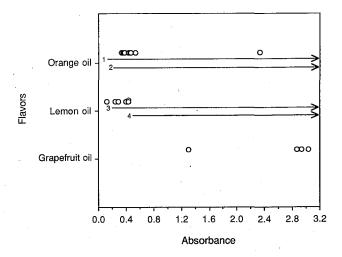


Fig. 3. Ultraviolet Absorbance of Natural Flavors at Maximum Absorbance

Orange oil: 330 ± 3 nm Lemon oil: 315 ± 3 nm Grapefruit oil: 320nm

- : Absorbance of Samples
- → : Ranges of Absorbance in FCC Specifications
- 1 : California Type (0.130<)
- 2 : Florida Type (0.240<)
- 3 : California Type (0.2<)
- 4 : Italian Type (0.49<)

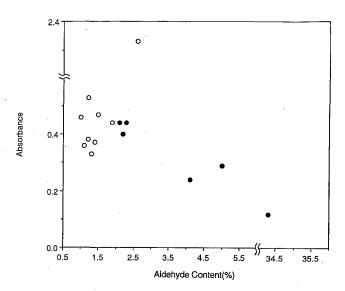


Fig. 5. Correlation between Aldehyde Content and Ultraviolet Absorbance

- : Orange oil $(r=0.859, p \le 0.05)$
- : Lemon oil $(r = -0.818, p \le 0.05)$

ると考えられる.

屈折率及び比重ではいずれも FCC 規格に適合した.

FCC 規格では UV 吸光度及びアルデヒド類含量が定められていない. しかし, グレープフルーツの風味が付加された種々の食品が市販されており, 需要も多いと思われることから, 規格を作成する必要があると考え, 他の柑橘系オイルと同様の操作法で試験を行った. その結果, 極大吸収波長は319nm~320nmにあり, そのUV 吸光度は1.30~3.10であった. これは, オレンジオイル, レモンオイルと比較すると, 非常に高かった. また, グレープフルーツオイルの主香成分はデシルアルデヒド等のアルデヒド類⁴)であることから, アルデヒド類含量はオレンジオイルの方法を適用し, 試験したところ0.7~1.5%であった. これは, オレンジオイルの場合と大差なかった.

なお、アルデヒド類含量と屈折率、旋光度、比重及び UV 吸光度との間に相関はみられなかった. (それぞれ r=-0.431, -0.728, 0.971, -0.117, p≤0.05)

(4) ライムオイル

オランダ産のオイル (No.22) について、屈折率、比重及び旋光度は FCC 規格に適合しなかった。ライムオイルの主成分は d-リモネンであるといわれているため 4)、定量を行ったところ、ほとんど検出されなかった。このことから、この 3 項目に影響を与えていると思われる d-リモネンが精製工程中に除去された可能性も考えられる。

(5) その他のオイル

1. 柑橘系以外の香料10種類についても試験を行った. 各オイルの測定値を FCC 規格と比較すると, ペパーミントオイルの旋光度及び比重, ナツメグオイルの旋光度, クローブオイル(No.27)の屈折率, タイムオイルの比重, ジンジャーオイルの比重及び香料成分は FCC 規格に適合しなかった.

2. ナツメグオイルでは、品種(イーストインディアンタイプとウェスタンインディアンタイプ)により規格が異なる. 今回試験したナツメグオイルでは、旋光度でわずかに規格を下回るものの、屈折率及び比重の結果からイーストインディアンタイプと推測される.

2) ヒ素、重金属及び鉛

ヒ素,重金属については FCC 規格より低い基準,鉛については FCC 規格と同じ基準を設定した(ヒ素は亜ヒ酸として 1 ppm,重金属は鉛として 20 ppm,鉛は 10 ppm).この結果,全ての検体で,この基準値以下であった.

なお, FCC 規格の重金属試験法中の passed test とは,

試料10mlを同量の水で希釈した後,塩酸1滴を加え, 飽和するまで硫化水素を通したとき,黒色に着色しな いこと,という試験法であるが,今回は全て日本の公 定法に従って試験を行った.

また、試料によっては試料量が少なく、旋光度及び 比重を測定することができないものもあった.

2. FCC 規格の検討課題

1) ジンジャーオイルの香料成分測定法

FCC 規格には、ジンジャーオイルの香料成分の分析は0.5 N塩酸による中和滴定法が収載されている. この中和滴定法では、滴定終末点はフェノールフタレイン試液で淡紅色になった変色点とされているが、今回分析対象としたジンジャーオイルは、試料そのものが褐色を呈していたため、淡紅色になる変色点を見極めることが極めて困難であった. そこで、電位によって滴定終末点を判定することができる電位差電極を用いた自動滴定装置による滴定を行ったところ、ばらつきもなく良好な結果が得られた.

2) カシアオイルの香料成分測定法

FCC 規格には、カシアオイルの香料成分の測定はカシアフラスコを用いた方法を収載している。すなわち、カシアフラスコに試料を採取した後、30%硫酸ナトリウム溶液で溶解し、加温しながらフェノールフタレイン試液を用いて50%酢酸溶液で淡紅色が消えるまで中和する。その後静置し、フラスコの首部に集まった油層の容量を読みとる方法である。しかし、今回分析対象としたカシアオイルでは、試料そのものが褐色を呈していたため、フェノールフタレイン試液で中和点を判定することが極めて困難であった。この試験法においては、今後、フェノールフタレイン試液にかわるpH指示薬の利用等について検討する必要があると考える。

カルダモンオイル、ナツメグオイル及びフェンネルオイルの香料成分測定法

FCC 規格で香料成分の項目が設定されていないカルダモンオイル, ナツメグオイル及びフェンネルオイルについては, 対象とする香料成分とその試験法を今後,検討したいと考える.

結 論

現在、我が国には天然香料の規格基準がなく、その品質の実態も明らかにされていないため、今回、市販の天然香料34検体について FCC 規格に従って試験し、品質実態調査を行った。その結果、屈折率、UV 吸光度、比重及び香料成分については FCC 規格にほぼ適合した。しかし、旋光度については適合しない検体が多くみられた。柑橘系オイルでは、主成分である d-リモネンが

旋光度に影響しているのではないかと考えられる. また, FCC 規格には, 試験法が検体によって適用できない場合があることや, 試験項目が設定されていないものがあることがわかった. そこで今後は, これら試験法の改良, 試験項目の設定について検討していく予定である. ヒ素, 重金属及び鉛については, 高い値を示すものはなく, 特に問題はなかった.

更に、天然物から香料成分を抽出する際使用する有機溶剤の残留があることが明らかにされている⁷⁾ことからも、天然香料の規格を早急に整備することが望まれる.

謝辞:本調査を実施するに当たり試料収集にご協力いただいた食品機動監視班の皆様に深謝いたします.

文 献

1) 日本香料工業会編:食品香料ハンドブック, 2-3,

1990, 食品化学新聞社, 東京.

- 2) Committee on codex specifications: Food Chemicals Codex, 3 rd. ed., 1981, National Academy Press, Washington, D. C.
- 3) 日本食品添加物協会編:第6版食品添加物公定書, 1992, 日本食品添加物協会, 東京.
- 4) 長田洋, 宮田佳和, 河合俊司, 他:香料, **138**, 53-86, 1983.
- 5) 玉虫文一,富山小太郎,小谷正雄,他:理化学事典,第3版增補版,1971,岩波書店,東京.
- 6) 食品化学新聞社編:食品添加物総覧'92, 1991, 食品化学新聞社, 東京.
- 7) 植松洋子, 鳩岡友紀, 平田恵子, 他:日本食品衛生学会第66回学術講演会講演要旨集, 31, 1993.

糖尿病食調製用レトルトパウチ食品のビタミン分析

菊 谷 典 久*, 門 間 公 夫**, 井 口 正 雄* 友 松 俊 夫*, 加 藤 芳 美***, 高 橋 邦 子***

Studies on Vitamin Contents of Retortable Pouched Food for Dietary Therapy of Diabetes

NORIHISA KIKUTANI*, KIMIO MOMMA**, MASAO IGUCHI*
TOSHIO TOMOMATSU*, YOSHIMI KATO*** and KUNIKO TAKAHASHI***

Analyses of vitamins were made on four kinds of retortable pouched food, arranged for 320 kcal of energy respectively, for the dietary therapy of diabetes.

The samples analyzed contained $1\sim30~\mu g$ of retinol, $8\sim623~\mu g$ of β -carotene, $0.07\sim0.18$ mg of vitamin B₁, $0.19\sim0.27$ mg of vitamin B₂ and $0\sim2$ mg of vitamin C. The content of vitamin C was extremely low. The heating process in manufacturing the retortable pouched foods was mainly suspected of decomposing vitamin C. These results indicate that the compensation for defects of nutrients is important when retortable pouched foods are utilized for the dietary therapy of diabetes.

Keywords:糖尿病 diabetes,食事療法 dietary therapy,レトルトパウチ食品 retortable pouched food,ビタミン vitamin,加熱処理 heating treatment,特殊栄養食品 specific nutritive food

緒言

糖質の代謝異常により、腎臓障害、網膜症、神経障害など、重篤な合併症を引き起こす糖尿病は、戦後、増加の一途をたどり、現在では全国に約500万人の患者がいると推定されている.

糖尿病の誘発因子としては、過食、肥満、運動不足、ストレスなどがあげられ、その治療においては、食事療法が重要な役割を果たしている.

この食事療法の基本は、適正なエネルギー量の維持とバランスの良い栄養素の摂取にあるが、一般家庭における食事管理は、必らずしも容易ではない。このため、近年、その食材として、レトルトパウチ製法を用いた、特殊栄養食品の一種である、糖尿病食調製用組合わせ食品の利用が増加している。

著者らは、今回、これら糖尿病食調製用組合わせ食品のビタミン分析を行い、若干の知見を得たので、以下、報告する.

試料および実験方法

- 1. 試料 市販の糖尿病食調製用組合わせ食品, 4 セットについて, 分析を行った. これらは, 調理済のレトルトパウチ食品であり, そのままで, あるいは短時間の加熱のみで, 食用に供することができる. 各セットとも, 3品目の献立から構成され, 1セットあたりのエネルギー量は, 320キロカロリーに調製されている.
- 2. 実験方法 レチノール:勝井らの方法 $^{1)}$ により,試験溶液を調製し,高速液体クロマトグラフィー(以下,HPLC と略す)により定量した.HPLC 条件:カラム;Unisil QC $_{18}$, $250 \times 4.6 \text{mm I. D.}$, 移動相;エタノールー水 (95:5, V/V),流速0.5 ml/min,検出;紫外部吸収 (325nm). β -カロテン:試料をけん化し,ジエチルエーテルにて色素を抽出後,試験溶液を調製 $^{2)}$ し,HPLC により定量した.HPLC 条件:カラム;Nucleosil 100-5, $250 \times 4.6 \text{mm I. D.}$, 移動相;メチルエチルケトン
- *東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1
- *The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
- **東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
- ***東京都衛生局健康推進部健康推進課

-ヘキサン(10:90, V/V),流速1.0ml/min, 検出;可視 部吸収(453nm). ビタミンA効力は,四訂日本食品標準 成分表3)記載の換算方式によった.ビタミン B_1 :試料は,酸による加温抽出,ジアスターゼ処理による酵素分解 を行ない,パームチットカラムにて精製した.なお,定量は,フェリシアン化カリウムを用いるチオクローム蛍光法4)によった.ビタミン B_2 :試料は,酸による加温抽出後,盲蛍光を除去するため,クロロホルムを用いて予浸を行なった.定量は,ルミフラビン蛍光法5)によった.ビタミンC:試料は,メタリン酸を添加後,乳鉢にて磨砕し,抽出を行ない,2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法6)により,定量を行なった.

結果および考察

Table 1 に各項目の結果を示す.

各セットにおいて、レチノール含量は、 $1~30~\mu g$ 、 β -カロテン含量は、 $8~623~\mu g$ 、ビタミンA効力は、113~1079~IUであった。レチノールは、動物性の食品である、肝油、牛、豚の肝臓、バター、チーズ、卵黄等に多く含まれている。今回の献立においては、特に高い含量を示したものはなかった。 β -カロテンは、肉じゃが、おでん、野菜の胡麻和えで、高い値を示したが、これはいずれも、材料にカロテン含量の高いニンジンが用いられたためであろう。ビタミンAの所要量は、成人男子で2000IU、成人女子で1800IU とされている 7 0. 一日三食の食事をとる場合、一食平均600~700IU のビタミンAが必要である。今回のセットの中で、

最低値を示した「さわらの山椒煮セット」では、その 含量は、113 IU にすぎず、その献立構成に改善の余地 があると考えられる.

各セットにおける、ビタミン B_1 含量は、0.07~0.18mgであった、ビタミン B_1 は、植物性食品、動物性食品とも、広く含まれており、今回の分析結果からも、それがうかがえる。ビタミン B_1 の所要量は、1000キロカロリーあたり、0.4mgとされている 7 . 各セットとも、エネルギー量は、320キロカロリーに調製されているので、この場合、ビタミン B_1 は、0.13mg程度は含まれていることが望ましい。今回の分析結果では、「牛肉のごぼう巻セット」で、その半量の0.07mgと、極めて低い値であった。

各セットにおける、ビタミン B_2 含量は、0.19~0.27mgであった。ビタミン B_2 の所要量は、1000キロカロリーあたり、0.55mgとされている 7)、ビタミン B_1 の場合と同様に考えると、1セットあたり、0.18mg程度が、ビタミン B_2 含量の目安となる。今回の分析結果では、どのセットにおいても、この値を越え、満足すべき数値を示した。

各セットにおける、ビタミンC含量は、 $0 \sim 2 \,\mathrm{mg}$ であった。各製品に表示してある原材料名、および、その重量から、四訂日本食品標準成分表 $^{3)}$ の成分値を参考にして、ビタミンC含量を計算すると、「あじの梅煮セット」で $20 \,\mathrm{mg}$ 、「おでんセット」で $8 \,\mathrm{mg}$ 、「牛肉のごぼう巻セット」で $7 \,\mathrm{mg}$ 、「さわらの山椒煮セット」で

		1 ab	1e 1 .	✓ 占里			
	一食重量(g)	レチノール (μg)	β-カロテン(μg)	VA効力(IU)	VB ₁ (mg)	VB ₂ (mg)	VC (mg)
あじの梅煮セット	310	7	275	482	0.18	0.26	0
あじの梅煮	103	0	0	0 .	0.08	0.16	0 .
肉じゃが	121	7	274	480	0.07	0.06	0
もやしの胡麻和え	86	0	1	2	0.03	0.04	0
おでんセット	372	12	623	1079	0.12	0.19	0
おでん	225	12	334	597	0.03	0.09	0
鶏とびじきの煮物	70	0	142	237	0.02	0.04	0
野菜のそぼろ煮	77	0	147	245	0.07	0.06	0
牛肉のごぼう巻セット	366	1	560	937	0.07	0.27	2
牛肉のごぼう巻	90	1	78	133	0.02	0.11	2
野菜の胡麻和え	101	0	478	797	0.03	0.02	0
豆腐のみそ汁	175	0	4	. 7	0.02	0.14	0 .
さわらの山椒煮セット	315	30	8	113	0.10	0.20	1
さわらの山椒煮	135	29	8	110	0.05	0.16	1
大根と貝柱のスープ	134	1	0	3	0.02	0.02	. 0
金時豆の甘煮	46	0	0	. 0	0.03	0.02	0

Table 1. ビタミン含量

28mgとなる. ビタミンCは, 熱や光などに分解しやすい栄養成分であり, 当然, 食品の調理過程においても, その減失がみられる. 今回, 調査に供した組合わせ食品は, レトルトパウチ食品であり, その製造過程においては, 調理後に加熱処理がなされている. このため, より一層, ビタミンCの分解が促進されたものと考えられる.

今や、「国民病」の一つと言ってよい糖尿病においては、患者個人個人の食事療法が、その治療に重要な役割を果たしている。しかしながら、労働形態や生活様式の変化に伴い、「食の外部化」が進みつつある現在、適正な食事管理を自ら行ない得る人は、必ずしも多くはない。また、高齢化社会を迎え、独居患者の増加も予想され、この場合も、その食事管理に困難が伴う。このような状況の中で、手軽に使用できるレトルトパウチ食品の特性をいかした、糖尿病食調製用組合わせ食品は、糖尿病患者にとって、大いに歓迎されるであ

ろう. 今回の分析結果では、特に、ビタミンC含量の低さが顕著であった. 新鮮野菜やフルーツなどを献立にとり入れ、その不足を補い、上手に、これら組合わせ食品を使用していくことが重要であろう.

文 献

- 1) 日本ビタミン学会編:ビタミン学実験法 I, 19-20, 1983, 東京化学同人.
- 2) 同上, 38-39, 同上.
- 3)科学技術庁資源調査会編:四訂日本食品標準成分表,30-33,1988,大蔵省印刷局.
- 4) 日本薬学会編:衛生試験法・注解, 356-359, 1990, 金原出版.
- 5) 同上、361-363、同上。
- 6) 同上, 366-369, 同上.
- 7) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修:第四次改 定日本人の栄養所要量,93-99,1989,第一出版.

報 文 Ⅳ

生活環境に関する調査研究

REPORTS IV

PAPERS CONCERNING ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Ⅳ 生活環境に関する調査研究

観測していく必要があろう.

生活環境に関する調査研究として10編の論文が掲載されている。このうち生活環境がヒトに与える健康影響に関したものが3編,その因子の測定法に関するものが1編,生活環境の汚染調査に関するものが3編,飲料水の衛生に関するものが3編である。

生活環境の中でのヒトの金属に対する影響を頭髪を指標として調査を行った報告では、同一個人の頭髪中のリン、カルシウム、クロム、鉄、銅、バリウムの6元素を月ごとに5年間測定を行っている。季節変動ではカルシウムは年の前半に濃度が高く、リンは年間を通し一定であり、その他の元素は年の後半に高い値を示す固有のパターンが見られた。

ディーゼル排ガスなど大気汚染のヒトへの影響について人肺中の黒色粒子 (炭粉) とベンゾ (a) ピレン (BaP) を測定し検討を行った。この結果,肺中の濃度は個人差があり,最大値は肺乾燥重量 1 g 当たり炭粉 13.6mg,BaP 2.48ngであった。また炭粉と BaP 濃度は正の相関を示し,その濃度は男性が女性よりも高く,加齢と共に増加することが明らかになったが,喫煙が肺中の炭粉の主な蓄積要因ではないとの結果が得られ,大気中の排ガスが主な原因であることを示唆した。炭粉の測定は従来元素分析法により行っているが,光の反射率を測定する分光測色計によって前処理の不十分な試料が測定可能である結果を得た。ディーゼル排ガス粒子中には発がん性を示す物質も含まれることから,排ガス粒子による DNA の損傷性について検討を行っている。粒子と DNA の構成成分である 2 物質を水溶液中で混合したところ,それぞれの物質は化学変化しその度合いは粒子量および反応時間に依存していた。またこの反応には活性酸素が関与しており,ヒトの発がんに活性酸素が関与するといわれることと一致した。生活環境の汚染調査に関して,東京湾に生息する魚類,鳥類の体内化学物質の継続した測定調査では,調査38物質中魚類から17物質,鳥類から12物質を検出し,このうち経年変動が見られる PCB については今年度は減少傾向が見られた。既に使用されていない物質も生体中から検出され環境中の化学物質の生物への影響については今後も

大気汚染の因子である窒素酸化物の幹線道路付近での濃度について気象要因の影響を検討した結果,道路をはさんだ地点で濃度差が見られ二酸化窒素よりも一酸化窒素に差が大きく,その主な要因は風向や風速であり,特に風向による影響が大きい結果を得た.

室内環境について掃除機内のゴミを指標として室内塵の調査を行った。この結果、室内塵は有機成分が70%、無機成分が30%の比率であり、大気塵と逆の比率を示した。また経時、経年変化が見られ特に夏期の塵量と比べ冬期は2倍量になり室内換気の頻度の差による影響と考えられる結果を得た。

飲料水の衛生に関して、水道水源となる河川水中の有機物質について調査を行い約40物質を検出した。この物質中には工場、生活排水由来の有機物質、農薬およびその分解物が含まれ、その濃度は ppt-ppb のレベルであり、浄水処理を行うことからも監視を必要する化学物質を明らかにした。飲料水中のアスベストによる人の健康影響について議論がなされているが、水道配管、環境中から水道水に混入する恐れのあるアスベストの家庭用浄水器による除去について検討を行った。この結果、中空糸膜を用いた浄水器では $0.2-10\,\mu$ m以上のアスベストを除去できたが、活性炭を用いたものでは $10\,\mu$ m以上のものはある程度除去できるが、それ以下のサイズのものは除去できず、器具の浄化法により差が見られた。

水道タンク水から時に見いだされる塩素に抵抗を示すメチロバクテリウムについて検討し環境水,空気,臨床材料からも検出されることを以前に報告している。この菌について分類学的に整理されていないことから,種々の場所から採取した82株について88項目の性状試験を行い分類を試みた。この結果,1-12群に類別され,タンク水由

来株は11,12群に偏在し、環境水 2 群、空気由来 3 群、臨床材料株 5 群と分類され、環境によって性状が異なることを明らかにした。

個人頭髪中の元素含有量(第2報*) (リン,カルシウム,クロム,鉄,銅,バリウムについて)

江波戸 擧 秀**, 中 村 弘**

Elements Content in Private Human Hair(II*)
Phosphorus, Calcium, Chromium, Iron, Copper, Barium

KIYOHIDE EBATO** and HIROSHI NAKAMURA**

Human hair samples were cut from the scalp in the nape or occipital regions of males for 5 years. Then, the sample was digested with HNO₃-H₂SO₄-HCLO₄. Trace metals (P, Ca, Cr, Fe, Cu and Ba) in samples were analyzed by using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES).

The results were as follows.

- 1) The analytical results of elements were compared with the reported values.
- 2) Seasonal index of Ca each month was higher in the first half of the year than in later half of the year. Contrary to the above results ,Cr, Fe, Cu and Ba had a higher seasonal index in the later half of the year than the first half of the year. p showed a constant seasonal index.
- 3) Concerning P and Ca in human hair, there was significant correlation using Spearman' correlation coefficient (by ranks).

Keywords: 毛髪, 頭髪 Human Hair, Hair, 元素 Elements, 金属 Metals, リン Phosphorus, カルシウム Calcium, クロム Chromium, 鉄 Iron, 銅 Copper, バリウム Barium, 高周波誘導結合プラズマ発光分析法 ICP, ICP-AES

緒言

血液¹⁾, 尿²⁾等とともに頭髪中の元素含有量の測定が 食生活,疾病,環境衛生,労働衛生等そのヒトの置か れている健康や生活環境を知る生物学的モニター³⁾のひ とつとして利用されている。そこで,著者らは頭髪の 元素含有量の季節変動の有無,バックグランド値等を 知る目的で定期的に採取した同一個人の5年間の試料 を用い,高周波誘導結合プラズマ発光分析法(ICP -AES)により,測定する元素の発光スペクトルに他元 素の干渉の影響がない,また,発光強度が十分高い等 信頼のおける測定値が得られた亜鉛(Zn),マグネシウム(Mg),リン(P),カルシウム(Ca),クロム(Cr),鉄 (Fe),銅(Cu),バリウム(Ba)の8元素について多元素 同時測定し,前報⁴⁾で Zn 及び Mg について報告した。 今回, P, Ca, Cr, Fe, Cu, Baの6元素について報告 する.

実験の部

1. 試 料

頭髪試料, 試料の採取時期, 採取方法及び洗浄方法 は前報⁴⁾と同じである.

2. 試 薬

硫酸,硝酸,過塩素酸,塩酸:前報⁴⁾と同じである. ICP-AES 測定用標準溶液: Zn, Mg, Ca, Cr, Fe, Cu, Ba の 7 元素は和光純薬工業製,P は関東化学製原子吸光分析用標準液(1000ppm)を0.5N塩酸で希釈混合して用いた.

3. 装置

ICP-AES は前報⁴⁾と同じ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. ホットプ

^{*}第1報, 東京衛研年報, **44**, 195-198, 1993.

^{**}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

レートはサーモライン社製の1900型を使用した.

4. 試験方法

試験方法は前報4)と同じである.

結果及び考察

1. 元素含有量について

今回、報告する元素の含有量の範囲、平均値±標準 偏差(n=60) は Table 1 に示した. 各元素の最低値と最 大値の倍率を比較すると、Pは1.6倍、Caは3.7倍、Cr は25倍、Fe は7.9倍、Cu は2.5倍、Ba は11倍であった. Cr の25倍を最高倍率として, Ba も11倍と2桁の倍率を 示した. 同一個人の測定値においてもこのような高い 倍率を示す元素もあることから、頭髪元素バックグラ ンド値の比較を行う場合,注意する必要がある.また, 測定した元素の平均値を他の報文と比較すると、P の平 均値は191ppmを示した。日本人男性と比較すると、 Kamakura⁵⁾の172ppm,大森ら⁷⁾の性別不明の101ppm, 江波戸ら⁸⁾の男子児童の98.1ppmより高かった. Ca の 平均値は344ppmを示した. 日本人男性と比較すると Kamakura⁵⁾の642ppm, 今堀⁶⁾の946ppm, 高橋ら⁹⁾の 486ppm, 大森ら⁷⁾の性別不明の890ppm, 江波戸ら⁸⁾の 男子児童の553ppmより低値であった. Cr の平均値は 0.58ppm を示した. 日本人男性と比較すると Kamakura⁵⁾の0.33ppmより高値で、江波戸ら⁸⁾の男子 児童の0.80ppmより低値であった. Fe の平均値は 10.1ppm を示した. 日本人男性と比較すると Kamakura⁵⁾の27.8ppm,大森ら⁷⁾の性別不明15ppm, 江波戸ら⁸⁾の男子児童の28.5ppmより低値, 高橋ら⁹⁾の 9.0ppmより高値であった. Cu の平均値は15.8ppmを示 した. 日本人男性と比較すると Kamakura⁵⁾の12.4ppm, 高橋ら⁹⁾の13.8ppm, 大森ら⁷⁾の性別不明の8.8ppm, 江波戸ら8)の男子児童の6.48ppmより高値,今堀6)の 18.0ppmより低値であった. Ba の平均値は0.23ppmを 示した. 江波戸ら8)の男子児童の0.89ppmより低値で あった. 今回, 得られた平均値は, 上記に記載した含 有量の最高値と最低値の倍率、及び下記に記載した月 別平均値の最高値と最低値の倍率を考慮に入れるとほ

 $Table\ 1\ .\ Contents\ of\ Element\ in\ Hair$

Element	Range	$Mean \pm SD$
P	155 - 247	191 ± 20
Ca	¹ 150 −554 .	344 ± 99
Cr	0.07 - 1.76	0.58 ± 0.38
Fe	5.5 - 43.4	10.1 ± 6.0
Cu	9.3 - 22.8	15.8 ± 3.7
Ba	0.07 - 0.78	0.23 ± 0.13

(n=60) (ppm)

ぼ他の報文の数値と近似していると思われた.

2. 元素の月別測定値の均一性

Table 2.3 に示した P, Ca, Cr, Fe, Cu, Ba の月 別測定値 (n=5) の分散の均一性の検定 (Bartlett Test) を 行ったところ, 有意水準 5 %で P, Ca, Cr, Cu の 4 元 素が均一性を示したが, Fe, Ba の分散はそれぞれ54.4, 43.2となり, 有意水準0.1%でも均一性を示さなかった.

3. 月別測定値の比較

頭髪中の測定した月別元素含有量の平均値を比較した. Pは6月の203ppmが最高値, 11月の177ppmが最低値となり, 1.1倍の平均値の差があり, Ca は5月の432ppmが最高値, 12月の237ppmが最低値となり, 1.8倍の平均値の差があった. Cr は9月の0.79ppmが最高値, 1月と10月の0.44ppmが最低値となり, 1.8倍の平均値の差があり, Fe は2月の14.6ppmが最高値, 3月の6.9ppmが最低値となり, 2.1倍の平均値の差があった. Cu は10月の19.1ppmが最高値, 1月の13.7ppmが最低

Table 2. Contents of Element in Hair by Month

Month	P	Ca	Cr
1	191 ± 18.7	301 ± 95.6	0.44 ± 0.22
2	200 ± 24.1	340 ± 100	0.65 ± 0.18
3	197 ± 13.3	380 ± 71	0.52 ± 0.43
4	196 ± 8.7	403 ± 64.4	0.49 ± 0.41
5	200 ± 16.1	432 ± 66.7	0.49 ± 0.52
6	203 ± 22.1	409 ± 68.6	0.53 ± 0.25
7	198 ± 30.3	417 ± 99.9	0.68 ± 0.48
8	180 ± 19.9	333 ± 96.4	0.61 ± 0.44
9	180 ± 20.9	323 ± 61.3	0.79 ± 0.58
10	182 ± 13.2	. 298± 86.9	0.44 ± 0.33
11	177 ± 17.9	257 ± 110	0.62 ± 0.33
12	186 ± 20.0	· 237 ± 79.3	0.69 ± 0.48
(n=5)		-	(Mean ± SDppm)

Table 3. Contents of Element in Hair by Month

Month	Fe	Cu	Ва
1	7.1 ± 0.6	13.7 ± 2.95	0.26 ± 0.29
2	14.6 ± 16.2	15.6 ± 3.16	0.13 ± 0.04
3	6.9 ± 1.6	14.8 ± 5.05	0.14 ± 0.03
4	7.7 ± 2.3	14.6 ± 4.19	0.14 ± 0.03
5	11.7 ± 7.3	15.0 ± 2.67	0.22 ± 0.12
6	9.7 ± 4.9	14.8 ± 4.40	0.16 ± 0.04
7	10.4 ± 3.9	14.5 ± 4.73	0.24 ± 0.10
8	12.3 ± 5.3	15.5 ± 3.29	0.35 ± 0.16
9 -	11.2 ± 2.2	19.0 ± 3.79	0.36 ± 0.10
10	12.8 ± 5.9	19.1 ± 2.64	0.35 ± 0.07
11	8.4 ± 1.6	17.4 ± 2.00	0.28 ± 0.10
12	8.2 ± 2.7	15.3 ± 3.44	0.18 ± 0.04
			,

 $(n=5) (Mean \pm SDppm)$

値となり、1.4倍の平均値の差があり、Ba は9月の0.36ppmが最高値、2月の0.13ppmが最低値となり、2.8倍の平均値の差があった.上記の結果、月別平均値の最高値、最低値の差の大きな元素はBa の2.8倍でPの1.1倍が最も小さかった.最高値、最低値の差の大きな

元素を比較すると Ba>Fe>Ca>Cr>Cu>P の順であった.

4. 季節指数

各元素の年間平均値を100とした,季節指数は Table 2.3 に示した測定値をグラフ化した Fig. 1 に記載した.

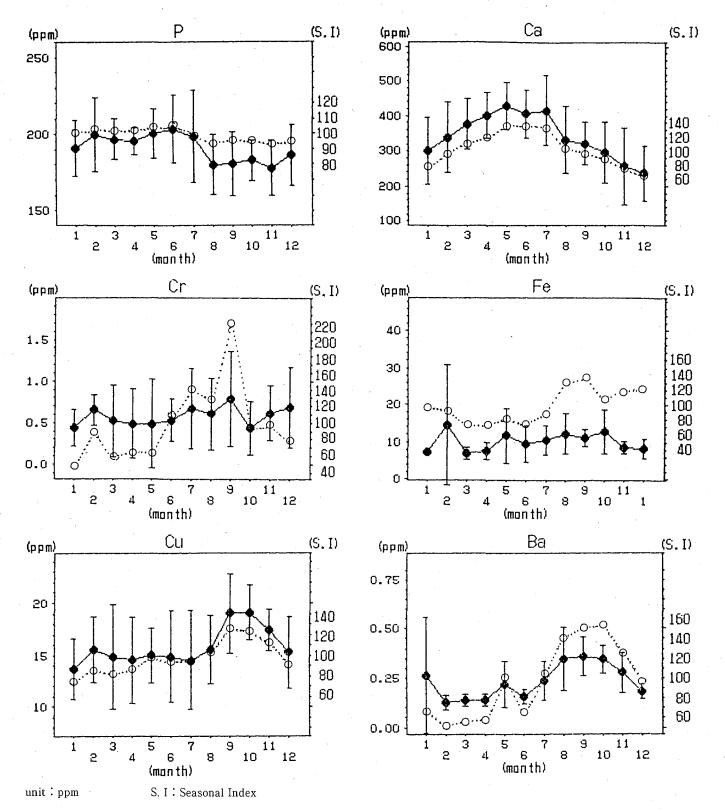


Fig. 1. Seasonal Changes of the Element in Private Hair.

The symbols indicate contents of element (●), seasonal index (○) by month.

Table 4. Spearman's correlation coefficient (by ranks) of Contents of Element in Hair

	P	Ca	Cr	Fe	Cu	Ba
P.	1.00	0.73	-0.50	-0.33	-0.39	-0.34
Ca		1.00	-0.47	-0.16	-0.39	-0.01
Cr			1.00	0.48	0.34	0.03
Fe				1.00	0.22	0.49
Cu					1.00	0.18
Ba						1.00

各元素の季節指数によると、Pはほぼ一定の季節指数を示し、Caは6月を頂点とした季節指数が高い山型、Cr(9月)、Fe(9月)、Cu(9月)、Ba(10月)は()内に示す月を頂点とした年の後半に季節指数が高い山型を示した。すなわち、P以外の元素は年間を通じて山型から谷型、谷型から山型のパターンを示した。例数が1例のため、これら元素のパターンが個人的な特徴か普遍的特徴か不明で、今後調査する必要がある。

5. 元素間の相関について

P, Ca, Cr, Fe, Cu, Ba 間の Spermann の順位相関を求め、Table 4 に示した. その結果. P-Ca に相関係数0.73の相関があった.

まとめ

頭髪元素含有量の季節変動等のバックグランド値を 得る目的で、同一個人の5年間の月別元素含有量を測 定し、P、Ca、Cr、Fe、Cu、Ba について下記の結果を 得た.

- 1. 月別元素含有量平均値の最高値と最低値の倍率の大きい元素はBa>Fe>Ca>Cr>Cu>pの順であった.
- 2. 1年間の元素含有量平均値を100とした各元素の季節指数によると、Ca は年の前半に季節指数が高い山型、Fe、Ba、Cr、Cu は年の後半に季節指数が高い山型、P はほぼ一定の季節指数を示した.
- 3. 頭髪中 P 及び Ca の含有量に相関性があった. (本研究の概要は日本微量元素学会第 5 回大会1994年6月で発表した.)

文 献

- 1) 安井昌之, 大田喜一郎: Biomed. Res. Trace Elements, **5**, 41-46, 1994.
- 2) 吉永淳:Biomed. Res. Trace Elements, **5**, 47-51, 1994.
- 3) 寺岡久之, 小林純:日衛誌, 32, 574-587, 1977.
- 4) 江波戸擧秀,中村弘:東京衛研年報, **44**, 195-198, 1993.
- 5) Kamakura, M.: Jpn. J. Hyg., **38**, 823-838, 1983.
- 6) 今堀彰:臨床検査 Mook, 22, 192-201, 1985.
- 7) 大森佐与子, 町田和彦:第54回日本産業衛生学会 要旨, 660-661, 1981.
- 8) 江波戸擧秀, 神谷信行, 二島太一郎:第40回日本公衆衛生学会要旨, 342, 1981.
- 9) 高橋祐子, 今堀彰, 塩原正一他:第45回日本公衆衛生学会要旨, 856, 1986.

東京湾の環境汚染モニタリング(第12報*) 平成4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**

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay(XII *) Residue Levels in Japanese Sea Bass and Gull in 1992

TOMOKO OHKUBO** and HIROSHI SETO**

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⁾.

これまでの化学物質による環境汚染は、使用禁止後20年を経過した現在でも、魚類や鳥類から高濃度に検出される PCB のように、難分解性、高蓄積性、慢性毒性の性状を有する物質の汚染であった. しかし近年、トリクロロエチレン等の塩素系溶剤による地下水汚染問題のように、難分解性、高蓄積性、慢性毒性の性状を併せ持たないが、環境汚染を通じてヒトの健康に悪影響を与える恐れのある化学物質の存在が指摘されている.

化学物質は、人間の社会や生活の向上に役立つ場合もあるが、ヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性もある. このことを未然に防ぐために、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4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4年10月神奈川県横須賀沖で捕獲された15尾を重量の順に3尾ずつまとめ5検体とした。ウミネコは、平成4年5月から9月にかけて羽田空港付近で捕獲された若鳥を採取日の順に7羽ずつまとめ5検体とした。鑑定及び試料の調製は、前報¹⁾と同様に行った。試料の概要はTable 1、2に示した。

分析方法 環境庁で定めた分析法²⁾により行った. 詳

細な操作法、及び分析条件は報告書3)に記載した.

分析対象とした化学物質は38種類であり、使用した 略語は、前報¹⁾と同様である.

試薬及び分析装置は、前報¹⁾と同様のものを使用した.

結果及び考察

スズキについて スズキ可食部中の化学物質を測定 した結果を Table 3 に示した. PCB 濃度は平均0.26 µg /gで、高濃度であった昨年度の半分以下に減少した. ディルドリン濃度は平均0.002 μg/gで, 例年と同程度 の汚染であった. DDT 類濃度は平均0.030 µg/gで, 昨 年度よりも減少はしたものの、年度により変動があり、 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. クロルデン類の濃度は、平均0.017 µg/g であった. HCH 類は、今年度も検出されなかった. 塩 素化ベンゼン類濃度は平均0.05 μg/gで, 昨年度の汚染 濃度の半分であった.調査開始以来,昭和62年度まで は DCB の汚染は、p-DCBよりもo-DCB、m-DCB の方 が高かった. しかし、最近5年間では、o-DCB、m-DCB は全く検出されず、p-DCB のみが検出されている. 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0.18 µg/gで、昨年度よりも減少 し、一昨年度と同程度の汚染であった。 TPT 濃度は平 均0.12 μg/gで、減少傾向がみられる.

ウミネコについて ウミネコ胸筋中の化学物質を測定した結果を Table 3 に示した. PCB の濃度は、平均 $1.2\,\mu\mathrm{g/g}$ であった. ディルドリン濃度は平均 $0.009\,\mu\mathrm{g}$ /gで、昨年度と同程度の汚染濃度であった. DDT 類の濃度は平均 $0.33\,\mu\mathrm{g/g}$ で、昨年度と同程度であった. ク

^{*}第11報, 東京衛研年報, **44**, 199-201, 1993.

^{**}東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{**}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

Table 1. Constitution of the Sample (Sea Bass) and Water and Fat Contents of the Muscle. (n=3)

No	body weight(g)	length* (cm)	water(%)	fat (%)
group No.	mean ± SD	mean±SD	water (70)	1at (70)
1	1040 ± 25	41.9 ± 1.3	72.9	4.48
2	977 ± 36	42.2 ± 1.6	75.5	2.94
3	881 ± 61	40.8 ± 1.9	75.2	2.56
4	767 ± 17	37.2 ± 0.6	73.3	3.22
. 5	695 ± 85	36.7 ± 1.5	72.2	3.71
mean	872	39.8	73.8	3.38

^{* :} not included the part of tail fin

Table 2. Constitution of the Sample (Black-Tailed Gull) and Water and Fat Contents of the Muscle. (n=7)

group	~~	body weight(g)	wing length(cm)	water(%)	fot (%)	
No.	sex	mean \pm SD	mean \pm SD	water (70)	1at (%)	
1	mix	572 ± 62	35.7 ± 1.4	64.9	6.20	
2	mix	596 ± 96	35.5 ± 1.1	63.0	6.23	
3	mix	588 ± 64	35.9 ± 0.8	62.9	6.51	
4	mix	508 ± 64	35.3 ± 1.7	66.5	5.95	
5	mix	556 ± 96	36.0 ± 2.1	69.0	5.34	
mean		564	35.7	65.3	6.05	

Table 3. Concentrations of Pollutants in Muscle Tissues of Sea Bass and Black-Tailed Gull.

•	Sea Bass	S	Black-Tailed Gull		
compound	range ^a	mean ^a	range ^a	mean ^a	
PCB*1	0.16-0.38	0.26	0.74-1.4	1.2	
PCN * 2	nd	nd	nd	nd	
HCB	nd	nd	0.005-0.006	0.006	
aldrin	nd	nd	nd	nd	
dieldrin	0.001-0.003	0.002	0.007-0.011	0.009	
endrin	nd	nd	nd	nd	
o, p'-DDT	nd	nd	nd-0.002	- .	
p, p'-DDT	0.001-0.003	0.001	nd	nd	
o, p'-DDE	0.002-0.006	0.003	nd	nd	
p, p'-DDE	0.009-0.049	0.021	0.25-0.46	0.33	
o, p'-DDD	nd-0.001	· <u>-</u>	nd	nd	
p, p'-DDD	0.003-0.009	0.005	nd-0.001	-	
trans-chlordane	nd-0.003	- .	nd	nd	
cis-chlordane	0.003-0.009	0.005	0.004-0.009	0.006	
trans-nonachlor	0.004-0.014	0.008	0.045-0.10	0.061	
cis-nonachlor	0.002-0.007	0.004	0.017-0.054	0.027	
oxychlordane	nd-0.001	- .	0.011-0.019	0.015	
heptachlor	nd	nd	nd	nd	
HCE	nd	nd	0.003-0.005	0.004	
α -НСН	nd	nđ	nd	nd	
β -HCH	nd	nd	0.007-0.011	0.009	
γ-нсн	nd	nd	nd	nd	
δ-НСН	nd	nd	nd	nd	
o-DCB*1	nd	nd	nd	nd	
<i>m</i> -DCB*1	nd	nd	nd	nd	
<i>p</i> -DCB*¹	0.04-0.06	0.05	nd	nd	
1,2,3-TrCB	nd	nd	nd	nd	
1,2,4-TrCB	nd-0.001	=	nd	nd	
1,3,5-TrCB	nd-0.002	=	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*3	nd	nd	nd	nd	
DEHP*3	nd	nd	nd	nd	
TBP*1	nd	nd	nd	nd	
TBT*4	0.12-0.25	0.18	nd	nd	
TPT*5	0.11-0.13	0.12	nd	nd	

a: $(\mu g/g$ on wet weight basis)

^{*1:}nd<0.01, *2:nd<0.02, *3:nd<0.1, *4:nd<0.002, *5:nd<0.005, others:nd<0.001

ロルデン類濃度は、過去 4 年間減少傾向がみられたものの、今年度は昨年度の約 2 倍の平均 $0.109 \mu g/g$ であった。 β -HCH 濃度は、減少傾向が見られており、今年度は調査開始以来最低の平均 $0.009 \mu g/g$ を示した。塩素化ベンゼン類は調査開始以来初めて全く検出されなかった。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 は、昨年度に続き今年度も検出されなかった。

環境庁では、昭和63年度より一般環境中での TBT, TPT の残留状況を把握するため、全国の水質、底質の 調査を行っている. 平成4年度の全国34地区(10河川, 4 湖沼, 20海域)の水質, 底質の調査結果は次の通りで あった4)、TBT の水質、底質からの検出範囲はそれぞ れ nd ~ 0.084ppb, nd~420ppb (昭和63年度は nd~ 0.11ppb, 0.4~230ppb, 以下同じ), 検出頻度はそれぞ れ52/99、88/102(31/45、44/45)、地区別にみると、そ れぞれ33地区中20地区、34地区中31地区(15地区中11地 区,15地区すべて)であり、水質について、これまでの 調査結果と比較すると低減の兆しがみられる. また, TPT の水質、底質からの検出範囲はそれぞれ nd~ 0.044ppb, nd~90ppb (nd~0.088ppb, nd~600ppb), 検出頻度はそれぞれ10/90, 57/95(36/54, 43/55), 地 区別にみると、それぞれ30地区中5地区、32地区中22地 区(18地区中14地区、19地区中17地区)であり、水質に ついて、これまでの調査結果と比較すると低減してい る. 昭和62年2月に全国漁業協同組合連合会及び社団 法人全国かん水養魚協会が、養殖用漁網防汚剤として TBT, TPT の自主的な使用禁止措置をとっている. 社 団法人日本定置漁協協会は、定置網への使用を平成2

年1月以降自主的に行わないことに決定した. ビス(ト リブチルスズ) = オキシド(TBTO) は平成2年1月に化 学物質の審査及び製造等の規制に関する法律による第 一種特定化学物質に、TBTO を除くTBT 化合物13物質 (トリブチルスズ=メタクリラートなど)は平成2年9 月に,TPT 化合物 7 物質(トリフェニルスズ=クロリド など) は平成2年1月に第二種特定化学物質に指定され た. 運輸省, 水産庁は, 漁網防汚剤や船底防汚塗料に TBT, TPT を使用しないよう指導した(平成2年7月及 び10月). TPT は農薬登録も平成2年9月に失効し、農 薬としての使用も中止されている. これらの規制によ り TBT, TPT は使用量が激減し、環境中の汚染濃度に 減少傾向がみられるものの、まだ広範囲に残留してい る. 底質中の TBT 濃度が上昇した地区もあり、TBT は難分解性であることから、底質中に長くとどまる可 能性もある. このことから、引き続き TBT、TPT の環 境汚染対策を推進するとともに、環境汚染状況を監視 していく必要がある.

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:東京衛研年報, **44**, 199-201, 1993.
- 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4年度生物モニタリング結果報告書,1993.
- 4)環境庁編:化学物質と環境,平成5年12月.

分光測色計による肺中炭粉濃度の測定

大久保 智 + *, 瀬 戸 + *,

Measurement of Elemental Carbon Deposited in Lung by Spectrocolorimetry

TOMOKO OHKUBO*, HIROSHI SETO*, KAZUO OHNISHI and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: 炭粉 elemental carbon,分光測色計 spectrocolorimeter,元素分析 elemental analysis,黑色度 the degree of black color

緒言

大気汚染による健康への影響が社会的関心を呼んでいるが、これまでの大気汚染における規制対策は、窒素酸化物や硫黄酸化物などガス状物質への対策が主であった。しかし最近、大気中の浮遊粒子状物質が呼吸器系疾患を引き起こしているとして、その削減対策が検討され始めている。特に、浮遊粒子状物質の発生源の1つとしてディーゼルエンジン車の排ガスがある。このディーゼル排ガス中のディーゼル粒子は、炭粉の表面に発がん性のある多環芳香族炭化水素やニトロアレーン類などを吸着したものであるため、ヒトの健康への影響が懸念されている。

我々は、ディーゼル排ガスを暴露したラットの肺中 に多環芳香族炭化水素が残留することを報告した¹⁾が、 同時に多環芳香族炭化水素が肺に残留する際の保持母 体である炭粉の存在の重要性について指摘した. 大気 汚染物質の暴露量を知る上で、肺に蓄積した炭粉量を 測定することが重要であると考え、その分析法につい て検討し、報告した²⁾. 分析法としては、肺組織をアル カリ分解し、ガラス繊維フィルターを通して炭粉を捕 集し、元素分析計により炭素量を測定する方法を確立 した.しかし、前処理が十分に行われなかった場合に、 フィルター上に残存している有機物中の炭素量が加え て読み込まれるために、実際の炭粉量よりも高い値に なってしまうなど欠点もあった. 今回は, 分光測色計 を用いてフィルター上の炭粉の黒色度を測定し、これ より炭粉量を測定する方法を検討したので、その結果 を報告する.

試料及び分析方法

試料 肺臓は、都立病院との共同研究による大気汚染物質の蓄積量調査のために供与されたものである.

試薬 エタノール, n-ヘキサンは残留農薬試験用, その他の試薬は特級を使用した.

装置 分光測色計:ミノルタカメラ(株) CM-2002, 元素分析装置:パーキンエルマージャパン CHN 2400

分析方法

操作 ガラス繊維フィルターとしてワットマン GF/F を用いた以外は、既報²⁾の通りである。すなわち、試料 約50gについてアルカリ分解後、有機物を抽出除去した アルカリ画分をろ過し、炭粉をフィルター上に捕集して試料とした。

定量法1. 分光測色計による方法:分光測色計の光源をD₆₅(紫外域を含む昼光で照らされている物体色の測定用光源),視野を2°, 受光光学系をSEC(正反射光除去)に設定し,一試料フィルターについて異なる3カ所の反射率を測定し,その平均値を黒色度とした. この値と定量法2で測定した炭素量との相関よりフィルター上の炭粉量を求めた.

定量法 2. 元素分析法:フィルターをスズ箔に包み、 元素分析計で燃焼させ、炭素量を測定した. 参考に、 水素、窒素量も測定した.

結果及び考察

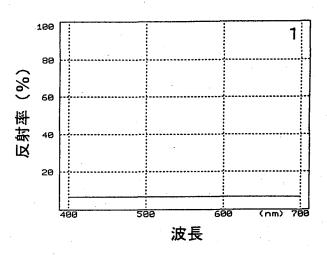
分光測色計は、対象物質の色の明度、色相、彩度を 測定して数値化するとともに、400~700nmの波長の光 の反射率を測定して、「色の正体」を知ることができる 装置である. はじめに、ガラス繊維フィルター上に捕 集した炭粉の黒色度の数値化について検討した.

^{*}東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町 3 -24-1

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

黒色度を反射率と明度で数値化することを考えた. 今回用いた分光測色計は、400~700nmまで10nmごとに 反射率の測定が可能である. 黒色以外に色が存在しな ければ、波長を変化させても反射率は一定と考えられ る. 試料フィルターの400~700nmまでの反射率をグラ フ化したものを図1に示した. 図1-1の試料の反射率 は、波長を400~700nmまで変化させても、一定であっ た. 前処理が十分に行われ、フィルター上には、炭粉 のみが残ったと考えられる. 試料の400nmと700nmの反 射率の関係を求めたところ、相関係数0.99でよく相関 していた(図2). また,前処理が不十分であったため, 肉眼的に黄色がかって感じられる試料の反射率を測定 すると、図1-2に示すように、長波長になるにつれ反 射率が増加していくことがわかった. 黄色い色調は, 残存している有機物によるものである. そこで、黄色 がよく吸収される短波長ならば有機物の存在に左右さ れないと考え、以後の実験には400nmにおける反射率を 用いることにした.

次に、図3に試料フィルターの400nmにおける反射率と元素分析計による炭粉量との関係を示した。炭粉量



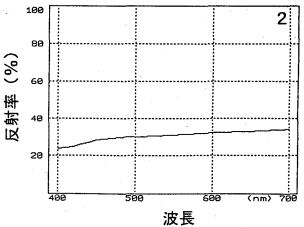


図1. ガラス繊維フィルターに捕集した炭粉の 400~700nmの光における反射率

の増加とともに反射率は減少することがわかった. 反射率を対数に変換し、元素分析値との関係を調べたのが図 4 である. 回帰方程式は y=1.03 $x^{0.5}$ (x:元素分析値、<math>y:-Log 反射率)、相関係数0.82という関係が認められた. この図から、1 mg以下の範囲でならば反射率による炭粉量の測定が可能と考える. なお、今回

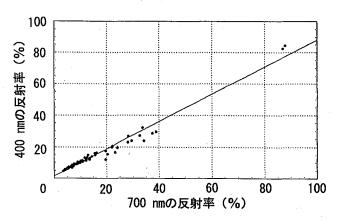


図 2. ガラス繊維フィルターに捕集した炭粉の 400nmと700nmの光の反射率の関係

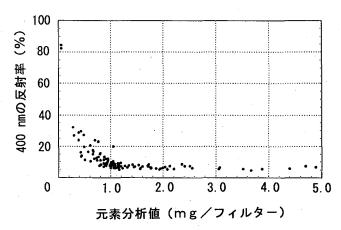


図3. ガラス繊維フィルターに捕集した炭粉の 400nmの光における反射率と元素分析値の関係

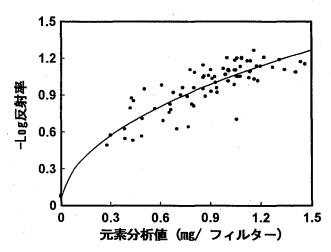


図4. 対数変換した反射率と元素分析値の関係

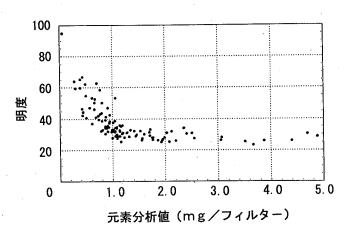


図5. ガラス繊維フィルターに捕集した炭粉の 明度と元素分析値の関係

の実験では、反射率40-80%の試料を調製できなかった ため、この範囲のデータが欠落したが、今後の課題と したい.

一方,図5に示すように、明度と炭粉量の関係を求めたところ、明度も反射率と同様、炭粉量の増加とともに減少したが、炭粉量が1mgを超えると明度は変化せず、また1mg以下でも反射率に比べると数値にバラツキが大きいことがわかった。したがって、黒色度の測定には、反射率の方が明度よりも適していると考えられた。

なお, ガラス繊維フィルターのみを測定したところ 反射率は84.49%, 明度は94.94であり, 100%光を反射 することはなかった.

分光測色計による方法の特徴は、明度、色相、彩度を示す図により、どの方向の色(赤方向、黄方向、緑方向 青方向)かがわかることである(図 6). 図 6-1では、図 1-1 と同じ試料であるが、ほぼ原点に位置しており無色であることがわかる。図 6-2 では、図 1-2 と同じ試料であるが、原点からはずれ、黄方向に色を持っていることがわかる。

以上のことから、分光測色計を用いる方法は、炭粉の黒色度を400nmにおける反射率、または明度によって測定するため、元素分析計のようにフィルターに残存している有機物中の炭素が炭粉量として過度に測定されることは少ない、また、元素分析計のようにガラス

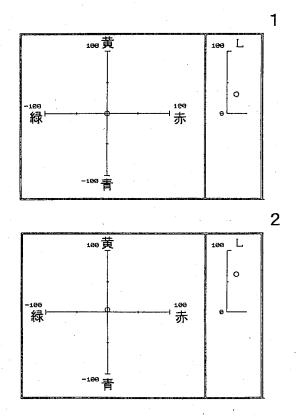


図 6. ガラス繊維フィルターに捕集した炭粉の 表色系色度図

L:明度

繊維フィルターの細断や、スズ箔包みなどの、測定のための下準備が不要であり、また、試料フィルターも消失せずに保存できる非破壊分析法である.しかし、分光測色計による測定範囲は、1 mg/フィルター以下で、非常に狭く、実試料では5 mg/フィルターくらいの測定範囲が必要なため、実際の測定では試料量を減らして、フィルターに捕集する炭粉量を少なくするなどの工夫が必要と考える.

文 献

- 1) 大久保智子, 瀬戸 博, 大沢誠喜 他: 東京衛研 年報, **39**, 193-197, 1988.
- 2) 瀬戸 博, 大久保智子, 加納堯子:東京衛研年報, **40**, 271-273, 1989.
- 3) 色を読む話, ミノルタカメラ株式会社.

