

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

46

1995

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



序

わが国の20世紀の後半は、疾病対策の実需要に大きな地殻変動が起こった時代として、歴史に永く記されることになるのではないのでしょうか。

社会構造の中に広く深く浸透した健康障害要因と、それに起因する多彩で多数の病気への、全方位的対処をもってこの時代は始まりました。そして今世紀が終わりを迎えるいま、感染症にも中毒にも、僅かの例外を別にして、巨大な社会的脅威だった昔のおもかげはどこにもありません。病気による被害の圧縮とその原因の抑制という直接的な対処が主目標だった疾病対策は、次の発展段階に入ったと申せます。これからの目標は、病気の制圧に一定の成功を納めた結果として獲得した生活環境の安全性を維持し向上させながら、その制圧効果を拡大する方向に移ってゆくことになるはずです。

こうした状況の変化に直面して、多年、疾病対策に携わってきた各種の組織機関は、それぞれに活動の軸道修正を迫られつつあります。衛生研究所もその例外ではありません。ただ、衛生研究所の業務はもともとが新しい目標に最もなじみ易いものだったはずですから、業務の本質的な目標に改めて目を向ければ、努力すべき方向はおのずと明らかになって参ります。地域保健の法体系の中で衛生研究所に投げられた課題にも、それが答えになるでしょう。

研究年報も46号になりました。行政研究と学術研究一般との最大の違いは、研究課題が最終的には社会の実需要を反映することになる点です。国立試験研究機関をはじめとして、研究組織の見直しが急がれる趨勢にあり、科学振興の掛け声や旗印だけがいたずらに賑やかですが、ことの成否は結局この点の認識の有無に掛かっていると思います。課題の選択にも、その成果の活用の方法にも、さらに改善を加えてゆかねばなりません。努力の方向性が適切なものとなるよう、関係各位には従来にも増してご指導、ご鞭撻を賜りたく存じます。

例年のことながら、通常業務の寸暇を割いて年報編集の作業に当たられたみなさんのご苦勞に深く感謝する次第です。

平成7年10月

東京都立衛生研究所長 倉科 周介

目 次

報文Ⅰ 感染症等に関する調査研究

エンテロトキシンD単独産生黄色ブドウ球菌による食中毒事例柳川 義勢, 潮田 弘, 橋本 由美, 新垣 正夫, 尾畑 浩魅, 門間 千枝 甲斐 明美, 楠 淳, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄.....	3
新血清型ウェルシュ菌による集団食中毒2事例の細菌学的検討門間 千枝, 柳川 義勢, 楠 淳, 甲斐 明美, 新垣 正夫 尾畑 浩魅, 高橋 正樹, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄.....	8
腸炎ビブリオ血清型O8:K41の抗原解析に関する検討庭山 邦子.....	12
東京都における1990年から1994年の5年間に同定された寄生原虫・蠕虫の感染源調査村田 以和夫, 榎田 隆一, 鈴木 淳, 池田 正幸.....	16
風疹 HI 抗体, HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体の東京都衛生検査所精度管理調査結果(1988年~1993年)蓑輪 佳子, 大石 向江, 小林 千種, 五十嵐英夫, 町田 勝彦 河野 均也.....	27
東京都内のインフルエンザ検索成績(1994年12月~1995年2月)山崎 清, 伊藤 忠彦, 関根 整治, 林 志直 佐々木由紀子, 関根 大正.....	33
東京都における1994年の HIV 抗体検査田部井由紀子, 貞升 健志, 森 功次, 門間 公夫, 関根 大正 鈴木 敬子, 吉田 勲, 平田 一郎, 工藤 泰雄.....	37
PCR法による生エビからのコレラ毒素産生 <i>Vibrio cholerae</i> O1 および O139 の検出方法の検討石崎 直人, 金子 誠二, 片岡 潤, 小久保彌太郎, 伊藤 武.....	41
マイクロプレートを用いた <i>Listeria monocytogenes</i> の簡易・迅速な血清型別法飯田 孝, 神崎 政子, 小久保彌太郎.....	46
報文Ⅱ 医薬品等に関する調査研究	
生薬に含まれる抗 HIV 作用物質の検索(第1報) 抗 HIV 作用を示すサイカチ果实中のサポニン安田 一郎, 浜野 朋子, 塩田 寛子, 高野伊知郎, 瀬戸 隆子 西島 基弘, 秋山 和幸, 門間 公夫, 田部井由紀子, 関根 大正 木島 孝夫, コーセンチーノマーク, リークオシオン.....	53
プレカラム誘導化試薬ピクリルスルホン酸ナトリウムを用いたアスパラギン酸, タウリン, トラネキサム酸の HPLC 定量法野尻 宗子, 上原 真一, 萩原 輝彦, 西島 基弘.....	58
キレート試薬ビスムチオールⅡを用いたヒ素の吸光度定量野尻 宗子, 上原 真一, 西島 基弘.....	62
高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のアラントインの分析と安定性大貫奈穂美, 鈴木 助治, 森 謙一郎, 中村 義昭, 伊藤 弘一 中村 弘, 木嶋 敬二.....	66

蛍光 X 線分析法による医薬部外品及び化粧品中のイオウの定量	中村 義昭, 大貫奈穂美, 森 謙一郎, 伊藤 弘一, 中村 弘.....	72
義歯床固定用糊材中の元素含有量材質及び人工唾液への溶出について	江波戸舉秀, 中村 弘.....	77
家庭用品の衛生化学的研究(第31報) 形状記憶繊維製品のホルムアルデヒド残留量調査	岸本 清子, 山野辺秀夫, 観 照雄, 中村 弘.....	81
家庭用品の衛生化学的研究(第32報) ガスクロマトグラフィーによる家庭用品中の有機スズ化合物の分析	山野辺秀夫, 岸本 清子, 岩崎由美子, 観 照雄, 中村 弘.....	86
家庭用品の衛生化学的研究(第33報) ガスクロマトグラフィーによる壁紙等防炎加工製品中 Tris (2-chloroethyl) phosphate の定量	観 照雄, 岩崎由美子, 山野辺秀夫, 中村 弘.....	90
報文Ⅲ 食品等に関する調査研究		
大腸菌群検査用市販寒天培地の菌数測定能の評価	梅木富士郎.....	97
発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査(第1報)	井部 明広, 上村 尚, 田端 節子, 早野 公美, 田村 行弘.....	102
高速液体クロマトグラフィーによる食用タール色素の一斉分析	中沢久美子, 嶋村 保洋, 中島 和雄, 菊地 洋子, 中込 圭介 田村 行弘.....	108
化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(第12報)―平成6年度―	冠 政光, 観 公子, 橋本 秀樹, 真木 俊夫, 田村 行弘.....	115
輸入食品中の放射能濃度(第6報)―平成6年度―	観 公子, 冠 政光, 橋本 秀樹, 真木 俊夫, 田村 行弘.....	120
輸入農産物中の残留農薬実態調査―平成6年度―	小林 麻紀, 永山 敏廣, 伊藤 正子, 田村 康宏, 塩田 寛子 田村 行弘.....	127
野菜・果実中の残留農薬実態調査―平成6年度―	伊藤 正子, 永山 敏廣, 小林 麻紀, 田村 康宏, 塩田 寛子 田村 行弘.....	134
炊飯改良剤の品質調査	船山 恵市, 安野 哲子, 広門 雅子, 平田 恵子, 植松 洋子 貞升 友紀, 安田 和男, 鈴木 助治.....	140
熱分解生成物の赤外吸収スペクトルによるゴムの系統的鑑別法	渡辺 悠二, 金子 令子.....	147
天然または合成イソプレンゴムをブレンドしたブタジエン系ゴムの鑑別	金子 令子, 樺島順一郎, 渡辺 悠二, 鈴木 助治.....	154

有機農産物の栄養成分について	高橋 巖, 横山 知子, 坂牧 成恵, 牛尾 房雄, 植田 忠彦 市川 久次, 友松 俊夫, 加藤 芳美, 小宮三紀子, 小林 俊明 寺門 和也	159
報文Ⅳ 生活環境に関する調査研究		
ディーゼルエンジン排気ガス暴露がラットの骨代謝に及ぼす影響	渡辺 伸枝, 池田 真悟, 大沢 誠喜, 大西 和夫, 鈴木 重任	167
スギ花粉抗原特異的マウス IgE 抗体産生におけるディーゼル粒子中のアジュバント活性物質の検索	鈴木 孝人, 石森 真子, 保坂 幸子, 池田 真悟, 大澤 誠喜 加納 堯子	173
幹線道路周辺住民の尿中チオバルビツール酸反応性物質 (TBAR) 調査	瀬戸 博, 大久保智子, 斎藤 育江, 大西 和夫, 鈴木 重任	180
長期型 PTIO 法とザルツマン法による NO, NO ₂ 濃度の比較結果について	小野塚 春吉, 福田 雅夫, 牧野 国義, 長嶋 親治, 大西 和夫	185
高速液体クロマトグラフィ/高周波誘導結合プラズマ発光分光分析によるヘキサシアノ鉄(Ⅱ)及びヘキサシアノ鉄(Ⅲ)の分離定量	中川 順一, 高橋 保雄, 土屋 悦輝	190
水道水中の消毒副生成物の系統分析法	細川奈津子, 中川 順一, 高橋 保雄, 土屋 悦輝	193
皇居外苑濠の植物プランクトン(第6報)— <i>Microcystis</i> 属について—	渡辺真利代, 土屋 悦輝	198
報文Ⅴ 毒性に関する調査研究		
酸化ストレスによるラット脳抗酸化系の変動におよぼす六味丸散剤の影響	市川 久次, 浦野 四郎	205
いくつかの既知変異原に対する六味丸水抽出物の影響	藤田 博, 青木 直人, 佐々木美枝子	211
ヒト病態モデルマウスによる六味丸添加飼料投与実験(第1報) 白血病好発系マウス(AKR/N)の一般症状および臨床検査結果	坂本 義光, 安藤 弘, 池田 虎雄, 小縣 昭夫, 久保 喜一 小嶋 昭江, 高橋 博, 多田 幸恵, 田山 邦昭, 長澤 明道 林田 志信, 福森 信隆, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣 吉田 誠二, 青木 直人, 佐々木美枝子	215
ヒト病態モデルマウスによる六味丸添加飼料投与実験(第2報) 自己免疫疾患マウス(MRL/l)の一般症状および臨床検査結果	坂本 義光, 安藤 弘, 池田 虎雄, 小縣 昭夫, 久保 喜一 小嶋 昭江, 高橋 博, 多田 幸恵, 田山 邦昭, 長澤 明道 林田 志信, 福森 信隆, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣 吉田 誠二, 青木 直人, 佐々木美枝子	225
酸化マグネシウムの13週間毒性試験	藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 長澤 明道 多田 幸恵, 福森 信隆, 池田 虎雄, 高橋 博, 佐々木美枝子	232

十全大補湯の13週間毒性試験	藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野 範男, 湯澤 勝廣, 長澤 明道 多田 幸恵, 福森 信隆, 池田 虎雄, 高橋 博, 坂本 義光 佐々木美枝子	243
没食子酸プロピル及び関連化合物のラット遊離肝細胞における毒性	中川 好男, 田山寿美子	254
<i>Salmonella typhimurium</i> TA97, TA102を用いた食品添加物の変異原性試験(第10報)	藤田 博, 青木 直人, 佐々木美枝子	258
石綿繊維の経口摂取による生体影響(第7報) 繊維の分布形態	福森 信隆, 青木 直人, 佐々木美枝子	265
マウスを用いた繁殖毒性試験における対照群の産仔数と仔体重の関係	田中 豊人, 市川 久次	271
時間制限給餌法による F344ラットの飼育と漢方方剤投与試験への応用	林田 志信, 佐々木美枝子	274
報文VI 公衆衛生情報に関する調査研究		
大気汚染物質高濃度発現後の肺がん死亡率への人口移動の影響について	牧野 国義	283
東京湾の水質汚濁の解析における LANDSAT-TM データの利用	荻野 周三, 神谷 信行, 池田 一夫, 竹内 正博, 土屋 悦輝	289
疾病構造データベース	池田 一夫, 竹内 正博, 鈴木 重任	293
広域保健情報ネットワークに関する地方衛生研究所の取組の実態と将来 —平成7年1月のアンケート調査の結果から—	佐々木美枝子, 池田 一夫, 神谷 信行, 荻野 周三, 竹内 正博	301
<資料>地域保健サービスへのインターネットの活用	神谷 信行, 荻野 周三, 池田 一夫, 竹内 正博, 佐々木美枝子	307
著書及び他誌発表		313
学 会 発 表		323

CONTENTS

REPORTS I PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Enterotoxin D Producing Stapylococcal Food Poisoning in Tokyo Y. Yanagawa, H. Ushioda, Y. Hashimoto, M. Shingaki, H. Obata C. Monma, A. Kai, J. Kusunoki, T. Itoh, K. Ohta and Y. Kudoh	3
Bacteriological Investigation of Two Outbreaks Caused by <i>Clostridium perfringens</i> of New Serotype C. Monma, Y. Yanagawa, J. Kusunoki, A. Kai, M. Shingaki, H. Obata M. Takahashi, T. Itoh, K. Ohta and Y. Kudoh	8
Antigenic Analysis of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Serovar O8:K41 Isolated from Foodborn Diseases Outbreak K. Niwayama	12
Case study on Protozoa and Helminthes Identified in Tokyo during 1990 to 1994 I. Murata, R. Enokida, J. Suzuki and M. Ikeda	16
The External Quality Assessment at the Registered Independent Clinical Laboratories in Tokyo for Rubella (HI) Antibody and HIV (HTLV-III) Antibody from 1988 to 1993 K. Minowa, H. Oishi, C. Kobayashi, H. Igarashi, K. Machida and K. Kawano	27
Prevalence of Influenza in Tokyo (Dec. 1994~Feb. 1995) K. Yamazaki, T. Ito, S. Sekine, Y. Hayashi, Y. Sasaki and H. Sekine	33
Serological Survey on Antibodies Against HIV in Tokyo in 1994. Y. Tabei, K. Sadamasu, K. Mori, K. Monma, H. Sekine K. Suzuki, I. Yoshida, I. Hirata and Y. Kudoh	37
Detection of Cholera Toxin Producing <i>Vibrio cholerae</i> O1 and O139 from artificially Contaminated Raw Prawn Using the Polymerase Chain Reaction N. Ishizaki, S. Kaneko, J. Kataoka, Y. Kokubo and T. Itoh	41
Simple and Rapid Serotyping Assay for <i>Listeria monocytogenes</i> Using Microplate T. Iida, M. Kanzaki and Y. Kokubo	46

REPORTS II PAPERS ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Isolation of Anti-HIV Principle in Crude Drugs (I) Saponin as an Anti-HIV Principle from Fruits of <i>Gleditsia japonica</i> I. Yasuda, T. Hamano, H. Shioda , I. Takano, T. Seto M. Nishijima, K. Akiyama, K. Monma, Y. Tabei H. Sekine, T. Konoshima, M. Cosentino and K. Lee	53
High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Aspartic Acid, Taurine and Tranexamic Acid by Precolumn Derivatization using Sodium Picrylsulfonate S. Nojiri, S. Uehara, T. Hagiwara and M. Nishijima	58

Spectrophotometric Determination of Arsenic with Bismuthiol II as the Chelating Agent	S. Nojiri, S. Uehara and M. Nishijima	62
High Performance Liquid Chromatographic Analysis and Stability of Allantoin in Cosmetics	N. Ohnuki, S. Suzuki, K. Mori, Y. Nakamura, K. Itoh H. Nakamura and K. Kijima	66
X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Sulfur in Quasi-Drugs and Cosmetics	Y. Nakamura, N. Ohnuki, K. Mori, K. Ito and H. Nakamura	72
Elements Content in Denture Adhesives Materials and Dissolution in Artificial Saliva	K. Ebato and H. Nakamura	77
Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXI) Survey of Formaldehyde Residue in Shape-memory Fabrics	K. Kishimoto, H. Yamanobe, T. Kan and H. Nakamura	81
Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXII) Analysis of Organotin Compounds in Household Necessities by Gas Chromatography	H. Yamanobe, K. Kishimoto, Y. Iwasaki, T. Kan and H. Nakamura	86
Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIII) Determination of Tris (2-chloroethyl) phosphate in Wall Paper and Flame Retardant Household Products by Gas Chromatography	T. Kan, Y. Iwasaki, H. Yamanobe and H. Nakamura	90

REPORTS III PAPERS ON FOOD HYGIENE

Evaluation of Colony Counting Ability by Commercial Agar Medium for the Examination of Coliform Group	F. Umeki	97
Contents of Non-Volatile Amines in Fermented Foods (I)	A. Ibe, H. Kamimura, S. Tabata, K. Hayano and Y. Tamura	102
Determination of Food Coal-Tar Dyes by High Performance Liquid Chromatography	K. Nakazawa, Y. Shimamura, K. Nakajima, Y. Kikuchi K. Nakagome, and Y. Tamura	108
Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (XII)—1994—	M. Kammuri, K. Kan, H. Hashimoto, T. Maki and Y. Tamura	115
Radioactive Contamination in Imported Foods (VI)—Apr. 1994 ~ Mar. 1995—	K. Kan, M. Kammuri, H. Hashimoto, T. Maki and Y. Tamura	120
Survey of Pesticide Residues in Imported Crops — Apr. 1994 ~ Mar. 1995—	M. Kobayashi, T. Nagayama, M. Ito, Y. Tamura, H. Shioda and Y. Tamura	127
Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits — Apr. 1994 ~ Mar. 1995—	M. Ito, T. Nagayama, M. Kobayashi, Y. Tamura H. Shioda and Y. Tamura	134

Survey on Qualities of Foods and Food Additives for Improving the Cooking Properties of Rice Grains	K. Funayama, T. Yasuno, M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu Y. Sadamasu, K. Yasuda and S. Suzuki	140
Systematic Identification of Rubbers by Infrared Spectra of Pyrolysis Products	Y. Watanabe and R. Kaneko	147
Identification of Isoprene-Butadiene Component Blended Rubber	R. Kaneko, J. Kabashima, Y. Watanabe and S. Suzuki	154
Nutritional Components in Vegetables Cultivated Using Organic Materials	I. Takahashi, T. Yokoyama, H. Sakamaki, F. Ushio, T. Ueta H. Ichikawa, T. Tomomatsu, Y. Katoh, M. Komiya T. Kobayashi and K. Terakado	159

REPORTS IV PAPERS ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Inhalation of Diesel Engine Exhaust Affects Bone Metabolism in Rats	N. Watanabe, S. Ikeda, M. Ohsawa, K. Ohnishi and S. Suzuki	167
Adjuvanticity of Chemical Compounds in Diesel-Exhaust Particles on Specific IgE Antibody Production to Japanese Cedar Pollen Allergen in Mice	T. Suzuki, M. Ishimori, S. Hosaka, S. Ikeda, M. Ohsawa and T. Kanoh	173
Survey of Urinary Thiobarbituric Acid Reactants Value of the Residents Living Near Arterial Road	H. Seto, T. Ohkubo, I. Saito, K. Ohnishi and S. Suzuki	180
Comparison of the Concentrations of NO and NO ₂ by PTIO Method for Long-Term Measurement with the Concentrations by Saltzman Method	H. Onozuka, M. Fukuda, K. Makino, C. Nagashima and K. Ohnishi	185
Determination of Hexacyanoferrate(II) and Hexacyanoferrate(III) by High Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry	J. Nakagawa, Y. Takahashi and Y. Tsuchiya	190
Simultaneous Quantification Analysis of Disinfectant By-Products in Supply Water	N. Hosokawa, J. Nakagawa, Y. Takahashi and Y. Tsuchiya	193
Phytoplankton in the Moats around the Imperial Palace (VI)— <i>Microcystis</i> species—	M.F. Watanabe and Y. Tsuchiya	198

REPORTS V PAPERS ON TOXICOLOGY

Effects of Rokumi-gan Powder on the Antioxidative Functions of the Rat Brain through Oxidative Stress	H. Ichikawa and S. Urano	205
Effect of Water Extract of Rokumigan on Some Known Mutagens	H. Fujita, N. Aoki and M Sasaki	211

Study on the Effects of Rokumi-gan using Experimental Model Mice for Human Disease (I) Clinical and Blood Examination Data on High Leukemia AKR/N Mice	Y. Sakamoto, H. Ando, T. Ikeda A. Ogata , Y. Kubo A. Kojima, H. Takahashi, Y. Tada, K. Tayama A. Nagasawa, S. Hayashida, N. Fukumori, H. Mikuriya N. Yano, K. Yuzawa, S. Yoshida, N. Aoki and M. Sasaki	215
Study on the Effects of Rokumi-gan using Experimental Model Mice for Human Disease (II) Clinical and Blood Examination Data on Autoimmune MRL/lpr Mice	Y. Sakamoto, H. Ando, T. Ikeda, A. Ogata, Y. Kubo A. Kojima, H. Takahashi, Y. Tada, K. Tayama A. Nagasawa, S. Hayashida, N. Fukumori, H. Mikuriya N. Yano, K. Yuzawa, S. Yoshida, N. Aoki and M. Sasaki	225
Toxicity Test of Magnesium Oxide in Rats by Dietary Administration for 13 Weeks	T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa Y. Tada, N. Fukumori, T. Ikeda, H. Takahashi and M. Sasaki	232
Toxicity Test of Juzen-taiho-to in Rats by Dietary Administration for 13 Weeks	T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa Y. Tada , N. Fukumori, T. Ikeda, H. Takahashi Y. Sakamoto and M. Sasaki	243
Cytotoxicity of Propyl Gallate and Related Compounds in Isolated Rat Hepatocytes	Y. Nakagawa and S. Tayama	254
Mutagenicity Test of Food Additives with <i>Salmonella typhimurium</i> TA97 and TA102 (X)	H. Fujita, N. Aoki and M. Sasaki	258
Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (VII) Finestructural Findings of Intravenously Injected Fibers	N. Fukumori, N. Aoki and M. Sasaki	265
Relationship between Litter Size and Body Weight of Offspring of Control Mice in Reproductive Toxicity Studies	T. Tanaka and H. Ichikawa	271
The Feeding to F344 Rats Restricted by Time and a Try for Feeding-study of a Chinese Drug	S. Hayashida and M. Sasaki	274
REPORTS VI PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION		
Effects of Population Movement on Mortality Rates from Lung Cancer after Outbreak of Severe Levels of Air Pollutants	K. Makino	283
Analysis of Water Pollution in Tokyo Bay by LANDSAT-TM Data	S. Ogino, N. Kamiya, K. Ikeda, M. Takeuchi and Y. Tsuchiya	289
Structured Database System of Diseases	K. Ikeda, M. Takeuchi and S. Suzuki	293
A Questionnaire Survey on the Broad Net-Work for Public Health Information in All the Japanese Local Laboratories of Public Health	M. Sasaki, K. Ikeda, N. Kamiya, S. Ogino and M. Takeuchi	301
<Informasion>Public Health Infomation on Internet	N. Kamiya, S. Ogino, M. Takeuchi and M. Sasaki	307

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS	315
THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS	323

報 文 I

感染症等に関する調査研究

REPORTS I

PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

I 感染症等に関する調査研究

本章には感染症に関する9編の論文が掲載されている。このなかには、細菌性食中毒をはじめとする食品媒介感染症起因菌の疫学調査成績と検査法の開発に関する論文が5編、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルスなどのウイルス疾患の疫学調査と精度管理調査結果に関する論文が3編、寄生虫疾患の疫学的検討成績が1編含まれている。

ブドウ球菌食中毒の原因物質であるエンテロトキシンは、その免疫学的特徴などからA、B、C、D及びEの5つの型に分類されている。わが国で発生する食中毒事例の大部分はこのうちのA型毒素産生菌に起因することが明らかにされているが、今回、1984年から1993年までの10年間に都内で発生したブドウ球菌食中毒事例122件からの分離菌株の産生毒素を検討したところ、これまでに発生例の少ないD型毒素単独産生菌による事例が4例存在したことが明らかとなった。本論文では、その4事例の汚染経路を特定するとともに分離菌株がすべてコアグラゼⅡ型の菌であることを明らかにしている。

感染型食中毒の疫学的解析や細菌学的診断法には菌の表在性抗原による血清型別法が応用されている。1990年及び1992年に発生した各1例のウエルシュ菌食中毒事例においては患者糞便から高率に既知血清型に該当しないエンテロトキシン産生ウエルシュ菌が検出された。そこで、分離株を用いて免疫学的検討を実施した結果、事例1は新型2種(TW型61,62)を含む3種の血清型のウエルシュ菌による食中毒事例であり、事例2も新しい血清型(TW型63)による事例であることを明らかにすることができた。他方、1990年から1993年の間に都内で発生した腸炎ビブリオ食中毒の関連検体から分離された血清型O8:K41の菌株についてO及びKの因子血清を作製し、抗原解析を行った。その結果、本血清型は新しい組み合わせの血清型であることを確認した。

過去5年間(1990~1994年)に東京都内で発生した寄生虫感染症のうち、海外からの輸入寄生虫症としてランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムなどの原虫性疾患及び回虫、鞭虫、鉤虫、肝蛭などの蠕虫性疾患が認められた。また、国内感染例として回虫症及びアニサキス症の集団または散发事例に加え、無鉤条虫、米子裂頭条虫、日本海裂頭条虫、大腹殖門条虫などの条虫症の珍しい症例が認められた。これらの寄生虫疾患は1960年から1990年までの30年間には全く報告されていない。今回の結果は、各種寄生虫疾患の復活と増加に注意を払う必要のあることを示唆している。

東京都では都内の登録衛生検査所の検査精度の質的向上を目的として精度管理を実施している。本論文は1988年から1993年の6年間にわたって実施した風疹HI抗体及びエイズ(HIV; HTLV-Ⅲ)抗体検査の精度管理調査の結果をまとめたものである。風疹HI抗体の精度管理においては、陰性血清を陽性と判定した例が延べ3施設でみられたが、それ以外の施設では陽性血清の判定結果も含めて満足すべき結果が得られている。HIV抗体スクリーニング検査の場合は全施設から正しい結果報告が得られた。しかし、確認検査では陰性試料を判定保留とした施設が1ヶ所存在し、陽性試料は延べ45施設のうち1施設で陰性と判定され、5施設で判定保留とされた。

東京都内で1994年11月から1995年3月に発生したインフルエンザ様疾患についてウイルス分離試験ならびに血清学的試験を実施した。その結果、集団かぜ35事例のうち、AH-3型ウイルスによる事例が30集団、B型ウイルスによるものが2集団、アデノウイルス3型の事例が1集団確認された。また、病因不明の2集団は患者の症状などからSRSV(小型球形ウイルス)によるものと推察された。今期分離されたAH-3型ウイルスには、発育鶏卵培養法で分離されず、ニワトリ赤血球に対する凝集能が低いなどの特徴がみられた。

後天性免疫不全症候群（AIDS）患者数の増加が世界的に問題となっている。今回は1994年度に都内各保健所及び南新宿検査相談室受診者を対象に実施したエイズ抗体検査の結果をまとめた。エイズ抗体保有者は全受診者の0.137%と、1992年及び1993年の調査結果に較べてやや高い陽性率であった。

Vibrio cholerae non O1の1血清型である *Vibrio cholerae* O139は、コレラ菌同様に伝染力が強く、コレラ毒素を産生し、コレラ様疾患の原因となる。わが国では、本菌によるコレラ様疾患の発生地域であるインドや東南アジア諸国から生鮮魚介類、特に大量のエビを輸入している。そこで、本菌及びコレラ菌に汚染されたエビ類による危害を未然に防ぐ目的で、エビ類からの本菌及びコレラ菌のPCR法による迅速試験法を検討し、両菌は増菌培養法とPCR法の併用により迅速な検出が可能であることを確認した。

人や動物の髄膜炎や敗血症の原因となる *Listeria monocytogenes* は血清学的に13種類に型別されている。しかし、リステリア症の患者、患畜から分離される本菌の90%以上は1/2a, 1/2b及び4bの3種の血清型に含まれることから、血清型別は本菌の病原性の指標として重視されている。本論文では、*L. monocytogenes* 血清型別のための因子血清作製方法と同時に、今回新たに考案したマイクロプレート凝集試験法の手技を報告している。本法は同時に多数の菌株を簡易・迅速に型別可能なことから食品媒介リステリア症の発生防止に有効な方法と考えられる。

エンテロトキシンD単独産生 黄色ブドウ球菌による食中毒事例

柳川 義勢, 潮田 弘, 橋本 由美, 新垣 正夫,
尾畑 浩魅, 門間 千枝, 甲斐 明美, 楠 淳,
伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄

Enterotoxin D Producing Staphylococcal Food Poisoning in Tokyo

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

Keywords: 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, ブドウ球菌食中毒 Staphylococcal food poisoning, エンテロトキシン Enterotoxin

緒 言

ブドウ球菌食中毒は食品内で黄色ブドウ球菌が産生するエンテロトキシンによって発病する毒素型食中毒である。このエンテロトキシンは毒素の蛋白成分や免疫学的特徴により, A, B, C, DおよびEの5型に分類されている。これまでにわが国で発生したブドウ球菌食中毒の原因菌のエンテロトキシン型は寺山¹⁾, 五十嵐²⁾によりA型が圧倒的に多いことが報告されている。D型毒素についてはA型との複数毒素産生菌による事例が多く, D型単独産生菌による事例は少ない。今回, 1984年から1993年までの10年間に, 東京都内で発生したブドウ球菌食中毒122事例を対象に, 分離菌株のエンテロトキシン型を検討した結果, D型エンテロトキシン単独産生黄色ブドウ球菌による事例が4事例認められた。そこで, これら4事例についての概要と細菌学的検討成績について報告する。

材料および方法

1) 供試菌株

供試菌株は1984年から1993年の10年間に東京都内で発生したブドウ球菌食中毒122事例の原因食品や患者吐物など関連検体から分離保存されていた黄色ブドウ球菌の内, 104事例の由来菌株合計273株を用いた。

2) コアグララーゼ型別法

菌株のコアグララーゼ型別は潮田ら³⁾が報告した簡易型

別法によって行った。すなわち, 5%ウサギ血漿加BHIブイヨンに供試菌を接種し, 37℃20時間培養して得たコアグララーゼ抗原液を用い, 中和反応により型別を行った。

3) エンテロトキシン型別法

エンテロトキシン産生性は供試菌をBHIブイヨン5mlに接種し, 37℃20時間振とう培養した菌液を10,000rpm15分間遠心分離して, その上清について市販のブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット(SET-RPLA「生研」:デンカ生研)と, 当研究所において作成した抗エンテロトキシンE感作ラテックスを用いて逆受身ラテックス凝集反応により行った。また, 一部の菌株については, 市販のエンテロトキシン遺伝子検出用DNAプライマー(島津製作所)を用いたPCR法によっても確認した。

4) プラスミドプロファイル検査

被検菌よりKadoの変法により抽出したプラスミドを, 0.6%アガロースゲルで電気泳動後エチジウムブロマイド染色したものを写真撮影して保有プラスミドのサイズを確認した。

成 績

1) 10年間におけるブドウ球菌食中毒由来株のエンテロトキシン型別とコアグララーゼ型別成績

1984年から1993年までの10年間に, 東京都内で発生し

*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

たブドウ球菌食中毒の年次別発生状況とエンテロトキシン型別成績を事件数で表1に示した。事件発生状況では1984年には事件数24件、患者数1,019名の発生があったものの、その後減少傾向を示し、1993年には年間の発生件数は6件、患者数69名と激減してきた。122事例の内、黄色ブドウ球菌が検出され、分離菌株が保存されていた104事例の食中毒由来菌株273株について、そのコアグララーゼ型別試験およびエンテロトキシン産生性を検討した結果を事件数で表2にまとめた。104事例の内エンテロトキシンA産生菌による事例が60事例(57.7%)と最も多く、A型とB、C、D型の複数毒素産生菌による事例が31事例(29.8%)、B型産生菌事例が9例、エンテロトキシンD産生菌事例が4例であった。

2) エンテロトキシンD産生菌による事例

エンテロトキシンD単独産生菌による4事例の概要を表3に、また、食中毒発生時における細菌学的検査成績と由来菌株の毒素産生性およびコアグララーゼ型別成績を表4に示した。

(1) 事例1

1985年5月に弁当屋から購入した「おにぎり」や「のり弁当」を喫食し、14名中5名が嘔吐、下痢を主症状とする食中毒症状を呈した。検査の結果、患者糞便2検体中1検体からコアグララーゼII型エンテロトキシンD産生黄色ブドウ球菌を検出、参考食品8検体中2検体、施設の拭き取り11検体中7検体からも同一型菌を検出した。なお、菌陽性の食品「おかか」からは 10^2 個/g、「鮭塩

表1. 東京都におけるブドウ球菌食中毒の年次別発生状況と原因菌のエンテロトキシン型

年	事件数 (患者数)	エンテロトキシン型別事件数							未検討
		A	AB	AC	AD	ABD	B	D	
1984	24 (1,019)	13	5	-	-	-	1	-	5
1985	13 (129)	5	-	-	-	-	3	2	3
1986	19 (243)	10	1	-	5	-	1	-	2
1987	13 (153)	4	5	-	-	1	-	1	2
1988	9 (58)	4	2	-	1	-	1	-	1
1989	10 (182)	6	3	-	1	-	-	-	-
1990	12 (455)	4	2	-	1	-	2	-	3
1991	10 (121)	7	-	-	-	-	1	-	2
1992	6 (193)	3	2	-	-	1	-	-	-
1993	6 (69)	4	-	1	-	-	-	1	-
合計	122 (2,622)	60	20	1	8	2	9	4	18

表2. 東京都で発生したブドウ球菌食中毒由来株のエンテロトキシン型とコアグララーゼ型

(1984年~1993年)

エンテロトキシン型	合計	事 件 数							
		コアグララーゼ型							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
A	60	-	5	7	2	-	3	43	-
A, B	20	-	1	1	-	-	-	18	-
A, C	1	-	-	-	-	-	1	-	-
A, D	8	-	1	5	-	-	2	-	-
A, B, D	2	-	1	1	-	-	-	-	-
B	9	-	1	-	-	-	-	8	-
D	4	-	4	-	-	-	-	-	-
合計	104	-	13	14	2	-	6	69	-

表3. エンテロトキシンD型単独産生ブドウ球菌による食中毒事例の概要

調査項目	事例 1	事例 2	事例 3	事例 4
発 生 日	1985, 5, 6.	1985, 7, 31.	1987, 12, 18.	1993, 5, 11.
原 因 施 設	飲食店(弁当)	飲食店(弁当)	飲食店(惣菜)	飲食店(弁当)
喫 食 者 数	14	3	不明	不明
患 者 数	5	3	3	9
推定原因食品	おにぎり・弁当	おにぎり	うなぎ蒲焼	弁当

表4. ブドウ球菌食中毒4事例の細菌検査成績と由来株のエンテロトキシン産生性とコアグララーゼ型

事例No.	検 体	検体数	ブドウ球菌 陽性数	供試 菌株数	毒素産生性			コアグララーゼ型	
					D型	その他	陰性	Ⅱ型	その他
事例 1	食品 (参考品)	8	2	2	2	-	-	2	-
	患者ふん便	2	1	1	1	-	-	1	-
	従事者ふん便	3	0	-					
	ふきとり	11	7	5	4	-	1	5	-
事例 2	食品 (参考品)	5	4	3	2	-	1	3	-
	患者ふん便	3	3	1	1	-	-	1	-
	患者吐物	1	1	1	-	-	1	1	-
	従事者ふん便	4	2	-					
	ふきとり	7	7	7	7	-	-	7	-
事例 3	食品 (残品)	4	2	2	2	-	-	2	-
	食品 (参考品)	7	0	-					
	患者ふん便	2	1	1	1	-	-	1	-
	患者吐物	1	1	1	1	-	-	1	-
	従事者ふん便	10	0	-					
	ふきとり	5	1	1	1	-	-	1	-
事例 4	食品 (残品)	5	5	5	5	-	-	5	-
	食品 (参考品)	23	11	11	11	-	-	11	-
	患者ふん便	8	7	7	7	-	-	7	-
	従事者ふん便	2	1	1	1	-	-	1	-
	ふきとり	10	7	7	7	-	-	7	-

焼き」から300以下/gの黄色ブドウ球菌が検出された。菌の汚染経路としては、調理者の手指や鼻前庭から同一型菌が検出されたことから、手指からの汚染が考えられた。

(2) 事例 2

本事例は1985年7月に弁当屋から購入した「三色おにぎり」を喫食した3名全員が、2時間後に嘔吐を主症状に発症した。患者吐物1検体および糞便3検体からコアグララーゼⅡ型、エンテロトキシンD産生菌を検出した。また、参考食品5検体中「サケおにぎり」(10^8 個/g)、

「ウメおにぎり」(10^6 個/g)、「オカカおにぎり」(10^7 個/g)そして具材の「オカカ」(10^3 個/g)の4検体、更に、従事者の手指、鼻前庭や「おにぎりの成形枠」など施設の拭き取り7検体すべてから同一菌が検出された。菌の汚染経路は事例1と同様手指からの汚染と考えられた。

(3) 事例 3

本事例は1987年12月にスーパーで購入した「うなぎの蒲焼き」を原因食品として家族3名が吐き気、嘔吐を主症状に発症した。原因調査の結果、患者糞便2検体中1検

体や吐物1検体および「うなぎの蒲焼き」やその製造に使用した「蒲焼きのタレ」からコアグラーゼII型エンテロトキシンD産生菌が検出された。また、「うなぎの蒲焼き」からは 10^9 個/gの黄色ブドウ球菌とともに80ng/g, 患者の吐物からも64ng/gのエンテロトキシンDが検出された。本事例の発生原因は焼いたうなぎに黄色ブドウ球菌の汚染した「蒲焼きのタレ」を付け、更に加温陳列している間に原因菌の増殖, 毒素の産生が生じたものと推定された。

(4) 事例4

本事例は1993年5月デパート食品売り場にて調製販売された, ウニやイクラなどの魚介類の入った弁当を購入喫食した10名中9名が, 嘔吐, 下痢, 腹痛など食中毒症状を呈した。原因調査の結果, 患者糞便8検体中7検体, 弁当残品5検体中5検体, 参考食品23検体中「サケフレーク」や「錦糸玉子」など11検体, 施設の拭き取り10検体中, 作業台やフキンなど5検体から, コアグラーゼII型菌が検出された。検出された菌はすべてエンテロトキシンD産生菌であった。また, 弁当残品5検体からは, $10^8 \sim 10^9$ 個/gの原因菌が検出され, この内4検体から8~32ng/gのエンテロトキシンDが検出された。汚染経路としては, 施設内のまな板やふきんなどの調理器具から同一型菌が検出されており, これらの器具からの汚染が考えられた。

以上の4事例における患者の主要症状をまとめてみると, 嘔気(90.0%), 嘔吐(75.0%), 下痢(70.0%), 腹痛(60.0%)で典型的ブドウ球菌食中毒の症状であった。

3) 保有プラスミドの検討

今回調査対象とした4事例由来菌株の保有プラスミド解析の成績を図1に示した。すべての菌株において約90kbのプラスミドのみが検出され, 同一パターンを示した。

考 察

ブドウ球菌食中毒は, エンテロトキシンA産生菌によるものが多いことがよく知られている。1969年から1974年までの6年間に東京都で発生したブドウ球菌食中毒を報告した寺山¹⁾の成績ではエンテロトキシンAによる事件が全体の37.9%を占めており, また, 1986年から1990年の五十嵐²⁾の成績でも44.4%がエンテロトキシンA産生菌であることが報告されている。エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の食中毒が多い傾向は, 米国や英国の調査によっても指摘されており, Holmbergら⁴⁾は米国での調査成績では, エンテロトキシンが確認された29事例中27事例(93.1%)がA型であったことを報告し, 英国

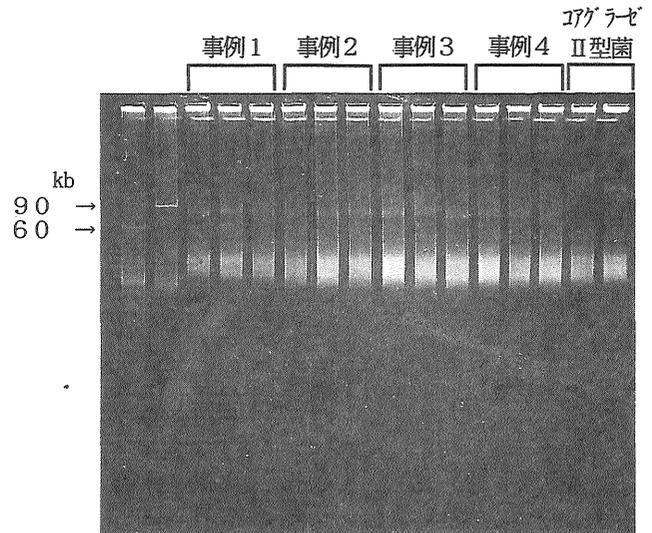


図1. エンテロトキシンD単独産生ブドウ球菌による食中毒事例由来菌株のプラスミド電気泳動像

で1969年から1990年の22年間に発生した357事例の調査成績を報告した Wieneke⁵⁾の成績では, 203事例(56.9%)がA型であったことを報告している。エンテロトキシンA産生菌による事例の多い要因として, 五十嵐ら^{6,7)}は各毒素産生性に対する水分活性の影響を検討した成績から, エンテロトキシンBやエンテロトキシンCの毒素産生には水分活性の影響が強く作用したが, エンテロトキシンAではほとんどその影響は受けないので, エンテロトキシンA産生菌はあらゆる食品中で毒素産生が良好であるからと推定している。五十嵐ら⁸⁾は添加蔗糖濃度を変えたカスタードクリーム中での各毒素産生性を検討した成績でも, エンテロトキシンAの産生量が多く, 添加蔗糖濃度の影響もほとんど受けないことを報告している。また, 寺山ら⁹⁾は原因食品中のエンテロトキシン量を調査した成績でエンテロトキシンAを含む複数の毒素を産生する菌が検出された原因食品でも, その食品から検出されるエンテロトキシンAの量は他の毒素型よりも多いことを報告している。今回報告したD型毒素産生菌による食中毒事例は東京都で発生したブドウ球菌食中毒事例の3.3%に過ぎなかった。この成績は過去の発生頻度とほぼ同じであり, 大きな変動は認められない。また, Wienekeら⁵⁾の英国の報告でもD型毒素産生菌による事例は4.2%とA型菌に比してその発生件数は極めて少ない。一方, 食品中でのD型毒素産生性を検討した Pereiraら¹⁰⁾の報告では, 他の毒素型に比べその産生量は少ないが, 食品中においてヒトが発症するのに十分な量を産生することを確認している。しかし共存する他の菌の存在によりD型毒素産生菌の発育および毒素産生性に

影響があることを指摘している。また、寺山¹⁾の健康人の糞便や各種食品などの黄色ブドウ球菌分布状況を調査した成績でもエンテロトキシンCおよびA産生菌が多く、エンテロトキシンD産生菌汚染率は14%であった。調理従事者の手指および鼻前庭について調査をした入倉¹¹⁾の報告ではエンテロトキシンD単独産生菌はわずかに手指から1件(0.2%)検出したに過ぎない。すなわち、D型毒素産生菌は食品を汚染する頻度が低く、食品中の毒素産生性が水分活性や他の共存菌の影響を強く受けることから、その食中毒例が少ないものと示唆される。

今回調査したD型毒素産生菌のコアグララーゼ型はすべてⅡ型であったが、先の寺山¹⁾が報告した事例原因菌のコアグララーゼ型はⅡ型が5事例、Ⅲ型が3事例、Ⅶ型が1事例であり、特にコアグララーゼ型に偏りがあるものではないと考えられる。

最近、ブドウ球菌感染症の疫学解析にコアグララーゼ型別やエンテロトキシン型に加え、分子遺伝学的手法としてプラスミドプロファイルやパルスフィールド電気泳動によるDNA酵素切断パターン、あるいはリボタイピングなどが応用されている。今回の保有プラスミドの検討成績では、供試菌株すべて約90kbのプラスミドを保有する菌であったが、その事例発生時期や場所から同一由来の菌であるとは考えにくく、今後の疫学解析には、前

述した標識法を加味して、ブドウ球菌食中毒の感染原や感染経路の解析を進める必要があると考えられる。

文 献

- 1) 寺山武：食衛誌，**18**，142-148，1986.
- 2) 五十嵐英夫：食品衛生研究，**43**，31-45，1993
- 3) 潮田弘，寺山武，坂井千三，他：東京衛研年報，**26-1**，1-6，1975.
- 4) Holmberg, S.C. and Blake, P. A.: *JAMA*, **251**, 487-489, 1984.
- 5) Wieneke, A.A., Roberts, D. and Gilbert, R.J.: *Epidemiol Infect.*, **110**, 519-531, 1993.
- 6) 五十嵐英夫，新垣正夫，山田澄夫，他：東京衛研年報，**29-1**，6-12，1978.
- 7) 五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，他：東京衛研年報，**30-1**，111-116，1979.
- 8) 五十嵐英夫，新垣正夫，高橋正樹，他：東京衛研年報，**31-1**，122-126，1980.
- 9) 寺山武，五十嵐英夫：食品衛生研究，**31**，193-201，1981
- 10) Pereira, J.L., Salzberg, S.P. and Bergdoll, M.S.: *Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 19-26, 1991.
- 11) 入倉善久，池島伸至，平田一郎，他：東京衛研年報，**38**，145-149，1987.

新血清型ウェルシュ菌による集団食中毒 2 事例の細菌学的検討

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

Bacteriological Investigation of Two Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens* of New Serotype

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

Keywords: ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens*, 食中毒 Food poisoning, 新血清型 new serotype

はじめに

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 食中毒の疫学的解析や細菌学的診断法としてウェルシュ菌の表在性抗原による血清型別法が広く利用されてきた。本菌の血清型としては1953年にHobbsらによって開発されたシステム(Hobbs型)があり¹⁻³⁾, わが国でも本血清型診断用血清Hobbs型1~17が市販されている。当研究所においても食中毒発生時の細菌学的診断の一手段として, 分離菌を対象にHobbsの血清型別を実施してきた。1972年, 伊藤は健康者が保菌するウェルシュ菌の大多数がHobbsの血清型に該当しないことからHobbsの血清型をさらに拡大し, 新たに1~56型を追加してこれをTWの血清型(TW型)と称した⁴⁾。食中毒由来株の中にもこのTWの血清型に該当する菌株が多数認められ, 当研究所では食中毒発生時の細菌学的検査にHobbsとTWの血清型の両者を併用してきた。しかし, その後TW型1~56以外の新血清型によるウェルシュ菌食中毒事例も認められ, 1989年までにさらにTW型に4血清型が追加された。

1990年と1992年に東京都内で発生した食中毒各1事例は, これらのHobbsやTWの血清型のどれにも該当しない新血清型ウェルシュ菌によるものであった。本報では, これらの事例の疫学的概要と細菌学的検査成績について報告する。

検査材料及び方法

1. 細菌学的検査

食中毒発生時に採取された患者ふん便, 非発症者ふん便, 推定原因食品等を対象に, 常法⁵⁾に従ってウェルシュ菌の検査を行った。

ふん便材料の場合, TGC培地(日水製薬)に約1g接種し, 100℃, 10分間加熱して, 37℃, 20~48時間好気条件下で培養した。発育が認められたTGC培地から10%卵黄加カナマイシンCW寒天培地(日水製薬)を用い分離培養を行い, 嫌気条件下で37℃, 18~24時間培養した。CW寒天培地上に発育した典型的なウェルシュ菌集落を1検体あたり3~10集落釣菌し, α 抗毒素ろ紙(日水製薬)を用いて, レシチナーゼ反応抑制試験を実施して同定した。食品や器具器材などの拭き取り材料については加熱なしでTGC培地による増菌培養を行い, ウェルシュ菌を分離した。

2. 分離菌の血清型別試験

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⁴⁾60種類を用いて, スライド凝集反応で行った。

3. 新型抗血清の作製

検出菌のうちHobbs型及びTW型の型別血清のいずれにも該当しなかった菌株で, かつエンテロトキシン産生

*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

株の中から代表株を選び抗血清を作製した。変法GAM寒天培地(日水製薬)で18時間嫌気培養後、得られた菌苔を0.6%ホルマリン加生理食塩水に浮遊させたものを免疫用抗原とした。接種抗原液は抗原を生理食塩水にMcFARLAND No. 5の濃度で再浮遊させ用いた。ウサギ耳静脈に抗原液を常法に従って1週間ごとに4回接種し、抗体価の上昇を確認後採血して抗血清を調整した。得られた抗血清に対して既知のHobbs型やTW型の型別抗原との類属反応性をスライドグラス凝集反応によって検討した。吸収試験は伊藤の報告⁴⁾に従って実施した。

4. 分離菌のエンテロトキシン産生試験

エンテロトキシン産生試験は、大谷らの報告した変法DS培地⁶⁾を用い、以下の方法で行った。供試菌株を37℃、18~24時間嫌気条件下で培養後、位相差顕微鏡下で芽胞状態を確認すると共に培養液を3,000rpm、15分間遠心した。その上清中のエンテロトキシンを市販のラテックス凝集キット(PET-RPLA「生研」, デンカ生研)を用いて調べた。

検査成績

I. 事例1

1. 疫学的調査成績

本事例は1990年7月29日、高齢者医療施設で877名中

103名の患者の発生をみた例である。患者の主要症状は、軟便や水様便の下痢がほとんどであり、これまでのウェルシュ菌食中毒患者の症状に類似していたが、腹痛の発現頻度が8.7%(9名)と極めて低かった。初発患者が喫食後10時間、遅い例で20時間後に発症し、潜伏時間のピークは11~12時間であった。同施設内は1日3回の給食が実施されていた。疫学調査や検食の細菌学的成績から7月28日夕食に提供された「小松菜とえのきたけの煮びたし」が原因食品と推定された(表1)。

2. 細菌学的検査成績

1) ウェルシュ菌検出状況

患者ふん便101検体中46件(45.5%)からウェルシュ菌が検出され、そのうち32件(31.7%)がエンテロトキシン陽性であった。また、調理従事者ふん便からも8件(21%)からウェルシュ菌が検出された。検食として保管されていた食品25件のうち1件「小松菜とえのきたけの煮びたし」からエンテロトキシン産生ウェルシュ菌を検出した(表2)。

2) ウェルシュ菌の血清型別検査成績

ふん便と食品から検出されたエンテロトキシン産生ウェルシュ菌64菌株を対象にHobbs型(1~17)及びTW型(1~60)による型別を実施した結果、TW型6が13株、

表1. 新血清型 *C. perfringens* 食中毒 2 事例の概略

	事例 1	事例 2
発生年月日	1990年 7月29日 5:00~12:00	1992年12月 2日 22:00~4日 13:00
原因施設	高齢者医療施設	飲食店
患者数/喫食者数(発症率)	103名/877名(11.7%)	30名/160名(18.75%)
潜伏時間	10時間~20時間(平均11時間)	3時間~43時間(平均12時間)
主要症状	下痢(99.9%)	下痢(90.0%), 腹痛(76.7%)
原因食品	給食(小松菜とえのきたけの煮びたし)	宴会料理

表2. 事例1における患者及び関連検体からの *C. perfringens* 検出成績

検査材料	検体数	<i>C. perfringens</i> 検出件数	エンテロトキシン産生 <i>C. perfringens</i> 検出件数(%)	血清型別 供試菌株数	血清型別 可能菌株数 ²⁾	血清型別 不可能菌株数
ふん便: 患者	101	46(45.5)	32(31.7)	53	11	42
非発症者	12	0	-	-	-	-
従業員	38	8(21.1)	8(21.1)	10	4	6
食品(検食)	25	1(4.0) ¹⁾	1(4.0) ¹⁾	1	-	1
水(調理場, 使用水)	1	0	-	-	-	-
拭き取り	13	0	-	-	-	-

¹⁾小松菜とえのきたけの煮びたし

²⁾Hobbsの血清型1~17型, TWの血清型1~60型

TW型11が2株で、残りの49菌株は型別不能であった(表2)。型別不能株のうち、患者ふん便から検出されたエンテロトキシン産生ウェルシュ菌株W3484とW3493を選び家兎によるホルマリン死菌免疫血清を作製した。得られた各抗血清について交差凝集反応や吸収試験を行った結果、新たに2つの型別血清を作製することができた。W3484で得られた血清型をTW型61、W3493で得られた血清型をTW型62とした。

型別不能菌株49株についてTW型61及びTW型62の抗血清により型別を実施した結果、TW型61該当株が40株、TW型62該当株が9株であった。

また、ふん便からエンテロトキシン産生ウェルシュ菌の4種類の血清型のいずれか1種類が検出された例が40件中32件で、他の8件は2種類の血清型が検出された。食品からの検出菌の血清型はTW型61であった(表3)。

II. 事例2

1. 疫学的調査成績

本事例は1992年12月2日に飲食店において立食パーティに出席した16グループ中1グループ、160名中の30名がその日の深夜から翌日にかけて食中毒症状を呈した

表3. 事例1において検出されたエンテロトキシン産生性 *C. perfringens* の血清型

由 来	血清型別 供試菌株数	既知の血清型		新血清型	
		TW6	TW11	TW61	TW62
ふん便：患者 ¹⁾	53	11	0	35	7
従業員 ²⁾	10	2	2	4	2
原因食品	1	0	0	1	0
合 計	64	13	2	40	9

¹⁾患者5名からTW型6とTW型61、2名からTW型61とTW型62の複数血清型菌が検出された。

²⁾従業員1名からTW型11とTW型61の複数血清型菌が検出された。

例である。患者は典型的なウェルシュ菌食中毒の症状であった。潜伏時間3時間～43時間で、そのピークは12時間前後であった。この事例では疫学調査からパーティに提供された食事が原因と考えられたが、食品を特定することはできなかった(表1)。

2. 細菌学的検査成績

1) ウェルシュ菌検出状況

発症後4日～6日後に採取された患者ふん便22件中10件、非発症者ふん便5件中1件からエンテロトキシン産生ウェルシュ菌が検出された。調理従事者ふん便3件からはウェルシュ菌が検出されたが、いずれもエンテロトキシン非産生菌であった。発症グループのみに提供された給食の検食29件、拭き取り59件からウェルシュ菌は検出されなかった(表4)。

2) ウェルシュ菌の血清型別検査成績

患者及び非発症者から検出されたエンテロトキシン産生ウェルシュ菌32菌株の血清型はHobbs型13該当株2株(1件)、TW型48該当株3株(1件)で残りの27株は型別不能であった。型別不能株のうち代表株としてW3798を家兎に免疫し、得られた抗血清に対して交差凝集反応及び吸収試験を行った。Hobbs型1～17、TW型1～62に該当しないことを確認して新たにTW型63とした。

型別不能株の27菌株は全てTW型63に型別された(表5)。

表5. 事例2において検出されたエンテロトキシン産生性 *C. perfringens* の血清型

由 来	血清型別 供試菌株数	既知の血清型		新血清型
		Hobbs13	TW48	TW63
ふん便：患者	31	2	3	26
非発症者	1	0	0	1
合 計	32	2	3	27

表4. 事例2における患者及び関連検体からの *C. perfringens* 検出成績

検査材料	検体数	<i>C. perfringens</i> 検出件数	エンテロトキシン産生 <i>C. perfringens</i> 検出件数(%)	血清型別	血清型別	血清型別
				供試菌株数	可能菌株数 ¹⁾	不可能菌株数
ふん便：患者	22	13(59.1)	10(45.4)	31	5	26
非発症者	5	3(60.0)	1(20.0)	1	0	1
従業員	13	3(23.1)	-	-	-	-
食品(検食)	29	0	-	-	-	-
拭き取り	59	0	-	-	-	-

¹⁾Hobbsの血清型1～17型、TWの血清型1～60型

考 察

わが国におけるウェルシュ菌食中毒は年間約15件発生し、その比率は細菌性食中毒発生件数の約3%と低率であるが、大規模に発生する傾向が高く患者数では全体の約7%を占めている。

東京都では1963年から食中毒の原因究明にウェルシュ菌も対象にして菌検索を行い、1994年までの12年間に59事例のウェルシュ菌食中毒を明らかにしてきた。分離菌株については、感染源や原因食品の究明のために英国で発生したウェルシュ菌食中毒事例をもとに構築されたHobbsの血清型(1~17)や伊藤が新たに追加したTWの血清型(1~56)による型別を実施してきた。さらに、これらの血清型に該当しないウェルシュ菌食中毒事例が発見されると、随時にTWの血清型を追加してきた。

これらの血清型別法を用いて解析したところ、1994年までに東京都内で発生したウェルシュ菌食中毒59事例の原因菌の血清型は、Hobbs型に該当した事例が32例、TW型該当事例が22例でHobbs型とTW型の混合事例が5例と、TW型に該当する事例が東京都内で発生したウェルシュ菌食中毒の45.8%を占めることが明らかになった。Hobbs型に型別されたものでは1~17のうち13種類の血清型が認められ、1型、4型、6型、13型が高頻度に検出された血清型であった。Hobbs型9、11、16、17はこれまで東京都内で発生が見られない血清型である。TW型では、2型、6型、11型、40型等計14菌型が認められ、原因菌型は特定の血清型に片寄る傾向がみられた⁷⁾。これらのことから、TW型はHobbs型と同様にウェルシュ菌食中毒の疫学解析の手段として十分に応用できる血清型であると考えられる。しかし今回、2事例のウェルシュ菌食中毒由来株がこれまでのHobbs型及びTW型に該当しないことから、さらに免疫血清を作製して抗原の特異性を検討し、新たに3種類の血清型、すなわちTW型61、62、63を追加することができた。

同一事例ではその多くが同一血清型菌が原因であるが、11事例は2~3種類の血清型菌が原因となっている。今回の事例1でも、TW型6、11、61、62の4種類のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌が検出されている。しかし、患者ふん便からTW型11は検出されていないので、TW型6、61、62の3菌型が原因菌型と考えられた。

現在は腸炎起病性ウェルシュ菌はエンテロトキシン産生株であることが判明している⁸⁻¹⁰⁾。エンテロトキシン

産生株を基準にした血清型システムの再編成が必要であり、Hobbs型とTW型を含めて再検討しなければならない。

結 論

1990年7月に高齢者医療施設の給食を原因として、また1992年12月に立食パーティの会食料理を原因として発生したウェルシュ菌食中毒2事例は患者ふん便や原因食品の細菌学的検索の結果、従来のHobbs型(1~17)及びTW型(1~60)に該当しない新血清型ウェルシュ菌が原因菌であると考えられた。両事例から検出された血清型別不能のエンテロトキシン産生ウェルシュ菌株を対象に免疫血清を作製し、型別を行った。その結果、高齢者医療施設の事例が従来のTW型6の他にTW型61とTW型62、立食パーティの事例がTW型63によって発生したことを明らかにすると同時にこれらの3種類の血清型を新たにTW血清型に追加することができた。

謝 辞

本事例について疫学的調査資料を提供していただきました東京都衛生局環境衛生部食品衛生課食中毒調査係、板橋区衛生部、千代田区衛生部の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Hobbs, B.C., Smith, M.E., Oakley, C.L. et al.: *J. Hyg.*, **51**, 75-101, 1953.
- 2) Hughes, J.A., Turnbull, P.C.B. and Stringer, M.F.: *J. Med. Microbiol.*, **9**, 475-485, 1976.
- 3) Stringer, M.F., Watson, G.N. and Gilbert, R.J.: *J. Hyg.*, **84**, 443-456, 1980.
- 4) 伊藤 武: 東京衛研年報, **34**, 7-39, 1972.
- 5) 坂井千三, 太田建爾: 一般検査体系, 微生物検査必携編集委員会編, 微生物検査必携, 細菌・真菌検査, 第3版, D2-D23, 1987, 日本公衆衛生協会, 東京.
- 6) 大谷仁己, 氏家淳雄: 食衛誌, **28**, 281-285, 1987.
- 7) 伊藤 武, 坂井千三: ウェルシュ菌, 食中毒II, 坂崎利一編, 306-337, 1983, 中央法規出版, 東京.
- 8) Duncan, C.L. and Strong, D.H.: *Infect. Immun.*, **3**, 137-170, 1971.
- 9) Hauschild, A.H.W., Walcroft, M.J. and Campbell, W.: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 1141-1143, 1971.
- 10) Strong, D.H., Duncan, C.L. and Perria, G.: *Infect. Immun.*, **3**, 171-178, 1971.