肺に残留する黒色粒子とその蓄積要因について

瀬 戸 博*, 大久保 智 子*, 渡 辺 伸 枝*, 大 西 和 夫*, 鈴 木 重 任*
小 池 盛 雄**, 中 村 恭 二***, 川 原 穣****

Black Dust Matter in Human Lung and Causes of the Deposition

HIROSHI SETO*, TOMOKO OHKUBO*, NOBUE WATANABE*, KAZUO OHNISHI*, SHIGETOH SUZUKI*

MORIO KOIKE**, KYOUJI NAKAMURA*** and YUTAKA KAWAHARA****

Keywords: 肺 lung, 炭粉 carbon, ベンゾ(a) ピレン benzo(a) pyrene, タバコ cigarette, ディーゼル排ガス diesel exhaust

緒 言

近年,肺がんの死亡率が上昇しており,既に男性では肺がんが胃がんの死亡率を上回った¹⁾と報告されている.肺がんの原因は主に喫煙と考えられている²⁾.また,大気汚染との関係³⁾を指摘する研究者も多い.特に,ディーゼル車の排ガス中にはベンゾ(a)ピレン(以下,BaP と略す)に代表される発がん性の化学物質が多く含まれていることから,健康への影響が社会的問題となっている.ディーゼル排ガスの中では,ガス成分よりも粒子状物質が発がんと関係しているとみられている⁴⁾.ディーゼル車の排出する黒煙は炭粉微粒子の表面にBaP などが吸着したものである.

都市の大気をフィルターを通して吸引すると黒い粉塵が捕集される.この粉塵の総体は浮遊粒子状物質 (SPM)と呼称され、土ぼこり、砂塵、煤煙、自動車の排ガスなど多種多様な物質の混合物である. SPM の黒い色は元素状炭素(炭粉)によるもので、主として熱分離法を組合わせた元素分析計で分析されている. しかし、ヒト肺中の炭粉濃度及び BaP 濃度を定量的に分析し、疾病等種々の要因との関係を研究した報告はほとんどない.

我々は、ディーゼル排ガスを暴露したラットの肺中に炭粉を主体とする黒色粒子成分(炭粉及び BaP 等)が長期間残留すること、また炭粉が BaP の保持母体となっていることを確認した⁵⁾. さらに、ヒトの肺に蓄積

した BaP 濃度を測定し、男性においては肺がん傾向と BaP 濃度との間に関係があることを報告した $^{6)}$.

我々は、ヒト肺中のBaPを分析する際、多量の黒色 粒子の存在を認めた、ヒト肺中の黒色粒子の成分は炭 粉、タールの他、種々の無機塩・酸化物等が複合した ものであるが、黒色度は主に炭粉に由来すると考えら れる。今回は、炭粉に着目してこれを化学的に分離・ 分析し、BaPとの相関、年齢、性差、喫煙歴の影響、 さらに、タバコ煙など黒色粒子の蓄積要因について検 討したので報告する。

実 験

試料: 試料は共同研究先である都内 3 病院の剖検例のホルマリン固定された肺 (1986~1992年)を用いた. 試料の概要を表 1 に示した. また,当所吸入実験装置により,小型ディーゼルエンジン排ガス(粒子量5.6mg/m³,NO $_2$ 4.1ppm)を1 日 8 時間,週 5 日で12 $_7$ 月間吸入させたラット (F344/DuCrj)の肺組織を光学顕微鏡により観察した.

分析方法:肺中の BaP の分析は既報⁶⁾ の要領で行った. 肺中の炭粉の測定も既報⁷⁾の元素分析法により行った. **肺組織の光学顕微鏡による観察**:10%ホルマリンで固 定後,常法に従ってパラフィン包埋し,厚さ5μmのパ ラフィン切片を作製し,ヘマトキシリン・エオジン染 色を行った.

タバコの燃焼により生成する粉塵の捕集とフィルター

^{*}東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町 3 -24-1

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

^{**}東京都立駒込病院

^{***}東京都立府中病院

^{****}東京都立広尾病院(現職 東京都立墨東病院)

	標本数	年齢(X±SD)	Min.	Max.
全体	665	66.5±13.8	3M	97
全体	419	66.5 ± 13.6	3M	97
男 喫煙者	241	66.9 ± 12.2	26	92
非喫煙者	74	66.6 ± 15.5	3M	97
不明	104	-	-	-
全体	246	66.5 ± 14.1	13	91
女 喫煙者	45	65.3 ± 13.1	29	86
非喫煙者	132	66.4 ± 12.9	13	90
不明	69	- .	=	-

表1. 試料概要

X±SD:平均値±標準偏差,3M:3ヶ月

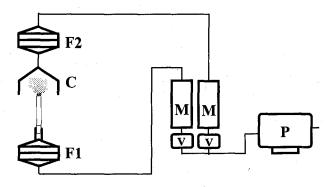


図1. タバコ燃焼粉塵の捕集装置

C: 副流煙捕集用フード,F 1: 主流煙捕集用フィルター,F 2: 副流煙捕集用フィルター,M: 流量計,P: ポンプ,V: 流量制御バルブ

処理:市販の紙巻きタバコ(表示タール12mg, 活性炭フィルター付き)を図1に示すような装置を用いてクリーンベンチ内で燃焼させ、主流煙、副流煙中の粒子状物質をあらかじめ恒量にしたガラス繊維フィルター(ワットマンGF/F 47mm径)に捕集した。主流煙の吸引速度は37ml/minとした。タール・粉塵重量を測定後、20mlのベンゼン/エタノール(3:1)溶液で2回洗浄した。フィルターを乾燥させ、20mlの10%水酸化カリウム水溶液を加えて70℃に30分間加温した。水洗後、20mlの濃塩酸に10分間浸した。フィルターを水洗、アセトン洗浄した後、105℃で1時間乾燥させた。

結 果

1. ヒト肺中の炭粉及び BaP の測定結果

写真1,2にヒト肺組織からガラス繊維フィルター上に分離された炭粉を示した.肺重量約10gから分離されたもので、比較的軽度な汚染例と重度な汚染例を示した.表2にヒト肺中の炭粉及びBaPの測定結果を示した.データは乾燥させた肺1g当たりの重量比(重量濃度)で示した.対数変換したデータのヒストグラムは正規分布曲線に近似できたので、平均値の差の検定は

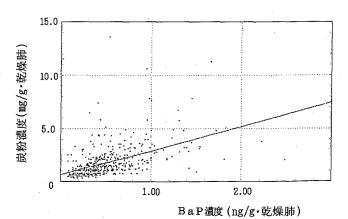


図2. 肺の炭粉濃度と Bap 濃度との関係

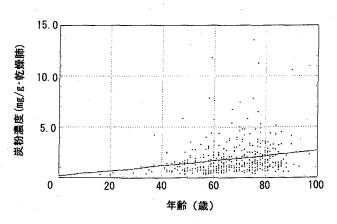


図3. 肺の炭粉濃度と年齢との関係

対数変換後の数値を用いて Student の t 検定を行った. 炭粉濃度の最大値は13.6 mg/g, BaP 濃度の最大値は 2.48 ng/gで,同一検体ではないが、いずれも男性であった.

2. 炭粉-BaP間の相関

図 2 に炭粉 (Y) - BaP (X) 間の相関を示した. 回帰式は Y=2.275X+0.623で、相関係数 (r) は 0.517 であった.

3. 年齢 一炭粉間の相関

図3に年齢(X) - 炭粉(Y)間の相関を示した. 図に示した直線の回帰式はY=0.0247X+0.191で, 相関係数(r)

		標本数	炭粉(X±SD)	Min.~Max.	$BaP(\bar{X}\pm SD)$	Min.~Max.		
			(mg/g di	y lung)	(ng/g dry lung)			
全位	本	665	1.84 ± 1.52	nd~13.6	0.54 ± 0.34	0.08~2.48		
	全体	419	2.05 ± 1.70	nd~13.6	0.61 ± 0.37	0.08~2.48		
男	喫煙者	241	2.14 ± 1.79	0.3~11.8	0.62 ± 0.38	0.08~2.23		
	非喫煙者	喫煙者 74 2.26±2.20		nd~13.6	0.55 ± 0.31	0.08~1.45		
	不明	104	-	-	-	-		
	全体	246	1.51 ± 1.10	0.3~7.8	0.41±0.22	0.08~1.42		
女	喫煙者	. 45	1.55 ± 1.02	0.3~4.9	0.39 ± 0.21	0.08~1.03		
	非喫煙者	132	1.72 ± 1.29	0.4~7.8	0.42 ± 0.22	0.09~1.13		
	不明	69	- .		-	-		

表2. ヒト肺中炭粉及びBaPの測定結果

X±SD:平均值±標準偏差, nd:<0.1

は0.234であった. 炭粉濃度は年齢とともに増加する傾向があるが, 個人差も大きい. 80歳以下に限ってみれば, 高濃度汚染例は年齢が上がるほど増加する. なお, BaP 濃度も年齢とともに増加する傾向が認められた.

4. 肺の黒色粒子成分濃度の性差

表2に男女の肺中の炭粉及びBaP濃度を示した.

炭粉濃度は男性2.05mg/gに対し、女性では1.51mg/gで0.1%以下の危険率で有意な差が認められた。BaP 濃度も男性0.61ng/g、女性0.41ng/gで0.1%以下の危険率で有意差が認められた。

5. 肺の黒色粒子成分濃度に及ぼす喫煙歴の影響

男女別に喫煙歴のあるものとないものとにわけ、肺の炭粉及び BaP 濃度を示したのが図 4 である. 喫煙歴 のあるものとないものとを比較すると、炭粉濃度は有意な差はなかったが、一方男性の BaP 濃度は喫煙歴のあるものの方が有意に高かった.

6. 光学顕微鏡による肺中黒色粒子の観察

写真3に比較的汚染されたヒト肺組織の光学顕微鏡写真を示した. 肥厚した肺胞壁には黒色粒子が沈着しているのがわかる. また, 黒色粒子を取り込んだマクロファージが肺胞腔内に集合している. 肺胞腔の沈着の程度は肺胞ごとに差があり一様ではない. すなわち炭粉粒子がたまった肺胞にさらに沈着する傾向が見られる. 写真4はディーゼル排ガスを12ヶ月間暴露したラットの肺組織である. 肺胞壁の一部肥厚と黒色粒子の取り込み及び肺胞腔内に黒色粒子を取り込んだマクロファージの集合が見られるのはヒトの場合と共通した所見である.

7. タバコ燃焼粉塵の捕集フィルターの観察

写真5,6にタバコー本分の主流煙及び副流煙を捕集したフィルターの写真を示した.主流煙から黄褐色のタール,粉塵(平均10.8mg)が捕集された.副流煙の

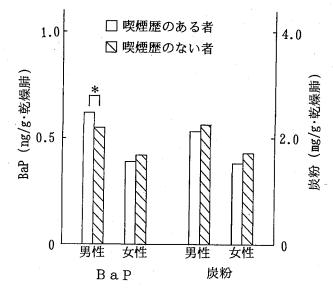


図 4. 喫煙者, 非喫煙者の BaP 濃度と炭粉濃度 *:P<0.05

場合,捕集するために流速を速めたため,捕集面が不均一となった(捕集量 平均21.6mg). 次に,タバコ10本分の煙を捕集し,有機溶媒,アルカリ,酸による洗浄処理をしたフィルターを写真 7 及び 8 に示した.主流煙ではタール分と思われる黄褐色成分は除かれ,ほとんど無色となり炭粉を認めなかった.すなわち,比色法 8 によるタバコ 1 本当たりの炭粉量は検出限界(2 μ g)以下であった.副流煙では黄褐色の成分は除去できたが黒褐色の成分が残った.

考 察

今回の調査で、都内病院の剖検例における肺の炭粉 濃度及びBaP濃度の濃度範囲が明らかになった。

肺の炭粉濃度及び BaP 濃度が比較的良い相関を示したことから、ヒト肺内においても炭粉が BaP の保持母体となっていることが示唆された. しかし、ごく一部の BaP は脂質中に拡散しているものと思われる. ヒト

肺中の炭粉-BaP間の相関はディーゼル排ガスを暴露したラット肺における相関係数0.965⁵⁾ に比較するとやや低い.炭粉との相関が低いのは両者の半減期が異なる(炭粉の半減期の方が長い⁵⁾)ためであろう.また,ヒトによって異なった汚染源(汚染質)の影響,例えば喫煙や職業性暴露を受けているためであろう.

肺中の炭粉濃度は年齢とともに増加する傾向が認め られた. カーボンブラックをラットに暴露した実験に よると暴露期間が長くなるほど肺における半減期が長 くなる $^{8)}$. また、 $Wolff ら ^{9)}$ は、ディーゼル排ガス粒子 を吸入させたラットでは高濃度の群でクリアランスが 低下し、半減期が長くなると報告している. また、蓄 積のためにはある程度以上の粒子濃度が必要と述べて いる. 肺組織の光学顕微鏡による観察では、写真3, 4のように炭粉粒子を取り込んだマクロファージがた まった肺胞にさらに炭粉/マクロファージが集合、沈着 する傾向が見られる. これは炭粉の吸入によって、マ クロファージによる貪食→肺胞壁の肥厚/炭粉の沈着→ 肺胞の換気能低下→肺胞腔での炭粉の停滞→マクロ ファージの増殖と集合→肺胞壁の肥厚/炭粉の沈着とい う悪循環をくりかえすためであろう. これらから疾病 または加齢による肺胞壁の弾力性の低下, 換気能の低 下は炭粉の沈着を促進すると推察される.

男性の肺中の炭粉濃度及びBaP濃度が女性に比較して有意に高いが、これは我が国の一般的傾向として男性の方がより汚染された空気、例えば粉塵の多い作業場や交通量の多い都市の大気にさらされる機会が多いためと思われる。肺のクリアランス能力に本来、性差があるのかどうかは不明である。

タバコの煙は BaP を含むタールと呼ばれる黄褐色の 粘性の高い液状の物質が主体である。このものはかな り不安定で空気により容易に酸化され褐色に変色する。 主流煙中の BaP 量は一本当たり8.6~14.2ngという報 告¹⁰⁾がある。しかし、主流煙中に炭粉は認められな かった。このことは、今回の肺の調査結果すなわち、

「喫煙歴のあるものとないものの間で炭粉濃度に有意差はないが、BaP 濃度は喫煙歴のあるものの方が有意に高い」ことを良く説明できる.一方、副流煙中には炭粉とは断定できないが、極めて溶解性の乏しい黒褐色の成分が認められた.また、副流煙中のBaP量は一本当たり77.1~102ngで主流煙の約10倍と報告¹⁰⁾されている.副流煙中に溶解性の乏しい黒褐色の成分が認められたことから、吸入した場合、BaPが肺内に長く留る可能性がある.したがって、喫煙者本人及び周辺の人の肺BaP濃度は副流煙による影響も考慮する必要があ

る.

主流煙は乾燥タバコ葉の成分が一種の乾溜によって熱分解を伴いながらガス化,エアロゾル化したもので、これらは移動に伴い熱が低下するため炭化しにくい.一方,不揮発性の成分は移動することはなく癒合しながら炭化,さらに灰化するので主流煙に混入することはほとんどないのであろう.副流煙は不揮発性の成分が炭化する際に生ずる熱分解生成物などのエアロゾルとその炭化物及び燃焼が進み、乾燥して微細化した炭粉,灰の一部が上昇気流に巻き込まれたものである.なお、今回のタバコの煙を捕集する方法は、一定流量(37ml/min)で持続的に燃焼させる方式でヒトの喫煙条件とは異なる.燃焼条件によりタールの発生量やBaP濃度は変動するものと思われるが主流煙中に炭粉が増加することは考えにくい.

都内の野性の鳩の肺も炭粉や BaP で汚染されている¹¹⁾ことから、ヒトの肺内黒色粒子の蓄積の要因として大気汚染がまず考えられる.ヒト肺中の BaP の炭粉(C)に対する割合(BaP/C, ng/mg)は平均0.3であったが、鳩肺¹¹⁾では1.6、ディーゼル排ガスを暴露されたラット⁵⁾では0.85という値が得られている.BaP の濃度は炭粉の約百万分の一と微量であることや動物種、暴露条件が異なることを考慮するとこれらの種の肺中BaP/C 比の値はかなり近いものと判断できる.このことはこれらの種に暴露された汚染物質の性状あるいは起源が似ていることを示唆している.今後は、居住環境、職業環境などがどのように関わっているか、また疾病、特に肺がんとの関係についてさらに調査をする予定である.

結 論

都内病院の剖検例の肺中の黒色粒子の成分,炭粉及びBaPを測定した. その結果,以下のことが判明した. ①ヒトの肺内の炭粉及びBaP濃度は個人差が大きく,対数正規分布を示した. 最大値は乾燥肺重量1g当たり,それぞれ13.6mg, 2.48ngであった.

- ②炭粉と BaP 濃度間に正の相関(r=0.517)が認められた. ③炭粉及び BaP 濃度は男性の方が女性よりも有意に高い
- ④炭粉及びBaP 濃度は加齢とともに増加する.
- ⑤喫煙は肺中の炭粉の主要な蓄積要因ではない. しかし, BaP の蓄積については喫煙も関与していることが示唆された.

本研究は、大気汚染保健対策事業の一環として、衛生局医療福祉部環境公害保健課、衛生研究所、駒込病院、府中病院、広尾病院が協力して実施しているもの

である.

文 献

- 1) 人口動態統計月報(概数)平成5年1-6月:厚生省.
- 厚生省編: 喫煙と健康,79-104,1988,保健同人 社,東京.
- 3) 清水弘之, 富永祐民, 中川宣子 他: 大気汚染学 会誌, **14**, 324-333, 1979.
- 4) 岩井和郎: 医学の歩み、150、847-849、1989.
- 5) 瀬戸 博, 大久保智子, 鈴木孝人 他:東京衛研 年報, **41**, 226-228, 1990.
- 6) Seto, H., Ohkubo, T., Kanoh, T. et al.: Arch. Environ. Contam. Toxicol., 24, 498-503, 1993.
- 7) 瀬戸 博, 大久保智子, 加納堯子:東京衛研年報,

40, 271-273, 1989.

- 8) Lee, P. S., Gorski, R. A., Hering, W. E. et al.: Environ. Res., 43, 364-373, 1987.
- 9) Wolff, R. K., Henderson, R. F., Snipes, M. B., et al.: Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, In Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan R. O. and Stober, A. (eds.), Developments in Toxicology and Environmental Science, vol.13, 199-211.
- 10) 田辺潔, 小谷野道子, 遠藤由子 他:第32回大気 汚染学会報告, 4305, 1991.
- 11) 瀬戸 博, 大久保智子, 関比呂伸 他:東京衛研 年報, **41**, 223-225, 1990.

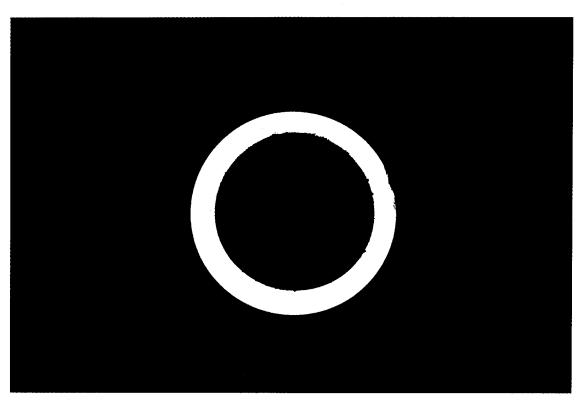


写真1. ヒト肺組織約10gから分離された炭粉(重度汚染例).

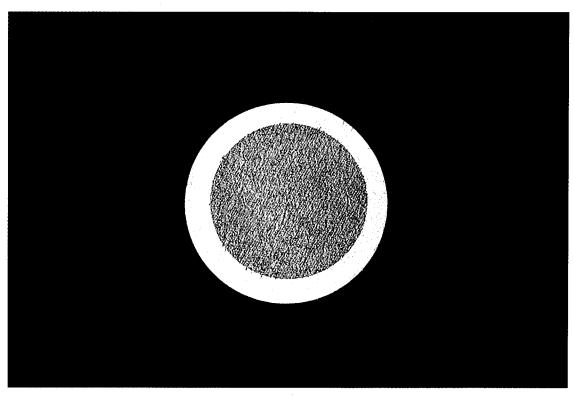


写真 2. ヒト肺組織約10gから分離された炭粉(軽度汚染例).

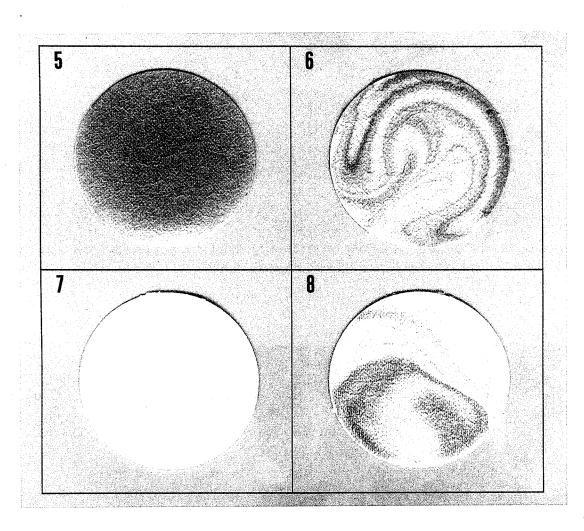


写真5. タバコ主流煙(1本分)を捕集したフィルター.

写真 6. タバコ副流煙(1本分)を捕集したフィルター.

写真7. 有機溶媒、アルカリ、酸による洗浄処理後のフィルター(10本分のタバコ主流煙を捕集した).

写真8. 有機溶媒,アルカリ,酸による洗浄処理後のフィルター(10本分のタバコ副流煙を捕集した).

ディーゼル排ガス粒子による核酸成分の損傷について

瀬 戸 博*, 大久保 智 子*, 大 西 和 夫*, 鈴 木 重 任*

Chemical Modifications of Nucleic Acid Components by Diesel Particulate Matter

HIROSHI SETO*, TOMOKO OHKUBO*, KAZUO OHNISHI* and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: ディーゼル排ガス粒子 diesel particulate matter, DNA 損傷 DNA damage, 8-ヒドロキシデオキシグアノシン 8-hydroxydeoxyguanosine, チミングリコール thymine glycol, 活性酸素 active oxygen

緒 言

近年,我国においても肺がん死亡率の上昇が報告され,その原因をめぐって社会的関心を呼んでいる.肺がん死亡率の上昇をもたらした要因を肺に吸入する化学物質に求めるとすれば,喫煙と大気汚染が考えられる.

我々は、東京都衛生局の「大気汚染保健対策事業」の一環として、ディーゼル排ガス中の発がん性物質に着目し、多環芳香族炭化水素の肺への吸入と排泄、蓄積について動物実験を行い、検討してきた^{1,2)}. さらに、ヒト肺に残留する多環芳香族炭化水素及び炭粉濃度と肺がんとの関係についても調査を行ってきた³⁻⁵⁾.

発がん性物質による生体への負荷の影響や発がんを 予測するうえで、DNA 損傷の程度を把握し、監視する ことが有効と考えられている⁶⁾. 一方、ヒトの生体内で は活性酸素による DNA の酸化的損傷が恒常的に進行し ており、老化やがんと関係している可能性が指摘され ている⁷⁾. また、ディーゼル排ガス粒子 (DPM) には、 活性酸素の産生を触媒する能力があることが示唆され ている⁸⁾. さらに、DPM による気管支ぜんそくに活性 酸素が関与していることを示唆する報告⁹⁾も提出されて いる. 我々は、大気汚染物質による遺伝子損傷の指標 を開発することを意図し、ディーゼル排ガス成分の酸 化的作用によって生ずる DNA 変性体の検索を試験管内 および動物実験により行うこととした. 本稿では、試 験管内で 2'-デオキシグアノシン (dG) またはチミンに DPM を作用させた時の実験結果について述べる.

実 験

試薬, 材料等: DPM は NBS No.1650を使用した. また, 一部の実験では N 社製 排気量2.81のディーゼルワゴン 車の排気口に付着した黒色粒子を用いた.

2'-デオキシグアノシン(dG), カタラーゼ, スーパーオキシドディスムターゼ(SOD), ウシ赤血球由来(SOD), ウシ赤血球由来(SOD), デスフェラールはシグマ製を使用した. 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG) は Kasai らの方法(SOD), チミングリコール(SOD) は Jones らの方法(SOD) により合成した.

DPM の有機溶媒抽出物の活性炭吸着物(EAC)は次のようにして得た. DPM 200mgを10mlのヘキサンで10分間超音波抽出した. これを遠心分離機にかけ、上澄み層を別の容器に移した. 沈渣は同様にしてベンゼン、アセトン、メタノールの順で抽出した. 活性炭200mgを各抽出液に加え、10分間振とうした後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した.

標準化学物質の活性炭吸着物(CAC)は、各化学物質のヘキサンの溶液(1 mg/10ml)に活性炭100mgを加えて振とうしたのち、溶媒を除去して得た.

分析装置:高速液体クロマトグラフー日本分光工業880-PU 型ポンプ,同880-COカラムオーブン,同880-UV紫外・可視検出器,ヒューレットパッカード HP-1040Mダイオードアレイ UV/VIS 検出器,ESA 5100Aクーロケム電気化学検出器.質量分析計-VG70S.電子スピン共鳴装置(ESR)-日本電子 JES-RE1X.

反応及び生成物の分析方法: 2 mMの dG またはチミンの0.1M りん酸緩衝溶液 (pH 7.0) 2 mlに DPM またはEAC あるいは CAC 各 2 mgを加え,振とうした後,37℃の水浴中で16時間静置し反応させた.過酸化水素添加群では,1.25mMの過酸化水素を含むようにした.16時間後に反応液をフィルターでろ過した後,電気化学検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC-EC) またはダイオードアレイ UV/VIS 検出器付き高速液体クロマ

^{*}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 3-4-1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research laboratory of public health 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

トグラフで分析した. dG 反応液の分析条件は以下のとおりである. カラム:GL サイエンス イナートシルODS-2 (250mm x 4.6mm i.d,), カラム温度:35 $^{\circ}$ C, 溶離液:10mMリン酸二水素ナトリウム, 8% (V/V)メタノール/水溶液. 流速:1 ml/min. ECD 電極電圧:No.1 0.20V, No.2 0.35V. チミンの反応液の分析条件は以下のとおりである. カラム:GL サイエンス イナートシル ODS-2 (250mm x 4.6mm i.d,), カラム温度:室温,溶離液:10mMリン酸二水素ナトリウム, 5% (V/V)メタノール/水溶液. 流速:1 ml/min. 測定波長:210nm.

8-OH-dG および TG 生成に及ぼす硫黄酸化物, 窒素酸化物の影響: 2 mMのデオキシグアノシン(dG)またはチミンの0.1Mリン酸緩衝溶液(pH 7.0) 2 mlに硫黄酸化物あるいは窒素酸化物 2 mgを加え溶解後, 37℃の水浴中で16時間静置し, 反応させた. 反応液を HPLC-UV および HPLC-EC で分析した.

8-OH-dG の同定:①HPLC-EC による保持時間を標準物質と比較した.②前述の HPLC で用いた分離条件で検出器をダイオードアレイ UV/VIS 検出器とし、8-OH-dG ピークの UV スペクトルを測定した.③本ピークの分画を集めロータリーエバポレータで濃縮した.移動相を5%アセトニトリルに換え、8-OH-dGを含む濃縮液を HPLC に注入し、さらに精製した.この分画を真空中で乾固し、トリメチルシリル(TMS)誘導体として質量分析(直接導入法)を行った.標準物質(8-OH-dG)についても同様の TMS 化をし、質量分析を行った.分析条件は以下のとおりである.イオン化モード:EI.加速電圧:7kV.イオン化電圧:70eV.イオン化電流:200 μA.

TG の同定: 100mlのナス型フラスコに 2 mMチミン (0.1Mリン酸緩衝溶液, pH 7.0) 50ml, DPM 50mgを入れ、攪拌しながら37℃の水浴中で21時間反応させた. 反応液をメンブランフィルターでろ過した後、HPLC で TG と推定される分画を採取した. ①チミンの HPLC 分析条件で検出器をダイオードアレイ UV/VIS 検出器とし、TG ピークの UV スペクトルを測定した. ②TMS 誘導体として質量分析(直接導入法)を行った. 標準物質 (TG) についても同様の TMS 化をし、質量分析を行った. 分析条件は以下のとおりである. イオン化モード: EI. 加速電圧: 7 kV. イオン化電圧: 70eV. イオン化電流: 200 μA.

ESR 測定: 5 mgの DPM を 2 mlの0.1Mリン酸緩衝液に 懸濁させ, 37℃の水浴中で 2 時間保温した. この混合 液を100 μlとり, DMPO (5,5'-ジメチルピロリン-N-オ キシド) の10倍希釈液 15μ l, 水 50μ lを加えて混合し, 石英製偏平セルに移し, 直ちに室温で ESR スペクトル を測定した.

結果および考察

チミンと DPM の反応液の HPLC-UV クロマトグラムを図 1 に示す。3.5分付近に出現したピークは TG 標準品と同一の保持時間で,同一の UV スペクトルの特徴を示した。また, TMS 誘導体のマススペクトルは分子イオンピークm/z 448を示したことから, TG と同定した。

チミンは DPM によって化学的修飾を受け、TG に変化することがわかった。この時、過酸化水素が存在すると反応は顕著に促進された(図1下段)。 DPM 量を増加すると TG の生成量は増加した(図2)。 過酸化水素を添加しない場合、4時間程度反応させると生成量はプラトーになり、以後反応時間が長くなるほど TG 量は低下した(図3)。これは一旦生成した TG が分解されるためと考えられた。

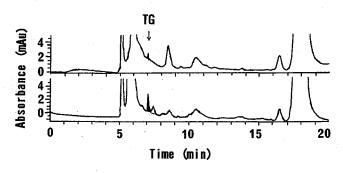


図1. DPM の作用による TGの 生成 上段 DPM, 下段 DPM+H₂O₂

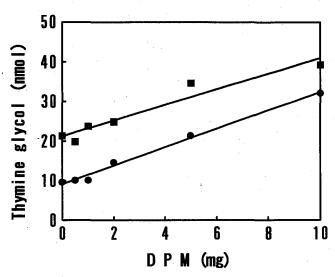


図2. チミングリコール生成に及ぼす DPM 量の影響

- ●:H₂O₂無添加
- ■:H₂O₂添加

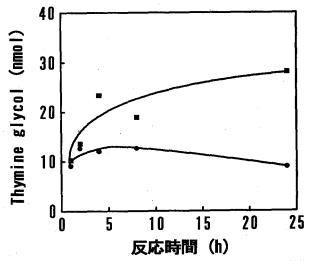


図3. チミングリコール生成に及ぼす反応時間の影響

●:H₂O₂無添加 ■:H₂O₂添加

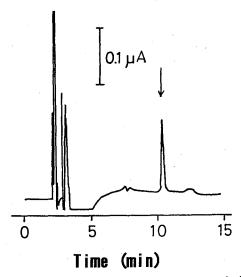


図 4. DPM の作用による 8-OH-dG の生成

dG と DPM の反応液の HPLC-EC クロマトグラムを図 4 に示す. 10.3分に出現したピークは8-OH-dG標準品と同一の保持時間であった. 8-OH-dGであることをさらに確認するため、HPLC-ダイオードアレイUV/VIS 検出器による UV スペクトル測定および質量分析を行い各スペクトルを得た. これらのスペクトルの特徴は標準物質のそれと同一(UV λ max 250, 295nm、EI-MS M^+m/z 643 TMS deriv.) であり、8-OH-dG と同定した. DPM 量を増加すると8-OH-dGの生成量は増加した(図 5). また、反応時間が長くなるほど8-OH-dG の生成量は増加した(図 6). dG・DPM 反応系に Fe(II) イオンおよび過酸化水素を添加すると、8-OH-dG 生成量は増大した. しかし、過酸化水素のみでは8-OH-dG は、ほとんど生成しなかった.

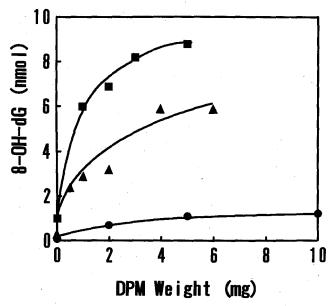


図5.8-OH-dG 生成に及ぼす DPM 量の影響

●:NBS DPM,H₂O₂無添加

▲:N社ワゴンDPM, H₂O₂添加

■:NBS DPM, H₂O₂添加

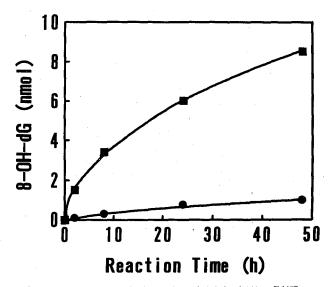


図 6.8-OH-dG 生成に及ぼす反応時間の影響

●:H₂O₂無添加

■:H₂O₂添加

ラジカルスカベンジャーなどの阻害剤の影響を表1に示した. 鉄キレート剤であるデスフェラールによって反応が抑制されることから, 8-OH-dG の生成には鉄イオンが関与しているものと考えられる. カタラーゼ,マンニトール,エタノールも8-OH-dG の生成を抑制することから,過酸化水素とヒドロキシルラジカルが本反応系に関与していることが推察される. SOD もまた8-OH-dG の生成を抑制することから,スーパーオキシドアニオンも関与していると推察された.しかし,ESR(スピントラッピング法)で観測されたラジカル種はヒ

表 1.8	3-OH-dG	生成にお	よぼす	阻害剤	の影響
-------	---------	------	-----	-----	-----

阻害剤	添加量	8-OH-dG(nmol)
テスフェラール	0 (\mu mol)	0.74(0)*1
	0.1	0.65(12)
	0.5	0.53(28)
	1.0	0.29(61)
SOD	30(ユニット)	0.62(16)
	150	0.30(59)
	300	0.27(64)
カタラーゼ	$10 (\mu \mathrm{g})$	0.23(69)
	50	0.17(77)
	100	0.14(81)
マンニトール	$10 \left(\mu \mathbf{g} \right)$	0.74(0)
	50	0.64(14)
	100	0.52(30)
エタノール	8 (mg)	0.32(57)
	40	0.30(59)

*1 () 内の数字は制御率 (%). n=2.

過酸化水素が存在する中で、各種 EAC の dG 8 位水酸化能を比較したのが図 8 である.

ヘキサン,ベンゼンで抽出して得た EAC にはごく弱い水酸化能しか認められなかった。ところが、次のアセトン分画には元の DPM の35%の水酸化能が認められた。しかし、メタノール分画には水酸化能は認められなかった。注目すべきことは、残渣部分にまだ大部分(75%)の水酸化能が残っていることである。過酸化水素を加えない系でも同様の結果が得られた。これらの結果から、dG の8位水酸化は DPM 中の極性有機化合物及び無機化合物によるものと推察された。

表 2 には大気汚染物質関連の無機化合物による 8-OH-dG 及び TG 生成量を示した。dG の 8 位水酸化能は亜硫酸イオン>>硫酸イオン、硝酸イオンの順であった。TG の生成についても同様の傾向がみられた。これらの陰イオンと鉄(II)イオンは DPM の有機溶剤抽出残渣中に存在する主な8-OH-dG及び TG 産生因子と考えられる。ここで、DPM による8-OH-dGと TG の生成量を比較すると TG の方が約10倍も生成することが注目される。しかし、生体内におけるこのような微量成分をモニタリングする場合には、分子が比較的安定で、電気化学検出器で高感度に測定できる8-OH-dG(または8-ヒドロキシグアニン)を指標にする方が有利であ

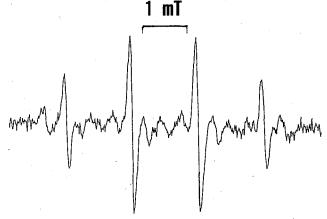


図 7. DPM 水溶液の ESR スペクトル

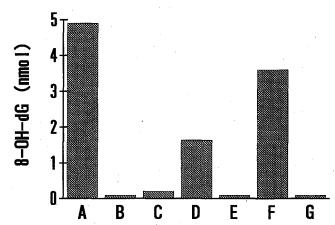


図 8. 各抽出分画の 8-OH-dG 産生能力比較 A:DPM, B:ヘキサン, C:ベンゼン, D:ア セトン, E:メタノール, F:残渣, G:活性炭

表 2. 8-OH-dG およびTG 生成に及ぼす DPM 硫黄酸 化物, 窒素酸化物の影響

	Product (nmol)						
物質(2mg)	8-OH-dG	TG					
DPM	0.88	9.12					
$DPM + H_2O_2$	5.84	82.8					
Na ₂ SO ₃	19.6	17.8					
Na ₂ SO ₄	1.52	12.0					
$Na_2S_2O_3$	nd	9.36					
NaNO ₂	nd	_					
NaNO ₃	0.80	_					
none	nd	nd					

nd:不検出(<0.04), -:測定せず, n=2

ろう.

表3にはCACによる8-OH-dG 生成量を示した. 大部分の化学物質は大気汚染物質である. この表からわかるように, 多環芳香族炭化水素やニトロ化多環芳香族炭化水素は. 8-OH-dG 生成量が少ない. 分子内に水酸基を有する物質, 例えばヒドロキノンは強い8位水

表3. 活性炭に吸着させた化学物質による 8-OH-dG の生成

化合物	8-OH-dG(nmol)
アンスラヒドロキノン	0.88
アンスラキノン	0.12
ベンズアルデヒド	0.32
ベンゾイックアシド	0.20
ベンゾ(k)フルオランテン	0.04
ベンゾ(ghi)ペリレン	< 0.04
ベンゾ(a) ピレン	< 0.04
1,8-ジヒドロキシアンスラキノン	0.08
1,3-ジニトロピレン	0.12
1-6-ジニトロピレン	< 0.04
1-8-ジニトロピレン	< 0.04
ヒドロキノン	1.52
8-ヒドロキシキノリン	0.72
1-ニトロピレン	0.12
バニリン	0.60

n=2.

酸化能がある. DPM 中には通常ポリフェノール化合物 や酸化された多環芳香族炭化水素が存在しており¹²⁾, これらの極性有機化合物が有機溶剤抽出物中に存在する主な8-OH-dG 産生因子と考えられる.

水溶液中で DPM によってチミンが容易に修飾され TG に、また dG が8-OH-dG に変化するという本実験 結果は、試験管内における DNA 損傷を化学的に示した ものである。このような反応が生体内で実際に進行す るか否かは動物実験によって確認される必要がある。

Vogl ら⁸⁾ は DPM による活性酸素産生作用には、システイン及び過酸化水素の存在が必要としているが、本実験結果は DPM 自体に十分な触媒作用があることを示している。このことは、ESR スペクトルの測定により、ヒドロキシルラジカルを確認することで確定的となった。 Sagai ら⁹⁾ は DPM/生理食塩水懸濁液をマウスの気管に直接注入する実験を行い、活性酸素がぜん息の要因であるとしている。この方法は、濃厚な活性酸素による直接的な気管及び肺胞への作用を検討するためのモデルとして興味深い。

8-OH-dG の生成は、DPM によってヒドロキシルラジカルが産生されたためであることが判明した。TG の生成も主としてヒドロキシルラジカルの作用に基づく

ものと推定される. この作用は DPM 中の鉄化合物, 硫 黄酸化物やポリフェノールのような極性有機化合物の 相乗効果によるものと考えられ, これらが細胞内外で ヒドロキシルラジカルを産生し, 細胞の機能を障害することが懸念される. 生体内には, ヒドロキシルラジカル生成を促進する因子, 例えば遊離の鉄(II)イオン, 過酸化水素, L-アスコルビン酸等も存在する. DPM は 肺に沈着し, 異物として処理されていく過程で, 種々の有機物, 硫黄酸化物イオン等を放出し, 活性酸素の発生源として, 発がんに関与している可能性がある.

8-OH-dG は、ヒトの肝、腎等において加齢とともに増加する⁷⁾と言われており、DPM による遺伝子レベルへの酸化的傷害の程度を把握するためのマーカーとして有望である.

文 献

- 1) 大久保智子, 瀬戸 博, 大沢誠喜 他:東京衛研 年報, **39**, 193-197, 1988.
- 2) 瀬戸 博, 大久保智子, 鈴木孝人 他:東京衛研 年報:**41**, 226-228, 1990.
- 3) H. Seto, T. Ohkubo, T. Kanoh, et al.: Arch. Environ. Contam. Toxicol., 24, 498-503, 1993.
- 4) 大久保智子, 瀬戸 博, 笹野英雄:第34回大気汚染学会, 1993, 12.
- 5) 大久保智子, 瀬戸 博, 笹野英雄 他:衛生局学 会, 1994, 5.
- 6) G. N. Wogan: Environ. Health Perspect., **98**, 167-178, 1992.
- 7) C. G. Fraga, M. K. Shigenaga, J. W. Park, et al., : Proc. Natl. Acad. Sci., **87**, 4533-4537, 1990.
- 8) G. Vogl and E. F. Elstner: *Toxicol. Lett.*, **47**, 17-23, 1989.
- 9) M. Sagai, H. Saito, T. Ichinose, et al., : Free Radical Biol. Med., 14, 37-47, 1993.
- H. Kasai and S. Nishimura: Nucleic Acid Res., 12, 2137-2145, 1984.
- 11) M. H. Benn, B. Chatamra and A. S. Jones, : *J. Chem. Soc.*, 1014-1020, 1960.
- 12) H. Y. Tong, J. A. Sweetman and F. W. Karasek: *J. Chromatography*, **312**, 183-202 1984.

幹線道路付近の窒素酸化物濃度への気象要素の影響

牧 野 国 義*,福 田 雅 夫*,小野塚 春 吉*,大 西 和 夫*

Effects of Weather Factors on Concentration of Nitrogen Oxides around Arterial Roads

KUNIYOSHI MAKINO*, MASAO FUKUDA*, HARUKICHI ONOZUKA*
and KAZUO OHNISHI*

Concentrations of nitrogen oxides were continuously monitored monthly at fourty points which were distributed on the roadside and the rear of both sides of the road near ten arterial roads in Tokyo. The two roadside points on boh sides were compared and the effect of wind direction and wind velocity on the conentration differences between the two points was studied using data for sixteen month. Eexponential models of concentration and distance were devised for analyzing the cause of the differences between the roadside point and the rear point. By using these models, it was considered by some information that the attenuation constant, which is coefficient of the distance, could be expressed using some weather factors etc.

As a result of this study, different concentrations were often observed between the two points on both sides. This difference was also detected between their mean concentrations for sixteen months. It was larger for nitrogen oxide than for nitrogen dioxide and was affected mainly by wind direction and wind velocity. According to the analyses using exponential models, the attenuation constant was closely associated with air temperature, humidity, solar radiation, wind direction, wind velocity, volume of traffic and the width of the road.

Keywords: 窒素酸化物 nitrogen oxides, 大気汚染物質 air pollutant, 気象要素 weather factor, 濃度推定 estimation of concentration, 季節変動 seasonal fluctuation, 健康監視モニタリング monitoring of health survey, サーベイランスシステム surveillance system

緒 言

窒素酸化物や浮遊粒子状物質による大気汚染が注目されるようになって既にかなりの年月を経ているが、東京をはじめ、全国の大気汚染状況は必ずしも好転したとは言えない。むしろ、徐々にではあるが、一層進行しつつある^{1,2)}。このような状況の下で、東京都では健康監視モニタリングの一環として幹線道路付近に居住する住民の呼吸器症状調査を行い³⁾、症状発現の原因物質となる恐れがある窒素酸化物や浮遊粒子状物質および重金属については現在も都内10地区(区部5,市部5)で、道路両側の沿道、後背地点の濃度を毎月観測している。この道路両側の観測体制は、沿道から等距離

地点でも両側で濃度がほぼ同一とみなせない可能性を 考慮しているが、その実態評価はなされておらず、ま た、呼吸器症状調査においても沿道、後背を道路両側 でさらに区分する手法では解析されていない.

ここでは窒素酸化物について,まず沿道から等距離 地点の濃度を比較し,風向風速が関与するかを検討した.次に,沿道と後背の濃度差を生ずる要因には主と して気象要素が考えられている⁴⁻⁶⁾.そこで,道路両側 濃度の距離変動(発生源は主に自動車排気ガスであり, 沿道から後背に濃度が減衰するので,以下は距離減衰 と記す)への気象要素などの寄与について解析モデルを 設定し,検討した.

^{*}東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町 3 -24-1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

調査資料

(1) 観測地点

観測地点は都内10地区(中央,大田,渋谷,板橋,足立,八王子,立川,青梅,町田,田無)の沿道両側からの距離が大体5 m, 20mにある40地点. 各地区の観測地点(No $1\sim4$)と方位はFig. 1 の通りである.

(2) 調査期間

調査期間は、1地区4地点の観測が開始された平成4年7月から平成5年10月までの16か月とした。

(3) 調査項目

短期型(3日間)のPTIO法により測定された窒素酸化物(一酸化窒素,二酸化窒素)濃度と10地区近傍の東京都環境保全局の大気汚染常時測定局で測定された1時間値の気温,湿度,風向,風速および気象庁の日別日射量,降水量を選択した。なお,短期型の3日間は開始日の午前10時から3日後の同時刻をさす。さらに,地域要素として各地区の交通量(交通センサス昼間12時間),道路幅も調査項目に加えた。ただし,交通量は年1回の観測値であり,道路幅もおよその値で,濃度の距離減衰は観測地点の建築物の影響があることから,Table 1のようにカテゴリカルデータとして区分した。

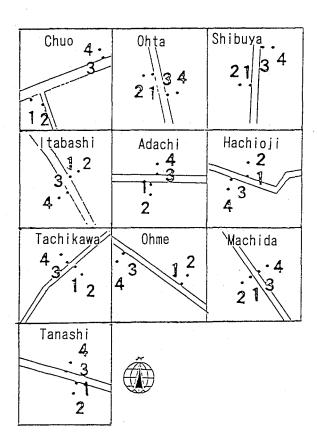


Fig.1. Direction of an Arterial Road and Distribution of 4 Monitoring Sites at 10 Districts

研究方法

(1) 沿道からの等距離地点濃度比較

各地区 5 m, 20m両側地点における月平均の濃度差, 系統的な濃度差の有無について基礎統計量で, さらに 地点, 月を要因とした二元配置の分散分析で検討した.

(2) 距離減衰への気象要素などの寄与

道路両側の沿道から後背への窒素酸化物濃度の距離 減衰に気象要素がどのように寄与するかを以下の方法 で検討した.

まず、距離減衰式は比較的よく利用される次式とした。

$$Cy = C0 \cdot \exp(-ay)$$
 1

ここで、Cy, C_0 は沿道からの距離が ym, 0 m地点の 濃度, a は減衰定数,道路両側に測定地点(N_0 . 1 側と N_0 . 3 側)があるので,沿道地点濃度は, C_{01} , C_{03} と表す.

プルームモデルを応用した JEA モデル⁷⁾では濃度が 風速の1/2乗に反比例するとしており、風向風速成分と して以下の様にする.

 $u_i = (wi)^{1/2}, v = (1/n) \Sigma_{i=1-n} u_i \cos(\theta_i \pi/8) Tr_i$ ② ここで,i は時間,n は測定時間数,wi は風速, θ_i はNo. 1 側からの風向との角度(16方位), Tr_i は交通量時間割合を示す.この交通量時間割合は風向風速成分の重み付き平均としたもので,交通センサスより区部と市部の割合を Table 2 のようにした.

ここで、C₀₁/C₀₃比と風向風速成分 v は曲線関係にあ

Table 1. Grade by Volume of Traffic or Width of a Road, and The Grades at 10 Districts

Grade	Volume of	Width of			
	Traffic (/1000)	Road(m)			
1	~15	25~			
2	15~20	20~25			
3	20~25	15~20			
4	25~30	10~15			
5	30~	~10			

District	Traffic	Grade	Road	Grade
Chuou	24	3	30	1
Ohta	24	3	20	2
Shibuya	31	5	15	3
Itabashi	29	4	20	2
Adachi	28	4	20	2
Hachioji	14	1	12	4
Tachikawa	10	1	8	5
Ohme	9	1	. 8	5
Machida	14	1	12	4
Tanashi	29	4	12	4

Area	Hour	1.	2	3	4	5	. 6	7	8	. 9	10	11	12
Ward	A.M.	0.6	0.5	0.5	0.4	0.6	1.2	1.3	1.4	1.3	1.4	1.2	1.0
	P.M.	1.2	1.1	1.3	1.2	1.4	1.3	1.1	1.0	1.0	0.8	0.7	0.6
City	A.M.	0.4	0.3	0.3	0.3	0.6	1.1	1.5	1.6	1.3	1.2	1.2	1.1
	P.M.	1.3	1.3	1.3	1.4	1.5	1.3	1.3	1.0	0.8	0.7	0.6	0.5

Table 2. Transition of Hourly Rate of Traffic in a Day

Table 3. Elemental Statistics (Mean and SD) of Differences of NO_x Concentration between at Side No. 1 and at Side No. 3 (5m-site) and between at Side No. 2 and at Side No. 4 (20m-site)

	NO).·	NO_2					
District	5m-site	20m-site	5m-site	20m-site				
Chuou	29.9±10.3	6.6± 9.0	6.0±3.8	-0.9±2.3				
Ohta#	-17.3 35.0	-6.4 24.1	-4.0 7.0	0.1 7.0				
Shibuya	18.0 18.1	-6.1 10.5	0.3 3.6	-1.1 3.0				
Itabashi	-20.6 23.4	-9.2 14.0	-3.5 4.9	-3.0 5.0				
Adachi	67.9 50.7	17.1 15.3	10.4 6.9	3.7 7.1				
Hachioji	-13.1 8.8	-15.8 9.9	-3.1 1.8	-2.5 2.1				
Tachikawa	18.0 17.8	10.5 11.3	2.1 4.0	1.3 4.5				
Ohme	-2.4 6.0	-2.9 2.0	-0.7 2.9	-0.8 1.9				
Machida	15.7 6.3	8.8 6.1	2.6 1.7	1.7 2.3				
Tanashi	15.3 33.6	15.9 12.0	2.2 5.4	7.5 4.1				
All	12.8 34.9	2.3 16.0	1.5 6.1	0.6 5.2				

#: N=8 at Ohta District for Missing Data (N=16 at The Others)

ると考えた. 実測したのは 5 m地点であるから, 5 m 地点濃度が C_{11} , C_{13} のとき,

 $C_{11}/C_{13} = m_0 \cdot \exp(m_1 V)$ (m_0 , m_1 は定数) ③

次に,減衰定数 a を,気象要素(気温,湿度,日射量,降水量),地域要素(交通量,道路幅-ともに区分量)を説明変数とした一次式で推定した.

$$\mathbf{a} = \mathbf{a}_0 + \Sigma \mathbf{a}_j \mathbf{x}_j \tag{4}$$

$$\mathsf{L}tth_0^{\mathsf{r}} \mathsf{T},$$

 $Cy = C_0 \cdot \exp(-(a_0 + \Sigma a_j x_j)y)$ ⑤ と推定される.ここで, a_0 , a_j は回帰係数, x_j は上記説明変数である.

上記の①,②はモデルを設定する式であり,③,④ は濃度間の関係や距離減衰を説明する式である.した がって,①,②式が妥当であるためには③,④式で充 分説明し得ることを検証する必要がある.

そこで、まず③式を対数化し、

$$\ln (C_{11}/C_{13}) = \ln (m_0) + m_1 V$$
 ⑥ 左辺と v が線形関係を有するか検討した.

次に, 5, 20m地点 (i = 1, 2) で①式より,

$$a = (\ln (C_{1i}/C_{2i}))/15$$
 ⑦ タイト記述明亦物トの重相関 ・ 重回標

が得られ、この a と上記説明変数との重相関、重回帰 分析を行った.この際、AIC (赤池情報量基準) により説 明変数採否の整理を行った.

結 果

(1) 沿道からの等距離地点濃度比較

Table 3 に各地区の沿道から等距離地点の濃度差基礎統計量を示した.実際,道路両側の濃度差はかなり大きい.中央,立川,町田の3地区ではNOの場合,20m地点の濃度が反対側の5 m地点よりも16か月の平均値で同等または上回る結果(それぞれ33と30,33と33,28と25ppb)であった。また,濃度差は、足立の場合を最大とし、濃度平均値と比べても小さくない。NOとNO₂とを比べると、濃度差はNOの方が大きかった。二元配置の分散分析結果(Table 4)でみても、NOの5 m地点では欠測の多い大田と低濃度の青梅を除く8地区で有意差が認められた。NOの5 m地点ほどではないが、有意差が認められた地点があり、沿道から両側の等距離地点であっても長期間濃度に差の生じることが確認された。

(2) 距離減衰への気象要素などの寄与

まず,道路両側の濃度比を対数化した⑥式の左辺($\ln(C_{11}/C_{13})$)と風向風速成分vが線形関係を有するかを相関でみると、標本数145で、NO は相関係数0.657と高く(危険率0.1%未満で有意)、 NO_2 も0.641(危険率0.1%未

Table 4.	Signif	ficano	e I	_ev	el of T	wo	Way	ANOVA in	whic	h T	`wo Facto	ors	were A:Sic	le of
	Road	and	В	:	Month	for	NOx	Concentra	tion	by	District	by	Monitoring	Site
	(5/20))m)												

				N	o			No_2						
District		į	5m-sit	e	20m-site				5m-si	te	20m-site			
	Factor	A	В	A-B#	A	В	A-B [♯]	A	В	A-B#	A	В	A-B#	
Chuou		***	**			***		**	*			*		
Ohta							*		*					
Shibuya		***	***	*		***				*				
Itabashi		**	***		***	***	*					*		
Adachi		***	*	**	***	***	4.	***	**			**		
Hachioji		**	***		***	***		*	*					
Tachikawa		**	**	*	***				*					
Ohme			***		*	***								
Machida		***	***		**	***								
Tanashi		*	**	*	***	***					**			

 $\ensuremath{\sharp}$: Factor A-B ; Interaction of Factor A and B

*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

満で有意)で、明かな直線関係が認められた。この回帰式より、濃度比 C_{11}/C_{13} は、

NO : $C_{11}/C_{13}=1.043\exp(0.0591V)$

 $NO_2: C_{11}/C_{13}=1.003\exp(0.0178V)$

の関係が得られた.

次に、減衰定数 a と気象要素(気温、湿度、日射量、降水量)、地域要素(交通量、道路幅)を説明変数とした重相関、重回帰分析を行い、AICで説明変数を整理した結果を Table 5 に示した. 重相関係数では、NO、NO₂とも高い有意水準となり、減衰定数が気象要素や地域要素と密接に関連することを示唆した.

考 察

従来の沿道、後背地点における大気汚染の健康影響 調査では、沿道地点に居住する住民と後背地点に居住 する住民の呼吸器症状などを比較することによって検 討された^{3,8)}. これらは、大気汚染の健康影響は高濃度 の沿道地点住民の方が発現しやすいとの視点に立ち, 汚染群別健康影響指標の比較を行っており, 妥当な手 法といえよう. しかし、今回の検討で得られたように、 沿道からの距離が等距離であっても地区によっては長 期間濃度に差がみられた.したがって、汚染物質濃度 を用いた比較を行う場合は慎重を要する. 今回の結果 では、中央、足立、立川、町田、田無の濃度は概ね No. 1 側が高く, 板橋, 八王子, 青梅(NO のみ)は No. 3側が高かった.一方,大田は欠測期間が多いため傾 向が不明で、渋谷は5m地点と20m地点とで逆の傾向と なった. 明確な差を示した8地区について Fig. 1 から 測定地点配置をみると、8地区とも南側の地点の濃度

Table 5. Regression and Multiple Correlation of Attenuation Constant" a "from a NO/No₂ Concentration Equation

	NO	NO2
Regress. Coef. 1000a=		
Temperature(℃)	1.506	0.268
Humidity(%)	-0.0288	_
Solar Rad. (mJ/m ²)	0.305	0.0864
Volume of Traffic#	17.24	3.66
Width of Road#	16.22	3.86
Constant	-83.78	-18.84
Multiple Corr. Coef.	0.856	0.798
p	< 0.001	< 0.001
n .	145	145

#: Categorical Variable

の高いことが分かる. 年間を通じて風向分布は大体北方向が最大で, 南側は風下にあたることから, この濃度差は風向などの気象要素の影響の強いことが推察される. 因みに, 大田と渋谷は道路がほぼ南北に走っており, 風向の影響を検出し難い位置にある.

気象要素の影響を考慮した従来の報告では、プルームモデルなどの拡散モデルを利用した検討がなされているが⁹⁻¹¹⁾,風向風速一定などの限定条件が多い.また,道路の両側を考慮した報告はあまりみられない.このような拡散式による理論的アプローチは重要であるが,実際に道路両側の4地点でモニタリング調査が行われているので,このデータを利用した現象論的アプローチもまたモニタリング調査をより有効にするために意味があると思われる.今回のTable 5の結果か

ら,減衰定数が気象要素や地域要素と密接な関連を有することが示唆された.濃度距離減衰はこれらの要素が寄与することは明かと言ってよいであろう.1測定地点(例えば No.1 地点)を基準として回帰係数を利用すれば各地域の減衰定数を推定することができ,⑤式の濃度推定値が得られる.ただし,元の減衰定数は①式に基づく計算値であって,実測値でない.したがって,最適の濃度推定値を得るためには実測値と②式の差を最小にする回帰係数を求めねばならないが,解析的には解くことができず,近似解によらねばならない.さらに,その近似解が普遍性を有するためには大量のデータに基づくことが必要になり,今後もデータの蓄積が求められる.

まとめ

健康監視モニタリングとして現在幹線道路両側の沿道,後背地点で窒素酸化物測定を行っている。この資料を用いて,両側等距離地点間の濃度差について,また,沿道後背間の濃度変動への気象要素の寄与について検討した。その結果,以下の知見が得られた。

- 1) 道路両側の地点で、沿道からの距離が等しくても窒素酸化物濃度が同程度とは必ずしも見なせない。
- 2)この差は地区によって異なり、長期間でみても差は無視できない。
- 3) NOとNO_Xとを比べると、濃度が高く、自動車排気ガスの1次生成物であるNOの方が濃度差が大きい.
- 4) この濃度差を生ずる主原因の一つは風向などの気象要素と思われ、道路の方向が濃度差に関与する.
- 5)沿道から後背への濃度距離減衰は指数モデルにより表現できるが、その際、減衰定数は、気温、湿度、日射量、風向風速、交通量、道路幅と密接に関連する.

したがって、窒素酸化物濃度とその地区地点に居住する住民の健康影響との関連を追究する際には、以上の点を考慮すべきと考えられる.

(この報告の一部は第64回日本衛生学会総会(1994年 4月)で発表した。)

文 献

- 1)環境庁編:環境白書平成5年版,1993,大蔵省印刷局,東京.
- 2)環境庁大気保全局:日本の大気汚染状況平成5年版,1994,ぎょうせい、東京.
- 3) 東京都衛生局:大気汚染保健対策に係る健康影響 調査総合解析報告書, 1991, 東京.
- 4) 東京都環境保全局:昭和61年度大気汚染常時測定結果概要, 1988, 東京.
- Witz, S., Larm, A. M., Elvin, B. M. and Moore, A. B. : JAPCA, 32, 643-645, 1982.
- 6) Rao, S. T. and Visalli, J. R. : *JAPCA*, **31**, 851-860, 1981.
- 7) 神奈川県臨海地区大気汚染調査協議会:神奈川県臨海地区大気汚染調査報告書,1986,川崎.
- 8) 小野雅司,村上正孝,新田裕史,他:日本公衛誌, **37**,321-332,1990.
- 9) U. S. Environmental Protection Agency: Guidline on Air Quality Model, *EPA* **450**/2-78-027R, NTIS, PB 86-245248, 1986.
- 10) Bache, D. H.: Atmospheric Environment, 13, 1681-1687, 1979.
- 11) Yamada, T: Atmospheric Environment, 11, 1015-1024, 1977.

室内塵(ハウスダスト)の性状とその挙動に関する調査

佐藤泰仁

Study on Chemical Components and Amount in Daily Change of Indoor Dust

YASUHITO SATO*

Keyword:室内環境 Indoor environment, ハウスダスト House dust, 組成分析 Component analysis, 日変化 Daily change

はじめに

近年、我々の居住環境は建設工法の発達により、快適な人工空間となってきている。しかし、気密性が高く準閉鎖環境でもあるため、室内空気の汚染による健康影響が危惧されている。特に室内で起こる気管支喘息やアレルギー等の疾病と室内粉塵との関連について高い関心がもたれるようになった。しかし、今までに室内塵の化学的組成についてはMcCrone等¹⁾の報告があるにすぎない。我国においては建築様式や生活様式が大きく変化しているにも係わらず室内塵の成分等について検討された調査資料は殆どなく、ビル管理法に規制されている建築物に関するものしかないのが現状である。その背景には居住環境に関する法的規制がなく、さらに室内塵による影響が各家庭の家族構成や住まい方によって大きく左右されるため、個々の問題として表に出にくい側面のあることが考えられる。

そこで我々は、居住環境の室内で生じる粉塵がどのような性状(組成成分)を有しているのか、我々の日常生活の活動で生じる浮遊粉塵の挙動(時間的変化)がどのようであるかについて実態を調査し、室内環境における健康面での安全性を確保するための方策を見い出すことを目的として調査を実施した。

調査方法

1. 室内塵(ハウスダスト)の化学的性状について

〈試料の採取〉戸建住宅(4戸), 共同住宅(8戸)の総計12戸の住宅の協力を得て, 各家庭で使用されている掃除機に蓄積されていたゴミを試料として採取した.

掃除機内のゴミを調査の対象としたのは, 試料の入 手が容易であり, かつ室内塵の成分が各家庭の住まい 方に関連した特性を示しているものと考えたからである.

《試料の分類》集めた試料は、ダニ類の分離に用いられているふるいわけ試験 2)に従って、試験用ふるいを用い、試料の全量を粗塵(16mesh以上、目の開き1mm)、細塵(16~200mesh以下、目の開き1mm~75 μ m)、微塵(200mesh以下、目の開き75 μ m)の3種類に分類した、〈組成分析〉

1) 元素組成分析:エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置(理学電機工業製,ウルトラトレースシステム0600型にデータ処理システム7077型を組み合わせたもの)を用い常法により分析した.

測定条件

管球:モリブデン管球(対象元素=Pb, Zn, As 等), ゲルマニュウム管球(対象元素=Fe, Cu, Mn, Cr, V 等), 蛍光 X 線スペクトル:K α 線(対象元素=As, Zn, Cu, Mn, Cr, V 等), K β 線(対象元素=Fe), L β 線(対象元素=Pb), X 線発生装置の電圧, 電流及び測定時間:40KV, 25mA, 200 秒, (Ge):40KV, 60mA, 300 秒 (Mo), チャンネル幅:10KeV (Ge), 20KeV (Mo), 検出器:Si (Li)

2) 結晶構造の解析: X線回折装置(リガク製, RINT-2500V)を用い常法により分析した.

測定条件

管球:銅管球、管電圧:50KV、管電流:300mA、スリット系:DS $1/2^\circ$ 、SS $1/2^\circ$ 、RS 0.15mm、連続スキャニング法(サンプリング: 0.01° 、走査速度: 5° /min,)、モノクロメータ:自動モノクロメータ使用

3)無機成分・有機成分の分類:試料2gを精秤し、

^{*}東京都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

これを磁製皿に入れ電気炉にて800℃, 7時間の灰化を行い, 灰化後デシケータ内で常温で冷却してから再度秤量し, 熱灼減量を有機成分とし, 灰分を無機成分とした.

4) 粒径及び繊維状粒子の同定:①光学顕微鏡法による粒径の計測:微塵の一定量をトリアセチンによりカバーグラスで固定したものを試料とし、その試料を光学顕微鏡の鏡筒内に入れたアイピースグレイティクル(測微計)により400倍の倍率で10視野の計測を行った. ②繊維状粒子の計測:粒径計測と同様に試料を作成し、微塵と細塵について10ミクロン以上の粒子を100倍の倍率で微塵は5視野、細塵は3視野の計測を行った.

2. 浮遊粉塵量の挙動調査

日常の生活活動から生じる浮遊粉塵の挙動を調査するため、夏季、冬季において同一住宅について次の①②③に示す条件で調査を行った。測定器は原則として居間に設置し、1日(24時間)の経時変化をとらえることとした。

- ①喫煙者在住家庭の居間での変動
- ②寝具の出し入れ及び掃除機使用の掃除による発塵
- ③蚊取り線香使用時の居間での変動(夏季のみ)

使用した機器は光散乱方式のデジタル粉塵計 PCD-1型(柴田科学器械工業製)である。この粉塵計は相対濃度計であるため、標準測定法(ローボリュウム・エアー・サンプラー法)による質量濃度への補正が必要となる。

そこで今回, 粉塵量(質量濃度)に換算するための質量濃度換算係数(較正係数) K は K = 1.3 を用いた³⁾.

結果及び考察

1) 粉塵の化学組織について

ふるい分け試験により求めた粗塵,細塵,微塵の割合を,また,有機成分と無機成分の割合を重量比で表 1 に示した.各家庭のゴミ質 (内容物) により組成比に バラツキが認められるが,12試料の平均値からみると,粗塵,細塵,微塵の割合はおおむね 2:3:5 であり,有機成分と無機成分の割合は 7:3 であった.前者に ついては,これを比較検討する資料がないが,後者に ついては我々が以前に報告した調査データ $^{4-7}$ と比較すると,大気環境での降下媒塵中の有機成分と無機成分の割合は $3:7^{4}$ で,ビルの空調ダクト内の堆積塵の成分割合も $4:6^{5-7}$ と無機成分が多く存在していたが,今回の結果はこれらとは逆であった.当然,室の内外では粉塵の発生原因が異なり,さらに,生活様式の違いが粉塵の成分内容に大きな影響を与えているため,今回のように有機性成分の割合が多い結果になったも

表1. 室内塵の組成比

(単位:%)

試料 No.	粗塵	細塵	微塵	有機成分	無機成分
1	10.1	20.1	69.8	63.8	36.2
2	13.3	11.5	75.2	47.0	53.0
3	18.7	24.5	56.8	81.3	18.7
4	32.7	54.8	12.5	94.1	5.9
5	21.2	39.8	39.0	87.7	12.3
6	16.3	18.9	64.8	79.6	20.4
7	30.4	19.9	49.7	88.4	11.6
8	25.2	23.8	51.0	68.4	31.6
9	17.8	21.2	61.0	70.2	29.8
10	31.1	30.2	38.7	60.3	39.7
11	13.4	19.7	66.9	88.1	11.9
12	22.3	31.1	46.6	81.3	18.7
平均值	21.0	26.3	52.7	75.9	24.1

注) No.1, 4, 8, 10は戸建住宅である.

のと思われる.

また,室内塵の重量組成比は,微塵が半分以上を占めていることから,我々の居住空間の床等には浮遊粉塵の源となり得る,微小粒子が多く存在していることが推察される.

目視によるゴミの観察によると、粗塵には人間の毛髪、ペットの毛、繊維類、建材片、土砂等が存在しており、細塵にはこれらの一部と食物片、塗料片、植物片、昆虫類等が認められた、微塵は粉末状態で、目視では内容物を識別できず、粗塵、細塵中で検出されたものがさらに粉砕された状態で存在しているものと思われる

そこで粗塵, 細塵, 微塵をそれぞれ0.5gずつ秤量し, 蛍光X線分析装置による元素組成分析を行った.

その結果、検出同定された成分は、Al, Si, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn 及びPb 等であり、これらの成分は先に記した空調ダクトの堆積塵等でみられた組成 $^{4-6}$ と類似の元素成分であった。

長良⁸⁾のビルの室内調査によると、室内浮遊塵の元素 組成は自然換気状態では大気環境に近いとしている.

一般家庭ではほとんどが自然換気であり、外気の流入があると考えられ、したがって今回の家庭内調査結果が外気組成に類似した結果になったものと推察される.

元素分析については、元素の定量は行わなかったが、各元素のエネルギー強度による定性分析結果からは、多くの試料では図1に示したように、粗塵→細塵→微塵になるほどカルシウム、鉄及び亜鉛が多い傾向を示していた。これらの元素は外気環境に多い成分である

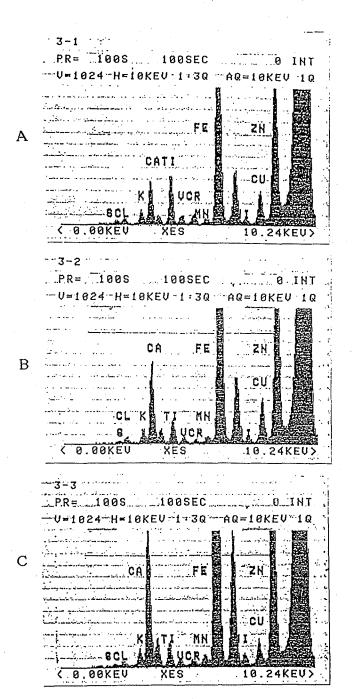


図1.室内塵の元素組成パターン A:粗塵 B:細塵 C:微塵

ことから、室内塵には外気由来の成分の寄与が大きいものと推察される.

粉塵の粒径分布については、計測した試料がNO.8,NO.9,NO.11の3試料と少なかったが、微塵の粒径分布を図2に示しておいた、その結果は、 $5\sim11\,\mu$ mを中心とする分布を示していたが、光学顕微鏡による計測の限界である $1\,\mu$ m以下のサブミクロン領域については計測不可能であることから、実際には $1\,\mu$ m以下の粒子も多くあるものと推定される。ちなみに、今回の結果を計測数から求めた粒径別の割合については $1\,\mu$ m以下が1.8%, $1\sim5\,\mu$ mが20.2%, $5\sim10\,\mu$ mが41.8%,

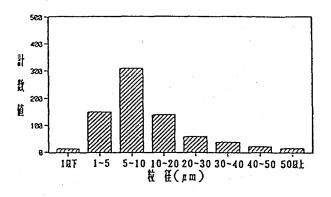


図2. 微塵の粒径分布

10~20μmが18.6%で、10μm以下が大半の64%を占めていた。このように微塵には10μm以下の粉塵が多く存在しており、室内における浮遊粉塵の主体をなすものは微塵であることが判明した。細塵についても同様な測定を行ったが粒径の範囲が広いため、一部計測困難な視野もあったが約70μm前後を中心とする分布であると推察された。

健康影響を左右する因子と考えられる 10μ m以上の繊維状粒子の存在割合を求めるため、先述のNO.8、NO.9、NO.11の3試料について計測を行った。その結果、微塵についてはNO.8が総粉塵数2655個に対して繊維状粒子が115個 (115/2655)で4.3%、NO.9が1.4% (45/3115)、NO.11が3.9% (115/3990)であった。同様に、細塵についての計測結果はNO.8が38.8% (462/1191)、NO.9は51.0% (1059/2079)、NO.11は58.3% (951/1632)であった。これらの結果から、微塵中に占める繊維状粒子の割合は $1\sim5$ %と少なく、細塵中には $40\sim60$ %が存在しており、繊維状粒子は細塵中に多く存在していることが解った。

X線回折装置により結晶構造の解析は、粗塵及び細塵は毛髪や繊維状のものが多く測定のために行う粉末状にしにくく、回折分析には適さないため、微塵についてのみ行った. 微塵は粉末状ではあったが若干粒度が粗いため、試料をメノウ乳鉢に入れてより細かくし、回折強度か得やすいように前処理を行った. 分析結果の一例を図3、図4に示す.

それぞれの試料から主成分として同定されたのは、 Na_2SO_4 , $CaCO_3$, NaCl, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $Mg_3Si_4O_{10}$ (OH) $_2$, SiO_2 , Al_2O_3 等であった. したがって,先の組成分析で定性されたカルシウムは $CaCO_3$ や $CaSO_4$ ・ $2H_2O$ 等がその主要成分であると思われる. Na_2SO_4 はガラスやパルプの製造,洗剤等にも使用されているためか,多くの試料から同定された. そこで,発生源を推定するためコピー用紙の箱の底内に残存しているペー

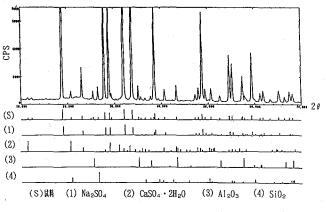


図3. 微塵の X線回折チャート (試料 NO.8)

パーダストや粉末中性洗剤を分析した結果,この成分と同じ回折スペクトルが得られた. $Mg_3Si_4O_{10}$ (OH) $_2$ はベビーパウダー等にも使用されている.したがって,この $_2$ 成分は使用実態や分析例から,発生源は室内由来の寄与が大きいものと判断し、その他の成分は大気塵や土壌に多く存在することから外気由来のものと推定された.

2) 浮遊粉塵の挙動調査

浮遊粉塵の日内変化による挙動について,夏季と冬季の違いを調査した.①喫煙者在住家庭での測定チャートを図5,図6に,1時間帯毎の幾何平均濃度を経時変化として図7に示した.さらに,②寝具の出し入れ及び掃除機使用の掃除による発塵の状況も1時間帯毎の幾何平均濃度を経時変化として示したのが図

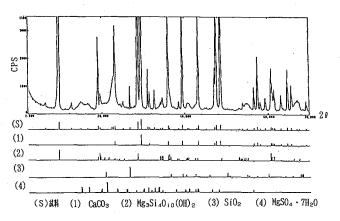


図4. 微塵のX線回折チャート (試料 NO.12)

8である. 図 5, 図 6 にみられるように、喫煙が行われるとその時点から瞬時に粉塵が高濃度を示し、チャート上のフルスケールである 0.3mg/m^3 の濃度を越える現象が生じ、特に冬季にはこの傾向が大きくなることがみられた.

1日の時間荷重平均濃度を求めてみると,夏季が0.04mg/m³であり,冬季は0.08mg/m³となり2倍の濃度差となっている。また,浮遊粉塵濃度の基準値である,0.15mg/m³を越えている総時間は夏季が50分であるのに比べ,冬季は162分と3倍以上と長く,冬季は高濃度環境になることが認められた。測定チャートからみてもわかるように、喫煙量は両季ともほぼ同じ15本/日であるが,1日の時間荷重平均濃度で2倍の濃度差がみられたことは、冬季は暖房等の省エネを考慮する結果、

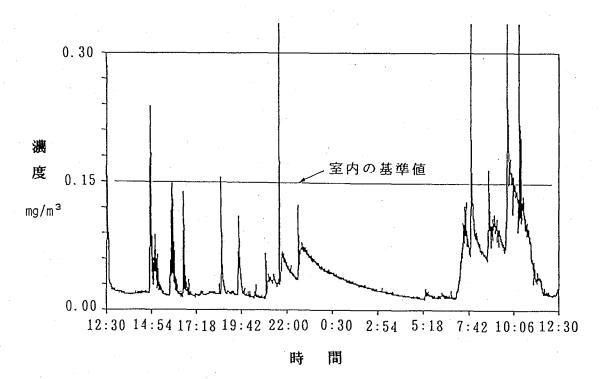


図5. 喫煙者在住家庭での夏季における浮遊粉塵の経時変化(生チャート)

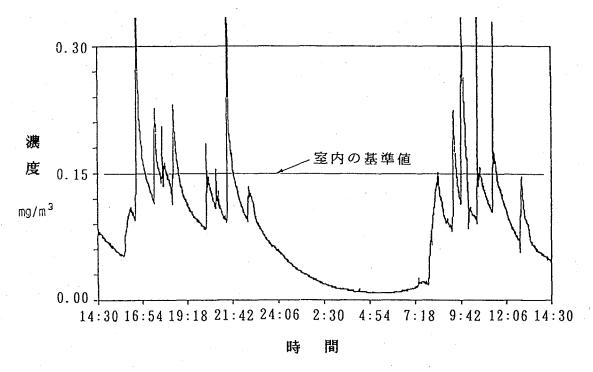


図6. 喫煙者在住家庭での冬季における浮遊粉塵の経時変化(生チャート)

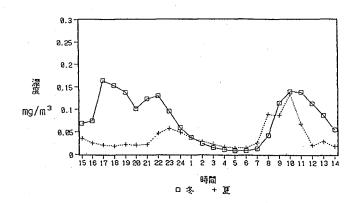


図7. 喫煙者家庭での時間荷重平均濃度による経時変化

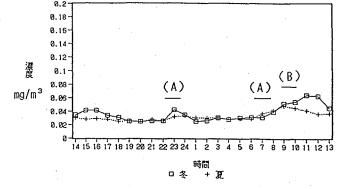


図8. 寝具の出し入れ (A), 掃除機使用時の (B) の時間荷重平均濃度による経時変化

窓等の開放時間が減少し、そのため換気量の低下を引き起こし、夏季に比べて発生した粉塵の希釈や拡散量の違いによるものと推測される.

次に寝具の出し入れ等にともなう発塵状況を図8に示した. その結果, 1日の時間荷重平均濃度は,夏季が0.03mg/m³,冬季が0.04mb/m³であり,季節による濃度差はみられなかった. しかし,図8(A,B)からもわかるように局所的な時間帯をみると,冬季の方が若干高い傾向であること,かつ濃度の低減に長時間を要することが認められる. さらに,チャートには示してないが,等やハタキを使用した掃除では粉塵の発生は顕著であった. したがって,窓等を閉め切った状態が多くなる冬季は,より意識的に窓等の開口部を開けて作業を行うことが第一で,さらに,掃除機の排気口

を外に向ける, または掃除機に排気用ホースをつけ外 に出す等の配慮を持つことが必要と考える.

最後に、③蚊取り線香を使用した時(夏季)の測定チャートを図9に示した。窓等が開放された状態でも蚊取り線香を使用すると直ちに粉塵濃度が上昇し、それから平衝に近い状態を一定時間維持し、線香がなくなると徐々に下降する現象がみられている。濃度的には蚊取り線香を使用しない時間帯に比べ、約10倍もの濃度上昇となっており、先に記した基準値を超える状況がみられた。基準値を超えた時間をチャートから求めてみると、4時間以上と長時間であった。このことには部屋の大きさ、窓の開放面積、蚊取り線香の長さ等も関連してくるが、蚊取り線香の煙も粉塵の1つであることで、室内濃度を高くする原因にもなってくる。

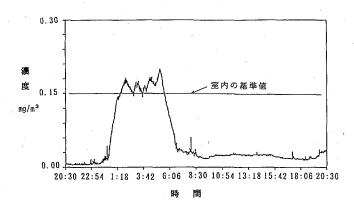


図9. 蚊取り線香使用時の夏季における浮遊粉塵の 経時変化(生チャート)

最近の蚊取り線香には煙の出ない液状タイプのものも 市販されており、粉塵発生の抑制を考慮する場合は液 状タイプのものの方がより良いと考える.

まとめ

今回の結果をまとめてみると大要は以下のとおりである.

- (1) 各家庭によりゴミの内容物の違いはあるが、平均すると粗塵、細塵、微塵の割合(重量比)は2:3:5で、微塵が多いことがわかった。また有機物質と無機物質との割合は、7:3の割合で有機性成分が多い性状であり、外気等とは異なっていた。
- (2) 目視から、粗塵には毛髪、建材片、土砂等が、細塵には食物片、塗料片、昆虫類が多く観察された.
- (3) 無機成分の元素組成は外気や空調ダクト内の堆積 塵の組成と類似していた. また, 結晶構造からは家

庭で使用されている粉末洗剤の一成分である Na₂SO₄ (別名ボウ硝)が多くの試料から同定された.

- (4) 繊維状粒子は微塵よりも細塵中に多く存在していた.
- (5) 喫煙者在住家庭における1日の浮遊粉塵量は冬季の方が高く、夏季に比べると2倍の濃度差がみられた。この原因は、冬季は保温効果を高めるために窓等の開放度合が減り、ゆえに空気の置換が低下することによるものと推定される。

(この調査の概要は,第50回(盛岡,1991年10月)並び に第51回(東京,1992年10月)の日本公衆衛生学会大会 において発表した.)

文 献

- 1) McCrone, W. C and Delly, J. G: The Particle atlas, 2nd edition Vol. 4 Ann Arber Science Publication, 1973.
- 2) 吉川 翠:家屋害虫, 13(2), 75-85, 1991.
- 3) 空気清浄:相対濃度粉じん測定器の特性と標準的 使用法 (1985), **23-1**, 23-27, 1985.
- 4) 佐藤泰仁, 牧野国義, 狩野文雄ほか: 東京衛研年報, **26-1**, 265-271, 1975.
- 5) 佐藤泰仁:東京衛研年報, 33, 352-355, 1982.
- 6) 佐藤泰仁:東京衛研年報, 35, 324-328, 1984.
- 7) 佐藤泰仁, 吉川 翠, 緒角 聖ほか:東京衛研年 報, **38**, 304-308, 1987.
- 8) 長良健次:空気清浄, 22(6), 28-31, 1985.

ある河川水におけるモニタリング物質の検索及び濃度レベル

高橋保雄*,中川順一*,細川奈津子*,土屋悦輝*

Identification of Organic Compounds for Monitoring a River and Their Concentrations

YASUO TASKAHASHI*, JUNITI NAKAGAWA*, NATUKO HOSOKAWA* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords: 同定 identification, キャピラリーカラムガスクロマトグラフ/質量分析計 capillary column gas chromatography/mass spectrometry, 河川水 river water, 有機物 organic compound, 濃度 concentration, 除草剤 herbicide, 殺虫剤 insecticide, 殺菌剤 fungicide, 分解物 degradation compound, 有機リン酸トリエステル organophosphate triester, フタル酸エステル phthalic acid ester.

緒言

水道水の安全性確保の為に、水道原水である河川水中の微量有機物の調査、モニタリング等を行うことは極めて重要であると認識されてきた.

その結果、今回の水道法の改訂で、監視項目が設定され、水道原水の水質保全に注意が向けらようになってきた.しかし、水道原水の水質はそれぞれ地域の特性等を反映しているので、全国一律の新水道水質基準の監視項目では水道水の安全性確保に不十分である.

そこで、著者らはある地域で住民の約45%に供給している水道原水である河川水を用いて、ある水系(A水系)のモニタリング物質の検索をキャピラリーカラムガスクロマトグラフ/質量分析計(キャピラリーカラムGC/MS)で行い、モニタリング項目を設定し、その設定項目の内、市販の標準品があり、更にキャピラリーカラムGC/MSで測定できる溶存有機物について、その濃度レベルを調査した。

実験の部

1. 試 薬

ジクロロメタン、酢酸エチル、ヘキサン、エチルエーテル、アセトン、硫酸ナトリウム(無水):和光純薬残留農薬試験用. 塩酸:和光純薬重金属分析用. フロリジル:和光純薬100~200メッシュを650℃で6時間焼成し、活性化して使用. トリメチルシリルジアゾメタン、ジメチルホルムアミドジエチルアセタール:ジェールサイエンス誘導体調製試薬. 標準品:和光純薬・関東化学・東京化成等.

2. 試 料

1990年6月に、A水系の中流地点(No.1)と下流地点(No.10)の表層水各々541をモニタリング物質の検索に、また同年6月中旬と9月下旬に、中流地点から下流地点まで、10地点の各表層水1500mlをモニタリング物質の濃度レベル調査に用いた。Fig. 1にA水系の採水地点を示した。

3. 装置及び測定条件

1) 同定に用いた GC/MS の測定条件

モニタリング物質の同定は Hewlett Packard社製5890 A型のガスクロマトグラフ (GC), VG社製70-S (11-250Jシステム) の質量分析計 (MS) を使用し、次の測定条件で行った.

①中性物質の同定を,カラム:SPB-5 0.25mm id×30m 膜厚0.25 μm,カラム温度:55℃(2min)~4℃/min~280℃(15min),注入法:スプリットレス法,注入量:1 μl,注入口温度:250℃,カラムヘッド圧:12psi,イオン化法:EI,イオン化電圧:70eV,イオン化電流:100 μA,イオン源温度:210℃で行った.

②酸性物質及びエステル化した酸性物質の同定も、カラム:DB-17 0.25m id \times 30m 膜厚0.25 μ m、カラム温度:55 \mathbb{C} (2min) \sim 4 \mathbb{C} /min \sim 260 \mathbb{C} (15min) にして、それ以外は①と同一条件で行った。

2) 定量に用いた GC/MS の測定条件

モニタリング物質の濃度レベル測定は Hewlett Packard社製5890-2型の GC 及び Hewlett Packard社製5970型の MS を使用し、次の測定条件で行った.

^{*}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

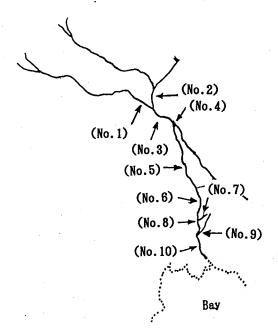


Fig.1. Location of Sampling Sites in A River

①中性物質群の内,ヘキサン分画の有機物を,カラム:DB-5 0.25mm id×30m 膜厚0.25 μ m,カラム温度:55 $^{\circ}$ C(2min)~15 $^{\circ}$ C/min~175 $^{\circ}$ C(0min)~2 $^{\circ}$ C/min~195 $^{\circ}$ C(0min)~8 $^{\circ}$ C/min~250 $^{\circ}$ C(2min),注入法:スプリットレス法,注入量:2 μ l,注入口温度:250 $^{\circ}$ C,カラムヘッド圧:5 psi,イオン化法:EI,イオン化電圧:70eV,トランスファーライン温度:270 $^{\circ}$ Cで定量を行った.

②中性物質群の内、35(v/v)%エチルエーテル含有のヘキサン分画及びアセトン分画の有機物も、カラム温度:55 $^{\circ}$ $^{\circ$

③酸性物質の内、ベンタゾンはトリメチルシリルジアゾメタンでメチル化した後、カラム:DB-1 0.25mm $id \times 30m$ 膜厚 $0.10 \, \mu m$ 、カラム温度: $55 \, \mathbb{C} \, (2 \, min) \sim 20 \, \mathbb{C} \, / min \sim 200 \, \mathbb{C} \, (0 \, min) \sim 9 \, \mathbb{C} \, / min \sim 265 \, \mathbb{C} \, (10 \, min)$ にして、それ以外は①と同一条件で定量を行った。

④酸性物質の内,クロロベンゾイックアシドもジエチルアセタールでエステル化後,カラム:DB-23 $0.25\,\mathrm{mm}$ id \times 30m 膜厚 $0.25\,\mathrm{\mu m}$,カラム温度:55 $^{\circ}$ $(2\,\mathrm{min})\sim$ 20 $^{\circ}$ /min \sim 120 $^{\circ}$ $(0\,\mathrm{min})\sim$ 10 $^{\circ}$ /min \sim 210 $^{\circ}$ $(13\,\mathrm{min})$ にして,それ以外は①と同一条件で定量を行った.

なお,モニターイオン(SIM)はそれぞれの物質の最大 強度のピーク,又は分子量ピークの質量数を用いて, 絶対検量線法で定量した.

4. 同定方法及び定量方法

1) モニタリング物質の同定方法

A水系における中流(No. 1)の表層水541にジクロロメ タン3.61を加えて、15分間の振とう抽出を行った. 同様 の操作をジクロロメタン3.61を加えて繰り返し、ジクロ ロメタン抽出液を合わせた. この操作により中性物質 をジクロロメタンに抽出した. このジクロロメタン抽 出液を脱水後、ロータリーエバボレーターで約20ml 迄濃 縮し、更にこの濃縮液を K.D. 濃縮器でヘキサンに転溶 し、引き続き窒素ガスを吹き付けて約750μιに濃縮した. 中性物質群は多種類であるので、分画する必要があ る. そこで, この濃縮液を直経1cm, 8gのフロリジル を充填したカラム (ただし、上端に硫酸ナトリウム(無 水)5gを乗せた.) にかけて3分画した. 最初の分画の 溶離溶媒はヘキサン100ml, 次の分画は35(v/v)%エチ ルエーテル含有のヘキサン80ml, 最後の分画はアセト ン250mlを毎分1mlの割合で順次溶離させた.ヘキサン 分画, 35(v/v)%エチルエーテル含有のヘキサン分画の 溶離液を K.D.濃縮器及び窒素ガス吹き付けで、1 mlに 定容した. またアセトン分画の溶離液も K.D.濃縮器で 酢酸エチルに転溶し、更に窒素ガスを吹き付けて 1 ml に定容した. そして, 各分画の定容液の一定量をキャ ピラリーカラム GC/MS に注入して同定を行った.

次に中性物質を取り除いた表層水541に濃塩酸180mlを添加した後,ジクロロメタン3.61を加えて、15分間の振とう抽出を行った。同様の操作をジクロロメタン3.61を加えて繰り返し、ジクロロメタンを合わせた。この操作により、酸性物質をジクロロメタンに抽出した。このジクロロメタン抽出液を脱水後、ロータリーエバボレーターで約20ml迄濃縮し、更にこの濃縮液を K.D.濃縮器で酢酸エチルに転溶し、引き続き窒素ガスを吹き付けて 1 mlに定容した。そして、定容液の一定量をキャピラリーカラム GC/MS に注入して同定を行った。

ベンゼン骨格のある酸性物質を同定する為に、残りの酢酸エチル定容液の内、200 μ1を風乾させ、これにジメチルホルムアミドジエチルアセタールを加えて、100℃で2時間加熱してエチルエステル化を行った後、酢酸エチルで200 μ1に定容した。そして、定容液の一定量をキャピラリーカラム GC/MS に注入して同定を行った。

以上の操作を, A水系の下流 (No.10) の表層水541に ついても同様に行った.

ただし、溶媒・フロリジル・操作由来の有機物と河川水由来の有機物を区別するために、ジクロロメタン7.21を用いて、ロタリーエバボレーターでの濃縮以降同

様の操作を行い、これをブランクとした.

2) モニタリング物質の定量方法

表層水1500mlを用いて、実験方法 4.1)の方法でキャピラリーカラム GC/MS-SIM を用いて、モニタリング物質の濃度レベルを調査した.

なお、ベンタゾンの定量は酸性物質群の酢酸エチル定容液 $200\mu l$ を風乾させ、トリメチルシリルジアゾメタンを加え、1時間放置してメチル化を行い、酢酸エチルで $1\,\mathrm{ml}$ に定容し、この定容液の一定量をキャピラリーカラム $\,\mathrm{GC/MS-SIM}}$ に注入して行った。

ただし、溶媒・フロリジル・操作由来の有機物と河川水由来の有機物を区別するために、ジクロロメタン 200mlを用いて、濃縮以降同様の操作を行い、これをブランクとした.

結果と考察

1. モニタリング項目の設定

Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4 は中流地点 (No. 1),及び下流地点 (No. 10) の表層水中の中性物質群 (ヘキサン分画, 35 (v/v) %エチルエーテル含有のヘキサン分画, アセトン分画) の FIDーキャピラリーカラムガスクロマトグラムである. Fig. 5, Fig. 6 は中流地点及び下流地点の表層水中の酸性物質群及びエステル化した酸性物質群の FIDーキャピラリーカラムガスクロマトグラムである.

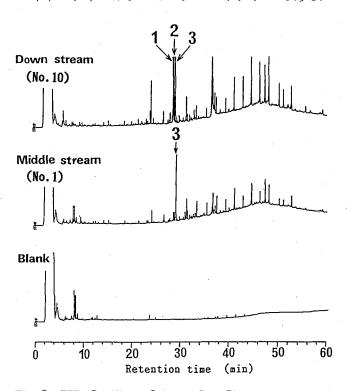


Fig. 2. FID-Capillary Column Gas Chromatograms of the Hexane Fraction Partitioned by Florisil Column Chromatography in the Neutral Organic Compounds, Extracted by Dichloromethane from A River

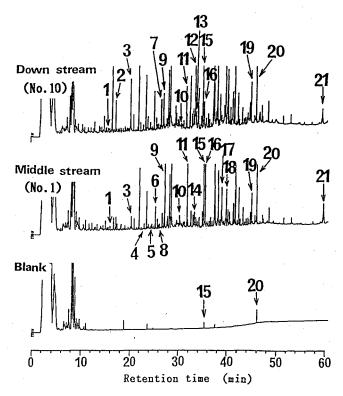


Fig. 3. FID-Capillary Column Gas Chromatograms of the 35%Ether/Hexane Fraction Partitioned by Florisil Column Chromatography in the Neutral Organic Compounds, Extracted by Dichloromethane from A River

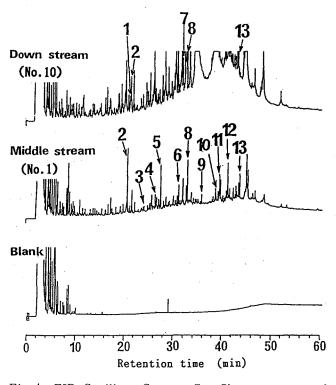
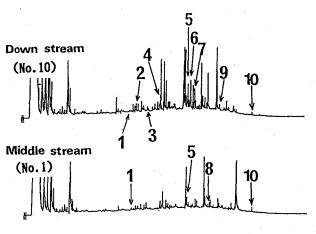


Fig. 4. FID-Capillary Corumn Gas Chromatograms of the Acetone Fraction Partitioned by Florisil Column Chromatography in the Neutral Organic Compounds, Extracted by Dichloromethane from A River

Table 1 ~ Table 5 は中流地点及び下流地点の表層水中の中性物質群と酸性物質群のキャピラリーカラム GC/MS で同定できた物質名である.

中性物質群のヘキサン分画(Fig. 2)で、同定できた主な物質は脂肪族炭化水素、環状イオウ分子(S_8)であった。ただし、Fig. 2 は FIDーキャピラリーカラムガスクロマトグラムであるので、環状イオウ分子のピークは認められない。また35(v/v)%エチルエーテル含有のヘキサン分画(Fig. 3)及びアセトン分画(Fig. 4)で同定できた主な物質は農薬、可塑剤、代謝(分解生成)物質であった。農薬では、水稲除草剤(モリネート、シマジン、シメトリン、チオベンカルブ、ブタクロール、オキサ



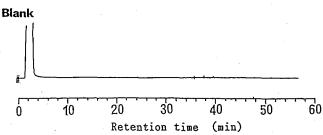


Fig. 5. FID-Capillary Column Gas Chromatograms of the Acidic Organic Compounds, Extracted by Dichloromethane from A River

ジアゾン),除草剤(メトラクロール),殺菌剤(IBP), 殺虫剤(ダイアジノン)であり,可塑剤では,フタル酸 エステル(DBP, DHP, DEHP)と有機リン酸トリエステル(TCEP, TBXP)であり,代謝物質あるいは分解生成 物質ではベンズアルデヒド類,ナフタレン類,アルキ ルフェノール類であった.酸性物質群(Fig. 5, Fig. 6)

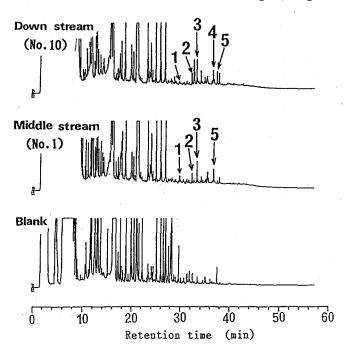


Fig. 6. FID-Capillary Column Gas Chromatograms of the Estified Acidic Organic Compounds, Extracted by Dichloromethane from A River

Table 1. Substance Identified (Numbers Correspond to Those in Fig. 2.)

Correspond
Heptadecene
Heptadecane
Hexadecane

Table 2. Substance Identified (Numbers Correspond to Those in Fig. 3.)

Number	Correspond	Number	Correspond
1	Benzothiazole	11	Diazinon
2	Ethenyl, methyl pyrroledione	12	Dimethylnonyl benzene
3	Hydroxy benzaldehyde	13	Bis (dimethylethyl) methyl phenol
4	Dimethyl phthalate	14	Simetryn
5	Molinate	15	DBP
6	Methylethyl phenol	16	Thiobencarb
.7	DEP	17	Butachlor
8	Nitro naphthalene	18	Oxadiazon
9	Methylpropyl phenol or	19	Dioctadecyl ester phoshonic acid
	Methoxypropyl benzene	20	DEHP
10	Simazine (CAT)	21	Cholesterol

Number	Correspond	Number	Correspond
1	Dihydro, trimethyl naphthalene	8	Kitazin P(IBP)
2	Hydroxy benzaldehyde	9	PAE
3	Methylethyl phenol	10	Meteilachlor (Metolachlor)
4	PAE	11	Dinitro naphthalene
5	Methylpropyl phenol	12	Fenthion (MPP)
6	TCEP	13	TBXP
7	Carboxaldehyde indole		

Table 3. Substance Identified (Numbers Correspond to Those in Fig. 4.)

Table 4. Substance Identified (Numbers Correspond to Those in Fig. 5.)

Number	Correspond	Number	Correspond	
1	Bis (methylethyl) phenol	6	Hexadecanoic acid	
2	Bis (dimethylethyl) phenol	7	Bentazone	
3	Tetradecanoic acid	8	PAE	
. 4	Caffeine	9	Octadecanoic acid	
5	PAE	10	PAE	

Table 5. Substance Identified (Numbers Correspond to Those in Fig. 6.)

Number	Correspond
1	Tetradecanoic acid, ethyl ester
2	PAE
. 3	Hexadecanoic acid, ethyl ester
4	Octadecatrienoic acid, ethyl ester
5	Octadecanoic acid, ethyl ester

で同定できた主な物質は水稲除草剤(ベンタゾン), アルキルベンゼン類, アルキルフェノール類, 脂肪族カルボン酸, ジクロロベンゾイックアシドであった.

水稲除草剤が数多く検出されたことから、A水系で はこれら以外の水稲除草剤も検出されると推定される. 事実、著者ら¹⁻³⁾は今回未検出の CNP、クロメトキシニ ル,アトラジンをこの水系から検出している.一方, 散布後直ちに分解する水稲除草剤は分解生成物質が検 出されると予測されるので、分解生成物質にも注意を 払う必要性がある. また, 今回検出された農薬の殺菌 剤と殺虫剤(原体生産量は1000トン以上)は大量に使用 されているので、同様に大量に使用されている殺菌剤、 殺虫剤も検出されると予測される. 事実, 著者ら¹⁻³⁾は 今回、未検出のイソプロチオラン、MEP をこの水系か ら検出している. A水系の一部に,河川敷のゴルフ場 はあるが、ゴルフ場使用農薬は検出されなっかった. これらゴルフ場で使用される農薬は使用量及び使用方 法を考えると、水稲農薬に比較して検出されることは 極端に少ないと予測される.

可塑剤の内、フタル酸エステルの DEHP は最近発癌性物質と見なされている.一方有機リン酸トリエステルは難燃加工剤、ガソリン添加剤、合成樹脂可塑剤として幅広く工業に利用され、また繊維製品の防炎難燃加工剤として日常用品に利用されている.これら物質4)は生物濃縮性を有し、一部は突然変異原性を有している.また、著者ら2)は今回未検出の TBP、CRP、TPPをこの水系から、検出しているので、今回未検出の有機リン酸トリエステルにも注意を向ける必要性がある.

代謝(分解生成)物質であるベンズアルデヒド類,ナフタレン類,アルキルフェノール類は一般に環境中に長く残留し,毒性もあることが多いので,関心を向ける必要性がある.その内,アルキルフェノール類はプレダイオキシンであるとして,特に注意が向けられつつある.

結論として、A水系において、モニタリングする必要性のある物質は以下の通りであるとした.

- [1]水稲除草剤(モリネート,シマジン,シメトリン,チオベンカルブ,ブタクロール,オキサジアゾン,ベンタゾン,CNP,クロメトキシニルなど)
- [2]散布後直ちに分解する水稲除草剤の分解生成物質 (ピラゾレート⁵⁾ではジクロロベンゾイックアシド,ナプロアニリド⁶⁾ではナフトール)
- [3] 殺菌剤と殺虫剤及び除草剤(IBP, イソプロチオラン, ダイアジノン, MEP, BPMC, MPP, TCTP, メトラクロラールなど)
- [4]農薬とその光分解生成物(チオベンカルブ⁷⁾ではクロロベンズアルデヒド・クロロベンジルアルコール,

ブタクロール⁸⁾ではジエチルアニリン・キシレン・エチルトルエン・トルエン・エチルベンゼン, モリネート⁹⁾ではヘキサメチレンイミン・カプロラクタム, MEP¹⁰⁾ではメチルニトロフェノール・フェニトロオキソン, ダイアジノン¹¹⁾ではダイアジノオキソン)
[5]代謝(分解生成)物質(ベンズアルデヒド類, ナフタレン類, アルキルフェノール類)

[6]可塑剤の内, フタル酸エステル(DBP, DHP, DOP, DEHPなど)と有機リン酸トリエステル(TBP, TCEP, TNAP, CRP, TPP, TBXP, TCP, TDBP, TBPP など)

以上のモニタリングを行う必要性のある物質は生産 活動由来の有機物,日常生活由来の有機物,農薬特に 水稲農薬、及びそれぞれの分解生成物である.

Table 6. Minimum, Maximum and Mean Concentration of Surveyed Organic Compounds in A River (ng/l)

		1990.6		<u> </u>	1990.9	
	min.	max.	mean	min.	max.	mean
[Herbicide and Pesticide]	,					
1) Molinate	6.3	46.7	19.8	ND	1.7	0.2
2) Simazine (CAT)	333.0	1430.0	698.0	107.0	350.0	207.0
3) Simetryn	ND	33.3	11.6	ND ·	4.0	0.5
4) Thiobencarb	73.3	367.0	158.0	1.3	15.0	7.0
5) Butachlor	6.0	117.0	47.6	ND	2.0	0.4
6) Oxadiazon	15.0	173.0	69.2	2.3	20.0	8.1
7) Chlornitrofen (CNP)	ND	16.7	5.7	ND	ND	ND
8) Chlormethoxynil (X-52)	· ND	20.0	6.6	ND	ND ·	ND
9) Bentazon	127.0	667.0	308.0	ND	217.0	60.3
10) Iprobenphos (IBP)	83.3	1000.0	402.0	6.7	267.0	58.7
11) Isoprothiolane	16.7	117.0	65.7	ND	56.7	13.1
12) Fenobucarb (BPMC)	25.0	367.0	207.0	5.4	54.5	19.7
13) Diazinon	40.0	667.0	232.0	2.7	60.0	21.5
14) Fenitrothion (MEP)	20.0	183.0	68.0	8.3	500.0	134.0
15) Metolachlor	1.0	33.3	8.4	ND	2.0	0.8
16) Chlorthal-Dimethyl (TCTP)	ND	0.8	0.4	ND	1.3	0.2
[Dergradation compound of herbicide]			* *			
1) 2,4-Dichlorobenzoic acid	70.0	267.0	159.0	5.0	67.0	20.1
2) p-Chlorobenzaldehyde	3.5	36.6	17.3	0.3	3.5	1.8
3) p-Chlorobenzyl alcohol	0.5	9.0	3.8	ND	1.0	1.3
4) 3-Methyl-4-nitrophenol	ND	3.0	1.5	ND	9.0	2.6
[Organophosphate triester]						
1) TEP	1.3	30.0	6.3	0.7	7.3	3.1
2) Triallyl phosphate	ND	23.3	6.2	ND	1.7	0.6
3) TBP	10.3	90.0	38.4	8.3	110.0	43.5
4) TCEP	66.7	533.0	162.0	43.3	767.0	231.0
5) TCPP	22.7	470.0	123.0	12.0	447.0	109.0
(TCPP-1)	16.2	306.0	82.9	7.1	306.0	71.1
(TCPP-2)	5.6	145.0	34.7	4.0	122.0	32.8
(TCPP-3)	0.9	19.8	5.7	0.9	18.9	5.3
6) CRP	10.0	73.3	24.2	6.7	70.0	25.5
7) TPP	8.3	83.3	34.5	ND	1.8	0.4
8) TBXP	100.0	1670.0	323.0	60.0	1370.0	357.0
9) TCP	2.4	33.3	10.5	ND	15.3	3.2
(TCP-1)	1.0	8.5	2.4	ND	7.8	1.5
(TCP-2)	1.0	15.0	4.2	ND	7.5	1.2
(TCP-3)	0.7	11.7	3.7	ND	4.8	0.5
(TCP-4)	0.1	0.4	0.2	ND	ND	0.0
[Other compound]						
 α-Nitronaphthalene 	4.0	43.3	15.2	ND	5.7	2.5
2) 2-Nitronaphthalene	20.0	55.0	35.7	13.3	70.0	34.8
3) 1,5-Dinitronaphthalene	ND	50.0	9.6	ND	10.0	3.7
4) Cholesterol	233.0	10000.	1800.0	833.0	8330.0	3170.0

2. モニタリング物質の濃度レベル

モニタリングする必要性のある有機物の内,市販の標準品があり,更にキャピラリーカラム GC/MS で一斉分析できる溶存有機物について,濃度レベル調査を行った.ただし,ジクロロメタンで抽出されにくい有機物,及びフロリジルカラムクロマトグフィーにおいて,回収率の良好でない有機物は濃度レベル調査から除外した. Table 6 は A水系のNo.1~No.10における,6 月及び9 月の主な有機物の検出濃度範囲とその平均濃度である.

水稲除草剤(モリネート、シマジン、シメトリン、チオベンカルブ、ブタクロール、オキサジアゾン、CNP、クロメトキシニル、ベンタゾン)、水稲殺菌剤(IBP、イソプロチオラン)、水稲殺虫剤(BPMC)が全採水地点から、散布時期(6月)に数ng/lから数百ng/lの範囲で検出され、シマジン、IBP 以外は 9 月ではほとんど検出されなかった。これら農薬の検出濃度はこの水系における使用時期及び使用量、溶解度、水中半減期、土壌半減期等を強く反映している。一例として、この水系ではシマジン、IBP は大量に使用され、溶解度も高く、半減期も非常に長いので、検出濃度は高い、一方 CNP、クロメトキシニルもかなり使用されているが、溶解度が小さい為、検出濃度は低い、6 月のこれら水稲農薬の合計濃度は各採水地点で、約 2 μ g/lrであった。

ダイアジノン、MEP は中流 (No.2) では水稲及び畑に施用され、下流 (No.7, No.9) では畑及び住宅環境に施用され、各採水地点で 6 月及び 9 月に数ng/lから数百ng/lの範囲で検出されていた、その内、MEP は住宅地域 (No.7, No.9) において、9 月でも大量に施用されいた。

ピラゾレート、チオベンカルブ、MEP の光分解生成物として考えられるジクロロベンゾイックアシド、クロロベンズアルデヒド、クロロベンジルアルコール、メチルーニトロフェノールは散布時期を反映して、数ng/lから数 Π g/lの範囲で検出されていた。また穀類の殺虫剤、メトラクロールと芝生の除草剤、TCTP も 1 ng/l弱から数 Π g/l0の範囲で検出されていた。6月の非水稲農薬及び農薬の光分解生成物の合計濃度は各採水地点で、約 1 μ g/l0であった。

A水系中の農薬及びそれらの光分解生成物の合計濃度は6月では、各採水地点で、約3 μ g/lであった。また著者らが以前報告¹⁻²⁾した水道水及び水道原水中の有機塩素系農薬及び有機リン系農薬の濃度から推測して、今回調査した農薬及びその分解生成物の合計濃度はこの水系では、7月に最高値になり、数 μ g/l~数十 μ g/l

に達する場合があると考えられる.

日常の生活及び産業に由来する有機リン酸トリエステル (TEP, トリアリルホスフェート, TBP, TCEP, TCPP, CRP, TPP, TEXP, TCP)が全採水地点から,数ng/lから数Eng/lの範囲で検出されていた。この有機リン酸トリエステルの内, TEP, トリアリルホスフェート, TPP, TCPの検出濃度はEngledes6月Engledes9月Engledes6月Engledes9月Engledes6月Engledes6月Engledes9月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes6月Engledes70年Engled

これら農薬及び農薬分解生成物,有機リン酸トリエステル以外にも,全採水地点から,ナフタレン類は数ng/l~数+ng/lで検出され,コレステロールは数 $\mu g/l$ 検出されていた.

この水系の中流では農業と住宅地・都市域の影響を受け、下流のNo.7, No.9ではより一層住宅地・都市域の影響を強く受けている。この水系は水道原水として使用されているので、これら有機物を監視する必要性はある。しかし、水道水を通じてこれら有機物を摂取しても、直ちに健康に悪影響を及ぼすとは考えにくい。

要 約

A水系においてモニタリングを行う必要性のある物質は生産活動由来の有機物,日常生活由来の有機物,農薬特に水稲農薬,及びそれぞれの分解生成物であった.その内,一部の物質について濃度レベル調査を行った.

A水系における 6月の水稲農薬は約 $2 \mu g/l$ であり,非水稲農薬と農薬の分解生成物の合計濃度は約 $1 \mu g/l$ であった.今回調査した農薬及びその分解生成物の合計濃度はこの水系では, 7月に最高値になり,数 $\mu g/l$ ~数十 $\mu g/l$ に達する場合があると考えられ,また,有機リン酸トリエステルの合計濃度も一年中,約 $1 \mu g/l$ であると推測される.その他に, 6月及び 9月にナフタレン類は数n g/l~数+n g/lで,コレステロールは数 $\mu g/l$ で検出されていた.

なお、A水系は中流では農業と住宅地・都市域の影響を受け、下流ではより一層住宅地・都市域の影響を 強く受けていることが判明した.

(本研究の概要は第1回環境化学討論会1992年6月, 及び第2回環境化学討論会1993年6月で発表した.)

文 献

- 1) 高橋保雄, 森田昌敏:水質汚濁研究, **11**, 93-99, 1988.
- 2) 高橋保雄, 森田昌敏:水質汚濁研究, **11**, 161-168, 1988.
- 3) 細川奈津子,中川順一,高橋保雄:東京衛研年報, **40**,2119-222,1989.
- 4) 剣持堅志, 松永和義, 石田立夫: 岡山県環境保健センター年報, 4, 103-110, 1980.
- 5) Yamaoka, K., Tsujino, Y., Ando, M., et al: *J. Pesticide Sci.*, **13**, 29-37, 1988.
- 6) Oyamda, M. and Kuwatsuka, S. : J. Pesticide Sci.,

- **11**, 179-187, 1986.
- 7) Ishikawa, K., Nakamura, Y. and Kuwatsuka, S. : J. Pesticide Sci., 2, 17-25, 1977.
- 8) Chen, Y-L., Lo, C-C. and Wang, Y-S. : *J. Pesticide Sci.*, **7**, 41-45, 1982.
- 9) Soderquist, C. J., Bower, J. B. and Grosby, D. G.: J. Agric. Food Chem., 25, 940-945, 1977.
- Ohkawa, H., Mikami, N. and Miyamoto, J. : Agr. Biol. Chem., 38, 2247-2255, 1974.
- 11) Pardue, J. R., Hansen, E. A., Barron, R. P. and Chen, j.-Y: *J. Agric. Food Chem.*, **18**, 405-409, 1970.