腸炎ビブリオ血清型 O8 : K41 の抗原解析に関する検討

庭山 邦子

Antigenic Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Serovar O8 : K41 Isolated from Foodborn Diseases Outbreak

KUNIKO NIWAYAMA

Keywords : *Vibrio parahaemolyticus*, Serovar, Foodborn disease

はじめに

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* の食中毒事件において、その感染経路および原因食品の究明などの疫学解析には、本菌の同定後、標識試験として耐熱性溶血毒素産生性試験と共に、O 及び K 抗原に基づく血清型別法が有効であり公衆衛生分野で、重視されている。今回、東京都に届けられた本菌による食中毒事例から、これまでにほとんど報告されていない血清型 O8 : K41 株が分離されたので、本菌型が新しい組み合わせの血清型であるかを解明するため、本菌株を対象に O 群および K 抗原の特異抗血清を作成し、抗原性の検討を行った。

実験材料および方法

1. 供試菌株

1990年から1993年の間に当研究科において食中毒関連検体より分離された腸炎ビブリオで、O8 : K41 に血清型別された8株を実験に供した。このうち抗血清の作成に用いた91-216株は、冷凍むきえびを推定原因食品とし218名の患者発生があった際に¹⁾、原因菌型と推定された20種類の血清型(O1 : K38, O1 : K56, O3 : K29, O3 : K54, O4 : K8, それに、O4 : K63等)の中で、患者糞便から検出された1菌株である。吸収試験には、血清型別用のパイロット株O8 : K20, O1 : K41, それにO2 : K3の3菌株を使用した。

パイロット株以外のO群の菌株は、当研究科で分離されたO3 : K54(患者由来), O4 : K8(患者由来), O5 : K15(患者由来), O6 : K18(患者由来), O7 : K19(食品由来), O9 : K55(食品由来), O10 : K24(ふき取り由来), それにO11 : K50(患者由来)を使用した。

2. 免疫血清の作成

抗O因子特異血清は Burrows et al.²⁾, ら³⁾の方法を適用し、抗K因子特異血清は善養寺⁴⁾の方法に従い作成した。

1) 抗原の調整

O抗原： 3%トリプチケースソイ寒天(BBL)平板上でS型を示した91-216株を3%食塩加普通寒天培地に塗沫し、37℃, 18時間培養後、3%食塩液へ集菌、100℃, 2.5時間加熱した。その後、3%食塩液で3回洗浄し、40mg(湿菌量)/mlとした菌液を免疫原とした。

K抗原： 3%食塩加ブレインハートインフュージョン(BHI)ブイオンに2代以上継代培養した91-216株を、3%食塩加BHI(Difco)寒天平板に37℃, 20時間培養した。3%食塩液に集菌、浮遊し、0.25%の割合でホルマリンを加え、37℃, 20時間放置して滅菌した。

3%食塩液で2回洗浄し、10mg(湿菌量)/mlとなるよう同液に浮遊し、免疫原とした。

2) 免疫方法

抗O血清は、約2kgの家兔に4日間の間隔で6回免疫抗原を投与した。つまり、第1回と第2回は、各0.5ml, 1.0mlを腹腔内投与し、第3回から第6回までは0.5ml, 1.0ml, 2.0ml, および3.0mlを耳静脈投与した。最終免疫から1週間後に予備採血をし、凝集素価を調べ、翌日全採血し、血清を得た。

抗K血清は、同じく約2kgの家兔に、準備したホルマリン処理抗原を4日間隔で0.5ml, 1.0ml, 2.0ml, および4.0mlを耳静脈投与した。予備採血を最終免疫の1週間後に行い、凝集素価が低いとため4.0mlを2回、同じ間隔で追加免疫し、最終免疫の1週間後に全採血し、血清を得た。

3) 吸収試験

抗O 8および抗K 41因子血清の作製法： 抗O 8因子血清は、上記の免疫によって得られた抗O血清1.0mlに、3%食塩液2.0mlを加え三輪谷ら³⁾の報告に従いパイロット株O 2 : K 3の2.5時間加熱処理したO抗原液(湿菌量約100mg) 2 mlとよく混和させた。37℃、20時間反応させ、その後4℃に一夜放置後、5000rpm30分間遠心分離し、上清の抗O 8因子血清を作製した。

抗K 41因子血清は、同じく家兔免疫によって得た抗K血清にO群が同一のパイロット株O 8 : K 20の加熱処理O抗原を混和し、37℃、20時間反応し、4℃で一夜放置後、遠心分離し上清の抗K 41因子血清を得た。

O 8およびK 41抗原の吸収： 得られた抗O 8因子血清に免疫抗原である91-216株の加熱O 8抗原あるいはパイロット株O 8 : K 20のO抗原を添加して、上記と同様にO抗体の吸収を行った。抗K 41因子血清には免疫抗原である91-216株のK抗原あるいはパイロット株O 1 : K 41のK抗原についてK抗体の吸収を行った。なお、O群およびK抗原の型別には市販の診断用抗血清(デンカ生研)を使用した。

3. 凝集素価の測定法

ヴィダール反応に準じて行う。抗O因子特異血清と3%食塩液で100倍希釈から2倍段階希釈で3, 200倍まで希釈し、1 mg/ml濃度の菌液を等量加え、50℃の湯浴中で一夜反応させ、凝集の有無を判定した。抗K因子特異血清は20倍希釈から2倍段階希釈で640倍まで希釈し、37℃、2時間反応させ、その後、一夜4℃に放置し凝集の有無を判定した。

4. 耐熱性溶血毒素産生性試験

2代以上継代培養した腸炎ビブリオ菌株を5%食塩加マンニトペプトン水に接種し、37℃、18時間振とう培養後、遠心分離した上清を2倍段階希釈し、市販の「腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒素検出用キット」(デンカ生研)で逆受け身ラテックス凝集反応法(R.P.L.A法)を行った。室温で20時間反応後、凝集の有無を判定した。

結果および考察

1. 91-216株のO群およびK抗原の検討

O群： 吸収試験により作製した抗O因子血清は、免疫抗原作成に用いた91-216株とは1600倍の凝集素価を示し、パイロット株のO 8 : K 20株とは800倍の凝集素価であった(表1)。O 1 ~ O 11(O 8を除く)の各抗原との凝集反応はいずれも陰性であった。さらに、パイロット株O 8 : K 20のO抗原で吸収試験を行った結果、吸収血清は91-216株とは凝集しなかった。

表1. 91-216株のO群の検討成績

O群 (加熱処理抗原)	抗血清に対する凝集素価	
	91-216株の O因子血清	91-216株の O因子血清をO 8で吸収
91-216株	1 : 1600	—
パイロット株 O 8 : K 20	1 : 800	—
O 1 ~ O 11 (O 8を除く)	—	N T
— : 凝集素価 100倍以下, N T : 未検討		

表2. 91-216株のK抗原の検討成績

K抗原	抗血清に対する凝集素価	
	91-216株の K因子血清	91-216株の K因子血清をK 41で吸収
91-216株	1 : 160	—
パイロット株 O 1 : K 41	1 : 320	—
— : 凝集素価 20倍以下		

K抗原： 91-216株の抗K因子血清については、免疫用K抗原に対しては160倍の凝集素価であり、パイロット株のO 1 : K 41株とでは320倍の凝集が認められた。91-216株のK因子血清をK 41(O 1 : K 41株)で吸収試験を行った結果、91-216株のK抗原とは凝集が認められなかった(表2)。このことより、抗原解析に使用した91-216株はO 8 : K 41の血清型であることが判明した。

2. 腸炎ビブリオ血清型O 8 : K 41の出現状況

1990年から1993年に食中毒関連検体から分離された腸炎ビブリオ菌株のうち血清型O 8 : K 41に型別された菌株は8株認められた。表3に示す通り、O 8 : K 41該当菌株の抗O 8因子血清に対する凝集素価は800倍から1600倍であり、91-216株のO凝集素価とはほぼ同一であった。抗K 41因子血清に対する凝集反応は40倍から160倍の凝集素価であった。

昭和25年に、塩分を含む食品を原因として食中毒が発生し、腸炎ビブリオを原因菌とすることが世界で初めて日本において解明され、命名されて以来^{5), 6)}、本菌による食中毒の原因究明はめざましく進められてきた。その中で、腸炎ビブリオ食中毒の汚染経路および原因食品の解明に有効な血清型は、O群がO 1 ~ O 11の11種類、K抗原はK 1 ~ K 75の68種類に区別されており、O群とK抗原の組み合わせにより腸炎ビブリオを型別している。菌体抗原であるO抗原と菌体の表層抗原であるK抗原と

表3. 食中毒関連検体由来株の抗O8および抗K41因子血清に対する凝集素価

供試菌株	分離年	由来	耐熱性溶血毒素	凝集素価	
				抗O8因子血清	抗K41因子血清
91-216*	1991	患者	+	1:1600	1:160
90-260	1990	患者	+	1:800	1:80
91-152	1991	患者	+	1:1600	1:160
91-245	1991	患者	—	1:1600	1:160
92-30	1992	患者	+	1:800	1:160
92-42	1992	患者	+	1:800	1:80
93-17	1993	患者	+	1:1600	1:160
93-18	1993	患者	+	1:800	1:40

*: 今回、特異血清を作成するのに用いた菌株

の間に、一定の組み合わせが確認されているが、今回検討した91-216株はK抗原が41であり、従来のO群との関連ではO1群と推定される。しかし、免疫血清を作成し、91-216株のO抗原を確認した結果、O8であることが判明した。長年の食中毒事例からは、これまでに確認されている68種類のK抗原には該当しない新しい血清型⁷⁾、あるいはO群別されてもK抗原が型別不能な腸炎ビブリオ菌株が自然界に存在しており⁷⁾、これまでもO群とK抗原の組み合わせが従来の一定の関連とは異なるものが13種類認められてきた。今回確認したO8:K41の血清型については、これまで8株を明らかにすることが出来た。当研究科における食中毒関連検体からのO8:K41の年次別出現状況は、今回検討した1990年から1993年までに、1990年に1株(90-260)、1991年に3株(91-152, 91-216, 91-245)、1992年に2株(92-30, 92-42)、それに、1993年に2株(93-17, 93-18)の合計8株が分離されている。1964年から1994年までの31年間では⁸⁻¹¹⁾、東京都の腸炎ビブリオ食中毒事例からはO8:K41の血清型は、1976年、1984年にそれぞれ1株、1985年に2株分離されているにすぎず、近年になって多く出現してきたものと考えられる。いずれも患者糞便から検出された菌株であるが、それぞれの食中毒事例の主要原因血清型ではなかった。東京都内で発生した食中毒事件以外、国内の旅行先で感染した例も最近含まれている。古屋ら¹²⁾は、1991年に静岡県においてO8:K41に型別された腸炎ビブリオをタイ旅行者1例、および国内散发下痢症例2例の合計3例を報告している。血清型O8:K41の腸炎ビブリオは、いまのところそれほど多く出現する菌ではないが、1984年から1989年の海外旅行者からの分離報告¹³⁾や海外旅行時の感染も認められていることから、

わが国はもとより東南アジアなどにも広く分布するものと推定される。

結 論

1991年に東京都内で発生した食中毒患者から分離された腸炎ビブリオ91-216株の免疫血清を作成し、O抗原およびK抗原の検討を行った結果、これまでに報告例の少ないO8:K41の新しい組み合わせの血清型であることを明らかにした。O8:K41の血清型を示す腸炎ビブリオは、1990年から1993年の間に腸炎ビブリオ食中毒事例の関連検体から合計8株認められた。

要 旨

食中毒関連検体から、新しい組み合わせの血清型を示すO8:K41株が分離された。今回、1990年から1993年の間に分離された合計8株についてOおよびKの抗因子血清を作成し、抗原解析を行った。抗O因子血清は免疫に用いたO抗原と1600倍の凝集素価を示し、抗K因子血清はK抗原と160倍の凝集素価を示した。O8以外の他のO群との間で凝集は見られず、O8:K41は新血清型と判明した(提案する)。

文 献

- 1) 東京都衛生局生活環境部食品保健課, 平成3年 東京都の食中毒概要, 48-49, 平成4年, 東京.
- 2) Burrows, W., Mather, A.N., Macgann, V.G., ; J. Infect. Dis. **79**, 168-197, 1946.
- 3) 三輪谷 俊夫: 型別抗血清, 腸管感染症研究会編, 感染モデルの組み方, 240-250, 1973, 近代出版, 東京.
- 4) 善養寺 浩, 寺山 武, 工藤 泰雄 他: 日細菌誌, **26**, 298-301, 1971.
- 5) 三輪谷 俊夫, 大橋 誠 監修: 腸炎ビブリオ 第

- Ⅲ集, 2-23. 1990, 近代出版, 東京.
- 6) Okudaira, M., Kawamura, H., Ueno, M., et al.,
; Acta Pathol. Japo, **12**, 299-304, 1962.
 - 7) 伊藤 武, 津野 正朗, 太田 建爾 他: 日細菌誌,
36, 593, 1981.
 - 8) 工藤 泰雄, 太田 建爾, 池島 伸 他: 東京衛研
年報, **22**, 15-20, 1971.
 - 9) 工藤 泰雄, 太田 建爾, 齊藤 香彦 他: 東京衛
研年報, **26**, 25-29, 1975.
 - 10) 工藤 泰雄, 津野 正朗, 太田 建爾 他: 東京衛
研年報, **29-1**, 15-19, 1983.
 - 11) 津野 正朗, 太田 建爾, 山田 澄夫 他: 東京衛
研年報, **34**, 15-19, 1983.
 - 12) 古屋 洋一, 塩沢 寛治, 窪田 勉 他: 病原微生物
検出情報(月報), 14(NO.158), 72, 1993.
 - 13) 三輪谷 俊夫, 大橋 誠 監修: 腸炎ビブリオ 第
集, 42, 1990, 近代出版, 東京.

東京都における1990年から1994年の5年間に同定された寄生原虫・蠕虫の感染源調査

村田 以和夫*, 榎田 隆一*, 鈴木 淳*, 池田 正幸**

Case study on Protozoa and Helminthes Identified in Tokyo during 1990 to 1994

IWAO MURATA*, RYUICHI ENOKIDA*, JUN SUZUKI*
and MASAYUKI IKEDA**

Keywords: 寄生原虫および蠕虫の同定 Identification of protozoa and helminthes, 感染源調査 Case study, 形態学 Morphology, 東京 Tokyo, 1990-1994

はじめに

近年、海外渡航者および外国人の入国者数はそれぞれ1,000万人台および250万人台を越え、外国人就労者数も約25万人と推定されている。一方、輸入農産物および魚介類の数量も飛躍的な伸びを示し、高度経済成長期以来のグルメブームと鮮魚、活魚など輸送方法の発達が呼応して、刺し身、たたき、酢じめ等生食嗜好が広まってきた。その結果、過去30年間に研修用の新鮮な寄生虫標本の収集にも困難を極めていたにもかかわらず、1990年代に入ると海外において感染し国内に持ち込むか、あるいは外国人が持ち込むいわゆる「輸入寄生虫症」や輸入または国内産の肉・魚介類の生食に起因する各種の寄生虫症、および寄生率が戦後80%台から1980年代には0.02%台にまで低下した回虫症の復活傾向や、ペットを介しての人畜共通寄生虫疾患の増加が目立つようになった。

そこで今回は、1990年以降当所で取り扱った寄生虫の虫種鑑別試験および苦情品から見いだされた寄生虫の同定成績について写真1~19を添えて報告する。また、感染源に関する聞き取り調査の結果、1. 海外からの輸入寄生虫(症)、2. 無農薬・有機栽培野菜から感染する寄生虫、3. グルメブームがもたらす食品媒介寄生虫、4. ペットおよび汚染環境から感染する寄生虫の4群に大別されるのでそれぞれ文献的考察を加えた。

材料および方法

1. 材料標本: 中国人の日本語学校就学生の検便177件、中国残留家族の検便3件、海外渡航者および赤痢アメーバ患者関係者検便1,208件、排泄虫体および苦情品

からの寄生虫鑑別試験38件、輸入野菜および無農薬・有機栽培野菜の虫卵検査1,140件および公園、学校、保育園などの砂場の砂からの虫卵検査45件、合計2,611件から検出・同定された寄生原虫および蠕虫である。今回見いだされた寄生虫の標本を写真1~19に示す。

2. 方法: 1) 便からの虫卵検査は直接塗抹法とホルマリン・エーテル法による集卵法を併用した。¹⁾ 2) 検便による原虫検査はスクリーニングにヨード・ヨードカリ染色法¹⁾、確定にはコーン染色変法 Kohn's one step staining method²⁾およびクリプトスポリジウム *Cryptosporidium* のオーシストの検出には井関の抗酸染色変法³⁾を用いた。3) 輸入野菜および有機栽培野菜、砂の洗浄液沈渣からの虫卵検査には硫酸マグネシウム・食塩水(比重1.24)による浮遊法¹⁾を用いた。4) 排出虫体および苦情品からの新鮮虫体は生検により、ホルマリン固定標本の線虫類はグリセリン・エタノールまたはラクトフェノール透徹法⁴⁾により外皮を透化してから、また条虫類は圧平標本とし、カルミン染色を施した後、光学および実体顕微鏡下で形態学的に検討した。

成 績

I 海外からの輸入寄生虫(症) (写真1~7,9)

1. 1990年の東京都中野保健所管内の日本語学校就学生・中国人177名の寄生虫卵保有状況調査では、鞭虫 *Trichuris trichura* 単独寄生30例(16.9%)、回虫 *Ascaris lumbricoides* 単独寄生12例(6.7%)、回虫+鞭虫混合寄生6例(3.4%)、ズビニ鉤虫 *Ancylostoma doudenale*+鞭虫混合寄生2例(1.1%)、ズビニ鉤虫単独寄生2例(1.1%)、

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第二科 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

**中野区衛生試験所

および肝蛭 *Fasciola hepatica* + 鉤虫 + 鞭虫 1 例 (0.6%), 虫卵陽性数(率)は全体で53例 (29.9%)を示した。今回, ウシの胆管に寄生する肝蛭卵が見いだされたことが特筆される。2. 過去5年間に2名の感染者から自然排虫された成虫の2例が回虫 *Ascaris lambricoides* と同定され, 聞き取り調査の結果, 台湾(1991), サイパン(1992), フィリピン(1994)など海外旅行先での感染が推定された。3. 1993年中国残留帰国家族3名のうち, 5才児から回虫成虫および鞭虫 + 回虫卵, 父親から鉤虫卵, 母親から鞭虫 + 回虫卵が見いだされた。4. 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* (写真2-a, b)の検査件数は, 例年関係者検便が約200例前後実施されているが, 過去5年間の陽性例は3例で, 内2例は日本人海外旅行者で検便により嚢子型, 他1例は外国人JICA研修生で肝膿瘍の膿汁から栄養型を検出した。5. 赤痢アメーバの関係者検便でアメーバ陰性にもかかわらず, 海外旅行経験者から2例のランブル鞭毛虫 *Giardia lamblia* (写真1-a, b)が見いだされている。6. 1993年に南米パラグアイに里帰りして帰国後, 頑固な下痢症状を訴え医院でランブル鞭毛虫症と疑われた日本人の夫とパラグアイ出身の妻および5才児の検査の結果, 父と子から小型種のクリプトスポロジウム *Cryptosporidium parvum* (写真3-a, b)が検出された。7. 1990年に日本人ジャズマンが1カ月のアフリカ演奏旅行中, 腹部に5cm大の腫瘤が生じ, 帰国後潰瘍部から圧出されたウジムシがヒトクイバエ *Cordylobia anthropophaga* の幼虫と同定された, 珍しいウジ症例⁵⁾(本邦2例目)にも遭遇している。

II 無農薬・有機栽培野菜から感染する寄生虫

過去5年間に虫種鑑別のために送付された肛門排出虫体10例および口から排出された虫体2例がそれぞれ回虫 *Ascaris lambricoides* (写真7)の成虫と同定された。国内での感染が示唆される症例では, 中国からの帰国者の症例とは異なり, 雌雄どちらかの成虫1隻の単性寄生で再検便によって虫卵が検出されることは少ない。保健所を通じて患者が日常食べている野菜の入手経路を調査した結果, 契約有機栽培野菜1名, 自家用栽培野菜(区民農園等)2名, 実家からの直送野菜1名より有機栽培野菜からの感染が示唆される回答が得られた。その他は市販の野菜を購入しており, 有機栽培または輸入野菜との直接的な因果関係は不明であった。

なお, 1990年以降当所で行って来た輸入野菜の虫卵検査(年平均130件)の結果では, 人体寄生虫卵は過去5年間に全く検出されていない。

一方, 下水処理場汚泥の寄生虫卵検査では1968年から

1982年の間に虫卵陽性が認められているがそれ以後陰性となり検査を中止している。しかし, 1993年に経済局飼肥料検査所の協力を得て下水汚泥を主原料とする有機肥料12種13件の虫卵検査を行った結果, 野積み発酵肥料100gの1例から鞭虫卵(写真5)とイヌ鞭虫卵 *Trichuris vulpis* (写真12)が見いだされた。このように生存虫卵が見いだされたことから, 今後検査数量と頻度を増加する事により, 回虫の感染源が特定されるとともに肥料発酵工程の改善が図られるものと思われる。

III グルメブームがもたらす食品媒介寄生虫

1. 異物, 有害物混入事例: 当所に依頼された苦情および患者発生時の残品の検査においても種々の寄生虫が検出されている。その代表的なものは1) *Anisakis* I型(弁当のサラダ, シメサバのバックずめ, タラの昆布じめ) 2) 鉤頭虫 *Echinorhynchus gadi* (おにぎりのタラコ), 3) *Terranova* A型(豚肉ロースのバック詰め), 4) 四吻条虫 *Nibelinia* spp. (ステーキ用牛肉, タラの煮付け) 5) 粘液胞子虫 *Myxozoa kudoa* (マグロ刺し身の残物) 6) シュードテラノバ *Pseudoteranova* spp. (アイナメの刺し身, ヒラメの刺し身)などである。1990年には本来あり得ない寄生虫の混入事例が相次いで発生した。スーパーや仕出し弁当業者の調理工程で魚介用まな板と肉・野菜用まな板, 包丁など調理器具の共用による二次汚染と考えられる事例については, スーパーや仕出し業者に対して調理, バック詰め工程を魚介類とその他の2工程に区分するよう, 保健所を通じて指導を行った。

2. アニサキス症の集団発生病例: 1990年に町田市でスケトウダラの白子ポンズを生食した5名全員が吐気, 嘔吐, 下痢など食中毒様の症状を呈した。原因食の残物白子から *Anisakis* I型7隻を見いだした。この5名のアニサキス症患者は魚屋の「生食用」と表示されたきょうぎ札を信じて, 白子を湯通しせずに食べたことに起因する。魚屋さんには「生食用」の表示はしないよう指導した。

3. 条虫の片節による形態学的同定(写真11~19に示す): 1) 1990年に15歳の少年が牛肉のタタキまたはレアステーキを家族と共に食べて, しばらく後に便表面に蠢く白いウリの種様の片節を見つけ, 体節の子宮の複雑な走行形態から本虫を無鉤条虫 *Taenia saginata* と同定した。(1片節のみの標本を大学病院に送付したため写真欠) 2) 1990年頃から度々条虫の片節を便中に認めながら蟯虫の駆虫薬コンバントリンを服用, その効果無く, 1991年2月患者本人が駆虫法につき相談のため持参した虫体の片節は, 影井(未発表)により, 他の条虫症と比較して報告例の少ない米子裂頭条虫 *Diphyllobothrium yona-*

goense (写真16, 17)と同定されたが原因食は不明であった。3) 1992年に自然排出された条虫の片節を日本海裂頭条虫 *Diphyllobothrium nihonkaiense* (写真18, 19)と同定した。原因はサケ・マス類の生食によるものである。4) 1994年に都立豊島病院でプラジカンテルで駆虫した7.5mの全虫体と5mの条虫の一部老熟片節の同定依頼があり、2虫を大複殖門条虫 *Diplogonoporus grandis* (写真11~15)と同定した。患者は頻回、サケ・マスの生食をしたと訴えている。

4. 寄生虫と誤認された事例：1) 誤飲によるコウラナメクジ(マッシュルームの生食後便に虫を見つけ同定を依頼してきた例) 2) ニクバエの幼虫(カツオ刺し身パック) 3) ナカヒメヒラタアブの幼虫(シャコ) 4) シマミミズ(便器)などが鑑別のために保健所から送付されている。

IV ペットから感染する寄生虫(写真8に示す)

公園、学校および保育園などの砂場のイヌ回虫 *Toxocara canis*, ネコ回虫 *Toxocara cati* の虫卵による汚染状況がマスコミを通じて報道されるや、各区市町村議会で汚染実態について質問されるなど保健所の対応が急がれている。これまで東京都では12区の依頼を受けて当所で検査法の統一に関する特別技術研修を実施した。1992年6~11月に行った豊島区長崎保健所の調査(未発表)では、公園が52.6%(20/38), 児童遊園が27.2%(22/81), 幼稚園が16.0%(4/25)および区立保育園の砂場の陽性率は6.2%と低く、夜間シートで覆う効果が認められている。

一方、所と台東区下谷保健所の共同調査では、公園が10~20%(1/10, 2/10)と低く、小学校が50%(2/4, 2/4), 保育園40~60%(2/5, 3/5)と高い成績を示した。公園の清掃はシルバー事業として定着徹底しているのに対し、学校や保育園の砂場管理にシートで覆うなど不徹底さが指摘されるなど、給食残飯をあてにした、捨て猫問題や苦情の多い場所を中心に調査した結果と思われる。対策として、プロパンガスバーナーを用いた炎熱殺卵効果および黒いビニールシート被覆による炎天下での実験を実施したが、湿潤・乾燥砂ともに実用的な殺卵温度が得られず、火炎放射13分でも表層から5cm以下の温度が60℃を越えることができなかった。試みに、腐食土やヘドロに含まれるフミン酸(pH2.0~5.0, 100倍希釈液)に幼虫包蔵卵を滴下して、変性効果を検討したが無効であった。

考 察

I 海外からの輸入寄生虫(症)

文献的考察を加えると、日本人が海外に出掛けて感染

し国内に持ち込む場合と発展途上国の外国人が国内に持ち込む場合が考えられる。今回、中国人就学生から検出同定された消化器系寄生虫の寄生率は29.9%を示した。表1に示されるとおり、山浦ら⁶⁾、杉山ら^{7-a)}、小林ら^{7-b)}、広川ら⁸⁾の報告に見られる寄生虫の寄生率は調査対象と出身国によってバラツキはあるものの、30~70%台といずれも高い寄生率を示している。我が国で断片的に報告される文献から推定される「輸入寄生虫症」は、精査すれば更に増えるものと思われる。発展途上国と言われるアジア・アフリカ・インド・中近東・中南米・南太平洋諸島の各国、特に熱帯・亜熱帯地域の衛生環境は現在も戦後の日本における衛生環境水準を維持し、しかも人口増加と戦乱および食料難が加わって更に悪化の過程にある。したがって、無警戒なグルメ旅行が「輸入寄生虫症」を増加させるとともに、これら地域からの帰国者および外国人入国者の健康管理が現状のまま放置されるならば、中間宿主を必要としない消化器系寄生虫が再び我が国に土着し、蔓延する可能性がある。少なくとも外国人または患者の尿尿が混入する公共下水道の汚泥が完全に加熱処理されずに有機肥料として流通し、菜園に施肥される場合、自家用菜園、都・区民農園の野菜を介して、または無農薬・有機栽培野菜の流通によって人体寄生虫症が増加するものと予想される。

II 山野草、輸入野菜または加工食品からの寄生虫感染例

杉山⁹⁾(1994)は韓国の親元から直送の人糞肥料で栽培された白菜キムチから感染した回虫症例2例を報告し、キムチより回虫受精卵を見いだしている。また永倉ら¹⁰⁾(1994)は韓国済州島から輸入された市販キムチが原因と思われる有鉤囊虫症(脳症1例)を報告している。

輸入野菜の虫卵検査は当所で1988年以来、年平均50件ほど行っているが、今のところ陽性例は全く無い。1回の検査数量が100~200gと少ないことと、葉物野菜がほとんど送付されないことが原因と思われる。

本来ウシの寄生虫である肝蛭の人体感染例が兵庫県で3例¹¹⁾(児玉ら, 1991), 長野県で2例¹²⁾(大島, 1985)が報告されている。今回、我々が行った中国人就学生検便でも肝蛭卵が1例検出されており、海外から持ち込まれるケースのほか国内でも春の七草など食べられる野草採取がブームを呼んでいることことから、セリ、クレソンなど放牧地付近の水田や水辺の野草サラダには注意する必要がある。今後は輸入農産加工食品の検査も実施して行くべきであろう。

表1. 文献による消化器系輸入寄生蠕虫卵および原虫検出率 (数)

調査対象	青年海外協力隊	大村収容所の難民・偽装難民		石川県における外国人就労者				
出身・派遣国	日本・世界各国	ベトナム	中国	インドネシア		フィリピン		
首都・地方	各地	各地	各地	首都	地方	首都	タルラック	その他
報告者(年)	山浦ら* ¹ (1977~1980)	杉山ら* ² ・小林ら* ² (1989~1991)		広川ら* ³ (1991~1992)				
陽性率(数)	30.3(230/750)	78.2(719/932)	65.6(1386/2114)	(159)	(41)	(35)	(50)	(44)
回 虫	3.7(28)	29.2(268)	33.7(712)	0.6(1)	—	2.9(1)	14.0(7)	9.1(4)
鞭 虫	9.3(70)	44.0(404)	50.3(1063)	52.2(83)	39.0(16)	45.7(16)	52.0(26)	54.5(24)
鉤 虫	0.9(7)	30.5(280)	8.8(186)	15.7(25)	19.5(8)	—	2.0(1)	2.3(1)
肝 吸 虫	0.4(3)	—	—	—	—	—	—	—
異 形 吸 虫	1.6(12)	—	—	—	—	—	—	—
ランブル鞭毛虫	17.3(130)	6.8(58)	nd	1.9(3)	2.4(1)	2.9(1)	8.0(4)	6.8(3)
赤痢アメーバ	1.6(12)	0.7(6)	nd	—	—	—	—	—
大腸アメーバ	2.1(16)	—	nd	9.4(15)	9.8(4)	5.7(2)	10.0(5)	2.3(1)
小形アメーバ	1.2(9)	—	nd	6.9(11)	4.9(2)	2.9(1)	8.0(4)	4.5(2)
イソスポーラ	1.0(7)	—	nd	—	—	—	—	—
そ の 他	—	5.3(49)	nd	8.2(13)	12.2(5)	2.9(1)	12.0(6)	15.9(7)

注) *1:文献 6), *2:文献 7), a & b, *3:文献 8)
nd:検査せず

平均陽性率:58.1% (191/329)

Ⅲ グルメブームがもたらす食品媒介寄生虫(症)

もともと日本人は魚介類の生食嗜好が強く、鮮魚や活魚の刺し身、タタキ、ルイベ、酢じめ等素材の味覚を堪能することを好む。しかも、食品流通の面では活魚・鮮魚の輸送手段の発達により、産地直送便が戸口から戸口に配達されるようになり、全国どこでも活・鮮魚介を摂取することが可能となった。さらに、肉牛が生きてまま輸入されたり、氷温でのウシ、ブタ、トリおよびウサギ、カンガルー、ワニ等の野生動物の肉類の輸入が増加の一途にあり、有鉤・無鉤条虫のほか旋毛虫(トリヒナ)など寄生虫の幼虫が感染して、重篤な症状を呈する「人畜共通寄生虫疾患」の広がりが懸念される。

1. 肉・生鮮魚介類からの寄生虫

1) アニサキス症:サバ、タラ、オヒョウ、カタクチイワシ、カレイなどの刺し身から感染するアニサキス症が最も多く、年間2,000例を越える症例報告¹³⁾(影井, 1989)がある。これまでの散発症例に加えて、静岡県¹⁴⁾(目黒ら, 1982 & 1986)、鹿児島県¹⁵⁾(山下ら, 1988)、千葉県¹⁶⁾(津田ら, 1992)、次いで山口県¹⁷⁾(神田ら, 1993)で数10~130名規模の食中毒様の症状を呈するアニサキス症が疑われる集団症例が報告されており、益々本症と食中毒との類症鑑別の必要性が高まって来た。原因食としてカタクチイワシの酢の物または刺し身など

生食に近い状態での摂食が共通であるため、カタクチイワシの調査を行った結果、最高56.5%(山口)および20.0%(千葉)の本虫寄生率が報告されている。また、今回報告のタラの白子を生食または加熱不十分で食べて感染した5症例からは、これまでの散発的発生から集団的発生へ転換期を迎えていることが示唆される。我々¹⁸⁾が1991年に報告した魚介別・産地別のアニサキス寄生状況と各県別の報告症例数と重ね合わせて見ると、九州の9,704症例と玄海灘に面した佐賀県産マサバの高寄生率(100%, 11~50隻/1尾)および北海道の1,564症例と羅臼産のスケトウダラ、根室産マダラの高寄生率(90~100%, 11~50隻, 50隻以上)とが他県と比べて症例数に2桁の違いがあり、群を抜く寄生水準にある。また調理法および生食の食習慣の違いにより相違が見られる。すなわち、影井¹⁹⁾の報告によれば、九州ではサバを原因食とした症例が80%台であったのに対し、北海道ではオヒョウが50%台、次いでイカ17%、カレイ14%台とつずき、生食の習慣が少ないタラ、サバは8~9%台と低い。最近、過去と現在の原因食の変遷も報告²⁰⁾(唐沢, 1993)されており、かつてイクラやスジコからの感染例は少なかったが、最近では空輸のイクラ、スジコ、生サケも増えており、これらサケからの感染例が19%台に上ると言われている。1988年に自家製の生サケのマリネから

感染した1症例(未発表)の調理済み残物より *Anisakis* I型幼虫を検出したことがあるので生ザケおよび冷凍不十分のルイベも感染源として注目される。

2) 旋尾線虫症: ホタルイカの生食による皮膚爬行症(Kagei, 1991), 2例の腸閉塞症(大鶴ら, 1974), 腸穿孔症2例(Kagei *et al.*, 1992, 松田ら, 1993), 前眼房から見いだされた症例(Chung *et al.*, 1993), および0.72% (7/972)のホタルイカの本虫寄生率が加藤ら²¹⁾(1993)によって報告されている。影井²²⁾(1992)の報告によると, 38例中男性30例, 女性8例, 30~40歳台が63.1%と最も多く, 関東, 関西, 近畿, 四国, 沖縄の各県からの鑑別依頼があり, 生食用のホタルイカの出荷が続くと今後さらに症例の増加が予想されている。

また, Okazawa *et al.*²³⁾(1993)の調査によると, ホタルイカから37/1,109(3.3%)の旋尾線虫 Type X の幼虫が見いだされ, スルメイカからも1/30(3.3%)に本虫が見いだされている。特に, 魚介類の咽頭部から胃部にかけて本虫が見いだされる可能性が強い。当所においても, *Anisakis* の調査をつうじて本虫と類似の標本が得られており, 最近, ホタルイカの塩辛から感染発症したと思われる症例に遭遇したが, 残品からは本虫を見いだす事ができなかった。今後, 本虫についても注意を払って検索を行ってゆくべきであろう。

3) 条虫症 サケ・マス類, 特に平均30~50%台の寄生率を示すサクラマスの生食, ルイベまたは自家製のマスズシなどを原因食とする広節裂頭条虫症(日本海裂頭条虫症)は, 1960~80年の20年間に586例報告²⁴⁾(影井, 1982)されている。586例にのぼる本症患者数の内訳は, 北海道10, 青森80, 秋田51, 新潟94, 富山28, 石川60, 福井110, 京都74例と日本海側に偏在している。1978年に我々²⁵⁾が報告したサクラマスの広節裂頭条虫プレロセルコイド(幼虫)寄生状況は, 北海道産17.8%, 青森産27.8%, 秋田産30.0~54.2%, 山形産54.1%, 新潟産22.2%, 富山産35.7%, 平均38.8%と本症例の分布に沿って高率を示している。1993年に当所に鑑定を依頼してきた2例の片節のうち1例が日本海裂頭条虫で, 1例が米子裂頭条虫と同定され, 症例報告の増加傾向から, 毎年かなりの新規裂頭条虫感染者があるものと思われる。

このほか大腹殖門条虫の症例報告数は1984年以降著しい増加傾向が認められる。個別の報告症例をまとめると, 千葉1, 神奈川5, 静岡31, 愛知1, 三重1, 和歌山1, 大阪3, 京都1, 岡山1, 兵庫1, 広島2, 鳥取19, 島根8, 高知23, 愛媛4, 大分1, 長崎15, 熊本4, 佐賀5, 宮崎2, 鹿児島3, 合計132症例が報告されている。

今回当所で同定された1症例と赤尾ら²⁶⁾(防衛医大)が1992年に報告した, 青森, 千葉, 静岡の各県の7例が追加される。また静岡県清水市立病院の川田ら²⁷⁾(1993)は1医療機関だけで, カツオやイワシの刺し身をよくたべる本症患者4例が追加報告され, 当院の累計は合計39例となったと報告している。また, 鈴木ら²⁸⁾(1992)は高知医科大学で最近5年間に大腹殖門条虫19例, 無鉤条虫4例(牛肉由来), 日本海裂頭条虫2例, 米子裂頭条虫1例, 有鉤囊虫1例(豚-虫卵由来), 合計27症例を報告している。大腹殖門条虫の患者分布は, 千葉県以西の東海, 四国, 中国, 九州の太平洋側に多発し, 1989年までに153例が報告²⁹⁾(山浦ら, 1990)され, その後の追加で174例に達している。本症は東北から北陸, 山陰に至るの日本海側に多発する日本海裂頭条虫症の分布とは全く異なり, 黒潮に乗って回遊する魚介類が感染源(中間宿主)として注目されている。

一方, 福井医科大学の症例として, 牛肉由来の国内感染例として無鉤条虫5例, およびヘビ, カエル, シヤモ肉等由来の Manson 弧虫症3例が報告³⁰⁾(高田ら, 1993)されている。この症例の中に, 1歳半の幼児感染例の記載が含まれているが, 当所に依頼された15歳の中学生の糞便中に見いだされた片節が無鉤条虫と同定されたこと, 海外渡航歴がないことなどから輸入牛肉からの感染が推定された。最近, 盛ら³¹⁾(1993)によって神奈川県下の一畜産農家で和牛66頭の有鉤囊虫症が発生し, 廃棄処分となったことが報告され, 和牛肉でも感染の機会は有り得る。国内での無鉤条虫潜在感染者数も近年増加傾向にあると推定される。

4) 赤痢アメーバ症: 最近香川県で発生したブタのアメーバ症の報告³²⁾(野崎ら, 1993)があり, ヒト→ブタ, ブタ→ヒトへの感染が懸念され, 形態学的に赤痢アメーバと一致する本アメーバの異同について注目されている。報告によると *Entamoeba histolytica* 抗原に対する抗体陽性率は母ブタで7.7% (3/39), 肥育ブタで37.5% (6/16), 抗体価は160~320倍と強陽性を示した。このことから, 本症の国内感染の因果関係が明らかとなれば, 現在同性愛による性行為感染症(STD)として注目されている赤痢アメーバ症に加えて, 国内感染ルート解明の糸口が得られる可能性がある。

IV ペットおよび汚染環境から感染する寄生虫症

1. イヌ・ネコ回虫症: 1990年頃まで我が国では約40例程の症例が知られていたが, そのうち8例が抗 *Toxocara* 抗体陽性とされ, うち1例から幼虫の断端が見いだされているにすぎない。その後 辻³³⁾(1993)は本症が

疑われる患者血清490例のうち、66例が抗体陽性、眼移行型が疑われた105例中45例が陽性、内臓移行型が21例と報告している。また、永倉³⁴⁾(1993)は抗体陽性の血清18例中ネコ回虫症例が14例、イヌ回虫症1例、うち眼球移行が疑われた症例は2/18、肝臓移行が疑われた症例は9/18と肝臓移行型が多いと報告している。さらに、原因食として18例のうち11例にシャモまたは牛の肝臓を生食した経験が有することが注目される。一方、幼児の抗体調査では、よく砂場で遊ぶグループと遊ばないグループとの間に有意差が認められず、いずれも陽性率は数%と低かったこと、また本症と診断された18例の中には成人以外、幼児症例が無いことなどから、三宅³⁵⁾(1991)の引用紹介した幼児例6/8とは感染様相が変化してきている。

現在は砂場からの感染よりも、イヌ・ネコと接触頻度の高い飼育環境の地鶏・シャモなど生肉・生肝臓の摂食の方が危険性が高いと言われている。細川³⁶⁾(1989~1990)は品川区の砂場のイヌ・ネコ回虫卵の陽性率が平均21.7% (9/42)、吉岡³⁷⁾(1990)は都内10区、56か所の公園砂場の調査で、51.8% (29/56)が陽性と報告しており、今回の各区の陽性率と同様の成績を示した。当面の対策としては、1) 砂場近くに手洗い場を設置して、手足の洗浄およびうがいの励行 2) 小規模の砂場を夜間シートで覆う 3) ペットの定期的な駆虫を行う 4) ペットブリーダー以外の避妊手術の奨励および助成 5) 捨て猫の防止および餌付けの自粛 6) 砂場の清掃と表層砂と深層砂の掘り返しによる太陽光・紫外線暴露以外、砂の入れ替えだけでは数カ月の内に汚染状態がもとにもどってしまうので有効な手段は無い。

2. 汚染飲料水から感染するクリプトスポリジウム下痢症:今回、輸入寄生虫症として本症例を報告したが、黒木³⁸⁾は神奈川県飲食店10店舗が入居する雑居ビルの従業員および客400人を越える集団下痢症を報告し、12/25 (48%)の便から *Cryptosporidium parvum* を検出し、上水汚染の原因が下水混入が可能な設備設計にあったと指摘している。英国での急性下痢症の調査では、本虫がサルモネラと同程度、赤痢菌の3倍の検出率と言われているが、本症の国内での汚染実態は未だ明らかにされていない。今後本虫の水質検査および検便による検査体制が整えられれば、原因不明の集団下痢症のかなりの部分に、クリプトスポリジウムが関与していることが解明されるものと思われる。

ま と め

東京における1990~1994年間に同定された寄生原虫お

よび蠕虫を、感染源別にまとめると、**1. 海外からの輸入寄生虫(症)**として、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム、回虫卵および成虫、鞭虫卵、ズビニ鉤虫卵、巨大肝蛭卵がそれぞれ日本人海外旅行者、中国人就学生の集団検便および中国残留帰国家族等の検便によって見いだされ、本邦2例目のヒトクイバエの幼虫感染によるウジ症例を報告した。**2. 無農薬・有機栽培野菜から感染する寄生虫(症)**として、肛門や口から排出された線虫12例を雌雄回虫の成虫と同定した。また、国内感染が疑われたため、下水道汚泥を原料とする有機肥料の虫卵検査で、1例から鞭虫卵を検出し、回虫卵汚染の可能性が示唆された。一方、過去5年間、輸入野菜からは寄生虫卵が見いだされていない。**3. グルメブームがもたらす食品媒介寄生虫(症)**、特に肉・生鮮魚介類からの寄生虫として、食中毒様集団発生5例の原因食(白子)残物からアニサキS型幼虫7隻を検出同定した。自然排出された片節の形態学的特徴から、無鉤条虫、米子裂頭条虫、日本海裂頭条虫および大腹門条虫それぞれ1例を同定した。**4. ペットから感染する寄生虫**として、公園、学校、保育園などの砂場の砂からイヌ・ネコ回虫卵の検出を試みた結果、20~60%の陽性率を示した。汚染防止対策として火炎放射機による炎熱効果を試したが、5 cm以下の深度ではの殺卵効果は期待できないことが明らかとなった。

謝辞 本邦で稀な寄生虫の形態学的同定にあたっては国立予防衛生研究所寄生動物部の影井昇博士のご指導とご助言をいただいたことを記して深謝します。

(本研究の概要は第7回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、1995年2月で発表した。)

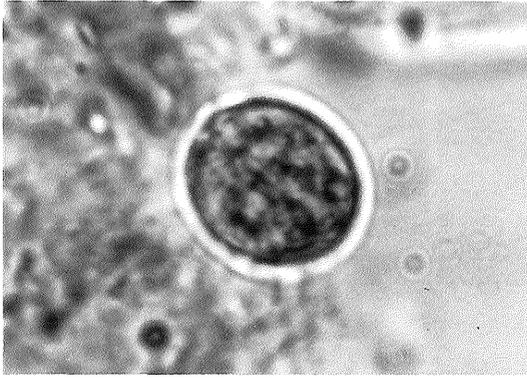
文 献

- 1) 鈴木了司: カラーアトラス人体寄生虫と原虫, 寄生虫学的検査法, 94-118, 平成4年, 第2刷, 藤田企画出版, 弘前市.
- 2) 小山 力: 染色法のすべて, 318-319, 1992年, 第1版, 3刷, 医歯薬出版, 東京.
- 3) 井関基弘: 染色法のすべて, 320-321, 1992年, 第1版, 3刷, 医歯薬出版, 東京.
- 4) 加茂 甫: 最新醫學, 4, 868-872, 1989.
- 5) 影井 昇, 村田以和夫, 倉橋 弘: 日本熱帯医学会雑誌, 17, 4, 347-350, 1989.
- 6) 山浦 常: 健康と環境, LICHIT LEBEN LIEBE, No.2, 82-87, 1988(財)東京顕微鏡院.
- 7) a 杉山秀徳ら: 感染症, 23, 2, 13-16, 1993.
b 小林 忍ら: 感染症, 23, 2, 17-30, 1993.

- 8) 広川 渉ら：予防医学ジャーナル, No.284, 16-23, 1993.
- 9) 杉山誠一：日経メディカル, 104-107, 6月15日号, 1995.
- 10) 永倉貢一, 永山正雄：病原微生物検出情報, **16**, 5 (183), 7(103), 1995年5月, 国立予防衛生研究所.
- 11) 児玉和也ら：感染症学雑誌, **65**, 12, 1620-1625, 1991(平成3年).
- 12) 大島智夫：最新醫學, **44**, 4, 856-860, 1989).
- 13) 影井 昇：最新醫學, **44**, (4), 781-791, 1989.
- 14) 目黒克巳：「胃アニサキス症の集団発生について」, 静岡県衛生部, 19-33, 1982.
- 15) 山下行博ら：Gastroentero Endoscopy, **30**, 3092-3098, 1988.
- 16) 津田純朗ら：日本消化器病会誌, **85**, (臨時増刊), 2, 130, 1988.
- 17) 神田千瑞枝ら：日本獣医学雑誌, **46**, 8, 704, 1993.
- 18) 村田以和夫, 白鳥憲行, 小山利夫ら：東京衛研年報, **42**, 70-76, 1991.
- 19) 影井 昇：モダンメディア, **28**, (10), 518-538, 1982.
- 20) 唐沢洋一：モダンメディシン, (朝日新聞社刊), 6月号, 29-31, 1993.
- 21) 加藤桂子ら：第53回日本寄生虫学会東日本大会口演要旨, 34頁, 1993(10月).
- 22) 影井 昇：寄生中学雑誌, **42**, 増刊号, 83, 1993.
- 23) TAKAO OKAZAWA et al. : *Jpn. J. Parasitology*, **42**, 4, 356-360, 1993.
- 24) 影井 昇：モダンメディア, **28**, (10), 518-538, 1982.
- 25) 村田以和夫, 大久保暢夫, 山田 満ら：東京衛研年報, **29-1**, 95-100, 1978.
- 26) 赤尾信吉, 工藤康之, 鈴木恒夫ら：寄生虫学雑誌, **41**, 1, (捕), 81, 1991, 第51回日本寄生虫学会東日本大会記事.
- 27) 川田和昭ら：第53回日本寄生虫学会東日本大会口演要旨, 33頁, 1993(10月).
- 28) 鈴木了司ら：寄生虫学雑誌, **41**, 増刊号, 130頁, 1992(4月).
- 29) 山浦 常ら：東京女子医科大学雑誌, **60**, 12, 75-79, 1990.
- 30) 高田伸弘ら：寄生虫学雑誌, **42**, 増刊号, 103頁, 1993(4月).
- 31) 盛 信博, 小橋 隆, 兵頭征介ら：第117回日本獣医学会, IV. 寄生虫病学分科会抄録, 132頁, 1994(平成6年春).
- 32) 野崎 宏ら, 平田和則, 天野 武ら：日本獣医師会雑誌, **46**, 639-642, 1993.
- 33) 辻 守康：第53回日本寄生虫学会東日本大会シンポジウム要旨, 15頁, 1993.
- 34) 永倉貢一：第53回日本寄生虫学会東日本大会シンポジウム要旨, 17頁, 1993.
- 35) 三宅 勉：東京都獣医師会, 学術講習会資料「犬・猫の回虫卵による環境汚染実態について」, 9-44頁, 平成3年11月1日(1991).
- 36) 細川 珠, 岩谷美枝, 坂井智子ら：東京都衛生局学会誌, **86**, 148-149, 平成3年4月30日(1991).
- 37) 吉岡義道, 安藤言枝, 三宅 勉ら：東京都衛生局学会誌, **86**, 154-155, 平成3年4月30日(1991).
- 38) 黒木俊郎：病原微生物検出情報, **15**, 11(177), 1994年11月, 国立予防衛生研究所.