家庭用浄水器によるアスベスト繊維の除去試験

小輪瀬勉*,土屋悦輝*

Removal Studies on Asbestos-Fibers in Water using Household Water Purifier

TSUTOMU KOWASE* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords: アスベスト繊維 asbestos-fiber, 浄水器 water purifier, 透過型電子顕微鏡 transmission electron microscope

はじめに

水道給水管にアスベストセメント管が使用されている場合,更には環境からの影響により水道原水中にアスベスト繊維(以後アスベストと称す)が混入した場合等,給水栓がアスベストにより汚染される可能性が考えられる.

こうした事から、当所では平成元年より水道原水及び給水栓中のアスベスト濃度の実態調査を行っている.

その調査結果¹⁾ を見ると、アスベスト数の最高値が水道原水では250,000本/1、給水栓水は120,000本/1という結果が得られている.

以上の事から今回,水道水中のアスベストの除去方法として,市販の家庭用浄水器がどの程度の効果があるかの試験を行い,若干の知見を得たのでその結果を報告する.

市販の家庭用浄水器は、ろ過材の違いにより2種類に分類する事が出来る.

第1には残留塩素及びトリハロメタン等の有機物を除去する目的でろ過材に活性炭のみを用いた機種, 第2には残留塩素, 有機物, 更に鉄さび, 濁り等の微細な異物も除去する目的で活性炭と中空糸膜を組み合わせた2重構造を有する機種である.

今回は、それぞれ代表的なろ過材の製品2種類ずつを 選び試験を行った.

実験の部

- 1. 浄水器の機種及び性能:表1に示した.
- 2. 試料溶液:水道水アスベスト濃度:定量限界 (9,600本/1)以下にアスベスト(クリソタイル)を添加し,次の2種類の濃度の試料溶液を作成した.

(1)試料溶液-1:388,000本/1(都内のアスベスト調査に おいて検出された最高値に近い試 料.)

(2)試料溶液-2:13,003,000本/1(長沢²⁾らが発表した 都内の水道水中のアスベスト濃度に 近い試料.)

試料溶液-1及び2のアスベスト長さの分布表を表 2に示した。

3. 試験方法:除去試験には上記に示したアスベスト濃度の異なる試料溶液-1及び試料溶液-2を水流ポンプを用いて各浄水器に通過させ、その流出水(処理された水)について、次の各3種(初流水、処理能力中間水、最終処理能力水:最終処理能力は各製品により違いが有るのでそれぞれの製品のカタログに従った)の流出水各々11を採取し試料とした.

なお, 浄水器を通過させる流速は各機種とも, 毎分約21(各製品とも使用流速は毎分21としていた) に調製した.

上記の方法に従い、試料溶液-1及び2について、表1に示したA、B、C及びDの4種類の浄水器についてアスベスト除去試験を行い流出水を採取した.

4. 測定方法:3の試験方法で採水した各試料の流 出水11を常法³⁾に従い,電子顕微鏡を用いてアスベス トの本数を計測した.

結果および考察

各浄水器の試験結果を表 3 (試料溶液-1)及び表 4 (試料溶液-2)に示す.

A およびB の各浄水器では、試料溶液-1 及び試料溶液-2 を用いた試験において、長さ $10 \mu m$ 未満のアス

^{*}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

表1. 浄水器の機種及び性能

機種	ろ過材	処理能力(l)
A	活性炭	900
В	活性炭	17,000
С	活性炭+中空糸膜	2,000
D	活性炭+中空糸膜	4,500

表3.試料溶液-1における浄水器の試験結果

機種	採水試料	 総本数/I	スベスト繊維サイズ(μm)			
7茂俚	水水武件	松平奴/1	0.2~1.0未満	1.0~10未満	10以上	
	初流水	446,000	78,000	339,000	29,000	
A	中間水	368,000	49,000	300,000	19,000	
	最終水	407,000	97,000	310,000	<dt< td=""></dt<>	
	初流水	358,000	116,000	223,000	19,000	
В	中間水	465,000	145,000	300,000	<dl< td=""></dl<>	
	最終水	484,000	165,000	319,000	<dl< td=""></dl<>	
	初流水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dr< td=""></dr<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dr< td=""></dr<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dr< td=""></dr<></td></dl<>	<dr< td=""></dr<>	
С	中間水	<DL	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
	最終水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
	初流水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td>< DT</td><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td>< DT</td><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	< DT	<dl< td=""></dl<>	
D	中間水	<DL	<dl< td=""><td><dł< td=""><td><DL</td></dł<></td></dl<>	<dł< td=""><td><DL</td></dł<>	<DL	
	最終水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl.< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl.<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl.< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl.<></td></dl<>	<dl.< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl.<>	<dl< td=""></dl<>	

注) DL: 定量限界(9,600本/I)

ベストが初流水、中間水、最終水の各試料全てから検出された。しかし長さが $10\,\mu$ m以上のものについては、Aの最終水およびBの中間水、最終水の各試料からは検出されなかった。

試料溶液-1の処理水ついて検出されたアスベストを長さ別に見てみると、長さ0.2~1.0 μ m未満の本数が処理前の試料溶液に比べAおよびBとも初流水、中間水、最終水の各試料でかなり増加しているのが見られた、しかしこれは短いアスベストは本数を正確に数えることが難しく、計測数に誤差を生じやすいことが原因の1っ考えられ、この本数の増加は測定誤差の範囲と思われる.

長さ1.0~10 μm未満のアスベストについては、両機種とも試料溶液と処理溶液との間に若干本数の違いは見られるものの、ほぼ同じ値を示していた。これはこの範囲の長さのアスベストについては、本数を比較的正確に計測できる事によるものと思われる。

長さ10 μm以上のアスベストについては、上記に述べた様に検出されない試料も見られた.これは水道水中に含まれる微細なごみや添加したアスベスト自体が活性炭の間に徐々に付着して目詰りを起こし、フィルターの役目をして長いアスベストを除去してしまったものではないかと考えられるがその原因は不明であった.

表 2. 試料溶液中の繊維の長さの分布

試料名	総本数	アスベス	ト繊維サイズ	(µ m)
1000年在	(本/1)	0.2~1.0未満	1.0~10未満	10以上
試料溶液-1	388,000	39,000	330,000	19,000
試料溶液-2	13,030,000	2,792,000	9,850,000	388,000

表4.試料溶液-2における浄水器の試験結果

機種	1分十三十四	少◇→ 米- 米 /1	スベスト繊維サイズ(μm)			
1戌作	採水試料	総本数/I	0.2~1.0未満	1.0~10未満	10以上	
	初流水	11,537,000	3,781,000	7,368,000	388,000	
A	中間水	12,119,000	3,975,000	8,047,000	97,000	
	最終水	10,277,000	2,424,000	7,756,000	97,000	
	初流水	16,578,000	4,556,000	11,925,000	97,000	
В	中間水	12,589,000	4,169,000	8,725,000	97,000	
	最終水	10,567,000	3,393,000	7,174,000	<dl< td=""></dl<>	
	初流水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
C ·	中間水	<dt< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dt<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
	最終水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
	初流水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	
D	中間水	<dt< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><DL</td></dl<></td></dl<></td></dt<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><DL</td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><DL</td></dl<>	<DL	
	最終水	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<></td></dl<>	<dl< td=""><td><dl< td=""></dl<></td></dl<>	<dl< td=""></dl<>	

注) DL:定量限界(9,600本/1)

同じく試料溶液-2について、処理水のアスベストを長さ別に見てみると、長さ0.2~1.0 μ m未満の本数が両機種とも試料溶液に比べ誤差が大きかった。

この事は先に述べた試料溶液-1の場合と同様の事が原因と思われる。

長さ1.0~10μm未満のアスベストについては本数に 多少の誤差はみられたものの,両機種とも試料溶液と 比べ有意差は見られなかった.

長さ10 μm以上のアスベストについて見ると、両機種とも繊維数が増加している試料は無く、減少さらには検出されない試料も見られた。これも先の試料溶液ー1 の場合と同様、活性炭の目詰りによるフィルター効果により、長いアスベストが取り除かれた事が原因ではないかと思われる。

この試験結果から、ろ過材として活性炭のみを用いたA、Bの各浄水器については、長さが10 μ m未満のアスベストの除去にはほとんど効果が見られなかった。

CおよびDの各浄水器については,試料溶液-1及び 試料溶液-2のいずれの濃度においても,初流水,中 間水,最終水の全ての試料においてアスベストは検出 されなかった.

この結果から、中空糸膜と活性炭の二重構造の製品 については水中のアスベストが100%除去されることが 判明した. この中空糸膜は直径 $0.01\sim0.1\,\mu$ mの微細な孔を有する繊維であり、これがフィルターの機能を有することから、アスベストが除去されるものと思われる.

尚,残留塩素は、全ての浄水器について最終処理能 力水において検出されなかった.

おわりに

現在浄水器の主な製品に使用されている中空糸膜は,水中のかなり微細な異物(0.2 μm程度)も取り除く能力を有しており、アスベストもその製品の有効処理水量内では完全に除去することが可能である.

しかし活性炭は残留塩素を除去出来るものの,アスベスト等の微細な異物を取り除くことは出来ないものと思われる.

- 1) 小輪瀬勉, 坂本朋子, 笹野英雄: 東京衛研年報, **39**, 259-263, 1988.
- 2) 長沢弘明, 蔵楽正邦, 田島孝寿:昭和女子大学雑誌, **574**, 42-47, 1987.
- 3) 上水試験方法, 1993年版, 132-145, 1993年, 日本 水道協会.

表現形質からみた Methylobacterium 属菌の分類学的検討

古 畑 勝 則*, 松 本 淳 彦*

Some Approach to Identification of the Genus *Methylobacterium* Isolated from Drinking Tank-water and Other Environments

KATSUNORI FURUHATA* and ATSUHIKO MATSUMOTO*

Keywords:メチロバクテリウム属 genus *Methylobacterium*,数値分類 numerical taxonomy,表現形質 phenotypic characteristics

緒 言

著者らは、先に考案した選択培地 $^{1)}$ を使用して、残留塩素が存在する多くの飲料用タンク水から Methylobacterium 属菌を効率よく検出し、しかも共通的に塩素抵抗性を示すことを明らかにした $^{2)}$.

本属菌は、元来、土壌をはじめ自然環境水中に広く 分布しているが、1913年に Bassalik が Bacillus extorquens と 初め て 命名 して 以来³⁾、 Flavobacterium⁴⁾、 Vibrio⁵⁾、 Methanomonas⁶⁾、 Corynebacterium⁷⁾、 Chromobacterium⁸⁾、 Methylobacterium⁹⁾、 Pseudomonas¹⁰⁾ など様々 な属名で報告されてきたため分類学的に混乱していた。

1984年に Urakami & Komagata は、非水溶性の淡紅色色素を産生するグラム陰性桿菌で、メタノールを分解するこれら一連の細菌群に対して Protomonas という新属を設け、P. extorquens の一属一種を提唱した¹¹⁾. しかし、翌1985年に Bousfield らがこれに異論を唱え¹²⁾、命名規約上の優先権から1983年に Green らが修正していた Methylobacterium 属¹³⁾ の妥当性を主張し、現在に至っている.この属には type species としての M. organophilum⁹⁾ のほか、M. rhodinum¹³⁾、M. radiotolerans¹³⁾、M. mesophilicum¹³⁾、M. extorquens¹²⁾、M. rhodesianum¹⁴⁾、M. zatmanii¹⁴⁾、M. fujisawaense¹⁴⁾及び M. aminovorans¹⁵⁾の 9 菌種が包含されているが、これらはいずれも発酵工学分野の研究のために自然環境から分離されたものである.

飲料水中にこのような細菌が生残している事実はほとんど認識されておらず、衛生学的検討の必要性が示唆された、こうしたことから、本属菌による日和見感

染の可能性の有無をも考慮しながら、種々検討を進めているところである。実際にタンク水から分離された本属菌は、酵素反応などの20項目による生化学的性状で60のタイプに分かれるなど非常に多様性に富んでおり²⁾、種レベルまで決定するにはさらに性状試験の追加検討を行う必要があると考えられた。

そこで今回は、タンク水分離株の他に、環境水、空気環境、臨床材料からの分離株について、炭素源利用能、構成酵素、及び薬剤感受性の計88項目の性状試験を行い、これらの成績をもとに表現形質による数値分類を試み、標準菌種のそれと比較した.

材料及び方法

- 1. 供試菌株 タンク水, 環境水, 空気環境から分離し, Greenらの定義¹³⁾に従って Methylobacterium 属と同定した菌株のそれぞれ30株, 10株, 28株と, 臨床材料由来分与株 7 株及び標準菌種の M. extorquens JCM 2802, M. rhodesianum JCM 2810, M. rhodinum JCM 2811, M. zatmanii JCM 2819, M. mesophilicum JCM 2829, M. radiotolerans JCM 2831, M. organophilum JCM 2833の各1株(いずれも理化学研究所より分与)の合計82株を用いた.
- 2. 細菌浮遊液の調製 保存菌株をあらかじめ標準 寒天平板培地(日水製薬)に画線塗抹して30℃で5日間 培養した. 発育した独立集落を釣菌して新たな平板培 地で再び画線培養した. 培養後, 菌体を滅菌蒸留水に 浮遊させ, これを遠心分離(15,000rpm, 5分間)により 3回洗浄したのち, およそ10⁸CFU/mlの菌数になるよ うな細菌浮遊液を試験直前に調製した.

^{*}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

- 3. 性状試験 1) 試験項目 49項目の炭素源利用 能,19項目の構成酵素,20項目の抗生物質感受性の計 88項目について試験を行った.各項目は以下のとおり である.
- (1) 炭素源;グリセロール, エリスリトール, D-ア ラビノース、L-アラビノース、リボース、D-キシロー ス、L-キシロース、アドニトール、 β -メチル-D-キシ ロシド、ガラクトース、グルコース、フラクトース、 マンノース, ソルボース, ラムノース, ズルシトール, イノシトール, マンニトール, ソルビトール, α-メチ ル-D-マンノシド, α-メチル-D-グルコシド, N-アセ チル-グルコサミン, アミグダリン, アルブチン, エス クリン, サリシン, セロビオース, マルトース, ラク トース、メリビオース、シュクロース、トレハロース、 イヌリン,メレジトース,ラフィノース,スターチ, グリコーゲン, キシリトール, ゲンチオビオース, D-ツラノース, D-リキソース, D-タガトース, D-フコー ス, L-フコース, D-アラビトール, L-アラビトール, グルコネート、2-ケト-グルコネート、5-ケト-グルコ ネート.
- (2) 構成酵素;ホスファターゼアルカリン,エステラーゼ(C4),エステラーゼリパーゼ(C8),リパーゼ(C14),ロイシンアリルアミダーゼ,バリンアリルアミダーゼ,シスチンアリルアミダーゼ,トリプシン,キモトリプシン,ホスファターゼアシッド,ホスホアミダーゼ, α -ガラクトシダーゼ, β -グルクロニダーゼ, α -グルコシダーゼ, β -グルコ シダーゼ, β -グルフナーゼ, α -フコシダーゼ, α -フコシダーゼ, α -フコシダーゼ.
- (3) 抗生物質;ペニシリン,カルベニシリン,アモキシシリン,エリスロマイシン,ジョサマイシン,リンコマイシン,クリンダマイシン,クロラムフェニコール,チアンフェニコール,テトラサイクリン,ミノサイクリン,カナマイシン,ゲンタマイシン,セファロシン,セファレキシン,セファゾリン,セファピリン,コリスチン,ポリミキシンB,ナリジキシン酸.
- 2) 試験操作 (1) 炭素源利用能;試験には市販のAPI50CH (アスカ純薬)を用い,添付された使用書に従って行った.すなわち,細菌浮遊液を2ml作製し,これを試験用培地LRA150メディウム(60ml)に加えて混和後,50穴の乾燥基質に約100μ1ずつ添加した.30℃で培養し,1週間ごとに3週間後まで観察して混濁が認められたものを陽性と判定し,培養時間ごとの数値表現,3(1週間後に陽性のもの),2(2週間後に陽性のもの),1(3週間後に陽性のもの)及び0(陰性のもの)

で示した.

- (2) 構成酵素;市販の API ZYM (アスカ純薬)を使用した. 細菌浮遊液を 3 ml作製し、これを20穴の乾燥基質に約100 μ lずつ添加した. 30 \mathbb{C} に 4 時間放置させたのち、添付された判定用試薬を加えてから色調の変化によって判定した. 比色表に従って陰性を 0 、陽性は色調の濃淡によって 1 から 3 の数値で示した.
- (3) 薬剤感受性;市販の感受性試験紙(トリディスク, 3 濃度法,栄研化学)を用いた.標準寒天平板培地の全面に細菌浮遊液を0.2mlずつ塗抹し,菌液が培地に吸収してから各薬剤スティックのろ紙を培地面に密着させた.30℃で7日間培養後,阻止円の有無によって感受性を判定し,抵抗性を0,感受性は濃度によって1から3の数値で示した.
- 3) データ解析 標準株及び分離株の全82菌株についてのこれら三通りの性状試験の結果をそれぞれ0,1,2,3の数値で統計用ソフト "Lotus 1-2-3多変量解析(オードマン)" に入力してクラスター分析を行い、ユーグリッド平方距離、最遠隣法の解析条件でデンドログラムを描いた.

結 果

1. Methylobacterium 属菌のクラスター分析

全82菌株について行った88項目の性状試験の成績をもとにクラスター分析を行った結果、図1に示すようなデンドログラムが描かれ、70%の相似度を基準にすると1群から12群に類別された。ただし、相似度70%以下を示した3株は除外した。これらクラスターのうち2群が最も大きく、13株(16%)から構成されていたが、これらはさらに相似度80%で6株と7株に分かれた。次いで大きなクラスターは11群の11株(13%)であった。

2. 各クラスターの特性

表1は、性状試験88項目のうち、すべての菌株が0%あるいは100%を示した項目を除いた40項目についてのそれぞれの陽性率をクラスター別に示したものである.

まず、炭素源利用能については49物質のうち陽性率の低いものも含めて16物質を表示した。これによると、概してクラスター番号が大きくなるにつれて陽性率100%の物質数が増加する傾向が認められた。すなわち、クラスター前半の1群、2群、4群では陽性率100%の炭素源はグリセロールのみであり、また、5群、6群ではこのほかにL-アラビノース、ガラクトース、D-フコースであった。7群以降のクラスターではグリセロール、L-アラビノース、D-キシロース、D-フコース、

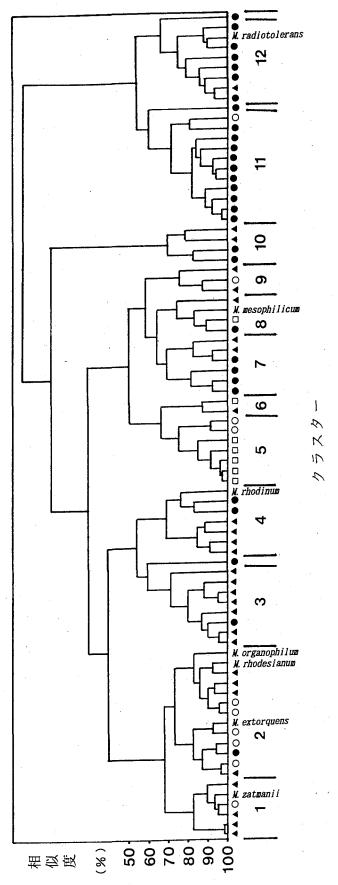


図1. Methylobacterium 属菌の表現形質によるデンド ログラム

●:タンク水由来株,○:環境水由来株,▲:空気環境由来株,□:臨床由来株

グルコネートの5物質が共通して100%陽性を示したほか,7群,9群,11群ではそれぞれグルコース,フラクトース,ガラクトースも陽性であり,合計で6物質を炭素源として利用した.さらに,8群ではガラクトースとD-リキソース,12群では加えてグルコースも利用し、それぞれ7物質,8物質であった.

次に、19項目の構成酵素のうち1株でも陽性を示した9酵素についてであるが、クラスターによる顕著な傾向はみられず、10群を除き、いずれのクラスターでも1種類ないし2種類の酵素が100%の陽性率を示したにとどまった。1群、2群、3群、8群はエステラーゼリパーゼのみが、7群と11群はエステラーゼのみが、9群はロイシンアリルアミダーゼのみが陽性率100%であった。また、4群、5群、6群、12群ではすべての株がエステラーゼとエステラーゼリパーゼの2酵素で陽性を示した。

20種類の抗生物質に対する薬剤感受性については, 表1に示した15種類の薬剤で菌株によって感受性が異 なり、クラスター番号の増大に伴って100%感受性薬剤 数が増加する傾向がみられた. 1群では100%感受性の 薬剤はなく、2群ではテトラサイクリンとゲンタマイ シンの2剤のみであった。3群以降のクラスターでは エリスロマイシン, ジョサマイシン, テトラサイクリ ン、ゲンタマイシンに対して共通的にすべて感受性を 示した. 5群と7群ではこれらの4剤だけであったが, 3群ではこれらのほかにアモキシシリン、8群と9群 ではセファレキシン、4群ではカルベニシリンとアモ キシシリンにも感受性であった. さらに, 6群, 10群, 11群, 12群では、カルベニシリン、チアンフェニコー ル、セファレキシンの3剤にも共通して感受性を示し たほか,11群ではセファロシンに,6群ではアモキシ シリンとセファロシンに、12群ではアモキシシリンと クロラムフェニコールに、また10群ではペニシリン、 アモキシシリン, クロラムフェニコール, セファロシ ンにも感受性であり、100%感受性薬剤数はそれぞれ8 剤, 9剤, 9剤, 11剤であった.

3. 標準菌株と分離株のクラスター分布

標準菌株と分離株がいずれのクラスターに属するかを表2に示した.これによると,標準株7菌種は12のうちの5つのクラスターに属した.すなわち, M. zatmanii は単独で1群に属したが, M. extorquens, M. rhodesianum, M. organophilum の3菌種はともに2群であった.また, M. rhodinum は4群, M. mesophilicum は8群, M. radiotolerans は12群にそれぞれ属した.

一方、種々の環境分離株は由来によってその所属す

表 1. Methylobacterium 属菌のクラスター別性状

快来課						クラ	ラスター	- 及び(杉	卡数)				
次書線・ グリ・セロール 100* 100 25 100 100 100 100 100 75 100 10 10 107 75 100 10 10 107 75 100 10 10 107 75 100 10 10 107 75 100 10 10 107 107 75 100 10 10 107 107 100 100 100 100 100 1	性状項目	1	2	3	4	5	6	7 .	8	9	10	11	12
グリセロール 100*** 100 25 100 100 100 100 100 100 75 100 10 10 10 75 100 10 10 10 75 100 10 10 10 75 100 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10		(6)	(13)	(8)	(7)	(7)	(2)	(6)	(4)	(3)	(4)	(11)	(8)
D-アラビノース 0 0 13 29 0 0 0 33 50 0 25 91 8 L-アラビノース 0 0 13 0 100 100 100 100 100 25 100 10 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1													
L-アラピノース 0 0 13 0 100 100 100 100 100 25 100 10 10 ボース 0 0 0 0 0 0 17 75 33 0 18 2 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10		100 *	100	25	100		100		100	100			100
リポース 0 0 0 0 0 17 75 33 0 18 2 トキシロース 0		. 0	0	13	29	: 0	Ó	33	50	0		91	88
Dーキシロース 0 0 0 14 0 50 100 100 100 25 100 10 10-1-キシロース 0 0 0 0 0 0 0 0 50 33 0 45 25 100 10 10-キシロース 0 0 0 13 0 100 100 67 100 67 0 100 10 10 10 100 100 100 100 100 100		0	0	13	0	100	100	100	100	100	25	100	100
Lーキシロース 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 50 33 0 45 2 グラクトース 0 0 13 0 100 100 67 100 67 0 100 100 100 7ルコース 0 46 25 43 71 0 100 67 100 67 0 100 100 7シークトース 67 85 38 86 0 0 117 0 100 0 91 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	リボース	0	0	. 0	0	0	0	17	75	33	0	18	25
ガラクトース 0 0 13 0 100 100 67 100 67 0 100 10 10 がルコース 0 46 25 43 71 0 100 0 33 50 91 10 7ラクトース 67 85 38 86 0 0 17 0 100 0 0 3 50 91 10 Dープラクトース 67 85 38 86 0 0 17 0 100 0 0 0 0 Dープラクトス 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 Dープラクトス 0 0 0 13 0 100 100 100 100 100 100 100		0	0	0	14	0	50.	100		100	25	100	100
グルコース 0 46 25 43 71 0 100 0 33 50 91 10 フラクトース 67 85 38 86 0 0 17 0 100 0 91 1 Dーツラノース 0 0 0 13 0 0 0 67 100 67 0	i e	0	0	0	0	0	0	0	50	33	0	45	25
フラクトース 67 85 38 86 0 0 17 0 100 0 91 1 D-ツラノース 0 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 D-リキソース 0 0 13 0 0 0 67 100 67 0 82 10 D-ツラノース 0 0 13 0 100 100 100 100 100 100 0 100 10	ガラクトース	0	0	13	0	100	100	67	100	67	0	100	100
Dーツラノース 0 0 0 0 14 0	グルコース	0	46	25	43	71	0	100	0	33	50	91	100
Dーリキソース 0 0 13 0 0 67 100 67 0 82 10 ローフコース 0 0 13 0 100 100 100 100 100 100 0 0 100 100 100 100 0	フラクトース	67	. 85	38	86	0	0	17	0	100	0	91	13
D-フコース 0 0 13 0 100 100 100 100 0 0 100 0<	D-ツラノース	0	0	. 0	0	14	0	0	0	0	0	0	0
L-フコース 0 0 0 0 0 0 25 0 0 9 1 グルコネート 0 0 25 71 0 0 100 100 100 50 100 100 4 スファターゼアルカリン 17 15 13 29 0 0 0 0 33 25 0 2 エスファターゼアルカリン 17 15 13 29 0 0 0 0 33 25 0 2 エステラーゼ(と4) 67 92 75 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 0 0 0 2 43 14 0	D-リキソース	. 0	0	13	0	0	0	67	100	67	. 0	82	100
グルコネート 0 0 25 71 0 0 100 100 50 100 10 2-ケトーグルコネート 0	D-フコース	0.	0	13	0	100	100	100	100	100	0	100	100
2-ケト-グルコネート 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	L-フコース	. 0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	9	13
ちーケトーグルコネート 0 0 0 0 0 0 0 0 25 0 0 0 0 0 0 0 0 0	グルコネート	0	0	25	71	0	0	100	100	100	50	100	100
構成酵素	2-ケト-グルコネート	Ó	0	0	. 0	0	0	0	50	0	. 0	0	25
ポスファターゼアルカリン 17 15 13 29 0 0 0 0 0 33 25 0 2 エステラーゼ(C4) 67 92 75 100 100 100 100 75 33 75 100 10 10 エステラーゼリバーゼ(C8) 100 100 100 100 100 100 50 100 67 50 45 10 ロイシンアリルアミダーゼ 50 69 25 43 14 0 17 0 100 0 9 1 バリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0	5-ケト-グルコネート	. 0	0	0	0	0	0	0	25.	. 0	0	. 0	0
エステラーゼ(C4) 67 92 75 100 100 100 100 75 33 75 100 10 10 エステラーゼリバーゼ(C8) 100 100 100 100 100 100 50 100 67 50 45 10 ロイシンアリルアミダーゼ 50 69 25 43 14 0 17 0 100 0 9 1 バリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 33 0 18 2 ホスファターゼアシッド 33 8 25 57 100 50 50 50 0 0 55 7 ホスホアミダーゼ 17 31 25 14 100 50 17 50 0 0 36 3 a -グルコシダーゼ 0 0 0 0 57 0 17 0 0 0 0 18 2 変 薬剤感受性	構成酵素												
エステラーゼリパーゼ(C8) 100 100 100 100 100 50 100 67 50 45 10 ロイシンアリルアミダーゼ 50 69 25 43 14 0 17 0 100 0 9 1 パリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0	ホスファターゼアルカリン	17	15	13	29	. 0	. 0	0	0	33	25	0	25
ロイシンアリルアミダーゼ 50 69 25 43 14 0 17 0 100 0 9 1 バリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	エステラーゼ(C4)	67	92	75	100	100	100	100	75	33	75	100	100
パリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	エステラーゼリパーゼ(C8)	100	100	100	100	100	100	50	100	67	. 50	45	100
バリンアリルアミダーゼ 0 0 0 0 14 0 55 7 7 2 2 2 2 7 100 50 50 50 0 0 0 36 3 3 8 25 57 100 50 50 0 0 0 36 3 4 0 50 0 0 0 0 0 100 100 100 100 50 50 0 100 100 100 100 50 50 0	ロイシンアリルアミダーゼ	50	69	25	43	14	. 0	17	0	100	0	9	13
トリプシン 17 15 13 14 71 0 0 0 33 0 18 2 ホスファターゼアシッド 33 8 25 57 100 50 50 50 0 0 55 7 ホスホアミダーゼ 17 31 25 14 100 50 17 50 0 0 36 3 a -グルコシダーゼ 0 0 0 0 57 0 17 0 0 0 18 2 変刺感受性 ベニシリン 0 8 25 14 0 50 50 50 0 100 100 64 2 カルベニシリン 0 46 63 100 57 100 50 50 50 0 100 100 100 100 100 100	バリンアリルアミダーゼ	. 0	0 -	0	0	14	. 0	0	0	0	0	0	0
ホスファターゼアシッド 33 8 25 57 100 50 50 50 0 0 55 7 ホスホアミダーゼ 17 31 25 14 100 50 17 50 0 0 36 3 α-グルコシダーゼ 0 0 0 0 57 0 17 0 0 0 18 2 薬剤感受性 ペニシリン 0 46 63 100 57 100 50 50 0 100<	トリプシン	17	15	13	14	71	. 0	0	. 0	33	0	. 18	25
ホスホアミダーゼ 17 31 25 14 100 50 17 50 0 0 36 3 a-グルコシダーゼ 0 0 0 57 0 17 0 0 0 0 18 2 変割感受性	ホスファターゼアシッド	33	8	25	57	100	50	50	50	0 -	0	55	75
α-グルコシダーゼ 0 0 0 0 57 0 17 0 0 0 18 2 薬剤感受性 ペニシリン 0 8 25 14 0 50 0 0 0 100 64 2 カルベニシリン 0 46 63 100 57 100 50 50 0 100 100 100 アモキシシリン 33 77 100 100 71 100 83 75 67 100 91 10 エリスロマイシン 50 62 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100	ホスホアミダーゼ	17	31	25	14	100	50	17	50	0	0		38
薬剤感受性	α-グルコシダーゼ	0			0	57			0	0	. 0		25
ペニシリン 0 8 25 14 0 50 0 0 0 100 64 2 カルベニシリン 0 46 63 100 57 100 50 50 0 100 100 100 100 アモキシシリン 33 77 100 100 71 100 83 75 67 100 91 10 エリスロマイシン 50 62 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10	薬剤感受性												
カルベニシリン 0 46 63 100 57 100 50 50 0 100 100 10 アモキシシリン 33 77 100 100 71 100 83 75 67 100 91 10 エリスロマイシン 50 62 100 <td></td> <td>0</td> <td>8</td> <td>25</td> <td>14</td> <td>0</td> <td>50</td> <td>. 0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>- 64</td> <td>25</td>		0	8	25	14	0	50	. 0	0	0	100	- 64	25
アモキシシリン 33 77 100 100 71 100 83 75 67 100 91 10 エリスロマイシン 50 62 100 <td></td> <td>0 ,</td> <td></td> <td></td> <td>100</td> <td>57</td> <td></td> <td>50</td> <td>50</td> <td>0</td> <td></td> <td></td> <td>100</td>		0 ,			100	57		50	50	0			100
エリスロマイシン 50 62 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10									75	67			100
ジョサマイシン 67 85 100 <	·												100
クロラムフェニコール 0 8 0 57 0 50 17 50 0 100 91 10 チアンフェニコール 0 8 50 71 43 100 17 75 33 100 100 10 テトラサイクリン 83 100													100
チアンフェニコール 0 8 50 71 43 100 17 75 33 100 100 10 テトラサイクリン 83 100				* · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·									100
テトラサイクリン 83 100 100 100 100 100 100 100 100 100 10													100
ゲンタマイシン 50 100 1													100
セファロシン 0 15 50 43 43 100 0 25 0 100 100 100 8 セファレキシン 0 38 25 57 71 100 33 100 100 100 100 10 セファゾリン 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 9 セファピリン 0 8 38 14 14 50 0 0 0 75 82 5 コリスチン 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0													100
セファレキシン 0 38 25 57 71 100 33 100													88
セファゾリン 0 0 0 0 0 0 0 0 0 50 9 セファピリン 0 8 38 14 14 50 0 0 0 75 82 5 コリスチン 0 0 0 0 0 0 0 0 0													100
セファピリン 0 8 38 14 14 50 0 0 0 75 82 5 コリスチン 0 0 0 0 0 0 0 33 0 0													, 0
コリスチン 0 0 0 0 0 0 33 0 0													50
													. 0
ポリミキシンB 0 0 0 0 0 0 0 25 0		· ·		-	•	-			•				. 0

*;陽性率(%)を示す

表 2. Methylobacterium 属菌のクラスター分布

分離源(株数)					ク	ラン	スタ	_				
7万 南田 (75、(77、安义)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
標準株									,			
M. zatmanii	\circ											
M. extorquens		\circ										
M. rhodesianum		\bigcirc										
$M.\ organophilum$		\circ										
M. rhodinum				\bigcirc								
M. mesophilicum								\bigcirc				
$M.\ radio to lerans$												\bigcirc
分離株												
タンク水(27)	0	1	1	2	0	0	4	1	0	2	10	6
環 境 水 (10)	1	5	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0
空気環境 (28)	4	4	7	4	0	1	2	1	2	2	0	1
臨床材料 (7)	0	0	0	0	5	1	0	1	0	0	0	0

るクラスター位置に偏りがみられた(図1). すなわち、タンク水由来株は11群と12群に偏在しており、27株のうちそれぞれ10株(37%)、6株(22%)と多く、このうち後者はM. radiotolerans と同一のクラスターであった. 環境水由来株はタンク水由来株とは異なり、2群が5株(50%)と最も多く、この群にはM. extorquens、M. rhodesianum、M. organophilum が属していた。また、空気環境由来株では、3群に7株(25%)と多かったが、標準株でこのクラスターに該当する菌種はなかった. 次いで1群、2群、4群が4株(14%)ずつあった。なお、臨床材料由来株のほとんどは5群(7株中5株、71%)であった.

老 窓

Methylobacterium 属菌はメタノール資化性細菌ともいわれ、メタノールを分解する特徴的な性状から微生物タンパク (SCP) や治療薬としての補酵素 Q_{10} などの生産に関する発酵工学の分野で1970年代から注目され、多くの研究が行われている 16,17 .

現在のところ、これらの特徴を示す細菌群に対しては Methylobacterium 属 $^{13)$ で世界的に統一されており、さらに、種レベルでは DNA 相同性を基本的な分類根拠として 9 菌種が正規に報告されている.

今回の7菌種の標準株を含めた82株についての表現形質によるクラスター分析の結果では、相似度70%レベルで12群に類別され、同一属としては多様性を示す結果を得た.このように、本属菌の性状は多岐にわたっており、このクラスター分析の結果をみても、本属菌は9菌種のほかにも新たな菌種が存在する可能性があると考えられた.1982年に Green らが行った178株のメタノール資化性細菌を対象とした同様の数値分類

では、150株が Methylobacterium 属と同定され、相似度80% レベルで M. organophilum 及び M. mesophilicum (Pseudomonas mesophilica) に該当する2群のみに分類されている¹⁸).

7 菌種 7 株の標準株では、M. zatmanii が 1 群、M. rhodinum、M. mesophilicum、M. radiotolerans はそれぞれ 4 群、8 群、12 群に属し、M. extorquens、M. rhodesianum、M. organophilum の 3 菌種はいずれも 2 群に属することが今回の数値分類で確認できた。これら標準菌種の分類根拠は DNA の相同性であり、表現形質による手法とは異なることから、既知の菌種と環境分離株のクラスターとは一致しないものが多いと考えられた。浦上の報告¹⁶⁾でも、M. rhodinum と M. rhodesianum、また、M. mesophilicum、M. radiotolerans、M. fujisawaense を区別できる表現形質は見いだされていない。

Methylobacterium 属菌のクラスター分布を分離源別にみると、タンク水由来株の約60%は11群と12群であり、後者のクラスターには M. radiotolerans が位置することから、これらは M. radiotolerans あるいはその類似菌であると考えられた。ところが、環境水分離株では、半数の菌株が M. extorquens、 M. rhodesianum、 M. organophilum とともに2群に属しており、同様な水環境中に生息しているものでもクラスター分布に大きな相違がみられた。そのほか、空気環境由来株は3群をはじめ、1、2、4群に多く、これも環境水由来株と同様なクラスター分布を示した。このように、塩素抵抗性のタンク水由来株とその他の塩素感受性株がそれぞれ属したクラスターが大きく異なったことは非常に興味深く、同一属菌であっても生息している環境によって表現形質に差異が生じたものと推察された。

化学分類学の進展に伴って、近年では DNA 情報が分類学に取り入れられ、G+C含量や核酸相同性からクラスター分析を行っている¹⁹⁾. さらに最近では、16 S リボソーム RNA の塩基配列を決定して相互に比較し、系統発生学的な検討も盛んに行われている²⁰⁾. 今後は本属菌に関してもこうした手法を用いてさらに詳細な分類学的検討を行う必要がある. その際、DNA などの成績と対比した表現形質の特徴的な情報をも十分に考慮することが重要であると考えられた.

結 語

Methylobacterium 属菌について表現形質による分類学的検討を行い、以下のような結果を得た.

1. タンク水,環境水,空気環境,臨床材料からの分離株と標準株の合計82株について,88項目の性状試験結果をもとにクラスター分析を行ったところ,相似

度70%のレベルで12群に類別された.

2. タンク水由来株の60%は11群と12群に偏在し、 後者には M. radiotolerans が属した. また、環境水由来 株の50%は M. extorquens, M. rhodesianum, M. organophilum の3種とともに2群であった. そのほか、空気 環境由来株は3群をはじめ、1群、2群、4群に多く、 臨床材料由来株は5群と分離環境によってクラスター 位置が偏る傾向がみられた.

謝 辞 臨床材料由来株は、長崎市立病院成人病センター 浜本昭裕先生、青森県黒石厚生病院 (故)一戸 兵部先生から分与していただいた. 心から感謝いたします.

(本研究の概要は第9回日本微生物生態学会(1993年 11月)で発表した.)

- 1) 古畑勝則, 松本淳彦:東京衛研年報, **38**, 333-342, 1987.
- 2) 古畑勝則, 小池和子:日本公衛誌, **40**, 1047-1053, 1993.
- 3) Bassalik, K.: Jahrb. Wiss. Bot., 53, 255-302, 1913.
- 4) Bassalik, C., Janota-Bassalik, L. and Brisou, J.: Annales de l'Institut Pasteur, 98, 165-168, 1960.
- 5) Stocks, P. K. and McCleskey, C. S. : *J. Bacteriol.*, **88**, 1065-1070, 1964.
- 6) Stocks, P. K. and McCleskey, C. S. : *J. Bacteriol.*, **88**, 1071-1077, 1964.
- 7) Gräf, W. and Bauer, L.: Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt.

- Orig. B **157**, 291-303, 1973.
- 8) Dickinson, C., Austin, B. and Goodfellow, M. : *J. Gen. Microbiol.*, **91**, 157-166, 1975.
- 9) Patt, T. E., Cole, G. C. and Hanson, R. S. : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**, 226-229, 1976.
- 10) Austin, B. and Goodfellow, M.: Int. J. Syst. Bacteriol., 29, 373-378, 1979.
- 11) Urakami, T. and Komagata, K.: Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 188-201, 1984.
- 12) Bousfield, I. J. and Green, P. N.: Int. J. Syst. Bacteriol., **35**, 209, 1985.
- 13) Green, P. N. and Bousfield, I. J. : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 875-877, 1983.
- 14) Green, P. N., Bousfield, I. J. and Hood, D.: *Int. J. Syst. Beteriol.*, **38**, 124-127, 1988.
- 15) Urakami, T., Araki, H., Suzuki, K., et al. : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 504-513, 1993.
- 16) 浦上貞治:醱酵工学, 68, 279-300, 1990.
- 17) Komagata, K.: FEMS Microbiol. Rev., 87, 291-296, 1990.
- 18) Green, P. N., and Bousfield, I. J. : *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 623-638, 1982.
- 19) Hood, D. W., Dow, C. S., and Green, P. N. : *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 709-720, 1987.
- Brusseau, G. A., Bulygina, E. S., and Hanson, R. S. Appl. Environ. Microbiol., 60, 626-636, 1994.

報 文 V

毒性に関する調査研究

REPORTS V

PAPERS CONCERNING ON TOXICOLOGY

V 毒性に関する研究

化学物質の毒性に関する研究の成果は、医薬品、食品添加物等の安全性評価及び環境汚染物質等の生体への影響を推測する基礎資料として、広汎に活用されている。本章では毒性に関する研究報告が10編掲載されており、医薬品に関して2編、食品添加物をとりあげたもの3編、環境汚染物質を対象にしたもの2編、農薬、実験動物の性状及び研究資料の統計解析について各1編である。

医薬品に関する2編のうち、1編は漢方方剤の十全大補湯及びその構成生薬の変異原性をサルモネラ菌を用いた Ames 試験によって検討している。方剤及び構成生薬のうち芍薬及び桂皮は、S9無添加の場合にのみ変異原性を示した。しかし、代謝活性化されない場合のみ陽性であることから、生体内では変異原性は発現しないと推定している。本報と異なる結果の報告もみられるが、天然物由来薬物の生物実験では多々起きることである。実験結果の信頼性は、相違の主な誘因となる被検薬物の品種、産地、調整方法等の違いを、十分に検討して判断すべきであろう。

他の1編は、十全大補湯の構成生薬である黄耆をマウスに摂取させ、3次元小動物行動解析装置を用いて運動量等を測定した実験で、投与に関連した運動活性の異常はなく、黄耆は行動に影響を及ぼさなかったと結論している. 化学物質の生体影響を観察する方法は、多種多様であるが、運動活性を指標にした本法は、行動記録装置の発達、データの蓄積等に伴い、さらに発展すると考えられる.

食品添加物に関する報告 3 編のうち、変異原性を検討した 1 編は、調味料10種、食品製造用剤 6 種、香料 5 種等、合計34種類の食品添加物について Ames 試験を行い、何れも陰性であったと述べている。著者らは、これまでに添加物276種類について Ames 試験を実施し、そのうちの21種類は、弱いながら、陽性を示したと報告している。

防かび剤チアベンダゾール(TBZ)の催奇形性の作用機序の解明を目的として、培養細胞に TBZ を曝露したところ、微小管を構成するチュブリンの凝集、分裂阻害がみられ、これらの変化が細胞の分裂阻害、死を招来し、奇形を発現したと推測している。このような実験動物の個体ではなく、培養細胞を用いる実験法は、生命尊重、迅速な毒性評価の立場から、催奇形作用の発現機序のみならず、各種の毒性検索に活用されるべきであろう。

酸化防止剤ブチルハイドロキシアニソール (BHA) の代謝中間体である tert-ブチルハイドロキノン (tBHQ) がラット遊離肝細胞に急性障害を起こし、この細胞毒性はジクマロールとの併用により増強されるとの知見を述べている. すなわち、BHAの発癌、催奇形作用等の発現に、tBHQ、そのセミキノン体及びキノン体等が関与したと推論している.

環境汚染物質は、クロムまたはアスベストに関して各 1 編が掲載されている。疫学的に、クロム酸塩と肺癌発生との関連が言われ、その原因物質としてクロム酸カルシウム (CaCrO₄)等の 6 価クロム化合物が考えられている。著者らは、クロム鉱滓が社会問題化した当時から継続してクロム化合物の曝露実験を行っており、ラットにCaCrO₄を 2 年間全身曝露した実験では、濃度に比例して肺の腫瘍性病変が増加すると報告している。今回は、2 年間曝露後、終生飼育 (平均20週間) し、曝露終了後に肺腫瘍の発生は無く、腫瘍発生率は前回とほぼ同じく約50%であったと述べている。この結果から、肺に対する CaCrO₄の発癌性が確認され、発癌は 2 年間以内の曝露で完了していたと結論している。このように長期間しかも連続曝露で行う吸入実験は、様々の困難な実施条件を要するため、報告例が極めて少なく、貴重なデータである。

アスベスト繊維の経口摂取による生体に対する影響についての研究では、ラットを用いアスベストの経口投与実験を行い、極く少量の繊維が、肝臓、脾臓等の組織内で検出されたことから、消化管壁からの繊維の侵入が粘膜の防御作用によって抑制されたとしている。すなわち、アスベストによる発癌性が吸入曝露に比べ経口投与では著明に現れない原因は、消化管からの吸収量すなわち発癌等の標的器官組織への曝露量が少ないためと推定している。

農薬等6種類の化合物の毒性をラット初代培養肝細胞を用いて評価するとともに、これら化合物の細胞での50% 生存濃度とラット個体での50%致死量との相関を分析した。その結果、6種類では有意ではなかったが、3種類づ つの2グループに分けた分析では、両者に有意な相関がみられたと報告している。これは、本法が実験動物を用い た毒性評価の代替法として、有用であることを示唆した報告と思われる。

毒性試験のデータは、各種測定機器による客観性の高いものと肉眼的観察のようにやや主観的なものとがある. そこで、偏りの少ない、客観性の高いデータを得るための試みとして、皮膚刺激試験を行い、皮膚の色調変化を分光測色計によって測定、これと肉眼所見とを比較検討した.この結果、両者の判定には相関がみられ、測色計は肉眼では判定不可能な微細変化も検出した.このような機器の動物実験への導入は、客観的データの増加、毒性評価の信頼性の向上に結びつくと考える.

当衛生研究所毒性部では,実験計画の立案からデータの統計解析に至るまで,パーソナルコンピュータによる毒性試験システムが駆使されている.著者らは,このシステムの開発に創立時から携わり,毒性研究の発展充実に貢献してきた.今回は,これを改良したプログラムを作成,紹介している.本システムは,これまでも実験の企画から評価まで関与しており,その改良開発は今後も毒性研究の進歩に,新たな展開に必要不可欠であることは言うまでもない.

十全大補湯の Salmonella typhimurium に対する 変異原性について

藤 田 博*,青 木 直 人*,佐々木 美枝子*

Mutagenicity of Juzen-taiho-to with Salmonella typhimurium

HIROSHI FUJITA*, NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

Keywords:変異原性 mutagenicity, 漢方薬 chinese medicine, 十全大補湯 juzen-taiho-to, shi-quan-da-bu-tang, サルモネラ *Salmonella typhimurium*

近年, 漢方薬の効用がみなおされ, 多くの病院で用いられるようになってきた. 都立病院においても漢方治療が実施されていることから, 東京都衛生局では, 東洋医学事業として漢方薬の有効性や安全性についての検討を行ってきた. 十全大補湯は, その調査対象漢方薬として平成三年度より取り上げられた.

化学物質の安全性を評価するために様々な毒性試験が行われるが、遺伝毒性を知るために変異原性試験が実施されている。この変異原性試験のなかで、Ames 5^{1-3} により開発されたサルモネラを用いる試験、いわゆる Ames 試験は、最も多用されている試験法である。今回、十全大補湯について Ames 試験による変異原性の検討を行ったので報告する。

実験材料および方法

試料 試験には、十全大補湯エキス末および生薬単味エキス末を用いた. 単味生薬の人参、当帰、芍薬、川芎は日本産、黄耆、蒼朮、茯苓、地黄、桂皮、甘草は中国産である. エキス末は、(株)ツムラに製造委託を行った. なお、これらの構成生薬の品質および試料エキス末の作成方法については、安田ら4)によってすでに報告されている.

試料エキス末は、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.

試験における陽性対照物質としては、9-アミノアクリジン (和光純薬製)、2-ニトロフルオレン (Aldrich製)、2-アミノアントラセン (和光純薬製)を用いた。

菌株 Salmonella typhimurium TA97⁵⁾, TA98³⁾, TA100³⁾ および TA102^{6,7)} を普通ブイヨン (Nutrient

broth No. 2, OXOID 製)で一夜培養し用いた. これらの株は、B. N. Ames 教授(カリフォルニア大)より分与を受けたものである.

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^{3.8)} により行った. 代謝活性化には, アロクロール1254 (ジーエルサイエンス) により薬物代謝酵素を誘導した雄性 CD 系ラット (Crj:CD 日本チャールス・リバー) の肝臓ホモジネートから調製したS9³⁾ を用いた. S9mix^{3.8)}中のS9量は, 10% (50μ 1/プレート) とした.

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ,代謝活性化する場合にはS9mix 0.5ml,代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液 (pH7.4)0.5mlを加え,さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え,37 $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ 0 $^{\circ}$ 0 $^{\circ}$ 1 ml ml 加之, $^{\circ}$ 2 ml を加え混合後,最少グルコース寒天培地 $^{\circ}$ 1 に重層した。37 $^{\circ}$ 0 で $^{\circ}$ 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 $^{9)}$ を行い、さらに Moore ら $^{10)}$ のプログラムによる回帰分析を行った、両検定において有意な場合変異原性陽性とした。

結果

十全大補湯エキス末のAmes試験の結果を図1に示した. S9無添加の場合, 4試験菌株の何れにおいても復帰コロニーが有意に増加した. 30mg/プレートでは対照群に対しTA97では2.8倍, TA98では4.0倍, TA100では2.9倍の増加であった. TA102の増加はやや少なく

^{*}東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

^{*}The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

^{24-1,} Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

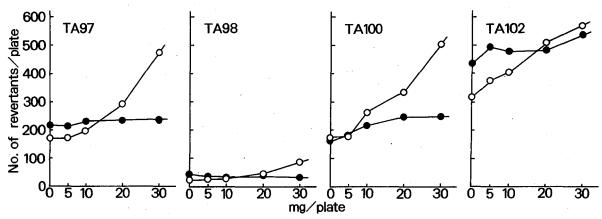


図1. 十全大補湯の変異原性. ○:S9mix 無添加, ●:S9mix 添加.

1.8倍であった.変異原性が出現するためには高用量を必要とするが、十全大補湯は、S9無添加の場合何れの菌株においても変異原性陽性である. S9を添加した場合、TA100およびTA102で復帰コロニーが用量に伴いわずかに増加したが、統計的には有意ではなかった.他の菌株では増加は見られなかった.

十全大補湯に変異原性が見られたことから、変異原性の由来生薬を知るため構成生薬エキス末10種について変異原性の検討を行った. S9無添加の10mg/プレートにおける結果を表1に示した. 変異原性陽性の一つの判断基準である2倍以上の復帰コロニー増加が見られたのは、当帰のTA98、芍薬および桂皮のTA97、TA98、TA100であった. TA102においては、2倍以上に増加したものはなく、茯苓、芍薬、甘草がごくわずか増加した. 芍薬および桂皮については、TA102を除く3菌株について高濃度の試験結果を示した(図2). 芍薬は、3菌株において30mg/プレートまで復帰コロニーは増加し、統計的にも有意であった. 桂皮は、TA98、TA100の20mg/プレート以上では菌株の生育阻止によ

表1. 十全大補湯構成生薬エキスの変異原性

7 1 727		復帰コロ	!ニー数 ¹⁾	
生薬	TA97	TA98	TA100	TA102
人参	15	19	124	3
黄耆	46	. 0	- 58	15
蒼朮	13	2	0	0
茯苓	26	13	56	124
当帰	19	23	111	0
芍薬	187	29	211	97
地黄	30	7	49	83
川芎	0	5	22	46
桂皮	420	98	239	52
甘草	40	5	71	115
十全大補湯	26	8	88	90

1):S9無添加, 10mg/プレート, 対照群の値を引いた値

り増加は抑制されるが、対照群に比べると3菌株とも有意な増加であった.

考 察

十全大補湯の変異原性についてエキス末を用い検討を行った. 試験に用いた菌株の全てで変異原性が見られた. ただし, この変異原性は, 高用量を要することから陽性物質として用いた変異原に比べると弱いものであった. 用いた菌株間で比較してみると, TA97およびTA98に対して変異原性が強く, この変異原は, フレームシフト型の突然変異をより多く起こすように思われた. また, S9を添加することにより変異原活性を失うことから, 生体内では変異原性を示さないであろうと考えられる.

変異原性を示す化合物は、現在のところ明らかではない。植物に含まれている変異原としては、フラボノイドがよく知られているが、これらの化合物は、S9による代謝活性化をした場合に変異原性を示すかまたは増加する^{11.12)}ことから、今回の十全大補湯に見られた変異原性とは異なっている。少なくとも十全大補湯の

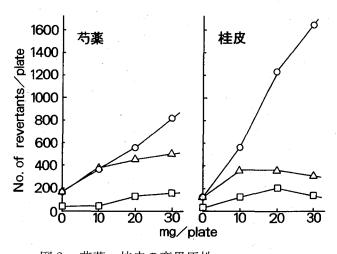


図 2. 芍薬, 桂皮の変異原性. ○:TA97, △:TA100, □:TA98.

変異原性にフラボノイドは関与していないであろう.

十全大補湯に変異原性が見られたことから、その変異原性が10種の構成生薬の何れに由来するものであるかを調べた。その結果、芍薬と桂皮にTA97、TA98、TA100に対する変異原性が見られ、当帰にはTA98に対する変異原性が見られた。ただし、当帰の変異原性は、芍薬、桂皮に比べるとかなり弱いものであった。これらの生薬の変異原性は、十全大補湯の変異原性に比べるとかなり強いものであった。従って、これらの生薬の構成比率を考慮すれば、十全大補湯に見られた変異原性は、主に芍薬と桂皮に由来するものであろうと思われる。十全大補湯および構成生薬のTA102に対する変異原性は、他の菌株に比べてかなり弱く、変異原性に関与している構成生薬を特定することは出来なかった。

十全大補湯の変異原性に関する試験報告は見いだせ なかった. 10構成生薬の Ames 試験の結果としては, 芍薬¹³⁾のメタノール抽出物がS9添加の TA100において, 当帰¹⁴⁾の水抽出物がS9無添加のTA98において、さら に、黄耆¹⁵⁾の水抽出物がS9添加のTA98において変異 原性を示すことが報告されている. 今回の試験結果と 比較してみると、当帰の TA98に対する結果は一致した が、 芍薬は代謝活性化の条件が異なり、 黄耆は全く増 加しなかったことから、何れも異なる結果となった. また、これら3種の生薬については、他に陰性の報 告15,16)も見られる. 比較検討した場合陽性, 陰性の相 反する結果が報告されていることから, その変異原性 については未だに明確ではない、生薬のような試料に ついての変異原性を検討する場合、試料の由来が異な る可能性が高く,これが試験結果に大きく影響すると 考えられる. 生薬は産地, 品種, 調製法の違いにより 成分に変化がみられることがあり、変異原性を論じる ようなときには,同時にいくつかの産地の試料を比較 検討する必要があるかもしれない.