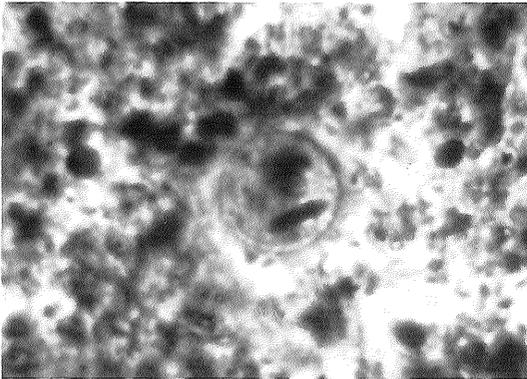
写真説明

- Fig. 1 ランブル鞭毛虫 *Giardia lamblia* a : 嚢子型 cyst, b : 栄養型 trophozoite, ($\times 1,000$), ヨード・ヨードカリ染色, 海外旅行者より検出
- Fig. 2 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* a : 嚢子型 cyst (Kohn' 染色), b : 栄養型 trophozoite ヨード・ヨードカリ染色, ($\times 1,000$), 海外旅行者より検出
- Fig. 3 クリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum*, a : 抗酸染色, ($\times 1,000$), b : 無染色, ($> \times 1,000$), パラグアイ旅行者より検出
- Fig. 4 回虫卵 *Ascaris lambricoides*, ($\times 400$), 中国残留帰国家族より検出
- Fig. 5 鞭虫卵 *Trichuris trichura*, ($\times 400$), 中国残留帰国家族より検出
- Fig. 6 ズビニ鉤虫卵 *Ancylostoma duodenale*, ($\times 400$), 中国残留帰国家族より検出
- Fig. 7 回虫 (成虫, 雌), 体長 22.5cm, 体幅 0.7cm, 頭部より体長の $1/3$ 部位に交接輪のくびれが見られ, 陰門が開く, 頭端に1個の背側口唇 (2個の乳頭) および2個の亜腹側口唇 (各1乳頭) が認められる. 有機・無農薬栽培野菜常食者から検出された虫体
- Fig. 8 ネコ回虫卵 (幼虫抱蔵卵), *Toxocara cati* ($\times 400$) 卵殻表面に微細な凹凸が規則的に認められる. (イヌ回虫卵の卵殻表面の凹凸は不規則), 砂場から検出された虫卵
- Fig. 9 肝蛭卵 *Fasciola hepatica*, ($\times 200$; $160 \mu \times 70 \mu$), 最も大形虫卵で小蓋がある. 不規則な卵黄細胞と胚細胞に満たされている. 中国人就学生の便から検出
- Fig. 10 イヌ鞭虫卵 *Trichuris vulpis*, ($\times 400$), 鞭虫より大形, 卵殻厚く両端に透明な栓が有り, ヒトの鞭虫卵とともに汚泥肥料より検出
- Fig. 11 大腹殖門条虫 *Diplogonoporus grandis* (体幅 6mm) の老熟片節, 各体節に正中線を挟んで一対の生殖器が並び, 子宮に虫卵は見られない. 各体節の中間に不完全な皺壁が認められる. 体長 5.0m, 体幅 6~10mmの条虫片節
- Fig. 12 (体幅 4~5mm), 13 ($\times 10$) 大腹殖門裂頭条虫 *Diplogonoporus grandis* (体長 7.5m, 体幅 4~8mm) の成熟片節, 正中線を挟んで各体節に一対の生殖器が並び虫卵の分布状態から細く 5~6層に分岐した卵巢の形態が観察される.
- Fig. 14 大腹殖門裂頭条虫 *Diplogonoporus grandis* の虫卵 ($\times 400$) 卵殻厚く小蓋を有し, 褐色短楕円, 小蓋の接合部は幅広く陥凹し明瞭で, 淡黄色で小蓋の接合部の挟み日本海裂頭条虫とは区別される.
- Fig. 15 (体幅 7~10mm), 16 ($\times 10$) 米子裂頭条虫 *Diphyllobothrium yonagoense* の成熟片節では 5~6層の末端部子宮ループに密に虫卵を満たす.
- Fig. 17 同老熟片節では上部子宮ループの分岐一対は囊条で虫卵を充満する. 2列以下のループでは虫卵少なく細い. 虫卵の形は卵殻の厚さ, 小蓋の接合部, 色調とも日本海裂頭条虫卵と区別できない. ホルマリン固定のストロビラは日本海裂頭条虫より肉厚で, 縦の皺襞が多く凹みは深い.
- Fig. 18 (体幅 8mm, 実体顕微鏡写真), 19 ($\times 10$) 日本海裂頭条虫 *Diphyllobothrium nihonkaiense* のストロビラは全体に菲薄で皺が多く, 各体節毎に花紋状の子宮を規則正しく配列する.



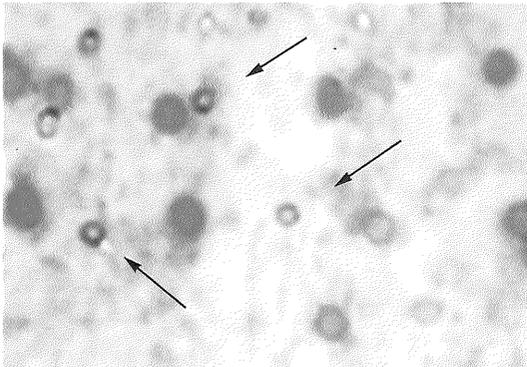
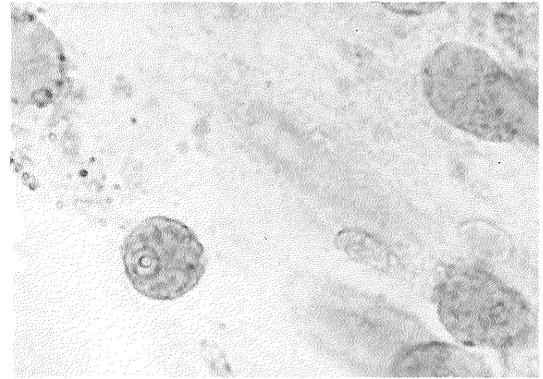
1

a b



2

a b



3

a b



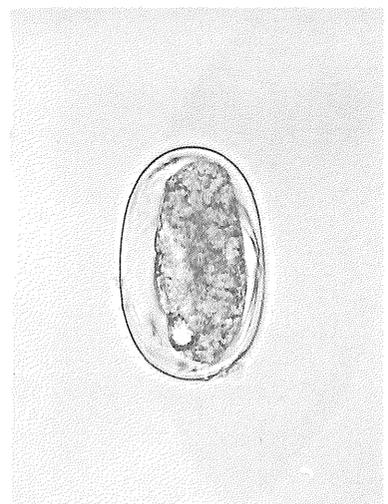
4

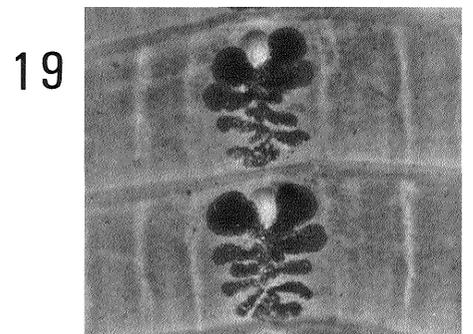
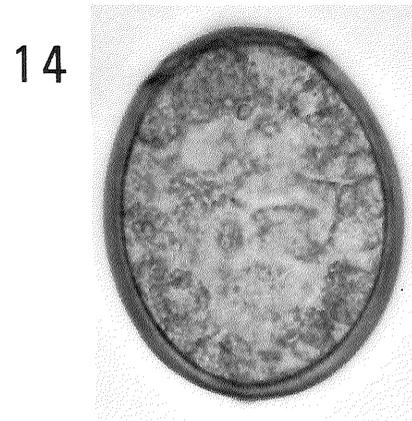
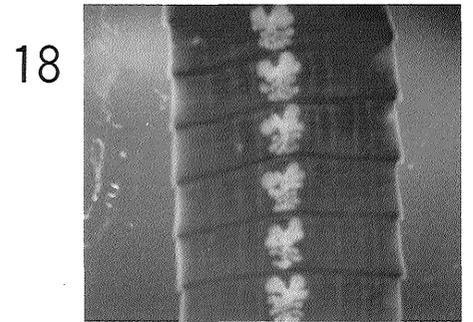
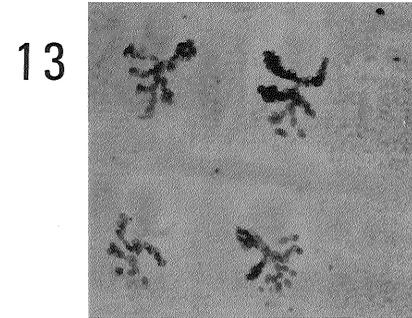
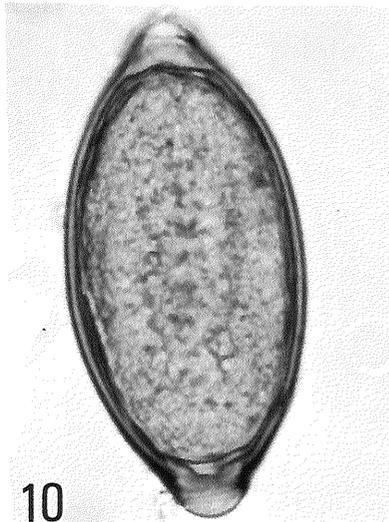
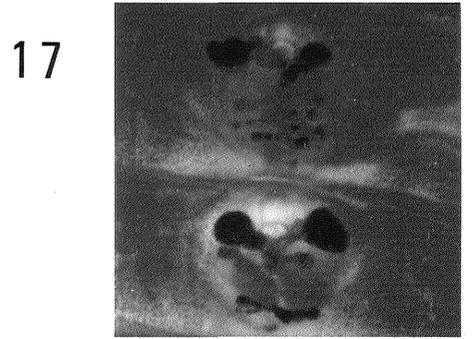
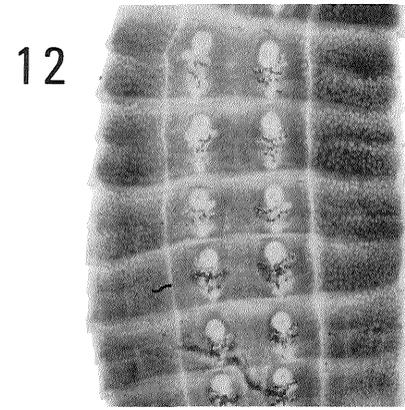
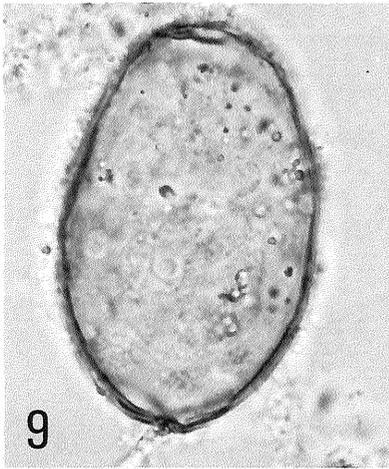
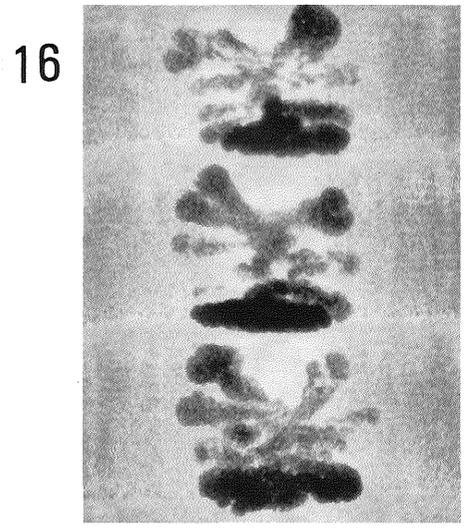
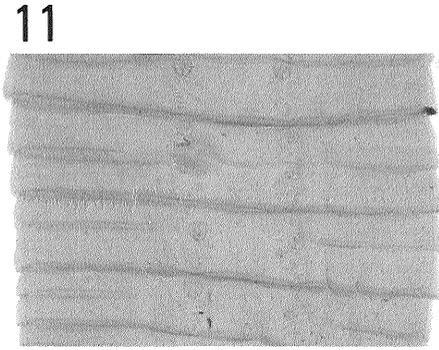
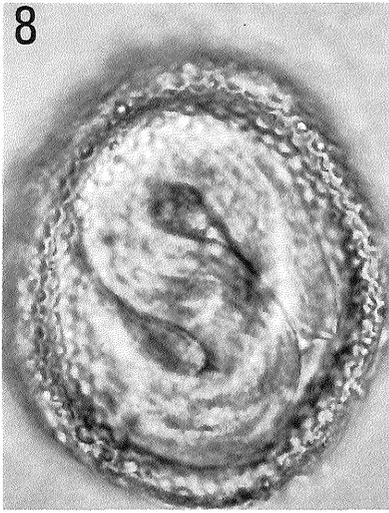
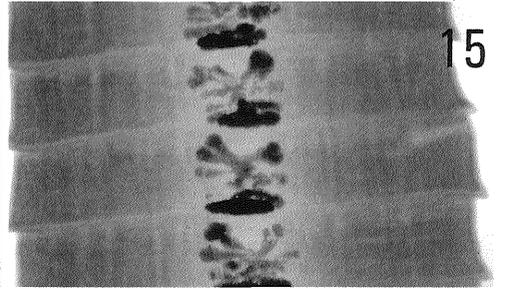
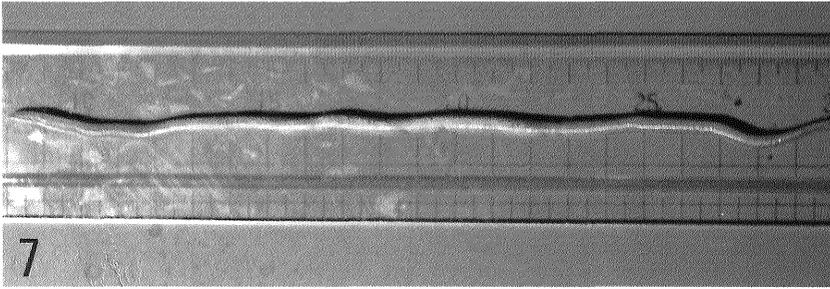


5



6





風疹 HI 抗体, HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体の東京都 衛生検査所精度管理調査結果 (1988年~1993年)

衰 輪 佳 子*, 大 石 向 江*, 小 林 千 種**, 五 十 嵐 英 夫*
町 田 勝 彦***, 河 野 均 也****

The External Quality Assessment at the Registered Independent Clinical Laboratories in Tokyo for Rubella (HI) Antibody and HIV (HTLV-Ⅲ) Antibody from 1988 to 1993

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, CHIGUSA KOBAYASHI**
HIDEO IGARASHI*, KATSUHIKO MACHIDA*** and KINYA KAWANO****

Keywords: 精度管理調査 external quality assessment, 風疹HI抗体 rubella HI antibody, HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体
HIV (HTLV-Ⅲ) antibody

緒 言

東京都においては、1982年から衛生検査所の質的向上を図るため、都内の登録衛生検査所を対象として精度管理調査を実施している。生化学、血液学、血清学、微生物学の検査項目を対象にしているが、1988年から血清学検査に風疹 HI 抗体検査及び HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体検査を新たに追加し調査を行った。風疹抗体価の測定は先天性風疹症候群児の出生予防に重要な検査法であることから、また HIV 抗体価測定は、社会的に大きな問題となっており、その検査過誤は被検者に与える影響が大きいことから双方ともその検査精度は重要である。そのような事情から衛生検査所での検査の実施状況及びその検査精度向上のために調査を実施した。

今回は、1988年から1993年まで6回の調査結果をまとめ、ここに報告する。

調 査 方 法

1. 調査試料

(1) 風疹 HI 抗体

試料 A にはヒトのプール血清から γ -グロブリンのみを除いた陰性血清を使用し、試料 B は1988年から1990年

及び1992年は抗体価を64倍に調整した陽性血清を、1991年と1993年は32倍に調整した陽性血清を調査試料として使用した。

(2) HIV 抗体

試料 C, D には陰性プール血清を使用し、試料 E は陽性血清を不活化して使用した。なお、1992年の試料 C, D は EIA 法とウェスタンブロット法 (WB 法) は陰性で、粒子凝集法 (PA 法) では $< 2^3$ (8 倍未満: 陰性)、1993年の試料 C, D は EIA 法と WB 法は陰性で、PA 法では $< 2^4$ (16 倍未満: 陰性)、試料 E は1992年及び1993年共に EIA 法と WB 法が陽性、PA 法が 2^{13} (8192 倍: 陽性) であることを確認して用いた。

なお、調査試料は当研究所ウイルス研究科で調製及び測定したものである。

2. 精度管理調査の実施方法

東京都内には登録衛生検査所が約90施設存在するが、そのうち自施設で測定あるいは他施設へ検査を委託している検査所を対象にして、年1回オープン方式で実施した¹⁻⁶⁾。試料と調査票を配付し、測定結果及び測定法、外注の有無、試薬、使用キット、自動機器の使用等につ

* 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

** 同生活科学部食品研究科

*** 東京慈恵会医科大学臨床検査医学教室

**** 日本大学医学部臨床病理学教室

いて回答を求めた。HIV 抗体は、スクリーニング検査と確認検査の両方で回答を求めた。

結果及び考察

1. 検査所数の推移

表1に、6年間の風疹 HI 抗体と HIV 抗体検査の参加施設数の推移を示した。

風疹 HI 抗体検査の対象施設数は、1988年には40施設であり、その後も顕著な増減はなかった。しかし、自施設での検査実施状況は調査開始時は21施設で全体の52.5%であったが、年次的に自施設で実施する割合が減少し、1993年には35.1%となり、多くの検査所では、他の検査所に検査を二次委託する傾向がみられた。

HIV 抗体のスクリーニング検査を行っている検査所は、11~13施設であり全登録検査所の15%程度にすぎなかった。さらに、確認検査まで行っている検査所はその中の6~9所であった。しかもその半数以上は二次委託を行っており、その委託先の内訳をみると3施設の検査所に集中していた。

2. 風疹 HI 抗体

測定法、使用キット、抗原、血球、動物種、機器の使用状況の推移を表2に示した。図1は、試料A、Bの年度ごとの検査成績を示したものである。

測定法：検査所の70~90%は予研法を使用し、年度による変化はほとんどなかった。

使用キット：キットを使用している検査所は、1988年には半数以上を占めていたが、徐々に減少し1992年にはデンカ生研のキットを使用する4施設のみとなった。

抗原・血球(動物種)：抗原はキット付属の抗原を使用

している検査所を別にすると、調査開始時は5社(タケダ、デンカ生研、富士レビオ、北里研究所、シオノギ)にわたっていたが、1993年には2社(デンカ生研：23施設、シオノギ：7施設)に収束されていた。また、血球は新鮮血球を使用する検査所が増え、1993年は76%であった。しかし残りの検査所は固定血球を使用していた。動物種もガチョウ、ヒヨコ、ヒツジ、ミドリザルと多岐にわたっていたが徐々に収束し、1993年にはガチョウ32施設、ヒヨコ5施設となった。

機器：自動機器使用の検査所が増加し、全体の80%程度になる。しかし、依然として用手法を実施している検査所が残っていた。

検査成績：試料Aは陰性血清であるが、1988年、1991年、1992年に、それぞれ1施設から8倍との報告があった。それ以外の検査所はいずれも陰性とする正しい結果の報告が寄せられた。陽性血清である試料Bは、1990年及び1992年には調製した力価の±1管差以内にすべての報告が入っていた。1989年、1991年及び1993年は調製した力価より高めに報告した施設が多くあり、また1988年は逆に調製した力価より低めの結果を報告した施設が多く認められたが、いずれも許容範囲に入っていると思われた。

3. HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体

(1) スクリーニング検査

表3は、測定法、試薬、使用機器の推移を示したものである。

測定法：実施検査所の約75%の施設は、酵素免疫測定法で行っていた。それ以外の検査所での測定法は、粒子

表1. 参加施設数

	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年
風疹 HI 抗体						
全体	40	38	42	37	36	37
自施設で実施	21	17	16	15	12	13
他施設に外注	19	21	26	22	24	24
HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体・スクリーニング検査						
全体	11	12	13	12	12	12
自施設で実施	10	10	9	7	8	8
他施設に外注	1	2	4	5	4	4
HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体・確認検査						
全体	7	9	8	7	6	8
自施設で実施	3	3	3	3	3	4
他施設に外注	4	6	5	4	3	4

表2. 風疹 HI 抗体における測定法, 使用キット, 使用機器の推移

	1988年(%)	1989年(%)	1990年(%)	1991年(%)	1992年(%)	1993年(%)
測定法						
全体	*	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
予研法		27(71)	33(79)	32(86)	32(89)	30(81)
予研法以外		11(29)	9(21)	5(14)	4(11)	7(19)
使用キット						
全体	40(100)	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
タケダ	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
デンカ生研	3(7.5)	4(11)	5(12)	4(11)	4(11)	5(14)
富士レビオ	13(33)	3(7.9)	1(2.4)	0(0)	0(0)	0(0)
ウェルマー研究所	5(13)	3(7.9)	3(7.1)	2(5.4)	0(0)	0(0)
シオノギ	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(5.4)
使用しない	18(45)	28(74)	33(79)	31(84)	32(89)	30(81)
抗原						
全体	40(100)	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
キット付属	9(23)	10(26)	7(17)	6(16)	4(11)	7(19)
タケダ	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
デンカ生研	12(30)	16(42)	24(57)	23(62)	24(67)	23(62)
富士レビオ	9(23)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
北里研究所	4(10)	4(11)	3(7.1)	0(0)	0(0)	0(0)
シオノギ	5(13)	8(21)	8(19)	8(22)	8(22)	7(19)
血球						
全体	40(100)	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
新鮮血球	19(48)	27(71)	34(81)	28(76)	29(81)	28(76)
固定血球・キット付属	15(38)	10(26)	8(19)	6(16)	4(11)	7(19)
固定血球・キット付属以外	6(15)	1(2.6)	0(0)	3(8.1)	3(8.3)	2(5.4)
動物種						
全体	40(100)	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
ガチョウ	19(48)	28(74)	34(81)	31(84)	32(89)	32(86)
ヒヨコ	2(5)	4(11)	4(9.5)	4(11)	3(8.3)	5(14)
ヒツジ	18(45)	6(16)	4(9.5)	2(5.4)	1(2.8)	0(0)
ミドリサル	1(2.5)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
機器						
全体	40(100)	38(100)	42(100)	37(100)	36(100)	37(100)
用手法	14(35)	14(37)	13(31)	7(19)	5(14)	6(16)
自動機器使用	26(65)	24(63)	29(69)	30(81)	31(86)	31(84)

* 調査せず

凝集法のみ, または酵素免疫測定法と粒子凝集法の併用があったが, 後者が増加する傾向がみられた。

試薬: 1993年の調査では富士レビオ, アボットの試薬を使用している検査所が多くみられた。特に, 富士レビオの試薬は他社と併用されていることが多かった。他に, オルガノン, ヘキスト, パスツールの試薬が使用されていた。

機器: 調査開始当時は, 用手法で検査を実施している検査所が見受けられたが, 1993年の調査では全検査所で自動機器(オートドロッパー, オートダイリユーター, エライザシステムなど)を使用していた。

(2) 確認検査

表4は, 測定法, 試薬, 使用機器の推移を示したものである。

測定法: 1993年の調査では, ウェスタンブロット法のみが5施設と最も多く, 間接蛍光抗体法のみが2施設, 更に1施設ではこの2法を併用していた。

試薬: 1993年の調査ではバイオラッド, パスツール, オーツ・ダイアグノスティック, 自家製の試薬を使用していた。

機器: スクリーニング検査と異なり, 用手法で検査する検査所が多かったが, 1993年には自動機器を使用する検査所が増加した。これは, パスツールの試薬を使用する自動機器LS-12が検査所に導入されたためである。

(3) 検査成績

表5には, 試料C, D, Eのスクリーニング検査及び確認検査による成績を示した。

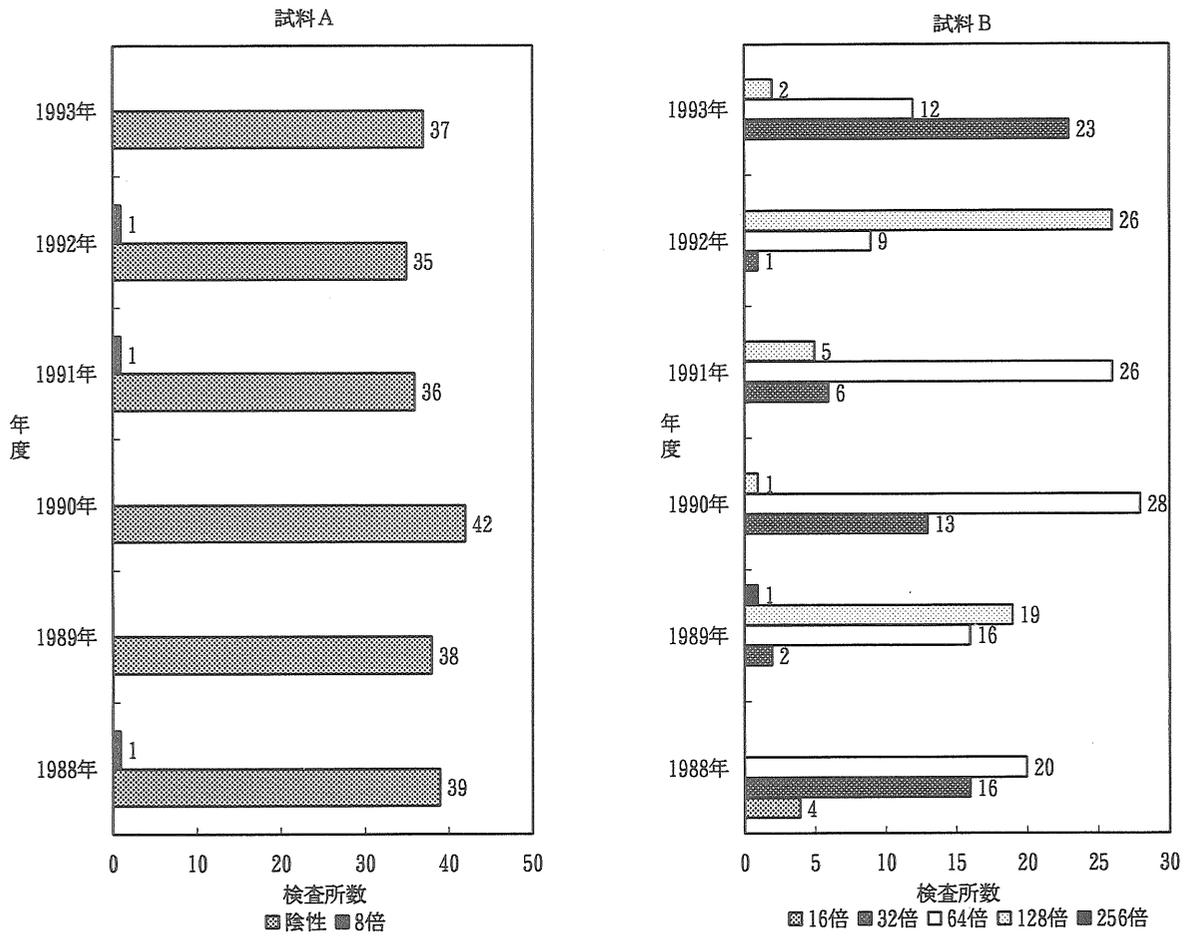


図1. 風疹 HI 抗体の成績

表3. HIV (HTLV-Ⅲ) 抗体(スクリーニング検査)における測定法, 試薬, 使用機器の推移

	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年
1. 測定法						
全体	11	12	13	12	12	12
酵素免疫測定法	8	9	10	9	8	7
粒子凝集法	2	2	2	2	2	1
EIA と PA	1	1	1	1	2	4
2. 試薬						
全体	11	12	13	12	12	12
アボット	8	9	7	5	4	4
富士レビオ	2	2	2	2	2	1
デュボン	0	1	1	0	0	0
オルガノン	0	0	2	2	0	0
ヘキスト	0	0	1	2	2	2
ダイナボット	0	0	0	0	2	0
パスツール	0	0	0	0	0	1
デュボン, 富士レビオ	1	0	0	0	0	0
オルガノン, 富士レビオ	0	0	0	0	1	1
パスツール, 富士レビオ	0	0	0	1	1	1
アボット, 富士レビオ	0	0	0	0	0	1
ヘキスト, 富士レビオ	0	0	0	0	0	1
3. 使用機器						
全体	11	12	13	12	12	12
用手法	3	3	1	0	2	0
自動機器使用	8	9	12	12	10	12

表4. HIV (HTLV-Ⅲ)抗体(確認検査)における測定法, 試薬, 使用機器の推移

	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年
1. 測定法						
全体	7	9	8	7	6	8
ウェスタンブロット法のみ	2	4	4	3	3	5
間接蛍光抗体法のみ	3	3	1	1	1	2
ウェスタンブロット法及び間接蛍光抗体法	2	2	3	3	2	1
2. 試薬						
全体	7	9	8	7	6	8
バイオラッド	2	2	2	2	1	1
デュボン	0	1	2	0	0	0
国際試薬	1	1	1	0	0	0
パスツール	0	0	0	0	1	3
オーソ・ダイアグノスティック	0	0	0	2	0	1
自家製	3	1	0	1	1	2
バイオラッド, 国際試薬	0	0	0	0	1	0
バイオラッド, パスツール	0	0	0	0	1	0
バイオラッド, 自家製	1	0	0	0	1	1
バイオラッド, 分与品	0	0	2	1	0	0
デュボン, バイオラッド, 自家製	0	0	1	1	0	0
3. 使用機器						
全体	7	9	8	7	6	8
用手法	6	8	7	6	5	4
自動機器使用	1	1	1	1	1	4

表5. HIV (HTLV-Ⅲ)の成績の推移

	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年
(スクリーニング検査)						
全体	11	12	13	12	12	12
1. 試料C						
陰性	11	12	13	12	12	12
陽性	0	0	0	0	0	0
2. 試料D						
陰性	11	12	13	12	12	12
陽性	0	0	0	0	0	0
3. 試料E						
陰性	0	0	0	0	0	0
陽性	11	12	13	12	12	12
(確認検査)						
全体	7	9	8	7	6	8
1. 試料C						
陰性	4	6	8	7	6	7
陽性	0	0	0	0	0	0
その他	0	0	0	0	0	0
2. 試料D						
陰性	4	6	7	7	6	7
陽性	0	0	0	0	0	0
その他(判定保留)	0	0	1	0	0	0
3. 試料E						
陰性	0	0	0	1	0	0
陽性	7	9	5	4	6	8
その他(判定保留)	0	0	3	2	0	0

スクリーニング検査については、陰性試料である試料C、試料Dともに6年間で、それぞれ延べ72施設で検査を実施したことになるが、全施設が陰性と回答していた(正解率100%)。陽性試料である試料Eにおいても延べ72施設で検査を行ったが、すべて陽性と回答していた(正解率100%)。

確認検査の成績をみると、試料Cでは全施設が陰性であると正解を報告していた(正解率100%)。しかし試料Dでは、延べ38施設のうち37施設は正しく陰性であると報告していた(正解率97.4%)が、1施設で判定保留と回答していた。陽性試料である試料Eは、延べ45施設が回答し、そのうち38施設は陽性と正しく回答したが、5施

設からは判定保留であるとの回答があった。そして1施設からは陰性と明らかな誤回答があった。

次に、誤回答あるいは判定保留とした検査所について詳細に検討した。1990年に実施した調査の確認検査で、試料Dを判定保留とした検査所が1施設あった。この判定保留の理由は、ウェスタンブロット法(WB法)ではP24に陽性のバンドが認められたが、間接蛍光抗体法(IF法)は陰性であったためと調査票に記入されていた。また陽性試料である試料Eについては、3検査所が判定保留と回答した。このうち2検査所は、同一外注先の結果を報告しており、IF法では陰性であるが、WB法でP24, 55に陽性のバンドを認め、2つの方法で異なる結果であったため判定保留としたとのことであった。残る1検査所はIF法のみで判定保留と報告していた。

1991年の調査において、試料Eの確認検査では1施設が陰性、2施設が判定保留と報告している。判定保留の理由として、1施設はIF法とWB法の間成績の乖離を認めたためとしている。残る1施設はIF法では陰性、WB法で判定保留の結果から最終的に判定保留として報告したとのコメントが記載されていた。このスクリーニング検査と確認検査の成績に乖離を認めた検査所のうち、2施設は外注検査の結果であった。

1990年及び1991年にIF法とWB法の結果に乖離を認めたために判定保留とした検査所では、いずれも同じ試薬を使用しており、試薬の感度が測定結果に影響していることが考えられる。また、陽性試料を陰性と報告した検査所は重大なミスを起こしているが、スクリーニング検査では、陰性と正しく報告していることから、調査票へ成績を記入する時の転記ミスも考えられる。

要 約

東京都内にある登録衛生検査所を対象に1988年から1993年の6年間、風疹HI抗体及びHIV(HTLV-Ⅲ)抗体検査の実施状況及びその検査精度を把握するために外部精度管理調査を行った。

風疹HI抗体を実施している検査所は36～42検査所、HIV抗体のスクリーニング検査では11～13検査所、確認検査は6～9検査所あった。風疹HI抗体及びHIV抗体の確認検査は、他検査所に検査を二次委託する割合が高く、50～70%であった。

風疹HI抗体の陰性血清である試料Aについて、1988年、1991年、1992年の調査で、8倍と報告した検査所がそれぞれ1施設あった。しかし、それ以外の検査所からはいずれも陰性との正しい結果の報告が寄せられた。また、陽性血清である試料Bの検査成績も許容範囲に入っており満足できるものであった。

HIV抗体のスクリーニング検査では、陰性試料、陽性試料ともに全施設から正解の報告があった。確認検査では、陰性試料の場合1施設から判定保留との回答があったが、その他の検査所は陰性と回答していた。一方、陽性試料は6年間の調査で延べ45検査所が検査したが、陰性と回答したのが1施設あった。5施設は判定保留と回答し、残りの検査所は陽性と正しく報告した。

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

文 献

- 1) 東京都：昭和63年(第7回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1988.
- 2) 東京都：平成元年(第8回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1989.
- 3) 東京都：平成2年(第9回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1990.
- 4) 東京都：平成3年(第10回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1991.
- 5) 東京都：平成4年(第11回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1992.
- 6) 東京都：平成5年(第12回)東京都衛生検査所精度管理 調査結果報告書, 1993.

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1994年12月～1995年2月)

山崎 清*, 伊藤 忠彦*, 関根 整治*, 林志直*,
佐々木 由紀子*, 関根 大正*

Prevalence of Influenza in Tokyo (Dec. 1994～Feb. 1995)

KIYOSHI YAMAZAKI*, TADAHIKO ITO*, SEIJI SEKINE*, YUKINAO HAYASHI*,
YUKIKO SASAKI* 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

東京都においては、毎年冬季になるとインフルエンザによる集団かぜが多発し、学級閉鎖等の措置がとられている。近年のインフルエンザの流行では、A H 3 型ウイルス及びA H 1 型ウイルスあるいはB型ウイルスを含めた混在流行が多く認められている¹⁻⁵⁾。

1993～1994年では全国的にA H 3 型ウイルスが主流で、B型ウイルスによるものも若干認められた。都内の集団かぜ患者の主病因もA H 3 型ウイルスによるもので、その流行は例年に比べ小規模なものであった⁶⁾。

本報では、1994年12月から1995年2月までに、東京都内で発生したインフルエンザ様疾患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 1994年12月上旬から1995年2月中旬までに、集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小学校の計35集団140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 140例について、既報⁵⁾に準じ発育鶏卵及びRD, Hep 2, HeLa, Vero355, MDCKの各種培養細胞を用いて行った。

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、それぞれにニワトリ及び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代継代しても凝集(-)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。

A H 1 型: A/山 形/ 32/89
A H 3 型: A/北九州/ 159/93
A/東 京/2138/95
B 型: B/三 重/ 1/93

*東京都立衛生研究所ウイルス研究科 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

なお、A/東京/2138/95は今冬期、1995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株はすべて今期のワクチン株である。

CF, HI 試験共に回復期の抗体価が急性期のそれに比し4倍以上に上昇したものを有意上昇とみなした。なお、血清学的試験の検査術式は既報¹⁾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、1994年12月に4集団、1995年1月に30集団、2月に1集団の合計35集団例であった。これら患者材料について、ウイルス分離試験並びに血清学的試験を行い、その病因検索状況を表1に示した。ウイルス分離試験の結果、20集団例(患者80名中25名)からインフルエンザAH3型ウイルスを分離した。また、ウイルス分離試験は陰性であったが、血清学的試験の結果、AH3型ウイルスによる感染と診断された集団例が10例(1994年12月上旬1集団、1995年1月中旬5集団、下旬4集団)認められ、AH3型ウイルスによる事例は合計30集団例が確認された。また、1995年1月中旬に搬入された1集団及び同年2月中旬に搬入された1集団の計2集団例ではウイルスは分離されなかったものの血清学的にB型ウイルスに対する抗体価の有意上昇が認められ、同ウイルス感染によるものであったことが確認された。

以上の結果からインフルエンザウイルスによる事例は、35集団例中合計32集団例でこのうちAH3型ウイルスによるもの30事例、B型ウイルスによる集団例は2事例であった。

インフルエンザウイルス以外による事例は、1994年12月下旬に搬入された1集団の患者5名中3名からアデノウイルス3型が分離され、さらにペア血清が得られた4

名すべてに、アデノウイルスに対する抗体価の有意上昇がCFにより認められ、同ウイルスによる事例であったことが確認された。また、検索により病因が明らかとならなかった2事例(1994年12月中旬2集団)では、これら患者の共通する症状に、嘔吐及び下痢等がみられることから、この季節に多発するSRSV(小型球形ウイルス)による感染が推測された。

インフルエンザウイルス分離患者血清のHI試験成績

インフルエンザウイルスが分離されAH3型と型別同定された患者のうち、ペア血清が得られた22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：A/北九州/159/93及び今期分離ウイルス株：A/東京/2138/94のいずれもAH3型抗原株に対してのみ4倍から256倍の抗体価の有意上昇が認められた。

他方、インフルエンザウイルスの分離試験にあたって、AH3型ウイルス流行時における発育鶏卵培養法と細胞継代培養法でのウイルス分離株数の比較を行った。過去、1987~88年の流行期から今期までの結果の比較を図1に示した。1987~88年には発育鶏卵法の分離株数34株に対して細胞継代法での分離数は7株であったものが、1989~90年には31株と21株に差が縮まり、1990~91年の流行期では43株と44株と逆転し、発育鶏卵法は細胞継代法の分離数を下回った。以後、この傾向は続き1992~93年から今期1994~95年の流行期にかけては発育鶏卵法による分離株数は細胞継代法に比べ5/24, 7/54と低下し、徐々にその差が顕著となり、今流行期の1994~95年には、発育鶏卵法の分離は皆無となり、歴然とした差が認められた。また、従来、細胞継代法で検出されたウイルス株は、発育鶏卵で容易に増殖可能であったが、今期分離株は発育鶏卵での増殖能は極めて低かった。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、その判定には若干凝集像が不鮮明なモルモット赤血球を使用せざるを得なかったことがあげられる。これらの特徴から近年流行したAH3型のウイルスと、それ以前に流行した同型ウイルスとは、従来から言われているHA抗原の変異に加え、更に生物学的性状の変異が進行している可能性が推察された。

東京都における今冬季のインフルエンザ流行は、集団発生の届出患者数が前期の流行期の2.3倍(26, 203/60, 572)、また、学級閉鎖数で5.06倍(2, 433/12, 316)に達しており、流行の規模は前期に比べ大きなものであった

表1. 1994~1995年冬季、東京都における集団かぜ患者の病因検索

発生年月旬	検索対象 集団例数	診断結果			
		インフルエンザウイルス		アデノ ウイルス	不明
		AH3型	B型		
1994. 12上	1	1(1)			
中	2				2
下	1			1	
1995. 1中	20	19(5)	1(1)		
下	10	10(4)			
2中	1		1(1)		
計	35	30(10)	2(2)	1	2

()内は血清学的試験による確認診断

表2. インフルエンザウイルス検出患者由来血清22例のHI試験成績

A/山形/32/89 (AH1)												
回 復 期												
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
<1*	1+											1
1		3										3
急 2			1									1
3												
性 4					2							2
5						6						6
期 6							5					5
7								3				3
8									1			1
9												
>10												
計	1	3	1		2	6	5	3	1			22

A/北九州/159/93 (AH3)													
回 復 期													
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計	
<1*													
1									1	1	1	3	
急 2								1		1	1	3	
3										5		5	
性 4										5		5	
5									2	1	2	5	
期 6											1	1	
7													
8													
9													
>10													
計									1	3	13	5	22

B/三重/1/93												
回 復 期												
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
<1*	9											9
1		5	2									7
急 2			3									3
3				2								2
性 4												
5												
期 6												
7								1				1
8												
9												
>10												
計	9	5	5	2				1				22

A/東京/2138/95 (AH3)													
回 復 期													
	<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計	
<1*													
1													
急 2										1	1	2	
3										2	1	3	
性 4									1	3	1	5	
5										3	2	5	
期 6										2	2	4	
7										2	1	3	
8													
9													
>10													
計										1	13	8	22

*: 8×2ⁿ (抗体価) +: 例数

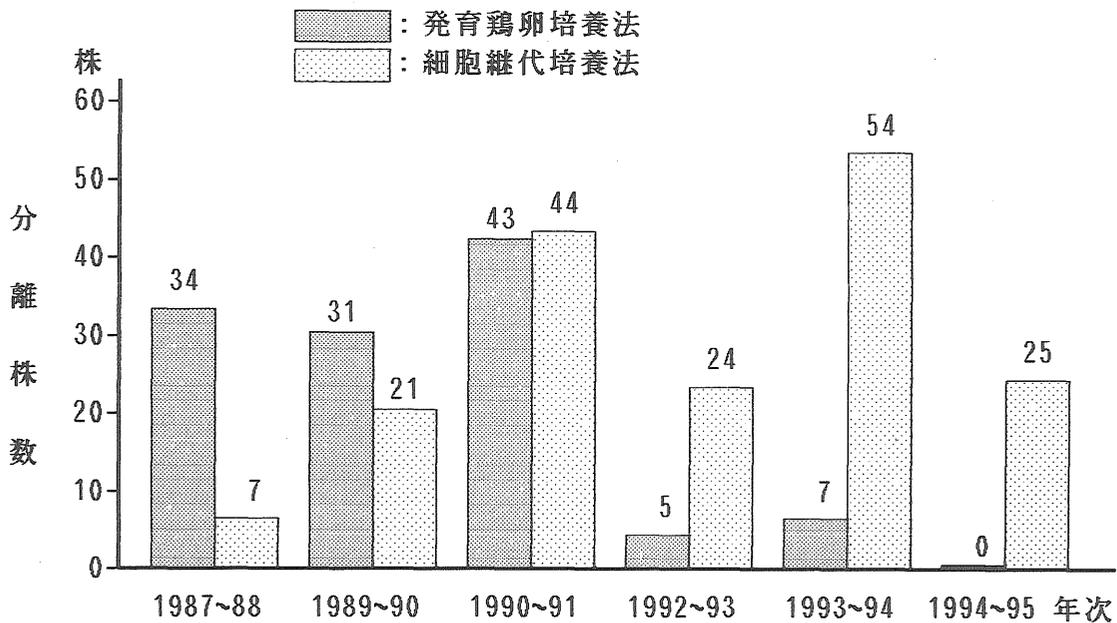


図1. 発育鶏卵法及び細胞継代法によるAH3型ウイルス分離株数の比較

ことを窺わせた。なお、前期の小規模流行時には集団発生時の患者材料が分散して搬入される傾向が認められたが⁶⁾、流行規模が比較的大きい今流行期においてはその搬入が1995年1月に35例中29例(83.0%)と一時期に集中した。

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A H 3型ウイルスによるものが主で、これに散発的にB型ウイルスによるものが混在したものであった。なお、A H 1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とインフルエンザの初発例は10月初旬に大阪府でA H 1型ウイルス、下旬には仙台市でA H 3型ウイルスがそれぞれ検出された。また、11月下旬に山形県並びに鳥取県でB型ウイルス検出の報告がなされたが、いずれも散発例からのものであった⁷⁾。

以後、1995年1月中旬までに、36都道府県でA H 3型ウイルスによる集団発生例が確認された。B型ウイルスの流行は2月初旬から3月初旬にかけて1道9県で確認された。また、A H 1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、集団例では北海道と佐賀県のわずか2事例のみであった⁸⁾。

以上のことから、全国的なインフルエンザの流行は1994年12月中旬からA H 3型ウイルスによる流行が始ま

り、1995年1月下旬に終息しつつあるところに重複するようにB型ウイルスの流行が起こり、それにA H 1型ウイルスも散発的に発生していたことが確認された。なお、今期の全国における集団発生による届出患者数は832,501人で、前年度(72,994人)の11.4倍となり、流行の規模はかなり大きなものであったことを窺わせた⁸⁾。

文 献

- 1) 山崎 清, 伊藤忠彦, 新開敬行, 他: 東京衛研年報, 40, 36-40, 1989.
- 2) 山崎 清, 伊藤忠彦, 藪内 清: 東京衛研年報, 41, 6-10, 1990.
- 3) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根整治, 他: 東京衛研年報, 42, 1-4, 1991.
- 4) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根大正: 東京衛研年報, 43, 8-11, 1992.
- 5) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根大正: 東京衛研年報, 44, 25-28, 1993.
- 6) 山崎 清, 伊藤忠彦, 関根大正: 東京衛研年報, 45, 19-22, 1994.
- 7) 国立予防衛生研究所内日本インフルエンザセンター: 1994/95シーズンインフルエンザ流行情報①.
- 8) 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19報), 1995.

東京都における1994年の HIV 抗体検査

田部井 由紀子*, 貞 升 健 志*, 森 功 次*
門 間 公 夫*, 関 根 大 正*, 鈴 木 敬 子**
吉 田 勲**, 平 田 一 郎*, 工 藤 泰 雄***

Serological Survey on Antibodies Against HIV in Tokyo in 1994.

YUKIKO TABELI*, KENJI SADAMASU*, KOHJI MORI*
KIMIO MONMA*, HIROMASA SEKINE*, KEIKO SUZUKI**
ISAO YOSHIDA**, ICHIRO HIRATA* and YASUO KUDOH***

Abstract

Assessment was made of HIV seroprevalence in individuals treated at the Public Health Center and Minami-Shinjuku Testing and Counseling Office in Tokyo during the age of 1994. Individuals tested for HIV antibody in Public Health Centers consisted ranged mainly from 20 to 49 years and percentage of males, females and unknown was 64.4%, 35.3% and 0.3% respectively. The positive rate for HIV antibody was 0.137%, exceeding that in 1992 and 1993.

Of 27 seropositive cases, 24 cases (88.1%) were males 20 through 59 years of age and 3 cases (11.1%), females, 20 through 29 years of age.

Keyword: 後天性免疫不全症候群 AIDS, ヒト免疫不全ウイルス HIV, HIV抗体検査 HIV Antibody Testing

緒 言

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) の感染によって生体防御機能が低下し、日和見感染症、悪性腫瘍、神経障害など多くの合併症を起こし、死に至る病気である¹⁾。

HIV に感染すると、無症候期でも配偶者等に対しての感染源となり得ることから、一般住民を対象とした保健所における抗体検査は、流行状況の把握、二次感染の阻止という意味で重要である。また、HIV には1型、2型が存在し、1型は感染から平均数年で、2型は10年若しくはそれ以上の時間を経て AIDS に進行する事が知

られているが^{2,3)}、アジドチミジン (AZT) 等の抗 HIV 薬の投与により発症を遅らせる事が可能なため、感染者自身の発症予防という意味でも HIV 感染の早期発見は重要である。

当所では、1987年2月より都内保健所から搬入された検体の HIV 抗体スクリーニング検査を、1988年4月より確認検査を開始した⁴⁾。更に、1993年9月より開設された南新宿検査相談室受診者のスクリーニング検査 (民間検査機関にて実施) 陽性検体の確認検査を開始し、1994年12月までの8年間にスクリーニング検査71,034件、確認検査544件を実施してきた。1987年から1993年までの結果は、すでに報告してきたので^{5,6)}、本報では1994年

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

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, 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

*** 微生物部

の検査結果について報告する。

材料及び方法

1) 検査対象

1994年1月から12月までの間に、都内保健所におけるHIV抗体検査受診者のスクリーニング検査8,723件、確認検査12件、目黒区、足立区、杉並区衛生試験所及び衛生研究所多摩支所からの確認検査6件、南新宿検査相談室からの確認検査14件について実施した。

2) 検査方法

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, サノフィダイアグノスティク)を実施し、一次スクリーニング検査陽性のものについては、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 HIV 1/2, 富士レピオ)を実施した。一次及び二次スクリーニング検査の両法で陽性となった検体については、確認検査を実施した。確認検査として、HIV-1, 2のそれぞれについてウエスタンブロット法(Western Blot Assay: WB法, ラブプロット1, 2, サノフィダイアグノスティク)並びに間接蛍光抗体法(Immunofluorescence Assay: IF法)をHIV-1感染細胞を固定したスライドを用いて実施し、これら確認検査によって陽性と判定されたものをHIV抗体陽性とした。更に、確認検査によってHIV抗体が認められるものの、1型と2型の鑑別ができない検体については、合成ペプチドを抗原としたスロットブロット法(Slot Blot Assay, ペプチラブ1, 2, サノフィダイアグノスティク)を用いて、1型と2型の鑑別を実施した。

なお、使用したすべての検査試薬キットは添付の説明書に従い検査、判定を行った。

結果および考察

1) HIV抗体検査受診者の性別と年齢構成

都内保健所から搬入された検体のうち、当所でスクリーニング検査を実施した8,723件の受診者の構成を調べた結果、男性受診者が5,618名(64.4%)、女性受診者が3,078名(35.3%)、性別不明が27名(0.3%)であり、年齢構成をみると、男性、女性共に20代が最も多く、次いで30, 40代が多かった(Fig.1)。保健所における男性受診者の割合は、抗体検査が開始された1987年より常に65%前後を占めており⁷⁾、1994年も変化が認められなかったことから(64.4%)、男性においては感染リスクが高いこともあり、HIV抗体検査への関心が引き続き高いことが推測された。また、10, 20代の若年層の受診者

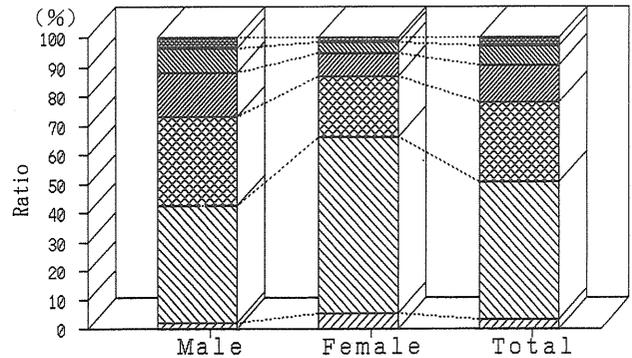


Fig. 1. The Age Distribution of Individuals who Visited Public Health Centers for the Testing of HIV Antibody.

▧ : Aged <19, ▨ : Aged 20-29,
 ▩ : Aged 30-39, ▪ : Aged 40-49,
 ▫ : Aged 50-59, ▬ : Aged >60

は、男性で42.4%、女性で66.0%を占め、特に女性受診者において若年層の占める割合が大きかった。このことから、女性においては若年層の方が感染リスクの高さも含め、HIV抗体検査への関心が高いことが推測された。

2) HIV抗体検査成績

保健所受診者の検体で当所において検査を実施し、一次スクリーニング検査(ELISA法)及び二次スクリーニング検査(PA法)の両法で陽性で、確認検査を実施した11件すべてがHIV抗体陽性であった。

また、目黒区、足立区、杉並区衛生試験所及び当所多摩支所からの検体で、確認検査のみを依頼された6件のうち2件が陽性、南新宿検査相談室から依頼された確認検査14件すべてが陽性であり、計27件のHIV-1抗体陽性例があった。当所で実施したスクリーニング検査8,723件のうち一次スクリーニング検査で陽性となったのは163件(1.869%)であり、更に11件が二次スクリーニング検査でも陽性となった。これら11件は確認検査でも陽性となったことから、2つの異なる検査法を使用することで、スクリーニング検査での偽陽性をふるい落とすことができることを示している(Table 1)。

当所でのスクリーニング検査8,723件の他に、目黒区、足立区、杉並区衛生試験所及び当所多摩支所で3,701件のスクリーニング検査がなされたこと、南新宿検査相談室のスクリーニング検査が7,147件であったことから⁷⁾、都内におけるHIV抗体陽性率を算出すると、保健所全体で0.105%、南新宿検査相談室では0.196%と南新宿検査相談室受診者の方が高率であった。また、都全体では0.137%であった。

更に、過去5年間をみると抗体検査数は、1992年を

Table 1. The Frequency of Positive Responses for the HIV Antibody Test in the Serum from Public Health Centers in 1994.

	No. of Samples	ELISA Positive	ELISA and PA Positive	WB and IF Positive	HIV Positive	Positive Rate of Confirm Test
The Number of Testing (The Frequency)	8,723	163 (1.869%)	11 (0.127%)	11 (0.127%)	11 (0.127%)	100%

ピークに減少傾向にあるものの⁶⁾, 1994年の陽性率は1992, 1993年より増加傾向を示した(Fig.2).