漢方薬の変異原性に関しては、生薬そのものに変異原性が見いだされている、一方、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が見いだされている^{17.18)}. また、我々は、六味丸の変異原性を検討したときに、構成生薬が混合されたことによって変異原性が増強されている可能性を示した¹⁹⁾. 今後とも漢方薬の変異原性に関しては様々な角度からの検討が必要であろう.

まとめ

十全大補湯について変異原性の検討を行った. その 結果 TA97, TA98, TA100および TA102のS9無添加に おいて変異原性が見いだされた. 10種の構成生薬について変異原性を検討したところ, 芍薬および桂皮のTA97, TA98, TA100のS9無添加において変異原性が見られた. 十全大補湯の変異原性はこれらの生薬の変異原性が出現したものであると考えられる.

- 1) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., et al.: *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) 安田一郎, 高橋奈穂子, 浜野朋子, 他:東京衛研 年報, **43**, 39-45, 1992.
- 5) Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B. N., et al. : *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
- 6) Levin, D. E., Hollstein, M. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
- 7) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
- 8) 矢作多貴江:蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 9) 石居 進:生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風 館.
- 10) Moore, D. and Felton, J. S. : *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 11) Sugimura, T., Nagao, M., Matsushima, T., et al.: *Proc. Japan Acad.*, **53**, 194-197, 1977.
- 12) Creczot. H., Tudek, B., Kusztelak, J., et al.: *Mutation Res.*, **240**, 209-216, 1990.
- 13) Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T., et al. : *Mutation Res.*, **97**, 81-102, 1982.
- 14) 山本久子, 水谷民雄, 野村治子: 薬学雑誌, **102**, 596-601, 1982.
- 15) Xue-jun, Y., De-xiang, L., Hechuan, W., et al. : *Mutation Res.*, **260**, 73-82, 1991.
- 16) 渡辺富士雄, 森本 功, 野坂富雄, 他:生薬学雑 誌, **37**, 237-240, 1983.
- 17) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., et al.: *Mutation Res.*, **206**, 324-334, 1988.
- 18) 渡辺富士雄, 森本 功, 興津知明:生薬学雑誌, 41, 248-252, 1987.
- 19) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **44**, 274-277, 1993.

黄耆の雄性マウスの行動に及ぼす影響

田中豊人*,市川久次*

Effects of Astragali Radix on Male Mice Behaviour

TOYOHITO TANAKA* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Astragali radix was administered to male mice from 1 week to 8 to 9 weeks of age at levels of 0 (control), 0.25, 0.5, and 1.0% in the drinking water. The movement activity of the exploratory behaviour was measured by ANIMATE AT-420E at 9 weeks of age. There were few adverse effects of astragali radix in any of the parameters of the exploratory behaviour in male mice in this study.

Keywords: 黄耆 astragali radix, 探索行動 exploratory behaviour, 運動活性 movement activity, 雄マウス male mice

緒 言

黄耆はキバナオウギ Astragalus membranaceus Bge., ナイモウオウギ A. mongolicus Bge. などマメ科の植物の乾燥根であり 1), 老人性疾患適用漢方方剤に属する黄耆建中湯,補中益気湯,人参養栄湯,十全大補湯などに広く配合される生薬である.

著者らは前報²⁾で十全大補湯の生物活性を調べる目的で、雄マウスに十全大補湯を投与しその行動に及ぼす影響について検討したが、その際に薬物投与によると思われる行動の変化は特に見られなかった。しかしながら、十全大補湯の構成生薬単体での実験は行われなかった。十全大補湯の構成生薬である黄耆については、その生物活性に関する基礎的な研究がほとんどなく、その有効性について検討した例も少ない。そこで著者らは、黄耆の有効性を解明するために、その生物活性を確認するための実験を計画した。今回も前報同様に、黄耆の持つ生物活性の中の全身的な作用を検討するために、雄マウスに黄耆を投与してその行動に及ぼす影響を運動活性を測定することによって検討した。

材料と方法

動物と試料:マウスは、日本チャールス・リバー(株) Crj:CD-1 (ICR)のSPF の雄を7週齢で購入し、1週間の予備飼育の後に一般状態の良好なマウスを実験に供した。黄耆は東洋医学研究プロジェクトで作成した黄耆エキス末(Lot. No. 911023001P)をフィルターを通

した水道水で溶解・希釈して用いた.

飼育条件:マウスは、温度 24 ± 1 \mathbb{C} ・相対湿度 55 ± 5 %に調節された飼育室でプラスチックケージで1 匹ずつ飼育し、給水瓶によってフィルターを通した水道水と標準飼料を自由摂取させた.

試料の調整: 黄耆はフィルターを通した水道水に溶解・希釈して析出しない限度の1.0%を上限とし、公比2で希釈して0.25,0.5,1.0%の溶液とし、給水瓶によってマウスに自由摂取させた。対照群として、フィルターを通した水のみを摂取させた群を用意した。各群は雄マウス15匹で構成され、合計60匹を実験に供した。

実験計画:8週齢から黄耆の投与を開始し,1週間連続で自由摂取させた.投与開始時及び終了時にマウスの体重及び摂水量を測定した.摂水量は7日間の給水瓶の重量の差をこぼしを含めて測定した.9週齢時にマウスの運動活性を測定した.

探索行動の測定:探索行動の運動活性は,小動物運動解析装置 ANIMATE AT-420E (東洋産業株式会社製) によって測定した³⁻⁴⁾. 測定時間は1分間のインターバルを 10回,合計10分間とした⁵⁾. 測定項目は動作回数,移動時間,水平移動回数,移動距離,立ち上がり回数,立ち上がり時間,方向反転回数,平均移動距離,平均移動速度及び脱糞数の10種類であった³⁻⁵⁾.

統計解析:マウスの体重及び摂水量は、一元配置分

^{*}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

散分析または Kruskal-Wallis の順位の分散分析を行った後に, Bonferroni の多重比較検定を行った. 行動に関するデータは, Mann-Whitney の U検定により解析した⁶⁾.

結 果

実験期間中、対照群及び投与群のマウスに異常な行動や死亡などは観察されなかった。投与開始時及び終了時のマウスの体重は、対照群と投与群の間に有意な差は見られなかった(Table 1). 摂水量は投与群で投与濃度に比例して増加した。このため、各群間の薬物摂取量の比は設定公比よりもやや大きくなった(Table 1).

探索行動の運動活性の結果を Table 2 に示した. 動作 回数及び移動時間は各群の間に特に有意な差は見られなかった. 移動距離は各群の間に有意な差は見られなかったが, 平行移動回数は黄耆 1 %投与群で減少した. その結果, 平均移動距離は黄耆 1 %投与群で有意に増加した. また, 移動時間及び移動距離に有意な差が見られなかったことにより, 平均移動速度にも有意な差

は見られなかった. 立ち上がり回数及び時間にも有意な差は見られなかったが, 方向反転回数は黄耆1%投与群で有意に増加した. さらに脱糞数にも有意な差は認められなかった.

考 察

本実験において、摂水量が黄耆1%投与群において 有意に増加したが、これは黄耆1%投与群にこぼしが 多い個体が見られたために、平均値を押し上げる結果 となったものと考えられる。また、投与量の逆転が見 られなかったために実験結果には直接影響しないと思 われる。したがって、本実験において投与は設定通り 行われ、各群の反応の差異は投与用量に伴うものと評 価できる。

実験期間中,投与群においてマウスの体重変化および一般行動に対照群との差異が観察されなかったので, 黄耆の投与はマウスの一般状態に影響を及ぼさないものと思われる。また,運動活性に関しても,平行移動回数・平均移動距離・方向反転回数が黄耆1%投与群

Table 1. Average Body Weight and Average Daily Fluid and Chemical Intakes of Male Mice Administered Astragali Radix.

		Dose le	evel(%)	
	0	0.25	0.5	1.0
No. of mice examined	15	• 15	15	15
Body weight (g)				
pre-treatment	35.8 ± 0.51	36.1 ± 0.42	36.3 ± 0.38	36.0 ± 0.36
post-treatment	37.2 ± 0.56	37.7 ± 0.42	37.7 ± 0.45	37.0 ± 0.39
Fluid intake(g/day)	8.29 ± 0.36	9.02 ± 0.40	10.11 ± 0.54	10.59± 0.69 *
Chemical intake(mg/kg/day)	. —	611.2 ± 25.77	1361.8 ± 74.17	2899.5 ± 181.10

Each value represents the mean \pm SE.

Significantly different from controls: *P<0.05

Table 2. Motor Activity of Exploratory Behaviour in Male Mice Administered Astragali Radix during 7 Days.

		Dose 1	evel(%)	
	0	0.25	0.5	1.0
No. of mice examined	15	15	. 15	15
No. of movement	2198.9 ± 75.7	2118.7 ± 48.1	2223.2 ± 79.5	2288.9 ± 70.4
Movement time(s)	517.3 ± 9.3	507.7 ± 7.3	515.5 ± 11.6	529.3 ± 6.4
No. of H. activity ^{a)}	51.7 ± 3.1	51.8 ± 2.1	49.2 ± 2.9	45.0 ± 3.1 *
Total distance (cm)	2999.15 ± 195.88	2913.86 ± 147.74	2859.19 ± 211.56	3384.81 ± 198.26
No. of V. activityb)	157.1 ± 5.5	147.5 ± 5.9	155.8 ± 7.6	157.3 ± 5.3
Vertical time(s)	273.8 ± 9.7	267.3 ± 9.9	280.8 ± 12.1	264.7 ± 10.6
No. of turning	52.2 ± 4.5	54.3 ± 3.8	54.4 ± 4.0	65.4 ± 3.6 *
Ave. distance (cm)	67.0 ± 11.48	58.13 ± 4.35	64.95 ± 9.06	82.60 ± 8.52
Ave. speed (cm/s)	5.75 ± 0.30	5.71 ± 0.24	5.49 ± 0.33	6.34 ± 0.31
Defecation	6.6 ± 1.0	6.0 ± 0.8	5.6 ± 0.5	6.1 ± 0.7

Each value represents the incidence of behaviour per 10 min (mean \pm SE).

Significantly different from controls: *P<0.05

- a) No. of H. activity means number of horizontal activity.
- b) No. of V. activity means number of vertical activity.

で有意な差を示したものの、これらの行動の指標の変化は動作回数・移動時間・移動距離の変化ほど重要なものではなく、また行動の変化が用量依存的ではないので、これらの変化が薬物投与の影響であるか特定できなかった。その他の投与群では有意な差は認められなかった。一般的には、生物活性が低い食品添加物などでも運動活性に対しては、ばらつきを大きくしたり⁷⁾、有意な影響を及ぼすものが見られるが⁵⁾、今回の実験では対照群と投与群の間に投与によると思われる明らかな差異はほとんど見られなかった。したがって、本実験において黄耆の投与によると思われる影響はほとんど観察されなかった。このことから、黄耆の単独投与がマウスの探索行動の運動活性に及ぼす影響はほとんどないものと推測される。

- 1) 高橋奈穂子,安田一郎,瀬戸隆子,他:東京衛研 年報,**40**,84-89,1989.
- 2) 田中豊人,市川久次:東京衛研年報, **44**, 265-267, 1993.
- 3) 松本欣三, 蔡 兵, 中村晋也, 他:日薬理誌, **96**, 31-39, 1990.
- 4) Matsumoto, K., Cai, B., Sasaki, K., et al.: J. Pharmacol. Methods., 24, 111-119, 1990.
- 5) Tanaka, T.: Toxicol. Lett., 69, 155-161, 1993.
- 6) Martin, P. and Bateson, P.: Measuring behavior. an introductory guide. 102-122, 1990, 東海大学出版会, 東京.
- 7) Tanaka, T.: Toxicol, Lett., 60, 315-324, 1992.

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた 食品添加物の変異原性試験(第9報*)

藤 田 博**,青 木 直 人**,佐々木 美枝子**

Mutagenicity Test of Food Additives with Salmonella typhimurium TA97 and TA102(IX*)

HIROSHI FUJITA**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

The mutagenicity of 34 food additives, including 10 seasonings, 6 bases for processing, 5 flavoring agents and 13 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 a phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. The 34 chemicals showed no mutagenicity in TA97 and TA102.

Keywords:変異原性 mutagenicity, 食品添加物 food additives, 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。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り、多くの変異原の検出に貢献してきた。 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 $^{3)}$.

食品添加物の変異原性についての Ames 試験による検討には、主に TA98および TA100が用いられてきた. TA97および TA102を用いた試験報告は少ないため、これらの菌株による試験を実施する必要があると考えられた. 試験開始にあたり 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た全食品添加物について行うことにした. 既報⁴⁻¹²⁾において245種の試験結果を報告してきたが、それらのうち21種の食品添加物に TA97または TA102に対する変異原性が見いだされた.

本報告では、調味料(10種),食品製造用アルカリ剤(6種),着香料(5種),膨張剤(4種),着色料(2種),発色剤(2種),溶剤(1種),チューインガム基礎剤(1種),防虫剤(1種),保存料(1種),漂白剤(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述べる.

実験材料および方法

試料 以下の試料化合物は、特に表示されたもの以外は全て和光純薬製である.

調味料:5'-シチジル酸二ナトリウム(CAS No. 6757-06-8, LOT No. TWE6691), コハク酸二ナトリウム(CAS No. 150-90-3, LOT No. WDJ8980), L-グルタミン酸(CAS No. 56-86-0, LOT No. APP3683), グリシン(CAS No. 56-40-6, LOT No. WDN1337), フマル酸ーナトリウム(CAS No. 5873-57-4, LOT No. PTN0889), コハク酸ーナトリウム(CAS No. 2922-54-5, 東京化成, LOT No. AV01), L-グルタミン酸ナトリウム(CAS No. 142-47-2, LOT No. WDJ0189), 乳酸ナトリウム(答液)(CAS No. 72-17-3, LOT No. WDG9833), DL-リンゴ酸ナトリウム(CAS No. 676-46-0, LOT No. APJ1865), L-酒石酸ナトリウム(CAS No. 868-18-8, LOT No. PTQ1148).

食品製造用アルカリ剤:リン酸水素二カリウム(CAS No. 7758-11-4, LOT No. PTK3940), リン酸水素二ナトリウム 無水(CAS No. 7558-79-4, LOT No. APJ

^{*}第8報, 東京衛研年報, 44, 278-287, 1993.

^{**}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

3697), 炭酸ナトリウム 無水(CAS No. 497-19-8, LOT No. PTH3569), 炭酸カリウム 無水(CAS No. 584-08-7, LOT No. PTJ3402), リン酸三カリウム(CAS No. 7778-53-2, LOT No. PTL2769), リン酸三ナトリウム(CAS No. 10101-89-0, LOT No. PTK3091).

着香料:イソチオシアン酸エチル (CAS No. 542-85-8, LOT No. WDJ5863), インドール (CAS No. 120-72-9, LOT No. APK2040), フェニル酢酸イソブチル (CAS No. 102-13-6, LOT No. AWH3658), 1-ペリルアルデヒド (CAS No. 18031-40-8, 東京化成, LOT No. AX01), L-テアニン (CAS No. 3081-61-6, 東京化成, LOT No. FIB02).

膨張剤: 炭酸水素アンモニウム (CAS No. 1066-33-7, LOT No. PTK3136), 炭酸アンモニウム (CAS No. 506-87-6, LOT No. PTM2580), L-酒石酸水素カリウム (CAS No. 868-14-4, LOT No. DSE3264), 炭酸水素ナトリウム (CAS No. 144-55-8, LOT No. PTJ3381).

着色料:三二酸化鉄(CAS No. 1309-37-1, LOT No. PTP2230), 二酸化チタン(CAS No. 13463-67-7, Aldrich, LOT No. H-180).

発色剤:グルコン酸第一鉄(CAS No. 22830-45-1, Aldrich), 硫酸第一鉄(CAS No. 7782-63-0, LOT No. PTM2692).

溶剤: グリセリン (CAS No. 56-81-5, LOT No. APH3844).

チューインガム基礎剤:アセチルリシノール酸メチル(CAS No. 140-03-4, 東京化成, LOT No. AP01).

防虫剤: ピペロニルブトキシド(CAS No. 51-03-6, LOT No. LAP5620).

保存料:安息香酸ナトリウム(CAS No. 532-32-1, LOT No. LAE0691).

漂白剤:ピロ亜硫酸ナトリウム (CAS No. 7681-57-4, LOT No. APH4211).

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、リン酸緩衝液 (pH 7.4) またはジメチルスルホキシド (同仁化学、吸収スペクトル用) に溶解した.

菌株 Salmonella typhimurium TA97¹³⁾ および TA $102^{14,15)}$ を普通ブイヨン (Nutrient broth No. 2, OXOID) で一夜培養し用いた. これらの株は、B. N. Ames 教授(カリフォルニア大)より分与を受けたものである.

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 $^{3,16)}$ により行った. 代謝活性化には、ア

ロクロール1254 (ジーエルサイエンス) により薬物代謝 酵素を誘導した雄性CD系ラット (Crj:CD 日本チャールス・リバー) の肝臓ホモジネートから調製した $S9^{3}$ を用いた。 $S9mix^{3.16}$ 中のS9量は,10% (50μ 1/プレート) とした.

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ、代謝活性化する場合にはS9mix 0.5ml、代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(pH7.4)0.5mlを加え、さらに一夜培養した菌液を0.1ml加え、37 $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ 2 mlを加え混合後、最少グルコース寒天培地 3 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 2 mlを加え混合後、最少グル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 $^{17)}$ を行い、さらに Moore ら $^{18)}$ のプログラムによる回帰分析を行った.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、試料が溶解している濃度または試験菌株の増殖が認められる濃度を調べ、本試験の最高濃度とした. 本試験は5濃度段階で行った.

今回試験した34種の試料は、いずれも復帰コロニー数に有意な増加は認められなかった。従って、これらの化合物のTA97およびTA102に対する変異原性は、陰性と判断された。

今回試験を行った化合物の中には Ames 試験において陽性の報告がされているものがある. ピロ亜硫酸ナトリウムは、水に溶かすと亜硫酸水素ナトリウムとなる. 亜硫酸水素ナトリウムは、弱酸性条件下のS9無添加において Ames の開発した菌株である G46, D3052および TA97などに弱い変異原性を示した¹⁹⁾. また、イソチオシアン酸エチルは、TA100の S9無添加において変異原性陽性である²⁰⁾. ただし、プレインキュベーション時間は60分であった. 今回の両化合物の結果は陰性であり、一致しなかった. これは、報告されている実験の実験条件が標準的な方法とは少し異なっていたのが陽性の結果となった原因かもしれない.

次に以下の化合物,5'-シチジル酸二ナトリウム,コハク酸二ナトリウム,L-グルタミン酸,グリシン,L-グルタミン酸ナトリウム,乳酸ナトリウム(溶液),DL-リンゴ酸ナトリウム,L-酒石酸ナトリウム,リン酸水素二ナトリウム,炭酸ナトリウム,炭酸カリウム,1-ペ

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

		Dose -	No. of Revertants/plate ^a					
Chemical	Solvent	mg/plate -		197		.102		
	<u> </u>	9/ Prate	-S9	+\$9	<u>-S9</u>	+\$9		
easonings								
Disodium 5'-Citidilate	DW	10	157	186	203	335		
[6757 - 06-8] ^{b)}		5	136	196	242	326		
		1	123	177	215	346		
		0.5	174	203	225	349		
•		0.1	145	184	214	361		
		0	162	189	228	345		
Disodium Succinate	DW	10	132	211	246	325		
[150-90-3]		5	137	194	234	. 317		
		1	97	184	176	334		
		0.5	149	190	212	319		
		0.1	138	184	235	341		
		.0	118	177	205	363		
Glutamic Acid	PBS	1	164	204	205	326		
[56-86-0]	1 100	0.5	149	201	217	312		
_00 00 0]		0.3	167	213	194	312		
		0.05	169	213	203	321		
			169	212		337		
		0.01			181			
		0	145	207	209	342		
Glycine	DW	10	162	196	177	302		
[56-40-6]		5	145	189	202	344		
		1	158	201	156	324		
		0.5	150	189	170	350		
		0.1	158	187	196	355		
		0	142	202	233	343		
Monosodium Fumarate	PBS	10	156	231	198	307		
[5873-57-4]	9	5	156	206	202	323		
	•	1	160	197	179	309		
		0.5	156	213	189	305		
		0.1	147	215	191	298		
		0	145	207	209	342		
Monosodium Succinate	DW	10	161	207	273	380		
[2922-54-5]	D 11	5	156	197	278	379		
		1	155	216	261	396		
		0.5	157	206	275	387		
		0.1	148	217	291	426		
		0.1	151	233	291 261	377		
		U ,	101	۵00	201	311		
Sodium L-Glutamate	DW	10	142	179	201	309		
[142-47-2]		5	165	198	204	350		
	4	1	179	201	232	319		
		0.5	139	213	227	326		
		0.1	122	204	223	321		
		0	142	202	233	343		

 $Table \ 1. \ Continued$

		Dose -	No. of Revertants∕plate ^{a)}					
Chemical	Solvent	mg/plate -	TA		TA102			
			<u>-S9</u>	+S9	-S9	+59		
Sodium Lactate (Solution)	DW	10	144	195	224	339		
[72-17-3]		5	150	211	205	358		
		1 .	152	197	, 227	363		
		0.5	152	196	222	341		
		0.1	143	216	223	339		
		0	162	189	228	345		
Sodium DL-Malate	DW	10	167	224	206	266		
[676-46-0]		5	196	202	249	285		
		1	176	238	237	316		
		0.5	184	205	255	315		
		0.1	182	231	242	297		
		. 0	173	212	255	280		
Sodium L-Tartrate	DW	10	136	168	190	339		
[868-18-8]	J/ ¥¥	5	130	174	195	321		
[000 10 0]		1	100	189	166	336		
		0.5	119	178	200	346		
				178		331		
		0.1	113		196			
		0	118	177	205	363		
ases for processing								
Dipotassium Hydrogen	DW	10	147	194	247	353		
Phosphate		5	174	219	256	361		
[7758-11-4]		1	169	196	276	342		
		0.5	. 176	215	238	335		
		0.1	169	189	259	369		
		0	152	192	257	344		
Disodium Hydrogen Phosphate,	DW	10	165	232	281	406		
Anhydrous		5	195	238	293	417		
[7558-11-4]		1 .	185	253	292	383		
		0.5	183	239	274	357		
		0.1	200	236	280	393		
		0	197	231	258	390		
Sodium Carbonate,	DW	10	48	93	103	219		
Anhydrous	<i>D</i> ##	5	91	112	103	238		
[497-19-8]		1	131	216	169	306		
[#01 IA O]		0.5	133	196	184	328		
		0.5	126	200	183	328		
		0	143	180	186	308		
Potassium Carbonate,	DW	10	115	140	122	240		
Anhydrous		.5	163	205	203	315		
[584-08-7]		1	157	203	209	326		
		0.5	157	221	209	345		
		0.1	173	217	189	335		
		0	168	235	. 211	333		

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose -	· т	A97	tants/plate ^{a)}	.102
Chemicai	Solvent	mg/plate -		+S9	——————————————————————————————————————	+S9
Tripotassium Phosphate	DW	10	104	128	169	234
[7778-53-2]	DVV	5	166	241	264	494
[[1110 00 2]		1	157	203	233	338
		0.5	158	190	248	336
		0.1	157	218	241	335
		0.1	152	192	257	344
			132	194	231	344
Trisodium Phosphate	. DW	10	152	167	200	328
[10101-89-0]		5	195	258	277	. 384
		1	199	239	228	402
•		0.5	192	212	278	389
		0.1	202	243	269	382
		0	197	231	258	390
avoring agents	DMCO	0.1	160	105	1.97	
Ethyl Isothiocyanate	DMSO	0.1	169	185	127	373
[542-85-8]		0.05 0.01	161	200	140	371
			148	202	208	374
		0.005	140	184	201	370
		0.001	138	204	248	370
		0	147	196	247	370
Indole	DMSO	1	92	164	76	295
[120-72-9]		0.5	117	232	169	400
		0.1	139	185	236	376
		0.05	142	215	240	356
		0.01	137	217	227	345
•		0	147	196	247	370
Isobutyl Phenylacetate	DMSO	0.1	123	202	146	418
[102-13-6]		0.05	129	208	202	396
		0.01	154	229	246	380
		0.005	170	217	255	382
		0.001	139	231	282	380
		0	148	225	241	391
l-Perillaldehyde	DMSO	0.1	139	185	198	413
[18031-40-8]	DIVIO	0.05	150	213	216	390
LICOULT TO U		0.03	152	217	263	396
		0.005	146	217	259	402
		0.003	146	231	259 254	402
		0.001	149	231 225	254 241	391
		V ,	140	LLJ	411	551
L-Theanine	DW	10	187	212	283	389
[3081-61-6]		5	170	216	258	390
		1	175	203	255	361
		0.5	175	229	288	370
		0.1	152	221	267	371
		0	151	233	261	377

 $Table \ 1. \ Continued$

	_	Dose -	No. of Revertants/plate ^{a)} TA97 TA102					
Chemical	Solvent	mg/plate -						
			-S9	+\$9	<u>-\$9</u>	+\$9		
eavening agents Ammonium Bicarbonate	DW	10	103	183	188	228		
[1066-33-7]	DW	5	137	196	192	236		
[1000-33-7]	•	3 1	117	209	186	323		
		0.5		209 202	181	325 335		
			125					
	· ·	0.1	152	220	205	306		
		0	147	207	208	328		
Ammonium Carbonate	DW ,	10	152	279	215	466		
[506-87-6]		5	160	223	224	247		
[000 6, 6]		1	153	221	212	297		
		0.5	172	218	200	324		
		0.1	165	231	202	324		
			168	235	211	333		
		0	108	<i>2</i> 30	211	333		
Potassium L-Bitartrate	DW	1	177	213	230	389		
[868-14-4]		0.5	178	219	270	373		
		0.1	177	225	265	352		
		0.05	175	224	253	361		
		0.01	188	252	269	377		
		0	184	232	260	392		
Sodium Bicarbonate	DW	10	117	201	167	295		
[144-55-8]		5	120	198	191	304		
		1	133	195	170	335		
		0.5	128	189	177	298		
		0.1	148	187	205	321		
•		.0	147	207	208	328		
ood colors Iron (∭) Oxide	DXX	1	179	225	261	393		
	DW.	1	173		261			
[1309-37-1]		0.5	165	211	248	437		
		0.1	145	241	275	410		
		0.05	166	219	278	384		
		0.01	163	251	252	415		
•		0	160	229	277	405		
Titanium Dioxide	DW	1	161	246	305	427		
[13463-67-7]	2 17	0.5	169	248	266	400		
FIGIOR OF []		0.1	179	223	281	407		
		0.05	156	211	260	378		
	à	0.03	172	231	. 253	361		
		0.01	160	231 229	277	405		
olor fixatives		V		200				
Iron(II) Sulfate	DW	1	155	255	244	332		
[7782-63-0]		0.5	149	273	221	342		
		0.1	186	226	254	293		
		0.05	172	236	221	313		
•		0.01	171	229	259	299		
		0	173	212	255	280		

Table 1. Continued

		Dose		No. of Revertants/plate ^{a)}					
Chemical	Solvent	mg/plate		A97		102			
			- S9	+S9	—S9	+S9			
Gluconic Acid Iron(II) Salt	DW	1	192	248	244	372			
Dihydrate	•	0.5	187	251	222	425			
[22830-45-1]		0.1	182	218	263	375			
		0.05	205	217	235	372			
		0.01	206	228	229	353			
•		0	190	242	226	379			
ther agents									
Glycerin	DW	10"	151	223	217	340			
[56-81-5]		5	135	208	194	345			
		1	149	177	185	293			
		0.5	149	187	211	331			
		0.1	133	191	183	326			
		0	143	180	186	308			
		4	150	100	010	905			
Methyl Acetyl Ricinoleate	DW	1	150	168	219	205			
[140-03-4]		0.5	146	175	218	199			
		0.1	153	194	204	395			
		0.05	167	194	201	356			
		0.01	153	192	213	387			
		0	148	204	235	367			
Piperonyl Butoxide	DMSO	1	143	193	186	421			
[51-03-6]		0.5	159	173	198	409			
		0.1	155	175	182	419			
•		0.05	139	172	199	394			
		0.01	157	220	233	365			
		0	143	226	220	400			
Sodium Benzoate	DW	10	13	6	49	68			
[532-32-1]		5	42	88	153	214			
		. 1	155	199	241	304			
		0.5	159	174	223	314			
		0.1	165	229	212	361			
		0	161	203	230	371			
			·						
Sodium Pyrosulfite	DW	10	140	152	164	239			
[7681-57-4]		5	131	183	204	271			
		1	133	152	201	324			
	4	0.5	139	174	205	309			
		0.1	169	191	213	341			
		0	161	203	230	. 371			
sitive controls									
9-Aminoacridine	DMCO	50()	$1,000 \pm 205^{\text{c}}$						
	DMSO	50 (μg)	1,000 ± 205°		2 140 ± 200				
Mitomycin C	DMSO	$0.5(\mu g)$		0 545 002	$3,142 \pm 309$	1 000 10			
2-Aminoanthracene	DMSO	5 (μg)		$3,545 \pm 396$		$1,090 \pm 19$			

a) Mean of three plates.

b) CAS registry number.

c) Mean and standard deviation (n=17).

リルアルデヒド、L-テアニン、炭酸水素アンモニウム、L-酒石酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム、三二酸化鉄、グリセリン、アセチルリシノール酸メチル、ピペロニルブトキシドおよび安息香酸ナトリウムについては、TA98およびTA100において変異原性陰性の報告^{21,22)}が見られ、今回の試験結果と合わせ4菌株以上の菌株による結果が一致した、従って、これらの化合物は、Ames 試験においては陰性と結論できるであろう.

なお, 上記化合物の内いくつかの化合物には, 他の 変異原性試験系における陽性の報告が見られた. 5'-シ チジル酸二ナトリウムおよび L-酒石酸ナトリウムは チャイニーズハムスターの培養細胞に染色体異常を誘 発した²²⁾ グリシンは、ヒト末梢血リンパ球およびタ マネギ根端細胞において SCE を誘発した²³⁾. ピペロニ ルブトキシドは、マウスの L5178Y 細胞の tk 遺伝子に 突然変異を誘発し²⁴⁾、シリアンハムスターの胎児細胞 のトランスフォーメーションを増加させた²⁵⁾. 安息香 酸ナトリウムは、ヒト末梢血リンパ球およびタマネギ 根端細胞において SCE を誘発した²⁶⁾ さらに、チャイ ニーズハムスターの培養細胞に染色体異常を誘発し た $^{22,27)}$. 1-ペリルアルデヒドは, rec-assay において陽 性の結果を示し²⁸⁾、チャイニーズハムスターの培養細 胞に染色体異常を誘発した²²⁾. いずれも変異原性は陽 性となったが、様々な試験方法による結果のため比較 は困難である.

また,以下の化合物,フマル酸ーナトリウム,コハク酸ーナトリウム,リン酸水素二カリウム,リン酸三カリウム,リン酸三ナトリウム,インドール,フェニル酢酸イソブチル,炭酸アンモニウム,二酸化チタン,グルコン酸第一鉄および硫酸第一鉄では,これまでにAmes 試験における結果は明らかではなく,今回のTA97およびTA102を用いた試験においての陰性が確認されたものである.ただし,硫酸第一鉄は,マウスから取り出した脾臓細胞における小核試験において陽性を示し,紫外線を照射する事によりさらに多くの小核を誘発することが報告されている²⁹⁾.

今回試験した34種の化合物の中には、発ガン性に関する実験結果が報告されているものがある. 炭酸カリウム³⁰⁾ および炭酸水素ナトリウム³¹⁾ は、ラットの餌に混入して投与した場合、膀胱上皮細胞の DNA 合成が促進され、膀胱の発ガンの促進に関係していることが推定されている. インドールは、マウスに皮下投与した場合肺に腫瘍が発生した³²⁾. 三二酸化鉄は、ラットに皮下投与したときに、投与部位に腫瘍が発生した³³⁾. また、二酸化チタンは、ラットに微粒子として曝露し

たところ肺の腫瘍が発生した 34)。これらの化合物の内, Ames 試験および染色体異常試験において陰性の結果が 報告 21,22 されている化合物は,変異原性と発ガン性と に相関が見られない化合物のようである.

食品添加物の TA97および TA102を用いた変異原性 試験は、前報4-12)に報告したように245種類が終了して おり、今回の34種を加えると279種類となった。これま での結果を総合すると、TA97、TA102の両株かどちら か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 10 , アスコルビン酸 4 , L-アスコルビン酸 ナトリウム 9 , エリソルビン酸 11 , エリソルビン酸ナ トリウム $^{8)}$,塩化マグネシウム $^{12)}$,塩酸ピリドキシン $^{5)}$, オルトフェニルフェノー ν^{4} , 過酸化水素 10 , L-シス テイン一塩酸塩⁸⁾, 食用青色 2 号¹²⁾, 臭素酸カリウム⁶⁾, チアベンダゾール 4 , ニコチン酸アミド 5 , ピペロナー ν^{10} , 没食子酸プロピ ν^{7} , マルトー ν^{11} , DL-メチ オニン $^{12)}$, L-メチオニン $^{12)}$, リボフラビン $^{5)}$, リボフ ラビン5'-リン酸エステルナトリウム¹²⁾の21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い. ただし. これらの化合物の TA97または TA102に対する変異原 性は、陽性対照に用いている変異原物質に比べるとい ずれもかなり弱いものであった.

まとめ

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. いずれも復帰コロニ―数が増加しなかったことから,変異原性陰性と判断した.

- 1) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., et al.: *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) 藤田 博, 小嶋昭江, 平賀興吾:東京衛研年報, **36**, 413-417, 1985.
- 5) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **37**, 447-452, 1986.
- 6) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **38**, 423-430, 1987.
- 7) 藤田 博,中野雅行,佐々木美枝子:東京衛研年報,**39**,343-350,1988.
- 8) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **40**, 355-362, 1989.

- 9) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **41**, 315-322, 1990.
- 10) 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **42**, 267-275, 1991.
- 11) 藤田 博, 角 千代, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **43**, 219-227, 1992.
- 12) 藤田 博, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **44**, 278-287, 1992.
- 13) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
- 14) Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
- 15) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
- 16) 矢作多貴江:蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 17) 石居 進:生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風 館.
- 18) Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95 -102, 1983.
- 19) Pagano, D. A. and Zeiger, E.: *Mutation Res.*, **179**, 159-166, 1987.
- Yamaguchi, T. : Agric. Biol. Chem., 44, 3017-3018, 1980.
- 21) 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.

- 22) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., et al. : *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
- 23) Zhang, Z. and Yang, J. : Mutation Res., 280, 279 -283, 1992.
- 24) McGregor, D. B., Brown, A., Caspary, W. J. et al. : *Environ. Mol. Mutagen.*, **12**, 85-154, 1988.
- 25) Amacher, D. E. and Zelljadt, I.: Carcinogenesis, 4, 291-295, 1983.
- 26) Xing, W. and Zhang, Z.: Mutation Res. 241, 109 -113, 1990.
- 27) Ishidate, M. Jr. and Odashima, S.: *Mutation Res.*,48, 337-354, 1977.
- 28) 兪 榮植 :阪市医誌, 34, 267-288, 1986.
- 29) Dreosti, I. E., Baghurst, P. A., Partick, E. J. et al. : *Mutation Res.*, **244**, 337-343, 1990.
- 30) Shibata, M. -A., Tamano, S., Fukushima, S. et al. : Fd Chem. Toxic. 27, 403-413, 1989.
- 31) Fukushima, S., Tamano, S., Ito, N. et al.: *Carcinogenesis*, **9**, 1203-1206, 1988.
- 32) Dzioev, F. K.: Voprosy Onkologii, **20** (8), 75-81, 1974.
- 33) Maltoni, C.: *Prog. biochem. Pharmacol.*, **14**, 47-56, 1978.
- 34) Lee, K. P., Trochimowicz, H. J. and Reinhardt, C. F.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 79, 179-192, 1985.

tert-ブチルハイドロキノンのラット遊離肝細胞に及ぼす毒性

中 川 好 男*, 市 川 久 次*, 佐々木 美枝子*

Cytotoxicity of *tert*-Butylhydroquinone on Isolated Rat Hepatocytes

YOSHIO NAKAGAWA*, HISATSUGU ICHIKAWA*
and MIEKO SASAKI*

Keywords: tert-ブチルハイドロキノン tert-butylhydroquinone, 細胞毒性 cytotoxicity, 抗酸化剤 antioxidant, 遊離肝細胞 isolated rat hepatocyte, ラット rat

tert-ブチルハイドロキノン(tBHQ)は、ブチルハイドロキシアニソール(BHA)の代謝中間体の一つであり、かつまた両物質とも酸化防止剤として加工食品、石油製品等に使用されている。生体内において、BHAはミクロゾームのチトクロムP-450により酸化的脱メチル化反応をうけて、tBHQを生成する1). 生成した tBHQは、グルクロニド、硫酸抱合体等に代謝されるが、tBHQの一部は自動酸化を受けることにより反応性が極めて高いキノン体、つまり tert-ブチルキノン(t-BQ)になる2). 現在、BHAによる発癌性3)、催奇形性4)、遺伝毒性5)などがハイドロキノン体及びキノン体等の代謝中間体と生体成分との相互作用に起因すると推察されている.

tBHQ の毒性については短期、長期及び発癌性試験 等^{6.7)}により検討されているが,組織器官の構成単位で ある細胞に及ぼす影響についての情報は少ない. 今回 ここで用いた遊離細胞系は,薬物の取り込み,代謝, 排泄などの動態、細胞膜及び細胞生理機能への影響、 細胞内成分の消長等をカイネティックスの面から分析 することができるため、化学物質による毒性発現の機 序を考察する上で有益な情報を与える⁸⁾. 前報⁹⁾におい て、著者らはBHAによる急性の肝細胞障害が、細胞内 アデニンヌクレオチド, グルタチオン(GSH), 蛋白質 SH 濃度等の枯渇を伴って惹起し、ミトコンドリアの酸 化的燐酸化系がその標的部位のひとつであることを明 かにした. 今回の実験では、ラット遊離肝細胞における tBHQ の毒性とキノン還元酵素である DT-ジアホラーゼ の阻害剤; ジクマロールとの作用を検討し, tBHQ 毒性 の発現機序を考察した.

実験材料及び方法

試薬 tBHQ(純度>98%) は東京化成社製, GSH と牛血清アルブミンは Sigma 社製, コラゲナーゼとジクマロールは和光純薬社製を用いた. このほかの試薬は市販の特級規格以上を使用した.

遊離肝細胞の調製と反応 遊離肝細胞は雄性 Fischer-344系ラット (240-280g) の肝臓を Moldeus ら⁸⁾ のコラーゲナーゼ潅流法により用時調製した. 遊離した肝細胞は 12.5mM Hepes と 0.1% アルブミンを含有した Krebs-Henseleit 緩衝液 (pH7.4) にけん濁 (10⁶細胞/ml)した. 生細胞は0.16%トリパンブルーの排除能で確認し,調製直後の生細胞率は約90%であった. 95%酸素-5%二酸化炭素気流下, 37℃に加温した細胞けん濁液に tBHQ (終濃度0.5mM)を加えて反応を開始した. また, ジクマロール(終濃度30 μM) は反応開始10分前に細胞けん濁液に加えた. tBHQ とジクマロールは, 各々ジメチルスルホキシドに溶かし, 細胞反応液に加えたジメチルスルホキシドの終濃度は0.5%以下とした. 反応開始後,経時的に分取した細胞液は細胞死及びアデニンヌクレオチド, GSH, 蛋白質 SH の各濃度について測定した.

細胞成分の定量 細胞内アデニンヌクレオチドは Jones による HPLC 法 10 , 還元型蛋白質 SH は Ellman 試薬による Albano らの方法 11 , GSH は Reed らによる HPLC 法 12 , 蛋白質は Lowry らの方法 13 によりそれぞれ測定した. ブレッブを伴う生細胞数は顕微鏡下で計数した.

結 果

Fig. 1 は遊離肝細胞に及ぼす tBHQ 及びジクマロー

^{*}東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

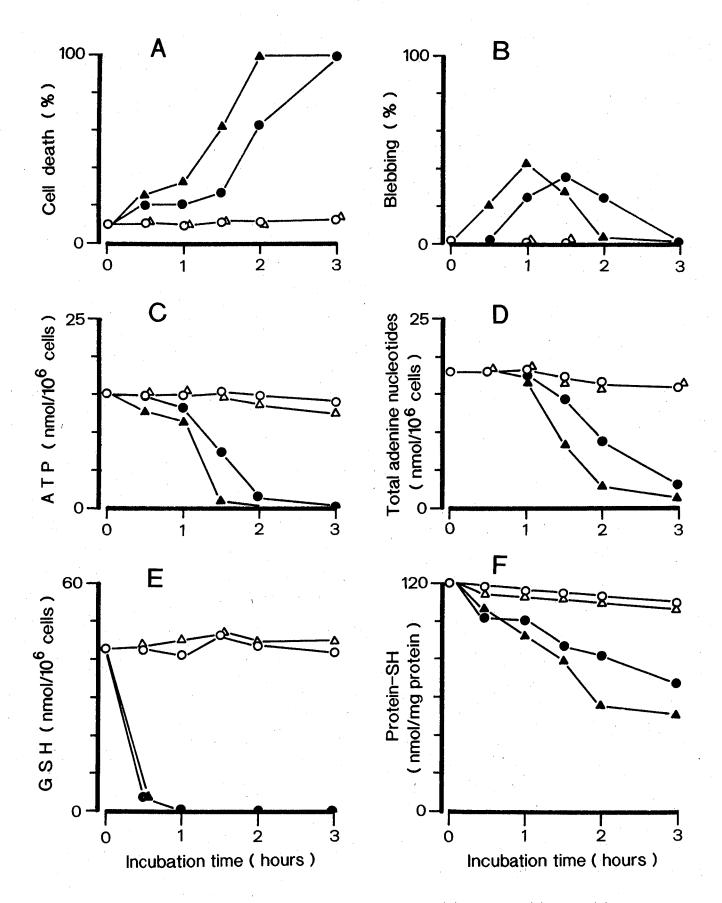


Fig.1. Effects of dicumarol on tBHQ-induced cytotoxicity:cell death (A), blebbing (B), ATP (C), total adenine nucleotides (D), GSH (E) and protein thiols (F). Hepatocytes ($10^6 \, \text{cells/ml}$) pretreated with or without 30 μ M dicumarol were incubated in Krebs-Henseleit buffer containing 0.5 mM tBHQ: (\bigcirc) nontreated cells, (\triangle) dicumarol-treated cells, (\bigcirc) tBHQ-treated cells, (\triangle) dicumarol and tBHQ-cotreated cells. One experiment typical of three.

ル併用による毒作用を示す. ここで用いたtBHQの濃 度は前報⁹⁾に基づき0.5mMとした。また30 μMジクマ ロールは細胞内 DT-ジアホラーゼ活性をほぼ95%阻害 する濃度である¹⁴⁾. tBHQ 暴露は死細胞数の経時的な 増加つまり細胞毒性を惹起した. 細胞死に先立ち細胞 内 ATP, GSH 及び蛋白質 SH 濃度が減少した. Fig. 1 には示してはいないが、ATP の減少は一時的な ADP と AMP の増加を伴っており、インキュベーション時間 の経過ともにアデニンヌクレオチドプールは枯渇した. またブレッブを伴った細胞数は細胞死の誘導に先立っ て増加した.一方、ジクマロール前処理は、tBHQ によ る細胞死の誘導, ATP 及び蛋白質 SH 濃度の減少を増 強させた. またtBHQによる細胞のブレッブ形成がジ クマロール処置により早期に発現した. しかしジクマ ロールの単独暴露は3時間のインキュベーション中. これらのパラメーターになんら影響を及ぼさなかつた.

考察

ここで得られた結果は、tBHQ が急性の肝細胞毒性を 惹起し、さらに DT-ジアホラーゼ阻害剤であるジクマ ロールとの併用により、この細胞毒性が増強すること を示している.ハイドロキノン類の毒性は,そのもの 自体よりむしろ自動酸化により生成する、セミキノン 体,キノン体,及び活性酸素種などが重要な役割を担っ ている 15 . 事実,tBHQ の酸化体である tert-ブチルキノ ン(tBQ)は、細胞毒性及びミトコンドリア呼吸阻害とも tBHQ より強い作用を示した9). キノンは1電子還元及 び2電子還元酵素系でそれぞれセミキノンまたはハイド ロキノンに還元される¹⁵⁾. セミキノン自体の生体成分 に対する反応性は高く, さらにセミキノンの再酸化の 過程で生じるスーパーオキシドもまた細胞傷害を誘発 する一因である. 一方, DT-ジアホラーゼは NADH あ るいはNADPH2を介してキノンを2電子還元させるた め、キノンからセミキノンとスーパーオキシドの生成 を間接的に抑制する. それゆえに、ジクマロールによ る DT-ジアホラーゼ活性の阻害時, tBHQ の細胞毒性が 増強したことは(Fig. 1 A, C), tBHQ 本体よりむしろ自 動酸化により生成した tBQ あるいは tBHQ のセミキノ ン体等が、毒性の発現に関与していることを示唆して

Orrenius ら 16 は,化学物質による細胞膜ブレッブの 形成が,細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に起因すると報告した。 ミクロフィラメント及び微小管等の細胞骨格の維持に は,細胞内 ATP が必須である.ジクマロールがミトコ ンドリアの酸化的燐酸化を脱共役させると報告されて はいるが 17 ,この実験系では,インキュベーション期 間中細胞内 ATP 濃度に対してなんら有意な影響を及ぼさなかった(Fig. 1 C, D). ジクマロールによる肝細胞の前処理は、tBHQ 依存性のブレッブ形成と ATP 濃度の減少速度を早め、さらにこれらの両パラメーターの消長は細胞死に先行した. ATP 濃度の急激な枯渇はミトコンドリア呼吸系がtBHQ の重要な標的部位であることを示している. なお、tBHQ による ATP の枯渇は、細胞死に依存した二次的な現象ではなく、むしろ細胞内の主要なエネルギー産生部位であるミトコンドリア呼吸系の障害に起因するものであり、その結果としてATP の減少と細胞死が生じたと思われる.

前報⁹⁾ において、細胞反応液中でtBHQ-GSH 抱合体が経時的に増加することを報告した。これは、細胞内 GSH による活性中間体の解毒代謝を示している。活性 中間体による蛋白質 SH の酸化またはアルキル化は、蛋白質構造、細胞骨格の変化及び SH 基を活性中心にもつ酵素の失活を導き、細胞の生理機能に負の影響を及ぼす原因である¹¹⁾. また GSH の長期的枯渇は、化学物質由来の酸化的ストレスに対する細胞の防御能を弱め、結果的に還元型蛋白質 SH の濃度を低下させる一因でもある。本研究において、tBHQ による蛋白質 SH の減少がジクマロールで高進したことは(Fig. 1F)、1電子酸化還元系で生じるセミキノン及びスーパーオキサイドによる酸化的ストレスがこの減少に関与することを示唆するものである。

要旨

tBHQ(0.5mM)は,ラット遊離肝細胞に急性の細胞傷害を惹起した.細胞死に先行して,細胞内 ATP と GSH の枯渇,細胞膜ブレッブの形成がみられた.tBHQ の細胞毒性は DT-ジアホラーゼ阻害剤;ジクマロール(30μ M)により増強し,その毒性発現にセミキノン体及びキノン体(tBQ)の関与が示唆された.

- 1) Armstrong, K. E. and Wattenberg, L. W.: *Cancer Res.*, **45**, 1507-1510, 1985.
- 2) Morimoto, K., Tsuji, K., Iio, T., et al.: *Carcinogenesis*, **12**, 703-708, 1991.
- 3) Ito, N., Fukushima, S., Tamano, et al. : J. Natl. Cancer Inst., 77, 1261-1265, 1986.
- 4) Tsuchiya, T., Ishida, N., Miyata, A., et al.: *Toxicol*. *In Vitro*, **2**, 291-296, 1988.
- 5) Rogers, C. G., Boyers, B. G., Matula, et al.: *Mutation Res.*, **299**, 9-18, 1993.
- Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., et al. : J. Natl. Cancer Inst., 70, 343-349, 1983.

- 7) Van Esch, G.J.: Food Chem. Toxic., **24**, 1063-1065, 1986.
- 8) Moldeus, P., Hogberg, J. and Orrenius, S: Isolation and use of liver cells. *In* Fleisher, S. and Packer, L. (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 52, 60-71, 1978, Academic press, New York.
- 9) Nakagawa, N., Nakajima, K., Moore, G. and Moldeus, P. : Eur. J. Pharmacol., in press.
- 10) Jones, D. P. : J. Chromatogr., **215**, 446-449, 1980.
- 11) Albano, E., Rundgren, P. J., Harvison, S. D., et al.: *Mol. Pharmacol.*, **28**, 306-311, 1985.

- 12) Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., et al. : *Anal. Biochem.* **106**, 55-62, 1980.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, et al. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 14) Rundgren, M., Porubek, P. J., Harvison, P. J., et al.: *Mol. Pharmacol.*, **34**, 566-572, 1988.
- 15) O'Brien, P. J.: Chem.-Biol. Interact., **80**, 1-41, 1991.
- 16) Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G, et al.: *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 281-285, 1989.
- 17) Stockdale, M and Selwyn, M.J., : Eur. J. Biochem.21, 565-570, 1971.

培養細胞を用いたチアベンダゾールの チュブリンに対する影響

小 縣 昭 夫*, 佐々木 美枝子*

Effects of Thiabendazole on Tublin of BALB/3T3 Cells

AKIO OGATA*, MIEKO SASAKI*

An in vitro immunological experiment was performed using a cell culture system to investigate the effects of thiabendazole (TBZ) on tublin. A BALB/3T3 cell was cultured and treated with a medium containing $50\,\mu\mathrm{g/ml}$ TBZ and fixed in acetone for 6 and 24hr after treatment. These fixed cells were incubated for 2 hr at 37°C with monoclonal antibodies (IgM) to tublin, a component of microtubles, and then incubated with FITC labelled anti-mouse IgM. These samples were observed under a fluorescence microscope with a B exciter filter.

In untreated control cells, the specific fluorescence was observed all over the cytoplasm along with cytoskeleton structure. In the group treated with TBZ, condensation of tublin in the perikaryotic region, disarrengement of the tublin fibrils in the cytoplasm and disturbances of cell division were marked. In the group treated with TBZ for a longer time severer effects were observed. These findings suggested that microtubles were impaired by TBZ and cell division became abnormal.

This may be one of the mechanisms of teratogenicity of TBZ.

Keywords: チアベンダゾール thiadenndazole, チュブリン tublin, 培養細胞 cell culture, 蛍光抗体法 fluorescent antibody method

はじめに

これまでにチアベンダゾール(TBZ:防かび剤,駆虫薬)は妊娠マウス経口投与により胎盤を通過し,胎児に奇形を誘発させることがわかっている^{1,2)}. また生体高分子(核酸,蛋白)へのTBZの結合を調べた実験から,TBZ は核酸(DNA,RNA)には結合せず,蛋白に不可逆的結合すること,また胎児におけるTBZの蛋白結合量と骨格癒合奇形の数とが正の相関関係を示していることがわかった³⁾.

石舘は TBZ が倍数性の染色体異常を高頻度に誘発することを報告⁴⁾している. そして,この種の染色体異常はコルヒチンのような細胞分裂阻害剤で誘発されることが知られている.

細胞分裂の際に形成される紡錘体の主要な構成要素 に微小管があり、微小管は染色体の動原体と結びつい て染色体の移動に必須構造である.この微小管はチュ ブリンと呼ばれるほぼ球状の蛋白からなっているが, コルヒチンはこのチュブリンと結合して微小管への重 合を阻害することが知られている.

TBZ と同じベンズイミダゾール化合物のベノミルやチオフェネートメチルの分解産物である metyl-benzi-midazolecarbamate がチュブリンに結合するという報告⁵⁾のあることから、今回、TBZ のチュブリンに対する影響を培養細胞を用いた蛍光抗体法により検討した.

実験材料および方法

培養細胞はマウス線維芽細胞由来 BALB/3T3を用いた. 培養液はダルベッコ MEM 倍地に10%仔牛血清を加えた後, ろ過滅菌を行い, pH7.1-7.4に調整したものを用いた. 培養はティシュー・カルチャーチェンバー/スライドに 3 mlの培養液を入れ、 $5\times10^4/\text{ml}$ に調整したBALB/3T3細胞の浮遊液を加え、37% の CO_2 培養器内で24時間培養した. 培養後TBZ $50\mu_g/\text{ml}$ を加えて調整し

^{*}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

た添加培地と交換し培養を行い,経時的に培養を止め 蛍光染色を行った.

蛍光抗体法:一次抗体にはチュブリンのモノクローナル抗体(mouse IgM, Transformation Research Inc. U. S. A)を用いた。また、二次抗体として FITC 標識抗マウス IgM 抗体(Zymed Laboratory Inc. U. S. A.) を用いた.

TBZ 処理した細胞は、経時的に培地を取り除き、PBS および再蒸留水で洗浄した後、冷アセトンで7分間固定した。固定後水洗、風乾してチュブリン抗体40μ1をスライドグラス上に均一に広げ、37℃の培養器内で2時間反応させた。反応終了後、PBSで3、5、7分間振洗し細胞内に取り込まれた過剰の抗体を取り除いた。次いで、水洗を行い、乾燥後、予め蒸留水で5倍希釈したFITC標識二次抗体40μ1をスライドグラス上に均一に広げ、37℃の培養器内で1時間反応させた。反応後、スライドグラスをPBSで上記と同様に洗い、水洗、乾燥後カバーグラスをかけ、蛍光顕微鏡により観察した。陰性対照として二次抗体以降の操作を行ったものを同様に観察した。

実験結果

間接蛍光抗体法を用いての、チュブリン、すなわち 微小管に対する TBZ の影響を写真 1 に示した.