全抗体陽性者のうち男性は88.9%, 女性は11.1%を占め, 男性の陽性率は0.187%と, 女性の0.045%よりも高率であった(Fig.3). 男性の陽性者は20, 30, 40代が大半を占め, 前述の受診者の年齢構成の結果をそのまま反映した結果となった. また, 女性の陽性者は全てが20代であり, これも全女性受診者のうち20代が60.5%を占めていることを反映していた. このような妊娠可能年齢層の感染は, 性行為を通じた感染源になるとともに, 出産を通じた次世代の感染への直接的な原因となり得るため, 今後の母子感染リスクの増加を懸念させた.

WHOの統計によれば, 1994年末までに世界192ヶ国で1,025,073人のAIDS患者, 1,800万人以上のHIV感染者が報告されている⁸⁾. また, 厚生省エイズサーベイランス委員会によれば, 我が国では1994年末までに患者, 感染者数4,122人が報告されており, 新規報告数も前年に比べ19.5%の増加となっている⁹⁾. 更に, 男性感染者は20, 30, 40代の患者, 感染者が84.8%を占め, 女性感染者は10, 20代が85.2%と若年層に感染が集中していると報告しており, 陽性者の性別, 年齢構成に関しては,

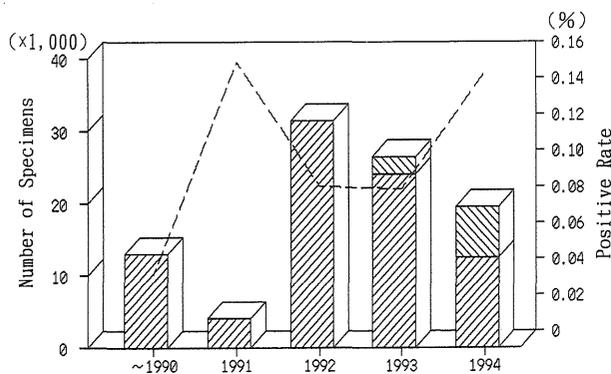


Fig. 2. Trends of the Number of Individuals who Visited Public Health Centers and Minami-Shinjuku Testing and Counseling Office for the Testing of HIV Antibody and Positive Rate in Tokyo.

- ▨ : Public Health Center,
- ▩ : Minami-Shinjuku Testing and Counseling Office
- : Positive Rate

今回の我々の結果もほぼ同じ傾向を示した.

本年は, HIV抗体検査を行う上で, 2つの重大な問題が提起された. 1つめの問題は, サブタイプOと呼ばれるHIV-1の新しいサブタイプが発見されたことである¹⁰⁾. これは, カメルーン人のエイズ患者から検出されたウイルスで, 既に発見されている他のHIVのサブタイプとエンベロップの構造が大きく異なっている. そのため, 非特異反応を減らす目的で開発された合成ペプチド, リコンビナント蛋白を抗原としたELISA法検査試薬の一部で, このサブタイプの抗体が検出ができないことがわかり問題となった¹¹⁾. もう1つの問題は, ある検査試薬で抗体陽転化直後の検出ができないケースがドイツで報告され, 既に我が国でも販売されていたこの検査試薬が回収されたという問題が起き¹²⁾, マスコミ等で大きく報道された. 都内衛生試験所の一部においてもこの試薬で検査が実施されていたが, それら検体については直ちに, 当所において他の検査試薬を用いて再検査を実施し, この検査試薬による検査で, HIV抗体陽性例の見落としがなかったことを確認した. その後WHOは, 回収された検査試薬及び当所で使用している検査試薬を含む, 8種類の検査試薬について再評価を実施し, 公衆衛生的調査及び血液供給のためのスクリーニング検査用試薬として問題なしと報告している¹³⁾.

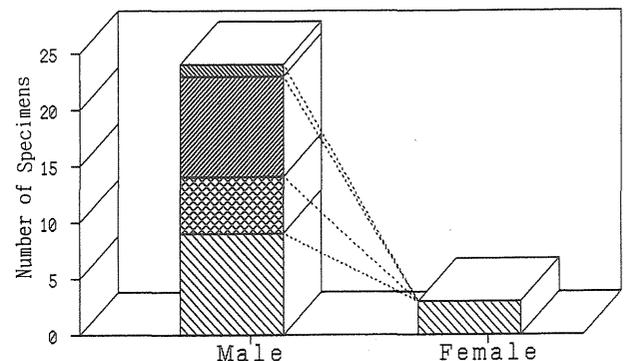


Fig. 3. The Distribution of Individuals who Showed Positive Response for the HIV Antibody Testing in Tokyo 1994.

- ▨ : Aged 20-29, ▩ : Aged 30-39,
- ▧ : Aged 40-49, ▦ : Aged 50-59

近年、高い特異性を求めたウイルス蛋白成分の合成ペプチド、リコンビナント蛋白を抗原とした試薬が多く販売され普及しているが、今後も HIV の新しい型、サブタイプが発見される可能性は大きく、これらの試薬で検出できないケースに遭遇することは有り得る。これらの未知の問題が起きた場合に早急に対応するためにも、検査に関する情報の収集に努めると共に各種検査試薬の感度や特異性についての調査研究を進めて行きたい。

ま と め

1994年の東京都における HIV 抗体検査陽性率は、保健所で0.105%、南新宿検査相談室で0.196%、都全体では0.137%であり、1992、1993年と比較して、増加傾向を示した。検査受診者のうち、男性が64.4%、女性が35.3%、性別不明が0.3%であった。男女共に、20、30、40代が大半を占めたが、特に女性若年層の受診者が多かった。

抗体陽性者のうち、男性が88.9%、女性が11.1%であった。男性陽性者は20、30、40代が大半であったが、女性陽性者は全て20代であった。

文 献

- 1) 関根大正：公衆衛生，**56**，560-564，1992.
- 2) Ancelle, R., Bletry, O., Baglin, C. A., et al. : *The Lancet*, **1**, 688-689, 1987.
- 3) 南谷幹夫：病理と臨床，**11**，221-222，1993.
- 4) 大貫奈穂美，貞升健志，関根大正，他：東京衛研年報，**41**，16-21，1990.
- 5) 関根大正，貞升健志，大貫奈穂美，他：東京衛研年報，**43**，12-15，1992.
- 6) 森 功次，貞升健志，田部井由紀子，他：東京衛研年報，**45**，23-27，1994.
- 7) 東京都衛生局医療福祉部エイズ対策室：エイズ関連相談等の概況，1994.
- 8) WHO : *Weekly Epidemiological Record*, **70**, 5-8, 1995.
- 9) HIV 感染者発症予防治療に関する研究班・情報委員 会，HIV 疫学研究班部会・検査情報普及グループ：HIV 最近の動向，第12号，1995，AIDS 医療情報センター.
- 10) Gürtler, G. L., Hauser, H. P., Eberle, J., et al. : *J. Virol.* **68**, 1581-1585, 1994.
- 11) Loussert-Ajaka I., Ly D. T., Chaix L. M., et al. : *The Lancet*, **343**, 1393-1394, 1994.
- 12) *Clinica*, DEC., 5th, 1994, PJB Publications LTD.
- 13) Constantine, N. T., Groen, G., Belsey, E. M., et al. : *AIDS*, **8**(12), 1715-1720, 1994.

PCR 法による生エビからのコレラ毒素産生 *Vibrio cholerae* O1 および O139の検出方法の検討

石崎 直人*, 金子 誠二*, 片岡 潤*
小久保 彌太郎*, 伊藤 武**

Detection of Cholera Toxin Producing *Vibrio cholerae* O1 and O139 from Artificially Contaminated Raw Prawn Using the Polymerase Chain Reaction

NAOTO ISHIZAKI*, SEIJI KANEKO*, JUN KATAOKA*
YATARO KOKUBO* and TAKESHI ITOH**

The Polymerase chain reaction (PCR) was used for the rapid detection of cholera toxin producing *Vibrio cholerae* O1 and O139 from raw prawn rapidly.

These serotype strains were inoculated to raw prawn and enriched in alkaline-peptone water. After incubation, the enrichment broth was used for PCR and a conventional culture method. Before enrichment, PCR was only amplified 380bp-DNA of *ctx* gene from the sample inoculated to 10^8 cfu per 10 g of enrichment broth. After 8 hours incubation, 380bp-DNA was detected in the sample inoculated to under 1cfu per 10 g. Inoculated organisms were also recovered from almost samples for 8 hours incubation and all samples for 24 hours incubation.

These results suggested that the raw prawn contaminated with *V. cholerae* O1 or O139 will be able to detect and specify rapidly using combination of enrichment procedure and the PCR technique.

Keywords : PCR 法 Polymerase Chain Reaction technique, コレラ菌 O1 *Vibrio cholerae* O1, コレラ菌 O139 *Vibrio cholerae* O139, 生エビ raw prawn, コレラ毒素遺伝子 cholera toxin gene

緒 言

1992年10月、インド南部のマドラスで *Vibrio cholerae* non O1 によるコレラ様疾患の大流行が発生した¹⁻⁵⁾。この流行は、インド国内及び隣国のバングラデシュに波及し、多数の犠牲者を出した。本菌は伝播力が強く、その後1年以内にタイ、シンガポール、マレーシアなどの東南アジア各国でもコレラ様下痢患者から分離されている^{5,6)}。現在までに報告された、本菌によるわが国や先進諸国での感染例は、アジアからの帰国者のみに限定されている。

本菌は、現在 *V. cholerae* の139番目の血清型として扱われ、遺伝学的解析からエルトル型コレラ菌と高い相関性があり⁷⁻⁹⁾、コレラ菌と同様にコレラ毒素遺伝子 *ctx*

を保有し^{10,11)}、コレラ毒素を産生する。

わが国では、*V. cholerae* O139汚染の拡大しているインドや東南アジア諸国から多量の鮮魚介類を輸入しており、そのうち輸入数量の4分の1はエビ類である¹²⁾。これらのエビ類が、原産国で *V. cholerae* O1 あるいは O139に汚染され、それがわが国に輸入されて市場に出回る危険性がある。このような危害を未然に防ぐには、汚染鮮魚介類を簡易迅速に特定し、市場から排除することが必要である。

このような疫学的背景及び輸入実態から、われわれは、生エビからコレラ毒素産生 *V. cholerae* O1 及び O139を迅速に検出するために、PCR法を用いた検出方法について実験的に検討するとともに、従来の培養法と比較した。

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of

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

**東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科

材料及び方法

1. 供試菌株及び培地

供試菌株はコレラ毒素産生 *V. cholerae* O1 エルトール小川型及びコレラ毒素産生 *V. cholerae* O139の2株である。

使用した培地は、Brain Heart Infusion (BHI: Difco), アルカリペプトン水 (BACTO-PEPTONE (Difco) 1%, NaCl 1% (pH8.6)) 及び TCBS 寒天培地 (日水製薬) である。

2. 供試材料

東京都内で購入し、*V. cholerae* O1 あるいは O139 に汚染されていないことを確認した市販生エビ (ブラックタイガー) を供試した。

3. PCR 法の条件及びアガロースゲル電気泳動

使用したプライマーは、小林らが報告したコレラ毒遺伝子 *ctx* 領域内の380塩基対 (bp) の DNA を増幅する CT-1 (5'-TCAAACATATATTGTCTGGTC-3') 及び CT-2 (5'-CGCAAGTATTACTCATCGA-3') である¹³⁾。

PCR 反応液は10倍濃度の PCR 反応用バッファー5 μ l, 10mM dATP, dTTP, dGTP 及び dCTP を各 1 μ l, 100 μ M 各プライマーを 1 μ l, 1unit の Tth DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を混合し、滅菌蒸留水33.75 μ l を加えて45 μ l に調製した。鋳型 DNA は菌培養液の100 μ l を1.5ml の遠心チューブに取り、5分間煮沸後遠心してその上清を使用した。PCR 反応は、反応液に 5 μ l の鋳型 DNA を加えて混合後、反応液の蒸発を防ぐためにミネラルオイルを1滴重層して行い、2本鎖 DNA を解離するために92°C で30秒間加熱、鋳型 DNA とプライマーをアニーリングさせるために55°C で30秒間保温、DNA の伸長反応を行うために72°C で30秒間反応させた。この1連の過程を1サイクルとし、25回繰り返すことにより、380bp の DNA 断片の増幅を行った。

PCR 産物の確認は TBE バッファー (89mM Tris-塩酸, 89mM ほう酸, 2mMEDTA (pH8.0)) に 2% に溶解したアガロースゲル (Nusieve 3:1 Agarose) を作製して、ミニゲル電気泳動システム (Mupid-2) を用いた電気泳動法で行った。すなわち、ゲルの各ウエルに10 μ l の PCR 産物と 2 μ l のマーカー色素 (50% グリセリン, 0.25% ブロムフェノールブルー (pH8.0)) を混和して注入した。分子量マーカーには123bp DNA ladder (Gibco BRL) を用いた。電気泳動用緩衝液には、TBE バッファーを用い、100V で約1時間泳動後、ゲルを0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液に侵して15分間染色して、紫外線照射下で観察し写真撮影を行った。

4. 菌数と PCR 法の結果との関係

菌数と PCR 法の結果との関係を知るために、各菌株を BHI で37°C, 24時間培養後、培養液をリン酸緩衝液で10倍階段希釈して 10^0 ~ 10^8 cfu/ml の菌液を調製した。各希釈菌液から100 μ l を取り、鋳型 DNA を調製し PCR 法を実施した。

5. 生エビに接種した *V. cholerae* O1 及び O139 の PCR 法による検出と培養法による回収

ストマッカー用のポリ袋に、生エビ10g を秤量し各培養菌液の10倍階段希釈液 1ml ずつを接種した。さらに、90ml のアルカリペプトン水を加え、ストマッキングした後37°C で培養した。菌を接種した直後、2, 4, 6, 8 及び24時間培養後に培養液を100 μ l 分取して鋳型 DNA を調製し PCR 法を実施した。

同時に、PCR 法と従来の培養法を比較するために、増菌培養 8 及び24時間後に、TCBS 寒天培地に画線塗抹し37°C, 24時間培養した。培養後 TCBS 寒天培地に発育した疑わしい集落を一平板当たり 5 個釣菌し、抗 O1 及び抗 O139 血清 (デンカ生研) を用いたスライド凝集反応で回収菌の確認を行った。これら一連の過程を Fig.1 に示した。

結果

1. PCR 法の検出限界

PCR 法では、どの程度の菌数であれば380bp の DNA が増幅されるかを確認するために、純培養菌の10倍階段希釈液について PCR 法を行った。その結果、Table 1. に示したように、*V. cholerae* O1 あるいは O139 の菌数が 10^4 cfu/ml 以上であれば、380bp の DNA が増幅されアガロースゲル電気泳動で検出できた (Fig.2)。

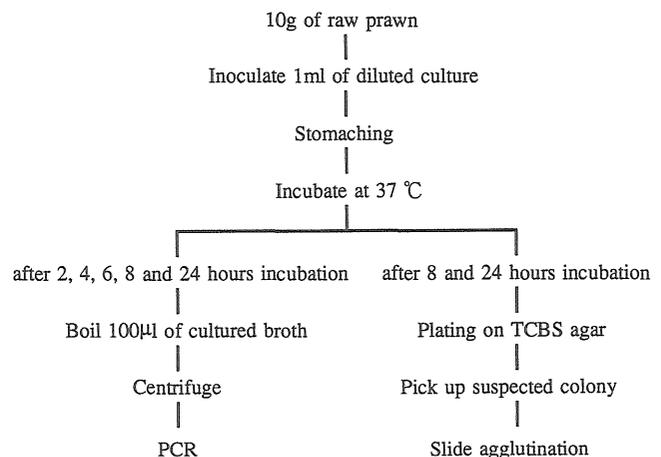


Fig. 1. Schematic Procedure for the Detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 from artificially Contaminated Raw Prawn Using PCR and Conventional Method

Table 3. Recovery of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Inoculated into Raw Prawn by Conventional Culture Method (Number of Positives/Number of Colonies Tested)

Incubation time (hours)	Serotype	Number of bacterial cell in 10 g of raw prawn									
		10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
<i>Vibrio cholerae</i>	O1	8	4/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
		24	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	O139	8	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
		24	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

考 察

PCR法は目的とする遺伝子内の特異的なDNAのみを増幅することができるため、多くの病原細菌の病原性評価や同定に利用されている。われわれは、このPCR法を生エビからの毒素産生 *V. cholerae* O1 及び O139 の検出に応用した。その結果、アルカリペプトン水を用いた増菌培養とPCR法を併用すれば、汚染菌数の少ない生エビでも8時間増菌培養することにより、確実にこれら2種類の血清型菌を検出できることを実験的に明らかにした。

近年、生鮮魚介類の輸入量が増え、1993年におけるエビの総輸入量30万トンのうち、約20万トンをインドや東南アジアから輸入している¹²⁾。これらの国々は *V. cholerae* O1 あるいは O139 の汚染地域であるため、汚染された生エビがわが国に輸入される可能性があり、食品衛生上憂慮すべき問題である。わが国では1978年に、輸入ロブスターが原因食品と推定されたコレラの流行が、東京都内の結婚式場で発生している¹⁴⁾。このような事例が再度発生することを防ぐためには、汚染生エビを未然に市場から排除するための迅速な検査方法を確立しなければならない。

当初、われわれは増菌培養せずに直接PCR法で2種類の血清型菌を検出するために、増菌培養液の生エビ懸濁液に接種した菌で実験を行い、煮沸して鋳型DNAを作製する方法では、接種菌量が10g当たり10⁸cfu以上でないと検出できないことを確認した。これは、純培養菌で行った実験結果より、2オーダーレベルが高くないと検出できないことを示唆していた。純培養菌と接種菌とでPCR法の結果に差が生じたのは、生エビ中に含まれている何らかのPCR反応阻害物質が存在すると考え、鋳型DNAを2種類の方法で作製して検討した。一つは接種菌を洗浄してから煮沸する調製法である。もう一つは、以前に豚肉からの病原性エルシニア属菌の検出で良

好な結果が得られることを報告した、増菌培養液をGuanidinium thiocyanateで溶菌しシリカ粒子にDNAを吸着させる作製法である¹⁵⁾。結果には示さなかったが、これらの方法を用いてPCR法を行っても、純培養菌と同レベルの汚染菌数である10⁴cfu/ml以上でなければ確認できないことが明らかにされた。以上の実験結果と、ビブリオ属の増菌培地中での発育速度が比較的速く世代時間が約10分と短いこと及び実際の生エビの *V. cholerae* 汚染が1g当たり数個あるいはそれ以下であることを考え合わせて、われわれは、生エビをアルカリペプトン水中で増菌培養し、その培養液を煮沸して鋳型DNAを作製してPCR法を行うこととした。その結果、生エビを汚染する *V. cholerae* O1 及び O139 の菌量が10g当たり数個であっても、PCR法あるいは従来の培養法で8時間増菌培養すればこれらの菌を検出できることを実験的に確認した。増菌培養時間については、今回の実験で採用した静置培養を振とう培養に変更することにより、短縮できると考えられ、しかも、PCR法は従来の培養法のような分離培地や確認操作を必要としないため、通常業務の時間内に汚染菌数の少ない生エビから、コレラ毒素を産生する *V. cholerae* O1 及び O139 を検出することができる極めて有効な方法と考えられた。

(本研究の概要は第14回食品微生物学会1993年11月で発表した。)

和 文 要 旨

生エビからコレラ毒素産生 *Vibrio cholerae* O1 及び O139 を迅速に検出するために、PCR法の有用性を実験的に検討した。

10倍階段希釈した2種類の血清型菌の培養液をそれぞれ生エビに接種してアルカリペプトン水で増菌培養し、培養液についてPCR法を行うとともに、従来の培養法で接種菌の回収を行った。増菌培養前では、10g当たり10⁸cfu接種した検体でのみ目的とする *ctx* 遺伝子内の

380bp の DNA が PCR 法で増幅されたが、培養 8 時間後では 10 g 当たり 1 個以下接種の検体でも 380bp の DNA が増幅された。PCR 法と並行して行った培養法による接種菌の回収試験では、培養 8 時間後にはほとんどの検体から、培養 24 時間後にはすべての検体から接種菌が回収された。

以上の結果から、生エビを汚染する *V. cholerae* O1 及び O139 は、増菌培養法と PCR 法を併用することにより迅速に検出し同定することが可能であった。

文 献

- 1) Albert, M. J., Ansaruzzaman, M., Bardhan, P. K., et al. : *Lancet*, **342**, 387-390, 1993.
- 2) Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., et al. : *Lancet*, **342**, 703-704, 1993.
- 3) Fisher-Hoch, S. P., Khan, A., Haq, I. U., et al. : *Lancet*, **342**, 422-423, 1993.
- 4) 竹田美文 : 日本医事新報, 3626, 29-32, 1993.
- 5) Nair, G. B., Bhattacharya, S. K., Deb, B. C. : *Indian J. Public Health.*, **38** (2), 33-36, 1994.
- 6) Islam, M. S., Hasan, M. K., Miah, M. A., et al. : *Lancet*, **342**, 430, 1993.
- 7) Hall, R. H., Khambaty, F. M., Kothary, M., et al. : *Infect. Immun.*, **62** (9), 3859-3863, 1994.
- 8) Bhadra, R. K., Choudhury, S. R., Das, J. : *Lancet*, **343**, 728, 1994.
- 9) Makino, S., Kurazono, T., Okuyama, Y., et al. : *FEMS Microbiol. Lett.*, **126**, 43, 43-48, 1995.
- 10) Wachsmuth, I. K., Blake, P. A., Olsvik, O. : *Vibrio cholerae and Cholera*, 53-67, The American Society For Microbiology Press, 1994, Washington, D. C.
- 11) Chowdhury, M. A., Hill, R. T., Colwell, R. R. : *FEMS-Microbiol. Lett.*, **119** (3), 377-380, 1994.
- 12) 日本貿易月報 : 平成 5 年 12 月号, 1-99, 1994, 日本関税協会, 東京.
- 13) 小林一寛, 田口真澄, 勢戸和子 他 : 感染症学雑誌, **67** (11), 1045-1051, 1993.
- 14) 池之端文化センターに関連したコレラ流行調査報告書, 1980. 東京都衛生局, 東京.
- 15) Kaneko, S. Ishizaki, N., Kokubo, yataro. : *Contrib. Microbiol. Immunol.*, **13**, 1995 in press.

マイクロプレートを用いた *Listeria monocytogenes* の簡易・迅速な血清型別法

飯田 孝, 神崎 政子, 小久保 彌太郎

Simple and Rapid Serotyping Assay for *Listeria monocytogenes* Using Microplate

TAKASHI IIDA, MASAKO KANZAKI and YATARO KOKUBO

Keywords: リステリア モノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*, 血清型別 serotyping, マイクロプレート凝集試験 microplate agglutination test, 因子血清 factor serum

はじめに

L. monocytogenes は人や動物に髄膜炎や、敗血症を起こすリステリア症の起因菌として知られている¹⁾。通常、本菌は血清学的に13種類に型別されているが²⁾、リステリア症の人や動物から分離される血清型は、90%以上が1/2a, 1/2b, 4bの3血清型であることから³⁾、血清型は *L. monocytogenes* の病原性の指標として重要視されている。近年、PCR法、パルスフィールド電気泳動法などの検査法が開発され⁴⁾、病原株を直接確認したり、型別することにより、病原株の分布および人や動物への感染経路が分子生物学的なレベルで明らかにされつつある。しかし、これらの検査法はコストが高く、操作が複雑であることを考えると、今後も血清型別検査は、病原株を選択する重要な検査法として利用されることと考えられる。

L. monocytogenes の血清型別に使用する因子血清は市販されてまもないこともあって、その検査術式については十分理解されているとはいえない。本報では、われわれが実施した因子血清の作成手順および同時に多数の菌株を簡易・迅速に血清型別できるマイクロプレート凝集試験法を考案したので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

供試した菌株は、表1に示した国立予防衛生研究所より分与を受けた *L. monocytogenes* 11株、*L. ivanovii* 1株、合計12株で、これを標準菌株として使用した。

2. 粗血清および因子血清の作成

免疫血清の作成に当って、標準菌株のうち *L. monocytogenes* 血清型3aおよび3cを除く10菌株を Seeliger & Höhne²⁾ の方法に従ってO血清用は37℃、H血清用は

30℃でそれぞれ18-20時間培養し、これらの条件で2代継代培養を行った。7,000gで20分間遠心分離して菌体を集め、これをPBSで2回洗浄し、O血清作成菌は0.5%に石炭酸を加え、H血清作成菌は0.3%にホルマリンを加えて24時間固定して免疫用抗原菌液とした。免疫用の家兎は約2.5kgの健康な日本白色家兎で、使用する菌株による抗体価が8倍以下であることを確認後、耳静脈から1~5×10⁹/mlに調製した菌液を初回0.5ml、2回目以降は0.5mlずつ増量していき、3~4日おきに合計5回接種した。最終免疫の1週間後に一部採血を行って、マイクロプレート法により抗体価を測定し、原則としてO粗血清は1,024倍以上、H粗血清は16,000倍以上であることを確認後に全採血を行った。*L. monocytogenes* の各血清型の菌は表2に示したようなOおよびH因子を有することから、標準菌を表3に示した組合わせで粗血清中に加えて4℃で18時間反応させ、交差する因子を吸収して、O因子10種類、H因子4種類の計14種類の因子血清を作成した。

3. 血清抗体価測定用標準菌液および血清型別用試験菌液の調製

いずれに使用する菌株も、Tween 80を0.1%に添加した Tryptose broth 0.7mlのマイクロチューブ(三光純薬)に接種し、O血清用は37℃、H血清用は30℃で18時間の条件で2代継代培養した後、O血清用は7,000gで5分遠心分離して上清を捨て、生理食塩水に菌体を懸濁後、100℃で60分間加熱処理し、H血清用はホルマリンを0.3%になるように加えて両菌株とも使用時まで4℃に保存した。

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

表2. *L. monocytogenes* の血清型およびその抗原構造

血清型	O 因子										H 因子			
	I/II	V/VI	I	IV	VI	VII	VIII	IX	X	XII/XIII	AB	A	C	D
1/2a	+		+								+	+		
1/2b	+		+								+	+	+	
1/2c	+		+								+			+
3a	+			+							+	+		
3b	+			+							+	+	+	
3c	+			+							+			+
4a		+				+		+			+	+	+	+
4ab		+			+	+		+	+		+	+	+	+
4b		+			+	(+)		(+)			+	+	+	+
4c		+				+					+	+	+	+
4d		+			+		+				+	+	+	+
4e		+			+		(+)	(+)			+	+	+	+
7										+	+	+	+	+

() 検出されることもある

表1. 因子血清作成用標準菌株

菌種名	菌株番号	血清型
<i>L. monocytogenes</i>	88-178	1/2a
<i>L. monocytogenes</i>	88-179	1/2b
<i>L. monocytogenes</i>	88-180	1/2c
<i>L. monocytogenes</i>	88-181	3a
<i>L. monocytogenes</i>	88-182	3b
<i>L. monocytogenes</i>	88-183	3c
<i>L. monocytogenes</i>	88-184	4a
<i>L. monocytogenes</i>	88-185	4b
<i>L. monocytogenes</i>	88-186	4c
<i>L. monocytogenes</i>	88-187	4d
<i>L. monocytogenes</i>	88-191	7
<i>L. ivanovii</i>	88-189	5

表3. 因子血清作成のための吸収操作

O粗血清	O因子吸収菌株	O因子血清
1/2a & 1/2b	4b	I/II
4b	1	V/VI
1	3	I
3	1	IV
4b	4c	VI
4c	4b	VII
4d	4b	VIII
4a	4c	IX
5	4d	X
7		XII/XIII

H粗血清	O因子吸収菌株	H因子吸収菌株	H因子血清
1/2a	1/2a	-	AB
1/2a	1/2a	1/2c	A
4b	4b	1/2a	C
1/2c	1/2c	1/2a	D

4. マイクロプレートを用いた血清抗体価の測定

1) O粗血清およびO因子血清

マイクロプレートの各ウェルに生理食塩水を50μlずつ分注し、その第1列に、表4に示した10種類の血清型の粗血清50μlを分注した。次いで、第1列の混合液50μlを第2列に分注するという操作を繰り返して、プレートの最終列に当る12列まで各粗血清の2倍階段希釈液を作成した。各希釈列に、免疫に使用した標準菌株の血清抗体価測定用菌液を30μlずつ分注した後、マイクロミキサーでよく攪拌し、37℃で30分間保温した。その後、プレートは4℃で1夜放置するか、または、結果判定までの時間を短縮する目的で、プレート遠心器で100g、30分間遠心した。判定は凝集像が確認できた最大希釈倍率を抗体価とした。

O因子血清の抗体価は、表5に示した10種類の因子血清について、粗血清の抗体価測定に準じて2倍階段希釈列を作成し、各希釈列に標準菌株の調製菌液を加えて測定した。

2) H粗血清およびH因子血清

表6に示した3種類のH粗血清の抗体価は、1/2a, 1/2b, 1/2c型菌を抗原としてO血清抗体価に準じて測定した。また、表7に示した4種類のH因子血清の抗体価は血清型1および3型菌計6株により測定した。

表4. O粗血清の抗体価と交差反応

菌株番号	血清型	各粗血清の抗体価									
		1/2a	1/2b	1/2c	3b	4a	4b	4c	4d	7	5
88-178	1/2a	8,000	8,000	8,000	1,024	128	32	64	128	64	32
88-179	1/2b	8,000	8,000	8,000	1,024	128	32	64	128	64	32
88-180	1/2c	8,000	8,000	8,000	1,024	128	32	64	128	64	32
88-182	3b	8,000	4,000	2,000	2,000	64	32	32	32	128	64
88-184	4a	256	256	16	128	16,000	2,000	128	128	32	128
88-185	4b	256	512	32	4,000	8,000	16,000	1,024	1,024	128	2,000
88-186	4c	256	128	32	64	16,000	4,000	256	512	128	256
88-187	4d	—	—	16	32	512	4,000	1,024	256	64	2,000
88-191	7	16	16	128	128	32	128	128	64	2,000	128
88-189	5	16	—	—	64	512	4,000	512	256	32	4,000

— : <16

■ : 接種菌と粗血清の抗体価

表5. O因子血清の抗体価と交差反応

菌株番号	血清型	各因子血清の抗体価									
		I	I/II	IV	V/VI	VI	VII	VIII	IX	X	XII/XIII
88-178	1/2a	256	256	—	—	—	—	—	—	—	—
88-179	1/2b	256	256	—	—	—	—	—	—	—	—
88-180	1/2c	256	256	—	—	—	—	—	—	—	—
88-181	3a	—	32	32	—	—	—	—	—	—	—
88-182	3b	—	64	32	—	—	—	—	—	—	—
88-183	3c	—	128	64	—	—	—	—	—	—	—
88-184	4a	—	—	—	256	32	256	—	1,024	—	—
88-185	4b	—	—	512	2,000	512	—	16	—	—	—
88-186	4c	—	—	—	512	16	256	—	128	—	—
88-187	4d	—	—	—	512	512	—	32	—	—	—
88-191	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	32
88-189	5	—	—	—	512	512	—	—	—	128	—

— : <16

■ 交差反応

表6. H粗血清の抗体価と交差反応

菌株番号	血清型	粗血清の抗体価		
		1/2a	1/2b	4b
88-178	1/2a	8,000	4,000	32,000
88-179	1/2b	4,000	4,000	32,000
88-180	1/2c	16,000	16,000	32,000

■ : 接種菌と粗血清の抗体価

表7. H因子血清の抗体価と交差反応

菌株番号	血清型	各因子血清の抗体価			
		A	C	D	AB
88-178	1/2a	512	—	—	512
88-179	1/2b	256	512	—	512
88-180	1/2c	—	—	512	512
88-181	3a	512	—	—	512
88-182	3b	512	512	—	512
88-183	3c	—	—	512	512

— : <16

5. マイクロプレートを用いた血清型別法

試験菌株の血清型別はマイクロプレートを用いて図1に示した step 1 ~ 4 の術式により、試験菌液30 μlと因子血清50 μlを混合して凝集反応により行った。因子血清は、抗体価測定により得られた値より1段階低い希釈を用いた。例えば、抗体価128倍の因子血清は64倍に希釈して使用した。以下に、試験菌株1~4をモデルとした血清型別法を述べる。

- Step 1 O因子血清 I/II と V/VI により1/2, 3型か、あるいは4, 7型かを決定する。
 試験菌株1と4は、1/2又は3型、試験菌株2, 3は4型と判定する。
- Step 2 Step 1で1/2又は3型と決定された菌株について、O因子血清 I と IV により1/2型か3型かを決定する。
 試験菌株1, 4は、それぞれ1/2型, 3型と判定する。

Step 3 Step 2で1/2又は3型と決定された菌株について、H因子血清 AB, A, C, DによりH因子を決定し、最終的な血清型を決定する。

表2の抗原構造から、1/2型に決まった試験菌株1は1/2a型、試験菌株4は、3cとそれぞれ判定する。

Step 4 Step 1で4型と決定された菌株2, 3について、O因子血清 VI, VII, VIII, IX, X, XII/XIIIによりO因子を決定し、最終的な血清型を決定する。
 表2の抗原構造から試験菌株2, 3はそれぞれ4b型, 4ab型と判定する。

なお、血清型別試験の実施にあたっては、同時に必ず標準菌株を対照とする。

結果および考察

家兎を免疫して得られた10種類のO粗血清および3種類のH粗血清の抗体価と標準菌株間の交差反応を行い、その結果を表4, 表6に示した。O粗血清の多くは免疫

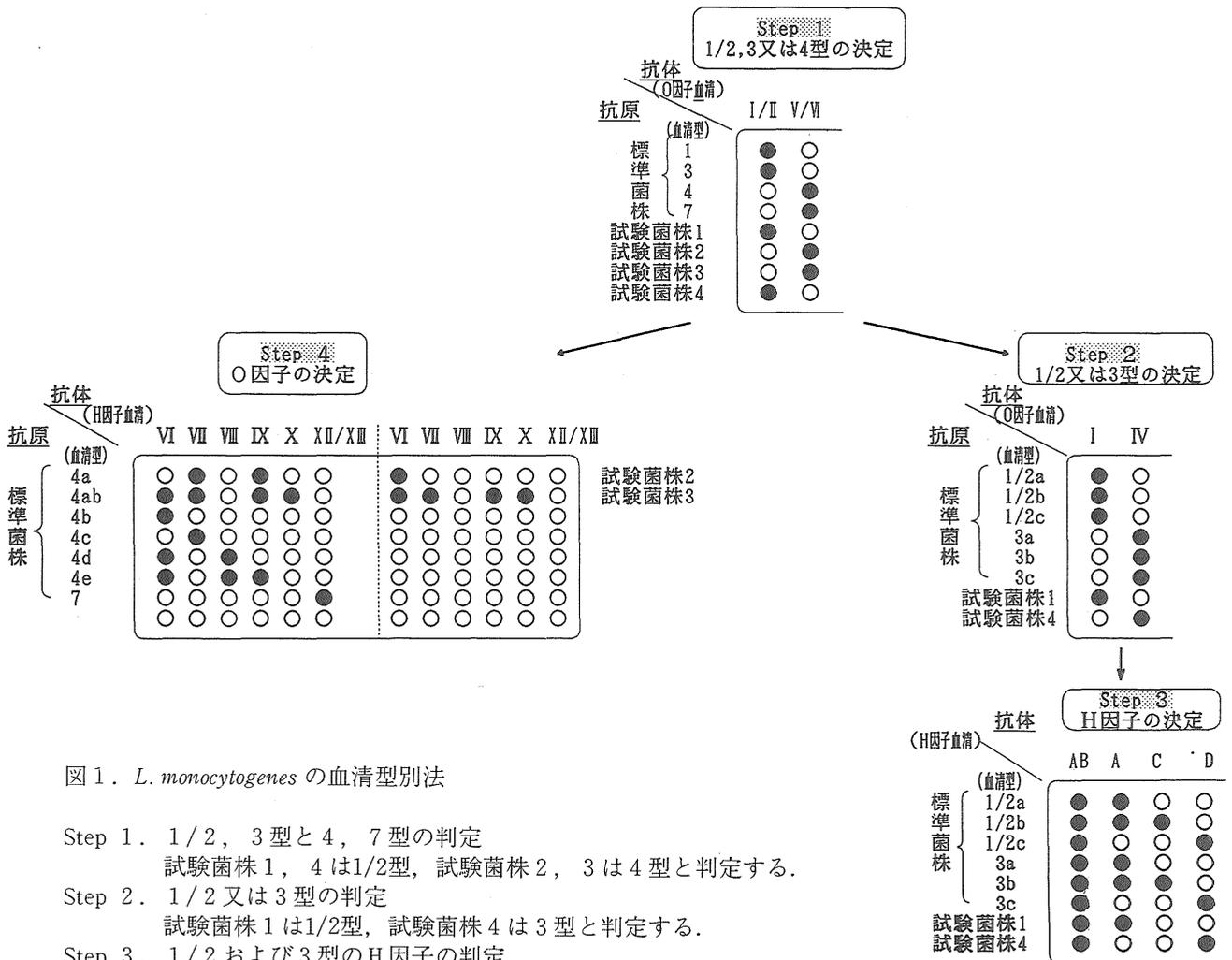


図1. *L. monocytogenes* の血清型別法

- Step 1. 1/2, 3型と4, 7型の判定
 試験菌株1, 4は1/2型, 試験菌株2, 3は4型と判定する。
- Step 2. 1/2又は3型の判定
 試験菌株1は1/2型, 試験菌株4は3型と判定する。
- Step 3. 1/2および3型のH因子の判定
 試験菌株1は1/2a, 試験菌株4は3cと判定する。
- Step 4. 4型のO因子の判定
 試験菌株2は4b型, 菌株3は4abと判定する。

した菌株に対して高い抗体価を示したが、血清型3b, 4c, 4dで作った粗血清は4b株に対して高い抗体価を示した。最も高い抗体価が得られたのは4a, 4b株で作成したO粗血清で16,000倍、最も低かったのは4c, 4d株で作成した256倍であった。4型菌は6種類あるが、その抗原構造は Garciaら⁵⁾の報告にもあるように共通部分が多く、それらの菌株で作成する粗血清には多くの交差反応が認められている。今回の測定でもO粗血清で交差の見られなかったものは無かった。一方、1/2a, 1/2c, 4b株で作成したH粗血清の抗体価は、4,000倍から32,000倍であり、4b株で作成したH粗血清は凝集反応に用いた1/2a, 1/2b, 1/2cの3菌株とも32,000倍と、高い抗体価を示した。

一方、粗血清を吸収して得た10種類のO因子血清および4種類のH因子血清の抗体価と標準菌株間の交差反応は、それぞれ表5, 表7に示したように、V/VI, IXの因子血清では高い抗体価が得られたが、VIII, XII/XIIIでは低かった。IV, VIII, IXは、いずれも4b型菌と512倍, 16倍, 128倍の交差が認められた。IXは4c型菌と128倍の交差があったが、その他の因子血清では、交差は認められなかった。因子血清は粗血清量のおよそ5倍に希釈されている。しかし、今回使用した因子血清の抗体価は、粗血清を吸収するのに必要な菌量に差があり、希釈率が異なることから単純に比較はできない。

今回作成した因子血清で、交差が見られたのはIV, VIII, IXの3種類であった。1又は3型を決定する因子血清IVは、4b型菌と512倍と高い凝集を示したが、この因子血清は4b型菌の決定には使用しないので、これ以上の吸収は行わなかった。因子血清VIIIは、VIIIの因子を持つ4d型菌に対して32倍と低い抗体価しか示さなかったが、4b型菌と16倍で交差することから、希釈して使用した場合、凝集が弱くなるという問題が残った。因子血清IXの交差は因子血清を希釈することにより消失することから使用が可能であった。以上のようにVIII以外の因子血清は問題なく使用できることがわかった。

L. monocytogenes の因子血清は *E. coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* 等と交差することが知られていることから²⁾、血清型別を行う菌は、その前に *L. monocytogenes* と同定されていることが必要である。また、表4に示したように *L. monocytogenes* は菌株間においても共通抗原を多く保有していることから、因子血清の作成に当っては菌

株間における交差反応と因子血清の力価を明らかにした後に使用することが重要である。

このようにして作成されたOおよびH因子血清により *L. monocytogenes* は血清型別されるが、その型別法は、10種類のO因子血清と4種類のH因子血清の凝集と非凝集の組み合わせにより行われる。この点、数多くある因子血清の中のOおよびH因子血清1種類ずつの凝集を確認することにより型別が決定されるサルモネラや病原性大腸菌などの血清型別とは異なっており、その型別に当って多少の熟練を要する。従って、*L. monocytogenes* では試験菌株数が多くなると検査が煩雑になるために、従来のスライド凝集反応によるO型別、試験管凝集反応によるH型別よりも簡易迅速な血清型別法が必要となる。今回、われわれが考案したマイクロプレートを用いる凝集反応による方法は、広い検査スペースを必要とせず、しかも、連続して8穴に分注できるマルチピペットなどを用いることにより、同時に多数の菌株の血清型別が可能な実用性の高い方法と考える。

おわりに

臨床材料や食品から分離された *L. monocytogenes* について血清型別を明らかにすることは、疫学的に有益な情報が提供されることから、血清型別用因子血清の作成あるいは、それによる型別に習熟することが *L. monocytogenes* の検査に当って欠かせない。本論文では型別用因子血清の作成法および、それを使用して同時に多数の菌株を簡易迅速に型別できるマイクロプレート凝集試験法の考案と、その手技について示した。今後、この手技を *L. monocytogenes* の疫学的特性を知るための手段として用いることは食品媒介リステリア症発生防止の上で有益である。

文 献

- 1) McLauchlin, J. : *Env. pol. prac.*, **3**, 201-214, 1993.
- 2) Seeliger, H. P. R. and Höhne, K. : *Methods in Microbiology*, Bergan, T. and Norris, J., R. **13**, 30-49, 1979, Academic Press, London.
- 3) McLauchlin, J. : *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 210-213, 1990.
- 4) Slade, P. J. : *Food Res. Int.* **25**, 215-225, 1992.
- 5) Garcia, J. A., Dominguez, L. and Briones, V., et al. : *FEMS Microbiol. Letters* **67**, 113-120, 1990.

報 文 Ⅱ

医薬品等に関する調査研究

REPORTS Ⅱ

PAPERS 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9編の報告が掲載されている。このうち生薬及び医薬品等に関するものが3編、医薬部外品及び化粧品に関するものが2編、医療用具に関するものが1編、家庭用品に関するものが3編である。

現在、抗エイズ薬としてアジドチミジンやジデオキシイノシンが使われているが、より優れた薬剤の登場が切望されている。抗エイズ薬開発の基礎的研究として今回、作用が緩和な生薬10種類について抗エイズウイルス(HIV)作用物質の検索を行った。その結果、サイカチ果実から得られたサポニン gleditsia saponin C に抗HIV作用があることが判明した。これはトリテルペン、エステル、糖の3つの部分より構成されており、作用発現部位はエステルと糖の部分にあると推定された。今後、その周辺物質の探査により構造活性相関の解明など医薬品開発への進展が期待される。

医薬品の有効性・安全性確保の一環として薬事法に基づく品質評価が重要な位置をしめている。そのため行政試験においては、多種多様の医薬品製剤に対応した試験法が求められる。アスパラギン酸、タウリン、トラネキサム酸などのアミン類のプレカラム誘導体化-HPLC 定量法を検討し、従来より応用範囲の広い改良法が開発された。また、医薬品の純度試験として用いられるヒ素の定量法についても検討が加えられた。本法はヒ素錯体の吸光度を測定する簡便な方法である。このように医薬品に対して的確かつ効率的な試験法の開発が要請される。

医薬部外品は緩和な作用を付与された薬剤であるが、化粧品は長期間使用するためにより安全性が重視される皮膚外用剤である。しかし、最近ではいわゆる有効成分を配合した、医薬部外品に限りなく近い化粧品もある。アラントインは抗炎症成分であり、多くの化粧品に配合されるが、pHがアルカリ性領域では経時的に分解する。今回、アラントインの簡易迅速分析法が開発されると共に、中性領域の化粧品でも漸減的に分解が進むことが確認された。また市販品の調査結果でも分解によるアラントインの含量低下が認められた。

にきびやふけ・かゆみ防止を目的とした医薬部外品や化粧品はイオウを配合する製品が多い。それらはクリーム、リンス、シャンプーなど乳化剤が共存しイオウの定量が難しい。また定量にはイオウを酸化するなど煩雑な前処理を必要とする。そこで、今回は試料にバインダーを添加して固形試料に変え、直接蛍光X線分析装置で測定する簡易定量法が開発された。本法は日常検査に有用な方法である。

義歯安定剤は口中で使用され、医療用具として扱われているものであるが、その材質等における金属元素の調査はなされていない。今回カドミウム、鉛、ヒ素などの有害金属を含めて18元素について、プラズマ発光分析装置による多元素同時分析及び人工唾液からの溶出試験が行われた。その結果、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム、マンガン、ストロンチウム、鉄、亜鉛等が検出された。この分野の研究は未だ希少であり、今後も継続してゆく必要がある。

防しわ・防縮加工を施した「形状記憶シャツ」などの繊維製品は主としてホルムアルデヒド(HCHO)を用いて樹脂加工されたものが多く、製品への遊離HCHOの残留が懸念されている。そこでワイシャツ、パジャマなど防しわ・防縮表示の繊維製品についてHCHO残留量の実態調査が実施された。その結果、特に不良品は見られなかったが、下着類の基準75ppmを越えるものが全体の30%認められた。近年、HCHOは生活環境からその排除の機運が高まっているが、アレルギー性接触皮膚炎の原因物質の一つでもあり、より一層の排除が望まれる。

防菌・防かび剤であるトリブチルスズ及びトリフェニルスズ化合物は、繊維製品、接着剤、塗料、くつクリームなどの家庭用品に対して使用が禁止されている。それらの公定試験法は無機スズに分解後、定量分析を行っているが、確認のために再度有機スズの定性分析を行う必要がある。そこで試料から有機スズを抽出精製後、直接ECDーガスクロマトグラフィーで分析する方法が開発された。本法は行政試験に対応したスクリーニング法として有用である。

リン酸トリス（2-クロロエチル）は繊維製品の防炎加工剤として使用されているが、家庭用品規制法では規制対象外の化学物質であり、その使用実態も明らかではない。そこで、ガスクロマトグラフィーによる簡易迅速定量法が開発され、本法により壁紙、カーテン、寝衣などの防炎加工製品中のリン酸トリス（2-クロロエチル）の調査が行われた。その結果、現在では壁紙などへの使用は少ないことが明らかになった。家庭用品に使用される化学物質の実態は不明な点が多いので、今後もこの分野における調査研究が重要である。

生薬に含まれる抗 HIV 作用物質の検索 (第 1 報) 抗 HIV 作用を示すサイカチ果実中のサポニン

安田 一郎*, 浜野 朋子*, 塩田 寛子*, 高野 伊知郎*
瀬戸 隆子*, 西島 基弘*, 秋山 和幸*, 門間 公夫**,
田部井 由紀子**, 関根 大正**, 木島 孝夫***
コーセンチーノマーク****, リークオシオン*****

Isolation of Anti-HIV Principle in Crude Drugs (I) Saponin as an Anti-HIV Principle from Fruits of *Gleditsia japonica*

ICHIRO YASUDA*, TOMOKO HAMANO*, HIROKO SHIODA*, ICHIRO TAKANO*,
TAKAKO SETO*, MOTOHIRO NISHIJIMA*, KAZUYUKI AKIYAMA*, KIMIO MONMA**,
YUKIKO Tabei**, HIROMASA SEKINE**, TAKAO KONOSHIMA***,
MARK COSENTINO**** and KUO-HSIUNG LEE*****

Examination was made of the anti-HIV effects of 10 crude drugs used in Japan *in vitro*. The MeOH extract of fruits of *Gleditsia Japonica* MIQUEL (*Leguminosae*) was found to express anti-HIV activity. Initial bioactivity-guided solvent fractionation of this extract with *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH and H₂O yielded an anti-HIV active *n*-BuOH fraction. By repeated bioassay-directed chromatography of the fractions on Sephadex LH-20 and C₁₈ Silica gel, saponin 1 was isolated.

The structure of 1 was assigned as gleditsia saponin C based on a comparison of physical and spectral data with those of an authentic sample and degradation product. Compound 1 inhibited HIV replication in acutely infected H9 cells with EC₅₀ of 1.1 μM and inhibited uninfected H9 cell growth IC₅₀ of 9.8 μM. The therapeutic index (T.I.) was found to be 9.

Keywords : 抗 HIV anti-HIV, 生薬 crude drugs, 作用物質 principle, 単離 isolation, サイカチ *Gleditsia japonica*, サポニン saponin, グレデテシアサポニン C gleditsia saponin C, エキノシスチン酸 echinocystic acid

緒 言

後天性免疫不全症候群 (Acquired Immunodeficiency Syndrome : AIDS) は, ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus : HIV) の感染によって免疫系が破壊され, 日和見感染症, カポジ肉腫, 痴呆などを起こす致死率の高い疾患である¹⁾. AIDS の治療薬及び感染者の AIDS 発症予防を目的として, アジドチミジン

(AZT), ジデオキシノイシン (DDI), ジデオキシシチジン (DDC) などをはじめ多くの薬剤の開発が図られている²⁾. しかし, これらは *in vitro* で優れた抗 HIV 作用を持ち, AIDS 患者に対し延命効果があると認められているものの, 造血機能の抑制や肺炎を起こすなどの副作用もあり, また, 耐性株 HIV の出現などの問題も生じている³⁾. そこで著者らは作用の緩和な生薬を対象として,

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

** 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科

*** 京都薬科大学

**** バイオテックリサーチ研究所

***** ノースカロライナ大学チャペルヒル校

より低毒性でかつ有効性のある薬剤を開発することを目的に、抗 HIV 作用物質の検索に着手した。

山崎ら⁴⁻⁶⁾により既に約200種の生薬の水抽出物及び熱水抽出物についてのスクリーニングが実施されており、抗 HIV 作用の強いシコンに含まれる作用物質は主に分子量約1,300の物質からなる分画に存在することが報告されている。また、マクリ水抽出物中の抗 HIV 作用物質は、分子量50,000以上の多糖質と推定される分画にあることが中村ら⁷⁾により明らかにされている。しかしこれらの作用物質の精製単離はいずれも報告がなく、詳細は不明のままである。著者らは広範囲な極性分布を示し、かつ精製単離操作が比較的容易なメタノール抽出物に着目し、生薬中の作用物質の単離を行うことにした。

作用が比較的緩和で、滋養強壮薬などの原料として用いられ、また、栽培地並びに基原植物を正確に把握することのできる生薬10種について、メタノール抽出物の抗 HIV 作用を調べた。その結果、ソウキョウ(皂莢)に強い抗 HIV 作用を認めた。ソウキョウはマメ科 *Leguminosae* の木本植物であるサイカチ *Gleditsia japonica* MIQUEL, トウサイカチ *G. sinensis* LAMARCK などの果実を乾燥したもので、去痰薬、利尿薬などのほかサポニンを多く含むことから石鹸の代用にされる生薬である⁸⁾。今回実験材料に用いたソウキョウは、サポニン含量の高い岩手県産のサイカチの果実である。

サイカチ果実のメタノール抽出エキスを極性の異なる4種の溶媒で分画したところ、サポニンを多く含むブタノール分画に抗 HIV 作用が集中した。そして本分画について種々のクロマト操作により精製を行い、作用物質として結晶水5分子を持つ分子量1,964のサポニン *gle-*

ditsia saponin C (1, Fig.1)^{9,10)}を単離した。これらの詳細について報告する。

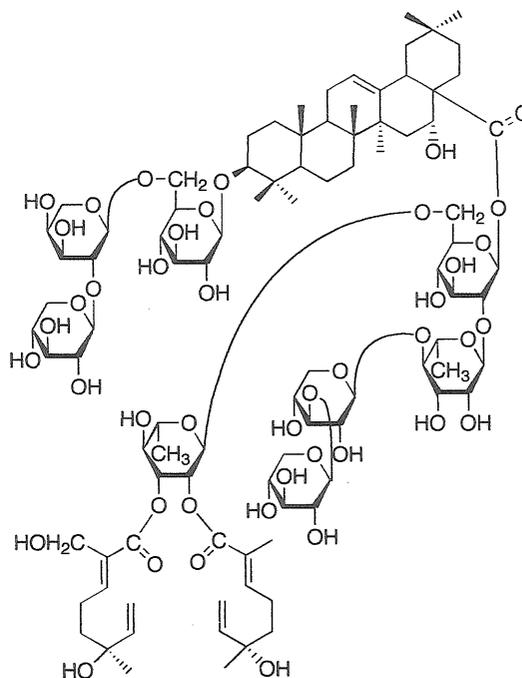


Fig. 1. Chemical Structure of Gleditsia Saponin C (1)

実験の部

1. 実験材料

実験材料とした生薬の基原植物、使用部位及び産地を Table 1 に示した。これらは根部 5、根茎部 3、樹皮 1 及び果実 1 の計 10 生薬であり、いずれも良品と鑑別されたものである。生薬約 50 g を切断した後粉末とし、これ

Table 1. Crude Drugs Assayed

No	Crude drugs (Japanese name)	Plant name	Part	Produced place
1	GINSENG RADIX (人參)	<i>Panax ginseng</i>	Root	Nagano/Japan
2	ASTRAGALI RADIX (黃耆)	<i>Astragalus membranaceus</i>	Root	Hebei/China
3	GLYCYRRHIZAE RADIX (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Root	Lin/China
4	ANGELICAE RADIX (當歸)	<i>Angelica acutiloba</i>	Root	Gunma/Japan
5	REHMANNIAE RADIX (地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i> var. <i>hueichingensis</i>	Root	Guang Dong/China
6	CNIDII RHIZOMA (川芎)	<i>Cnidium officinale</i>	Rhizome	Iwate/Japan
7	ATRACTYLODIS RHIZOMA (和白朮)	<i>Atractylodes japonica</i>	Rhizome	Ibaragi/Japan
8	ATRACTYLODIS RHIZOMA (唐白朮)	<i>Atractylodes ovata</i> ^a	Rhizome	Tokyo/Japan
9	CINNAMONMI CORTEX (桂皮)	<i>Cinnamomum cassia</i>	Bark	Guang Xi/China
10	GLEDTISIAE FRUCTUS (皂莢)	<i>Gleditsia japonica</i>	Fruits	Iwate/Japan

a: *A. macrocephala*

に10倍量のメタノールを加え室温で一昼夜抽出した。抽出液はろ過後溶媒を減圧留去し、メタノール抽出エキスとした。

成分検索に用いたソウキョウは岩手県北上川流域で採集したサイカチの乾燥果実であり、粉末225 gを1 lのメタノールで3回抽出を繰り返し、同様に処理して抽出エキスとした。

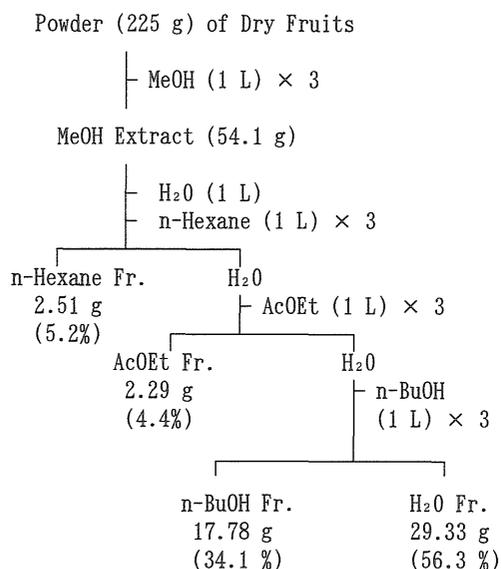


Fig. 2. Flow Diagram of Extraction and Fractionation of Fruits of *Gleditsia japonica*

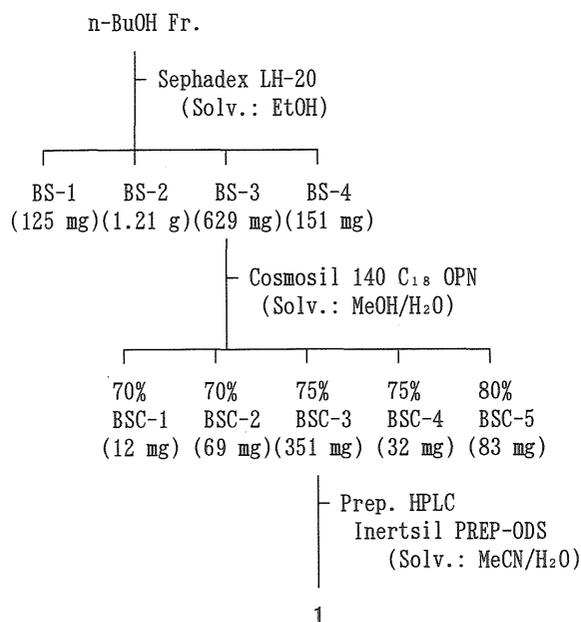


Fig. 3. Flow Diagram of Isolation of 1 from n-BuOH Fraction

2. サイカチ果実のメタノール抽出エキスからサポニン 1の単離

サイカチ果実のメタノール抽出エキスのブタノール分画は、Fig.2に示すように調製した。すなわち、メタノール抽出エキス 54.1 gに1 lの水を加え懸濁した後、ヘキサン 1 lで3回抽出し、さらに水層は酢酸エチル 1 lで3回抽出した。続いて水層を水飽和ブタノール 1 lで3回抽出し、溶媒を減圧留去してブタノール分画とした。処理後の水層はそのまま減圧濃縮し、水分画とした。

ブタノール分画からの1の精製はFig.3に従って実施した。すなわち、ブタノール分画 17.78 gをエタノールに溶かし、その可溶部をエタノールを溶離液としてセファデックスカラムにかけBS-1~BS-4の4分画とした。それらのうち作用の現れたBS-3画分を逆相系オープンカラム (Cosmosil 140 C₁₈ OPN)にかけ、メタノール 70~80%で溶出させ、BSC-1~BSC-5の5分画とした。さらに、作用画分BSC-3について分取HPLC(カラム: Inertsil PREP-ODS, 3.0 i.d.×30 cm, 移動相: アセトニトリル・水混液 (13:87))を行い、吸湿性の高いgleditsia saponin C(1) 240 mgを単離した。

1: $[\alpha]_D^{20} -24.0^\circ (c=1.05, \text{MeOH})$, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3400~3600 (OH), 1725 (COOR), Anal. Calcd for C₉₄H₁₄₈O₄₃·5H₂O: C, 54.42; H, 7.71. Found: C, 54.21; H, 8.00.