TBZ 無処置の分裂期細胞ではチュブリン蛍光が核周辺巣塊状に大きく集合して認められ、細胞の形も大きく、細胞膜辺縁は多くの偽足を延ばしており、核の存在も明瞭に認められる。これに対し、TBZ 50 µg/ml処置では、時間の経過とともにチュブリンの蛍光を発する塊は凝集して散在し、巣状を示さなかった。また細胞は小さく、偽足数も少なく、消失しているものもあり、多核細胞が多く認められた。

考 察

細胞分裂構造は細胞の分裂期に短時間のうちに構成されるが、細胞分裂の終了とともに速やかに消失し、再び次の細胞周期に出現するといった特徴を持っている。この分裂装置の主要な骨格が微小管であり、微小管の重合、脱重合がこの機能を担っている。今回の実験で得られた結果は、TBZが微小管の形成を障害していることを示していた。すなわち、チュブリンの凝集、

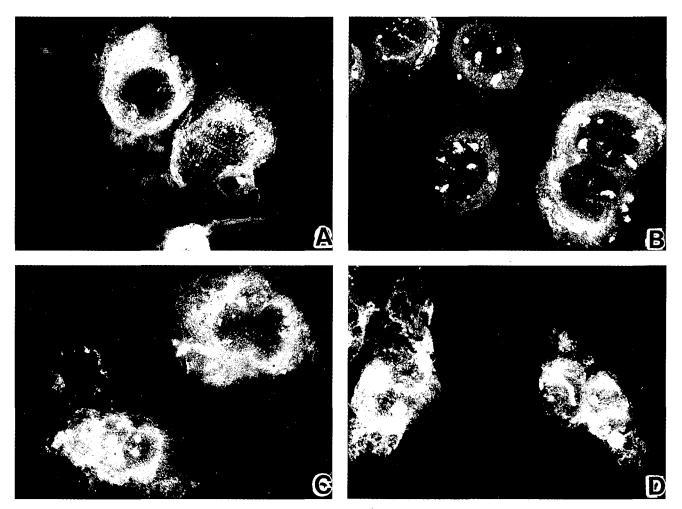
細胞骨格様のチュブリン線維の配列の乱れ,偽足の消失,多核細胞の出現は,TBZ がチュブリンに結合した結果生じた異常な形態である.このような細胞では微小管の分裂装置としての機能が充分発揮されず,死への経過をたどる可能性があると考えられる.

胎児期のような細胞増殖の活発な時期でのTBZへの 暴露はチュブリンの細胞内での正常な機能を妨げ、そ の結果細胞分裂が阻害され、細胞死を生じ、奇形を発 現させる可能性があると考えられる。

ここで選んだ50 µg/mlという TBZ の用量は, in vivo でマウスに奇形を生じる1000mg/kgの用量に相当するので, TBZ用量が培養細胞に対しては高すぎた可能性もある. TBZ 処理で見られた偽足の減少などの影響は, TBZ が微小管のみならずその他のミクロフィラメントにも結合している可能性を示唆する.

コルヒチンの妊娠動物への投与により脳に神経管閉鎖不全による奇形が見られている⁶⁾. 先にわれわれが行った in vivo および全胚培養での TBZ の胎児への影響の中に、やはり神経管閉鎖不全を示唆するものがある⁷⁾. このことは、奇形の成立過程においてTBZがコルヒチンと同様な作用機序をもっていることを推測させる.

- 1) A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and K. Hiraga: *Fd Chem. Toxic.* **22**(7), 509-520, 1984.
- 2) M. Yoneyama, A. Ogata, T. Fujii and K. Hiraga: Fd Chem. Toxic. 22(9), 731-735, 1984.
- 3) M. Yoneyama, A. Ogata and K. Hiraga: *Fd Chem. Toxic.* **23**(8), 733-736, 1985.
- 4) 石舘 基:厚生省がん研究助成金による研究報告 集(下), 培養細胞の染色体異常を指標とする癌原 性物質のスクリーニング, 750, 1976.
- 5) Davidse L. C. and Flach W. : J. Cell Biol. 72, 174-178, 1977.
- 6) Szabo K. T. and Kang J. Y.: *Teratology*, **2**, 270-278, 1969.
- 7) 小縣昭夫,安藤 弘,久保喜一:胎仔培養を用いた発生毒性試験の開発に関するシンポジウム(I) 講演要旨集,1990.東京.



Phote 1. Effects of TBZ on tublin of BALB/3T3 cells as revealed by immuno fluorescence using monoclonal antibody.

 $A : The \ specific \ fluorescence \ was \ observed \ all \ over \ the \ cytoplasm \ along \ with \ cytoskeleton \ structure \ in \ control.$

B and C: Condensation of tublin and abnormal cell division at 6th after treatment with TBZ.

D : Condensation of tublin and abnormal arrangement at 24hr after treatment with TBZ.

クロム酸カルシウムと関東ロームの混合粉体の ラットによる104週間吸入後終生飼育実験(第1報) 呼吸器系の病理組織学的観察

坂 本 義 光*,神 谷 信 行*,池 田 虎 雄*,佐々木 美枝子*

Toxicological Studies on Rats Kept for Their Life
Span after 104 Weeks Exposure to Calcium Chromate
Mixed with Kanto Loam Dust (I)
Histopathological Observations of the Lung

YOSHIMITU SAKAMOTO*, NOBUYUKI KAMIYA*
TORAO IKEDA* and MIEKO SASAKI*

Chronic inhalant toxicity, especially tumorigenesis, of calcium chromate (CaCrO₄) in the rat lung with continuous long-term exposure was studied. Male F344/DuCrj rats were exposed to the mixed dust which contained CaCrO₄ in the Kanto-loam dust at concentrations of 5 or 20% (5 % CaCrO₄ group and 20%CaCrO₄ group, respectively) and Kanto-loam dust without CaCrO₄ as negative control for 24 hr/day, 7 days/week, for 104 weeks. Aerosol concentration in the inhalation chamber of dust-exposed groups was 1.0mg/m³. Untreated control rats were kept in filterd clean air throughout the duration of the experiment. Each group consisted of 20 rats. After termination of the 104-week exposure, the surviving rats were kept for the rest of their life span in filtered clean air in the same way as the control group. The survival rates at 104 weeks were 85% and 90% in the 5% and 20% CaCrO₄ groups, respectively, 85% in the kanto-loam group and 80% in the control group. The mean life time of the rats kept for their life span after the 104-week exposure in the 5 % and 20%CaCrO₄ groups were similar to those of the control and the kanto-loam groups. The incidences of hyperplasia, adenoma and adenocarcinoma were higher in the 20% CaCrO₄ group than the control or kanto-loam groups. The incidence of adenocarcinoma were as follows: four adenocarcinomas were detected in the 20%CaCrO₄ group and one each in the 5% CaCrO₄ group and kanto-loam group. One adenocarcinoma in the 5 %CaCrO₄ and one of the four adenocarcinoma in the 20% CaCrO₄ groups showed infiltration to mediastnum and preipheral pleura. In the 20% CaCrO4 group, the incidence of tumors (9 adenoma and 4 adenocarcinoma) were significantly elevated as compared with the kanto-loam and the control group. The findings of this study are compared with the results of previous studies and the tumorigenesity of CaCrO₄ for rats that are continuously exposed for 104 weeks is discussed.

Keywords: calcium chromate, kanto-loam, rat lung, tumorigenesis, 104 weeks inhalation

緒 言

クロム酸塩製造に従事する労働者に肺癌が多発する ことが疫学的に知られている¹⁻³⁾.この原因物質として クロム酸塩製造工程で副生されるクロム酸カルシウム (CaCrO₄)など、やや難溶性の6価クロム化合物が考えられている⁴⁾. クロム酸カルシウムの腫瘍発生作用については、ラット筋、胸腔内および気管内投与実験⁵⁻⁶⁾で扁平上皮癌の発生が報告されている。しかし経気道摂

^{*}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

^{*}Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,

²⁴⁻¹ Hyakunincho 3 chome, Sinnjyuku-ku, Tokyo, 169 Japan

取による呼吸器系の腫瘍の発生を目的として行われた吸入実験では成功例は少なくマウスによる間欠吸入実験例があるのみである 7 . 著者らは $CaCrO_4$ を2,5,20%の割合で関東ローム粉体に混合し、ラットを用いた104週間連続吸入曝露を行った。その結果 $CaCrO_4$ の濃度に比例して肺に過形成および腫瘍性病変の発現率が増加することを認めた 8,9 . このうち腺癌について $CaCrO_4$ 20%群で推計学的に対照群と有意な差はなかったものの発現率が多い傾向がうかがわれた。そこで今回は $CaCrO_4$ と関東ローム粉体の104 週間曝露終了後、終生飼育を行い、 $CaCrO_4$ による腫瘍発生作用の再現性、過形成から腺腫および腺腫から腺癌の発生の可能性および腺癌の悪性度の変化などについて観察を行った。

実験材料および方法

動物 F344/DuCrj, 雄ラット, 4週令(日本チャールスリバー株式会社, 購入時体重55-65g, 出生日1987年10月21-23日)を1週間予備飼育した後, 実験に用いた. 粉体 クロム酸カルシウム(CaCrO4:関東化学株), 純度95%)は、粉末をさらにボールミルで粉砕し、45メッシュの篩を通したものを用いた. 水に対する溶解度は、 $163g/1(20^{\circ})$ で、6価クロム化合物の中ではやや難溶性である 10 。関東ローム粉体は日本粉体工業協会の、JIS試験用粉体(JIS Z8901)11種、平均粒径2 μ を使用した. 実験には、 100° 、24時間、乾熱滅菌した後使用した. 関東ロームの組成は前報 11 に示したとおりで、クロムの存在は、当部の原子吸光分析では検出限界 $^{\circ}$ 0.02ppm)以下であつた.

吸入実験. 1 群20匹を用い, $CaCrO_4$ を5,20%の割合で混合した関東ローム粉体の混合粉体曝露群(以下,各々 Ca 5%,Ca 20%群とする)と比較対照群としての関東ローム粉体曝露群,および実験室内空気のみの対照群の4群を設定して行った.実験に用いた吸入実験装置の詳細は前報¹²⁾ に示した.粉じん濃度はいずれも $1.0mg/m^3$ で,曝露期間は昼夜連続で104週間行った.吸入チャンバー内の粉じん濃度は常時デジタル粉じん計で測定し,また毎月1回ローボリュウムエアーサンプラーにより絶対量を測定した.粉じん中の $CaCrO_4$ 濃度はローボリュウムエアサンプラーにより口紙上に集めた粉じんについて蛍光X 線分析装置によって測定した.

曝露期間中の各群のチャンバー内粉じん濃度は設定 濃度 1 mg/m^3 に対して10%以内の変動巾であった.また 混合粉体群の平均 $CaCrO_4$ 濃度は,5.0%群 4.9 ± 0.4 , 20%群 $18\pm2.2\%$ であった.

チャンバー内の粉じん粒度分布はアンダーセンサン

Table 1. Particle Size Distributions in Inhalation Chamber by Andersen'n Sampler

		Dust ex	posed gro	ups .		
Samplar stage	Particle size		CaCrO ₄ ^{a)}			
Stage	3120	Kanto-loam	5 %	20%		
	(\mu)	Weight percent(%)				
0	>11.0	0.60	0	0		
1	11.0- 7.0	0.75	0.52	0.44		
2	7.0- 4.7	7.05	3.25	8.54		
3 ;	4.7- 3.3	23.60	20.85	26.01		
4	3.3- 2.1	32.97	34.91	31.37		
5	2.1- 1.1	22.98	25.49	25.65		
6	1.1- 0.65	6.83	8.01	6.54		
7	0.65-0.43	0.83	0.52	0.22		
. 8	0.43>	1.95	6.44	4.22		

a) $CaCrO_4$ was added to Kanto-loam dust at the concentration of 5.0 or 20%

プラーを用いて測定し Tabel 1 に示したように、各群 とも4.7以下が約90%、2 μ 以下のものが約40%の割合 で存在していた.

動物は吸入チャンバー内の2個のステンレス製金網ケージ(w34.5×150×h21cm)に等分して収容し、日本クレア製固形飼料CE-2およびチャンバー内自動給水ノズルにより水道水を自由に摂取させた。チャンバー内飼育条件は換気回数毎時15-16回、温度23-25 $^{\circ}$ C、湿度40-50%であった。また検知管を用いて測定した $^{\circ}$ CO₂濃度は1000-1500ppmであり、NH₃は実験期間を通して認められなかった。照明時間は実験室内と同じで午前6時より午後6時までとした。

体重は毎週1回測定し、一般状態の観察は、毎週の 体重の測定時およびチャンバー前面のガラス窓より毎 日行った.

動物は104週間曝露終了後そのまま吸入チャンバー内で、死亡または瀕死状態になるまで飼育を続けた. 曝露期間中及び終了後飼育期間中とも瀕死動物は大腿部動静脈より放血屠殺した.

推計学的処理. 増殖性病変の発現率の有意差検定は Fischer の直接確率法によった.

結 果

体重および一般状態. Table 2に示すように曝露期間中の各群の体重は各粉じん曝露群とも,実験期間を通して対照群と差がなかった. この間の体重増加推移にも特に変化はなく,また呼吸障害を思わせる特徴的な症状は認められなかった.

生存率. 曝露終了時の生存率は, 対照群16/20(80%), 関東ローム群17/20(85%), Ca-5%群17/20(85%),

0		·	Exposure time (weeks	s)	
Group -	0	26	52	88	104
Control	90±3 ^{a)} (20) ^{b)}	$391 \pm 20 (20)$	$450 \pm 26 (20)$	455±31 (20)	$445 \pm 33 (16)$
Kanto-loam	$90 \pm 3 (20)$	$388 \pm 22 (20)$	$445 \pm 22 (20)$	$451 \pm 22 (20)$	$431\pm23(17)$
CaCrO ₄ 5% ^{c)}	$91 \pm 3 (20)$	$379 \pm 15 (20)$	$434 \pm 19 (20)$	$440\pm19(20)$	$425 \pm 44 (17)$
CaCrO ₄ 20%	$89 \pm 3 (20)$	$285 \pm 12 (20)$	$449 \pm 14 (20)$	$453\pm19(20)$	$434 \pm 22 (18)$

Table 2. Mean Body Weight of Rats exposed to Kanto-loam Dust and the Mixed Dust of CaCrO₄ and Kanto-loam Dust for 104 weeks

- a) Mean body weight $\pm SA$, b)Number of surviving rats at the exposure time.
- c) CaCrO₄ was added to Kanto-loam dust at the concentration of 5.0 of 20%

Tablble 3. Mean Life Time and Mean Life Span in Surviving Rats after the Termination of 104 Week-Inhalation Exposure of Kanto-Loam Dust and the Mixed Dust of CaCrO₄ and Kanto-loam Dust.

Group	No. of rats	Mean life time (weeks)	Mean life span (weeks)		
Control	16 ^{a)}	$19 \pm 12^{\text{b}} (0,40)^{\text{c}}$	129±11 ^{d)}		
Kanto-loam	17 .	$22 \pm 17 (4,50)$	131 ± 14		
CrCaO ₄ 5% ^{e)}	17	$23 \pm 14 (2,46)$	132 ± 14		
CrCaO ₄ 20%	18	$21 \pm 12 (3,48)$	130 ± 12		

- a) Number of rats kets for life span after the termination of 104 weeks inhalation.
- b) Mean surviving time ± SD.
- c) Number in parenthese shows the shortest and longest life time in each group.
- d) Mean life span ±SD.
- e) CaCrO₄ was added to Kanto-loam dust at the concentration of 5.0 or 20%.

Ca-20%群18/20 (90%) であり、また終生飼育時の生存期間および平均寿命は、Table 3 に示すように各粉じん曝露群で対照群と差はなかった。

病理組織学的観察. 104週間曝露終了後終生飼育例に ついて観察を行った.

- 1) 非腫瘍性病変:各粉じん曝露群の全例に共通して粉じん粒子を貪食した大食細胞が肺胞内に散在または集簇巣を形成し、肺胞上皮の軽度腫大及び増生が見られた. 粉じん粒子の存在は肺内リンパ組織および縦隔リンパ節にも認められた. そのほか、局所性炎症巣、大食細胞などの崩壊残渣や粉じん粒子の混在したエオジン染色性物質の沈着が関東ロームおよび CaCrO4濃度に関係なく見られた.
- 2)腫瘍性病変:病変はいずれも細気管支から肺胞領域のいわゆる肺末梢部位に局在して見られた. 組織学的な分類は前報^{9,13,14)}に示した記載にしたがって,過形成(alveolar hyperplasia),組織学的に過形成と腺腫の中間的構造を示す過形成内腺腫(adenoma in hyperplasia),腺腫(adnoma),腺癌(carcinoma)に分類した. 過形成は肉眼的に,肺表面に白色点として見られるものもあるが,ほとんどは組織標本の検鏡によっ

てのみ認められた.組織学的には,正常の肺胞上皮細 胞に比べやや大形で好塩基性の強い核を有した細胞が 肺胞壁に沿って連続的または数珠状に配列し,隣接す る肺胞へ連続的に増生し正常組織との境界は不明瞭で あるが、肺胞構築は正常に保たれていた. 過形成内腺 腫は過形成病巣内の一部にやや異型性を有する細胞が 充実性または乳頭状に増生し、その部位では正常な肺 胞構造は認められず、過形成から腺腫への移行像のよ うに見える病変である. 腺腫及び腺癌は肉眼的には肺 表面または割面に白色、半透明円盤状の結節として見 られ、組織学的には腺腫は軽度な異型性を示す腫瘍細 胞が乳頭状または充実性に増殖を示し、病巣部分では 既存の肺胞構造は認められないが、増殖形態は全体的 に均一で、また隣接する正常組織との境界は明瞭で あった. 腫瘍細胞は主に立方状でややクロマチン顆粒 の多い円形の核と中等度の細胞質を有し、細胞境界は 不明瞭なものも多い。充実性の増殖では乳頭状に比べ 核が大きくまた細胞質も多かった。腺癌は腺腫と同様 の乳頭状、および充実性増殖に加えて、腺管様または 索状に腫瘍細胞が配列しているものも見られ、腫瘍に よってはこれらの増殖形態を異にする病巣が混在し、

組織学的に不均一で複雑な増殖態度を示した. 細胞は いずれも腺腫と比べ核形不整, 核大小不同, クロマチ ン顆粒の増加、粗大化、核小体の腫大などの異型性が 高く,分裂像も多かった. 腺腫との明らかな違いは, 増殖形態の不均一性が高いことおよび腫瘍径が大きい ことに加え、腫瘍によっては細気管支、血管壁への浸 潤,胸膜,縦隔部への転移が見られることである.以 上各病変を有するラット数(発現率%)を曝露終了時生存 例について求め、結果を Table 4 に示した. 対照群で は過形成4/16(16例中4例の意味;29%), 腺腫1/16(6%), 関東ローム群では、過形成5/17(29%)、腺癌1/17(6%) であったのに対し,Ca5%群では過形成10/17(59%),過 形成内腺腫3/17(18%), 腺腫1/17(6%), 腺癌1/17(6%), 20%群では、それぞれ12/18(67%)、4/18(22%)、5/18 (28%), 4/18(22%)であった. Ca5%群では過形成と過 形成内腺腫が、またCa20%群では各病変とも対照群, 関東ローム群に比べ発現頻度が高い傾向を示し, 腺腫 と腺癌を合計し腫瘍性病変としての発生頻度をみると 対照群に比べ推計学的に有意に高かった. Table 5に示 すように各病変の各群における発現総数は、過形成で

は CaCrO₄濃度に比例して増加し、ラット1 匹あたりで 多発化する傾向を示した.

各群で見られた腺癌のうちCa5.0%群の1例では右前葉に最大径が13mm大, Ca20%群の4例中の1例では右後葉から肺門部にかけて10mm大の結節状の腫瘍がそれぞれ存在し、さらに腫瘍組織がほぼ葉全体にわたって増殖しており、胸腔内への突出、胸膜および縦隔部への浸潤が顕著であった。関東ローム群の1例は18mmまたCa20%群の4例中2例はそれぞれ15,11mmの結節状の腫瘍であり、組織学的にいずれも一部胸腔内への小結節状の突出が見られた。Ca20%群の残り1例は6mm大の結節状の腫瘍で、今回観察した腺癌のうちで最も小さな腫瘍であったが、核の異型性が顕著であった。以上の各群の腺癌はいずれも他器官への転移は見られなかった。

考察

クロム酸カルシウム(CaCrO₄)を5及び20%の濃度で 関東ローム粉体に添加した混合粉体を104週間昼夜連続 曝露しさらに曝露終了後終生飼育したラットについて 腫瘍性病変の発現を観察した。CaCrO₄によって過形成,

Table 4. Histological Types and Incidence of Lung Proliferative Lesions in the Rats Exposed to Kanto-loam dust and the Mixed Dust of CaCrO₄ and Kanto-loam Dust for 104 weeks.

Group	dust r	No of	No. of rats with lesions					Total No.
		No. of — rasts observed	Any lesions	Focal alveolar hyperplasia	Adenoma in alveolar hyperplapia	Adenoma	Carcinoma	of Rats with Tumors
Control		16	4 (25) a)	3 (19)	0(0)	1(6)	0(0)	1(6)
Kanto-loam	1.0	17	6 (35)	5 (29)	0 (0)	0(0)	1(6)	1(6)
CaCrO ₄ 5.0% ^{b)}	1.0	17	12 (70)	10 (59)	3 (18)	1(6)	1(6)	5 (29)
CaCrO ₄ 20.0%	1.0	18	16 (89)	12 (67)	4(22)	(5(28)	4(22)	10 (56) °

- a) Number in parentheses shows parcentage.
- b) CaCrO₄ was added to Kanto-loam dust at the concentration of 5.0 or 20%.
- c) Statistically significant difference from control(p < 0.05) by Fisher's exact test.

Table 5. Total Numbers of Lung Proliferative Lesions in the Rats Exposed to Kanto-loam Dust and the Mixed Dust of CaCrO₄ and Kanto-loam Dust for 104 Weeks.

Group	Conc. of No. of dust rats mg/m³ observed	N	Total number of lesions					
		rats	Focal alveolar hyperplasia	Adenoma in alveolar hyperplasia	Adenoma	Carcinoma	Total tumors	Total lesions
Control		16	4(1.0) ^{a)}	0(0)	1(1.0)	0 (0)	1(1.0)	5(1.0)
Kanto-loam	1.0	17	5(1.0)	0(0)	0(0)	1(1.0)	1(1.0)	6(1.0)
CaCrO ₄ 5.0% b)	1.0	17	13(1.3)	3(1.0)	1(1.0)	1(1.0)	5(1.0)	18(1.0)
CaCrO ₄ 20.0%	1.0	18	20(1.7)	4(1.0)	6(1.2)	4(1.0)	14(1.1)	34(2.1)

- a) Number in parentheses; Number of lesions per a rat (Total number of lesions in observed in each groups/number of rats with each lesions shown in Table 5) parcentage.
- b) CaCrO₄ was added to Kanto-loam dust at the concentration of 5.0 or 20%.

腺腫の発現が増加し、20%群で腺癌が18例中4例に認められた. 腺癌のみの発現率では対照群と推計学的な有意性はなかったが、腺腫と腺癌を合計した腫瘍性病変として比較すると推計学的に有意性が認められた.

今回の実験と同条件で行った前実験⁹⁾では20%Ca群では16例中3例に計4個の腺癌が認められた。今回の結果は前実験の腫瘍発現率とよく一致しており、長期間連続という条件下で曝露されたCaCrO4の腫瘍発現作用は再現性があり、確かなものと思われる。

腺癌は、前実験 9 では対照群に19例中1例, $CaCrO_4$ 低濃度群には見られなかった。また今回の実験では関東ローム粉体、およびCa5%群にそれぞれ1例が認められた。前回および今回の実験で見られた $CaCrO_4$ 高濃度群の腺癌は組織学的にはこれらと同様な性状で、いずれも細気管支/肺胞領域の腺癌 (Bronchiolo/alveolo adenocarcinoma) と分類されるものと思われる。

ラット自然発生病変としての肺腫瘍は、ほとんどが、いわゆる細気管支・肺胞領域の腺腫、腺癌で、その発現率はF344、雄ラットで腺腫 $1.9\sim6.1\%$ 、腺癌 $0.9\sim1.4\%$ である $^{15-17)$. これらの発現率は他の器官の腫瘍に比べ低いが、前回 $^{9)}$ および今回の実験での結果はこれらに比べ明らかに高い発現率を示しており $CaCrO_4$ の作用が示唆される.

今回の各増殖性病変の発現率の変化はいずれも前実 験⁹⁾での各病変の発現率と同様であることから、各腫瘍 性病変はほぼ104週間の曝露期間(109週齢)にすでに発 現し、曝露終了後の飼育期間0~50週(平均20週)にはほ とんど生じていないものと思われる. CaCrO420%群で 過形成や腺腫の発現率が高いことから、腫瘍の組織発 生として腺腫が過形成から生じていることが考えられ るが、腺腫から腺癌の発生に関しては今回の結果から は明らかにできなかった. しかし CaCrO45%群の腺癌 および20%群の腺癌の1例では縦隔及び胸膜への浸潤あ るいは転移が顕著であり、そのほかの腺癌でも、最大 径が前実験で見られた腺癌では1~5mmであったのに 対して、6~18mmと大きく、さらに腫瘍組織の胸腔内 へ突出が見られたものが多かった. このことは前回の 104週間曝露終了時に腺癌と診断した腫瘍は曝露終了後 も増殖を続ける性質を有していたことを示しており, 終生飼育することにより腫瘍の性質を確かめることが できたものと思われる. また腺癌の発生にはさらに曝 露を続けることが必要であると思われる

 $CaCrO_4$ による腫瘍発生作用について比較できる実験は少ないが、Nettesheim 6^{71} はマウスを用い $CaCrO_4$ を $13mg/m^3$ の濃度で終生に亘り間欠曝露する事により対

照群に比べ 4 倍高い発現率で腺癌を含む腫瘍の発生を報告している. 他のクロム化合物を用いた長期連続という曝露条件での実験例として Glaser $6^{18)}$ の実験があるが, $Na_2Cr_2O_7$ ミスト $(Cr濃度:100 \mu g/m^3)$ の22-23時間/日,18カ月間吸入曝露によりラット19例中 3 例に腺癌を含む肺腫瘍の発生が報告されている.今回の104週間連続曝露実験での結果はこれらの結果と一致するものと思われる.

今回の実験で用いた粉体中の Cr 濃度は各々,Ca5% 群で1.6% ($17\mu g/m^3$),20%群6.6% ($66\mu g/m^3$)で,従来行われた吸入実験 $^{7.19-20)}$ に比べはるかに低かったが,前実験同様に腺癌の発生が認められた.

Heuper と Payne⁴⁾ はクロムの実験腫瘍発現に必要な要因として、クロム化合物の水または生理食塩水に対する中程度の溶解性と脂肪等と混合し徐放性にすることによる局所への長期間の接触をあげている. Kuschner ら⁶⁾ は CaCrO₄をコレステロールとの混合物として小さな金網カゴにいれ気管内に装着させることにより、気管支原性の扁平上皮癌を観察した. 著者らの実験ではクロム濃度は低かったが曝露条件を昼夜連続とすることにより、長期間接触する事と同様な効果が得られたものと思われる.

文 献

- 1) Baetjer, A. M. : A. M. A. Indust. Hyg. Occup. Med., **2**, 487-504, 1955.
- 2) Mancuso, T. F. and Hueper, W. C.: *Industr. Med. Surg.*, **20**, 358-363, 1951.
- 3) 露口 勝:肺癌, **23** (Suppl.), 235, 1983.
- 4) Heuper, W. C. and Payne, W. W.: Amer.Industr. Hyg. Assoc. J., 20, 274-280, 1959.
- 5) Heuper, W. C. : A. M. A. Arch. Indust. Health, 18, 284-291, 1958.
- 6) Kushner, M. and Laskin, S. : *Am. J. Path.*, **64**, 183-196, 1971.
- 7) Nettesheim, P., Hanna, M. G. Jr. and Doherty D. G.: J. Natl. Cancer Inst., 47, 1129-1144, 1971.
- 8) 坂本義光,神谷信行,池田虎雄,佐々木美枝子: 東京衛研年報,**38**,413-422,1987.
- 9) 坂本義光:埼玉医科大学雑誌, 20, 183-200, 1993.
- 10) 安達修一: 産業医学, 29, 17-33, 1987.
- 11) 坂本義光, 神谷信行, 池田虎雄, 平賀興吾:東京 衛研年報, **33**, 518-526, 1982.
- 12) 坂本義光,調 武久,平賀興吾:東京衛研年報, **28**-2, 135-141, 1977.
- 13) Boorman, G. A. and Eustis, S. L.: Lung, Boorman,

- G. A., Eustis, S., Elwell, M.R., Montgomery, C. A., Mackenzie, W. F., eds. : Pathology of the fischer rat, 339-367, 1990, Academic press Inc.
- Oshima, M., Ward, J. M., Singh, G. and Katyal, S.
 L.: Cancer Res., 45, 2785-2792, 1985.
- 15) Goodman, D. G., Ward, J. M., Squire R. A., Chu, K. C. and Linhart, M. S.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 48, 237-248, 1979.
- 16) Maekawa, A., Kurokawa, Y., Takahashi, M., Kokubo, T., Ogiu, T., Onodera, H., Tanigawa, H., Ohno, Y., Furukawa, F. and Hayashi, Y.: *Gann*, 74,

- 365-372, 1983.
- 17) Maita, K., Hirano, M., Harada, T., Mitumori, K., Yoshida, A., Takahashi, N., Kitagawa, T., Enomoto, A., Inui, K., and Shirasu, Y.: J. Toxicol. Sciences, 12, 111-126, 1987.
- 18) Glaser, U., Hochrainer, D., Kloppel, H. and Idiges, H.: *Toxicology*, **42**, 219-232, 1986.
- 19) Steffee, C. H. and Baetjer, A. M. : *Arch. Environ. Health* **11**, 66-75, 1965.
- 20) Baetjer, A. M., Lowney, J. F., Steffee, C. H. and Budcz, V.: *Arch. Industr. Health*, **20**, 124-135, 1959.

石綿繊維の経口摂取による生体影響(第6報*) 繊維の移行と動態

福 森 信 隆**,青 木 直 人**,佐々木 美枝子**

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (VI*) Migration and Behavior of Injected Fibers

NOBUTAKA FUKUMORI**, NAOTO AOKI**
and MIEKO SASAKI**

Migration of ingested chrysotile asbestos was studied after 1, 3, and 6 hours, and 1, and 4 days by means of a transmission electron microscope. The rat had been orally administered with a 20 mg/kg dose of UICC chrysotile fibers suspended in distilled water. The accumulation of fibers in the ashed liver and spleen increased gradually 6 hours later, and reached recovery rate values of approximately $2 \times 10^4/\text{g}$ after 4 days. The number of fibers in the blood was smaller than in the liver and the spleen. At the same time, deposition of asbestos fibers was observed using an ultrathin sectioning method. The fibers detected in the tissues were extremely few. It is assumed that asbestos fibers scarcely penetrate through the gastrointestinal wall by the protective process of mucus on mucous epithelium. In addition, the behavior of amosite asbestos, as well as chrysotile asbestos, showed a similar distribution of fibers in the digestive tract in the observation using scanning electron microscopy. The protrusive figure of amosite fibers on the surface of mucous epithelium, however, were occasionally seen.

Keywords: クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, アモサイト石綿 amosite asbestos, 経口摂取 oral ingestion, 動態 behavior, ラット消化管 rat digestive tract, 電子顕微鏡 electron microscope

緒 言

アスベストは、高濃度の職業性吸入曝露で石綿肺、肺癌、胸膜病変、悪性中皮腫等の疾患を惹起することが知られているため¹⁾、特定化学物質等障害予防規則で「特別管理物質」として規定されている。特に発病までに数十年の長い潜伏期間を経ることから、疾病との因果関係を証明することが非常に困難であった。動物を用いた吸入曝露では、肺発癌の立証が難しいため、胸腔あるいは腹腔内投与による悪性中皮腫の発生から、アスベストの毒性の強さを比較し検討されてきた。また疫学的には、アスベストに接した職歴や病変組織からのアスベスト小体の検出が疾患との関連において重要な指標である。

一方では、高濃度曝露における作業環境の集団調査

で、呼吸器系や中皮腫の疾病とともに他の消化器癌や 喉頭癌等の増加がみられ 2 、アスベストの関与が指摘された. しかし、角閃石アスベストの廃石が投棄された スペリオル湖の水 3 や、石綿セメント管の劣化により多 量のアスベスト繊維が混入している水道水を継続的に 飲用した場合の疫学調査から、アスベストと消化器癌 の発生との因果関係を明確に証明することは不可能で あった 4 . さらに実験的には、クリソタイル 5 、アモサイト及びトレモライトアスベスト 6)を終生摂食させた動 物においても、発癌の有意な増加は認められていない.

しかしながら消化器系曝露では、飲料、水道水、食物などの飲食物由来のほか、呼吸で吸入された繊維が気管の線毛の異物排除運動や咽喉部に付着した繊維を嚥下することにより、二次的に消化管に移行すること

^{*}第5報, 東京衛研年報, **43**, 209-218, 1992.

^{**}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

が知られている⁷⁾.このことを踏まえ、摂取したアスベスト繊維の消化管内での変化や動態について検索し、あわせて繊維の侵入と消化管発癌の可能性を検討する目的で基礎的研究を行った.

先にクリソタイルの胃酸に対する溶解性を調べ,一般的な消化時間内では繊維の構造や組成に顕著な変化を認めなかった⁸⁾. またクリソタイルの消化管壁での動態を走査型電子顕微鏡(走査電顕と略す)で観察したところ,粘膜上皮から突き出た繊維はほとんどみられず,直接的な上皮細胞への侵入が考えられなかったことから,回腸部のパイエル板からの繊維の侵入を示唆した⁹⁾. 本報では,これまでの走査電顕を用いた粘膜表面での繊維の観察とともに,侵入したクリソタイル繊維の組織内移行及び局在について調べた.また形状が異なるアモサイトアスベストの消化管内動態を,クリソタイルと比較した.

実験方法

1. クリソタイルの移行と局在

体重約400gの一晩絶食を行った F344/DuCrj 雄性ラットを使用し、ネンブタールで軽度に麻酔を施した後、内径1.8mmに加工した経口ゾンデを用いて強制投与を行った。クリソタイルアスベストは、UICC (Union International Contre le Cancer) の標準品 chrysotile A を用い、 0.1μ mのフィルターでろ過した精製水に分散懸濁して、20mg/kg体重の割合で投与した。投与後1、3、6時間及び1、4日後に各群5匹より血液を取り、脱血後、生理食塩水で灌流洗浄した肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。試料は完全に乾燥した後、デシケータに保管した。

乾燥した試料の0.1gを低温灰化装置(ヤマト科学, PR-302) を用いて150W 6時間の灰化を行い, 灰化が完 了していない組織に対しては更に長時間実施した. 無 機塩を溶解させるため1%エタノールを含む0.5N HCl 溶液を50ml加え、超音波で分散懸濁した.メンブラン フィルターの上に穴径0.2 µmのニュクレポアフィル ターを載せ、試料液を吸引ろ過した. その時、ろ過後 の酸を除去する目的で更に50mlの1%エタノールを加 えて洗浄した. ろ過済みのニュクレポアフィルターに 真空蒸着器(日立、HUS-5GB)で厚めにカーボン蒸着を 行ってカーボン膜を張り、フィルターの一部を切り 取った. 200メッシュのニッケルグリッド(H1タイプ) をシャーレに敷いたステンレス網の上に載せ、その上 に切り取ったフィルターを張り付けた. 5日間シャー レ内に充満したクロロホルム蒸気でニュクレポアフィ ルターを溶解させて、カーボン支持膜のみの試料を作 製した. 繊維の計測は、1985年の環境庁「アスベストモニタリングマニュアル」にもとずき、透過型電子顕微鏡(日立、H-7000、透過電顕と略す)を用いて1万倍の倍率で本数と長さ及び径を測定した. アスベスト繊維の確認は、計測時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し、クリソタイルの成分元素と比較して同定を行った.

組織内での局在を検索するために、肝臓、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節、パイエル板の組織の一部を3%パラホルムアルデヒド(0.1M 燐酸緩衝液、pH7.3)で前固定した. その後、1%オスミウム酸(0.1M 燐酸緩衝液、pH7.3)で後固定を行い、常法によりエタノール脱水し、エポン樹脂に包埋した. 超薄切は、約100nmのやや厚めの切片を作製して、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重電子染色を施し、分析用透過電顕で組成元素を確認しながら鏡検を行った.

2. アモサイトの消化管内動態

1と同様な実験条件で、20mg/kg体重の割合で UICC の amosite を完全に懸濁し、投与後1、3、6時間及び1日、4日後に各群3匹の消化管を摘出した。消化管壁の粘膜を軽く生理食塩水で洗浄して、3%パラホルムアルデヒドで前固定を行い、タンニン酸の導電染色、オスミウム酸固定を施し、前報¹⁰⁾の試料作製に従い同様な方法で走査電顕(日立、S-800)を用いて、胃及び小腸粘膜上皮でのアモサイトの動態を観察した。

実験結果

1. クリソタイルの移行と局在

灰化処理後の鏡検に際し、乾燥試料0.1g以上の量で は完全にはニュクレポアフィルターがクロロホルムに 溶解しないため、電子線の透過が少なく観察が困難で あったことから, 0.1gを適当量とした. Table.1 は, 組 織に移行した繊維数の平均値を経時的に示した.肝臓, 脾臓では、投与後1、3時間までの蓄積は認められず、 6時間後で軽度に増加した. 1日後では、肝臓に比べ 脾臓への蓄積が若干多い傾向を示した. これに対して 投与4日後では、肝臓への蓄積が増え、脾臓と比較し てやや高い値を示した. しかし、これらの組織間では 増加に顕著な差はなかった. 血液中の繊維の濃度は, 6時間後で少量みられ、その後1日、4日後と増加し たが大きな変動が認められず、肝臓や脾臓に比べて増 加は少なかった. 腎臓では、4日後までほとんど蓄積 が認められなかった. 検出された繊維は、全て単繊維 で2.5µm以下の長さであった.

組織内での繊維の存在を確認するために超薄切片を 透過電顕で観察したところ, 1 mm²の切片を 4 個載せ

Tissue 1h 3h 6h 1d 4dCont 2.1 ± 2.12 11.1 ± 3.55 10.7 ± 3.28 Blood 2.0 ± 2.04 2.2 ± 2.20 6.4 ± 4.30 Liver ND 2.1 ± 2.13 2.1 ± 2.12 9.1 ± 4.26 13.1 ± 6.45 25.4 ± 6.09 Spleen ND ND 2.0 ± 2.01 8.3 ± 3.63 19.7 ± 10.50 22.7 ± 5.35 2.2 ± 2.19 2.1 ± 2.15 6.2 ± 4.05 2.2 ± 2.21 4.3 ± 2.62 Kidney ND

Table 1. Fiber Counts of Chrysotile Asbestos by Nucleporefilter Method

Values represent the mean \pm S. E. of $\times 10^3$ fibers/g dry weight at five rats. ND: Not detectable

たグリッドにおいて、わずかに2本までの繊維しか認 められず、極めて少なかった. Fig. 1 は、組織内に沈着 していたクリソタイル繊維を示した. 左写真は、投与 4日後の肝臓の小葉間静脈の毛細血管近傍の肝実質細 胞にみられた長さ0.4 µmの繊維を強拡大した. またこ れと同様に、ディッセ腔周囲の microvilli に近接した実 質細胞の細胞質内辺縁でも、長さ0.8 µmの繊維が、管 状構造を保持したまま検出された. しかし肝臓のクッ パー星細胞では、繊維の沈着が確認できなかった。右 写真は、回腸部パイエル板のリンパ球様細胞内でみら れた0.7μmの長さを持つ繊維で、これらはEDX の分析 で Mg と Si が検出されたことから、クリソタイルと同 定された. 1本でも繊維が観察された組織は、肝臓、 パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓であり、細胞質や 微小管腔にみられた、繊維は単繊維で、長さ1 μm以下 の短い形状を呈していた。しかしながら、ほとんどの 切片で繊維の沈着が確認できず、検出されるのはまれ であった.

2. アモサイトの消化管内動態

アモサイトの形状はクリソタイルと比較して,径が 太く直線状であるため,繊維束での付着が少なかった. 繊維の消化管壁での付着量や残留様態は,クリソタイルの動態とほぼ一致していた.

投与後1時間では、胃に最も残留が多く、少量が腸管上部で認められた。前胃、腺胃とも多量のアモサイト繊維が胃壁の粘膜に付着して、一部は塊状を呈していた(Fig. 2)。また1時間では、繊維に絡み付く粘液は少なかった。前胃では付着傾向が強いのに対し、腺胃部では粘膜上皮から突き出た繊維像や胃腺が開口する胃粘膜小窩に入り込んだ繊維が比較的多くみられた。3時間後の動態は、1時間後とほとんど変化を認めないが、胃壁での付着量がやや減少する傾向を示した。大部分の繊維の外周では、粘液が付着しており、粘膜上皮からの突き出た繊維像は1時間と同様に散見された(Fig. 3)。これらの上皮細胞からの繊維の突き出た現象は、クリソタイル投与時よりもアモサイトで多く観察された。6時間では胃内の残留量が減少して、前胃

にはほとんど認められなかった. 分泌物と混在して集合する繊維や胃小窩から出ている繊維が幾らかみられた. 1日後の胃では、粘液でおおわれた太い繊維が胃腺開口部に付着して残存しているのが、散見された. 小腸では、絨毛に粘液と混在して、付着している像が多くみられ、中には絨毛から突き出ている細い繊維もみられた. パイエル板の表面に付着している繊維は、絨毛での繊維と比べ短かった. 投与後4日の胃では、アモサイト繊維の残留は認められなかった. 小腸の絨毛表面での付着は、1日後と比べ減少しており、分泌物と絡まっている繊維が多かった. パイエル板では、短い繊維が付着したり、突出した像が観察された(Fig. 4).

考 察

アスベストの経口摂取に関して、これまで多くの疫学調査や動物実験が実施されてきたが、不解明な点が多い。確かに、職業性高濃度の全身曝露では、食道、胃、結腸、直腸等の消化器癌の増加が認められるのは事実であるが、呼吸器系への曝露も受けていることから、消化器癌の発生が直ちに消化管からの摂取に起因するとは限らない。Confortiらは、サンフランシスコ市のクリソタイルが混入した給水を60年間使用した時、10%の胃癌や食道癌の増加を報告した111)。これに反して、ダルースで 65×10^6 本/100角閃石アスベストを20年間飲水した例では、消化器癌の増加がみられなかった121)。大量の繊維を摂取したにもかかわらず、発癌との明瞭な因果関係は明らかでない。

クリソタイル繊維の濃度は、血液での増加が若干早くみられたが、量的には少なかった。肝臓と脾臓では、漸次増加傾向を示し、4日後で肝臓の蓄積がやや多く認められた。1973年 Pontefract らは、2日後で血液や脾臓に、4日後で腸間膜に多量の蓄積を認め、繊維の貫通を指摘した¹³⁾.しかし肝臓を検討していないことやこの当時繊維の確認ができなかったことから充分ではない、Kaczenski らもまたクリソタイル及びクロシドライトを胃、心臓、脾臓、膵臓、血液から回収している¹⁴⁾.一方、生体内に侵入しないという報告もあるが、

多くは侵入を認めている。今回、腎臓では蓄積が認められなかった。腎臓の報告は少ないが、クリソタイルを週2回終生投与したラットの腎皮質に蓄積がみられた¹⁵⁾。今回の1回投与と終生連続して与えた時の相違は、侵入した繊維の量が異なるためと思われる。

透過電顕により観察された繊維の沈着は、大変少なく、組織の特定部位や経時変化による差はみられなかった.他の組織より、幾分肝臓で多かったが、量的に比較することは困難である.マクロファージに取り込まれた繊維は、電顕での観察がよく行われているが、生体組織での存在の形態的な証明はほとんど報告されていない.薄い切片のため、検出精度が非常に悪いと思われる.移行量と組織での沈着から考慮すると、投与した量に比べ、侵入したアスベストは極めてわずかで、大部分の繊維が消化管を単に通過して排泄されると考えられる.

組織に移行や沈着した繊維は、全て単繊維で長さ各 2.5 μm, 1 μm以下の短い形状を示した. 形態的に組 織内でアスベストの存在が確認されたことは、量的に 極めて少ないが消化管からの侵入を明らかにした. 一 方、Stanton らは、8 μm以上の長さの繊維がアスベス トの毒性を強めることを提唱している¹⁶⁾. 現在,アス ベストの毒性発現の主な原因は、繊維がマクロファー ジに取り込まれた際の膜破壊による活性酸素の増加に 起因するといわれている17). 消化管経由で生体内に侵 入する繊維は、壁での粘膜や分泌物が容易な侵入を防 ぎ、長い繊維の物理的貫通を抑制していると考えられ る. このため、侵入した繊維は全て短い長さであり、 このことは貪食機能を有するマクロファージに取り込 まれて細胞質内に入り込み、細胞からの繊維の露出が ないため、マクロファージの形質膜に障害を及ぼさな いと考える.

吸入曝露と経口摂取の侵入機序を考えた時、呼吸器は気管の線毛で体内侵入を防御しているが、細胞や膜の完全なbarrierとしての機能はない。さらに、気管を通過した繊維は、肺胞に到達した時、閉鎖された状態であり繊維の排除が困難である。短い繊維は、肺胞マクロファージに貪食され異物として気管に排出される。しかしこれに対して、長い繊維は、マクロファージに取り込まれないため排出されないで肺胞に残留する。そのためにマクロファージを刺激して、活性酸素の放出を増加させると考えられる。一方、摂取された繊維は、消化管の粘膜上皮から分泌される粘液でおおわれ単に消化管壁に付着するのみで、またbarrierとしての粘膜上皮細胞を貫通することが極めて少ないため、繊

維が容易に細胞内に侵入できない。このことは、消化管から長い繊維が侵入できず、移行には短い繊維が多かった理由と考えられる。したがって、呼吸器系でみられる長い繊維が消化管でみられる短い繊維に比べ、マクロファージ中の活性酸素の増加を多くしていると思われる。事実、Mossman らは、マクロファージが完全に貪食できない $10\,\mu$ m以上の繊維では、 $2\,\mu$ m以下の貪食できる繊維に対して、活性酸素が有意に増加していることを認めている180。このことが多量の経口摂取にもかかわらず、消化器系疾病の発症に至らない理由と推察される。

直線形状を持つアモサイトの消化管内動態は,前報¹⁰⁾のクリソタイルの場合と同様な分布を呈したが,胃や腸管壁において繊維の飛び出した突出現象が多く認められた.このことは,滅多に観察されなかったカール状を呈するクリソタイルと異なり,強く物理的な力を壁に与えていると考えられる. Storeygard らも,アモサイトで空腸粘膜に突き刺さる所見を観察しているが¹⁹⁾,発癌との関連は明らかでない. しかし,角閃石アスベストの疫学調査で,発癌の発生をみないことから,突き出た繊維が生体内に全て侵入し,疾病を引き起こすとは考えられない. 走査電顕で観察した突き出た繊維に対し,粘膜上皮下の細胞内での動態を超薄切片で確認する必要があると思われる. クリソタイルの付着がみられたパイエル板では,アモサイトも同様に付着や短い繊維の突出がみられた.

アスベストの経口摂取による毒性は、消化管壁の粘膜上皮が繊維の貫通を抑制しているため、侵入量が少なく、また繊維の長さも短いことから弱いと考えられる。このことは、アスベスト繊維の侵入について吸入曝露の呼吸器系と比較して、消化管粘膜で防御機構が強く働いていると推察される。McConnell らは、アモサイト及びトレモライトを1%の割りでラットに終生摂餌させた時、生存率や消化器癌の有意な増加を認めていない⁶⁾。さらに最近、WHO はプレスレリースにおいて、飲料水中のアスベストは健康に著しい影響を及ぼさないという考えを示した。アスベストの影響に関して、吸入曝露と経口曝露では、生体に及ぼす作用が異なると考察される。

結 語

クリソタイルのラットで経口投与による繊維の移行は、肝臓、脾臓で漸次増加し、血液では軽度にみられた. しかし腎臓での増加は、認められなかった. 透過電顕により観察された組織内繊維の沈着は、極めて少なかった. アモサイトの消化管内での繊維の動態は、

クリソタイルと同様な分布を示したが、粘膜上皮から 突き出た像が多く観察された.

文 献

- 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) Sigurdson, E. E., Levy, B. S. and Mandel, J., et al.: *Environ. Res.*, **25**, 50-61, 1981.
- 4) Marsh, G. M.: Environ. Health Perspect., **53**, 49-56, 1983.
- 5) McConnell, E. E., Shefner, A. M. and Rust, J., et al.: *Environ. Health Perspect.*, **53**, 11-25, 1983.
- 6) McConnell, E. E., Rutter, H. and Moore, J. A., et al.: *Environ. Health Perspect.*, **53**, 27-44, 1983.
- 7) Lee, D. H.: Environ. Health Perspect., 9, 113-122, 1974.
- 8) 福森信隆, 荻野周三, 中野雅行, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, **39**, 335-342, 1988.
- 9) 福森信隆, 角 千代, 佐々木美枝子:東京衛研年

- 報, 43, 209-218, 1992.
- 10) 福森信隆, 荻野周三, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **40**, 349-354, 1989.
- 11) Conforti, P. M., Kanarek, M. S. and Jackson, L. A., et al. : *J. Chronic. Dis.*, **34**, 211-224, 1981.
- 12) Masson, T. J., Mckay, F. W. and Miller, R. W. : *J. Am. Med. Assoc.*, **228**, 1019-1020, 1974.
- 13) Pontefract, R. D. and Cunningham, H. M. : *Nature*, **243**, 352-353, 1973.
- 14) Kaczenski, J. H. and Hallenback, W. H. : *Environ. Res.*, **35**, 531-551, 1984.
- 15) Patel-Mandlik, K. and Millette, J. : *Environ. Health Perspect.*, **53**, 197-200, 1983.
- 16) Stanton, M. F., Layard, M. and Tegeris, A. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 965-975, 1981.
- 17) 鏡森定信, 細田 裕:産業医学, **32**, 439-447, 1990.
- 18) Mossman, B. T., Marsh, J. P. and Shatos, M. A. : *Lab. Invest.*, **54**, 204-212, 1986.
- 19) Storeygard, A. R. and Brown, A. L. : *Mayo. Clin. Proc.*, **52**, 809-812, 1977.

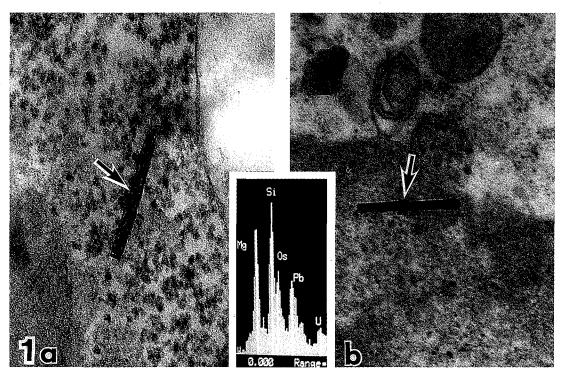


Fig.1. Transmission electron micrographs of deposited fibers (arrows) at the border of cytoplasm in liver (a) and Peyer's patch (b). EDX spectrum of fibers irradiated with electron beam was shown in the middle. Left (X94,700), Right (X45, 900)



Fig. 2. Scanning electron micrograph of the surface of mucous epithelium in rat stomach at 1 h after amosite asbestos administration. (X1,050)

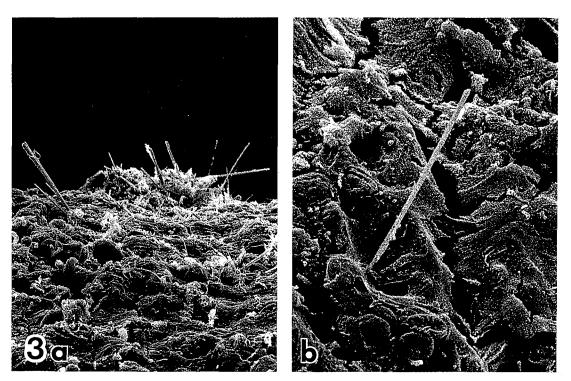


Fig. 3. Some figures of straight amosite fibers protruding from mucous epithelium of rat stomach after 1 h(a) and 3 h (b). Left (X750) Right(X1,250)



Fig.4. Peyer's patch of rat small intestine at 4 d administered with amosite asbestos. Right figure shows a high magnification of square areas in the left photograph. Adhesion of small fibers (arrows) surrounding with mucus was observed on the surface of Peyer's patch. Left (X430), Right (X2, 150)

ラット肝初代培養細胞に対する6種の化合物の毒性効果

藤 谷 和 正*, 市 川 久 次*

Toxic Effects of 6 Chemicals on Primary Cultured Rat Hepatocytes

KAZUMASA FUJITANI* and HISATUGU ICHIKAWA*

Abstract

Hepatocytes, prepared from a male F344/DuCrj (Fischer) rat at 10 weeks old using a collagenase perfusion technique and cultured for 24 hours on type-1-collagen coated dishes, were treated with medicine (Acetamidophenol), post-harvest fungicides (Imazaril, o-Hydroxydiphenyl, o-Phenylphenol sodium salt, or TBZ), or a post-harvest insecticide (Piperonyl butoxide). For each compound, the cell survival were assayed using MTT (dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium bromide), then determined the 50% viable dose (CT $_{50}$) (The viability is 50% of the viability of the control group). The cytotoxicity values were compared with oral LD $_{50}$ values reported for rats. The chemicals were separated into two groups. If the cause were known, in vivo LD $_{50}$ dose could be estimated from in vitro data. The enzyme (ALP, GOT, GPT, GTP, LDH and GLDH) leakage to the medium was also determined. GOT was induced by each chemical at higher concentrations than CT $_{50}$. The leakage of GPT, LDH and GLDH depends on the dose of each chemical.

Keywords: アセトアミドフェノール acetamidophenol, イマザリル imazaril, オルトフェニルフェノール o-hydroxydiphenyl, オルトフェニルフェノールナトリウム o-hydroxydiphenyl sodium salt, ピペロニルブトキシド piperonyl butoxide, チアベンダゾール thiabendazole, ジメチルチアゾリルジフェニルテトラゾリウムブロマイド, dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium bromide, ラット rat, 初代培養肝細胞 hepatocytes primary cultured

緒 言

前報 $^{1)}$ で、動物愛護と省資源化の目的でラット肝臓初代培養細胞を使い、アセトアミノフェン(p-acetamidophenol)とそのoおよびm 異性体の毒性を検討し報告した。このとき、細胞の生存率測定には Hayes ら $^{2)}$ の死細胞の核を trypan blue 染色してから写真撮影する方法を改変して用いたが、生存率を算出するまでに時間がかかる 難点があった。最近では 3- [4, 5-dimethyl thiazol-2-yl] -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT)を用いて細胞の生存率を迅速に測定する方法 3 が一般に用いられるようになった。

Shrivastava ら 4) は48種類の化合物についてラット初代培養肝細胞に投与した場合の50%生存濃度と、ラットあるいはマウスに経口投与した場合の LD_{50} を比較して、 $in\ vitro\ O\ LD_{50}$ から正確な $in\ vivo\ O\ LD_{50}$ を予想するこ

とができると述べている.

そこで今回,著者は6種の化合物をラット肝臓初代 培養細胞に投与して MTT 法で生存率を測定し,ラット における急性経口毒性の LD₅₀の値と比較した.合わせて,肝機能と関係の深い酵素の活性を測定した.

材料と方法

[動物]

ラットは日本チャールスリバー (株) の F344/DuCrj (Fischer) の雄 4 週令を購入飼育し, 10週令約250gで使用した.

[薬]

試薬はp-acetamidophenol (以下 PAAP と略す. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA A730-2), Imazalil (IZ, 和光純薬 098-03501 残留農薬試験用標準品), o-hydroxydiphenyl (OPP, 和光純薬 080-03901 食

^{*}東京都立衛生研究所毒性部 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

品添加物試験用標準品), 2-hydroxydiphenyl sodium salt tetrahydrate (OPPN, 東京化成 P0202), piperonyl butoxide (PiB, 和光純薬 165-10732 化学用), 2-(4-thiazolyl) -1H- benzimidazole (TBZ, 和光純薬 202-07761 食品添加物試験用標準品), dimethylsulfoxide (DMSO, 同仁化学研究所 Luminasol), insulin (Sigma Chemical Company, I 1882 Bovine Pancreas 由来 Cell Culture Reagent), dexamethasone (Sigma D 8893 Cell Culture Grade), epidermal growth factor (EGF, Collaborative Research Co., 40001 Culture Grade Mouse submaxillary glands 由来), Williams' E Medium (Sigma W 4125 Cell Culture Grade), Hepes (Sigma H 9136 Cell Culture Grade), gentamicin sulfate (Sigma G 1272 10mg/ml Cell Culture Grade), Fetal Bovine Serum (F BS, Cell Culture Laboratories, Ohio, USA 10-1010-50), collagenase (和光純薬工業 034-10533 from Clostridium histolyticum 細胞分散用), trypsin inhibitor (Sigma T 6522, Type 1-S Soybean, Cell Culture Grade), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA, Sigma E 4378), 0.4% trypan blue stain (Sigma T 8154 Cell Culture Reagent), 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-dipheny-Itetrazolium bromide (MTT, Sigma M 5655), iso-propyl alcohol (同仁化学研究所 Spectrosol), hydrochloric acid (和光純薬工業 精密分析用)を用いた. glutamic dehydrogenase (GLDH) 測定試薬については Boehringer Mannheim (Germany) 製を, alkaline phosphatase (ALP) glutamic- oxaloacetic transaminase (GOT) glutamicpyruvic transaminase (GPT) および lactate dehydrogenase (LDH) の測定試薬は第一化学薬品工業(株) 製 を使用した. その他は和光純薬工業(株)または関東化 学(株)の特級試薬を用いた.

[溶液調製]

水はMili-Q(日本ミリポア・リミテッド)で用時精製した $18M\Omega$ のものを用いた.

培地は Williams' E粉末を水に溶かし Hepes と 1 mole/1の NaOH で pH7.2に調整して保存し、これをここでは「無添加培地」と称する。 dexamethasone はエタノール,insulin は 1 m mole/1 のHCl,EGF は 1 mg/mlの albumin を含む水にそれぞれ 10^{-4} mole/1, 10^{-4} mole/1, $20 \mu g/ml$ に溶かし,用時10% (v/v) FBS- 10^{-7} mole/1 dexamethasone- 10^{-7} mole/1 insulin-20ng/ml EGF となるように培地に混ぜ,「血清ホルモン添加培地」とした.

80g/1 NaCl—4g/1 KCl—0.78g/1 NaH₂PO₄·2H₂O— 1.51g/1 Na₂HPO₄·12H₂O—23.8g/1 Hepes—0.06g/1 phenol red を潅流液の Stock Solution とした. その 100ml に glucose 0.9g, NaHCO₃ 0.35g, EGTA 0.19gを 加え, 1 mole/l の NaOH で pH 7.5にあわせ, 全量 11 にしたものを前潅流液, Stock Solution 100ml に CaCl₂ 0.555g, trypsin inhibitor 0.05g, NaHCO₃ 0.35g, collagenase 0.5gを加え pH 7.5, 全量 11 にしたものを コラゲナーゼ潅流液とした.

MTT は Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride (以下 CMF PBSと略す)にて 5 mg/mlに溶解して遮光下冷蔵保存した.

isopropyl alcohol:hydrochloric acid=500:1(V/V)に混合して acid isopropanol と称する.

投与化合物のうち IZ, OPP, PAAP, PiB, TBZ は DMSO にて, OPPN は水にて溶解希釈した.

DMSO あるいはエタノール溶液以外は $0.22 \, \mu m \, \sigma$ Sterivex-GV Bell (日本ミリポアリミテッド) で加圧濾過した.

[器材]

潅流用ポンプは Perista Pump SJ-1220(アトー(株)) の 2 段のチューブを並列につないで使用した.

ポンプのチューブおよび肝臓・肝細胞に直接触れる 器具などは滅菌したものを用い、肝臓切取り後の操作 は無菌的に行なった.

超音波破壊機は Bransonic Sonifier B12 にマイクロチップを装着して用いた.

[細胞調製]

肝細胞の分離と培養は中村ら⁵⁾の Collagenase *in situ* 潅流法に準拠し一部改変して実施した.

ラットをネンブタールで麻酔し開腹、門脈よりカニューレを入れ、37℃の前潅流液をペリスタポンプで30ml/minの速さで流し、右心房下の下大静脈から肝臓の血液を除いた後、コラゲナーゼ液に切り替え、とろけたところで肝臓を切取りシャーレに取り、クリーンベンチに移した。CMF Hanks 液を入れ、メスで細切して細胞を分散、ガーゼで濾過し、遠心 $(50\times g, 1$ min)の後、上清を除いた。さらに CMF Hanks 液を加えて遠心して上清を除くことを 3 回繰り返し、下層に血清ホルモン添加培地を加えて細胞を分散させた。その一部を取り Trypan Blue で染色し細胞数と死細胞数を調べた。

生存率80%以上の場合に以降の作業を行なった。血清ホルモン添加培地で 5×10^5 cells/ml に希釈し、4 ml づ

つディッシュにまき、37°C、5% CO_2 -30% O_2 インキュベーターで培養を開始した、細胞が伸展した後に培地を交換する事により死細胞を除いた.

[投与]

培養開始からおよそ1日後、無添加培地に化合物の DMSO 溶液(OPPN 群は水溶液)を加えた培地に交換 して投与開始とした。対照群には、無添加培地に DMSO (OPPN 群は水)を加えた培地を用いた。

[生存率測定]

MTT 溶液を、37℃に加温した無添加培地で100:1 に 希釈して「MTT 添加培地」(50 μ gMTT/ml)とした.投 与24時間後に各群 4 枚づつについて、培地を MTT 添加培地 2 ml に交換した.培養再開の60分後に acid isopropanol 4 mlを添加した.細胞をかきとり、液体と共に遠心管に移し、1000×g、+4℃、10min の条件で遠心した.上清について570nmの吸光度を測定し、細胞の生存率を算出した.

[酵素活性測定]

投与24時間後に、各群 4 枚づつのディッシュをインキュベータより取り出して+4 $\mathbb C$ で一時保存する。前項の生存率測定が終了した後、培地を回収し、 $-80\mathbb C$ で保存した。細胞は CMF PBS で洗った後、 $5\times10^{-4}\mathrm{g}$ Triton X-100/ml CMF PBS soln を 2 ml加え、パラフィルムで密封し、冷蔵保存した 6 . 翌日細胞を掻き取り、液体と共に $-80\mathbb C$ で保存した。

回収培地 (4 ml) には解凍後 10g Triton X-100/ml CMF PBS soln $\epsilon 10 \mu 1$ 添加し,掻き取り細胞には解凍後何も加えずに,マイクロチップを付けた超音波破壊機を用い,超音波出力 3 Wで20 秒間処理して均質化した。 $12000 \times g$,+4 \mathbb{C} ,10 min の条件で遠心じ,上清を-80 \mathbb{C} で保存した。

それらを解凍後,必要に応じて0.9% (w/w) 食塩水で 希釈し,日立7150型自動分析装置で ALP (ベッセイ・ローリー法),GOT (カルメン法),GPT (カルメン法),LDH 活性(ロブレスキー・ラ・デュー法),GLDH (UV 法)を測定した.

結果と考察

投与物質の濃度に対する細胞の生存率のグラフ (Fig. 1)から、対照群の生存率の50%の生存率になる投与物質の濃度 (CT_{50})を求め、ラットを用いた急性経口毒性の LD_{50} の値(文献値)と比較した ($Table\ 1$). これらの値について曲線回帰相関分析を行なったところ、2 方性を示し、全体では相関関係が認められなかった. ($Fig.\ 2$)

Shrivastava ら⁴⁾は、48種類の化学物質に付いて細胞 毒性を測定し、雌雄およびマウス・ラットの別を問わ ない動物でのLD50値(文献値)と、雄ラットから取りだ した初代培養肝細胞の50%生存濃度(Shrivastavaらの測 定値)の間に、相関があり、in vitro のデータから in vivo の LD50を推測することが出来ると述べている. これに 対し、著者の6種の化学物質を用いた実験では相関が 無く, in vitro のデータから in vivo の LD50を推測するこ とは困難であるとように見える. しかし, IZ, OPPN, PAAP および TBZ のグループ内, ならびに IZ, OPP お よび PiB のグループ内で、共に5%の危険率で有意に相 関していた(Fig. 2). 2つのグループに分かれること が多数の化合物についても不偏的であり、かつある化 合物が in vivo の実験なしでどのグループに属するかを 知ることが出来るなら, in vitro のデータから in vivo の LD50を推測することも可能であろう. 今後, グループ 間の差異を比較検討してみたい。

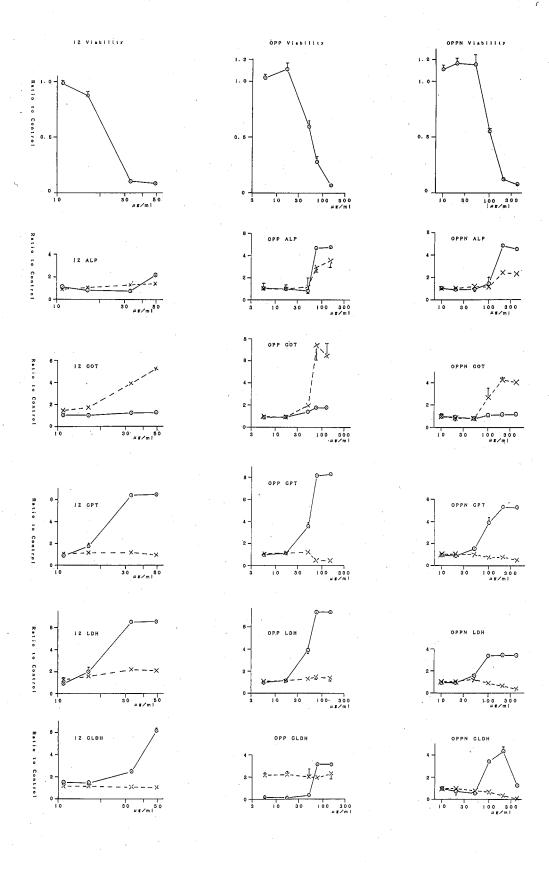
低濃度域において、細胞による MTT 還元力が大きい理由が、幸田らが述べている¹³⁾ように、細胞の巨大化によるのであると言う事は確認できなかった。今後検討したい.

ALP, GOT, GPT, LDH および GLDH の各酵素活性が 細胞から培地に漏れ出す割合は、概ね CT_{50} 付近で急上昇したが、PAAP については CT_{50} より更に高濃度側で上昇した.

全化合物の高濃度群において、GOT 活性が誘導されていたが、培地への漏洩率は対照群と大差無かった。GPT、LDH および GLDH の漏洩率は、投与濃度に依存していた。

Table 1. Comparison of 50% Cytotoxic Concentrations in Hepatocytes (CT_{50}) and Acute Oral Lethal Dose (LD_{50}) of Male Rats

	CT ₅₀			LD_{50}			
	μg/ml medium	mole/l medium	g/kg body weight	mmole/kg body weight	Rf No.		
IZ	23.0	0.0774	0.343	1.15	7)		
OPP	55.5	0.326	2.60	15.3	8)		
OPPN	108	0.409	1.096	4.15	9)		
PAAP	2860	18.9	2.20	14.6	10)		
PiB	164	0.485	8.75	25.9	11)		
TBZ	166	0.825	1.075	5.34	12)		



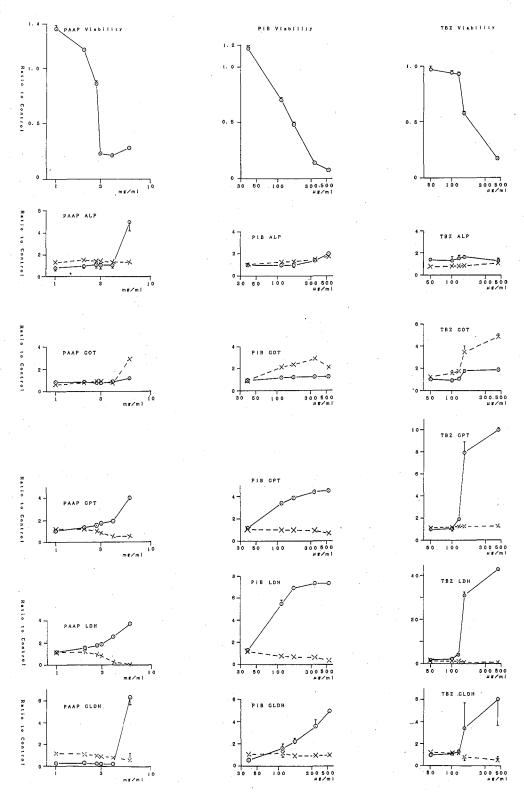


Fig. 1. Effects of Six Chemicals for rats hepatocytes cultured.

Hepatocytes prepared from each 10-weeks old (about 250g) F344/DuCrj (Fischer) male rat by collagenase perfusion technique were treated with each chemicals 24 hours. Viability of cells was determined by MTT method. The value of control = 1

Medium and scraped cells were homogenated with Sonicater and then centrifuged at $12000 \times g$, $+4^{\circ}$ C for 10 minutes, and then ALP, GOT, GPT, LDH and GLDH activities of the supernatants were determined.

————— LEAK "LEAK" means (activity in medium/activity in medium and cells)/(activity in medium/activity in medium and cells) of control.

---X--- TOTAL "TOTAL" means (activity in medium and cells)/(activity in medium and cells) of control

Each result (vertical axis) is expressed as ratio to the value of control. Each horizontal axis express the concentrations of the chemical in medium.

Results are the mean \pm SD of 4 dishes. Small SD values are not indicated.

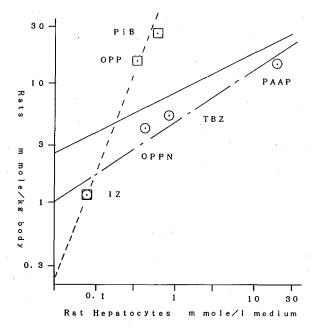


Fig.2. Non-Linear Regression $Y = A \times X^B$

	— — O - — -	🗌	-
	IZ, OPPN, PAAP, TBZ	IZ, OPP, PiB	6 chemicals
В	0.439	1.725	0.333
A	4.745	96.729	8.375
R	0.966	0.999	0.536
T	5.249	20.534	1.271
	*	*	<u> </u>

* ··· significant at P≤0.05

文 献

1) 藤谷和正, 市川久次, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **41**, 330-333, 1990.

- 2) Hayes, M. A. and Pickering, D. B.: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **80**, 345-356, 1985.
- 3) Lamb, Robert G., Borzelleca, Joseph F., Condie, Lyman W. and Gennings, Chris: *Toxicology and Applied Pharmacology*, **101**, 106-113, 1989.
- 4) Shrivastava, R., Delomenie, c., Chevalier, A., John, G. and et. al.: Cell Biology and Toxicology, 8 (2), 157-170, 1992.
- 5) 中村敏一:初代培養肝細胞実験法, 6-11,1987, 学会出版センター, 東京.
- 6) Chao, E. S., Dunbar D. and Kaminsky L. S. : Cell Biol. Toxicol., 4, 1-11, 1988.
- 7) Thienpont, D., Van Cutsem, J., Van Cauteren, H. and Marsboom, R.: *Arzneimittel Forscung*, **31 (2)**, 309-315, 1981.
- 8) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾:東京衛研年報, **31-2**, 1-6, 1980.
- 9) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾:東京衛研年報, **30-2**, 57-65, 1979.
- 10) 林田志信, 高橋 博, 平賀興吾:東京衛研年報, **30-2**, 90-92, 1979.
- 11) Sarles, Merritt P., Dove Walter E. and Moore Donald H.: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 29, 151-167, 1949.
- 12) 三栗谷久敏, 林田志信, 高橋 博, 平賀興吾:東京衛研年報, **31-2**, 20-25, 1980.
- 13) 幸田綾子, 浅野 誠, 瀬川俊章, 鈴木日出夫:日本薬学会第113年会要旨集, 122頁, 30EL 15-4.

分光測色計を用いたラットの正常皮膚色および 薬物刺激による紅斑の測定

田 山 邦 昭*, 中 川 好 男**, 青 木 直 人* 佐々木 美枝子**

Measurement of Normal Skin Color and Chemically-induced Erythema in Rat Skin Using a Spectrophotometer

KUNIAKI TAYAMA*, YOSHIO NAKAGAWA**
NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI**

Keywords:分光測色計 spectrophotometer, L*a*b*表色系 L*a*b* color space, ラット rats, 皮膚色調 skin color, 皮膚刺激試験 skin irritation tests

毒性試験領域において、これまで実験動物の皮膚やその他各種器官・組織の色調の判定は実験者独自の評価基準や色票などによる比較により行われてきた. しかしこれらは主観的要素が強く、色の表現やその判定に戸惑うことも少なくなかった.

近年,エレクトロニクスの進歩により小型で高性能の色を計る機器が開発され,昨年当研究所中央機器室にこれらの計測機器の一つである分光測色計が導入された.そこで本機器を用い実験動物の皮膚色測定への応用を試みた.測定材料には,皮膚の褐色変化に性差・系統差がみられる正常ラットの皮膚^{1,2)},および皮膚刺激性物質の貼付より紅斑を発生させたラット皮膚を用いた.

実験材料及び方法

実験動物 F344/NJic および WM/Jic ラット雌雄を日本クレア㈱より 4 週齢で入手し、10週齢で実験に用いた。6週間の順化飼育中、動物は基礎飼料(CE-2、日本クレア㈱)と細菌ろ過装置を通過した水を自由に摂取させた。

使用機器 分光測色計(CM-2022, ミノルタカメラ (株)を用い,機器の設定条件は表1に示した.色は色相 (赤,青などの色の種類),明度(明るさの度合い),彩 度(あざやかさの度合い)で表現される.これらを数値 化する方法として,現在まで種々の表色系が考案され ている。1976年に国際照明委員会(略称:CIE)で規格化された $L^*a^*b^*$ 表色系は色差をみるのに優れ、またその数値から明度や色度をイメージしやすい利点があり、現在多くの分野で汎用されている。そこで本報告では $L^*a^*b^*$ 表色系を使用した。

処置及び測定 正常皮膚色の分析:F344およびWMの雌雄各1匹をネンブタールで麻酔し,背部の被毛を物理的刺激があまり加わらないよう電気バリカン(スライブ900型,(株)夏目製作所)で注意深く剪毛した.その剪毛部の皮膚について,両系統の雌雄共に各5箇所を測定した.

紅斑の分析:WMの雌1匹をネンブタールで麻酔し、背部皮膚を剪毛後、正中線に沿って左右4箇所に硫酸水溶液を染み込ませた直径10mmの濾紙(No.63、東洋濾紙株))を貼付し、サージカルテープ(Blenderm、Medical Products Division/3 M)で固定した。硫酸水溶液の濃度は江波戸らの報告4)を参考とし、各々0%(水のみ)、4%、8%、16%で、その容量はろ紙1枚当たり0.05mlである。薬物適用18時間後テープを除去し、ろ紙を置いた4箇所の部位を測定した。

L*a*b*データの集計において、本機器は演算機能を有し、複数の測定値の自動平均化が可能であるが、 平均値しか算出できない。そこで本研究では各測定部位に対し1箇所3回の自動平均化による計測を行い、

^{*}東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

^{**}同毒性部薬理研究科

表1.機器の設定条件3)

表色計	L*a*b* L*は明度, a*, b*は色相と彩度を示す色度を表わす. L*値が大きいほど明るく, a*値の+側が赤, -側が緑, b*値の+側が黄, -側が青を示し, これらの数値の絶体値が大きいほど色が鮮やかなことを示す.
視野	2° 分光感度を示し、観察者が50cmの位置で直径1.7cmの試料を観察し、色を判定する場合に相当.
光源	D ₆₅ 紫外域を含む平均的な昼光で CIE 等の基準光.
SCI/SCE の選択	SCE のみ設定 本機器は正反射光込み(SCI:Specular Component Include)と正反射光除去(SCE:Specular Component Exclude)の両切り替え機構を持ち、試料面の違いによる正反射光の影響に対し、 使い分けが可能である.
自動平均回数	3 回/ 1 箇所
測定径	∮ 4 mm (固定)
その他	測定開口部と試料との間に介在物として,粉体カーバー用取付ガラス装着

測定5箇所の平均値±標準偏差を算出し,以下の統計 解析を行った.

統計解析 各測定値の検定には、Dunnet の多重比較 検定法を用い、正常皮膚色の分析ではF344雌を、また 紅斑の分析では0%を対照とした。これらの検定には、 当部の毒性試験システムを用いた⁵⁾.

結 果

正常皮膚色の分析

ラットの正常皮膚は写真 1 に示すように雄では WM は背部全体に褐色を示し、F344では褐色変化がわずかしかみられない。一方雌の両系統ではこれらの変化はない(詳細については既報 1,2)を参照)。これらの色調を分光測色計で測定した結果を表 2 および図 1 に示した。表 2 において対照としたF344雌に対し、WM の雄では L^* 値は小さく、また a^* 、 b^* 値は+側に移行し、大きい値となった。WM の雌ではこれらの値には差はみられなかったが、F344の雄では L^* 値が大きくなり、 a^* 、 b^* の値はやや大きい傾向を示し、さらに標準偏差も大きくなった。このように肉眼所見と測定結果はよく相関していた。図 1 - A に色度図および明度図を、図 1 - B にその分光反射率を示す (CM-2022機器付属CM-1 >

表2. ラット背部皮膚色の分光測色計による計測

系統	性	L*	a*	b*
WM	8	$60.31 \pm 1.14^{++}$	3.11±0.65 ⁺⁺	13.64±0.85 ⁺⁺
	우	68.81 ± 1.08	0.18 ± 0.41	-2.37 ± 0.60
F344	8	$69.86 \pm 1.05^+$	0.60 ± 0.84	0.28 ± 3.85
	우	68.14 ± 1.09	0.58 ± 0.64	-1.62 ± 0.46

 $^{^{+}}p<0.05$. $^{++}p<0.01$ (F344♀に対する)

フト使用). WM雄はいずれの図も他と大きくはずれており、分光反射率曲線では波長450-500nm (青色)の反射があまりみられなくなっていた.

色の知覚的相違を定量的に表すものに色差 Δ E*abがあり、 Δ E*ab は $[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ で算出される。F344雌の皮膚に対する他の皮膚の Δ E*ab

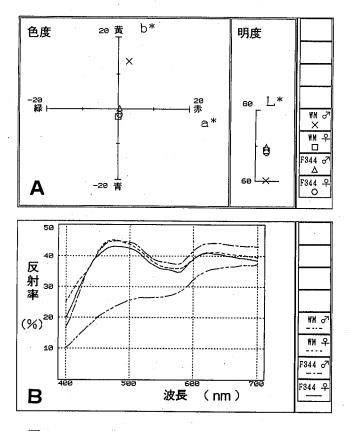


図1. ラット背部皮膚色の分光測色計による計測

- A)色度図および明度図
- B)分光反射率

を求めると、WM:雄17.31、雌1.09、F344:雄2.68となり、F344雌の皮膚色に一番近いのがWM雌で、WM雄の皮膚色が一番遠いことが数値で示された。

紅斑の分析

硫酸水溶液の刺激性試験による紅斑を写真 2 に示した。肉眼的には 0 %と 4 %とはあまり変化がみられず, 8 %と 16%ではやや赤くなった。分光測色計により赤色の程度を評価するには, $L^*a^*b^*$ 表色系のうち赤方向を示す a^* 値が重要である。図 2 に a^* 値と硫酸濃度との関係を示す。 a^* 値は硫酸濃度に依存して大きくなる傾向を示し,16%,8%では 0% (溶媒) より有意となった。

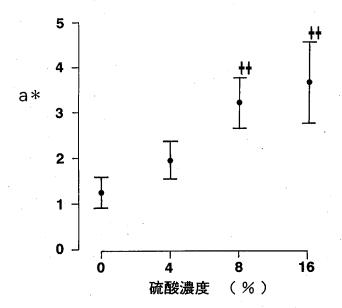


図2. ラット皮膚薬物刺激の紅斑における硫酸水溶液濃度と色度 a*値との関係 黒点は平均値,棒線は標準偏差を表す。 ++p<0.01 (0%に対する)

考 察

ラット正常背部皮膚色および硫酸水溶液刺激による 紅斑の分光測色計による測定において、いずれも肉眼 所見を良く反映する結果となり、微妙な色の違いも数 値化により客観的判定が可能となった.

OECD 等の試験法ガイドラインでは皮膚毒性試験に汎用される動物種はウサギ,モルモットで,ラットはあまり用いられていないが,経皮毒性試験ではラットの背部皮膚も使用される⁶⁾.今回ラットの正常皮膚色の測定により,性差および系統差を表色系のL*a*b*値により示したが,これら色調の相違が組織学的には表皮の肥厚と関係していることを我々は報告している²⁾.したがってラットを用いた経皮毒性試験において,雄の背部皮膚の使用にあたってはこれらのことに注意す

る必要がある.

皮膚刺激性試験ではラットは反応が鈍いとされ、ウサギを用いることが奨励されている⁷⁾. 江波戸ら⁴⁾も今回と同じ硫酸水溶液を用いたウサギによる閉塞性パッチテストで0%, 2%, 4%, 6~8%濃度で順に肉眼的に一, ±, +, +の判定をしている. 今回ラット皮膚において, 褐色変化のみられない雌でこの試験が行えないかと考えた. 予備試験において, 江波戸ら⁴⁾と同じ濃度段階では肉眼的に顕著な差はみられなっかった. そこで今回公比が一段上の16%まで設定したが, 濃度段階に依存した変化は肉眼的には不明瞭なもので, ラットでの皮膚刺激性試験の鈍さを実証するものであった. ところが分光測色計による計測では赤方向示す a*値が薬物濃度に依存した結果となった. このことは分光測色計による計測が, 肉眼的観察を補足する感度の良い手段であることを示している.

色計測機器の医学への応用としては、近年ヒトの皮膚科領域でパッチテストや色素沈着、紫外線の紅斑などの評価や治療効果などがあげられる⁸⁻¹³⁾.しかし、実験動物を対象とした報告は少ない.近年これらの計測機器は小型化し持ち運びに便利で、機器全体をカバーで被覆することも可能なため、機器の汚染防止に役立ち、動物室への持ち込みも可能となった.このために今後実験動物分野での経皮毒性試験、皮膚刺激性試験、感作試験や紫外線の作用、色素沈着作用、脱色素作用等の評価判定、また薬物に依存した動物の器官組織の色調変化などの測定に、これら装置は有用であると考えられる.我々も以前報告¹⁴⁻¹⁶⁾した色素異常物質などの皮膚毒性試験において今後役立てたい.

まとめ

分光測色計が導入されたのを機会に、ラットについて性差・系統差のみられる正常背部皮膚色および硫酸水溶液刺激による紅斑を計測した。結果は肉眼観察を裏づけるもので、微妙な色の違いも数値化により、客観的判定が可能であった。動物実験等の色の評価法としも有益であることが示された。

文 献

- 1) 田山邦昭, 志佐 湍:第41回日本実験動物学会講演要旨集, 21, 1994.
- 2) Tayama K. and Shisa H.: Laboratory Animal Science, 44, 240-244, 1994.
- 3) 色を読む話 (一色彩管理は「感覚」から「知覚」 へ一), 1-52, 1993, ミノルタカメラ, 大阪.
- 4) 江波戸舉秀, 伊藤弘一, 中村義昭, 他:東京衛研 年報, **32-1**, 94-98, 1981.

- 5) 神谷信行,中川好男,三栗谷久敏,他:東京衛研 年報,**38**,438-444,1987.
- 6) 厚生省生活衛生局企画課監修:OECD毒性試験ガイドライン,12-16,1991,薬業時報社,東京.
- 7) 厚生省生活衛生局企画課監修: OECD毒性試験ガイドライン, 27-30, 1991, 薬業時報社, 東京.
- 8) Westerhof W., van Hasselt B. A. A. M., Kammeijer A.: *Photo-dermatology*, **3**, 310-314, 1986.
- 9) Seitz J. C., Whitmore C. G.: *Dermatologica*, **177**, 70-75, 1988.
- 10) Wilheim K. P., Surber C., Maibach H.I. : Arch. Dermatol. Res., 281, 293-295, 1989.

- 11) Agner T., Serup J. : J. Invest. Dermatol., 95, 543-547, 1990.
- 12) Chardon A., Cretois I., Hourseau C.: *Int. J. Cosm. Sci.*, **13**, 191-208, 1991.
- 13) Gawkrodger D. J., McDonagh A. J. G., Wright, A. L.: Contact Dermatitis, 24, 172-177, 1991.
- 14) 田山邦昭, 井口重孝, 平賀興吾:東京衛研年報, **32-2**, 40-50, 1981.
- 15) 田山邦昭, 平賀興吾:東京衛研年報, **35**, 401-406, 1984.
- 16) 田山邦昭, 中野雅行, 佐々木美枝子:東京衛研年報, **39**, 351-356, 1988.

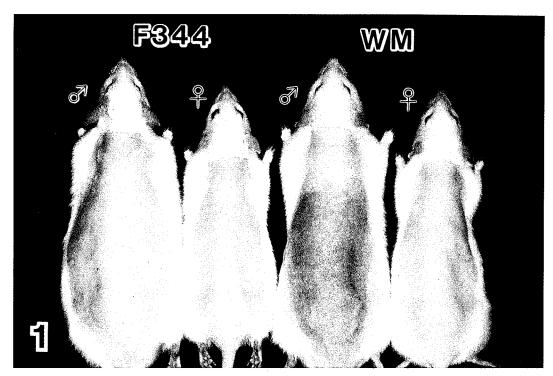


写真1. 剪毛したラット背部皮膚の外観.

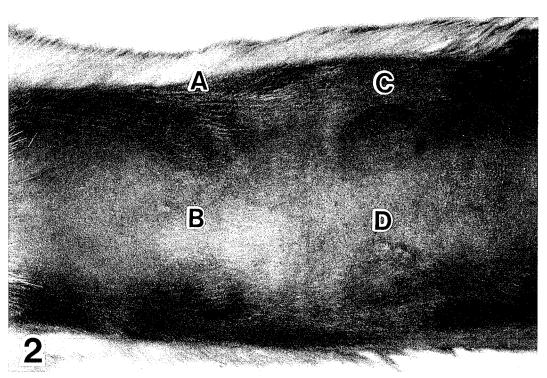


写真 2. 硫酸水溶液によるラット皮膚の紅斑. A:16%, B:8%, C:4%, D:0% (水のみ).

パーソナルコンピュータを用いた統計処理プログラムの作成

神 谷 信 行*, 坂 本 義 光**, 青 木 直 人** 佐々木 美枝子**

Personal Computer Program for Statistical Analysis

NOBUYUKI KAMIYA*, YOSIMITSU SAKAMOTO**
NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

Keywords:統計解析 statistical analysis, パーソナルコンピュータ personal computer

緒 言

毒性部では、食品添加物や医薬品等が生体にどのよ うな影響を与えるかを検討することを目的として、急 性, 亜急性, 慢性などの一般毒性試験, 催奇形性, 発 がん性などの特殊毒性試験, さらに、投与物質の生体 内運命や毒性発現機序の解明など、各種の試験、研究 が行われている. これらの試験, 研究で得られた多く のデータは、統計解析処理を行い、その結果を評価す ることとなる。著者らは既にパーソナルコンピュータ を用いた毒性試験システム¹⁻²⁾を開発し、データの解析 や,帳票の作成に利用している.しかし,このシステ ムは定型業務として行う毒性試験を想定して開発した ものであり、対照群が固定されていること、実験開始 前にスケジュールを含むプロトコールを作成する必要 があることなど、少なからぬ問題点を抱えていた. と りわけ使用できる統計学的手法が限定されていること は、研究を目的とする実験に使用する場合の大きな制 約であった、そこで、この難点を解決するために種々 の統計学的手法が容易に利用できる汎用統計処理プロ グラムを作成した.

システムの概要

1.動作機種

PC-9801, PC-9821 シリーズ(日本電気), およびその互換機で, 640KB 以上の主記憶容量をもつ機種で動作可能なプログラムとした.

2. 使用言語

プログラムの開発にはオペレーションシステム(OS) としてMS-DOS 3.3D(マイクロソフト)を、開発言語と して QickBasic Ver. 4.5(マイクロソフト)をそれぞれ用いた.

OS として MS-DOS 5.0を使用した場合の動作確認も 行った.

3. プログラムの機能

プログラムの構成を図1に示した.本プログラムでは誰でも容易に使用できるようにメニューから目的の処理を選択して実行させる方式を採用した.メニューの表示にはワープロソフトとして広く普及している「一太郎」と同様のESCキーを入力して表示させる手法を採用し、使用者の便宜を図った.また、データの入力には、Lotus 1-2-3や Multiplan のような表計算プログラムと同様な画面を使用し、セル間を自由に移動してデータの入力、修正を行えるように配慮した.

入力表選択 基本画面で表示されるメニューから新規の表,既存の表,毒性試験システムデータの選択を行う.図2~4に数値データを扱うときの画面を示した.まず,表の名称を設定し,次に,群の数と名称,各群のサンプル数,小数点以下の桁数および項目の数と名称を設定したのち,データの入力画面となる.

既存の表を選択する場合は、図5に示したように表 名の一覧が表示されるので、対象とする表を選択する.

また、毒性試験システムを利用して収集されたデータを読み込んで利用できる。図6に示したように読み込む際には試験番号、性別を指定したのち、必要とする項目のデータを指定する。

データ入力 データ入力の基本画面を図7に示した. 画面には縦に各群あたりのサンプル数に応じたサン

^{*}東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

^{**}同毒性部病理研究科

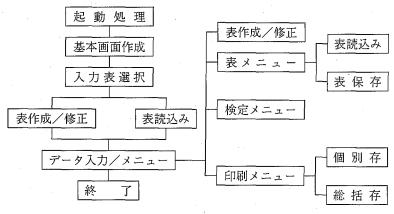


図1. プログラムの構成

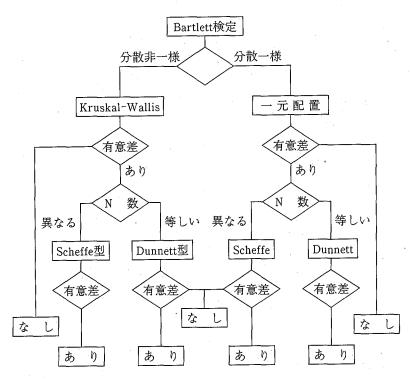


図5. 基本的な多重比較検定法

プル番号が、横には群の名称が表示された2次元の表が表示され、同様の画面が項目数分用意される。表計算ソフトと同様の入力形式を採用したため、カーソル移動キー(→、←、↑、↓)でセル間を自由に移動してデータを入力することができる。リターンキーを入力した場合のカーソルの移動方向(縦、横)もどちらかを選択できる。また、項目間は、ROLL UP、ROLL DOWN キーを使用して画面を切り替えることにより移動する。

図8に示したように、縦にサンプル番号、横に項目を表示した入力画面も用意し、データの入力をより容易にした。この場合、画面を切り替えることにより群間を移動する.

表1 プログラムで利用できる統計学的手法

- χ²-検定
- Fisher の直接確率
- Wilcoxon の順位和検定
- Mann-Whitney のU検定
- F 検定
- Student の t-検定
- Bartlett の検定
- 一元配置分散分析
- Kruskal-Wallis の検定
- Dunnett の検定
- Scheffe の検定
- Dunnett型 の検定
- Scheffe 型の検定
- Duncan の検定

検定 データの入力後、検定を行う.数値データでは2群の比較の場合はt検定が、3群以上の比較の場合には、図9に示した多重比較検定が基本の統計学的手法として適用される.他の統計学的手法を適用する場合は、オプションで選択する.頻度データの場合は、

メニューより検定を選択し、適用する手法を選択する. 本プログラムで選択できる統計学的手法を表1に示した

データ印刷 検定の手順にしたがった検定結果(図 10), 個別表(図11)および総括表(図12)を出力できる.

多重比較検定

検定方法:Bartlett 検定

危険率の表示: X2cal>=X2cal(5%)*

項 目 項目1

Grop	N	Mean	S.D	X2cal	X2cal (5 %)		
対照群	10	110.30	8.74	1.818	7.815	[]
投与群 A	8	89.88	8.37				
投与群 B	9	106.33	12.42				
投与群 C	. 10	80.50	11.76				

検定方法:一元配置分散分析

危険率の表示:Fcal>=Fcal(R%)*

項 目 項目1

要	因	平方和	自由度	分散	Fcal	Fcal(5 %)	
群	間	5680.94	3	1893.62	17.09	2.89	[*]
残	差	3657.48	33	110.83		•	•
全	体	9338.41	36				

検定方法:Scheffe の検定

危険率の表示:Fcal>=Fcal(5%)* Fcal>=Fcal(1%)**

項 目 項目1

-						
	Group	V	Fcal	Fcal (5 %)	Fcal(1 %)	
	対照群	9				
	投与群 A	7	5.58	2.89	4.44	[**]
	投与群 B	8	0.22	2.89	4.44	
	投与群 C	9	13.35	2.89	4.44	[**]

図10 検定結果出力例

項目1

No.	対照群	投与群A	投与群B	投与群C
0001	104	100	122	75
0002	105	77	131	86
0003	107	96	109	65
0004	120	95	94	78
0005	127	80	97	71
0006	99	85	104	67
0007	106	90	100	79
0008	105	96	102	100
0009	112	•	98	89 .
0010	118	•	•	95
N	(10)	(8)	(9)	(10)
Mean	110	90**	106	81**
S.D.	9	8	12	12

図11 個別表出力例

				·
Group	対照群	投与群A	投与群B	投与群C
	(10)	(8)	(9)	(10)
項目1	110 ± 9	90±8 **	106 ± 12	81±12**
•	(10)	(10)	(10)	(10)
項目2	$10.2 \!\pm\! 0.3$	10.5 ± 0.3	10.1 ± 0.2	10.5 ± 0.2
	(10)	(10)	(10)	(10)
項目3	0.39 ± 0.07	1.07 ± 0.05	0.37 ± 0.11	1.06 ± 0.06

図12 総括表出力例

おわりに

試験,研究データの解析のためにデータに応じた統計学的手法が手軽に利用できる統計処理プログラム集を作成した.

「一太郎」と同様な操作感をもつメニュー形式,表計算ソフトウェアと同じ画面を用いた入力様式,毒性試験システムデータの読み込みなど,利用者の要望を考慮するとともに,新しい統計処理プログラムが容易に追加できるようプログラム開発者にも配慮した.

今後,多くの種類のデータの解析に活用させるとと もに,今回プログラム化を見送ったその他の統計学的 手法を加えてより一層の充実を図りたいと考えている.

文 献

- 1) 神谷信行,中川好男,三栗谷久敏,市川久次, 佐々木美枝子:東京衛研年報,**38**,438-443,1987.
- 2) 神谷信行,三栗谷久敏,中川好男,中野雅行,市川久次,佐々木美枝子:東京都衛生局学会誌,79,242-243,1987.

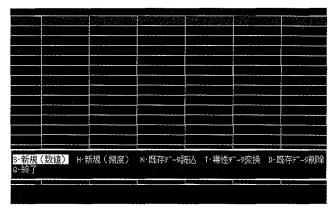


図2 基本メニュー

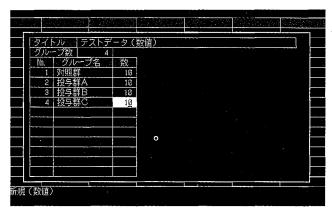


図3 投与群の設定

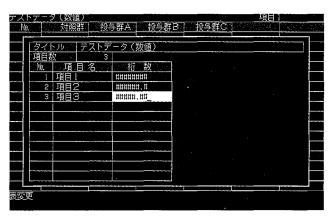


図4 項目の設定

ストデ	-夕(数値)			. /	項目	3
No.	対照群	投与群A	投与群B	投与群C	3.48F 8.818	
1	0.39	1.10	0.26	1.28		
2	0.40	1.11	0.20	1.13		
3	€.38	0.95	0.39	1.10		
4	0.51	1.07	0.43	1.03		
5	0.29	1.09	0.22	1.19		
6	0.39	1.12	0.47	1.01		
7	0.30	1.08	0.35	0.99		
8	0.36	1.07	0.50	_		
9	0.50	1.07	0.43			
10	0.39	1.05	0.50			
	تنسييا					
	1					
		. 9		1.		
データ	入力					

図5 既存データ読込み

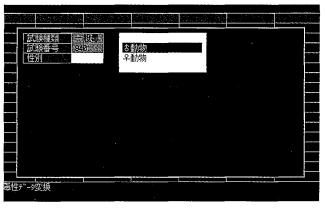


図6 毒性試験システムデータ読込み

ストデ	ータ(数値)				項目3	}
No.	対照群	投与群A	投与群B	投与群C		N. 10. 10.
1	0.39	1.10	0.26	1.08		
2	0.40	1.11	0.20	1.13		
3	0.38	0.95	0.39	1.10		
4	0.51	1.07	0.43	1.03		
5	0.29	1.09	0.22	1.19		
6	0.39	1.12	0.47	1.01		
7	0.30	1.08	0.35	0.99		
8	0.36	1.07	0.50	0.98		
9	0.50	1.07	0.43	0.91		
10	0.39	1.05	0.50	0.90		
i・データ i・検 定 i・計 算	H·立	変更 ² 均・SD []] 刷	L・読み込み G・グラフ表示 G・オプ ション	S·書き返 C·棄却物 I·項目列	間定 M·入	·提作成 、力方向 ? 了

図7 データー入力画面(1)

ストア	一夕(釵旭)			火打其Q t	#
No.	項目1	項目2	項目3	2000.085.47	
. 4	104	10.4	0.39		
2	105	10.3	0.40		
3	107	10.1	0.38		
4	120	10.1	0.51		
5	127	10.2	7.29		
8	99	9.9	0.39		
7	126	9.9	0.30		
8	125	10.1	0.36		
9	112	10.8	0.50		
10	118	10.6	0.39		
データ	入力				

図8 データー入力画面(2)

著書及び他誌発表

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

(1993.4—1994.3)

武, 甲斐 明美:**特定微生物の試験法**, 三 瀬 勝利,川村 邦夫,石関 忠一編,GMP微生物試 験法, 233-265, 1993, 講談社サンエンティフィク, 東京.

武:病原細菌の同定(Ⅱ),最新微生物同 定法, 159-195, 1993, 工業技術会, 東京.

土屋 悦輝, 矢野 一好:水質, 日本防菌防黴学会 編、環境微生物制御技術者の手引き、140-142、1993、 技報堂出版, 東京.

鎌田 国広:クロマトグラフィーほか、本橋 登、 山本 豊編著,薬学生のためのやさしい化学実験, 37-46、54-57、66-68、70-72、1993、学文社、東京、

上村 尚:カビとカビ毒,細貝祐太郎,松本昌雄 編, 見直したい食の安全性, 91-106, 1993, 女子栄養 大学出版部, 東京.

上村 尚:マイコトキシンほか、日本食品工業学 会編、食品工業総合事典、1993、光琳、東京、

永山 敏廣:アルジカルブ,エチオフェンカルブ, オキサミル、ピリミカーブ及びベンダイオカルブ試験 法,厚生省生活衛生局監修,食品衛生検査指針 追補 1,74-80,1993,日本食品衛生協会,東京.

笹野 英雄:給水衛生概論,消毒概論,新版貯水槽 の衛生管理, 1-34, 1993, (財)ビル管理教育センター, 東京.

笹野 英雄:アトラジン、飲料水中の各種化学物質 の健康影響評価, 35-55, 1994, 日本水道協会, 東京. 山田 澄夫, 太田 建爾, 尾畑 浩魅, 松下

吉川 翠:くらしの豆知識'94年版,国民生活セン ター, 230-231, 1993, 東京.

土屋 悦輝: VI理化学試験, 厚生省生活衛生局水道 環境部監修, 上水試験方法, 43-70, 325-356, 391-400, 423-425, 1993, 日本水道協会, 東京.

土屋 悦輝: **Ⅱ機器分析法ほか**, 厚生省生活衛生局 水道環境部監修,上水試験方法解説編,94-100, 114-116, 131-136, 363-425, 538-540, 1993, 日本水 道協会, 東京.

高橋 保雄:中揮発性物質 (農薬), 新しい水質環 境基準とその分析法, 305-411, 1993, 環境化学研究

古畑 勝則:上水・下水と水質汚濁防止. 日本防菌 防黴学会編,環境微生物制御技術者の手引き、74-83, 1993. 技報堂出版. 東京.

市川 久次, 植田 忠彦, 五十嵐 脩:天然型およ び非天然型α-トコフェロールのラット体内動態、ビ タミンE研究の進歩Ⅳ,51-56,1994,共立出版,東

諸角 聖:真菌の分離と同定,真菌, 三瀬 勝利, 川村 邦夫, 石関 忠一編, GMP微生物試験法, 271-284, 1993, 講談社サイエンティフィク, 東京.

他誌発表論文

新垣 正夫,伊藤 武,工藤 泰雄:Helicobacter pylori の産生するウレアーゼの細胞毒性について、 感染症学雑誌, 67, 741-746, 1993.

平田 一郎,工藤 泰雄:**1992年東京都において発生 した細菌性赤痢**,感染症学雑誌,**67**,1183-1189, 1993.

福山 正文,鈴木富美子,小林 貞男,原 元宣, 田淵 清,伊藤 武,古畑 勝則:等電点電気泳 動法(IEF)による運動性 Aeromonas 属の可溶性蛋白 分画の分析,生物物理化学,37,217-220,1993.

中村 孝一, 高橋 信一, 五十嵐秀之, 石山 業弘, 増淵 尚子, 中野 正美, 齊藤 昌三, 青柳 利雄, 山岸 郁子, 伊藤 武, 平田 一郎: *Helicobacter pylori* の酸耐性に関する検討, 感染症学雑誌, 67, 207-211, 1993.

福山 正文,中川 勝美,伊藤 武,原 元宣, 田淵 清,田口 勝久:海水魚における運動性 Aeromonas 汚染状況および分離菌株のファージ型別, 食品と微生物,10,43-46,1993.

高橋 正樹, 斉藤 香彦, 太田 建爾, 工藤 泰雄: Guillain-Barré 症候群患者における Campylobacter jejumi IgG 抗体保有状況の酵素抗体法 (ELISA)による検討, 感染症学雑誌, 68, 467-473, 1994.

柳川 義勢, 高橋 正樹, 伊藤 武 : Campy lobacter jejuni のマウス腸管定着性および培養細胞感染性における鞭毛の役割について, 日本細菌学雑誌, 49, 395-403, 1994.

Matsushita, S., Yamada, S., Kai, A. and Kudoh, Y.: Invasive strains of *Escherichia coli* belonging to serotype O121:NM, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 3034-3035, 1993.

Kato, Y., Satoh, T., Kaneuchi, C., Itoh, T. and Matsuda, M.: Differentiation of thermophilic species of

Campylobacter, in particular C. coli and C. jejuni, with a typical characteristics, by analysis of protein-banding profiles on non-denaturing polyacrylamide gels, *Microbios*, 76, 153-160, 1993.

Shingaki, M., Kai, A., Itoh, T. and Hirata, I.: Immunological specificity of *Helicobacter pylori* urease and identification by immunological detection of its specific urease, J. J A. Inf. D., 67, 1076-1082, 1993.

Takahashi, S., Igarashi, H., Ishiyama, N., Nakano, M., Ozaki, M., Ito, M., Masubuchi, N., Saito, S., Aoyagi, T., Yamagishi, I., Itoh, T., Hirata, I. and Shingaki, M.: Serial change of gastric mucosa after challenging with *Helicobacter pylori* in the cynomolgus monkey, *Zbl. Bakt.*, **280**, 51-57, 1993.

Takahashi, S., Igarashi, H., Ishiyama, N., Nakamura, K., Masubuchi, N., Ozaki, M., Saito, S., Aoyagi, T., Itoh and T., Hirata, I.: Is *Helicobacter pylori* a causal agent in gastric carcinoma?, *Zbl. Bakt.*, 280, 144-149, 1993.

Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S. and Miyatake, T.: A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure, J. Exp. Med., 178, 1771-1775, 1993.

Suzuki, M., Miura, S., Suematu, M., Fukumura, D., Suzuki, H., Kai, A. and Tsuchiya, M.: *Helicobacter pylori* elicits gastric mucosal cell damage associated with neutrophil-derived toxic oxidants, *Eur. J. Gastroen. Hepatol.*, **5**(suppl.1), S35-S39, 1993.

Yamada, S., Kai, A. and Kudoh, Y.: Serodiagnosis by passive hemagglutination test and verotoxin enzyme-linked immunosorbent assay of toxin-

producing *Escherichia coli* infections in patients with hemolytic uremic syndrome, *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 955-959, 1994.

Fujikawa, H. and Ohta, K.: Patterns of bacterial destruction in solutions by microwave irradiation, *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 389-394, 1994.

Fujikawa, H.: Diversity of the growth patterns of *Bacillus subtilis* on agar plates, *FEMS Microbiol*. *Ecol.*, **13**, 159-168, 1994.

Shibata, M., Takano, H., Hironaka, T. and Hirai, K.: **Detection of human cytomegalovirus DNA in dried new-born blood filterpaper,** *J.Viol. Methods.*, **46**, 279-285, 1993.

五十嵐英夫,大江 健二: 軟部組織の壊死性炎症を 伴う劇症型レンサ球菌感染症 (toxic shock-like syndrome) に流行の兆し,医学のあゆみ,167, 137-138,1993.

Ohkuni, H., Todome, Y., Mizuse, M., Ohtani, N., Suzuki, H., Igarashi, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Harada, K., Imada, Y., Ohkawa S. and Kotani, S.: Biologically active extracellular products of oral viridans streptococci and the aetiology of Kawasaki disease, J. Med. Microbiol., 39, 352-362, 1993.

Takada, H., Kawabata, Y., Tamura, M., Matsushita, K., Igarashi, H., Ohkuni, H., Todome, Y., Uchiyama, T. and Kotani S.: Cytokine induction by extracellular products of oral viridans group Streptococci, Infect, Immun., 61, 5252-5260, 1993.

Miwa, K., Fukuyama, M., Kunitomo, T. and Igarashi, H. Rapid assay for detection of toxic shock syndrome toxin 1 from human sera, J. Clin. Microbiol.,

32, 539-542, 1994.

大童 道治,鴨田 知博,小池 和俊,大橋 教良, 五十嵐英夫:**毒素性ショック症候群の1例**,小児科臨床,**47**,115-118,1994.

樋口 重典,栗田久多頚,布井 博幸,土屋 広幸, 岡田 稔久,吉川ひろみ,直江 弘昭,五十嵐英夫, 松田 一郎:常染色体優性遺伝を示した免疫グロブリ ン値正常な特異抗体欠乏症の1家系,小児科,34, 603-609,1993.

矢野 一好, 吉田 靖子, 新開 敬行, 太田 建爾:高度処理下水および河川水からの腸管系ウイルスの分離, 臨床とウイルス, 21, 17-21, 1993.

金 台東,本多 裕之,白神 直弘,矢野 一好, 海野 肇:活性汚泥混合液中でのウイルス感染価の 低減について,水環境学会誌,16,339-345,1993.

Hirata, T., Kawamura, K., Yano, K., Kaneko, M., Moniwa, T. and Taguchi, K.: Removal efficiencies of microorganisms in wastewater treatment processes. *Wat. Sci. Tech.*, **28**(7), 55-61, 1993.

Motohashi, N., Kamata, K. and Meyer, R.: Chromatographic techniques used to determine benz[c]-acridines in environmental samples, J. Chromatogr. 643, 1-10, 1993.

浜野 朋子,安田 一郎,高橋奈穂子,瀬戸 隆子,渡辺四男也,秋山 和幸**:漢方製剤の薬剤学的研究** (2)六味丸散剤の安定性,薬学雑誌,113,725-732,1993.

Konoshima, T., Kashiwada, Y., Takasaki, M., Kozuka, M., Yasuda, I., Cosentino, L. M. and Lee, K. H.: Cucurbitacin F derivatives, anti-HIV principles from Cowania mexicana, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4, 1323-1326, 1994.

奥本千代美,岩崎由美子,西島 基弘:**微量拡散法** による亜鉛,銅,ニッケルのシアノ錯体中のシアンの 定量,工業用水,421,31-38,1993.

Kamata, K., Takahashi, M., Terajima, K. and Nishijima, M.: Liquid chromatographic determination of carnitine by precolumn derivatization with pyrene-1-carbonyl cyanide *J. Chromatogr.* A, 667, 113-118, 1994.

Nitta, C., Hayashi, K., Ueda, T. and Igarashi, O.:Distribution of α-tocopherol stereoisomers in rats, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(8), 1406-1407, 1993.

鈴木 助治, 雨宮 敬, 伊藤 弘一, 中村 弘: **注入口熱分解ガスクロマト**グラフィーによる**化粧品中 の塩化アルキルトリメチルアンモニウムの定量**, 衛生 化学, **40**, 144-153, 1944.

種村 高一, 白坂 昭治, 足立 吉数, 松沢 安夫, 梅木富士郎, 武石 昌敬:**乳用山羊牧場における疾病** の発生調査, 家畜衛生研究会報, **37**, 7-11, 1993.

吉田 正明,梅木富士郎,武石 昌敬:**乳牛の分房 乳から分離した菌種及びその薬剤耐性菌の検出率の比較**,家畜診療,**363**,29-33,1993.

Umeki, F., Otsuka, G., Yosai, A., Seki, M., Yoshida, M., Takeishi, M., Kozaki, K. and Kozaki, R.: Evaluation of biological character and pathogenicity of Staphylococcus aureus isolated from healthy persons, patients, poisoned food and cows, Milchwissenschaft, 48, 552-555, 1993.

Kabasawa, Y. and Takeba, K.: Purification of 2,2'-di-hydroxy-3,3',5,5',6-pentachlorobenzanilide by counter alternative current chromatography, *Analytical Sciences*, 9, 875-876, 1993.

Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., Kaneko, S. and Sasakawa, C.: PCR-based random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and its practical applications, *J. Clin. Microbiol.*, 32, 65-69, 1994.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S., Tsubokura, M., Takeda, N., Hongo, T. and Shubin, F. N.: Restriction endonuclease analysis of virulence plasmids for epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* infections, *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1410-1413, 1994.

福山 正文,渡辺 和郎,神崎 政子,原 元宣, 田淵 清:市販食肉における豚丹毒菌の汚染状況お よび分離菌株の血清型別,食品と微生物,**9**,235-238, 1993.