3. サポニン 1の加水分解

1 180 mgをエタノール 10 mlに溶解し、2 N硫酸 10 mlを加えて3時間還流した。反応液は減圧濃縮し、約半量とした後、エーテルで抽出した。エーテル層は水洗し硫酸マグネシウムで乾燥後、エーテルを留去し、油状物質 50 mgを得た。これをシリカゲルカラム(メルク社製 Silica gel 60, particle size 0.040-0.063 mm, 4.5 i.d.×20 cm)に付し、クロロホルム-メタノール混液 (9:1)で流出した油状物質についてメタノールで再結晶を繰り返し、無色針状結晶のアグリコン echinocystic acid (2)を得た。

2: mp. 307~309°C, $[\alpha]_D^{20} +31.6^\circ (c=0.50, \text{EtOH})$, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3450 (OH), 1685 (COOH), PMR (C₅D₅N) δ : 0.95, 1.02, 1.06, 1.19, 1.22, 1.82 (totally 21H, 7×CH₃), 5.23 (1H, broad s), 5.65 (1H, broad s), 8.69 (1H, s, COOH). MS (m/z): 472 (M⁺), 264 (C₁₆H₂₄O₃), 246 (C₁₆H₂₂O₂), 201 (C₁₅H₂₁), Anal. Calcd for C₃₀H₄₈O₄·1/2H₂O: C, 75.11; H, 10.29. Found: C, 75.26; H, 10.31.

本物質の同定は直接、標品⁹⁾との比較により行った。

4. 抗HIV作用測定

エキス及び分画試料は100, 20, 4.0, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、精製試料は適宜希釈した濃度で抗HIV作用を測定した。

37°C, 5%CO₂存在下で1時間 HIV-1を0.001~0.01 TCID₅₀/cellの割合で感染させたH9細胞と非感染のH9細胞をいずれも3回培養液で洗浄した後、段階希釈した試料を含むRPMI-1640培養液の入った24穴プレートで4日間培養した。陰性のコントロールとしては試料無添加のものを、陽性のコントロールとしてはAZT, DDIあるいはDDCを用いた。定量値はELISA法¹¹⁾によりp24抗原量に依存する吸光度を測定し、検量線から算出した¹²⁾。

結果及び考察

1. 生薬抽出エキスの抗HIV作用

ニンジン, オウギ, カンゾウなど10種類の生薬のメタノール抽出エキスについて、100, 20, 4.0, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ の各濃度で抗HIV作用を調べた。Table 2に示すようにオウギ, カンゾウ, トウキ, センキュウに抗HIV作用は現れたが、濃度依存的な傾向は認められず、作用の有無を判定することは困難であった。メタノール抽出エキスは少量のDMSOに溶解し、培地を加え段階的に希釈するが、培地を加えた時、抽出物の一部は不溶物となり析出した。作用物質がこのような不溶物である場合には濃度依存的な傾向を得ることができず、今回の作用測定法での検索は難しいと思われた。

サイカチ果実(ソウキョウ)のメタノール抽出エキスは20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でも4日間培養すると細胞自体が70%以上死滅した。しかし、4.0 $\mu\text{g/ml}$ では抗HIV作用は認められるものの細胞毒性は現れなかった(Table 2)。

2. サポニンの構造と作用

細胞毒性は高いが抗HIV作用の認められたサイカチ果実のメタノール抽出エキスについて成分検索を行った。ヘキサン, 酢酸エチル, ブタノール及び水分画に分け、作用を測定したところ、ブタノール分画に毒性はあるものの作用が集中した。本分画に水を加え発泡試験を行うと、持続性のある泡が残存することから、サポニンを多く含むことが予想された。種々の分離操作を行いこの分画から作用物質として、gleditsia saponin C(1)を単離した。1は8個の単糖, 2個のイソプレノイドを持つ極めて分子量の大きいサポニンである。本物質は既に共同研究者の木島らにより構造解析されている¹⁰⁾が、吸湿性が高く、白色粉末で結晶化しないため正確な融点を得られなかった。また、分子量が大きいことから、スペクトルデータの比較だけでは正確な同定ができないと思われた。そこで1の加水分解を行い、得られたアグリコンを直接標品の物理定数及びスペクトルデータと比較し、echinocystic acid(2)であることを証明した。その結果に基づき1の構造が正しいことを確認した。

1は、H9細胞に誘導されたHIVに対する作用値 EC₅₀が1.1 μM , H9細胞の増殖に対する毒性値 IC₅₀が9.8

Table 2. Anti-HIV Activities and Cytotoxicities of MeOH Extracts of 10 Crude Drugs and *n*-BuOH Fraction of MeOH Extract of GLEDITSIAE FRUCTUS

No	Crude drugs	Yield of extract (%)	Dose ($\mu\text{g/ml}$)		
			20	4.0	0.8
1	GINSENG RADIX (人參)	37.6	106 ^a (1.28) ^b	102(1.18)	85(1.18)
2	ASTRAGALI RADIX (黄耆)	22.1	54(1.14)	49(1.10)	63(1.07)
3	GLYCYRRHIZAE RADIX (甘草)	29.1	62(0.98)	39(0.90)	39(0.92)
4	ANGELICAE RADIX (当帰)	44.8	47(1.00)	27(0.90)	52(0.94)
5	REHMANNIAE RADIX (地黄)	65.3	102(1.09)	85(0.96)	80(0.97)
6	CNIDII RHIZOMA (川芎)	35.2	41(1.03)	30(1.02)	-14(0.97)
7	ATRACTYLODIS RHIZOMA (和白朮)	23.5	143(1.04)	125(1.04)	107(1.04)
8	ATRACTYLODIS RHIZOMA (唐白朮)	12.4	76(0.76)	134(0.98)	90(1.02)
9	CINNAMONMI CORTEX (桂皮)	13.7	88(1.47)	91(1.12)	80(0.92)
10	GLEDITSIAE FRUCTUS (皂莢)	24.0	T ^c	82(1.12)	141(1.04)
<i>n</i> -BuOH Fraction of GLEDITSIAE FRUCTUS			T	13(0.87)	140(0.90)

a : % control p24

b : cell survival

c : above 70% toxicity to the cells

Table 3. HIV Inhibitory Effects (μM) for Gleditsia Saponin C (1), Echinocystic Acid (2) and AZT

Compounds	EC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	T. I. ^c
1	1.1	9.8	8.9
2	42	74	1.8
AZT	0.15	1,875	12,500

a : concentration which inhibits virus replication by 50%

b : concentration which inhibits lymphocyte cell growth by 50%

c : therapeutic index

μM , 計算上の治療指数値 (therapeutic index : IC₅₀/EC₅₀) が9を示した (Table 3). EC₅₀値はAZTに比べると1/7程度の作用値であり, IC₅₀値もはるかに大きい, 抗HIV薬の開発を進める上で, Key Compoundとして期待できる物質である. 一方, 2のEC₅₀値は42 μM , IC₅₀値は74 μM で, 1の作用に比較して弱い. このことは, 作用発現にはアグリコンのトリテルペン部分の構造ではなく, 糖部分及びエステル部分の構造が強く関与していることを示唆している. 今後, サイカチ果実に含まれる他のサポニンも含め, 作用の比較を行い, より強い作用を示す化学構造を明らかにしたいと考えている.

まとめ

In vitro で10種類の生薬メタノール抽出エキスの抗HIV作用を調べたところ, サイカチ果実に抗HIV作用が認められた. 液々分配により分画したところ, サポニンを多く含むブタノール分画に抗HIV作用が集中した. そこで本分画について作用測定を行いながら, セファデックス, 逆相系シリカゲル, 分取HPLCを繰り返し行い, 作用物質であるサポニン1を単離した.

1の構造は, アグリコンが echinocystic acid であり, また, 旋光度及びIRスペクトルを直接標品と比較し一致したことにより gleditsia saponin C と決定した. 1はH9細胞に誘導されたHIVに対し, EC₅₀が1.1 μM の作用値を, H9細胞の増殖にはIC₅₀が9.8 μM の毒性値を, 計算上の治療指数値が9を示した. 1の作用発現部位は, echinocystic acidの抗HIV作用が低いことから, 糖部分及びエステル部分と推察された.

文 献

- 1) 関根大正 : 公衆衛生, **56**, 560-564, 1992.
- 2) 三木隆, 大貫奈穂美, 新開敬行, 他 : 衛生試験所報告, **108**, 128-131, 1990.
- 3) 馬場昌範 : ファルマシア, **30**, 253-258, 1994.
- 4) 山崎勝弘, 大竹徹, 森治代, 他 : 薬誌, **113**, 818-824, 1993.
- 5) 山崎勝弘, 大竹徹, 森治代, 他 : 大阪府立公衛研究報 薬事指導編, **28**, 33-44, 1994.
- 6) 山崎勝弘, 大竹徹, 森治代, 他 : 大阪府立公衛研究報 薬事指導編, **28**, 45-53, 1994.
- 7) 中村弘, 大貫奈穂美, 貞升健志, 他 : *Natural Medicines*, **48**, 173-179, 1994.
- 8) 難波恒雄 : 原色和漢薬図鑑 (上), 252-253, 1980, 保育社, 大阪.
- 9) Konoshima, T., Fukushima, H., Inui, H., *et al.* : *Phytochemistry*, **20**, 139-142, 1981.
- 10) Konoshima, T., Inui, H., Sato, K., *et al.* : *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3473-3478, 1981.
- 11) 石川榮治 : 超高感度酵素免疫測定法, 181-212, 1993, 学会出版センター, 東京.
- 12) Hu, C., Chen, K., Lee, K. H., *et al.* : *J. Nat. Prod.*, **57**, 42-51, 1994.

プレカラム誘導化試薬ピクリルスルホン酸ナトリウムを用いた アスパラギン酸, タウリン, トラネキサム酸の HPLC 定量法

野尻宗子*, 上原真一**, 萩原輝彦***,
西島基弘*

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Aspartic Acid, Taurine and Tranexamic Acid by Precolumn Derivatization using Sodium Picrylsulfonate

SHUKO NOJIRI*, SHIN-ICHI UEHARA**,
TERUHIKO HAGIWARA*** and MOTOHIRO NISHIJIMA*

A simple method for the determination of aspartic acid (Asp), taurine (Tau) and tranexamic acid (TA) in pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography was developed.

Reactions of Asp, Tau and TA with sodium picrylsulfonate (PS) proceeded at room temperature in borate buffer (pH9.4) for 40min. PS derivatives were analyzed on a reversed-phase column (TSKGEL ODS-120T) with methanol-60mM ammonium acetate= 30 : 70 for Asp and Tau or 55 : 45 for TA at 335nm.

The present method was found adequate for the analysis of pharmaceuticals. Linearity in the range of 10-100ppm of Asp, Tau and TA was obtained. Average recovery (n=3) of amines from eye drops and tablets was 96-105%, and relative standard deviation was less than 1.7%.

Keywords : アスパラギン酸 aspartic acid, タウリン taurine, トラネキサム酸 tranexamic acid, ピクリルスルホン酸 sodium picrylsulfonate, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

医薬品には、アミノ酸を始めとしてアミノ基を有する化合物が数多く利用されている。これらの分析は、主に高速液体クロマトグラフ法が使われているが、紫外部吸収の小さいものも多く、検出にはプレあるいはポストカラムラベル化法が繁用されている。これまでラベル化には、ニンヒドリン¹⁾、オルトフタルアルデヒド²⁾、Dancylchloride³⁾、Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol⁴⁾などの種々の誘導体化試薬を用いた方法も実用化されているが、アミノ酸など水溶性化合物の多いアミン類医薬品の誘導体化試薬は、水溶液中で使用できることが望ましい。

著者らは既報^{5,6)}において、カリウム補給剤であるL-

アスパラギン酸 (Asp)、肝臓疾患用剤であるタウリン (Tau) 及び抗プラスミン剤であるトラネキサム酸 (TA) などのアミノ酸の分析法として、アミノ基の誘導体化試薬 Sodium 2,6-dinitro-4-trifluoromethylbenzenesulfonate (DNTS) を用いたプレラベル-HPLC 法を検討し、製剤分析に適用した。しかし、DNTS による誘導体化は加温を必要とするなどの難点が見られた。

そこで、今回は誘導体化試薬として DNTS より反応性に優れた Sodium picrylsulfonate を用いた Asp, Tau 及び TA のプレカラムラベル-HPLC 分析法を検討し (Chart 1, 2), さらに製剤分析に適用したところ良好な結果を得たので報告する。

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

*** 同理化学部微量分析研究科

同生活科学部食品添加物研究科

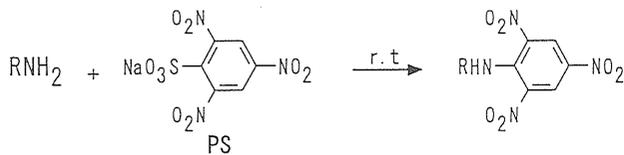


Chart 1. The reaction scheme

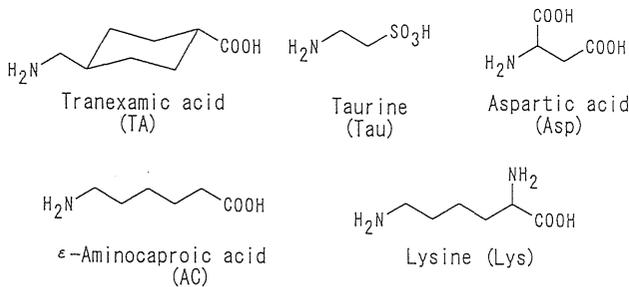


Chart 2. The structures of Asp, Tau, TA, AC and Lys

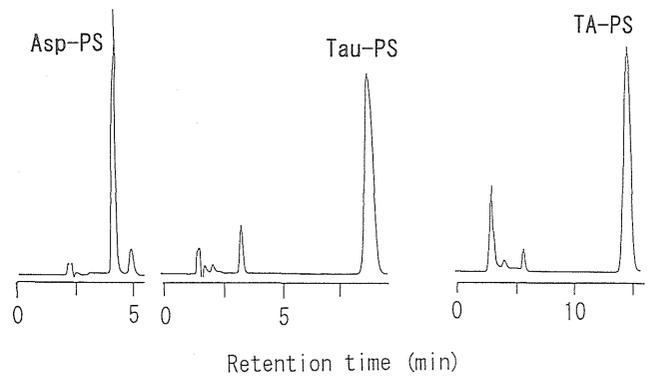


Fig. 1. Chromatograms of Asp, Tau and TA derivatized with PS. Each peak represents 50ppm. Conditions; Column: TSKGel ODS-120T, Mobile phase: 60mM sodium acetate buffer-methanol = 70 : 30 (Asp-PS, Tau-PS), 45 : 55 (TA-PS), Column temperature: 40°C, flow rate: 1ml/min, Detection: UV335nm.

実験方法

1. 試薬および標準品

1) アスパラギン酸 (Asp): 東京化成工業製, タウリン (Tau): 和光純薬工業製, トラネキサム酸 (TA): 東京化成工業製, Sodium picrylsulfonate (PS): 東京化成工業製, 四ほう酸ナトリウム (ほう砂): ナカライテスク社製 (いずれも特級) を使用した。

2) PS試液: PS50mgを水25mlに溶解し調製した (用時調製)。

3) 分析用製剤: Asp, Tau の処方された市販の点眼剤3種及びTAの処方された錠剤2種を購入し分析用製剤とした。

4) 標準原液の調製: Asp, Tau 及びTAに水を加えて溶かし5000 µg/ml溶液とした。

5) 標準溶液の調製: Asp, Tau 及びTA標準原液に水を加えて希釈し, 15, 25, 50, 75, 100 µg/ml溶液とした。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) ポンプ: 880-PU型, 検出器: 875-UV型, カラム恒温槽: 860-CO型 (以上日本分光製), データ処理装置: クロマトパックCR6A型 (島津製作所製)。

大気圧化学イオン化-質量分析計 (APCI-MS): M-1200型 (日立製作所製), 検出モード: 負イオン測定, 霧化部温度: 200°C, 脱溶媒室温度: 400°C, 第一細孔部温度: 120°C, ドリフト電圧: 30V, ニードル電圧: 2700V, マルチプライヤー電圧: 1800V。

3. HPLC測定条件

カラム: TSK-GEL ODS-120T 東ソー (株) 製 (4.6mm i.d. × 50mm). 移動相: メタノール-60mM酢酸アンモニウム = 30 : 70 (Asp, Tau), 55 : 45 (TA), 検出: 335nm. 流速: 1 ml/min. カラム温度: 40°Cである。

4. 定量法

試料溶液の調製: 点眼剤はそれぞれ Asp, Tau 約50mg に対応する量の試料を秤取した. これに水を加えて全量を100mlとし, その10mlをさらに水で100mlとしたものを試料溶液とした. 錠剤は均一な粉末とし, 表示量に従って, TA50mg に対応する量の試料を秤取した. 水60mlを加え, 振とう抽出を行った後, 水で全量を100mlとした. この液を遠心分離し, 上澄液10mlを分取し水で100mlとしたものを試料溶液とした。

定量: 標準溶液, 試料溶液の各0.5mlにPS試液0.5ml, ほう砂飽和緩衝液1mlを混和し, 40分間室温に放置後, 希塩酸0.1mlを加え酸性とした. 次に, 50%メタノールで正確に10mlとし10 µlをHPLCに注入した (Fig. 1)。

結果および考察

1. 大気圧化学イオン化-質量分析計 (APCI-MS) によるPS誘導体の確認

Asp, Tau 及びTAをそれぞれPS誘導体とし, APCI-MSにより構造の確認を行った。

一般に, APCIの負イオン測定では, 擬分子イオン $[M-H]^-$ が検出されることが知られている. そこで, それぞれのHPLCピークのMSスペクトルを測定したところ, Fig. 2に示した通り Aspは m/z 343, Tauは m/z 335, TAは m/z 367に観察された. これらの擬分子イオン

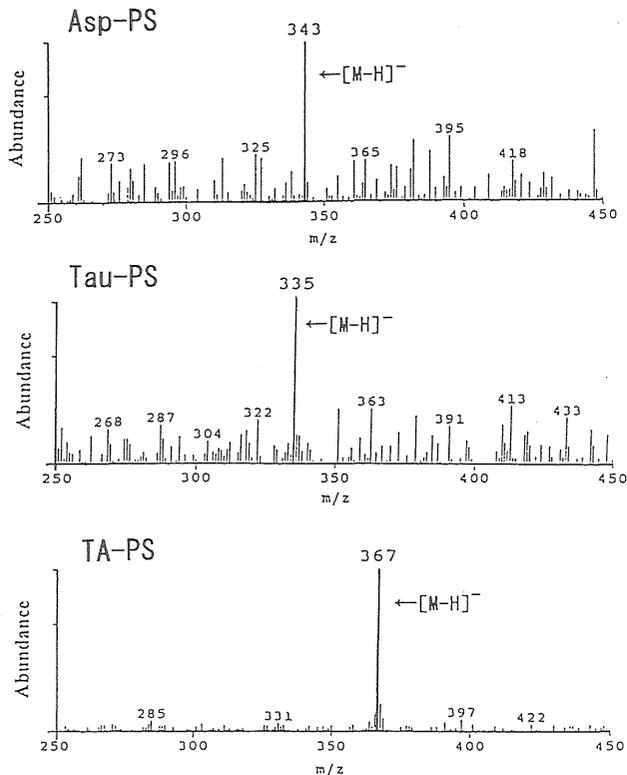


Fig. 2. LC-MS spectra obtained from Asp-PS, Tau-PS and TA-PS

[M-H]⁻から Asp, Tau および TA に対応する PS 誘導体が確認できた。

2. 誘導体化反応条件の検討

Asp, Tau 及び TA の各標準液 (50 µg/ml) について、本法に従い反応時間 (10~60分) を変化させ PS 誘導体の生成率を検討した (Fig.3). その結果 Fig. 3に示した通り、いずれの場合も生成率は経時的に増加し、ほぼ30~40分間で最大値に達し、60分までは安定であった。また、生成した誘導体は、酸性条件下では24時間経過してもピーク面積に変化はみられなかった。これらのことから、反応時間は40分間とし、反応終了後は生成する誘導体の

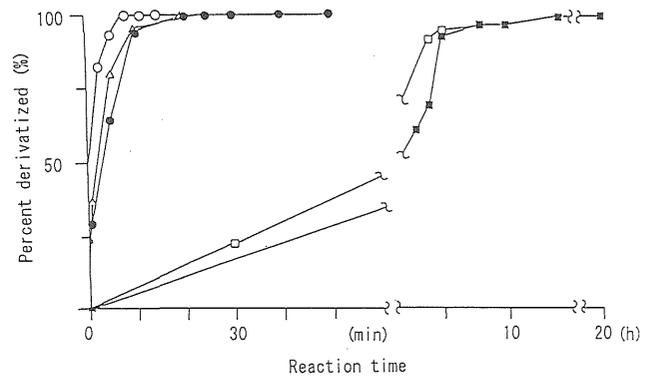


Fig. 3. Kinetic of derivatization with PS

The extent of derivatization of representative amines is indicated by the following symbols : Asp (○), Tau (△), TA (●), AC (□) and Lys (■).

安定化のため、希塩酸で酸性とすることとした。また、PS はアミノ酸発色試薬である Sanger 試薬の誘導体として紹介されたものであり、Chart1に示す通り、DNFS と同様の反応機構である求核置換 (S_N2) 反応で進行すると考えられるため、誘導体化反応における緩衝液の種類、濃度などは前報⁶⁾の DNFS に従いほう砂飽和溶液を用いることとした。

また、他のアミン類医薬品として止血剤である ε-アミノカプロン酸 (AC)、必須アミノ酸製剤として知られる L-リジン (Lys) についても検討したが、Fig.3に示す通り、両者とも反応性が悪く反応終了にはほぼ24時間を要することがわかった。

3. 検量線

標準溶液について、PS 誘導体を調製して HPLC に注入し、ピーク面積よりそれぞれの検量線を作成したところ 10~100 µg/ml の間で、良好な直線性 (r>0.999) が得られた。

Table 1. Assay results for the HPLC determination of Asp, Tau and TA in commercial formations

Sample ¹⁾	Labeled Amount	Results (%)	Recoveries (C.V) (%) ²⁾
A (E.D)	425mg/100ml	100.5	99.0 (1.3)
B (E.D)	1,700mg/100ml	99.0	96.2 (0.9)
C (E.D)	1,000mg/100ml	105.7	99.2 (0.3)
D (Tab)	47mg/Tab	97.2	104.9 (1.7)
E (Tab)	29mg/Tab	97.3	—

1) A,B; Asp, C; Tau, D,E; TA, ED; Eye Drop, Tab; Tablet

2) The results are average of three determinations and are expressed as a percentage of the claimed content or added amount (recovery).

4. 製剤への適用

本法を用いて, Asp を含む点眼剤2種(A, B), Tau を含む点眼剤1種(C), TA を含む錠剤2種(C, D)の計5種の市販製剤について分析を行った.

また同時に, 各製剤の Asp, Tau または TA の約25mg 対応量に各標準原液 5 mlを加えたものについて, 定量法に準じて操作し, 添加回収率を求めた. その結果, 定量値は各製剤の表示量と良く一致し, 添加回収率も96~105%の範囲であり, CV 値1.7%以下と良好であった (Table 1).

ま と め

アミノ基を有する医薬品のうち, 紫外吸収が小さく HPLC 分析が困難なアスパラギン酸, タウリン, トラネキサム酸を分析対象とし, 第一アミンの誘導体化試薬としてPSを用いてプレカラムラベル化-HPLC の定量法を作成した. 誘導化は室温において定量的進行し, 副反応も観察されず, 簡便で精度の良い方法である. また, 本

法を Asp, Tau 及び TA 含有製剤について適用したところ, 特に妨害物質も見られず実用分析として適用可能であることがわかった.

文 献

- 1) J. A. Grunau, J. M. Swiader, *J. Chromatogr.*, **594**, 165 (1992).
- 2) G. Wu, *J. Chromatogr.*, **641**, 168 (1993).
- 3) Y. Tapuhi, D. E. Shumit, W. Lindner and B. L. Karger. *Anal. Biochem.*, **15**, 123 (1981).
- 4) Y. Watanabe and K. Itami, *J. Chromatogr.*, **309**, 279 (1984).
- 5) 上原真一, 萩原輝彦, 高橋美佐子, 鎌田国広, 中山京子, 秋山和幸, 西垣 進: 医薬品研究, **19**, 98 (1998).
- 6) 上原真一, 野尻宗子, 高橋美佐子, 渡辺四男也: 薬学雑誌, **114(9)**, 697 (1994).

キレート試薬ビスムチオールⅡを用いた ヒ素の吸光度定量

野尻宗子*, 上原真一**, 西島基弘*

Spectrophotometric Determination of Arsenic with Bismuthiol II as the Chelating Agent

SHUKO NOJIRI*, SHIN-ICHI UEHARA**

and MOTOHIRO NISHIJIMA*

A spectrophotometric method was investigated for the determination of arsenic (As) based on precipitation reaction with bismuthiol II (Bis) as the chelating agent in hydrochloric acid. 1ml of 0.1% Bis solution, 1ml of 3N hydrochloric acid and 1ml of 0.1M EDTA were added to 1ml of As solution (1-10 μg). After shaking the mixture, it was allowed to stand for 10min. All precipitates were collected with a membrane filter and dissolved in 10ml of methanol. The Bis-As complex in methanol showed maximum absorption at 343nm and molar absorptivity of the complex was $2.8 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The composition of the complex was determined as As (Bis)₃ by the mole-ratio method. The calibration graph was linear from 1 to 10 μg of As. Relative standard deviation (R.S.D) was 2.6% for 10 μg of As. A study using various ions indicated interference due to Fe, Zn, Cu and Pb to be the most serious; that from Fe and Zn could be eliminated by EDTA.

Keywords : ヒ素 arsenic, ビスマチオールⅡ bismuthiol II, 吸光度定量 spectrophotometric determination

はじめに

ヒ素の分析方法としては、臭化第二水銀紙法、モリブデンブルー法、ジエチルカルバミン酸銀法などの比色法¹⁾、また、機器による直接法として、水素化原子吸光分析法(AAS)²⁾、誘導結合プラズマ発光分析法(ICP)が知られている。しかし、前者は、有害試薬を利用したりあるいは操作が煩雑であるなどの難点があり、後者は、高感度で優れた方法であるが高価な機器を要し、化学的な前処理を必要とする場合が多く必ずしも簡便とはいえない。

一方、キレート試薬は多種の金属の分析試薬として多用されており特異的、選択的で高感度分析への応用が検討されてきている³⁾。ヒ素分析においても、松原らはヘテロポリ酸-マラカイトグリーン会合体の濃縮による吸光度法を用いた簡易迅速法を検討している⁴⁾。

キレート試薬のうち、ビスムチオールⅡ(3-フェニル

-5-メルカプト-1, 3, 4-チアジアゾール-2-チオン)(以下 Bis と略す)は、ビスマスの検出試薬として紹介され、特にセレン、テルルの特異試薬としてよく知られている⁵⁾。ヒ素ともキレートを生成することから、ヒ素分析への重量法による検討がなされているが⁶⁾、吸光度法による定量法の報告例は見られない。

そこで著者らは、Bisを用いたヒ素の吸光度定量法の確立を目的として、今回キレートの生成条件、妨害金属のマスキングなどの基礎的条件について検討したので、その結果を報告する。

実験の部

1. 装置

吸光度の測定は島津製作所製 UV2100PC/3100PC 型分光光度計を用いた。

2. 試薬

0.1%ビスムチオールⅡ溶液(Bis溶液)：同仁化研製

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

**同理化学部微量分析研究科

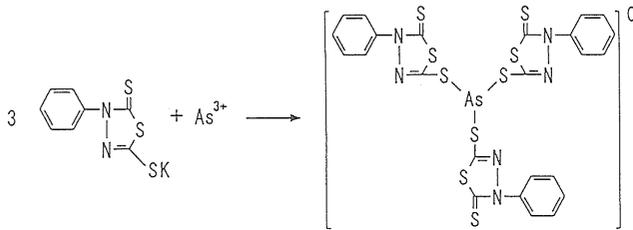


Chart 1 Formation of Bis-As complex

ビスムチオールⅡ(カリウム塩)0.1gを水で溶解し、100mlとした(用時調製)。

ヒ素(As), アルミニウム(Al), カリウム(K), マグネシウム(Mg), ナトリウム(Na):メルク製原子吸光分析用(1000ppm)標準液。

亜鉛(Zn), カルシウム(Ca), 銅(Cu), 鉄(Fe), 鉛(Pb), マンガン(Mn):和光純薬製原子吸光分析用(1000ppm)標準液。

塩酸は精密分析用試薬を用いた。

As標準液:Asの原子吸光分析用標準液を水で希釈し、1, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の溶液を調製してヒ素標準液とした。

0.1M-エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)溶液:同仁化研製特級EDTA $\cdot 2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を水に溶かし、0.1M溶液を調製した。

3. 器具

メンブランフィルター(MF):①HLC-DISKTM13(孔径0.45 μm , 直径13mm), ②HLC-DISKTM25(孔径0.45 μm , 直径25mm). ①, ②は, 水系/非水系, ポリフッ化ビニリデン製(関東化学製)。

③NYLON ACRODISC(孔径0.2 μm , 直径25mm), 水系/非水系ナイロン製(Gelman Sciences製)。

④マイクロシヨリディスクW-13-5(孔径0.45 μm , 直径13mm), ⑤マイクロシヨリディスクW-25-5(孔径0.45 μm , 直径25mm), ⑥マイクロシヨリディスクW-25-2(孔径0.2 μm , 直径25mm). ④, ⑤, ⑥は, 水系, セルロースアセテート製(東ソー製)。

なお, 検討の結果, 本法では①を用いることとした。

4. 定量操作

As標準液1mlにBis溶液1ml, 0.1M-EDTA溶液1ml, 3N塩酸1mlを順次加え混和する。室温で10分放置後, 沈澱物をMFで補集し, 水10mlで洗浄後, メタノール10mlで溶出し, メタノールを対照として波長343nmにおける吸光度を測定する。

結果及び考察

1. 錯体の吸収スペクトル

As10 μg について, 本法に従ってBis-Asキレート調製後, メタノールに溶解した錯体溶液, 並びに試薬ブランクの吸収スペクトルを測定した。その結果をFig. 1に示す。Bis-Asキレートは343nmに吸収極大を有し, 試薬ブランクは吸収を示さなかった。したがって, 以後定量値は343nmで測定することとした。なお, 343nmにおけるモル吸光係数は, $2.8 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ であった。

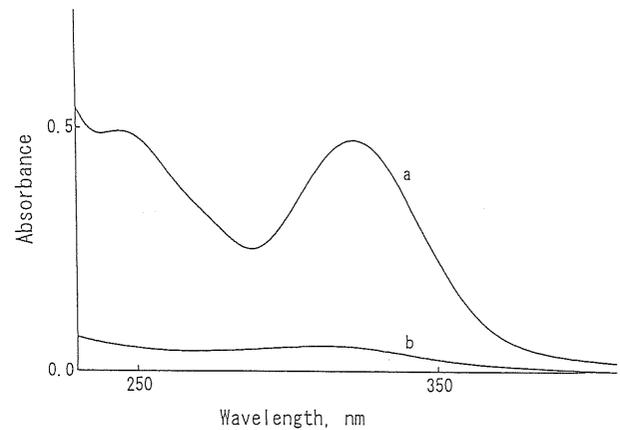


Fig. 1. Absorption Spectra of Bis-As complex and reagent blank

a : complex, b : reagent blank, ref : methanol
As taken : 10 μg

2. 吸光度に及ぼす塩酸濃度の影響

BisとAsのキレート生成反応において塩酸濃度の影響を調べるため, As10 μg に対して, 塩酸濃度を0.1~8Nと変化させ操作し, 吸光度を測定した。Fig. 2に示したとおり, 塩酸が0.5~1N範囲では, 濃度依存的に吸光度が増し, 1~4N塩酸ではほぼ一定の吸光度を示した。4N以上の高濃度の塩酸では, キレート沈澱以外の黄色沈澱が観察され, 吸光度も著しく増加することから, 試薬自体の分解反応が起こっていると推察される。そこで, 今回は3N塩酸を1ml添加することとした。

3. 反応時間

As10 μg について, 本法に従って経時的にBis-Asのキレート形成反応を調べた。その結果をFig. 3に示す。ほぼ7~8分で一定の吸光度を示し20分間まで安定であることがわかった。20分以降から吸光度の上昇がみられ, 試薬自体の酸化反応が進行するものと考えられることから, 反応終了後は速やかにキレート沈澱の補集操作をする必要がある。これらの結果から, 反応時間を10分間に設定して行うこととした。

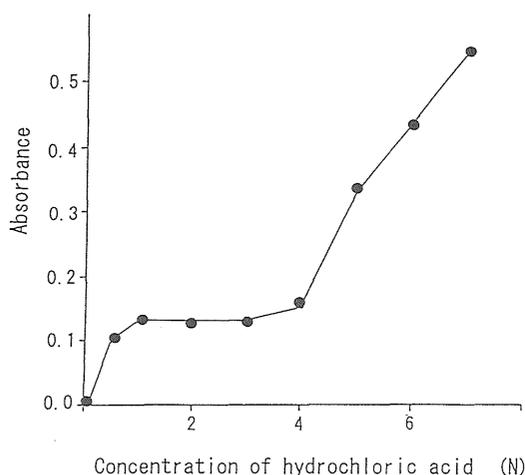


Fig. 2. Effect of concentration of hydrochloric acid on formation of Bis-As complex
As taken : $10 \mu\text{g}$

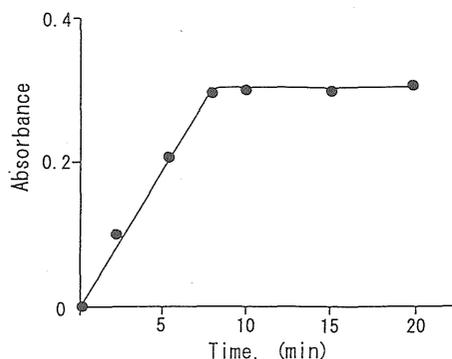


Fig. 3. Time dependence on absorption of Bis-As complex in methanol
As taken : $10 \mu\text{g}$

4. メンブランフィルターの種類及び溶出溶媒の検討

3. 器具の項に記載した各メーカーの材質、孔径、直径の異なる6種のMFについて、Bis-Asキレートの前集に及ぼす影響について調査した。キレート前集の際、MFの種類を変えて操作し吸光度測定した。吸光度は、孔径に無関係にはば一定の値を示し、材質の種類を変えても影響を与えなかった。しかし、MFの直径はキレート前集に大きく影響することが明らかとなった。今回、直径13mmと25mmの2種について検討を行ったが、25mmのMFは吸光度にばらつきがみられた。直径13mmにおいては、As $10 \mu\text{g}$ で変動係数3%以下と精度よく測定できた。

次にキレートを溶出する溶媒について検討した。クロロホルム、メタノールの2種がBis-Asキレートの溶解性及び溶出後の安定性に優れていた。そこで本法では、有害性等を考慮し溶出溶媒にメタノールを用いることとした。

本実験ではMFの選択にあたり、メタノールをキレー

ト溶出溶媒としたので、材質は水・非水系用であるポリフッ化ビニリデン製、直径13mm、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のMFを用いることとした。

5. 錯体の構造

Bis-Asキレートの組成についてはすでに3:1であることが報告されているが³⁾、著者らもこれを確認するため、モル比法⁷⁾により検討した。すなわち、As $10 \mu\text{g}$ に対して配位子Bisのモル濃度比を順次変化させ、以下本法に従い処理し吸光度をプロットした。Fig. 4に示すように、Bis:As=3:1以上の吸光度は一定の値を示した。以上の結果より、錯体組成は予想どおり3:1であることが確認できた。したがって、Bis-Asキレート生成反応はChart 1に示す通りである。

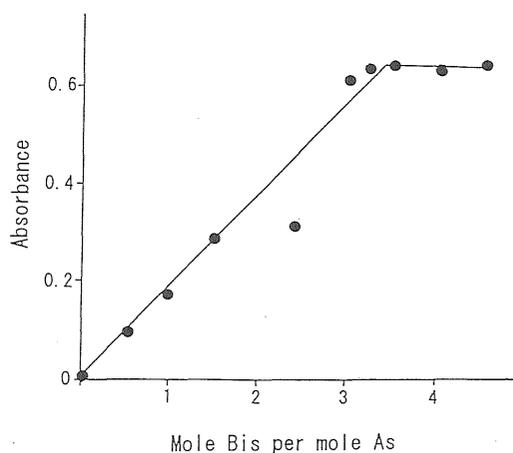


Fig. 4. Molar ratio method
As taken : $10 \mu\text{g}$

6. 共存イオンの影響

Asと共存するTable 1の元素の影響について調べた。As $10 \mu\text{g}$ に対して、他イオン各 $1000 \mu\text{g}$ を加え、以下本法に従って検討した。その結果をTable 1に示す。Pb, Cuについては負の誤差を与え、Fe, Znについては正の誤差を与えた。これらのイオンはBisとキレートを生成するため、それぞれ誤差が生じると考えられる。また、その他のイオンについてはほとんどあるいはまったく影響しないことがわかった。そこで、Zn, Fe, Cu, Pbのマスキングについて検討した結果、As $10 \mu\text{g}$ に対して100倍量のZn、10倍量のFeについては、反応時に0.1M-EDTA 1mlを添加することにより妨害を除去することができた。しかし、Cu, PbについてはEDTAの効果は全くみられなかった。

なお、Cu, PbとAsのBisキレートのカラムによる分離精製を試み、高速液体クロマトグラフィーによる順

Table 1. Influence of foreign ions on the determination of 10 μg As

Ion	Amount added (μg)	Recovery As (%)
Al(III)	1000	99.7
Ca(II)	1000	94.0
Cu(II)	1000	40.0
Fe(II)	1000	1040.0
K(I)	1000	95.0
Mn(II)	1000	99.7
Mg(II)	1000	100.0
Na(I)	1000	101.3
Pb(II)	1000	50.0
Zn(II)	1000	128.8

EDTA is absent.

相系(シリカ), 逆相系(ODS, NH_2 カラム)及びそれらの溶離液の種類など種々検討してみたが, 分離することはできなかった.

7. 検量線及び精度

本法に従って検量線を作成したところ, As 1 ~ 10 μg の範囲で, 吸光度との間に良好な直線関係が得られた($r > 0.999$). さらに本法の精度を5回繰り返し実験によっ

て求めたところ, As 10 μg に対する変動係数は2.6%であった.

以上の結果から, 今回検討した吸光度法は Bis-As キレート生成により As の簡易定量法を作成した.

ま と め

塩酸共存下でのビスムチオール II による As の反応性, キレート沈澱の補集条件, 共存元素の EDTA によるマスキングなどの基礎的条件の検討を行い, 吸光度法としてのヒ素の簡易定量法を作成した.

文 献

- 1) 日本公定書協会監修: 第12改正日本薬局方解説書, B-359-372, 1991, 廣川書店, 東京.
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 60-65, 1990, 金原出版社, 東京.
- 3) Nickless, G.: *J. Chromatogr.* **313**, 129-159, 1991.
- 4) 松本チヨ, 山本泰考, 小高学他: 分析化学, **36**, 189-193, 1989.
- 5) 渡辺邦洋, 栗野政典, 西山孝史他: 分析化学, **30**, 800-803, 1981.
- 6) 吉田仁志, 蓼目清一郎: 分光研究, **14**, 131-141, 1966.
- 7) 井口和男, 田部井克己, 松原チヨ, 高村喜代子, 山田泰司: 無機化学, 228, 1987, 廣川書店, 東京.

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の アラントインの分析と安定性

大貫 奈穂美*, 鈴木 助治**, 森 謙一郎*, 中村 義昭*,
伊藤 弘一*, 中村 弘*, 木嶋 敬二***

High Performance Liquid Chromatographic Analysis and Stability of Allantoin in Cosmetics

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

The authors established a high performance liquid chromatographic method for the determination of allantoin in cosmetics. To 1.0-2.0g cosmetic sample, equivalent to 0.2-4.0mg allantoin, 15ml acetonitrile-water (85 : 15) were added. The mixture was dispersed in an ultrasonic bath for 10min and diluted to 20ml with acetonitrile-water (85 : 15). A 10 μ l portion of the supernatant solution was analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). The conditions of HPLC were as follows: column, NUCLEOSIL 100-5NH₂ (4.6mm i.d. \times 250mm); column temperature, 40°C; detector, UV 210nm; mobile phase, acetonitrile-water (85 : 15); flow rate, 1ml/min.

The calibration curve obtained by plotting the peak area of allantoin was linear from 20 to 200 μ g/ml. The detection limit was 10 μ g/ml in the sample solution. Average recovery (n=5) of allantoin added to skin cream and skin lotion at 0.02%, 0.05% and 0.1% were 97.5~106.6% and coefficients of variation were less than 1.9%.

The contents of allantoin in 9 commercial cosmetics (40 samples) were determined by this method. Assessment was made of the degradation of allantoin at alkalinity from pH7~9 in several samples. Stability experiments on allantoin in skin lotions prepared at 0.1% concentration with pH5 and pH7 were conducted at 40°C for 60 days. The degradation of allantoin at pH7 was observed to occur quite slowly.

The present method is thus shown useful for determining allantoin in cosmetics.

Keywords : アラントイン allantoin, 化粧品 cosmetics, 医薬部外品 quasi-drug, 安定性 stability, 分解 degradation, 高速液体クロマトグラフィー-HPLC

緒 言

アラントインは抗炎症作用や抗刺激作用等の活性を有するため、化粧水、スキนครリーム、乳液、ファンデーション等の化粧品や医薬部外品に広範囲に使用されている。わが国では化粧品種別許可基準によってアラントイ

ンの配合量上限が定められている¹⁾。配合量上限は洗顔料、シャンプー、リンスなどが0.5%、化粧水、クリーム・乳液、頭髮用化粧品などが0.2%である。

最近、製剤中におけるアラントイン含有量が経時的に低下するという事例が報告されている^{2,3)}。特に製剤の

* 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

*** 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

*** 国立衛生試験所

pHが7以上のアルカリ性領域でアラントインの加水分解が起こり、その安定性はpHに依存することが指摘されている。また、アラントインの分解産物はアラントイン酸、グリオキシル酸、アラントインとグリオキシル酸の縮合物などであることが報告されている⁴⁾。

従来、アラントインの分析は化粧品原料基準の確認試験⁵⁾に代表されるように、アラントインを酸又はアルカリで加水分解してグリオキシル酸に変換後フェニルヒドラジンを加えて発色させ、これを比色する方法がとられてきた。しかし、この方法では製剤の液性に起因するアラントインの分解による含有量低下をとらえることができず、アラントイン配合製剤の正確な品質評価はできない。

著者らは既にカチオン交換体カラム TSKgel SCX (東ソー製)を用いて、アラントインの高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法及びアルカリによる分解について報告した²⁾。しかし、このカラムでは分析を繰り返して行くと次第にピークがブロード化し、カラムの劣化が認められ、多数の検体を処理するルーチン分析には適当でないことがわかった。そこで今回は化粧品の日常検査に適した分析法設定のために汎用性の高いアミノプロピル基で修飾したシリカゲルカラムを用いて HPLC 法の検討を行い、合わせて市販化粧品の分析を行った。

また、この分析法を用いて、化粧水中のアラントインの安定性に及ぼすpHの影響を観察したので報告する。

実験方法

1. 装置

高速液体クロマトグラフ：島津製作所製，LC-6A D型，オートインジェクタ：SIL-6B型，データ処理装置：クロマトパックC-R6A型。

pHメータ：ベックマン製，φ50型pHメータ。

2. 試薬

アラントイン標準溶液 アラントイン (和光純薬) 約100mgを精密に量り、水に溶解して正確に100mlとした。この液をアセトニトリル-水(85:15)で希釈して20, 40, 80, 120, 160及び200 μ g/mlの濃度系列を調製して、アラントインの標準溶液とした。

3. 試料

1) 市販試料 平成5年4月～7年3月までに東京都内で入手したアラントイン配合の化粧品及び医薬部外品を試料とした。その内訳は化粧水、アフターシェーブローション、スキนครリーム、シェービングクリーム、乳液、パック、シャンプー、ファンデーション及び洗顔料の9種40検体である。

2) 回収率検討用化粧水 化粧水(pH5.0)及びクリーム(O/W型, pH5.0)⁶⁾にアラントインを0.02, 0.1及び0.2%の濃度に添加し、回収率検討用モデル化粧品を作成した。

4. 試験溶液の調製

1) 化粧水などの液体試料 試料1.0～2.0g (アラントインとして0.2～4.0mg)を目盛り付き試験管に精秤し、これにアセトニトリル-水(85:15)15mlを加えて十分振り混ぜて溶解したのち、アセトニトリル-水(85:15)を加えて正確に20mlとし、これを試験溶液とした。なお、不溶物がある場合は次項に従って調製した。

2) クリーム、パックなどエマルション又は固形試料 液体試料と同様に試料を精秤し、これにアセトニトリル-水(85:15)15ml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、アセトニトリル-水(85:15)を加えて正確に20mlとした。不溶物がある場合は0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過するか、又は1,500 \times gで10分間遠心分離し、そのろ液または上澄液を試験溶液とした。

5. 定量方法

試験溶液について HPLC 法を行い、アラントインのピーク面積を求めた。また、別にアラントイン標準溶液の HPLC 法よりピーク面積を求めて検量線を作成し、これより試験溶液中のアラントインを定量した。

HPLC 測定条件 カラム：NUCULEOSIL 100-5NH₂ (4.6mmi.d.×250mm, GLサイエンス製)，移動相：アセトニトリル-水(85:15)，カラム温度：40℃，流速：1ml/min，検出波長：210nm，注入量：10 μ l。

6. 安定性検討用緩衝液

pH6, 7, 8, 9の緩衝液は0.1Mリン酸二水素カリウム溶液及び0.05M四ホウ酸ナトリウム溶液を用い、pH10の緩衝液は0.05M四ホウ酸ナトリウム溶液及び0.05M炭酸ナトリウム溶液を用いて調製した⁷⁾。別にアラントイン約50mgを精秤し、各pHの緩衝液40mlに溶解したのち、エタノール2.5mlを加え緩衝液で50mlとし、正確なpHを測定した。ここで調製したアラントイン配合緩衝液は40℃の恒温器中に保存した。

7. 安定性検討用化粧水

pH5.0及び7.0の安定性検討用化粧水⁶⁾に安定性の実験直前にアラントインを各0.1%になるように添加し、40℃の恒温器中に保存した。

8. pHの測定

pH測定は衛生試験法・化粧品試験法⁸⁾に準じて行った。ただし本実験では、緩衝液、化粧水、ひげそり用

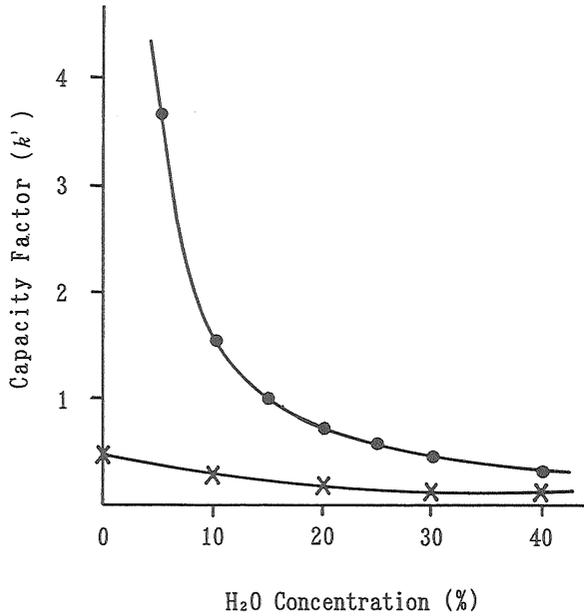


Fig. 1. Effects of H₂O Concentrations in Mobile Phase on the Capacity Factor (k') of Allantoin
Allantoin: 120 μ g/ml
● CH₃CN-H₂O, × MeOH-H₂O.

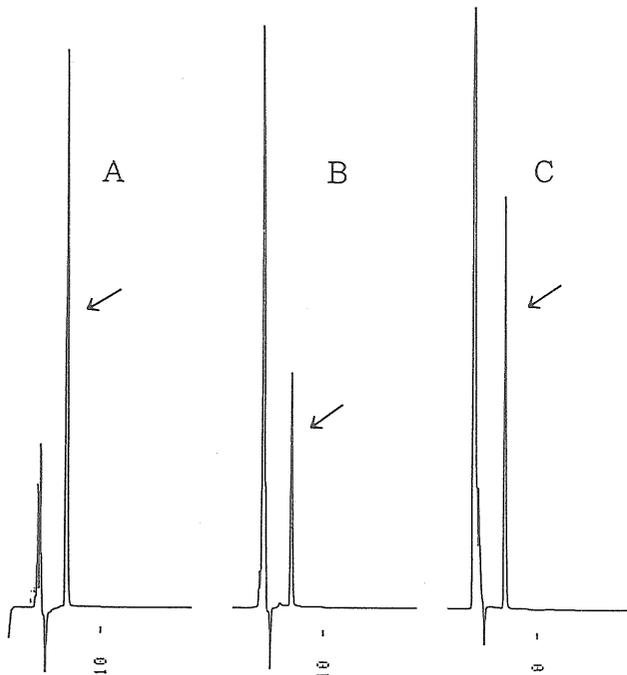


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Allantoin
A : allantoin standard solution 120 μ g/ml, B : skin lotion, C : skin cream.
HPLC conditions: column, NUCLEOSIL 100-5NH₂ (4.6mm i.d. \times 250mm); mobile phase, CH₃CN-H₂O (85 : 15); column temperature, 40°C; flow rate, 1ml/min; detection, UV detector at 210nm.

ローション、乳液、シャンプー及びファンデーションは原液のまま、また、クリーム、ひげそり用クリーム、パック及び洗顔料は蒸留水で2~5倍希釈してpH測定

を行った。

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

HPLC カラムは NUCULEOSIL 100-5NH₂, CAPCELL PAK NH₂ (4.6mm i.d. \times 250mm, 資生堂製) 及び ULTRON NH₂ (4.6mm i.d. \times 250mm, 信和加工製) の3種類のカラムについて検討を行った。

NUCULEOSIL 100-5NH₂カラムを用い、移動相としてアセトニトリル-水系とメタノール-水系について、アセトニトリル又はメタノールに対する水の混合比率を0から40%まで変化させてHPLC法を行い、Capacity Factor (k')を求めた。その結果をFig. 1に示す。メタノール-水系では、水の添加はほとんど k' に影響を与えず、アラントインはカラムに十分保持されることが分かった。これに対してアセトニトリル-水系では、水の比率を40%から5%と減少させることによって k' が0.5から3.7と大きく変わり、アラントインをよく保持することが分かった。アセトニトリル-水系の移動相において水の比率が20~15%で k' が1に近い良好な結果を与えた。

一方、CAPCELL PAK NH₂カラムではピークの保持時間 (t_R) が測定回数を重ねると若干大きくなる傾向 (t_R 9.3~9.6) がみられ、ベースラインの安定も得られなかった。この場合、移動相に5mMリン酸二水素カリウムを添加し、さらにリン酸でpHを2.5に調整して保持時間及びベースラインを安定させる必要がある。また、ULTRON NH₂カラムはアセトニトリル-水系の移動相を用いても保持時間 (t_R 7.6) の再現性は良好であったが、NUCULEOSIL 100-5NH₂, CAPCELL PAK NH₂に比べて、ピークの形状はかなりブロードであった。

以上の結果から、HPLC測定条件としてカラムにNUCULEOSIL 100-5NH₂を、移動相にアセトニトリル-水 (85 : 15) を用いることとした。本法はカチオン交換体カラムでみられる繰り返し分析によるカラムの劣化が少なく、ルーチン分析に適していた。Fig. 2にこの測定条件におけるHPLCのクロマトグラムを示す。

2. 検量線と回収率

前述の測定条件で検量線を作成したところ、アラントイン20~200 μ g/mlの範囲でほぼ原点を通る直線性を示した。相関係数は0.999であった。また、検出限界は10 μ g/mlであった。

回収率検討用モデル化粧品であるpH5.0に調製した化粧水及びクリームで回収実験を行った。その結果をTable 1に示す。化粧水の平均回収率は101.4~105.2%、変動係数0.5~1.1%、また、クリームでは平均回収率が

97.5~106.6%, 変動係数0.4~1.9%であり, 定量性及び精度共に良好な結果が得られた。

3. 市販化粧品の分析

本法を用いてアラントイン配合化粧品の分析を行った。その結果を Table 2 に製品のアラントイン配合量及び pH と共に示す。分析対象とした化粧品・医薬部外品 9 種 40 検体へのアラントイン配合量は 0.02~0.20%, pH の範囲は 4.4~9.4 であった。

Table 1. Recoveries of Allantoin from Skin Lotion and Skin Cream

Added (%)	Skin lotion		Skin Cream	
	Recovery (%) *	C.V. (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
0.02	104.4	0.6	101.3	0.4
0.1	105.2	0.5	97.5	1.5
0.2	101.4	1.1	106.6	1.9

* n=5

Fig. 2 に標準アラントイン並びに化粧水及びクリーム中のアラントインの HPLC クロマトグラムを示す。今回の製品分析においては, Fig. 2 に示すようにクロマトグラム上にはアラントインに対する直接の妨害ピークは認められなかった。しかし, クリームの一部の検体では共存成分と思われる保持時間が 1 時間以上のピークが出現し, クリーンアップを必要とするものがみられた。

本法での各試料の測定値(含有量)を比較してみると, 概して製品の pH が高いアルカリ性の試料において配合量に比べてアラントイン含有量の低い製品が認められた。製品配合量に対する含有量の比率を含有率(%)とすると, Table 2 中の pH が 4.4~6.9 の 25 試料 (No. 33 を除く) においては含有率が平均 89% である。それに対し, pH 7.0 の 5 試料のうち No. 20 では含有率の減少はみられないが, 他の 4 試料 (No. 3, 10, 31 及び 38) については含有率が平均 62% と後述の保存実験の結果からみてアラントインの分解過程にある。更に pH 7.5 以上の検体ではその傾向が顕著であり, pH 7.5~7.9 の 5 試料 (No. 13, 25, 26,

Table 2. Analytical Results of Allantoin in Commercial Cosmetics

Sample	No.	Allantoin (%)		pH	Sample	No.	Allantoin (%)		pH	
		Formula	Content				Formula	Content		
Skin lotion	1	0.20	0.18	4.4	Shaving cream	21	0.10	0.08	5.4	
	2	0.20	0.17	5.5		22	0.05	0.05	5.6	
	3	0.12	0.09	7.0		23	0.05	0.04	6.3	
	4	0.10	0.10	6.3		24	0.05	0.04	6.8	
	5	0.10	0.10	5.6		25	0.10	0.05	7.5	
	6	0.10	0.09	4.7		26	0.10	0.04	7.9	
	7	0.10	0.09	6.0		27	0.10	N.D.*	8.7	
	8	0.10	0.08	6.4		Milky lotion	28	0.10	0.07	6.2
	9	0.10	0.06	5.9			Pack	29	0.15	0.13
	10	0.06	0.05	7.0		30		0.05	0.05	5.5
	11	0.02	0.03	6.1		31	0.2	0.04	7.0	
	12	0.01	0.01	6.0		32	0.05	N.D.	9.4	
	13	0.10	0.05	7.6		33	0.2	N.D.	5.7	
After shave lotion	14	0.05	0.03	6.3	34	0.1	N.D.	7.8		
	15	0.02	0.02	5.5	35	0.1	N.D.	8.1		
Skin cream	16	0.20	0.21	6.1	Shampoo	36	0.055	0.04	5.6	
	17	0.20	0.19	6.6		37	0.05	N.D.	8.9	
	18	0.20	0.15	5.9	Foundation	38	0.10	0.07	7.0	
	19	0.20	0.16	5.4		39	0.10	0.02	7.8	
	20	0.10	0.12	7.0		Cleansing prep.	40	0.03	0.03	6.2

* Not detected.

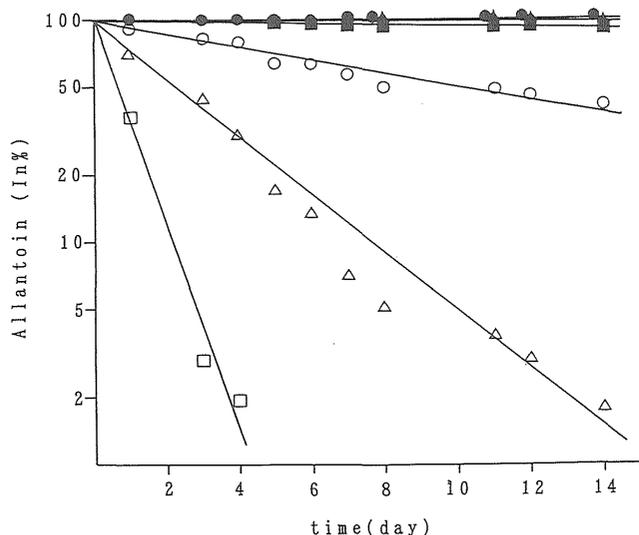


Fig. 3. Pseudo First-Order Degradation Plots of Allantoin in Stability Experiments at 40°C in Buffer Solution (pH5.0~9.9)

● : pH5.0 ($r=1.000$), ▲ : pH6.1 ($r=0.951$),
 ■ : pH7.1 ($r=0.962$), ⊕ : pH8.0 ($r=0.978$),
 △ : pH9.1 ($r=0.986$), ⊖ : pH9.9 ($r=0.990$).
 Allantoin : 0.1%.

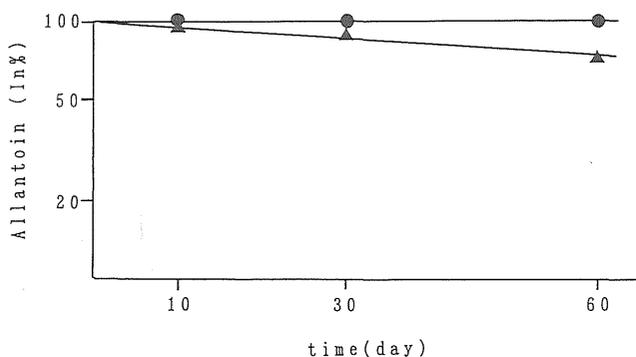


Fig. 4. Pseudo First-Order Degradation Plots of Allantoin in Stability Experiments at 40°C in Skin Lotion (pH5.0 and 7.0)

● : pH5.0 ($r=1.000$), ▲ : pH7.0 ($r=0.982$)
 Allantoin : 0.1%

34及び39)では含有率はいずれも50%以下(平均32%), pHが8.0以上の4試料(No.27, 32, 35及び37)ではいずれも検出限界以下であった。これらのことより製品のpHがアラントイン含有率に大きく影響することが明確になった。

4. アラントインの安定性の検討

1) 安定性に及ぼす pH の影響 萩原ら³⁾によって既に軟膏中アラントインの安定性に関して報告されているが、今回著者らは化粧水などの液体試料中での安定性実験を行った。まず、あらかじめ pH5.0~9.9の弱酸性からアルカリ性に調整した緩衝液中でアラントインの分解

を経時的に観察した。0.1%アラントイン配合緩衝液を40°Cの恒温器中に14日間保存し、アラントインの残存量(%)を測定した。その結果、pH5.0の緩衝液では14日経過後でもアラントインの分解は認められなかったが、pH6.1, 7.1, 8.0及びpH9.1の緩衝液では残存量はそれぞれ97.7%, 89.9%, 40.4%及び1.8%であった。またpH9.9の緩衝液中のアラントインは5日目以降では残存していなかった。Fig. 3に示すように、アラントインの分解は溶液のpHが高いほどその速度は大きく、pH6.1~9.9においてアラントインの残存量の対数値と経過時間との間に相関係数0.95以上の直線回帰式が得られ、アラントインの分解は擬一次反応⁹⁾として扱うことができると判明した。分解の速度定数を試算すると速度定数(k)と半減期はそれぞれpH6.1のとき 1.74×10^{-3} /日, 398.3日, pH7.1のとき 8.13×10^{-3} /日, 85.2日, pH8.0のとき 6.65×10^{-2} /日, 10.4日, pH9.1のとき 2.90×10^{-1} /日, 2.4日, pH9.9のとき1.04/日, 0.7日であった。

2) pH5.0及び7.0の化粧水における安定性 次に緩衝液中のアラントインの分解を参考として、実際の製剤に近い0.1%アラントイン配合のpH5.0と7.0のモデル化粧水を調製し、40°C, 60日間保存してアラントインの安定性を観察した。その結果をFig. 4に示す。pH5.0の化粧水では60日目でもアラントインの分解は認められず、安定であった。pH7.0の化粧水では10日, 30日及び60日目の残存量はそれぞれ99.3%, 89.5%, 71.7%であった。pH7.0では、長期間保存してもアラントインの分解は緩衝液の場合と同様に擬一次反応(相関係数0.982)で表されることがわかった。これより分解の速度定数を求めると 5.55×10^{-3} /日, また半減期は125.1日と推定された。

以上の結果より、製剤中のアラントインの安定性はpHがわずかでも変化すると著しく影響されることがわかった。また、モデル化粧水の60日間保存実験の結果から、40°C, pH7.0におけるアラントインの半減期は4ヶ月程度であると推定された。販売期間や使用期間、消費者の保存条件などを考慮すると、アラントイン配合の化粧品及び医薬部外品は、品質保持のために液性を少なくともpH6以下に調整することが望ましいと考えられる。

まとめ

化粧品及び医薬部外品中のアラントインの分析法として、カラムにNUCLEOSIL 100-5NH₂, 移動相にアセトニトリル-水(85:15)を用いたHPLC法を検討した。回収率は0.02, 0.1及び0.2%レベルで良好であり、本法を用いて市販化粧品の分析を行ったところ、特に妨害もなく、カチオン交換体カラムでみられる繰り返し分析によ

るカラムの劣化もみられなかった。アラントイン配合市販化粧品の分析の結果、製剤の液性がアルカリ性のときにアラントインの含有量低下が認められた。そこで pH5.0~9.9の0.1%アラントイン配合緩衝液中での安定性について検討したところ、pHによって著しい影響が認められ、pH6以上ではアラントインの分解は擬一次反応として示された。実際の化粧品に近い pH7.0の0.1%アラントイン配合化粧水を用いた60日間の保存実験においても、分解は緩衝液の場合と同様に擬一次反応として扱うことができた。

文献及び注

- 1) 日本公定書協会編：化粧品種別許可基準，1993，薬事日報社，東京。
- 2) 雨宮 敬，伊藤弘一，鈴木助治，他：東京衛研年報，44，94-97，1993。
- 3) 萩原輝彦，秋山和幸：東京衛研年報，42，15-20，1991。
- 4) 山本信也，大友三男，小松一男，他：薬学雑誌，113(7)，515-524，1993。
- 5) 日本公定書協会編：化粧品原料基準第二版注解，38-42，1984，薬事日報社，東京。
- 6) 回収率及び安定性検討用化粧品。
化粧水 (pH5.0)：硬化油，0.2%；香料，微量；パ

ラオキシ安息香酸エステル，0.15%；グリセリン類，8.0%；エタノール，4.0%；pH調整剤(クエン酸及びクエン酸ナトリウム)と水で pH5.0とし，全量を100%とした。

化粧水 (pH7.0)：硬化油，0.2%；香料，微量；パラオキシ安息香酸エステル，0.15%；グリセリン類，8.0%；エタノール，4.0%；pH調整剤(クエン酸及びクエン酸ナトリウム)と水で pH7.0とし，全量を100%とした。

クリーム (pH5.0)：油脂類，10.0%；高級アルコール，3.0%；スクアラン，7.0%；パラオキシ安息香酸エステル，0.35%；グリセリン，8.0%；モノステアリン酸グリセリル及びイソステアリン酸ポリオキシグリセリル，4.0%；pH調整剤(クエン酸及びクエン酸ナトリウム)，0.3%と水で pH5.0とし全量を100%とした。

- 7) 社団法人日本化学会編：化学便覧基礎編Ⅱ，第3版，355，1984，丸善株式会社，東京。
- 8) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，848-850，1990，金原出版株式会社，東京。
- 9) 後藤茂編：医薬品の開発，16，1990，廣川書店，東京。

蛍光 X 線分析法による医薬部外品及び化粧品中のイオウの定量

中村 義昭*, 大貫 奈穂美*, 森 謙一郎*,
伊藤 弘一*, 中村 弘*

X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Sulfur in Quasi-Drugs and Cosmetics

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

Keywords : 蛍光 X 線分析 X-ray fluorescence spectrometric determination, イオウ sulfur, 医薬部外品 quasi-drugs, 化粧品 cosmetics

緒 言

にきび発生防止を目的としたクリーム, 化粧水, 石けんや, ふけ・かゆみ防止を目的としたリンス, シャンプー, 育毛養毛剤等の医薬部外品及び化粧品にはイオウを配合している製品が多い. 従来これら製品中のイオウを分析する方法は, イオウを硫化物とした後, 過酸化水素で酸化して硫酸塩にし, これに塩化バリウムを加えて硫酸バリウムとして沈でんさせ, この沈でん量からイオウの含有量を求める方法や¹⁾, 硫化物をヨウ素で滴定する方法²⁾等がある. しかし, これらの方法はいずれも前処理操作が煩雑で, 秤量による誤差や, 夾雑物の妨害による誤差が生じやすい.

蛍光 X 線分析法は金属及び非金属元素の定性, 定量に有用な方法である. 特に個体試料で分析対象の元素が均一に含有している場合には特別な前処理を必要とせず, 直接測定できるなど多くの利点を有する. 我々は以前に化粧品領域においてエネルギー分散型の蛍光 X 線分析装置を用い鉛, ヒ素, ニッケルなどの重金属や酸化チタンの簡易分析法を検討し, その有用性を報告した³⁻⁵⁾. 今回高感度の波長分散型蛍光 X 線分析装置を用い, 医薬部外品及び化粧品中のイオウを直接測定する分析法を検討した結果, 簡便かつ迅速に定量することができたので報告する.

実験方法

1. 試料 東京都内の薬局, 化粧品店等で購入した, にきび防止を目的とした表示のある医薬部外品 5 検体

(クリーム 3 検体, 化粧水 1 検体, 石けん 1 検体)並びに, ふけ・かゆみ防止を目的とした表示のある医薬部外品 2 検体(シャンプー 2 検体)及び化粧品 4 検体(リンス 2 検体, 養毛剤 2 検体)の合計 11 検体を試料とした.

2. 試薬 1) イオウ: 和光純薬工業製試薬硫黄(結晶性, 99.9999%). 2) バインダー⁶⁾: ワットマン社製のセルロースパウダー CF11. 3) 親水軟膏: 日本薬局方収載親水軟膏(白色ワセリン 25%, ステアリルアルコール 20%, プロピレングリコール 12%, ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60.4%, モノステアリン酸グリセリン 1%, 精製水 38%)¹⁾の項に準じて調製した. 4) 標準化試料: 市販の Brass(銅 59.3%, 亜鉛 37.3%, 鉛 2.3%, スズ 0.3%, 鉄 0.4%, イオウ 0.4%の合金).

3. 装置 1) 蛍光 X 線分析装置: 理学電機工業(株)製の波長分散型蛍光 X 線分析装置 RIX-3000, 2) X 線管球: バリアン社製のロジウムクロム(Rh/Cr)デュアルターゲット X 線管球, プリケット成型器: 前川試験機(株)製手動型油圧成型器.

4. 標準試料の作成 標準試料はピーカーに親水軟膏 5 g を正確に量り, これにイオウ 10 mg を正確に入れて, よく混和した後, バインダー 2 g を加えて更によく混和し混合物とする. 次にプリケット⁶⁾作成のためにプレス用ダイス(直径 68 mm 厚さ 15 mm, 以下ダイスと略す)上にポリプロピレン膜(直径 50 mm, 厚さ 6 μ m, 以下 PP 膜と略す)を敷き, その上に置いたアルミニウムリング(内径 40 mm, 厚さ 5 mm, 以下リングと略す)の中にこの混合物

*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

を、スーパーテル等で均一に入れる。混合物を入れたこのリングの上にPP膜を敷きもう一つのダイスでリングを挟む。アルミニウムリングを挟んだダイスを更に真鍮製のスペーサー(70mm, 厚さ28mm, 円筒状)2個で挟みブリケット成型器にセットした後, 3 tの圧力を掛けてプレスする。作成したブリケットから上下のPP膜を外しリングを付けたままの状態, シルカゲルデシケーター中で一晩放置してイオウ10mgの標準試料とした。同様にイオウ25mg, 50mg, 100mg, 250mg及び500mgについても上記方法に従い操作し標準試料濃度系列を作成する。図1にブリケット成型方法を示す。

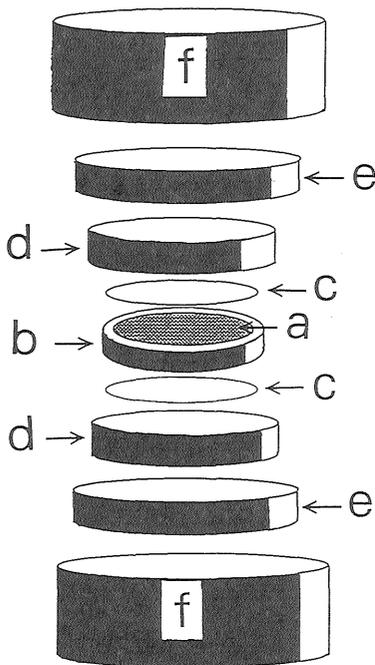


図1. ブリケット成型法

- a) ブリケット (試料),
- b) アルミニウムリング (内径40mm, 厚さ5mm),
- c) ポリプロピレン膜 (直径50mm, 厚さ6 μ m),
- d) ダイス (鋳物製, 直径68mm, 厚さ15mm),
- e) スペーサー (真鍮製, 直径70mm, 厚さ28mm),
- f) ブリケット成型器

5. 測定試料の作成 測定試料は試料5gをピーカーに正確に量り, バインダー2gを加えてよく混和し混合物とし, 以下標準試料と同様に操作して測定試料とした。ただし石けんの場合は5gをメノー乳鉢に正確に量り, エタノール20mlを加え乳棒でよく分散させてから, バインダー2gを加え, 一晩放置しエタノールを蒸散した混合物について, 同様の操作を行い測定試料とした。

6. 蛍光X線測定条件 1) 定性 (1)X線励起条件 ターゲット: ロジウム, 管電流50kV, 管電圧50mA,

1次フィルター: OUT, (2)光学系条件アットネータ: 1/1, スリット: COARSE, 分光結晶: ゲルマニウム(GE), 検出器: ガスフロープロポーションナルカウンタ(F-PC), 計数管ガス: PRガス, (3)波高分析器(以下PHAと略す)条件 ローレベル(以下L.L.と略す): 130, アップレベル(以下U.L.と略す): 310, (4)スキャン条件 スキャン方法: ステップスキャン, スキャン開始回折角(2θ): 108.000degree (以下degと略す), イオウ(S-K α)ピーク回折角(2θ): 110.820deg, スキャン終了回折角(2θ): 114.000deg, ステップ: 0.05deg, 測定時間: 0.4sec, (5)X線照射部条件 X線照射面積: 35mm, 雰囲気: Vacuum, 試料ホルダースピン: 有り。

2) 定量 (1)X線励起条件, (2)光学系条件, (3)PHA条件はいずれも定性と同じ, (4)回折角(2θ)deg及び測定時間 ピーク回折角(2θ): 110.820 deg-40sec, バックグラウンド1 (以下BG1と略す): 109.050deg-10sec, バックグラウンド2 (以下BG2と略す): 112.064 deg-10sec。

7. 試験操作 1) 定性: イオウ50mgの標準試料をアルミニウムリングの付いたまま図2に示す様に試料ホルダーの上に置き, 更にその上にPP膜を置き, PP膜の四隅をセロテープで固定し, 直径38mmの穴が開いているステンレス(sus)製の蓋をし, 予め定性測定条件にセットした蛍光X線装置にかける。試料から発生した蛍光X線スペクトルを装置のゴニオメーターの108.000deg~114.000deg間を走査しながらゲルマニウム(Ge)の分光結晶で分光し, イオウK α ピーク回折角(2θ): 110.820degのピークを測定する。次に測定試料についても同様に操作してイオウK α ピーク回折角のピークを求めて標準試料のそれと比較して定性を行う。

2) 定量: (1)検量線の作成及び標準化試料の測定 予め作成した標準試料濃度系列のX線強度 kiro counts per second (以下kcpsと略す)を測定し検量線を作成する。つづいて, 標準化試料である Brass 中のイオウのX線強

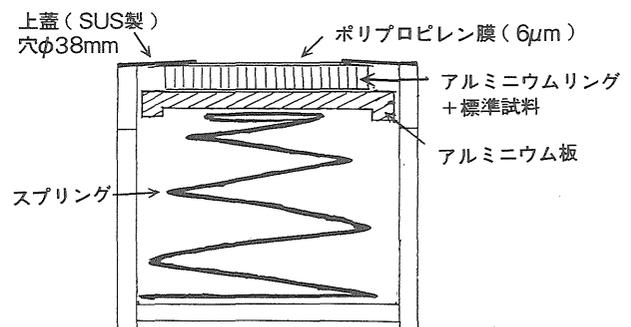


図2. 試料ホルダー

度 kcps を測定しその値を検量線作成時の基準強度とし、検量線の測定値と共にデータ処理装置に格納する。2回目以降の定量を行う場合は、標準試料濃度系列の測定は行わず、Brassのイオウ(S-k α)を測定し、検量線値の補正を行う。

(2)測定試料の測定 定性と同様の操作を行い蛍光X線分析を行い得られたイオウのX線強度と検量線から試料中のイオウの含有量を計算する。

実験結果及び考察

1. 試料の調製法の検討 今回調査を行う試料はクリーム、化粧水、石けん、シャンプー、リンス及び養毛剤等多岐に渡っている。このため、測定装置である蛍光X線分析装置X線照射部の雰囲気がVacuumであるので、水分を多く含有する試料をそのままの状態で測定するのは不可能である。また定量する場合、測定試料表面が平でない照射されたX線が同一方向に反射されず正確な定量ができない。これらのことから液体の試料についてはバインダーであるセルロースパウダーを加えて液体をバインダーに染み込ませ、プレスし表面が平なブリケットを作成し、乾燥することとした。固体の石けんについてはそのままではバインダーに均一に混和できないため、一度石けんをエタノールで分散した後、バインダーを加えて均一に混和し、エタノールを蒸散後、プレスし作成したブリケットを乾燥して測定試料とした。

2. 測定条件の検討 定性は分析装置に装備された標準的方法⁷⁾で行ったが、定量分析を行う場合は目的とするイオウの分析精度の向上や妨害スペクトルの軽減あるいは除去を行い、最適な条件を得るためにイオウのK α ピーク回折角110.820degの前後をスキミングしBG1 109.050deg及びBG2 112.064degの2点とした。またその時の測定時間をK α ピーク回折角は40sec, BG1及びBG2は10secと定めた。次に測定時に発生する2次線、3次線等の高次線や、電気ノイズを除去しバックグラウンドを軽減して、目的とするイオウのX線電気信号のみを取り出すために、PHAも測定してL.L.130及びU.L.310と定めた。

検量線の作成及び標準化試料の測定では、X線管球から発生するX線強度は測定する日により異なる可能性があり、また試料中のイオウを測定する場合、そのつど検量線を作成するのでは効率が悪い。このため作成した検量線をデータ処理に格納した後、この検量線を長期的に使用する目的で、標準化試料のBrassを検量線作成時に測定し、その値をデータ処理に格納する。2回目以降に定量を行う場合は、Brassのみを標準化試料として

測定することで自動的に検量線のX線強度補正を行う方法とした。

3. 検量線 図3に示す様に0.2-10.0% (W/W)の範囲で濃度とX線強度kcpsの間に直線関係が得られ、相関係数も $r=0.9997$ と良好であった。なお、この検量線は原点を通らないがこれはX線管球から発生する白色X線(連続X線)及びX線が試料に照射された時に発生する散乱線の影響のためである⁶⁾。

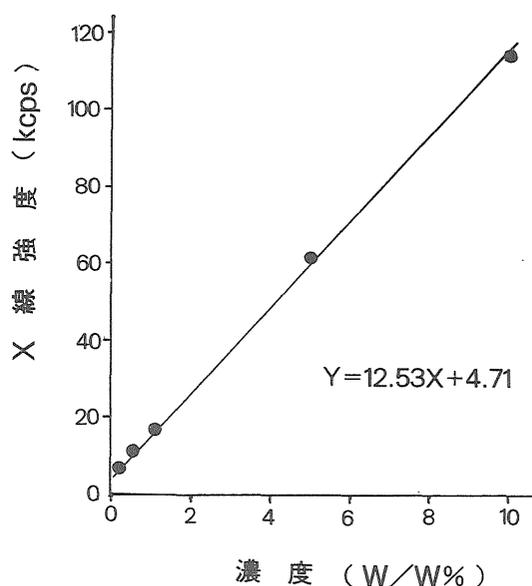


図3. イオウの検量線

4. 添加回収 本法を用いて市販クリーム(W/O型) 5gにイオウが0.5%及び5%となるように25mg及び250mgそれぞれ添加して回収率を求めた。その結果を表1に示す。5回の平均回収率は106%, 105%, 変動係数(C.V.)は4.4%, 4.7%であった。

表1. 市販クリームからのイオウの回収率

試料量 (g)	添加量 (mg)	回 収 率		n=5 変動係数(%)
		範囲(%)	平均(%)	
5	25	98-110%	106%	4.4
5	250	101-113%	105%	4.7

5. 繰り返し精度 本試験法の測定精度を確認するため、イオウを含有するシャンプー1検体と石けん1検体についてそれぞれ5回ずつ繰り返し測定した。表2に示すように変動係数はシャンプー2.0%, 石けん11.9%であった。シャンプーの測定精度は十分であったが、石けんでは変動係数が若干大きかった。

表2. 試料分析の繰り返し精度

サンプル	試料量 (g)	測定回数	測定値 (%)	平均 (%)	変動係数 (%)
シャンプー ¹⁾	5	5	6.8-7.1	6.9	2.0
石けん ²⁾	5	5	1.5-2.0	1.7	11.9

1) 表3 試料番号6, 2) 表3 試料番号5

6. 市販品の分析結果 市販医薬部外品及び化粧品11検体について本法によりイオウの測定を行い、その結果を表3に示した。11検体すべての検体からイオウを検出した。これらは特に妨害ピークは認められず、良好な蛍光X線スペクトルが得られた。その1例として試料番号6のスペクトルを図4に示す。なお、アルキル硫酸塩やスルホン酸塩等の陰イオン界面活性剤を含有しているシャンプーの場合にはそれらの相当するイオウ量を含む総イオウ含有量として測定される。

この試験方法により化粧水、シャンプー、クリーム等の医薬部外品及び化粧品中のイオウを簡便、迅速に定量できた。

表3. にきび防止製品及びふけ・かゆみ防止製品中のイオウの測定結果

試料 ¹⁾ 番号	サンプル	薬事法上の分類	効能(表示)	イオウ検出値 ²⁾ (%)
1	クリーム	医薬部外品	にきび ³⁾	1.0
2	〃	〃	〃	1.3
3	〃	〃	〃	4.0
4	化粧水	〃	〃	0.3
5	石けん	〃	〃	1.7
6	シャンプー	〃	ふけ ⁴⁾	6.9 ⁵⁾
7	〃	〃	〃	6.6 ⁵⁾
8	リンス	化粧水	〃	3.6
9	〃	〃	〃	0.1
10	養毛剤	〃	〃	1.3
11	〃	〃	〃	2.2

- 1) 試料番号9の製品はイギリス製、他の製品は全て国産、
- 2) 定量限界：0.1%、3) にきび：にきび防止製品、
- 4) ふけ：ふけ・かゆみ防止製品、
- 5) 製品中のアルキル硫酸塩やスルホン酸塩等陰イオン界面活性剤中のイオウを含む

ま と め

蛍光X線分析法による市販医薬部外品及び化粧品に含まれるイオウの定量法について検討し、次の結果を得た。

1. 蛍光X線分析法による化粧品及び医薬部外品中のイオウの分析では、回折角(2θ)deg及び測定時間はピーク回折角：110.820deg-40sec, BG1：109.050deg-10sec,

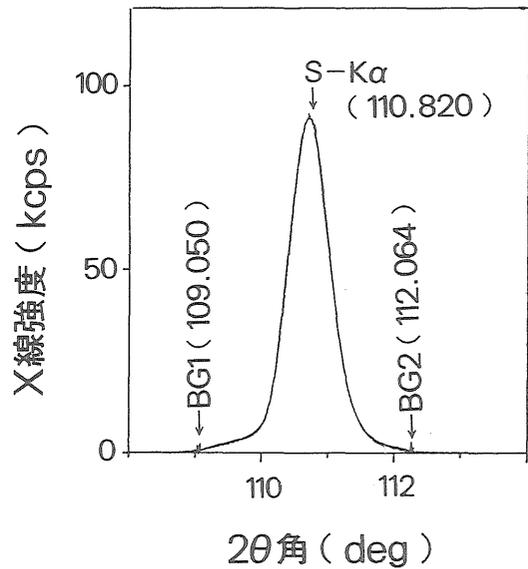


図4. シャンプー(表3 試料番号6)中のイオウの蛍光X線スペクトル

BG2 : 112.064deg-10sec とし、PHA は L.L.130, U.L.310とするのが最適であった。

2. 親水軟膏にイオウを0.2%から10%の濃度で添加した場合、蛍光X線強度kcpsとの間に直線関係が認められ、検量線を作成することができた。また検出限界はイオウとして10μg/gであった。

3. 本法による市販クリーム中のイオウの回収率は0.5%添加で106%、変動係数は4.4%、5%添加で105%、変動係数4.7%であった。また製品を5回測定したときの繰り返し精度は変動係数でシャンプー2.0%、石けん11.9%であった。

4. 今回市販医薬部外品及び化粧品11検体中のイオウの定性、定量において、共存する無機成分によるイオウに対する妨害は認められず、医薬部外品及び化粧品中のイオウを簡便、迅速に定量することができた。

謝辞 本研究にあたり蛍光X線測定条件等に御助言をいただいた理学電機工業(株)森 正道氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 日本公定書協会編：日本薬局方解説書第十二改正, C144-C147 D469-D470, 1991, 廣川書店, 東京.
- 2) 日本分析化学会編：分析化学便覧第三改正, 177-181, 1981, 丸善, 東京
- 3) 中村義昭, 観 照雄, 伊藤弘一, 他：東京衛研年報, 36, 98-100, 1985.
- 4) 雨宮 敬, 鈴木助治, 渡辺四男也：東京衛研年報, 40, 111-114, 1989.
- 5) 雨宮 敬, 伊藤弘一, 鈴木助治, 他：東京衛研年報,

- 41, 75-77, 1990.
- 6) 大野勝美, 川瀬 昇, 中村利廣: X線分析法, 9-12
124-133 144-145, 1987, 共立出版, 東京.
- 7) 理学電機工業(株)編: 蛍光X線RIX3000取扱説明書, (3)5-(3)17, 1992, 大阪.

義歯床固定用糊材中の元素含有量 材質及び人工唾液への溶出について

江波戸 舉 秀*, 中 村 弘*

Elements Content in Denture Adhesives Materials and Dissolution in Artificial Saliva

KIYOHIDE EBATO* and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords: 義歯床固定用糊材 Denture Adhesives, 元素 Elements, 金属 Metals, 高周波誘導結合プラズマ発光分析法 ICP-AES, 人工唾液 Artificial Saliva, アルミニウム Aluminium, カルシウム Calcium, 鉄 Iron, マグネシウム Magnesium

緒 言

義歯床固定用糊材(義歯安定剤と略す)は, 薬事法施行令, 別表第一では歯科材料の5「歯科用接着充填材料」に分類され, 一般には義歯安定剤, 総入れ歯安定剤と呼ばれ, 歯肉と義歯の隙間を埋めるために使用される医療用具である。

義歯安定剤は口中で使用される医療用具であるが, 材質及び溶出物等について厚生省告示による基準, 承認基準案, また, 日本工業規格(JIS)等の公的規格試験はなく, 製造(輸入)業者の医療用具製造(輸入)承認書による社内規格によって規程されているにすぎない。

医療用具製造(輸入)承認書による社内規格も各社異なり, 衛生上問題となる個々の元素含有量の規格は記載されていない。また, 義歯安定剤の元素含有量の報告例も見あたらない。

今回, 義歯安定剤の元素含有量を調査することを目的として, 高周波誘導結合プラズマ発光分析(ICP-AESと略す)により, 亜鉛(Zn), アルミニウム(Al), アンチモン(Sb), カドミウム(Cd), カルシウム(Ca), クロム(Cr), コバルト(Co), ストロンチウム(Sr), 鉄(Fe), 銅(Cu), 鉛(Pb), ニッケル(Ni), バリウム(Ba), ヒ素(As), ベリリウム(Be), マグネシウム(Mg), マンガン(Mn), モリブデン(Mo)の18元素について多元素同時測定した。また, 材質中に含有が確認された元素については, 人工唾液による溶出試験を行ったので併せて報告する。

実験の部

1. 試料

平成2年から平成7年に入手した4社の市販義歯安定剤, 6試料(試料A~F), 14検体を使用した。試料Aは天然ゴム系, 試料Eは炭化水素系, その他の試料は酢酸ビニル樹脂系であった。

2. 試薬

硫酸, 硝酸, 塩酸: 有害金属測定用試薬を用いた。過酸化水素: 原子吸光分析用試薬を用いた。人工唾液の調製: 炭酸水素ナトリウム4.2g, 炭酸カリウム0.2g, 塩化ナトリウム0.5gを1lの蒸留水に溶かした。ICP-AES測定用標準溶液: Zn, Al, Sb, Cd, Ca, Cr, Co, Sr, Fe, Cu, Pb, Ni, Ba, As, Be, Mg, Mn, Moの18元素の原子吸光分析用標準液(1,000ppm)を秤取・混合し, 0.5N塩酸で希釈して1ppmの測定用標準溶液を調製した。その他の試薬は特級試薬を用いた。前記試薬は, いずれも和光純薬工業製を用いた。

3. 装置及び器具

ICP-AESは, サーモジャーレルアッシュ社製ポリスキャン61ESS型にシータック社製超音波ネブライザーU-5000型を接続して行った。試料の分解には穴開きアルミブロックをホットプレート上にセットした装置を用いた。水浴は, ヤマト科学社製ヤマトBF-21型を, 試験管はテフロン(PFA)製を使用した。

4. 試験方法

1) 材質中元素含有量の測定: 試料約1gをテフロン試験管に秤取し, 試料分解装置にセットした後, 硫酸5

*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

滴、硝酸 2 ml を加えて、突沸しないように注意しながら 200°C までゆっくり昇温した。溶液が淡黄色を呈するまで硝酸を適宜滴下し、酸化促進と脱色を兼ねて過酸化水素を 2 滴滴下した。濃縮液が、淡黄色又は無色透明、あるいは、残渣が淡黄色または白色となるまで分解を続けた。冷後、0.5N 塩酸を加えて全量を 10 ml とした。残渣のある場合は、シリコンオイルフリーのプラスチック製注射筒(トップ社製)を用い、サンプルッセ 13-HV (孔径 0.45 μm , ミリポア社製)でろ過し、ICP-AES 用試料液とした。これを、表 1 に示す条件で測定した¹⁾。

2) 人工唾液による溶出試験：生ゴム状の試料の場合、直径 3 cm, 高さ 5 mm, 厚さ 1 mm のアルミニウムリングを 50 ml のビーカーの底に置き、既知重量の試料をアルミニウムリング中に広げるように入れ、上から押し込んで底面をビーカーの底に密着させ、上部表面をできるだけ平滑にし溶出用試料片とした。粉末状の試料の場合、重量を測定した試料に等量の蒸留水を添加し生ゴム状に練和して、上記と同様に溶出用試料片とした。

試料片を入れたビーカーに、36°C に保持した人工唾液 50 ml を入れ、上部をアルミホイルで密封し水浴中 36°C に保温した。次いで、24, 48, 72 時間と経時的に溶出液を 5 ml ずつ採取し、ICP-AES 用試料液とした。なお、試料片より材質が溶け出し、粘調性(ゲル状)を呈するものは、試料液を材質の場合と同様に分解した後、0.5N 塩酸を加えて全量を 10 ml とし、1) と同一条件で

表 1. ICP の操作条件

ICP			
高周波出力 (w)	: 1150		
トーチガス流量	: 高速流量		
補助ガス流量 (l/min)	: 1.0		
観察位置 (mm)	: 15		
ネプライザーガス圧 (psi)	: 30		
ポンプ回転数 (洗浄時) (RPM)	: 200		
洗浄時間 (s)	: 30		
ポンプ回転数 (分析時) (RPM)	: 100		
ポンプチューブの種類	: タイゴン		
波長 (nm)			
Al 308.2	As 193.77	Ba 455.4	Be 313.0
Ca 317.9	Cd 228.8	Co 228.6	Cr 267.7
Cu 324.7	Fe 259.9	Mg 279.0	Mn 257.6
Mo 202.0	Ni 231.6	Pb 220.3	Sb 206.8
Sr 407.7	Zn 213.8		
超音波ネプライザー			
試料加熱温度 (°C)	: 140		
試料冷却温度 (°C)	: 5		

ICP-AES を行った。人工唾液のみを用いてブランク試験を行った。

結果及び考察

1. 材質中の元素含有量

試料の元素組成により、測定元素の波長に他元素の波長が重複する分光干渉により、測定出来ない元素があることから、ICP-AES に設定された多元素同時測定が可能な 33 元素について、混合標準溶液(各 1 ppm)を調製し、試料ごとに元素の波長プロファイルと比較した。その結果、分光干渉の点から測定可能な元素は Cr, Cd, Cu, Fe, Zn, Mg, Mn, Ni, Pb, Ba, Ca, Co, Sr, Al, Be, Mo, Sb, As の 18 元素であった。材質中の 18 元素の測定値を表 2 に示した。試料分解終了後、残渣のあった試料は表 2 に示した天然ゴム系試料 A と炭化水素系試料 E の 2 種であった。

試料 A は、Al, Ca, Fe, Mn, Sr, Zn と 6 種の元素が検出され、他試料に比較して Mn が 37.50 $\mu\text{g/g}$, Sr が 10.53 $\mu\text{g/g}$ と高値を示した。試料 B では、Al, Ca, Cr, Fe, Ni, Pb, Sr, Zn と 8 元素が検出された。また、他試料では検出されなかった Cr, Ni, Pb が検出された。Pb は、1.81 $\mu\text{g/g}$ を検出したがディスプレイ輸血セット及び輸液セット基準(厚生省告示)²⁾の材料の合成樹脂、又は、ゴムの材質の重金属試験法の限度 20 ppm (Pb として)より低値であった。Zn は、5.12 $\mu\text{g/g}$ と測定した試料中最高値を示した。試料 C は、Al, Ca, Zn の 3 元素が検出された。試料 D は、試料 C と同様に Al, Ca, Zn の 3 元素が検出された。試料 C, D とともに Al が 70 $\mu\text{g/g}$ 以上と高値を示したが、試料 D は、Al が 78.72 $\mu\text{g/g}$ と最高値を示した。試料 E は、Al, Ca, Mg, Zn の 4 元素が検出された。試料 F は、Al, Ca, Mg, Mn, Sr, Zn の 6 元素が検出された。Ca は 4,709 $\mu\text{g/g}$, Mg が 40.6 $\mu\text{g/g}$ と他試料に比較して高値を示した。いずれの試料からも検出された元素は、Al, Ca, Zn の 3 元素であった。

2. 元素間の相関について

試料材質中の元素の相関を、例数から計算可能であった試料 A で検討し表 3 に示した。スピアマンの順位相関係数は、Fe-Al (0.996), Ca-Sr (0.898), Mn-Sr (0.783), Al-Zn (0.722) と高い相関を示した。試料 A は天然ゴム系の植物由来の製品であり、検出された 6 元素すべてが、いずれかの元素との組み合わせにより相関関係にあった。

3. 人工唾液溶出液中の元素含有量

蒸発による人工唾液の損失をみるため、蒸留水 50 ml を入れ、上部を家庭用アルミホイルで密封したビーカー

表2. 義歯安定剤中の元素含有量

試料	Al	As	Ba	Be	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Ni	Pb	Sb	Sr	Zn
A1	9.97	ND	ND	ND	3156	ND	ND	ND	ND	10.13	ND	35.36	ND	ND	ND	ND	11.73	1.59
2	24.48	ND	ND	ND	3408	ND	ND	ND	ND	30.16	ND	49.77	ND	ND	ND	ND	12.86	2.68
3	12.52	ND	ND	ND	2668	ND	ND	ND	ND	11.51	ND	37.23	ND	ND	ND	ND	9.21	2.24
4	23.01	ND	ND	ND	3338	ND	ND	ND	ND	26.94	ND	35.76	ND	ND	ND	ND	10.80	2.09
5	24.23	ND	ND	ND	2669	ND	ND	ND	ND	28.66	ND	29.39	ND	ND	ND	ND	8.10	3.43
平均値	18.84	ND	ND	ND	3407	ND	ND	ND	ND	21.48	ND	37.50	ND	ND	ND	ND	10.53	2.41
標準偏差	7.01	-	-	-	358	-	-	-	-	9.81	-	7.48	-	-	-	-	1.90	0.69
B1	1.58	ND	ND	ND	73.8	ND	ND	6.10	ND	23.09	ND	ND	ND	2.47	1.81	ND	0.37	5.12
C1	89.29	ND	ND	ND	52.96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.10
2	65.71	ND	ND	ND	40.19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.82
3	68.82	ND	ND	ND	39.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.59
平均値	74.61	ND	ND	ND	44.25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.84
標準偏差	12.81	-	-	-	7.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.26
D1	78.72	ND	ND	ND	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.35
E1	26.79	ND	ND	ND	152.1	ND	ND	ND	ND	ND	6.16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.22
F1	22.91	ND	ND	ND	5977	ND	ND	ND	ND	ND	42.1	0.40	ND	ND	ND	ND	3.96	0.35
2	15.82	ND	ND	ND	4228	ND	ND	ND	ND	ND	50.3	0.57	ND	ND	ND	ND	1.74	0.38
3	10.50	ND	ND	ND	3922	ND	ND	ND	ND	ND	29.3	0.61	ND	ND	ND	ND	1.79	0.35
平均値	16.41	ND	ND	ND	4709	ND	ND	ND	ND	ND	40.6	0.53	ND	ND	ND	ND	2.50	0.36
標準偏差	6.23	-	-	-	1108	-	-	-	-	-	10.6	0.11	-	-	-	-	1.27	0.02

単位: $\mu\text{g/g}$,ND: 未検出 (検出限界: As0.22, Ba0.11, Be0.09, Cd0.03, Co0.07, Cr0.08, Cu0.26, Fe0.09, Mg0.37, Mn0.03, Mo0.10, Ni0.11, Pb0.3, Sb0.18, Sr0.02, 単位: $\mu\text{g/ml}$)

表3. スピアマンの順位相関係数 (試料A)

	Al	Ca	Fe	Mn	Sr	Zn
Al	1.00	0.261	0.996	0.185	-0.044	0.722
Ca		1.000	0.322	0.640	0.898	-0.411
Fe			1.000	0.224	0.029	0.697
Mn				1.000	0.783	-0.126
Sr					1.000	-0.525
Zn						1.000

を用意し、それぞれの溶出液採取時に液量を測定したところ、蒸発による液量損失はなかった。酢酸ビニル樹脂系試料B, C, D, Fの4種の人工唾液溶出液は、いずれの元素も溶出しなかった。天然ゴム系試料A、及び炭化水素系試料Eは、溶出開始と共にビーカー底部の試料片よりゲル化が進行し24時間後にはほとんどゲル化した。試料Eは、粘性が強くピペットでの秤取が不能となったため測定できなかった。天然ゴム系の試料Aから、Ca, Fe, Mn, Srの4元素が人工唾液に溶出した。試料Aが

表4. 人工唾液による元素溶出率 (試料A)

元素	24時間諸間後	48時間後	72時間後
Ca	11.2%	19.4%	81.7%
Fe	21.8%	26.1%	66.6%
Mn	25.1%	33.6%	63.8%
Sr	30.8%	52.5%	88.0%

ゲル化したことから材質からの溶出率の計算は、試料の表面積からの溶出を計算する方法によらず、溶出に用いた試料片の全重量中の元素含有量と、人工唾液中に溶出した全元素量を計算し算出した。その結果を表4に示した。Caは、24時間後に11.2%、48時間後に19.4%、72時間後に81.7%、Feは、24時間後に21.8%、48時間後に26.1%、72時間後に66.6%、Mnは、24時間後に25.1%、48時間後に33.6%、72時間後に63.8%、Srは、24時間後に30.8%、48時間後に52.5%、72時間後に88.0%が溶出した。72時間後にはいずれの元素も60%以上の溶出率を示した。今回の試験は、口中での使用形態

と若干異なる溶出モデル試験であり、実際の使用の場合、義歯安定剤は歯肉と義歯の間で密着状態にある。このため、唾液への溶出は今回より低い溶出値になると考えられるので、これらの測定値から直ちに衛生上の問題を判断することは出来ない。

ま と め

市販義歯安定剤6試料, 14検体の元素含有量と, 人工唾液により溶出した元素を, ICP-AESにより, 多元素同時分析し検討した。

1. 天然ゴム系1種, 5検体, 炭化水素系1種, 1検体, 酢酸ビニル樹脂系4種8検体の材質中には, Al, Ca, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, Znの元素が測定された。

2. 天然ゴム系の義歯安定剤5検体の相関を検討したところ, Fe-Al, Ca-Sr, Mn-Sr, Al-Znで高い相関が見られた。

3. 義歯安定剤の人工唾液への溶出は, 酢酸ビニル樹脂系は, 人工唾液中に72時間浸漬しても元素が溶出しなかった。天然ゴム系では24時間溶出中にゲル化し, 材質中の元素を溶出した。炭化水素系も同様にゲル化したが,

粘調性が強く試料を採取出来なかった。

和 文 要 旨

日本人の高齢化に伴い, 使用量が増加している義歯安定剤について, 市販品6種の材質中の元素含有量と, 人工唾液により溶出した元素を, ICP-AES分析法により多元素同時分析し検討した。その結果,

1. 材質中には, Al, Ca, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sr, Znの元素が3-8種の組み合わせで測定された。

2. 天然素材系の義歯安定剤の相関を検討したところ, Fe-Al, Ca-Sr, Mn-Sr, Al-Znで高い相関が見られた。

3. 義歯安定剤の人工唾液への溶出は, 天然素材系では24時間溶出中にゲル化し, 材質中の元素を溶出した。プラスチック素材系は, 人工唾液中に72時間浸漬しても元素が溶出しなかった。

文 献

- 1) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 17-32, 1990, 金原出版, 東京。
- 2) 医療用具研究会編: 医療用具の規格基準解説, 90-96, 1993. 薬業時報社, 東京。

家庭用品の衛生化学的研究 (第31報)* 形状記憶繊維製品のホルムアルデヒド残留量調査

岸本清子**, 山野辺秀夫***, 舘照雄***, 中村弘***

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXI) Survey of Formaldehyde Residue in Shape-memory Fabrics

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

Keywords : ホルムアルデヒド formaldehyde, 形状記憶繊維製品 shape-memory fabrics, 樹脂加工繊維 resin-treated fabric

緒言

“しわにならない”, “縮まない” といういわゆる「形状記憶シャツ」など防しわ・防縮加工を施した繊維製品が, 平成5年秋以来市場を賑わせている。これは製品の手入れの簡便性が消費者に良く受け入れられたためと思われる。

繊維製品における形状記憶処理は, 技術の種類として Vapor Phase (VP) 加工, Super Soft Peachface (SSP) 加工, Double Action (D/A) 加工がある¹⁾。VP 加工は縫製後の製品にホルムアルデヒド (HCHO) ガスを吹き付けてセルロース分子間に架橋構造を作り, 形状記憶させる方法であり, SSP 加工は, 生地を液体アンモニアに浸して繊維のねじれや歪みを正し, HCHO 樹脂で加工を施した後, 縫製する方法でいずれも HCHO で処理を行う。これに対して D/A 加工は生地にポリエステル系の樹脂加工を施した後, 縫製する方法である。またこれらとは別に, 防しわ・防縮等は従来より一般的な機能として追求されており, 特に「ノーアイロン」を標榜しなくてもワイシャツ類は HCHO 樹脂加工されているものが多いと言われている。

このように防しわ・防縮機能を持ったワイシャツやブラウスなどの繊維製品は HCHO 樹脂等により加工されたものが多く, 製品への HCHO の残留が懸念されている。

HCHO は抗原性が高く, アレルギー性皮膚障害の原因

の一つとなっており, 「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」(家庭用品規制法)²⁾により, 身体に直接接触する度合いの大きい下着, 寝衣, 靴下等の繊維製品については「75ppm以下」, 24ヶ月以内の乳幼児用繊維製品については「検出しない」の基準値が設定されている。しかし, ワイシャツやブラウス等は中衣類に分類され, 家庭用品規制法による規制はなく, 通産省通達³⁾により300ppm以下となるように業界への指導がなされているにすぎない。また, 特に製品への樹脂加工の有無等の表示義務もない。現在, これらの HCHO 樹脂加工された繊維製品に関する実態調査は少なく, 遊離 HCHO の残留量など不明な点が多いのが現状である。

そこで, 著者らは今回, 防しわ・防縮加工の表示のある繊維製品について遊離 HCHO 量を測定し, 製品中の HCHO 残留量を調査したので報告する。

実験方法

1. 試薬 HCHO : 日本薬局方ホルマリン, その他の試薬は市販特級品を用いた。

HCHO 標準溶液 (0.1~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), アセチルアセトン (AA) 試液, ジメドン・エタノール溶液は家庭用品規制法²⁾の「ホルムアルデヒド」(公定法)の項に, また, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 溶液は衛生試験法⁴⁾の空気試験法「アルデヒド類」の項に従って調製した。

2. 試料 平成6年3月に東京都内の小売店より入手

*第30報, 東京衛研年報, 45, 63—66, 1994

**東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

***同理化学部微量分析研究科

した。綿、綿とポリエステルおよびポリエステルとレーヨンの混紡製品で、防しわ・防縮加工の表示のあるワイシャツ35検体、ブラウス7検体、パジャマ6検体、ズボン1検体、ニットシャツ1検体および表示のないワイシャツ1検体、計51検体を対象とした。

3. 装置 自記分光光度計 島津MPS-2000型, ガスクロマトグラフ 島津GC-14A型(ECD付), データ処理装置 島津C-R4AX型

4. 試験溶液の調製 公定法²⁾に従い, 試料の身頃部分(ズボンは裾部分)を細切し, その1~2gを200mlの共栓試験管に精密に秤取し, 水100mlを加え, 40℃の水浴中で時々振り混ぜながら1時間抽出した。次にこの液をガラスろ過器(G2)を用いて温時ろ過し, ろ液を試験溶液①とした。残留物を先の共栓試験管に戻し, 水100mlを加え同様に抽出し, ろ液を試験溶液②とした。残留物を再び試験管に戻し0.1%塩酸(HCl)100mlを加えて同様に抽出し, ろ液を試験溶液③とした。

5. AA法による定量 試験溶液①, ②および③のそれぞれ5.0mlを20mlの共栓試験管にとり, AA試液5.0mlを加えて振り混ぜ, 40℃の水浴中で30分間加温した。30分間室温に放置後, 空試験溶液を対照として415nmにおける吸光度を測定した。試験溶液と同時にHCHO標準溶液(0.1~4μg/ml)各5.0mlを同様に操作し, 得られた吸光度から検量線を作成し, 試験溶液中のHCHOの定量を行った。

6. HCHOの確認 1) ジメドンによる確認 試験溶液5.0mlを20mlの共栓試験管にとり, ジメドン・エタノール溶液1.0mlを加えて振り混ぜ, 40℃の水浴中で10分間加温した。更にAA試液5.0mlを加えて上記AA法に従い操作し, 415nmにおける吸光度を測定し, HCHO標準溶液と同様の吸収がないことを確認した。

2) GCによる確認 衛生試験法のDNPH法⁴⁾に従い, 試験溶液5.0mlをと, DNPH溶液5mlを加えヒドラゾン誘導体を調製し, トルエン5.0mlで抽出した。この液1μlについて次の条件でガスクロマトグラフィ(GC)を行った。

測定条件

カラム: J & W社製 DB-17 (0.53mm i.d. × 15m)

カラム温度: 200℃

キャリアーガス: N₂ 20ml/min.