石崎 直人, 金子 誠二, 伊藤 武: PATH-STIK Rapid Salmonella Test による鶏鳥肉からのサルモネラ迅速検査法の検討, 食品と微生物, 10, 95-100, 1993.

小野 一男,島田 邦夫,柳田潤一郎,細田 康彦,仲西 寿男,貫野 正文,飯田 孝:流通過程における食肉のリステリア汚染状況,食品と微生物,10,139-146,1994.

橋本 常生,宮崎 奉之,伊藤 武,松本 昌雄, 丸山 務,中澤 裕之:エンザイムイムノアッセイ (EIA)による牛肉中プロゲステロンの測定,食品衛生 学雑誌,34,211-215,1993. 神保 勝彦, 片岡 潤, 門間 千枝, 伊藤 武, 丸山 務, 松本 昌雄:東京都内市販畜水産食品中 の抗菌性物質残留実態調査, 食品衛生学雑誌, 35, 210-214, 1994.

Ryu, J.-C., Song, Y.-S., Park, J., Chang, J.-S. and Jinbo, S.: A study on the determination of residual antibiotics and synthetic antibacterial agents in meat (I) Microbiological assay, Kor. J. Food Hygiene, 8, 1-8, 1993.

Horii, S.: Liquid chromatographic determination of oxytetracycline and chlortetracycline residues in animal tissues, *J. Liquid Chromatogr.*, 17, 213-221, 1994.

橋崎 文雄, 田坂 清, 平松 廣, 七里 茂美, 矢部 和子, 神崎 政子: **多摩動物公園のチンパンジ** ー**に発生した Yersinia pseudotuberculosis 感染症,** 動物園水族館雑誌, **34**, 71-79, 1993.

水谷 浩志, 佐藤 博行, 鈴木 輝康, 飯田 孝, 丸山 務: 枝肉における *Listeria monocytogenes* の汚染実態とその汚染源, 日獣会誌, **46**, 343-346, 1993.

加藤 行男, 土肥富有子, 金子 誠二, 党征 志郎, 藤田 雅弘, 石橋 正彦, 金内 長司:東京都内のビ ルに生息するネズミにおける *Yersinia* 属菌の保有状 況, 日獣会誌, **46**, 1047-1050, 1993.

宮尾 陽子, 吉原 雅子, 鈴木 輝康, 白石 義明, 尾崎 正美, 木下 正彦, 甲斐 明美, 金子 誠二, 尾畑 浩魅, 伊藤 武:牛の糞便と枝肉および食肉 市場の施設環境におけるべ口毒素産生性大腸菌の調査, 日獣会誌, 47, 288-292, 1994.

Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Hashimoto, H. and

Tamura, Y.: Degradation of aflatoxins by food additives, Journal of Food Protection, 57, 42-47, 1994.

守安 貴子, 斉藤 和夫, 中里 光男, 石川ふさ子, 藤沼 賢司, 二島太一郎:食品中のアセスルファムK, サッカリン及びアスパルテームの含有量, 食品衛生学 雑誌, **34**, 277-282, 1993.

中里 光男,斉藤 和夫,石川ふさ子,藤沼 賢司,守安 貴子,二島太一郎:**高速液体クロマト**グラフィーによる食品中のサイクラミン酸の分析,食品衛生学雑誌,34,248-253,1993.

永山 敏廣**: 輸入野菜類中の農薬について**,月刊食品流通技術,**23**,16-21,1994.

広門 雅子,平田 恵子,植松 洋子,鳩岡 友紀, 風間 成孔:**食品製造用β-アミラーゼ及び**グルコア ミラーゼの活性測定法,食品衛生学雑誌,**35**,28-33, 1994.

Nishimune, T., Sumimoto, T., Konishi, Y., Yakushiji, T., Komachi, Y., Mitsuhashi, Y., Nakayama, I., Okazaki, K., Tsuda, T., Ichihashi, A., Adachi, T., Imanaka, M., Kirigaya, T., Ushio, H., Kasuga, Y., Saeki, K., Yamamoto, Y., Ichikawa, T., Nakahara, S. and Oda, S.: Dietary fiber intake of Japanese younger generations and the recommended daily allowance, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 39, 263-278, 1993.

Suzuki, T., Kanoh, T., Kanbayashi, M., Todome, Y. and Ohkuni, H.: The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice, *Jpn. J. Allergiol.*, **42**, 963-968, 1993.

瀬戸 博, 鈴木 孝人:ディーゼル排ガスばく露 の生化学的健康影響指標, 資源環境対策, **29**(12), 25-30, 1993. Seto, H., Ohkubo, T., Kanoh, T., Koike, M., Nakamura, K. and Kawahara, Y.: **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the lung**, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **24**, 498-503, 1993.

Makino, K.: **Weather/season and death**, Asian Medical Journal, **36**, 580-587, 1993.

吉川 翠:家屋内生息性ダニ類の生態および防除に関する研究(4), 家屋害虫, 15, 21-23, 1993.

吉川 翠:家屋内生息性ダニ類の生態および防除 に関する研究 (5), 家屋害虫, 15, 108-117, 1993.

内海 英雄,安藤 正典,土屋 悦輝:**細胞毒性試験による水質評価**,用水と廃水,**36**,303-310,1993.

渡辺真利代,原田 健一:**有毒アオコ――その生物学的,化学的特性――**,陸水学雑誌,**54**,225-243,1993.

古畑 勝則,小池 和子:飲料用タンク水から分離 された Methylobacterium 属菌の性状と塩素抵抗性, 日本公衆衛生雑誌,40,1047-1053,1993.

Oishi, S.: Strain differences in susceptibility to di-2-ethylhexyl phthalate-induced testicular atrophy in mice, *Toxicology Letters*, 66, 47-52, 1993.

Nakagawa, Y., Tayama, S., Moore, G. and Moldeus, P.: Cytotoxicity effects of biphenyl and hydroxy-biphenyls on isolated rat hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, **45**, 1959-1965, 1993.

Fujitani, T.: Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice, Toxicology Letters,

69, 171-179, 1993.

Tanaka, T.: Reproductive and neurobehavioral effects of amaranth administered to mice in drinking water, Toxicology and Industrial Health, 9, 1027-1035, 1993.

Tanaka, T.: **Behavioral effects of piperonyl butoxide in male mice**, *Toxicology Letters*, **69**, 155-161, 1993.

Takahashi, O.: A large dose of ergocalciferol does not cause defficient blood coagulation but is extremely toxic to rats, *Toxicology Letters*, 69, 257-272, 1993.

Nagai, F., Ushiyama, K. and Kano, I.: **DNA cleavage by metabolites of butylated hydroxytoluene**, *Archives of Toxicology*, **67**, 552-557, 1993.

Fujitani, T., Tanaka, T., Hashimoto, Y. and Yoneyama, M.: Subacute toxicity of piperonyl butoxide in ICR mice, *Toxicology*, 83, 93-100, 1993.

Cornu, M.C., Moore, G.A., Y. Nakagawa, N. and Moldeus, P.: Ascorbic acid uptake by isolated rat hepatocytes: stimulatory effect of diquat, redox cycling compound, Biochemical Pharmacology, 46, 1333-1338, 1993.

Suzuki, H. and Suzuki, N.: Detection of K-ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell, Biochem. Biophys. Res. Comm., 196, 956-961, 1993.

Fujitani, T., Tada, Y. and Yoneyama, M.: Hepato-

toxicity of piperonyl butoxide in male F₃₄₄ rats, *Toxicology*, **84**, 171-183, 1993.

Tanaka, T.: Reproductive and neurobehavioral effects of phloxine administered to mice, Food and Chemical Toxicology, 31, 1013-1018, 1993.

Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T. and Yoneyama, M.: Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in F₃₄₄ rats: Induction of hepatocellular carcinoma, Fundamental and Applied Toxicology, 22, 293-303, 1994.

坂本 義光: クロム鉱さい粉じんの長期吸入曝露に よるラット肺腫瘍についての病理学的研究, 埼玉医科 大学雑誌, **20**, 183-200, 1993.

Nemoto, J., Ohno, N., Saito, K., Adachi, Y. and Yadomae, T.: Expression of interleukin 1 family mRNAs by a highly branched $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-Glucan, OL-2, Biol. Pharm. Bull., 16, 1046-1050, 1993.

大橋 則雄, 土屋 悦輝, 笹野 英雄, 濱田 昭: 水中における農薬とオゾンの反応とその分解生成物, 衛生化学, **39**, 522-533, 1993.

Suzuki, I., Kumiko, Y. and Kano, I.: Screening methods for asulam, oxine-copper and thiram in water by high-performance liquid chromatography after enrichment with a minicolumn, J. Chromatogr., 643, 173-179, 1993.

Suzuki, T., Kumiko, Y., Ohnishi, K. and Yamagishi, T.: Determination of pesticide in water by capillary gas chromatography with splitless injection of large sample volumes, J. Chromatogr., 663, 139-146, 1994.

近藤治美, 鈴木俊也, 矢口久美子, 大西和夫:**多摩** 地区地下水中の揮発性有機塩素化合物汚染に関する調 査, 環境化学, **4**(1), 65-72, 1994.

総説・解説

甲斐 明美:食品からの食中毒原因菌の検出方法と 検査材料の採取方法,日本医事新報,No.3605, 120-121,1993.

工藤 泰雄: **気をつけたい病原性大腸菌――ベロ毒素産生性大腸菌をめぐって**,学校給食広報,**No.517** (**6月号**),5-7,1993.

甲斐 明美,工藤 泰雄:けん**さ質問箱,病原大腸菌の同定法**,検査と技術,**21**,631-634,1993.

工藤 泰雄, 山田 澄夫:**最近のコレラ事情**, モダンメディア, **39**, 531-546, 1993.

伊藤 武:サルモネラ検査, 食品と微生物, 9, 217-226, 1993.

伊藤 武:**食品中で産生する細菌の毒**,月刊フードケミカル,**1993-1**,93-100,1993.

伊藤 武:ベロ毒素産生性大腸菌と食品衛生,モダンメディア,**39**, 307-322, 1993.

草野 友子, 甲斐 明美, 宮尾 陽子, 伊藤 武: 成牛の糞便, 枝肉および食肉処理施設における Vero 細胞毒素産生性大腸菌の実態調査, モダンメディア, 39, 351-355, 1993.

伊藤 武、平田 一郎:Helicobactor pyloriの

細菌学的特徵, MB Gastro., 3, 11-18, 1993.

増淵 尚子, 高橋 信一, 中野 正美, 五十嵐秀之, 斉藤 昌三, 青柳 利雄, 伊藤 武, 平田 一郎: *Helicobactor pylori* の動物感染実験モデル, カニクイザルの感染実験, 日本臨床, **51**, 3127-3131, 1993.

高橋 信一,五十嵐秀之,中村 孝一,増淵 尚子, 斉藤 昌三,青柳 利雄,伊藤 武,平田 一郎: *Helicobactor pylori* 産生ウレアーゼの病因的意義, 特にウレアーゼ陽性株とウレアーゼ陰性株の比較,日 本臨床,**51**,3149-3153,1993.

高橋 信一,五十嵐秀之,増淵 尚子,石山 業弘, 斉藤 昌三,青柳 利雄,伊藤 武,平田 一郎: **萎縮性胃炎の進展と** *Helicobactor pylori*, *H. pylori* 抗体価と血清ペプシノゲン,日本臨床, **51**, 3231-3235, 1993.

工藤 泰雄:最近のわが国における細菌性食中毒の 発生動向, モダンメディア, **40**, 115-125, 1994.

五十嵐英夫: MRSA とは:皮膚と美容, 25, 2-5, 1993.

五十嵐英夫: MRSA の疫学マーカーとしてのコア グラーゼ型, 医学のあゆみ, 166, 274-278, 1993.

五十嵐英夫: MRSA のエンテロトキシンおよび toxic shock syndrome toxin-1 産生性, 医学のあゆ み, 166, 279-284, 1993.

五十嵐英夫: ブドウ球菌エンテロトキシン検査, 食品と微生物, **9**, 227-233, 1993.

五十嵐英夫:東京都におけるブドウ球菌食中毒発生

の最近の動向について, 食品衛生研究, **43**, 31-45, 1993.

五十嵐英夫: TSST-1 (Toxic shock syndrome toxin-one), 侵襲と免疫, 3, 3-10, 1994.

矢野 一好:**水中ウイルスの衛生学的問題点と検出 法**, 衛生化学, **39**, 381-394, 1993.

矢野 一好: **水環境におけるウイルスの実態と水処理**, 水道協会雑誌, **62**, 15-21, 1993.

小久保彌太郎:リステリアの食品汚染状況, 食品衛生学雑誌, **34**, 340-342, 1993.

仲真 晶子**:食品媒介リステリア症と乳,乳製品汚染**,乳技協資料,**43**,29-40,1993.

竹葉 和江, 岡 尚男, 中澤 裕之:動物性食品 中の寄生虫駆除剤の分析, 月刊フードケミカル, 1993-9, 98-107, 1993.

宮崎 奉之,橋本 常生:肥育用ホルモン剤の分析 法,月刊フードケミカル,1993-10,94-102,1993.

金子 誠二:エルシニア属菌のプラスミドに支配される病原因子,生物科学,45,132-139,1993.

上村 尚:**食品のカビ毒除去に関する最近の知見**, 食品と微生物, **10**, 21-27, 1993.

永山 敏廣:**輸入加工食品中の農薬残留実態**, 医学のあゆみ, **165**, 862, 1993.

瀬戸 博:東京湾の化学物質汚染は改善されたか、 都薬雑誌, **16**(4), 55-60, 1994.

笹野 英雄:**水質改善に関する情報の提供**,都薬雑 誌. **15**(5). 48-52. 1993.

吉川 翠:**ダニ**, ランダムハウス英和大事典第 2 版**全 1 巻**, 3200, 1993, 小学館.

吉川 翠:**PCO としてのダニ防除**, ワープ, **17** (2), 3-7, 1993.

吉川 翠:**ダニ忌避剤の畳への利用法**, 東京ペストコントロール, **24**, 18-24, 1993.

吉川 翠:**住まいの衛生管理と健康対策**,ファーマウィーク,**7617**, 8-9, 1994.

吉川 翠, 佐藤 泰仁:**電気カーペットによるダ 二処理機能効果判定**, 環境管理技術, **11**, 37-43, 1993.

古畑 勝則:飲料用タンク水から高頻度に分離され た耐塩素性メチロバクテリウム属菌について、環境管 理技術、11, 18-25, 1993.

古畑 勝則:水道水の大腸菌群試験方法として新た に採用された特定酵素基質培地法について,防菌防黴, 22,109-116,1994.

佐々木美枝子**: 毒性学――現状と将来**,日本臨床歯内療法学雑誌**, 14**(2), 20-27, 1993.

青木 直人:**癌抑制遺伝子――現状とその展望――**, リリーデイト, **2**, 21-22, 1994. 青木 直人:ウイルスと発癌,検査と技術, 22,227-230,1994.

斉藤 和夫:**最近問題となった輸入食品**について、 都薬雑誌、**16**(3)、49-54、1994、

諸角 聖, 上村 尚, 田端 節子, 和宇慶朝昭: 市販食品におけるカビおよびマイコトキシン汚染, マ イコトキシン, **37**, 7-12, 1993.

平田 一郎, 伊藤 武, 増渕 尚子, 高橋 信一: **Helicobacter pylori** の生検材料よりの分離, 同定お よび定量培養、日本臨牀, **51**、3231-3235, 1993.

諸角 聖:**食品工場における防カビ対策**, ジャパンフードサイエンス, **33**(4), 51-57, 1994.

潮田 弘:**米飯・弁当・そう菜類の細菌汚染の実態**, 食品加工技術, **14**, 117-124, 1994.

行政報告等

倉科 周介:食品検査情報のネットワーク化に関する研究,平成5年度厚生科学研究費補助金事業実績報告書,1994,厚生省.

矢野 一好:**雑用水の用途拡大と課題**,(社)空気調和・衛生工学会,給水水質設計小委員会報告書,321-349,1994.

小野 伸好,野口 有三,松山 雅子,秋吉 京子,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 幸夫,小野 哲郎,大友 信也,森下 高行,小林 慎一,三宅 恭司,石原 佑弌,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,

太田 建爾,三木 隆,大竹 徹,森 治代,森本 素子,上羽 昇,千々和勝巳,甲斐麻美子,高橋 克巳,三瀬 勝利,牛島 廣治,清水 博之,国貞 孝夫,山崎 修道:エイズ医薬品候補スクリーニング研究Ⅳ. 1991年度報告,衛生試験所報告,111,100-102,1993.

三木 隆, 関根 大正, 貞升 健志, 大貫奈穂美, 太田 建爾, 寺山 武: HIV 抗体陽性者における HIV-1 provirus genome の nested-PCR 法による検 出. 平成 4 年度東京都エイズ研究班報告書, 1993.

関根 大正:東京地区における HIV 感染の遺伝子 血清疫学的研究. 平成 4 年度厚生省 HIV 疫学研究班報 告書, 1993.

石井 明子,稲垣 智一,中村 清純,安川 信,川野由紀子,武田 浩,矢内真理子,中村 安秀,前田 秀雄,本保善樹,斎藤 剛,佐藤 文宣,寺田 勇人,長岡 常雄,吉岡 毅,大黒 寛,山口 一郎,前田 右子,深沢 啓治,関根 大正,尾崎 米厚,佐田 文宏:マスメディアを用いたエイズ対策キャンペーン効果の評価に関する研究. 平成4年度厚生省 HIV 疫学研究班報告書,1993.

木嶋 敬二,山越 葉子,中村 弘,鈴木 助治,藤山 善雄:新配合香粧品の品質確保に関する研究, 平成4年度厚生科学研究補助金事業実績報告書,1993,厚生省.

小嶋 茂雄,木嶋 敬二,鈴木 助治,西島 靖: 化粧品用界面活性剤・油脂等の規格整備に関する研究, 平成4年度厚生科学研究補助金事業実績報告書,1993, 厚生省.

吉川 翠:ニュータイプ商品(布団乾燥機,電気カーペット,電気掃除機)の表示・機能評価試験報告書,165,1993,東京都生活文化局適正表示課.

森田 昌敏, 吉永 淳, 伊藤 裕康, 白石 寛明, 高橋 保雄, 福島 実, 昆野 信, 日野 隆信, 服部 幸和:水質分析方法検討試験 (環境基準追加項 目の測定方法に関する検討調査), 平成5年度環境庁 委託業務結果報告書, 1994, 環境庁水質保全局.

坂本 朋子,鈴木 秀雄,土屋 悦輝:東京都にお ける放射能調査,第35回環境放射能調査研究成果論文 抄録集(平成4年度),1993,科学技術庁.

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1993.4—1994.3)

学 会 発 表

楠 淳, 甲斐 明美, 尾畑 浩魅, 柳川 義勢, 新垣 正夫, 門間 千枝, 太田 建爾, 工藤 泰雄, 寺山 武: S. Enteritidis の生物型別の試み, 第67 回日本感染症学会総会(1993, 4).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 柳川 義勢, 楠 淳, 高橋 正樹, 新垣 正夫, 山田 澄夫, 松下 秀, 太田 建爾, 工藤 泰雄:神奈川類似溶血毒産生性腸 炎ビブリオO6:K18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67回日本感染症学会総会 (1993, 4).

甲斐 明美,尾畑 浩魅,楠 淳,山田 澄夫,太田 建爾,工藤 泰雄,植益不二男,山本 勇: Vero 毒素産生性大腸菌O157:H7 による家族内感染事 例の細菌学的,血清学的検討成績,第67回日本感染症 学会総会(1993,4).

太田 建爾,松下 秀,山田 澄夫,尾畑 浩魅, 平田 一郎,工藤 泰雄:1992年に東京都内で発生し たソンネ赤痢菌による集団発生例及び家族内感染例由 来の分離株について,第67回日本感染症学会総会 (1993,4).

角田 隆文,夏木 豊,新田 義朗,安達 桂子, 今村 信子,相楽 祐子,甲斐 明美,工藤 泰雄: **虫垂炎症状を呈したべ口毒素産生性大腸菌腸炎の3例**, 第67回日本感染症学会総会(1993, 4).

東京都衛生検査所精度管理検討委員会,熊坂 一成, 工藤 泰雄,山口 恵三,河野 均也:**微生物検査 外部精度管理の現状と問題点一第10回東京都衛生検査 所精度管理調査結果報告**,第67回日本感染症学会総会 (1993, 4).

結城 伸泰, 宮武 正, 湯浅 龍彦, 瀧 孝雄,

飯田 静夫, 笠間 健嗣, 高橋 正樹, 斎藤 香彦, 稲垣 冬彦: Guillain-Barré 症候群を惹起する細菌と 神経系の交叉抗原: Campylobacter jejuni (PEN 19 型) のガングリオシド GM 1の molecular mimicry, 第34回日本神経学会総会 (1993, 5).

藤川 浩, 潮田 弘, 太田 建爾, 寺山 武: 溶液浮遊大腸菌に対するマイクロ波の殺菌作用:日本 食品衛生学会第65回学術講演会(1993, 5).

結城 伸泰,瀧 孝雄,稲垣 冬彦,笠間 健嗣, 高橋 正樹,斎藤 香彦,飯田 静夫,宮武 正: Guillain-Barré 症候群を惹起する細菌のリポ多糖とガ ングリオシド GM 1の分子相同性,第35回日本脂質生 化学研究会(1993,6).

結城 伸泰, 宮武 正, 瀧 孝雄, 飯田 静夫, 笠間 健嗣, 高橋 正樹, 斎藤 香彦, 稲垣 冬彦: Guillain-Barré 症候群を惹起する細菌のリポ多糖は GM1ガングリオシド様構造を有する, 第8回 Biomedicine Symposium (1993, 9).

結城 伸泰, 宮武 正, 瀧 孝雄, 飯田 静夫, 笠間 健嗣, 高橋 正樹, 斎藤 香彦, 稲垣 冬彦: Guillain-Barré 症候群を惹起する細菌のリポ多糖は GM1ガングリオシド様構造を有する, 第36回日本神経 化学会(1993, 10).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄:いわゆるTR H遺伝子保有腸炎ビブリオに関する検討, 第27回腸炎 ビブリオシンポジウム (1993, 11).

柳川 義勢, 門間 千枝, 尾畑 浩魅, 新垣 正夫, 甲斐 明美, 楠 淳, 潮田 弘, 橋本 由美, 平井 昭彦, 太田 建爾:エンテロトキシンD単独産 生ブドウ球菌による食中毒事例, 第14回食品微生物学 会 (1993, 11). 甲斐 明美, 伊藤 武, 工藤 泰雄, 島田 園子, 江成 博:**陽管出血性大陽菌O157:H7の検査の簡略 化を目的とした LIG 寒天培地の検討**, 第 5 回日本臨 床微生物学会総会(1994, 1).

楠 淳, 甲斐 明美, 尾畑 浩魅, 柳川 義勢, 新垣 正夫, 門間 千枝, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄:1989-1993年に東京都内で発生した S. Enteritidis 食中毒由来株の疫学マーカー解析, 第 6 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会 (1994, 2).

伊藤 武**:食品媒介感染症の発生要因**, 第9回日本環境感染症学会(1994, 2).

甲斐 明美,尾畑 浩魅,山田 澄夫,松下 秀,伊藤 武,太田 建爾,工藤 泰雄:1993年に東京都内で発生した Vero 毒素産生性大腸菌感染症について,感染性腸炎研究会総会:1993年度(1994,3).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: ヒト下痢症由 来神奈川現象陰性腸炎ビブリオの TRH 遺伝子保有状 況, 第67回日本細菌学会総会 (1994, 3).

Yuki, N., Taki, T., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Inagaki, F., Handa, S. and Miyatake, T.: **Molecular mimicry between ganglioside and a bacterium elicits Guillain-Barré syndrome**, 11th Peripheral Nerve Study Group Biennial Meeting (1993, 7).

Yuki, N., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Inagaki, F., Handa, S. and Miyatake, T.: **Molecular mimicry between ganglioside and a bacterium elicits Guillain-Barré syndrome**, 14th ISN Diennial Meeting (1993, 8).

Yuki, N., Taki, T., Kasama, T., Takahashi, M., Saito,

K., Inagaki, F., Handa, S. and Miyatake, T.: Molecular mimicry between ganglioside and a bacterium elicits Guillain-Barré syndrome, XII International Symposium on Glycoconjugates (1993, 8).

Hirata, I., Itoh, T., Suzuki, K., Irikura, Y., Kaneko, S., Takahashi, S., Masubuchi, N., Tomii, S. and Saito, S.: Colonization of urease positive and negative strains of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of cynomolgus monkeys, 7th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (1993, 9).

Masubuchi, N., Takahashi, S., Igarashi, H., Nakamura, K., Ishiyama, N., Saito, S., Aoyagi, T., Itoh, T., Hirata, I., Inoue, T. and Shimono, M.: Cell proliferation kinetics of gastric mucosa in the cynomolgus monkey infected with *Helicobacter pylori*, 7th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (1993, 9).

Tomii, J., Masubuchi, N., Igarashi, H., Nakamura, K., Ishiyama, N., Takahashi, S., Saito, S., Aoyagi, T., Mizukami, T., Niwa, M., Itoh, T. and Hirata, I.: **The serial changes of serum anti-Helicobacter pylori anti-bodies in the cynomolgus monkeys infected with Helicobacter pylori**, 7th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (1993, 9).

Kudoh, Y., Matsushita, S., Yamada, S.and Ohta, K.: Current status of shigellosis in Tokyo and characterization of Shigella isolates, The 28th Jt. Conf., US-Japan Coop. Med. Sci. Program, Cholera and Related Diarrheal Diseases Panel (1993, 11).

遠藤美代子, 奥野 ルミ, 柏木 義勝, 五十嵐英 夫:ラテックス凝集反応 (RPLA) による A 群レン サ球菌の発熱性毒素 (SPE) の検出法, 第67回日本感 染症学会 (1993, 4). 柏木 義勝, 遠藤美代子, 奥野 ルミ, 柏木 義勝, 五十嵐英夫: ラテックス凝集反応 (RPLA) による A 群レンサ球菌の発熱性毒素 (SPE) の検出法, 第2回 レンサ球菌談話会 (1993, 6).

奥野 ルミ,遠藤美代子,柏木 義勝,五十嵐英夫:ラテックス凝集反応 (RPLA) による A 群レンサ球菌の発熱性毒素 (SEP) の検出法,第26回レンサ球菌感染症研究会 (1993, 6).

高野 弘紀, 柴田 実, 平井 莞二:**乾燥血液口 紙を用いた HIV-1 抗体および DNA の検出**, 第21回日 本マス・スクリーニング学会総会 (1993, 6).

横尾 裕, 五十嵐英夫**: 黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別法の簡易・迅速な型別用キットの開発**, 第38回ブドウ球菌研究会(1993, 9).

相楽 好治,澤井 淳,五十嵐英夫,橋本 篤, 清水 賢:**細菌の損傷への遠赤外線照射の影響**,第 26回化学工学会秋季大会(1993, 9).

澤井 淳, 五十嵐英夫, 橋本 篤, 清水 賢: セラミックス粉末スラリー浸出液の細菌の増殖抑制に 及ぼす影響、第26回化学工学会秋季大会(1993、9)

村田以和夫: Anisakis I 型幼虫実験感染群および 本虫由来粗抗原経口投与群における Hartley 系モル モットの皮内反応 特に Arthus 型アレルギー反応の 発現,第53回日本寄生虫学会東日本大会(1993,10).

相楽 好治,澤井 淳,清水 賢,橋本 篤, 五十嵐英夫:加熱により生じた細菌の損傷の評価,第 70回日本細菌学会関東支部総会(1993,11).

澤井 淳,清水 賢,橋本 篤,五十嵐英夫: セラミックス粉末スラリー中における細菌の挙動、第 70回日本細菌学会関東支部総会(1993, 11).

清水 教一,柴田 実,藤岡 芳美,久保田純子, 青木 継稔:新生児口紙血を用いた抗ヒトセルロプラ スミンモノクロナール抗体 ELISA 法による Wilson 病マス・スクリーニングの実施成績,厚生省心身障害 研究班班会議 (1994, 2).

三和 敬史,福山 真弓,木村 昭夫,五十嵐英夫: 高感度 TSST-1 定量 ELISA の開発と患者由来血清か らの TSST-1 及び抗 TSST-1 抗体の検出・定量,第67 回日本細菌学会総会(1994,3).

澤井 淳,橋本 篤,清水 賢,五十嵐英夫: セラミックス粉末の抗菌活性,第67回日本細菌学会総会(1994,3).

相楽 好治,澤井 淳,橋本 篤,清水 賢, 篤, 五十嵐英夫:ストレスにより生じた損傷細菌について 第 **の検討**,第67回日本細菌学会総会(1994, 3).

> 五十嵐英夫,三栗谷久敏,湯沢 勝広,藤井 孝, 鳥居 義史,松木 則夫,斎藤 洋:ブドウ球菌エ ンテロトキシン A のスンクスによる嘔吐実験,第67 回日本細菌学会総会(1994,3).

> 横尾 裕, 五十嵐英夫:**黄色ブドウ球菌のコアグ** ラーゼ型別法の簡易・迅速な型別用キットの開発, 第 67回日本細菌学会総会(1994, 3).

> 高橋 博美,五十嵐英夫,星野 純,遠藤美代子, 奥野 ルミ,柏木 義勝,国眼 孝雄:MRSA 腸炎 由来黄色ブドウ球菌の毒素産生に及ぼす嫌気的培養条 件の影響,第67回日本細菌学会総会(1994,3).

奥野 ルミ,遠藤美代子,柏木 義勝,五十嵐英夫, 大江 健二,村井 貞子:**各種検査材料から分離され** た A 群レンサ球菌の発熱性毒素 A, B, C, "D" の産生性、第67回日本細菌学会総会(1994, 3).

宮澤 豊, 関根 大正: 当院における HIV 感染 妊婦の取扱い, 第45回日本産婦人科学会総会(1993,4).

関根 大正:**HIV の検査体制について**, 第14回衛生 微生物技術協議会(1993, 7).

矢野 一好, 吉田 靖子, 新開 敬行, 関根 大正, 寺山 武, 倉科周介: PCR 法による環境試料から の HAV 検出方法の検討, 第8回関東甲信静支部ウイ ルス研究会(1993, 7).

Unno, H., Kim, T., Shiragami. N. and Yano. K.: Virus removal process in aeration basin of activated sludge, Sixth Conference of The Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering (1993, 9).

Unno, H., Kim, T., Suzuki, N. Shiragami, N. and Yano, K.: Virus inactivation by biological wastewater treatment system, Emerging Technologies for Environment Protection, Preparing for the 21st Century (1993, 10).

窪山 泉,清水 裕幸,石田 雅巳,西村いずみ, 長田 道典,井元 四夫,宮脇 貞栄,金子 靖子, 本保 善樹,貞升 健志,関根 大正:保健所 HIV 抗体検査における FLISA 陽性の 3 例,第91回衛生局 学会(1993,10).

関根 大正:**HIV の増殖と細胞障害効果**, 明治薬科 大学シンポジウム(1993, 10).

金 台東, 白神 直弘, 海野 肇, 矢野 一好: 生物学的廃水処理プロセスでのウイルスの除去における原生・微小後生動物の役割について, 第28回日本水 環境学会(1994, 3).

中嶋 順一,鈴木 幸子,荒金眞佐子,福田 達男, 吉澤 政夫,清水 虎雄,安田 一郎,西島 基弘: **細辛の研究(第2報)栽培に伴う評価法の検討**,日本 生薬学会第40回年会(1993, 9).

鈴木 幸子,中嶋 順一,荒金眞佐子,福田 達男, 吉澤 政夫,清水 虎雄,安田 一郎,西島 基弘: **細辛の研究(第3報)ウスバサイシンの生育特性と作 型について**,日本生薬学会第40回年会(1993,9).

浜野 朋子,安田 一郎,高橋奈穂子,高野伊知郎,瀬戸 隆子,渡辺四男也,西島 基弘,秋山和幸:漢 方製剤の品質評価に関する研究——十全大補湯エキス 顆粒剤の製造工程における含有成分の挙動——,第30 回全国衛生化学技術協議会年会(1993,10).

高野伊知郎,高橋奈穂子,浜野 朋子,安田 一郎,瀬戸 隆子,西島 基弘:**漢方製剤 "温清飲" の試験** 法開発とその応用,第30回全国衛生化学技術協議会年会(1993,10).

鎌田 国広, 寺島 潔, 高橋美佐子, 西島 基弘: ピレン-1-カルボニルシアニドをプレカラム誘導体化 試薬に用いる HPLC による製剤中のDL-塩化カルニチンの蛍光定量, 第30回全国衛生化学技術協議会年会 (1993, 10).

高橋美佐子, 重岡 捨身, 長嶋真智子, 鎌田 国広, 西島 基弘:キラル固定相を用いた HPLC による塩 化カルニチンの光学分割, 第30回全国衛生化学技術協 議会年会 (1993, 10).

宮武ノリヱ, 上原 真一, 西島 基弘:ガスクロマトグラフィーによる光学異性体を有する医薬品の分析, 第30回全国衛生化学技術協議会年会(1993, 10). Seto, T., Yasuda, and I. Akiyama, K.: **Evaluation** of *Rosa* fruit as purgative crude drug, The 7th International Symposium on Chinese Drug (1993, 10).

中嶋 順一, 鈴木 幸子, 福田 達男, 吉澤 政夫, 荒金眞佐子, 清水 虎雄, 安田 一郎, 浜野 朋子, 西島 基弘:細辛の精油定量と HPLC による品質評 価, 第91回東京都衛生局学会 (1993, 11).

野尻 宗子,上原 真一,西島 基弘:アミノ基を 有する医薬品のプレラベル HPLC 定量法 (Ⅱ),日本 薬学会第114年会 (1994,3).

上原 真一, 宮武ノリヱ, 西島 基弘:キラルな GC キャピラリーカラムによる光学異性体分析 — メントール, カンフル, 日本薬学会第114年会 (1994, 3).

岩崎由美子, 奥本千代美, 西島 基弘:シアン簡易 テスト機材の評価, 日本薬学会第114年会 (1994,3).

新田千佳子,林 和恵,五十嵐 脩,植田 忠彦: α-トコフェロール立体異性体の生体内動態について, 日本ビタミン学会第45回大会 (1993, 5).

村松 理恵,清瀬千佳子,五十嵐 脩,植田 忠彦: 尾静脈注入によるα-トコフェロール立体異性体の体 内分布について,日本ビタミン学会第45回大会 (1993, 5).

中村 弘,大貫奈穂美,貞升 健志,関根 大正, 岡田 嘉仁,奥山 徹,田中 次郎:各種海藻水抽出 物の抗 HIV 活性,日本生薬学会第40回年会(1993, 9).

伊藤 弘一, 大貫奈穂美, 池田 一夫, 森 謙一郎, 鈴木 助治, 中村 弘:可視部吸収検出器を用いた 高速液体クロマトグラフィーによる化粧品用油溶性 **タール色素の分析**, 第30回全国衛生化学技術協議会年会 (1993, 10).

森 謙一郎, 伊藤 弘一, 中村 義昭, 中村 弘: 2次元 NMR による家庭用エアゾル製品の分析, 第30 回全国衛生化学技術協議会年会(1993, 10).

水石 和子, 竹内 正博, 中村 弘:**有機スズハ**ライドのキャピラリーガスクロマトグラフィー — 魚 **類中のトリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物の定量**, 日本分析化学会第42年会(1993, 10).

中村 義昭, 岸本 清子, 山野辺秀夫, 観 照雄, 中村 弘:家庭用カビ取り剤及び漂白剤等の市販家 庭用塩素含有製品の次亜塩素酸ナトリウム (有効塩 素) 濃度調査, 第91回東京都衛生局学会 (1993, 11).

清瀬 千佳子, 村松 理恵, 五十嵐 脩, 植田 忠 彦: *SRR*-トコフェロールの生体内動態について, 第 5 回ビタミンE研究会 (1994, 1).

植田 忠彦, 平原 文子, 五十嵐 脩, 美濃 真: モデル献立から求めた日本人の多価不飽和脂肪酸摂取 量と E/PUFA比, 第 5 回ビタミン E 研究会 (1994, 1).

中村 義昭, 岸本 清子, 山野辺秀夫, 観 照雄, 中村 弘:市販家庭用塩素含有製品(カビ取り剤, 漂白剤など)の有効塩素(次亜塩素酸ナトリウム) 濃 度について, 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支 部第6回理化学研究部会(1994, 2).

水石 和子, 竹内 正博, 保母 敏行:GC-NCI-MS による海水中の有機スズ化合物の定量, Separation Sciences '94 (第2回分離科学関連研究懇談会連合発表会) (1994, 2).

森 謙一郎, 伊藤 弘一, 鈴木 助治, 中村 弘: **2 次元 NMR による化粧品の分析**, 日本薬学会第114 年会 (1994, 3).

大貫奈穂美,池田 一夫,森 謙一郎,伊藤 弘一, 鈴木 助治,中村 弘:**多波長検出器を用いた HPLC による化粧品中油溶性タール色素の分析**,日本 薬学会第114年会(1994,3).

仲真 晶子,金子 誠二,飯田 孝,梅木富士郎,伊藤 武,松田 基夫,今井 雪穂,菊地 美加,丸山 務:パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE) 法を用いた Listeria monocytogenes 染色体 DNA のタイピングの検討,第115回日本獣医学会(1993,4).

金子 誠二,石崎 直人,伊藤 武,若山 裕晃: PCR 法と培養法による市販食肉からの病原性エルシニア属菌の検出,第115回日本獣医学会(1993,4).

金子 誠二,石崎 直人,伊藤 武:PCR 法を 用いた Yersinia enterocolitica と Yersinia pseudotuberculosis の病原性評価とその応用,第90回東京都 衛生局学会(1993,4).

原 樹子,稲垣 俊彦,菊池 俊六,渋谷 幸子,福田 正廣,山田 正勝,多田 公一,飯田 孝,神崎 政子:すし屋におけるリステリアの実態と衛生管理について,第90回東京都衛生局学会(1993,4).

小久保彌太郎: リステリアの食品汚染状況, 日本食品衛生学会第65回学術講演会(自由集会)(1993, 5).

堀井昭三,宮川弘之,井草京子,伊藤 武:**高速液体クロマトグラフィーによる食肉中の残留合成坑菌剤の分析**,日本食品衛生学会第65回学術講演会(1993,5).

金子 誠二,伊藤 武:エルシニア感染症が疑われた回腸末端切除標本からの PCR 法による Yersinia pseudotuberculosis の証明, 第67回日本感染症学会 (1993, 5).

金子 誠二: Yersinia の分類学と病原因子, 衛生 微生物技術協議会 第14回研究会 (1993, 7).

Takeba, K., Itoh, T., Matsumoto, M., Nakazawa, H. and Tanabe, S.: Simultaneous determinatin of fasciolidides in milk by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, The 107th Annual AOAC International Meetings & Exposition (1993, 7).

中島 勉, 宮崎 奉之, 橋本 常生, 伊藤 武: 高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のクレンブ テロールの定量, 日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993, 10).

神保 勝彦,片岡 潤,伊藤 武:*Micro-coccus luteus* 突然変異株によるマクロライド系抗生 物質の分別同定,日本食品衛生学会第66回学術講演会 (1993, 10).

橋本 常生,宮崎 奉之,中島 勉,伊藤 武 松本 昌雄,中澤 裕之:HPLC による牛肉中のサル ブタモールの分析法,第30回全国衛生化学技術協議会 年会(1993,10).

Nakama, A., Kaneko, S., Umeki, F., Itoh, T. and Maruyama, T.: **Detection of** *Listeria monocytogenes* in cheese using polymerase chain reaction, The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists (1993, 10).

Kaneko, S., Ishizaki, N. and Itoh, T.: Evaluation of

polymerase chain reaction to detect pathogenic Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis, The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists (1993, 10).

Kataoka, J., Jinbo, K. and Itoh, T.: Simplified classification method for the detection of residual antibacterial agents in meat and fish by microbiological assay, The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists (1993, 10).

Maruyama, T., Iida T., Mizutani, H. and Kokubo, Y.: Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw meat and carcasses in Japan, The 11th International Symposium of the World Association of Veterinary Food Hygienists (1993, 10).

仲真 晶子,金子 誠二,飯田 孝,梅木富士郎,伊藤 武,松田 基夫,今井 雪穂,菊地 美加,丸山 務:*Listeria monocytogenes* 染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析,第70回日本細菌学会関東支部総会(1993,11).

仲真 晶子,梅木富士郎,飯田 孝,伊藤 武,神 真知子,平田 一郎,小久保彌太郎,丸山 務: DNA プローブ法キットによる食品からの Listeria monocytogenes 検出法の検討,第14回食品微生物学 会 (1993, 11).

金子 誠二,伊藤 武,石崎 直人:PCR 法に よるコレラ毒素産生コレラ菌および NAG ビブリオの 生エビからの検出方法の検討,第14回食品微生物学会 (1993, 11).

石崎 直人,金子 誠二,尾畑 浩魅,甲斐 明美, 伊藤 武:Vero 毒素産生性大腸菌の検出法の検討 および市販食肉における分布,第14回食品微生物学会 (1993, 11).

小久保彌太郎: これからの食品の微生物管理法としての HACCP システム, 第14回食品微生物学会(教育講演)(1993, 11).

飯田 孝, 神崎 政子, 仲真 晶子, 梅木富士郎, 金内 長司, 丸山 務, 小久保彌太郎: *Listeria* monocytogenes の由来別血清型分布, 平成5年度獣医 公衆衛生学会 (1994, 2).

上村 尚:マイコトキシンの食品汚染実態及び調理加工における消長,日本食品衛生学会第65回学術講演会 (1993, 5).

田端 節子,上村 尚,井部 明広,嶋田 照江,田村 行弘:糸状菌のアフラトキシン変換能に関する検討,第37回マイコトキシン研究会学術講演会(1993,8).

上村 尚,田端 節子,井部 明広,嶋田 照江,早野 公美,田村 行弘:穀類中のフモニシン汚染, 日本食品衛生学会第66回学術講演会(1993,10).

安田 和男, 只野 敬子, 牛山 博文, 小川 仁志, 川合 由華, 田村 行弘:健康食品の衛生学的調査 (M)アロエ製品中のバルバロイン含有量, 日本食品衛 生学会第66回学術講演会 (1993, 9).

永山 敏廣,小林 麻紀,塩田 寛子,田村 行弘: **農産物中のプロパモカルブ分析法**,第30回全国衛生化 学技術協議会年会 (1993, 10).

上村 尚:**農産物中の臭素含有量**,地方衛生研究 所全国協議会関東甲信静支部第6回理化学研究部会 (1994, 2). 植松 洋子, 鳩岡 友紀, 平田 恵子, 広門 雅子, 風間 成孔:標準添加ヘッドスペースガスクロマトグ ラフィーによる食品香料中の残留溶剤の分析, 日本食 品衛生学会第66回学術講演会 (1993, 9).

金子 令子,渡辺 悠二,風間 成孔:輸入缶詰内 面コーティングの材質鑑別,第30回全国衛生化学技術 協議会年会(1993,10).

早藤知惠子,友松 俊夫,小宮三紀子,宮崎 元春, 金丸 正雄,窪山 泉:**骨粗鬆症の生化学的検討**, 第90回東京都衛生局学会(1993,4).

早藤知惠子,小宮三紀子:中**高年女性のライフスタイルによる骨密度と血清中ビタミンD代謝物濃度**,第40回日本栄養改善学会(1993,10).

高橋 巖,横山 知子,坂牧 成恵,牛尾 房雄: **陰膳方式による栄養成分摂取量**,第40回日本栄養改善 学会(1993, 10).

牧野 国義,丹後 俊郎:**呼吸器疾患患者発生数の** 季節変動と気象,大気汚染の影響,第63回日本衛生学 会総会(1993,4).

清水 勲,平口 哲夫,吉川 翠,入江 建久:アレルギー源としてのダニの自動計測法,第12回空気清 浄とコンタミネーションコントロール研究大会 (1993, 4).

加納 尭子,鈴木 孝人,上林 真子,大国 壽士:マウスの IgE 抗体産生におけるディーゼル排気ガス粒子のアジュバント作用,第5回アレルギー学会春季大会 (1993,5).

Shimizu, I., Hiraguchi, T., Yoshikawa, M and Irie, T.: Study on instantaneous determination of house

dust mites by MMSS, The 3rd International Congress on Optical Particle Sizing (1993, 8).

吉川 翠**:生活環境変化とダニ**,日本ダニ学会第 2回大会(1993,10).

吉川 翠,山縣 文夫,角野 政弥:高等学校内の ダニおよびダニアレルゲン分布,第52回日本公衆衛生 学会総会(1993, 10).

佐藤 泰仁,吉川 翠:ホットカーペットの温湿度 **分布とその影響**,第52回日本公衆衛生学会総会(1993, 10).

牧野 国義: **若年死亡を重視した死亡指標について**, 第52回日本公衆衛生学会総会(1993, 10).

牧野 国義:**病院情報からの大気汚染健康影響の検** 出,第34回大気汚染学会(1993,12).

大久保智子,瀬戸 博,笹野 英雄:ヒト肺臓中 の炭粉の蓄積量調査,第34回大気汚染学会(1993, 12).

鈴木 孝人,池田 眞悟,大澤 誠喜,加納 尭子: ディーゼル粒子の化学物質によるマウス IgE 抗体産生 の亢進,第34回大気汚染学会(1993,12).

吉川 翠:**超音波ノミ・ダニ撃退器のダニに対する 忌避効果実験法の検討**,日本家屋害虫学会第15回大会 (1994, 2).

土屋 悦輝, 高橋 清, 小泉 清, 小田 満: 上水試験方法の改訂に伴う試験方法の検討(II) — チウラムの分析方法 — , 第44回全国水道研究発表会 (1993, 5). 市川 久浩,松本 淳彦,平田 強,荒井 和之, 古畑 勝則:上水試験方法の改訂に伴う試験方法の検 討(XI) — 純培養菌に関する LB-BGLB 法と特定 酵素基質培地法との感度の比較 — ,第44回全国水道 研究発表会(1993,5).

池田 一夫, 倉科 周介:**世代マップによる疾病の 世界像(2)**, 日本人口学会第45回大会(1993, 6).

高橋 保雄,中川 順一,細川奈津子,笹野 英雄,森田 昌敏:ある河川水中のモニタリング物質の濃度レベル,第2回環境化学研究会(1993,6).

Watanabe, M.F., Harada, K-I., Ohtani, I., Suzuki, M., Terao, K. and Watanabe, M.: A hepatotoxin from a new species of cyanobacteria *Umezakia natans*, W. Pacific Science Inter Congress (1993, 7)

竹内 正博, 水石 和子, 中村 弘: **有機スズハ**ライドのキャピラリーガスクロマトグラフィー **薄 膜・短カラムの検討**, 日本分析化学会第42年会(1993, 10).

渡辺真利代:**冬季ブルームを形成した** *Anabaena tene-ricaulis* について,第58回日本陸水学会(1993,11).

朴 虎東,渡辺真利代,原田 健一,渡辺 真之,林 秀剛:ラン藻が生産する肝臓毒 microcystin・神経毒 anatoxin-a, 第58回日本陸水学会 (1993, 11).

古畑 勝則,松本 淳彦,平石 明,福山 正文, 田淵 清: Methylobacterium 属菌の性状と塩素抵 抗性,第9回日本微生物生態学会(1993, 11).

竹内 正博,水石 和子,保母 敏行:GC-NCI-MS による海産巻貝中の有機スズ化合物の定量,

Separation Sciences '94 (第 2 回分離科学関連研究懇談 会連合発表会) (1994, 2).

細川奈津子,中川 順一,高橋 保雄,土屋 悦輝: 消毒副生成物の分析における注意事項,地方衛生研究 所全国協議会関東甲信静支部第6回理化学研究部会 (1994, 2).

土屋 悦輝,渡辺真利代:**藍藻** *Microcystis* 培養物 の塩素処理副生成物の確認およびその変異原活性,日本薬学会第114年会(1994, 3).

大橋 則雄, 土屋 悦輝, 濱田 昭: N-メチルカル バメート系農薬 MPMC, MTMC のオゾン分解生成物, 第28回日本水環境学会年会 (1994, 3).

大橋 則雄, 土屋 悦輝, 濱田 昭:チオベンカル ブのオゾン分解生成物の検索, 第28回日本水環境学会 年会 (1994, 3)

大橋 則雄, 土屋 悦輝, 濱田 昭:有機リン系農 薬オキソンのGC/MSによる定性一斉スクリーニング の検討, 日本薬学会第114年会 (1994, 3).

大石 眞之,米山 允子,高橋 省,藤谷 知子, 田中 豊人:ピペロニルブトキサイドの慢性毒性試験, 第63回日本衛生学会総会(1993,4).

田中 豊人,藤谷 知子,高橋 省,大石 眞之: ピペロニルブトキサイドのマウスの発生におよぼす影響,第63回日本衛生学会総会(1993,4).

Ichikawa, H., Ueda, T. and Igarashi, O.: **Biodiscrimination of a-tocopherol stereoisomers between dietary** *RRR-*, *2-ambo-* and all-*rac-a-tocopherols* in male rats, 84th AOCS Annual Meeting & Expo, 4th Joint Meeting with JOCS, (1993, 4).

市川 久次, 植田 忠彦, 五十嵐 脩:*RRR* および *SRR*-α-トコフェロールのラット体内動態, 日本ビタミン学会第45回大会 (1993, 5).

Nagai, F., Satoh, K., Ushiyama, K., Yasuda, I., Akiyama, K. and Kano, I.: Inhibition of kidney Na⁺,K⁺-ATPase activity by crude drugs used as diuretics, 7th International Symposium on Chinese Drug (1993, 8).

佐藤かな子,長井二三子,牛山 慶子,加納 いつ:ウマ腎臓 Na, K-ATPase 活性に対するβ-オイデスモールの作用(第2報),第66回日本生化学会大会(1993,10).

中川 好男,田山 寿美子:ビフェニルの単離肝細 胞における毒性と代謝,日本薬物動態学会(1993, 10).

鈴木 英子, 鈴木 信夫:培養ヒト細胞における癌 遺伝子突然変異誘発試験 — サッカリンナトリウムに よる ras 遺伝子点突然変異誘発, 第22回日本環境変異 原学会 (1993, 11).

深野 駿一:**薬物動態予測プログラム (PPP) の開発とその応用**,日本動物実験代替法学会第7回大会 (1993, 12).

市川 久次, 植田 忠彦, 五十嵐 脩:**天然型および非天然型α-トコフェロールのラット腸管からの吸収**, 第5回ビタミンE研究会 (1994, 1).

Aoki, N., Noda, K., Mizutani,T., Tajima, M., Kato, K., Mori, M. and Shimada, Y.: **Detection of JC virus in brians of non-PML elderly patients**, 第82回日本病理学会総会(1993, 4).

堤 久, 熊川 寿郎, 平井真希子, 青木 直人, 森 真由美: **当科における70才以上の高齢者慢性骨髄性白 血病の検討**, 第35回日本老年医学会総会(1993, 9).

森 真由美,堤 久,平井真希子,熊川 寿郎,青木 直人,村井 善郎,水谷 良子:**高齢者非ホジキンリンパ腫の治療**,第35回日本老年医学会総会(1993,9).

服部 明徳, 荒木 厚, 井上潤一郎, 佐藤 忠弘, 青木 直人, 伊藤 英喜:**老年者糖尿病患者における 感染症**, 第35回日本老年医学会総会(1993, 9).

平井真希子,堤 久,青木 直人,熊川 寿郎,森 真由美:**高齢者におけるアドリアマイシン点滴静注後** 血中濃度(2),第35回日本臨床血液学会総会(1993, 11).

青木 直人, 田島マサ子, 加藤 賢三, 森 真由美, 嶋田裕之: 非 PML 老年患者骨髄組織における PCR による JC ウイルス DNA の検出, 第83回日本病理学 会総会 (1994, 3).

平田 一郎, 鈴木 敬子, 入倉 善久, 伊藤 武, 高橋 信一, 増渕 尚子, 富井 重明:ウレアーゼ産 生及び非産生 Helicobacter pylori によるカニクイザ ル感染実験と本菌の定着, 第67回日本感染症学会総会 学術講演会(1993, 4).

楠くみ子,神 真知子,池島 伸至,新井 輝義, 入倉 善久,鈴木 敬子,平田 一郎,小久保弥太郎: 食肉中における Lysteria monocytogenes の熱抵抗性, 日本食品衛生学会第65回学術講演会 (1993, 5).

新井 輝義,入倉 善久,鈴木 敬子,楠 くみ子,神 真知子,平田 一郎,池島 伸至,小久保弥太郎:「Dynabeads Anti-Salmonella」キットによる食肉を対象としたサルモネラ検査法の検討,第14回食品微

生物学会 (1993, 11).

神 真知子,楠 くみ子,新井 輝義,鈴木 敬子, 入倉 善久,平田 一郎,池島 伸至,小久保弥太郎, 徳山 和成,山中 寿子:食肉販売店および処理施設 における Listeria monocytogenes 汚染,第14回食品 微生物学会(1993,11).

諸角 聖,和宇慶朝昭,藤川 浩,太田 建爾, 鈴木昭四郎,長沢 冬樹:いわゆる健康茶における真 菌分布とマイコトキシン汚染の可能性,第14回食品微 生物学会(1993,11).

潮田 弘,橋本 由美,金子 誠二,石崎 直人, 池島 伸至,新井 輝義,伊藤 武,太田 建爾, 鵜沼 哲朗,宇田明日子,藤枝智香子:鶏,鶏卵,液 卵および卵加工品由来黄色ブドウ球菌の各種性状,コ アグラーゼ型ならびにエンテロトキシン産生性,第14 回食品微生物学会(1993,11). 潮田 弘,橋本 由美,平井 昭彦,柳川 義勢,楠 淳,甲斐 明美,新垣 正夫,門間 千枝,尾畑 浩魅,太田 建爾:コアグラーゼル型黄色ブドウ球菌による食中毒事例,第14回食品微生物学会(1993,11).

鈴木 俊也,近藤 治美,矢口久美子,大西 和夫, 山岸 達典:地下水中有機リン酸トリエステルの分析 — 試料大量注入法を用いたキャピラリーガスクロマ トグラフ法 — ,日本分析化学会第42年会(1993, 10).

鈴木 俊也, 矢口久美子, 大西 和夫, 山岸 達典: 地下水中農薬の分析 — 試料大量注入法を用いたキャ ピラリーガスクロマトグラフ法 — , 第28回日本水環 境学会年会 (1994, 3).

矢口久美子, 鈴木 俊也, 平田 一郎, 伊藤 武, 大西 和夫, 濱田 昭:テトラクロロエチレン分解菌 の化学的性状, 第28回日本水環境学会年会 (1994, 3).

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

秋 山 和 幸 (委員長) 友 松

土屋悦輝

田 村 行 弘

俊夫

北村俊文

市川久次

伊 藤 武

藤 井 孝

鈴 木 助 治

小久保 彌太郎

大 西 和 夫

1995年1月 発行

規格表 第 2 類 印刷番号(6)472 刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報第45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) 3 2 3 1 (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) 7 4 8 1 (代)