検出器温度: 280℃

注入口温度: 280℃

実験結果および考察

1. 繊維製品中のHCHOの確認 HCHOの確認は, 試験溶液①の値が40μg/gを超えた製品について, 公定法²⁾に従い, ジメドンを用いて415nmにおける吸収の消失によりAA法の発色がHCHOであることを確認した。更に, 公定法では他のアルデヒドによる定量値の誤差も考えられるため, DNPHによりヒドラゾン誘導体を調製し, GCによって定性試験を行った。クロマトグラムを図1に示した。

各試料のクロマトグラム上にはアセトアルデヒド(CH₃CHO), プロピオンアルデヒド(C₂H₅CHO)およびn-ブチルアルデヒド(C₃H₇CHO)のヒドラゾン誘導体など, HCHOの2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン以外のピークは認められなかった。

2. 繊維製品中の遊離HCHO量 繊維製品51検体について, 公定法の水1回の抽出(試験溶液①)によるHCHO量を測定し, 結果を表1の①に示した。

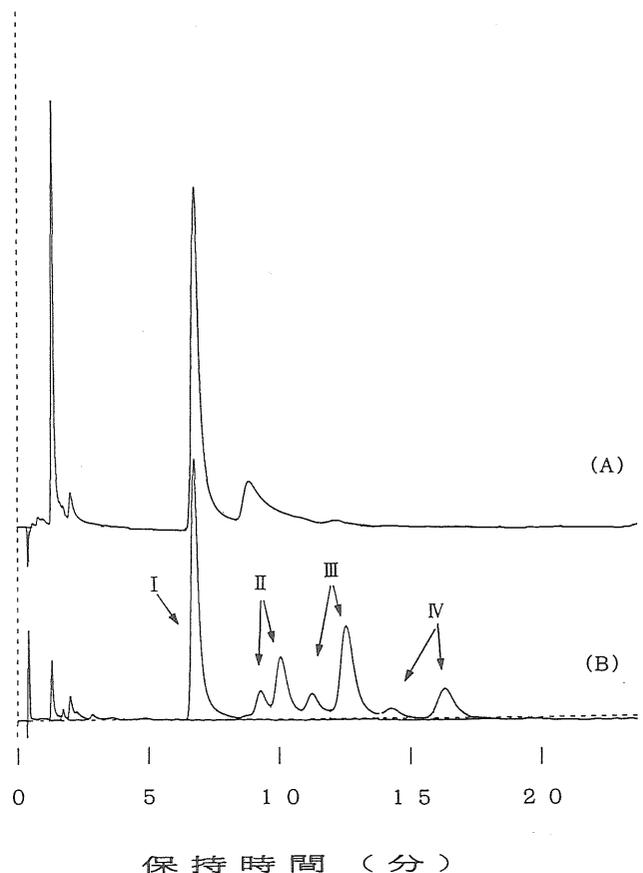


図1. アルデヒド類の2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾンのガスクロマトグラム

(A) 表1の試料No. 1

(B) 標準品 I: HCHO-DNPH

II: CH₃CHO-DNPH

III: C₂H₅CHO-DNPH

IV: C₃H₇CHO-DNPH

表 1. 製品中の遊離 HCHO 量

単位: $\mu\text{g/g}$

加工法*	No	品名	試験溶液** ①	平均 (標準偏差)	試験溶液 ②	平均 (標準偏差)	試験溶液 ③	平均 (標準偏差)	
VP	1	ワイシャツ	263		42		142		
	2		168	150	14	21	53	101	
	3		54	(68)	8	(15)	73	(44)	
	4		115		18		134		
SSP	5	ワイシャツ	97		19		326		
	6		92		17		337		
	7		142		26		333		
	8		126		17		451		
	9	136		21		338			
	10	170	121	28	18	394	323		
	11	ブラウス	240	(51)	19	(6)	177	(86)	
	12		144		14		140		
	13		66		6		356		
	14		95		21		378		
	15		70		12		318		
	16		70		10		326		
D/A	17		ワイシャツ	4	14	1	12	2	3
	18			12	(11)	3	(11)	5	(2)
	19	25			3		3		
その他	20	ワイシャツ	12		3		1		
	21		34		7		86		
	22		94		23		100		
	23		8		2		2		
	24		34		4		15		
	25		3	32	2	6	9	80	
	26		9	(38)	1	(10)	8	(179)	
	27		23		4		55		
	28		14		3		4		
	29		3		1		2		
	30		11		4		4		
	31		13		2		1		
	32		35		5		303		
	33		101		5		109		
	34		27		4		97		
	35		11		2		2		
	36		98		8		99		
	37		2		N.D.***		2		
	38		9		N.D.		N.D.		
	39		8		N.D.		N.D.		
	40		13		3		3		
41	33		4		3				
42	ブラウス	16		3		7			
43		ズボン	149		51		858		
44	ニットシャツ	34		10		221			
家庭用品規制対象品									
VP	45	パジャマ	8		4		105		
SSP	46		7		3		6		
その他	47		10		3		30		
	48		22		3		24		
	49		18		3		20		
	50		9		5		15		
加工表示無し									
	51	ワイシャツ	41		7		27		

* VP: Vapor Phase, SSP: Super Soft Peachface, D/A: Double Action

** ①: 1回目水100ml抽出液, ②: 2回目水100ml抽出液, ③: 3回目0.1% HCl100ml抽出液

*** 不検出 ($< 1 \mu\text{g/g}$)

試験溶液①からは2~263 $\mu\text{g/g}$ の範囲でいずれの製品からも HCHO が検出された。通産省通達の300ppm ($\mu\text{g/g}$) を超えるものはなかったが、家庭用品規制法の下着類の基準75ppm ($\mu\text{g/g}$) を超えるものが数多くみられた。

そこで、VP 加工、SSP 加工、D/A 加工およびそれ以外の加工法と防しわ・防縮表示があっても加工法の表示がないものを「その他」として、ワイシャツやブラウスなど家庭用品規制法による規制対象外の製品について加工法による HCHO 量の違いを比較した。

HCHO が使用されているVP加工(4検体)は54~263 $\mu\text{g/g}$ 、平均150 $\mu\text{g/g}$ 、またHCHO系樹脂を使用しているSSP加工(12検体)では66~240 $\mu\text{g/g}$ 、平均121 $\mu\text{g/g}$ と HCHO 量が高く、これに対して HCHO を使用していない D/A 加工(3検体)では4~25 $\mu\text{g/g}$ 、平均14 $\mu\text{g/g}$ と低濃度であり、HCHO 樹脂等の加工の有無が推察された。

また、加工法の表示の無い「その他」(23検体)では、2~149 $\mu\text{g/g}$ 、平均32 $\mu\text{g/g}$ と低濃度であったが、No.22, 33, 36のワイシャツおよびNo.43のズボンでは75ppmを超える値を示し、HCHO 樹脂等の使用が推察された。

なお、家庭用品規制法による規制対象品であるパジャマは加工法にかかわらず全て規制値以下であった。

3. HCHO樹脂加工の識別 水1回抽出した試料(残留物)について更に、岩間らの塩酸加水分解抽出による簡易樹脂加工識別法⁵⁾に従い HCHO 量を測定し、結果を

表1の②、③に示した。

公定法が水1回の抽出であるのに対して、岩間らの方法は2回の水抽出により製品中に残留する HCHO 量を測定し、さらに0.1% HCl 抽出により樹脂が加水分解されて遊離したと思われる HCHO 量を測定している。従って、2回目の水抽出(試験溶液②)と3回目の0.1% HCl 抽出(試験溶液③)による HCHO 量を比較することによって、1回目(試験溶液①)の HCHO 量が移染によるものか樹脂加工由来かを識別できる方法である。

表1の③に示したように、試験溶液②において試験溶液①の1/5~1/10に減少した HCHO 量が、試験溶液③の0.1% HCl 抽出ではVP加工が53~142 $\mu\text{g/g}$ 、平均101 $\mu\text{g/g}$ 、SSP加工は140~451 $\mu\text{g/g}$ 、平均323 $\mu\text{g/g}$ 、また「その他」の試料のうちNo.21, 22, 32, 33, 34, 36, 43, 44は86~858 $\mu\text{g/g}$ と大幅に増加していた。これは塩酸条件下で樹脂が加水分解されたため HCHO 量が増加したものと考えられ、上述した「その他」の試料を含めて、これらの製品には HCHO 樹脂加工が施されていることが推察された。

4. 水洗によるHCHO残留量の変化 表1より、水抽出による HCHO 量が1回目(①)に比べ2回目(②)で大きく減少することがわかった。そこでVP加工、SSP加工およびD/A加工のワイシャツ各3検体について、水洗(40℃水、1時間抽出)と乾燥(室内、2時間風乾)を繰り返し行うことにより HCHO 量がどの様に変化するか検討した。なお試料は、乾燥後、次の水洗まで移染防止のためポリエチレン袋に入れ、室内に放置した。結果

表2. 水洗による HCHO 残留量の変化

単位: $\mu\text{g/g}$

加工法		水 洗 回 数 (経日数)					
		1(0)	2(0)	3(1)	4(1)	5(8)	6(43)
VP	1	203	21	13	7	8	10
	2	70	9	6	4	5	5
	3	72	10	6	4	5	5
	平均	115	13	8	5	6	7
SSP	1	165	22	15	8	17	27
	2	139	13	11	7	11	19
	3	207	26	19	10	17	28
	平均	170	20	15	8	15	25
D/A	1	12	2	2	2	1	2
	2	35	4	3	2	2	3
	3	34	4	4	2	2	3
	平均	27	3	3	2	2	3

を表2に示した。

各加工法とも1回の水洗により1/5～1/10に減少し、その後も短期間に水洗を重ねると徐々に減少した。しかし、更に1週間(5回目)、5週間(6回目)と経過した後の水洗ではVP加工およびD/A加工のHCHO残留量には変化がみられなかったが、SSP加工では若干増加した。従って、これらの製品は洗濯などの水処理によって製品中のHCHOのほとんどを除去することが可能であることがわかった。しかし、SSP加工に関しては、長期間保管すると加工樹脂由来と思われるHCHOが若干増加する傾向が認められた。

以上の結果、形状記憶加工を施した繊維製品は、加工法によっては遊離HCHO量が高い傾向にあり、下着の基準値を超えることが多いが、1回の水洗によりそのほとんどが除去できることがわかった。

ま と め

形状記憶加工されたワイシャツやブラウス等の残留HCHOを定量した。その結果、2～263 $\mu\text{g/g}$ の範囲でHCHOが検出されたが通産省通達の中衣類の基準(300ppm以下)を超えるものは見られなかった。しかし、家庭用品規制法の下着類の基準(75ppm以下)を超える製

品が51検体中16検体に認められた。また、これらの製品は1回の水洗により残留HCHOが1/5～1/10程度まで減少することが分かった。しかし、ワイシャツやブラウスは下着なしに着用されることもあり、皮膚への接触面積も大きいため、下着類同様に最終製品への一層のHCHO除去対策が期待される。また、HCHOによるアレルギー等の事故を未然に防止するために、製品へのHCHO樹脂加工の有無や加工法の表示を義務づけると共に、消費者に対しては「着用前に水洗する」などの注意を促す表示も必要であると思われる。

引用文献

- 1) 機能材料, 14, No.6, 37-45, 1994.
- 2) 家庭用品規制関係実務便覧, 第一法規出版, 東京.
- 3) 通商産業省繊維雑貨局長通達, 47繊維局第569号 昭和47年7月20日.
- 4) 日本薬学会編 衛生試験法注解, 1404-1406, 1990, 金原出版, 東京.
- 5) 岩間雅彦, 中島重人, 青山大器他: 第22回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集(昭和60年10.8-9), 78-79.

家庭用品の衛生化学的研究 (第32報*)
ガスクロマトグラフィーによる家庭用品中の有機スズ化合物の分析

山野辺 秀夫**, 岸本 清子**, 岩崎 由美子**,
観 照 雄**, 中村 弘**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXII)
Analysis of Organotin Compounds in Household Necessities by Gas Chromatography

HIDEO YAMANOBE**, KIYOKO KISHIMOTO**,
YUMIKO IWASAKI**, TERUO KAN**,
and HIROSHI NAKAMURA**

Keywords : トリブチルスズ化合物 tributyltin compounds, トリフェニルスズ化合物 triphenyltin compounds, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 接着剤 adhesive, 靴クリーム shoe polish

緒 言

靴クリームや接着剤などの家庭用品に防腐、防黴効果を与えるために添加されるトリブチルスズ化合物(TBT)及びトリフェニルスズ化合物(TPT)は、毒性及び皮膚刺激性において問題があり、また動物での経口投与試験で生殖機能障害を示すことや、皮膚から吸収されやすいことが指摘されている^{1,2)}。このため「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により、TBT、TPTの家庭用品への使用及び加工処理がそれぞれ1979年1月及び1980年4月に禁止された。

家庭用品中のTBT、TPTの分析は、公定法³⁾では溶媒抽出後、抽出液を酸分解し、フレイムレス原子吸光法でスズを検出した場合は、改めてTBT、TPTを薄層クロマトグラフ法(TLC)で確認する方法が採用されている。しかし、TLCは感度が低く、また発色した有機スズ化合物の退色が速いため、確認法としては難点がある。

その他、イオン交換樹脂で精製した後、ガスクロマトグラフ(GC)で測定する方法、試料抽出液をアルキル化後、GCで測定する方法等が報告^{4,5)}されているが、これらの方法も操作が煩雑である。そこで、操作が簡便で感度よく有機スズ化合物を分析することができる方法として、試料からメタノール抽出後フロリジルカラムで精製

し、予め臭化水素酸処理したカラムを用い、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ(ECD-GC)で分析する方法について検討したので報告する。

実 験

1. 試薬 TBT、TPT標準溶液：和光純薬工業(株)製、酢酸トリブチルスズ(C₄H₉)₃SnOCOCH₃及び酢酸トリフェニルスズ(C₆H₅)₃SnOCOCH₃(共に家庭用品試験用)を公定法に従って溶解し使用した。臭化水素酸-メタノール溶液：和光純薬工業(株)製、臭化水素酸(比重約1.48, 約47%)を100倍量のメタノールで希釈した。溶媒類は和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を使用した。

2. 装置 島津製作所製GC-9AM型ガスクロマトグラフを使用した。

GCカラムの前処理 2%OV-225/Uniport HP(60~80mesh)をガラスカラム(1.0m×0.32mm i.d.)に充填し、常法に従ってエージング後、カラム温度150℃で臭化水素酸-メタノール溶液を5μlずつ10~20回注入し、250℃まで昇温して3~5時間保持した。

3. 検量線 TBT及びTPTについて、それぞれ0.1~1.0μg/mlで検量線を作成した。

4. 試験溶液の調製 試料1.0gを採りメタノール20ml, 塩酸1mlを加えて5分激しく振とうし、遠心分離後メタノール層を分取した。更にメタノール抽出を1回

*第31報, 東京衛研年報, 46, 81-85, 1995.

**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

行ないメタノール層を合わせた。メタノール層にリン酸・クエン酸緩衝液 (pH2.0) 25ml, H₂O 50ml, ヘキサン 30mlを加え5分振とうしヘキサン層を分取した。更にヘキサン抽出を2回行った後ヘキサン層を合わせ約5mlに濃縮した。内径1cm長さ30cmのカラム管にフロリジル 3.0gをヘキサンに懸濁させて充填し、更に無水硫酸ナトリウム2.0gを積層させたクリーンアップカラムにヘキサン濃縮液をキャピラリーピペットを用いて注入した。続いて、ヘキサン・アセトン(4:1)40ml, 次いでジクロロメタン80mlで洗浄後、ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)50mlで溶出した。溶出画分にn-ノナン0.5ml加え5ml以下に濃縮し、ヘキサンで一定量(通常は5ml)とし試験溶液とした。

5. 定量 試験溶液 3 μ lを表1に示す測定条件に従いGCに注入し、TBT及びTPTのピーク高を求め予め作成した検量線により定量した。

表1. GC測定条件

カラム	3.2mm i.d.×1.0m	ガラス
充填剤	2% Silicone OV-225/Uniport HP(60-80mesh)	
温度	カラム	TBT:150°C TPT:250°C
	ECD	280°C
	注入口	250°C
N ₂ ガス	50ml/min	

結果及び考察

1. クリーンアップ条件の検討 靴クリーム、接着剤は分析を妨害する多種類の有機化合物が含まれているため、抽出液を効率よく精製することが重要である。そこで、フロリジルカラムを用いるクリーンアップ法を検討した。先ず、予備実験としてTBT, TPTのフロリジルへの吸着性を評価するために、フロリジルカラムに標準液(TBT, TPT各々1 μ g/ml)を1ml添加し、ヘキサン, アセトン, ジクロロメタン各50mlを流した。その結果、TBT, TPTともヘキサン, アセトン, ジクロロメタン各50mlでは溶出しなかった。また、これらの溶媒を50mlずつ連続して流した場合も、溶出は認められなかった。従って、TBT, TPTのフロリジルに対する吸着性はかなり強いことが分かった。なお、フロリジルに強固に吸着したTBT, TPTの溶出はヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)30~50mlを使用することによって可能であった。

以上の結果から、ヘキサン, アセトン, ジクロロメタ

ンを洗浄溶媒とし、ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)を溶離液とすることにして次の検討を行った。

有機スズを含んでいない靴クリームにTBT, TPT各1 μ gを添加し、前項の抽出法に従って抽出後、濃縮液をフロリジルカラムに乗せ、ヘキサン, アセトン及びジクロロメタンを流して洗浄し、ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)画分の濃縮液について得られたガスクロマトグラムから、洗浄溶媒のクリーンアップ効果を判断した。ただし、クリーンアップ時間を短縮するため、ヘキサン及びアセトンは混液として使用することにし、混合比は3:1または4:1とした。

図1にヘキサン・アセトン(4:1)80ml流した場合に得られたクロマトグラムを示す。靴クリーム中の妨害物の影響はTBTよりTPTについて大きく現れた。この場合ヘキサン・アセトン(4:1)を80ml流しているにもかかわらず、TPTは妨害ピークに埋没してしまい、これだけではクリーンアップの目的を達成することはできなかった。なお、ヘキサン・アセトン(3:1)の場合もほとんど同様であり、妨害物を完全に除去することはできなかった。そこで、ヘキサン・アセトン(4:1)を40mlに抑え、続いてジクロロメタンを流すこととした。図2にジクロロメタンを流した後のヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)画分の濃縮液のクロマトグラムを示す。図1では妨害物の影響が大きかったが、

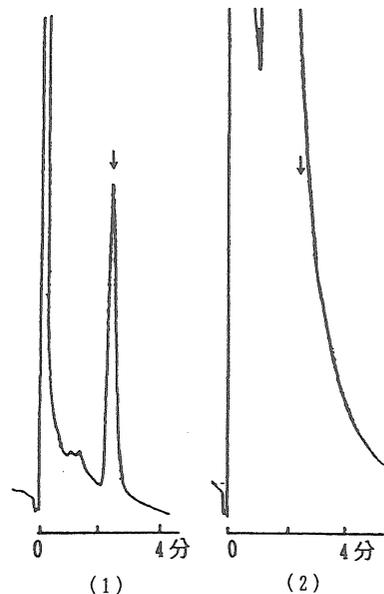


図1. フロリジルクリーンアップ法の検討(1)ヘキサン・アセトン(4:1)80ml洗浄
試料:靴クリーム TPT添加量1 μ g/g
(1)TPT STD (2)靴クリーム

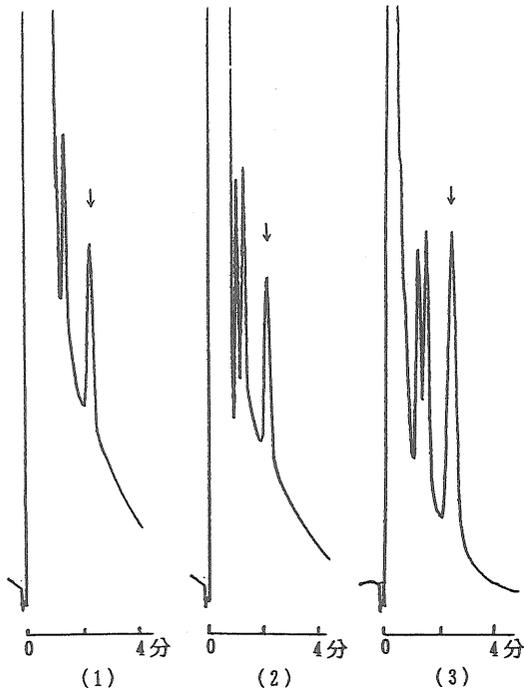


図2. フロリジルクリーンアップ法の検討(2)
 ヘキサン・アセトン (4 : 1) 40ml洗浄後
 ジクロロメタン(1)30ml (2)50ml (3)80mlで洗浄
 試料: 靴クリーム TPT添加量 1 μg/g

ジクロロメタンを80mlまで流すことによってTPTが妨害ピークから分離し、クリーンアップの目的を概ね達成することができた。

以上の結果から、クリーンアップはヘキサン・アセトン(4 : 1)混合溶媒40ml, ジクロロメタン80mlで行うことにした。なお、接着剤について、同様のクリーンアップを適用したところ、TBT, TPTのピークは妨害物ピークから分離することを確認した。

2. 検量線 図3に示すようにTBT及びTPTはいずれも0.1~1.0 μg/mlの範囲で原点を通る良好な直線を示した。

3. 添加回収実験 試料として、靴クリーム及び接着剤各1.0gに標準液(TBT, TPT各々1 μg/ml)1mlを添加し試験法の操作に従って繰り返し3回回収実験を行った。結果を表2に示す。このときのクロマトグラムを図4に示す。TBT及びTPTの回収率は靴クリームの場合がそれぞれ93.2%, 80.4%, 変動係数(C.V.)は4.2%, 3.4%, 接着剤の場合がTBT及びTPTの回収率は104.2%, 81.3%, 変動係数(C.V.)は2.8%, 2.9%であった。

要 約

靴クリームや接着剤等の家庭用品中に含有する有機スズ化合物(TBT, TPT)を簡便に分析する方法を検討

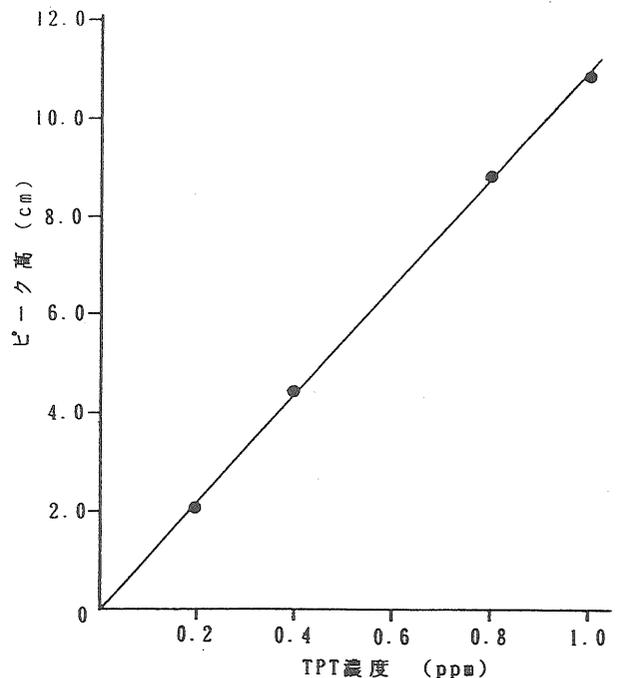
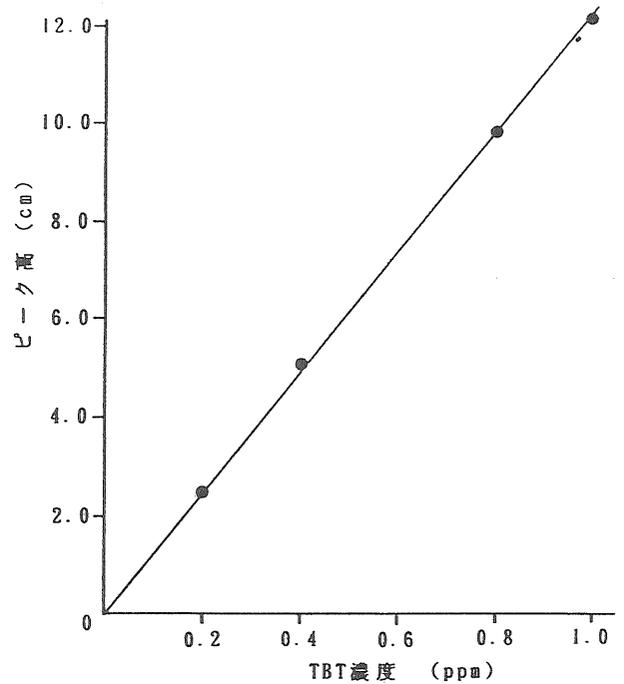


図3. TBTおよびTPT検量線

表2. 添加回収実験結果

試 料	回 収 率 (%)			
	TBT	C.V.	TPT	C.V.
靴クリーム	93.2	4.2	80.4	3.4
接着剤	104.2	2.8	81.3	2.9

試料量1.0g 添加量 TBT 1 μg, TPT 1 μg n=3

した。抽出液をフロリジルカラムを用いヘキサン・アセトン(4 : 1)40ml, ジクロロメタン80mlでクリーン

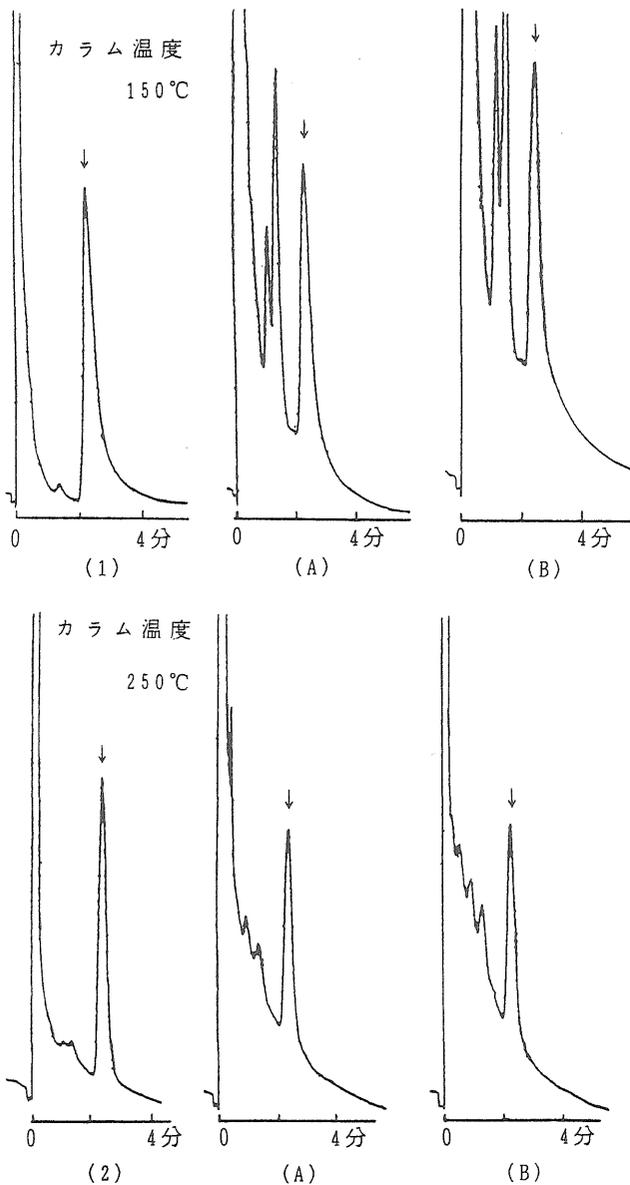


図4. TBTおよびTPTチャート
 (1) TBT STD. (2) TPT STD.
 (A) 靴クリーム (B) 接着剤

アップした後、ヘキサン・ジエチルエーテル・酢酸(75:25:1)50mlで溶出した。溶液にn-ノナン0.5mlを加えて濃縮しヘキサンで5mlにして試験溶液とし、臭化水素酸で前処理したカラムを装着したECD付きGCで測定した。靴クリーム及び接着剤を用いて添加回収実験を行ったところ、TBT及びTPT回収率は靴クリームがそれぞれ平均93.2%、80.4%、接着剤はそれぞれ平均104.2%、81.3%であった。

(本研究の概要は、地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第7回理化学部会1995年2月で発表した。)

文 献

- 1) 谷奥喜平編：単純化学物質と皮膚障害，357，1978，金原出版株式会社，東京。
- 2) 荒木 峻，沼田 眞，和田 攻編：環境化学事典，582，1985，東京化学同人，東京。
- 3) 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。
- 4) 斎藤 譲，福井弥生，細川 守，他：第21回全国衛生化学技術協議会年会講演集，118-119，1984。
- 5) 山田しげり，大曾根圭子，上野清一，他：茨城県衛生研究所年報，31，38-41，1993。

家庭用品の衛生化学的研究 (第33報*)
ガスクロマトグラフィーによる壁紙等防炎加工製品中
Tris (2-chloroethyl) phosphate の定量

観 照 雄**, 岩 崎 由美子**, 山野辺 秀 夫**,
中 村 弘**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIII*)
Determination of Tris (2-chloroethyl) phosphate in Wall Paper
and Flame Retardant Household Products by Gas Chromatography

TERUO KAN**, YUMIKO IWASAKI**, HIDEO YAMANOBE**
and HIROSI NAKAMURA**

Keywords: リン酸トリクロロエチル tris (2-chloroethyl) phosphate, 定量分析 determination, ガスクロマトグラフィー gas chromatography, 炎光光度検出器 flame photometric detector, 防炎加工剤 fire retardant, 壁紙 wall paper, カーテン curtain

緒 言

防炎を目的として加工された繊維製品は「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」¹⁾に基づき有機リン酸化合物である Tris (1-aziridinyl) phosphine oxide (APO), Tris (2,3-dibromopropyl) phosphate (TDBPP) 及び Bis (2,3-dibromopropyl) phosphate (BDBPP) 化合物の3種の防炎剤が現在使用規制されている。

有機リン酸化合物の一種である Tris (2-chloroethyl) phosphate (以下TCEPと略す)は繊維製品の防炎加工剤として使用されるとともに、ポリ塩化ビニル, ポリエステル, ポリウレタンフォーム等の合成樹脂の防炎剤を兼ねた可塑剤としても広く使用されている。

平成6年7月に東京都保谷市の都営住宅内公民館において室内空気からTCEPが高濃度に検出されたことが報道された²⁾。この原因は、塩化ビニルを素材とした壁紙に防炎剤として使われていた TCEP の一部が気化して室内空气中に拡散したためであると思われる。

TCEP の毒性については1990年の IARC (国際癌研究機関) モノグラフではグループ 3 (証拠不十分)³⁾であったが、その後、高田^{4,5)}らによりマウスに対する発癌性が認められたと報告されている。

一般家庭などの室内空気が本物質で高濃度に汚染されることは健康被害を起こす原因になると考えられる。そこで、一般家庭の室内に用いられる防炎加工された家庭用品について TCEP の含有量を調査することは意義あるものとする。

しかし、家庭用品中の TCEP の分析法に関する報告例は少ないので、今回は、ガスクロマトグラフィーによる TCEP の分析法を確立し、その方法を用いて、市販防炎加工製品中の TCEP を分析し、使用実態を調査したので報告する。

実験方法

1. 試料 平成6年8月から12月に防炎加工表示の家庭用品49検体を東京都内小売店より購入し試料とした。用途別では粘着タイプ壁紙17検体, 壁紙兼襖紙4検体, 襖紙3検体, カーテン12検体, バスカーテン7検体, 防災ズキン1検体, 寝具1検体, 寝衣5検体の8種49検体である。

2. 試薬 1) TCEP 標準品: 和光純薬工業製 Tris (2-chloroethyl) phosphate (98%) を用いた。本品についてガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法により TCEP であることを確認した。2) TCEP 標準溶液:

*第32報, 東京衛研年報, 46, 86-89, 1995

**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

TCEP100mgを正確に量り取り、ジクロロメタンに溶かして正確に100mlとした。これを必要に応じてメタノールで希釈し1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 $\mu\text{g/g}$ の標準溶液として用いた。3) フロリジルカートリッジカラム: Waters社SEP-PAK PLUSを用いた。4) その他の試薬: 和光純薬工業製の残留農薬試験用試薬を用いた。

3. 装置: ガスクロマトグラフ島津製作所製GC-14A, データ処理装置島津製作所製クロマトパックC-R5A

4. ガスクロマトグラフ測定条件 カラム: J&W社製フューズドシリカメガボアカラム DB-17 0.53mm i.d. \times 30m膜厚1.0 μm , 温度: 170 $^{\circ}\text{C}$ (6分)-10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -250 $^{\circ}\text{C}$ (16分), キャリヤガス(窒素): 20ml/分, 検出器: 炎光光度検出器(干渉フィルタP), 温度270 $^{\circ}\text{C}$, 水素60ml/分, 空気60ml/分, TCEPは約4分にピークを検出するようにした。

5. 試験溶液の調製 細切した試料の約1.0gを精秤し200mlナス型フラスコに入れ, アセトニトリル75mlを加えて還流冷却器をつけ85 $^{\circ}\text{C}$ の水浴中で1時間還流抽出した。抽出液をG2ガラスフィルターでろ過し, 少量のアセトニトリルでフラスコ及び残留物を洗浄し, 得られたろ液及び洗液を500ml分液ロートに移す。これに2%硫酸ナトリウム液300mlを加えてから, ベンゼン50mlずつで2回繰り返し抽出した。

得られたベンゼン層に硫酸ナトリウムを加えて脱水したのち, 50 $^{\circ}\text{C}$ で減圧濃縮し, 残渣にn-ヘキサン10mlを加えて溶解した。この溶液を, フロリジルカートリッジカラムに通し, n-ヘキサン10mlで洗浄したのち, 10%エタノール-n-ヘキサン40mlを流し, TCEPを溶出する。この抽出液を50 $^{\circ}\text{C}$ で減圧濃縮してから, 10mlのメタノールに溶かし, これを炎光光度検出器付ガスクロマトグラフフィー(FPD-GC)用試験溶液とする。濃度が濃すぎる場合にはメタノールで適宜希釈した。

また, TCEPが検出された試料についてはGC-MS法を用いて確認した。

6. FPD-GC法による定量 FPD-GC用試験溶液1 μl をGCに付しピーク面積を求め, 予め1.0から10.0 $\mu\text{g/g}$ のTCEP標準系列を用いて作成した検量線によって定量を行った。

実験結果及び考察

1. 壁紙等からのTCEP溶出法の検討 TCEPはハロゲンリン酸エステルであるので壁紙等防炎加工製品の高分子材料を防炎化させるために使用される添加剤であると考えられる。そこで, 加工製品からTCEPを溶出するために, 極性溶媒であるアセトニトリル, メタノール

及びエタノールを用いて溶出条件を検討した。TCEPを検出した壁紙(表1の試料No.3)1gを採り, 80 $^{\circ}\text{C}$ の水浴中でこれらの溶媒を用いて1時間, 還流溶出した。それぞれの抽出液のTCEPをFPD-GC法により測定した。アセトニトリル抽出が最も溶出率が高く, これを100%としたとき, メタノールは98%, エタノールは91%であった。次に, アセトニトリル溶出に必要な還流時間を検討した。試料を1時間, 2時間, 3時間還流溶出し, 抽出液中のTCEP濃度を比較したところ, 1時間以上で一定の濃度を示した。そこで, 溶出時間は1時間とした。

2. クリーンアップ法の検討 試料抽出液中にはプラスチック添加剤である帯電防止剤, 防カビ剤, 可塑剤や紫外線吸収剤など, 種々の共存物質が考えられる。また, 防炎加工剤の成分はハロゲン系, リン系, 無機系の三つに分けられ, 現在, わが国で使用されているものは100種類余と推定されている。これらの成分がTCEPの分析への障害にならないかを調べる目的で溶媒抽出法及びカートリッジカラムによるクリーンアップ法を検討した。

はじめに, 溶媒抽出法は剣持等⁶⁾の方法に従った。すなわちTCEP 50 μg を500ml分液ロートに取り, これに2%硫酸ナトリウム液300mlを加えてから, それぞれ次の5種の溶媒で抽出したところ, ベンゼン100%, ヘキサン0%, クロロホルム74.2%, 酢酸エチル96.0%, ジクロロメタン97.1%の抽出率であったのでベンゼンで抽出することとした。

さらに, フロリジルカートリッジカラムを用いるクリーンアップ法を検討した。中島等⁷⁾は防炎加工製品中のTrisbutylphosphateの分析でこのカラムを用いているが, 多種多量に存在する共存物質の除去が可能であった。よつて, 本法でもベンゼン抽出液をヘキサンに転溶後フロリジルカートリッジカラムに付し, ヘキサン10mlで洗浄後, 40mlの10%エタノール-n-ヘキサンでTCEPを溶出することとした。

3. 添加回収率: 壁紙2検体, バスカーテン1検体, カーテン2検体, 襖紙2検体の各細切試料にTCEPの50 μg をそれぞれ添加し, 一夜放置してから, 本操作法に従ってTCEPを分析し回収率を求めた。その結果, 壁紙で89.1%及び91.4%, バスカーテンで88.5%, カーテンで84.7%及び98.3%, 襖紙で90.4%及び92.2%の回収率であり, その範囲は84.7~98.3%であった。

4. TCEPの確認 GC-MS法を用いて行った。試料のトータルイオンクロマトグラム(TIC)におけるTCEPの保持時間及びそのマススペクトルを標準TCEPの保持時間及びマススペクトルと比較して同定した。図1に

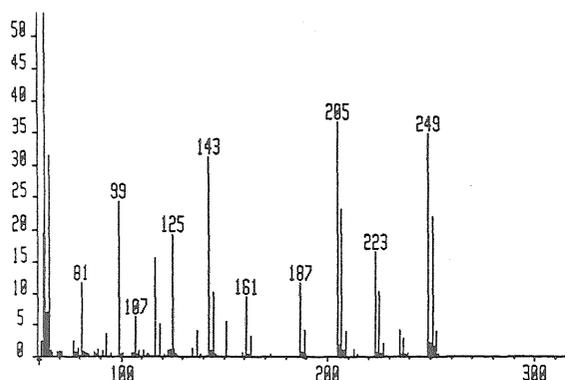


図1. 標準 Tris (2-chloroethyl) phosphate のマススペクトル

ガスマス測定条件 装置; VG-70S カラム; DB-17 (0.32mm × 30m) 温度 60 - 270°C (8°C/分) キャリヤガス; He1ml/分 注入; 1 μl スプリットレスモード マスレンジ; 600-60/1秒 イオン源; 電子衝撃型, 温度280°C

標準 TCEP のマススペクトルを示す。

5. 市販製品の分析結果 本法を防災加工等の表示がある市販製品に適用した。分析結果を表1に、また代表的なクロマトグラムを図2に示した。その結果、粘着タイプ壁紙17検体のうちの1検体から TCEP 33 μg/g を検出した。日本工業規格で制定されている壁紙には防災剤の規定はない。著者らは古い未使用壁紙(約20年前のもの、業務用)を11検体入手し、これらを本法で分析したところ、そのうち10検体から TCEP 260~8,545 μg/g を検出した。これらのことから当時は壁紙の防災剤として TCEP が使用されていたと考えられる。今回の壁紙1検体から検出された TCEP 濃度 33 μg/g はかなり低濃度であることから防災を目的に添加されたものとは考え難い。現在の壁紙には防災剤として TCEP は使用されなくなったものと思われる。なお、今回の壁紙において TCEP 以外の防災加工剤と思われる未確認リン酸化合物が8検体に認められた。そのうち試料No.4の壁紙ではトリフェニルホスフェイト(C₁₈H₁₅O₄P)がGC-MS法で確認された。

壁紙兼襖紙(4検体)、襖紙(3検体)、カーテン(12検体)ではいずれの検体からも TCEP を検出しなかつた。バスカーテンでは7検体中6検体から検出されなかつたが、試料No.37の青色製品からは4,580 μg/g の高濃度の TCEP を検出した。後に、この製品の製造ロットの異なる物入手し分析したところ、やはり4,600 μg/g の TCEP を検出した。いずれも防災のために製品に添加されたものと思われる。しかし一方、同一メーカーの製品である黄色の製品からは TCEP を検出せず、代わりに防災剤として 2-Ethylhexyl diphenyl phosphate

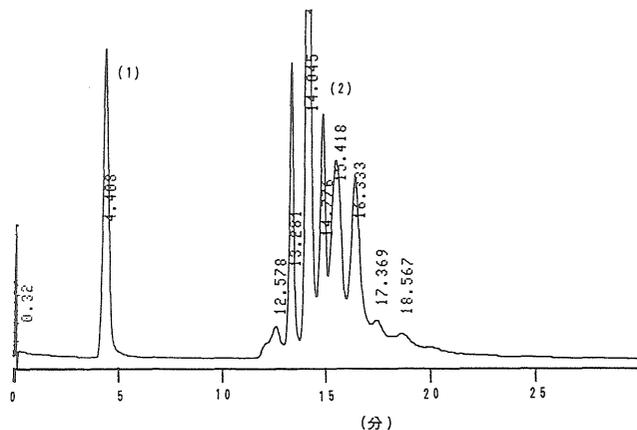


図2. 壁紙(試料No.3)のFPD-ガスクロマトグラム
(1) Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP)
(2) 未知成分

(C₂₀H₂₇O₄P)をGC-MS法で確認することができた。防災ズキン(1検体)、寝具(1検体)及び寝衣(4検体)からはどの製品からも TCEP を検出しなかつた。

まとめ

壁紙等防災加工製品の防災剤の一つである Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) を分析対象にして炎光光度検出器(干渉フィルタ P)-GC法を検討した。その結果、カラムとしてフューズドシリカメガボワカラム DB-17、キャリアガスに窒素を用い、試験溶液の調製にはフロリジルカートリッジカラムを使用した前処理操作が有効であった。TCEP の回収率は84.7%~98.3%であり、精度よく定量することができた。本法は TCEP の簡易かつ迅速な定量法として壁紙等防災加工製品の市販品に十分適用できた。

市販防災加工家庭用品8種49検体を本法で分析したところ壁紙1検体から33 μg/g、バスカーテン1検体から4,580 μg/g を検出したが、その他の47製品からは検出しなかつた。TCEP は現在は防災加工剤として壁紙等への使用が少なくなっているものと思われる。

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) 1994.7.6, 朝日新聞。
- 3) 黒木登志夫, 松島次郎監訳：化学物質のヒトに対する発癌性の評価, 別冊4, 4-19, サイエンスフォーラム, 東京。
- 4) 高田幸一, 安原加寿雄, 中路幸雄他：J. Toxicol Pathol, 2, 213-222, 1989。
- 5) 高田幸一, 吉本浜子, 安原加寿雄他：衛生試験所報告, 109, 18-24, 1991。

表1. 壁紙等防炎加工製品中の Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) の分析結果

品名	色・柄	素材	処理・表示	TCEP ($\mu\text{g/g}$)	
01	壁紙	水玉	塩化ビニル	—	ND
02	壁紙	花柄	—	汚れ防止、防カビ	ND
03	壁紙	白地にピンク模様	—	消臭・防カビ	33
04	壁紙	白地に花柄	—	—	ND
05	壁紙	大理石模様	—	—	ND
06	壁紙	白地に花柄	—	—	ND
07	壁紙	白地に大理石	—	—	ND
08	壁紙	ベージュ色	—	—	ND
09	壁紙	茶色木目	—	—	ND
10	壁紙	白地グレー模様	—	—	ND
11	壁紙	青地に雲の柄	—	—	ND
12	壁紙	白地に風景	塩化ビニル	糊アクリル樹脂	ND
13	壁紙	ベージュ色	塩化ビニル	防カビ	ND
14	壁紙	縦縞模様	塩化ビニル	糊アクリル樹脂	ND
15	壁紙	砂模様	塩化ビニル アクリル酸エステル	—	ND
16	壁紙	茶色レンガ柄	—	—	ND
17	壁紙	白、灰色の柄	—	—	ND
18	壁紙兼襖紙	ベージュ色	塩化ビニル、紙	—	ND
19	壁紙兼襖紙	ベージュ色	塩化ビニル	糊酢酸ビニル	ND
20	壁紙兼襖紙	ベージュ色	—	—	ND
21	壁紙兼襖紙	フローラルピンク	塩化ビニル	糊アクリル樹脂	ND
22	襖紙	白	紙	糊ポリビニールアリコール	ND
23	襖紙	白	紙	糊ポリビニールアリコール	ND
24	襖紙	白	紙	糊ポリビニールアリコール	ND
25	カーテン	黄色	ポリエステル	防炎	ND
26	カーテン	黒色	ポリエステル	防炎・遮光・洗濯	ND
27	カーテン	緑色	ポリエステル	防炎・遮光・洗濯	ND
28	カーテン	褐色	ポリエステル	防炎・遮光	ND
29	カーテン	花柄	綿・アクリル	防炎	ND
30	カーテン	青地に花柄	アクリル	防炎・遮光・洗濯	ND
31	カーテン	茶色の花柄	アクリル	難燃	ND
32	カーテン	緑地に花柄	アクリル・ポリエステル	防炎・遮光	ND
33	カーテン	青と白の縦縞	ポリエステル	防炎・遮光・洗濯	ND
34	カーテン	緑色	—	—	ND
35	カーテン	レース・白色	ポリエステル	防炎	ND
36	カーテン	レース・白色	ポリエステル	防炎	ND
37	バスカーテン	ブルー、ロットA	塩化ビニル	防炎・防カビ処理	4,580
		ブルー、ロットB	塩化ビニル	防炎・防カビ処理	4,600
		ベージュ色	塩化ビニル	防炎・防カビ処理	ND
38	バスカーテン	黄色	—	難燃・防カビ	ND
39	バスカーテン	ベージュ色	—	防炎	ND
40	バスカーテン	ピンク	塩化ビニル	防炎・防カビ	ND
41	バスカーテン	ベージュ色	塩化ビニル	防炎・防カビ	ND
42	バスカーテン	黄色	塩化ビニル	防炎・防カビ	ND
43	バスカーテン	ピンク	ポリエステル	難燃	ND
44	防災ズキン	赤色	—	防炎	ND
45	寝具	ベージュ色	毛	防炎	ND
46	寝衣	紺地に白の花柄	綿	—	ND
47	寝衣	白無地	綿・ポリエステル	防ダニ	ND
48	寝衣	クリーム色無地	綿 (形態安定)	—	ND
49	寝衣	青無地	綿	—	ND

(ND; 2 $\mu\text{g/g}$ 以下)

6) 剣持堅志, 松永和義, 齊藤直巳他: 岡山環境保健センター年報, 6, 142-152, 1982.

7) 中島晴信, 松永一朗, 宮野直子: 第31回全国衛生化学技術協議会年会講演要旨集, 146-147, 1994.

報 文 Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS Ⅲ

PAPERS 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は11編の報告が掲載されている。これらのうち、農産物中の農薬の残留調査、食品の包装材料の鑑別に関するものが各2編づつ、食品の大腸菌群の検査法に関するもの、食品の成分が変化して生成したアミン類に関するもの、人工着色料のHPLCによる分析法に関するもの、化学物質及び自然毒による食中毒事件例、輸入食品の放射能測定結果、有機農産物の栄養成分調査についての各1編である。

わが国の乳製品の大腸菌群検査用固形培地はDesoと規定されているが、欧米諸国ではVRBが採用されている。そこでDeso、VRBを含めた5種10通りの培地を作り、保存菌株、市販アイスクリームを対象にして検討した。大腸菌群の回収率はDesoL、VRB、酵素基質添加CCM培地で80%と高かったが、国内2社のDeso培地では50%程度であった。市販アイスクリームからの大腸菌群測定能はDesoL、CCMで優れていたが、Desoでは集落が小さく、その数も少ない傾向が見られた。

味噌、醤油、納豆、酒類等の発酵食品中の不揮発性アミン7種チラミン、ヒスタミン、フェネチルアミン、プトレシン、カダベリン、スベルミジン、スベルミンの含有量を調査した。味噌、醤油では殆どの試料から7種のアミンが検出され、特にチラミン、ヒスタミン濃度が他のアミンに比べ高かった。納豆ではチラミン、ヒスタミン、フェネチルアミンはほとんど検出されなかったが、引き割り納豆1試料からはチラミン1150 $\mu\text{g/g}$ が検出された。アミン類の含有原因を知る目的で醤油原料、もろみ等を調べたがチラミン、ヒスタミンは検出されず、醸造中に生成したものと考えられた。

食品に使用される多種類の食用タール色素を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により一斉分析することを目的として内部標準物質を用いるグラジエント溶離法を確立した。検出器には可視部検出器及びフォトダイオードアレイ検出器を用いることで38種類の色素が40分以内に確実に分離できた。

平成6年度に発生した化学物質による食中毒等の事例のうち、洗剤の誤食による有症苦情事例3件、魚介類の鮮度劣化にともなって生成するヒスタミンによる食中毒事例1件、有毒キノコのクサウラベニタケ、カキシメジの誤食による食中毒事例2件の計5事例について概要を報告した。

チェルノブイリ原発事故以来、放射能汚染食品の排除のために放射能検査を実施している。平成6年度は334試料を測定したところ、放射能濃度50Bq/kgを超えて検出された試料はピエ・ド・ムトン(カノシタ)、蜂蜜(栗の花)、ホーソンリーフ、ジロル(アンズタケ)で原産国はフランス、イタリア及びチェコスロバキアであった。これらのうち、ピエ・ド・ムトンはわが国の暫定限度値370Bq/kgを超え、830Bq/kgが検出された。

輸入農産物250作物について農薬の残留調査を行った。その結果、有機リン系殺虫剤6種、有機塩素系殺菌剤1種、カーバメイト系殺虫剤2種、除草剤1種、殺菌剤1種が検出された。また、タラゴンからメソミルが登録保留基準の0.5ppmを超える4.5ppmが検出された。しかし、いずれも食品衛生法による残留基準値、各国の残留農薬許容量及びFAO/WHOの定める最大残留許容量は超えていなかった。

平成6年度に都内に入荷した野菜・果実類30検体及び無・減農薬栽培農作物20検体について残留農薬を調査した。都内入荷の30検体からは有機リン系殺虫剤2種、カーバメイト系殺虫剤1種(チオジカルブ)、有機塩素系殺菌剤のプロシミドン、TPNが検出され、チオジカルブとTPNは登録保留基準値を超えていた。一方、無・減農薬栽培農作物からは有機リン系殺虫剤1種、カーバメイト系殺虫剤1種、有機塩素系殺菌剤2種が検出された。

平成5年の冷夏による米の大凶作から、外国産米と国内産米のブレンド米が登場した。ブレンド米をおいしく炊飯するために炊飯改良剤（植物油系、酵素系、デンプン系、カルシウム系、寒天及び木炭）が市販されるようになったのでこれらの品質調査を行った。植物油系製品では食品衛生上問題となる成分は認められなかったが、酵素系製品ではデンプン糖化力の低い製品が見られ、カルシウム系では強アルカリ性の製品があり、またカルシウム、ヒ素含量が自主原料基準に適合しない製品も見つかった。

食品用ゴム製品には食品衛生法に基づき規格が適用されるが、その際、材質の鑑別を行う必要がある。今回、日本ゴム工業会より種類の明らかな天然ゴム、合成ゴム、及び熱可塑性エラストマーの国内製品18種80品目の提供を受けた。そこで、これら製品の熱分解物を赤外吸収スペクトル法で測定したところ、特有のスペクトルパターンを示したので、スペクトルライブラリー及び特性吸収ピークによる系統的鑑別図を完成した。

食品用プラスチックやゴムは材質により規格が異なるため材質鑑別が必要である。特に合成、天然イソプレンゴムとブタジエンゴムは構造が類似しているため、判別が困難である。そこで、熱分解ガスクロマトグラフィー、質量分析法により熱分解物を分離、測定することにより鑑別が可能となった。この方法を用いて市販のゴム製品について調査し、イソプレン、ブタジエン、スチレンの相対組成比を算出したところ、同種の製品においても組成比にばらつきが見られた。

有機農産物はこれまでの慣行栽培農産物に比べて栄養学的に優れていると言われるが客観的なデータはない。そこで同一環境下の有機農法、減農薬栽培法、慣行栽培法で栽培された10種類の野菜を対象に栄養成分含量（水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、食物繊維、ミネラル、ビタミン類、糖度、酸度）を比較したところ、ミネラル、ビタミン等に有意差を示すものがあつたが、一貫した傾向は認められず、結論を得るに至らなかった。

大腸菌群検査用市販寒天培地の菌数測定能の評価

梅 木 富士郎

Evaluation of Colony Counting Ability by Commercial Agar Medium for the Examination of Coliform Group

FUJIO UMEKI

Keywords : 大腸菌群 coliform group, 市販寒天培地 commercial agar medium, 菌数測定能 colony counting ability, 回収率 recovery rate, 損傷菌 injured cell

はじめに

現在、わが国では法的に乳製品の大腸菌群検査に使用する固形培地は、デソキシコレート寒天培地(以下Deso)と規定されている^{1,2)}。一方、欧米諸国ではバイオレットバイル寒天培地(以下V R B)が通常使用されており³⁻⁶⁾、国際的に乳及び乳製品について標準試験法を作成している国際酪農連盟においても、本培地を固形培地の標準培地として採用している⁵⁾。これは、V R Bが製品の加工製造中の加熱や凍結処理により発生する損傷菌の検出に優れているためといわれている⁷⁾。また、最近では大腸菌群を簡易・迅速に検査することを目的に各種の特殊酵素の検出に基ずく培地が開発され市販されている⁸⁾。このような大腸菌群検査用培地の多様化にともない、各培地の特性の把握は食品衛生学的基礎資料を得るために極めて重要な検討課題である。そこで、今回、著者はこれら大腸菌群検査用市販寒天培地を用いて各種大腸菌群の保存菌株を用いた回収実験及び市販アイスクリームからの大腸菌群数測定成績から、各培地の菌数測定能を評価したので報告する。

材料及び方法

1. 供試菌株

実験に使用した大腸菌群は表1. に示した *Escherichia coli* 5株, *Citrobacter freundii* 3株, *Klebsiella aerogenes* 4株, 不規則型Coliforms 2株の計14菌株である。これらの菌株はいずれも当研究室で市販の乳及び乳製品から分離後、半流動寒天高層培地中で冷蔵保存されたものである。

2. 供試培地

大腸菌群数測定に使用した培地はDeso, V R B, デ

ソキシコレート・ラクトース寒天培地(以下Deso L)および酵素基質を添加した培地のフルオロカルトV R B寒天培地(以下F V R B)とクロモカルト・コリフォーム寒天培地(以下C C M)の5種類である。本実験においては製造会社間の差を検討するために、Desoは4社の製品(国産A・B, 外国産C・D), V R B及びDeso Lは外国産各2社の製品を選択し、これらに外国産のF V R BとC C M各1社の製品を加え、計10通りの培地を用いた。これら10通りの培地組成については表2に一覧にして示した。

3. 各種供試菌株の培地別回収率の算定

供試菌株は、中試験管に10mlずつ分注後121℃, 15分間滅菌したトリプトース・ソイブローズ(BBL)に接種し、35℃で24時間の条件で3代継代培養した。この培養菌液を滅菌緩衝生理食塩水(pH7.2)で10倍段階希釈し、10⁶, 10⁷および10⁸希釈の3段階の各希釈菌液1mlをそれぞれ滅菌プラスチックシャーレに分注した。次いで、加温溶解し50℃に保持した10通りの大腸菌群数測定用培地15mlをそれぞれ分注してよく混和して平板に固めた。平板は、同一菌株、培地ごとに5枚ずつ作成し、いずれも35℃で24時間培養した。培養後各平板に発生した集落数を計測して各培地5枚の平均値を求めた。対照として、上記方法にて処理した培養菌液を標準寒天培地(BBL)と混釈し、発育した菌数を測定した。当該培地の回収率は、標準寒天培地により算定された菌数を100%として各大腸菌群数測定用培地により算定された菌数の割合で算出した。

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

表1. 供試菌株

菌株番号	菌名 (IMViCパターン)
E c 1	<i>Escherichia coli</i> (I)
E c 2	<i>Escherichia coli</i> (I)
E c 3	<i>Escherichia coli</i> (I)
E c 4	<i>Escherichia coli</i> (II)
E c 5	<i>Escherichia coli</i> (II)
C f 1	<i>Citrobacter freundii</i> (I)
C f 2	<i>Citrobacter freundii</i> (I)
C f 3	<i>Citrobacter freundii</i> (II)
K a 1	<i>Klebsiella aerogenes</i> (I)
K a 2	<i>Klebsiella aerogenes</i> (II)
K a 3	<i>Klebsiella aerogenes</i> (II)
K a 4	<i>Klebsiella aerogenes</i> (II)
Ir 1	Coliforms (不規則型)
Ir 2	Coliforms (不規則型)

4. 市販アイスクリームからの培地別大腸菌群の検出

過去に当研究室で公定法により大腸菌群が検出され、冷凍保存されていた市販アイスクリーム13検体を対象に、Deso A, B, C 3社及び上記各種供試菌株の培地別検討成績から比較的回収率の良好であった3種類の培地、VRB, Deso L, CCM計6通りの培地を用いて大腸菌群数を測定した。検査に当たって、40℃以下の温湯で15分間以内に溶解したアイスクリーム10gに滅菌生理食塩水90mlを加えて調製したものを試料とし、その1mlを各培地について5枚の滅菌プラスチックシャーレに分注した。各培地の菌数は5枚の平均値として求めた。

成 績

1. 各種大腸菌群の培地別回収率の比較

増菌培地中の大腸菌群の菌数を標準寒天培地により求め、その菌数を100とした時の同時に測定した各種大腸菌群数測定用培地による菌数の割合を当該培地の回収率として表3に比較して示した。10通りの使用培地における各種使用菌株の回収率の平均は、培地の種類によりバ

表2. 供試した大腸菌群数測定用市販培地の組成 (g / 1,000ml)

	デソキシコレート寒天		バイオレットパイル寒天		デソキシコレートラクトース寒天		フルオロカルト	クロモカルト
	A・B	C・D	A	B	A	B	VRB寒天	コリフォーム寒天
ペプトン	10.0	10.0	7.0	7.0(獣肉)	10.0(プロテオス)	5.0(獣肉)	7.0(獣肉)	0.3
カゼイン	—	—	—	—	—	5.0(膀胱消化)	—	—
酵母エキス	—	—	3.0	3.0	—	—	3.0	—
乳糖	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	—
塩化ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
クエン酸ナトリウム	—	1.0	—	—	2.0	2.0	—	—
クエン酸アンモニウム	2.0	—	—	—	—	—	—	—
クエン酸鉄	—	1.0	—	—	—	—	—	—
リン酸1水素カリウム	2.0	2.0	—	—	—	—	—	—
リン酸2水素ナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	2.1
リン酸1水素ナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	2.6
L-トリプトファン	—	—	—	—	—	—	—	1.0
ビルビン酸ナトリウム	—	—	—	—	—	—	—	1.0
ソルビトール	—	—	—	—	—	—	—	1.0
ニュートラルレッド	0.033	0.033	0.03	0.03	0.033	0.033	0.03	—
クリスタルバイオレット	—	—	0.002	0.002	—	—	0.002	—
デソキシコール酸ナトリウム	1.0	1.0	—	—	0.5	0.5	—	—
胆汁酸塩	—	—	1.5(No.3)	1.5(混合物)	—	—	1.5(混合物)	—
ノボピオシン	—	—	—	—	—	—	—	0.005
タルジトール7	—	—	—	—	—	—	—	0.15
酵素基質	—	—	—	—	—	—	0.1(MUG)*	0.2(合成混合物)
寒天	15.0	15.0	15.0	13.0	15.0	15.0	13.0	10.0
pH	7.1~7.2	7.3±0.2	7.4±0.2	7.4±0.1	7.1±0.2	7.1±0.2	7.4±0.1	6.8±0.1

*MUG : 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide

表3. 各種供試菌株の培地別回収率

菌株番号	デソキシコレート寒天				バイオレットパイル寒天		デソキシコレート ラクトース寒天		フルオロカルト	クロモカルト
	A	B	C	D	A	B	A	B	VRB 寒天	コリフォーム寒天
Ec 1	25.4 *	12.4	36.1	15.0	36.1	9.5	74.6	10.1	18.4	38.8
Ec 2	43.4	50.9	37.2	18.0	83.0	14.6	96.2	10.0	61.5	103.8
Ec 3	5.0	6.3	35.5	38.8	32.5	53.8	67.5	6.3	15.0	87.5
Ec 4	81.6	97.9	122.1	66.2	111.6	100.1	122.1	58.5	50.0	118.9
Ec 5	80.5	64.1	85.6	60.3	85.9	67.3	101.9	96.8	64.1	93.6
Cf 1	30.5	25.4	53.9	20.3	91.5	43.5	136.2	55.9	52.0	70.4
Cf 2	63.5	48.5	70.2	50.8	84.7	73.6	89.7	58.4	57.8	92.5
Cf 3	22.4	21.6	65.1	45.1	64.7	72.1	89.7	54.3	50.5	62.9
Ka 1	100.4	104.3	95.8	79.1	113.8	55.2	110.1	97.1	80.2	39.0
Ka 2	47.8	41.7	80.3	56.2	84.5	50.2	89.2	57.8	56.8	92.3
Ka 3	88.8	84.9	101.0	83.8	96.5	91.6	110.5	75.3	81.8	100.0
Ka 4	64.5	63.0	72.3	49.0	92.1	86.6	105.0	66.4	49.0	104.0
Ir 1	60.4	65.0	75.4	69.6	85.0	25.8	103.2	27.6	71.5	101.6
Ir 2	64.2	33.2	67.6	65.0	59.3	19.3	85.6	57.2	19.3	9.6
平均	55.6	51.4	71.3	51.2	80.1	54.5	98.7	52.3	52.0	79.6
標準偏差	26.8	29.4	24.5	21.2	23.4	28.2	17.5	28.2	21.0	30.2

* 各培地について5枚の寒天平板から菌数の平均値を求め、標準寒天培地の菌数を100とした時の割合(%)

ラツキが見られたが、Deso-C, VRB-A, DesoL-A, CCM培地のように70%以上の回収率を示したグループと、約50%の回収率を示したグループに大別された。

供試Deso, VRB, DesoLは表2に示すようにそれぞれ同一組成であったが、製造者間において回収率の差が認められた。すなわち、Desoでは外国産のDeso-Cを除く3種類のDesoの回収率の平均は大差なく、51~56%であったが、Deso-CはDeso-Dと同一組成にもかかわらず回収率の平均は約20%高かった。同様に、VRB-AおよびDesoL-Aは平均80%および98.7%の回収率であったが、他の製品(VRB-BおよびDesoL-B)は国産Desoと同様な回収率であった。一方、酵素基質を添加した培地では、FVRBの回収率はほぼ50%であり、*Escherichia coli* (以下 *E. coli*) の蛍光の発色も全般的に弱かった。また、CCMでは約80%と全般的に高い回収率を示したが、バラツキが大きく、*E. coli* とその他の大腸菌群を鑑別するための集落の着色も明瞭さに欠けるものが観察された。他方、供試菌株別に各培地における回収率をみると、菌株別に回収率の大きなバラツキが観察された。

Ec4, Ec5, Ka1, Ka3は他の菌株よりも全体的に回収率が高く、Ec1, Ec3, Ir2では一般的に集落

も小さく回収率も低い傾向が認められた。

2. 市販アイスクリームにおける培地別大腸菌群数

市販アイスクリーム13検体に対してDeso-A, BおよびC, VRB-A, DesoL-AおよびCCMの6通りの培地を用いて、大腸菌群数を測定した成績を表4に示した。検出率からみると、Deso-C, DesoL-AおよびCCM培地は全て大腸菌群陽性であったが、VRB-Aでは1検体、Deso-Bでは2検体、Deso-Aでは3検体が陰性であった。測定菌数が全般的に高かった培地は、DesoL-A, およびCCMで、次いでVRB-Aであった。これらに対して、Desoでは全般的に発生集落が小さく、その数も少ない傾向が観察された。また、凍結損傷菌の存在を考慮して48時間培養後に再度観察したところ、ほとんどの検体で24時間培養の菌数と差異は認められなかった。

最も大腸菌群集落の鑑別が容易であったのはVRBで、集落の周辺に雲状のリングを形成するために夾雑菌と明らかに識別できた。これに対して、CCMでは大腸菌群以外の夾雑菌の抑制が弱く、本培地の特性である酵素基質による着色も24時間培養では明瞭さに欠ける傾向がみられた。なお、本培地で計測された集落を分離し、菌種の鑑別を行ったところ、*E. coli* は認められずいずれもこ

表4. 冷凍保存市販アイスクリームからの各種培地による大腸菌群の検出菌数

検体番号	デソキシコレート寒天			パイオレット パイル寒天	デソキシコレート ラクトース寒天	クロモカルト コリフォーム寒天
	A	B	C			
1	0	0	2*	0	3	1
2	0	1	17	2	20	5
3	0	1	17	5	20	30
4	4	3	2	8	13	42
5	5	5	7	12	16	32
6	6	5	5	7	7	8
7	7	5	1	63	57	57
8	8	6	15	21	25	28
9	13	36	35	97	66	130
10	21	0	22	86	88	72
11	28	22	23	42	20	6
12	47	29	49	97	79	110
13	130	25	80	290	290	270

* 菌数は5枚の寒天平板の平均値(試料原液1ml当たり)

れ以外の大腸菌群であった。

考 察

わが国では、乳製品の大腸菌群検査に使用する固形培地は公定法でDesoと規定されており¹⁾、その組成は欧米諸国で市販されているものと若干異なっている。一方、欧米諸国では乳及び乳製品検査に通常使用する固形培地はV R Bであり、米国では法的にもこの培地の使用を規定している⁶⁾。さらに最近では酵素基質を添加した大腸菌群検査用固形培地が開発され、乳及び乳製品について国際標準試験法を作成している国際酪農連盟でも、この種の培地の有用性について検討中である⁹⁾。このような背景において、アイスクリームのような凍結損傷菌の存在が予想される乳製品では、的確に大腸菌群の汚染状況を把握し、食品衛生上の基礎資料を得るためには、使用培地の選択は重要な問題であると思われる。そこで、今回、国内外のDeso 4種、外国産のV R BおよびDeso L各2種及び酵素基質添加培地のF V R B, C C Mの計5種類、10通りの培地について大腸菌群測定能を検討した。

今回供試した5種類の培地の組成(表2)は、C C M培地を除いて他の4種はほぼ同様の組成にもかかわらず、保存菌株を用いた回収実験による各培地の発育能を比較すると、平均70%以上の回収率を示した培地群と約50%の回収率の培地群に大別された。前者に該当するものは、Deso-C, V R B-A, Deso L-AおよびC C M培地で、

いずれも外国産であった。後者に属するものとしては、国産のDeso-AおよびBを含む6通りの培地であった。このような使用培地間の差は、同一種類の培地-4社のDesoあるいは2社のV R BおよびDeso-L培地-においても観察された。例えば、Desoでは、国産2社および外国産2社の培地組成はそれぞれ同じであり、培地のpHも同一であったが、外国産1社の製品は平均70%以上の回収率を示したのに対し、国産2社の製品を含む他の3社の製品はそれよりもかなり低い回数率であった。また、高い回収率の認められたV R B-AとDeso L-A培地は同一メーカーのものであり、両培地がDesoより高い回収率を示したのは、V R Bでは、Desoよりもペプトン量は少ないが酵母エキスが添加されていること、Deso Lではデソキシコール酸ナトリウムがDesoの半分であることからでないかと思われる。以上の成績は、製造メーカーの違いにより回収率が大きく異なることを示唆するものであり、食品の微生物に関する精度管理上重要な問題を提起していると考えられる。

乳及び乳製品は、その加工製造、保存に当たって加熱、乾燥、凍結、融解、各種の添加物の添加などの処理を経ている。大腸菌群はこの様な過程を経た場合、物理的あるいは化学的にストレスを受け、非致命的損傷菌として存在する可能性がある。このような損傷菌を的確に測定することが食品衛生管理上必要であり、そのための多くの検討がなされている。Draughon⁷⁾は加熱損傷大腸菌

群について、Reberら¹⁰⁾、Rayら^{11,12)}は凍結損傷大腸菌群の検出法について検討し、V R Bの検出能がすぐれていることを報告している。こうした観点から、今回大腸菌群汚染が確認され、冷凍保存した市販アイスクリームについて、Deso, V R B, Deso LおよびCCM培地を用いて再度大腸菌群数を測定した。大腸菌群検出率においては一部の培地において陰性検体をみた他は差がない結果であったが、V R BおよびDeso LはDesoに比較して全般的に高い菌数を示した。これらの成績は、公定検査は規定に準じてDesoを使用するとしても、日常の衛生管理、特に損傷大腸菌群を考慮にいたした検査では欧米諸外国と同様にV R Bの使用が適切であろうと思われる。

最近、酵素基質を添加した培地が食品中の大腸菌群や *E. coli* を簡易・迅速に検出するのに極めて有効であることが報告されている^{7,13-15)}。今回の調査では、F V R BとCCMの2種類について検討したが、供試菌株の回収率の実験では両者間に大きな差を認めた。また、CCMは外国メーカにより大腸菌群と *E. coli* とを同時に定量する目的で新たに開発された寒天培地である^{16,17)}。その組成は、表2にみられるようにDesoやV R Bとはかなり異なることから大腸菌群の選択及び鑑別機構も他の培地とは大きく異なっている。本培地を用いたアイスクリーム検査においても選択能や鑑別能などの点に一部問題のあることが示されたが、大腸菌群の平均回収率はDesoに比較してかなり優れていた。今後、これらの点を改良することにより、特殊酵素の検出に基づく培地の使用は日常の衛生管理検査において極めて有用であろうことが期待される。

ま と め

5種類、10通りの大腸菌群検査用市販寒天培地の大腸菌群数測定能について保存菌株、市販アイスクリームを対象に調べ、次の成績を得た。

1) 培地の種類及び製造メーカにより供試菌株の回収率にバラツキがみられたが、外国産のDeso L及びV R B、酵素基質を添加したCCMでは平均80%以上、次いで外国産のDesoが70%の高い回収率が認められた。これに対して、わが国で公定法で使用されている国内2社のDesoを含む6通りの培地はいずれも50%程度の回収率であった。

2) 市販アイスクリームからの大腸菌群測定能はDeso L及びCCMが最も優れ、次いでV R Bであり、Desoでは全般的に集落が小さく、その数も少ない傾向がみられた。

文 献

- 1) 厚生省：乳及び乳製品の成分規格に関する省令一部改正について、厚生省令31号，1969。乳及び乳製品の成分規格等に関する省令一部改正について，厚生省令14号，1971。
- 2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，微生物編，79-90，1990，日本食品衛生協会，東京。
- 3) Hartman, P. A., Hartman, P. S., Lanz, W. W. : *Appl. Microbiol.*, **29**, 537-539, 1975.
- 4) Hartman, P. A. : *J. Food Prot.*, **42**, 356-361, 1979.
- 5) 日本国際酪農連盟：IDF Standard (1991改訂版) 303-313. 1991.
- 6) Marshall, R. T. (ed.) : *Standard Methods for the Examination Dairy Product*, 16th ed., 251-252, 1992. American Public Health Association, Washington DC.
- 7) Draughan, F. A., Nelson, P. J. : *J. Food Sci.*, **46**, 1188-1191, 1981.
- 8) 寺本忠司：食品と微生物，**9**, 211-216, 1993.
- 9) 日本国際酪農連盟：第77回国際酪農連盟年次会議報告資料第64号，312, 1994.
- 10) Reber, C. L., Marshall, R. T. : *J. Food Prot.*, **45**, 584-585, 1982.
- 11) Ray, B. : *J. Food Prot.*, **42**, 346-355, 1979.
- 12) Ray, B., Speck, M. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 820-822, 1978.
- 13) 宮崎 健，岩本典子：食品と微生物，**9**, 171-176, 1991.
- 14) Peter, C. S. F., Hartman, P. A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1320-1329, 1982.
- 15) Lloyd, J. M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1383-1387, 1985.
- 16) Kilian, M., Bulow, P. : *Acta Path Microbiol. Scand. B*, **84**, 245-251, 1976.
- 17) Mohamm ed, M., Wolfgang, K. : *Zbl. Hyg.*, **189**, 225-234, 1989.

発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査 (第1報)

井部明広*, 上村 尚*, 田端節子*
早野公美*, 田村行弘**

Contents of Non-Volatile Amines in Fermented Foods (I)

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

Seven non-volatile amines, *i.e.*, tyramine (Tym), histamine (Him), 2-phenethylamine (Phm), putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (Spm) in commercial fermented foods were examined for composition by HPLC using dansyl derivatives. Most soy bean paste and soy sauce samples were found to contain seven non-volatile amines. The concentration of Tym and Him were highest. In red wines, these amines were 30.4 $\mu\text{g Put/g}$ and in chinese wines, 99.6 $\mu\text{g Tym/g}$, the highest concentrations. In most fermented soy beans (natto) samples, Tym, Him and Phm were not present but one sample contained Tym at 1150 $\mu\text{g/g}$, a very high concentration.

The determination of these amines in starting materials and moromi mash of soy sauce was made for clarification of their origins. Tym, Him and Phm were not present in the starting materials of soy sauce, and thus were considered to be produced by microorganism during fermentation, in a manner similar to that for soy bean paste.

Keywords: 不揮発性アミン non-volatile amine, ヒスタミン histamine, チラミン tyramine, フェネチルアミン 2-phenethylamine, 醤油 soy sauce, 味噌 soy bean paste, 紹興酒 chinese wine, 納豆 fermented soy beans

緒 言

不揮発性アミン類(以下アミン類と略す)はヒスタミンなどによるアレルギー様食中毒として食品衛生上しばしば問題となってきた。食品中に含まれるアミン類は腐敗によるばかりではなく、発酵食品では製造過程での発酵により微生物によっても産生される。

アミン類の中でも特にヒスタミン(Him)、チラミン(Tym)等はイソニアジドやモノアミンオキシダーゼ阻害薬(MAOI)等ある種の薬品を服用している患者、あるいは感受性の高い人に対して強い影響を及ぼす。Tymを含むチーズ、キャビア等の食品を喫食したことにより頭痛、高血圧、心悸亢進など重篤な症状に陥ったことも報告されている¹⁻⁴⁾。Himの毒性は、Him単独よりも腐敗した食品等を摂取した時の方が強いといわれている。こ

れは共存するプトレシン(Put)等他のアミン類の影響とされ、アミン単独の毒性ばかりでなくアミン類相互による毒性の相加相乗作用の関連も懸念されている⁴⁾。

このようにアミン類の毒性が知られ、特定の患者に対してはアミン類を含有する食事に対して注意が喚起されているにもかかわらず、いままでチーズ中のTym、Himを除いては報告が少ない。著者らはこれまでワイン、味噌、醤油中のアミン類含有量を調査し、また味噌で成因について究明し報告した⁵⁻⁸⁾。本報では最近市販の赤ワイン、味噌、醤油及び中国酒についてTym、Him、Put、フェネチルアミン(Phm)、カダベリン(Cad)、スベルミジン(Spd)及びスベルミン(Spm)の7種のアミン類の含有量調査を行い、前報^{5,6)}のデータと比較すると共に、新たに納豆についても調査を行ったので報告する。また、

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

*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

**東京都立衛生研究所多摩支所

醤油中のアミン類の含有原因を知る目的で都内の醤油製造所において製造工程ごとに試料を採取し調査したのでその結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試料 平成6年東京都内で市販されていたフランス産赤ワイン19検体, その他赤ワイン9検体, 米味噌27社27検体その他の味噌7社7検体, 濃口醤油20社22検体, 平成7年2月に市販されていた納豆10社10検体, 平成2年から7年までに市販されていた中国酒(紹興酒44検体, 蒸留酒8検体), ウィスキー, ブランデー49検体並びに都内の醤油製造業A社及びB社において採取した製造工程中のもろみ, 原料及び製品を用いた。

2. 試薬 前報⁵⁾に従った。

3. 試験溶液の調製及びダンシル誘導体化

1) 納豆: 試料10gに10%トリクロロ酢酸溶液10ml, 水20mlを加えホモジナイズ後, 水で100mlとし, よく混和後ろ過, ろ液を試験溶液とし以下前報⁵⁾に従って操作した。

2) 納豆を除く試料: 前報⁵⁾に従った。

4. 高速液体クロマトグラフィーの測定条件

カラム: COSMOSIL 5C₁₈-MS 4.6φ×150mm(ナカライテスク社製)

移動相: CH₃CN・H₂O=50:50→80:20/65分

流速: 0.7ml/min

測定波長: Ex.325nm, Em.525nm

5. GC-MSによる確認 前報⁵⁾に従った。

6. TLCによる確認 衛生試験法⁹⁾に従った。

結果と考察

1. 納豆中のアミン類分析法の検討

味噌, 醤油及びアルコール飲料中のアミン類の分析については既に添加回収の検討を行い報告し, ほとんどのアミンで90%以上の回収率を得ている。納豆については初めて分析するため回収率の検討を行った。アミン含有量の少ない納豆にHim25, 50μg/g, Tym12.5, 25μg

Table 1. Recoveries of Non-Volatile Amines added to Natto (Fermented soybeans)

	n=3						
	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Added(μg/g)	12.5	25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Recovery(%)	101	96.2	96.0	96.8	98.2	91.9	94.0
Added(μg/g)	25	50	5	5	5	5	5
Recovery(%)	96.8	97.8	98.0	91.4	98.6	96.5	94.0

Tym: tyramine, Him: histamine, Phm: 2-phenethylamine, Put: putrescine, Cad: cadaverine, Spd: spermidine, Spm: spermine

/g, その他2.5, 5.0μg/gとなるように添加し回収実験を行った結果をTable 1に示した。いずれの濃度においても, 91.4から101%と良好な結果が得られた。ただし, 納豆の場合は前報の塩酸溶液による抽出でも回収率に相違がないものの, カラムクロマトグラフィーの際にカラムの目詰まりを起こすことがあるため, トリクロロ酢酸溶液を用い抽出することとした。

2. 市販品の実態調査

1) 味噌

市販の米味噌について, 各アミン類含有量を調査した結果をTable 2に示した。

特に需要の多い米味噌を中心に27試料について調査を行ったが, 前報同様, 検出されたものの平均値はTym及びHimが他のアミンに比べ高く, 検出率も同様に他のアミンに比べTymが92.6%と高く, Himは11.1%と低い傾向を示した。その他のアミン類も前報と比較し同様あるいは近い含有量, 検出率を示し, Put, Cad, Spdは検出率が100%と高く, Phm, Spmは29.6%, 59.3%と比較的低い傾向がみられた。Tym, Himの含有量はTymが前報の平均値194μg/gに対し68.8μg/g, Himで177μg/gに対し102μg/gとより低い値を示した。

Table 2. Contents of Non-Volatile Amines in Miso (soy bean paste)

	(μg/g)						
	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Range	ND-926	ND-262	ND-65.1	14.5-40.5	1.2-2.9	3.1-20.5	ND-3.2
Average of positive	68.8	102	11.0	27.7	2.0	10.2	1.8
Ratio of positive (%)	92.6	11.1	29.6	100	100	100	59.3
ND <	5	20	2	1	1	1	1

ND: Not detected. n=27 samples

しかし、Tymで最高926 $\mu\text{g/g}$ を示すものがあることから、必ずしも減少傾向にあるわけではなく、含有範囲としては変化はみられなかった。

著者ら^{5,7)}は味噌中のTym, Him及びPhmは発酵中の微生物に起因し、Put, Cad, Spd, Spmは原料由来と推察したが、今回の調査でもこれら4者のアミンは検出率も高く、またTym, Him, Phmにおいては、Tymは検出率、含有量とも高く、Himは検出率は低い含有量は高く、また、Phmは検出率、含有量ともに低いという傾向に変わりはなかった。

その他の味噌として白味噌1検体、麦味噌2検体、豆味噌2検体を調査したが、いずれも前報同様米味噌の場合と同じ傾向を示した。

味噌におけるアミン産生菌として、著者ら⁷⁾はTym産生菌では *Enterococcus faecium*, Him産生菌では *Lactobacillus* 属の2種の乳酸菌を分離した。味噌からしばしば検出される *E. faecalis*¹⁰⁾もTymを産生することが知られているので、味噌熟成中これらの菌が他の微生物と共存しながら、塩分濃度やpHの条件のよい熟成初期の短期間のうちに生育し、それぞれがTymあるいはHimを産生すると考えられる。その際Tymは生成されやすく、Himは生成しにくいことを考察したが⁸⁾、今回の結果もこれを示唆した。

2) 醤油

市販の濃口醤油について、各アミン類の含有量を調査した結果をTable 3に示した。醤油の場合も全てのアミンにおいて前報同様の検出率、含有量を示した。味噌同様にTym及びHimの含有量が他のアミンに比べ高く、それぞれ平均値484, 203 $\mu\text{g/g}$ であり、検出率も高くほとんどすべてから検出された。他のアミンについても含有量、検出率とも味噌と比べより高い傾向を示した。

醤油の場合も味噌とほぼ同じ原料を使っていることから、検出されたTym, Him, Phmは味噌と同様、発酵中に生成したものと考えられる。これら3者の検出率は

いずれも高く、ほとんど全てから検出されたことは味噌よりも醤油の方がアミン産生菌が多く存在しているか、醤油の場合液状であることから菌が繁殖しやすい条件にあると考えられる。また、塩分濃度は味噌よりも高いことから、味噌の場合とは異なる菌が働いていることも考えられた。

3) 赤ワイン

市販のフランス産赤ワイン19検体及びアメリカ、スペイン、日本の3ヶ国産9検体について含有量の調査を行った結果をTable 4に示した。産地にかかわらずすべての試料から検出されたアミンはPutのみであり、含有量も平均値14.3, 15.2 $\mu\text{g/g}$ であった。最高値もPutで56.0 $\mu\text{g/g}$ を示し、ついでHim, Tymの順であった。Tym, Himの平均含有量はその他のアミンの1.0 $\mu\text{g/g}$ 以下と比べ高かった。フランス産と3ヶ国産の含有量とを比べると、Tym, Himがフランス産で若干高い値を示した以外はほぼ同じ含有傾向がみられ、国による差は認められなかった。また、前報⁶⁾と比べても含有量、検出率に大きな差はなかった。

4) 紹興酒

中国酒のうち紹興酒のアミン含有量をTable 5に示した。44検体中ほとんど全てからTym, Putが検出され、他のアミンに比べ高い検出率、含有量を示し、平均含有量はそれぞれ38.0, 17.7 $\mu\text{g/g}$ であった。Himは検出率では約30%と低いものの平均含有量は9.2 $\mu\text{g/g}$ とTym, Putについて高い値を示した。この値は赤ワインと比べてもTymを除いては大きな差はみられなかったが、Tymについては紹興酒が平均値で約8倍、最大値でも約9倍も高く含有していた。紹興酒は原料にうるち米、小麦を主に薬草などが用いられることから、薬草中のTymの有無は不明であるが、原料から由来するとは考えにくく、醸造中微生物により生成されたものと思われる。また麴を作るかびも数種あり、日本酒などの製造と比べて微生物の管理方法が異なり、アミンを産生する菌

Table 3. Contents of Non-Volatile Amines in Shoyu (soy sauce)

	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Range	42-1320	ND-544	4.0-164	9.1-236	ND-10.2	3.5-23.3	ND-3.7
Average of positive	484	203	36.6	53.6	3.4	12.6	1.9
Ratio of positive (%)	100	95.5	100	100	77.3	100	81.8
ND <	5	20	2	1	1	1	1

ND: Not detected. n=22 samples

Table 4. Contents of Non-Volatile Amines in Red Wines

		($\mu\text{g/g}$)						
		Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Range	A	ND-11.6	ND-11.1	ND-6.6	2.1-30.4	ND-0.7	ND-2.0	ND-0.3
	B	ND-7.1	ND-3.6	ND-2.3	0.5-56.0	ND-0.6	ND-1.6	ND
Average of positive	A	4.5	5.1	1.0	14.3	0.4	0.9	0.2
	B	2.5	3.0	0.9	15.2	0.4	0.7	ND
Ratio of positive (%)	A	84.2	78.9	89.5	100	57.9	84.2	31.6
	B	66.7	55.6	55.6	100	88.9	77.8	0
ND <		0.5	1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

ND : Not detected. A : Produce of France, 19 samples. B : Produce of USA, Spain and Japan, 9 samples.

Table 5. Contents of Non-Volatile Amines in Shao Xing Wine (Chinese Wines)

		($\mu\text{g/g}$)						
		Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Range		ND-99.6	ND-28.0	ND-7.2	1.8-48.7	ND-17.1	ND-3.0	ND-0.4
Average of positive		38.0	9.2	2.5	17.7	4.1	0.7	0.2
Ratio of positive (%)		97.7	29.5	56.8	100	95.5	81.8	22.7
ND <		0.5	1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

ND : Not detected. n=44 samples

Table 6. A Comparison of Whole and Ground Soybeans for Contents of Amines in Natto (Fermented Soybeans)

		($\mu\text{g/g}$)						
		Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Whole (9 sample)								
Range		ND-8.4	ND	ND	3.3-8.9	2.6-5.6	39.2-67.7	5.9-11.3
Average of positive		7.4	ND	ND	5.0	3.9	52.1	9.0
Ratio of positive (%)		44.4	0	0	100	100	100	100
Ground								
1 sample		1150	ND	18.1	23.9	ND	54.9	7.0

Whole : normal natto, Ground : hikiwari natto

の混入も考えられた。

5) 納豆

丸大豆納豆 9 検体, ひきわり納豆 1 検体についてのアミン含有量を Table 6 に示した。丸大豆納豆(通常の納豆)では Put, Cad, Spd, Spm がすべてから検出され, 含有量も Spd が最も高く平均で $52.1 \mu\text{g/g}$ であり, Him, Phm は全く検出されなかった。Tym は 9 検体中 4 検体から検出され, 検出されたものの平均値は 7.4

$\mu\text{g/g}$ であった。納豆の原料は大豆のみであり, 大豆のこれらアミン含有量から考え Put, Cad, Spd, Spm は原料由来であり, Tym は発酵中に生成したものと考えられた。

一方, ひきわり納豆では一試料のみの結果であるが, Him, Cad は検出されず, Spd, Spm は丸大豆と差がなかった。一方 Put は丸大豆より高く, さらに Tym, Phm が検出されたことから, これらのアミンは製造中

に生成されたことが推察された。同じ製造所の丸大豆納豆との比較も出来ないことから、Tym, Phm がいかんして生成され、Put が増加し Cad が消費されたかの理由は不明であるが、考えられることとしては、用いた納豆菌の種類が違うこと、ひき割りの状態つまり形態により発酵の速度が違うこと等が挙げられる。いずれにしても通常の丸大豆納豆においてもわずかながら Tym が検出されたことから、何らかの要因により大量の Tym が生成されることも考えられるので今後も調査検討が必要である。

6) 蒸留酒

中国酒、ブランデー、スコッチ及びバーボンウィスキー等洋酒はいづれからもアミン類は検出されなかった。ただし、蒸留酒における検出限界は Him $5 \mu\text{g/g}$, Tym $1 \mu\text{g/g}$, Phm $0.5 \mu\text{g/g}$, Put, Cad, Spd, Spm $0.2 \mu\text{g/g}$ であった。これらの酒は蒸留工程を経るため、例え発酵中にアミン類が存在したとしても不揮発性であるアミン類は除かれたものと思われる。さらに蒸留後の熟成中においてもアミン類の混入がなかったことがわかった。

以上市販各種発酵食品からアミン類が検出されることを明らかにしたが、アミン類摂取による人体への影響が憂慮される。平成4年における食品の摂取量は国民一人1日当り全国平均で味噌 14.9g , 醤油 21.0g , ワイン等洋酒 6.8g 及び納豆等大豆製品 6.8g となっている¹¹⁾。

毒性のよく知られている Tym, Him について、仮に 1000ppm の Tym, 500ppm の Him を含む醤油を摂取したとすると1日に Tym 21mg , Him 10.5mg 摂取することになる。酒類は飲酒量に個人差があるものの味噌、醤油等と比べてアミン含有量は低いが一度に摂取する量は味噌、醤油よりも多いと考えられる。Tym, Him それぞれ 10ppm を含む赤ワインを仮に1本 750ml を飲んだとすると、 7.5mg 摂取することになる。また、Tym 1000ppm を含む納豆を 50g 食べたとすると、 50mg 摂取することになる。これらの量は健康な人ではそれほど問題にならないが、Tym は MAOI 服用患者には 6mg で発症に十分である²⁾。Him の毒性は 70mg 以上といわれ²⁾、その毒性を高めると考えられている⁴⁾ Put 等その他のアミン類も存在することから、なんらかの影響があることも考えられる。

3. 製造所における調査

淡口醤油製造業 A 社並びに濃口醤油製造業 B 社における製品、原料及びもろみ中のアミン含有量を Table 7 に示した。

A 社では製品、原料の大豆、麦麴、もろみからは Tym, Him は全く検出されなかった。しかし原料にはない Phm が仕込後50日目、1年目のもろみ及び製品から検出されたことから、Phm が製造中に生成したと思われる。A 社では、製品は3ヶ月間仕込んだもろみを絞り、さらに1年以上のもろみを絞ったものを加え味を整えて

Table 7. Contents of Non-Volatile Amines in Products, Starting Materials and Moromi mash of Soy sauce

	($\mu\text{g/g}$)						
	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
A manufacturer							
Soy sauce Product * ¹	ND	ND	1.4	6.9	1.1	14.1	2.3
Soy beanes (uncooked)	ND	ND	ND	5.8	ND	57.1	8.9
Malts (mugi-koji)	ND	ND	ND	29.6	ND	28.0	4.3
Moromi mash (50 days) * ²	ND	ND	4.6	13.8	ND	10.0	2.2
Moromi mash (1 years)	ND	ND	6.3	14.6	0.4	8.7	3.1
B manufacturer							
Soy sauce Product 1 * ³	129	66	15.4	9.1	1.9	11.8	1.3
" 2	103	60	15.5	27.1	2.2	9.2	1.9
" 3	42	37	20.7	26.0	ND	7.9	1.5
Kiage (soy sauce)	569	355	30.5	29.5	ND	21.5	2.3
Moromi mash (2 month)	192	74	27.8	12.3	2.1	19.3	3.0

* 1: usukuchi-shoyu, * 2: fermented for 50days, * 3: koikuchi-shoyu

Table 8. Contents of Non-Volatile Amines in Moromi mash during Fermentation

	($\mu\text{g/g}$)						
	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Moromi mash (for 2 month)	192	74	27.8	12.3	2.1	19.3	3.0
Moromi mash (for 4 month)	164	48	25.0	12.0	2.2	18.1	2.9
Moromi mash (for 11 month)	153	58	25.1	12.0	2.1	20.4	2.7

at B manufacturing industry

製品とする。前報⁵⁾の調査では、淡口醤油の Tym, Him は濃口醤油と同様の検出率, 含有量であった。A社の試料から Tym, Him が検出されないのはこれらアミン類を産生する菌がもろみ中に存在しないためと考える。

B社では原料以外の製品および中間製品である発酵途中のもろみからも Tym, Him が検出された。仕込み後2ヶ月のもろみからも製品と同様に検出されたことから短期間に産生されることも考えられた。しかし, B社ではもろみを仕込む際に麦麴に塩水と更に, きあげ(生揚)醤油(絞り立てのまま調製していない醤油)を同時に加えている。ここで用いる生揚醤油には既に Tym, Him がそれぞれ355, 569 $\mu\text{g/g}$ 含有していることから, Tym, Him は醸造中生成されたのではなく, 生揚醤油に由来したと考えられた。さらに熟成中の本もろみの発酵過程におけるアミン類の経時変化を知る目的で4ヶ月間, 11ヶ月間発酵後サンプリングし含有量を Table 8 に示した。すべてのアミンともほとんど増加の傾向はなく, むしろ Tym, Him では減少する傾向がみられた。このことにより仕込み時の生揚醤油中のアミン含有量が製品のアミン含有量に大きく影響していることがわかったが, 醸造によりアミン類が生成するか否かの知見は得られなかった。今後生揚醤油を加えない, 塩水だけでもろみを生揚醤油を仕込む一般の方法で醤油を製造し, アミン類生成の有無を検討する必要があると考える。

まとめ

味噌, 醤油及びワイン中のアミン含有量を調査し, 過去のデータと比較したところ, 含有量及び検出率に特に差は認められなかった。

今回初めて紹興酒, 納豆中のアミン含有量を明らかにした。紹興酒では Tym, Him が含まれることが判明した。特に Tym の検出率, 含有量は高くほとんどの試料から検出され平均含有量は38.0 $\mu\text{g/g}$ であった。

納豆では約半数から Tym が平均値で7.4 $\mu\text{g/g}$ 検出されたが Him は検出されなかった。またひきわり納豆

から1150 $\mu\text{g/g}$ という高濃度の Tym が検出された。

ウイスキー等蒸留酒からは全くアミン類は検出されなかった。

都内の醤油製造業2社において製品, 製造工程中のもろみ及び原料について調査したところ, 1社ではすべての試料において Tym, Him は検出されなかった。もう1社では原料を除くすべての試料から Tym, Him が検出されたが, 仕込みに使われた生揚醤油が原因と考えられ, 醤油醸造中のアミン類の生成は不明であった。

本調査は平成6年度先行調査として東京都衛生局食品環境指導センターと協力して実施した。

文 献

- 1) Rice, S. L., Eitenmiller, R. R., & Koehler, P. E. : *J. Milk Food Technol.*, **39**, 353-358 (1976).
- 2) Edwards, S. T. & Sandine, W. E. : *J. Dairy Sci.*, **64**, 2431-2438 (1981).
- 3) Wright, S. P. : *Lancet*, 284-285 (1978).
- 4) Stratton, J. E., Hutkins, R. W., & Taylor, S. L. : *J. Food Prot.*, **54**, 460-470 (1991).
- 5) 井部明広, 田村行弘, 上村 尚, 他 : 衛生化学, **37**, 379-386 (1991).
- 6) A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, et al. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 695-698 (1991).
- 7) A. Ibe, T. Nishima & N. Kasai. : *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 181-187 (1992).
- 8) A. Ibe, T. Nishima & N. Kasai. : *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 403-409 (1992).
- 9) 日本薬学会編 : 衛生試験法・注解, 289-291, 1990, 金原出版, 東京.
- 10) 農林省食糧研究所編 : 発酵食品の微生物管理技術, 23, 1967, 農林省食糧研究所, 東京.
- 11) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修 : 国民栄養の現状, 66-67, 平成6年版, 第一出版, 東京.

高速液体クロマトグラフィーによる食用タール色素の一斉分析

中 沢 久美子*, 嶋 村 保 洋*, 中 島 和 雄*
菊 地 洋 子*, 中 込 圭 介*, 田 村 行 弘**

Determination of Food Coal-Tar Dyes by High Performance Liquid Chromatography

KUMIKO NAKAZAWA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, KAZUO NAKAJIMA*
YOKO KIKUCHI*, KEISUKE NAKAGOME* and YUKIHIRO TAMURA**

Keywords : 食用タール色素 food coal-tar dyes, 着色料 color additives, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography, フォトダイオードアレイ検出器 photodiodearray detector

緒 言

わが国では12種類の食用タール色素が許可されているが、諸外国ではそれ以外の色素も許可されている等許可状況が異なることから、他の食品添加物と比較して着色料に関する違反事例が多くみられる。そのため、着色料は許可外色素も含めて多種類の色素を検査する必要がある、検査の能率化のため一斉分析する手法の開発が求められている。

食用タール色素の分析には従来からペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーが用いられているが、Rf. 値や色調が似ている色素が複数あるため同定の困難なこともある。そこで高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が用いられ定性及び定量分析に応用されている¹⁻⁷⁾が、許可外色素への応用例は少ない。

HPLCによる多種類の食用タール色素の分析では、グラジエント溶離法がすでに報告されているが、色素のピークの保持時間及び定量値の再現性が良くないという難点が見られる。

著者らは、許可色素12種類及び入手することができた26種類の不許可食用タール色素を一斉分析するにはHPLCのグラジエント溶離法が最も適していると考え、再現性の良い分析法を確立するため内部標準法を検討すると共に、多種類の色素を同時分析するため紫外部検出

器-フォトダイオードアレイ(PDA)検出器を用いる方法を、さらに妨害物質の影響を除くため可視部検出器を用いる方法を検討したのでその結果を報告する。

実験方法

1. 試料

都内で市販されていた無果汁及び10%果汁含有清涼飲料水8検体を用いた。

2. 試薬

許可色素：食用赤色2号(R2, C.I.16185), 同3号(R3, C.I.45430), 同102号(R102, C.I.16255), 同104号(R104, C.I.45410), 同105号(R105, C.I.45440), 同106号(R106, C.I.45100), 食用黄色4号(Y4, C.I.19140), 同5号(Y5, C.I.15985), 食用緑色3号(G3, C.I.42053), 食用青色1号(B1, C.I.42090)及び同2号(B2, C.I.73015)は国立衛生試験所標準品を、食用赤色40号(R40, C.I.16035)は東京化成社製品を用いた。

不許可色素：ポンソー3R(PO-3R, C.I.16155), ポンソーSX(PO-SX, C.I.14700), エオシン(EOS, C.I.45380), ナフトールイエローS(NA-S, C.I.10316), オレンジI(O-I, C.I.14600)及びオレンジII(O-II, C.I.15510)は国立衛生試験所標準品を、アゾルビン(AZR, C.I.14720), ポンソーR(PO-R, C.I.16150), ポンソー6R(PO-6R, C.I.16290), レッド2G(R2G,

*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

**東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市紫崎町3-16-25

**Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa Tokyo, 190 Japan

C.I.18050), レッド6B(R6B, C.I.18055), クリソインS(CH-S, C.I.14270), キノリンイエロー(QY, C.I.47005), キシレンイエロー(XY, C.I.18965), クロセインオレンジ(CR-O, C.I.15970), オレンジG(OG, C.I.16230), グリーンS(GS, C.I.44090), アズールブルーVX(AZB-VX, C.I.42045), パテントブルーV(PAB-V, C.I.42051)及びブラックPN(BPN, C.I.28440)はシグマ社製品を, スカーレットGN(SC-GN, C.I.14815), オレンジGGN(O-GGN, C.I.15980)及びベンジルバイオレット4B(BV-4B, C.I.42640)はクロマ社製品を, ファーストレッドE(FRE, C.I.16045), レッドFB(RFB, C.I.14780)及びブリリアントミリンググリーン(BMG, C.I.42100)は東京化成社製品を用いた。

なお, これらの色素はいずれも高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)のマスパターンによりそれぞれの色素であることを確認し, 混合色素等表示と合致しないものについては使用しなかった。

内部標準色素: アリズロールパープル(AP, C.I.60730)クロマ社製品, ウラニン(UN, C.I.45350)東京化成製品。

ポリアミド: ポリアミドC-100 和光純薬工業(株)社製品。

その他の試薬は市販特級品を用いた。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ

システムコントローラー: 島津SCL-10A, オートインジェクター: 島津SIL-10A, ポンプ: 島津LC-10AT, 恒温槽: 島津CTO-10A, 検出器及びデータ処理装置: 可視部(VIS)-島津SPD-10AV, 島津C-R7A-plus, フォトダイオードアレイ(PDA)-Waters 994, Waters 5200。

4. HPLC測定条件

カラム: Cosmosil 5C18-AR 4.6mm i.d.×150mm(ナカライテスク社製)。

移動相: A液-メタノール・アセトニトリル・水(3:3:4)に酢酸アンモニウムを0.5%溶解したもの。B液-0.5%酢酸アンモニウム。グラジエント条件: A液・B液の(1:9)から(10:0)までの直線勾配を30分間行い, さらに10分間溶出させた。

流速: 1.0ml/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 10 μ l, 検出波長: VIS 検出器-赤系色素 520nm, 黄系色素 450nm, 青系色素 620nm。PDA検出器-クロマトグラム 254nm, 吸収スペクトル 200~650nm。

5. 色素標準溶液の調製

1) VIS 検出器用色素標準溶液

①アゾ赤系色素混合標準溶液: R2, R40, R102, AZR, FRE, PO-R, PO-3R, PO-6R, PO-SX, RFB, R2G, R6B及びSC-GN以上13種類の色素の各々5, 10, 25及び50ppm水溶液(内部標準色素AP50ppmを含む)。

②キサンテン赤系色素混合標準溶液: R3, R104, R105, R106及びEOS以上5種類の色素の各々5, 10, 25及び50ppm水溶液(内部標準色素AP50ppmを含む)。

③黄系色素混合標準溶液: Y4, Y5, CH-S, NA-S, QY, XY, CR-O, O-I, O-II, OG及びO-GGN以上11種類の色素の各々5, 10, 25及び50ppm水溶液(内部標準色素UN5ppmを含む)。

④青系色素混合標準溶液: G3, B1, B2, GS, BMG, AZB-VX, PAB-V, BV-4B及びBPN以上9種類の色素の各々5, 10, 25及び50ppm水溶液(内部標準色素AP50ppmを含む)。

2) PDA 検出器用色素混合標準溶液

38種類の色素の各々20, 40, 60及び80ppm水溶液(内部標準色素 AP20ppm を含む)。

6. 検量線の作成

各色素混合標準溶液の10 μ lをHPLCに注入し, 得られたピークの保持時間と面積を内部標準色素と比較して相対保持時間及び相対面積を求め検量線を作製した。

7. 試験溶液の調製

試料の調製はポリアミドを用いた食品衛生検査指針⁸⁾に準じて行った。

結果及び考察

1. HPLCの測定条件

1) カラムの選択

数種類のオクタデシルカラム(ODS)C18について検討した結果, 相互の分離の比較的良かった Cosmosil 5C18-AR を使用することとした。

2) グラジエント溶離条件

長南等²⁾がアイソクラティック溶離法で色素の種類により移動相を変えて分析を行っている。著者等は長南等が使用している移動相を若干変更し, 一斉分析をするためグラジエント溶離法に応用した結果, 実験方法4. HPLC 測定条件によって40分以内で38種類の色素を良好に分離することができた。

なお, 使用した移動相はペアーディオオンを用いていないことからLC/MSを行う上で有効であった。

3) 検出波長

VIS 検出器については感度良く検出するため, 色調毎

にグループ分けして測定した。赤系色素には検出波長520nm, 黄系色素には450nm, 青系色素には620nmを使用し良好な結果を得た。なおY5, CR-O, O-I, O-II, OG及びO-GGNについては検出波長520,450nmのいずれでも測定可能であったが, これらの色素は450nmに最大吸収波長がやや近いことから黄系色素に分類し測定することとした。

一方, PDA 検出器については一斉分析を目的とし検出波長254nmを用いたが, 食品成分の中で紫外外部吸収を持つものが多くあることから, PDA 検出器で200~650nmまでスキャンさせ得られた吸収スペクトルの最大吸収波長及び波形を比較することで同定が可能となり, 誤認することなく確認ができるようになった。

4) 内部標準物質

グラジエント溶離法では保持時間及びピーク面積の再現性が悪いため内部標準法を検討した。内部標準物質は同定する色素より遅い保持時間をもつものが良く, さらに測定する38種類の色素と分離すること, 巾広い吸収範囲の波長があること及び食品に添加される可能性の少ない物質であること等を条件に内部標準色素を選定した。その結果, 254,520,620nmでいずれもアリズロールパープル(AP)が, 450nmでウラニン(UN)がそれらの条件を満たし良好な結果を得た。

2. VIS検出器による分析

内部標準色素 AP 又は UN と比較した各色素のピークの相対保持時間及び相対面積の再現性は極めて良好であり, 検量線は各色素とも5~50ppm で原点を通る直線性($r=0.9977\sim 0.9999$)を示した。

1) アゾ赤系色素

アゾ赤系色素13種類の HPLC のクロマトグラムを図1に示した。検出限界は SC-GN は0.7ng, 他の色素は0.4ngであった。

2) キサンテン赤系色素

キサンテン赤系色素5種類の HPLC のクロマトグラムを図2に示した。検出限界はいずれの色素とも0.5ngであった。

3) 黄系色素

黄系色素11種類の HPLC のクロマトグラムを図3に示した。CR-OとO-IIは分離できなかった。検出限界はQYが4ng, XYが2ng, 他の色素は1ngであった。

なおQYはキノリルインダンジオン骨格にスルホン基及びメチル基が1~3個付加したものの混合物であり製造状態により混合形態が異なる。そのため今回使用したシグマ社製品のピーク保持時間は20.5分と21.4分であ

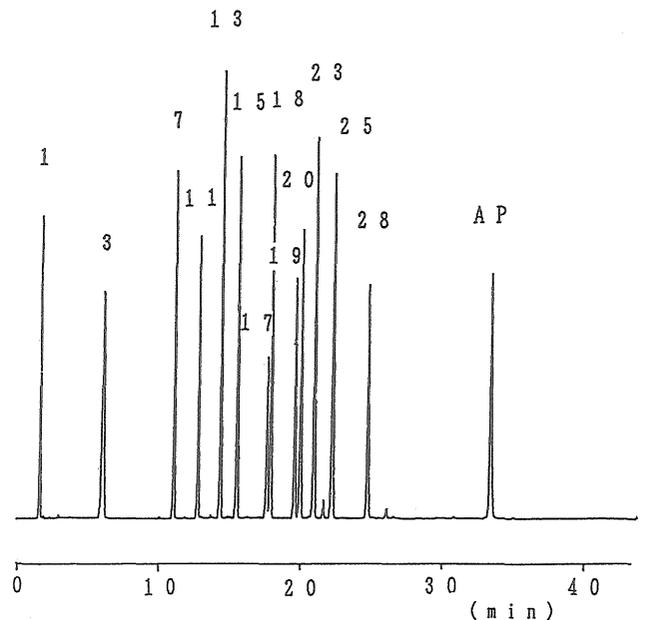


図1. アゾ赤系色素の HPLC によるクロマトグラム
1: PO-6R, 2: Y4, 3: R2, 4: B2, 5: NA-S, 6: CH-S, 7: R102, 8: Y5, 9: OG, 10: BPN, 11: R6B, 12: O-GGN, 13: R40, 14: XY, 15: R2G, 16: GS, 17: SC-GN, 18: FRE, 19: AZR, 20: PO-R, 21: QY, 22: O-1, 23: PO-SX, 24: G3, 25: PO-3R, 26: B1, 27: EOS, 28: RFB, 29: AZB-VX, 30: R3, 31: O-II, 32: CR-O, 33: R106, 34: PTB-V, 35: BMG, 36: R104, 37: R105, 38: BV-4B, AP UN: 内部標準色素。

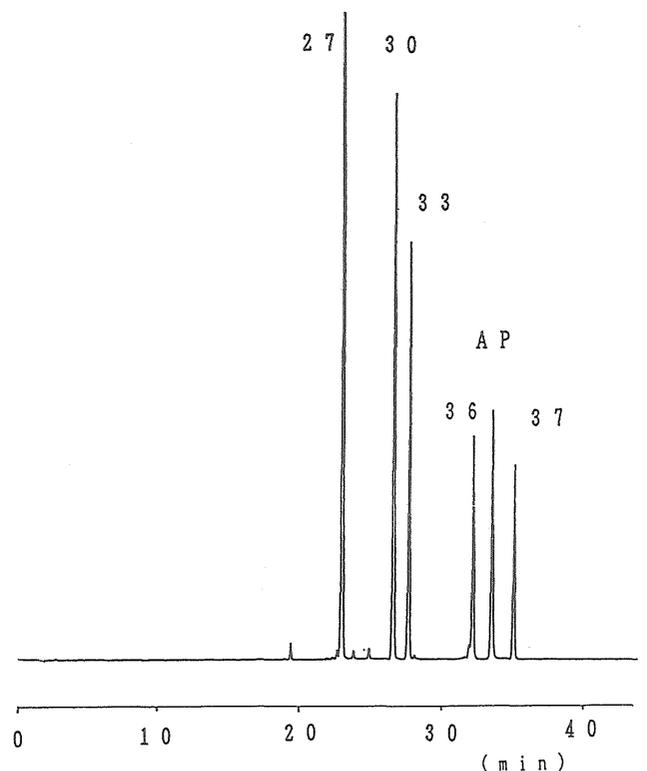


図2. キサンテン赤系色素の HPLC によるクロマトグラム
(番号の色素名は図1を参照)

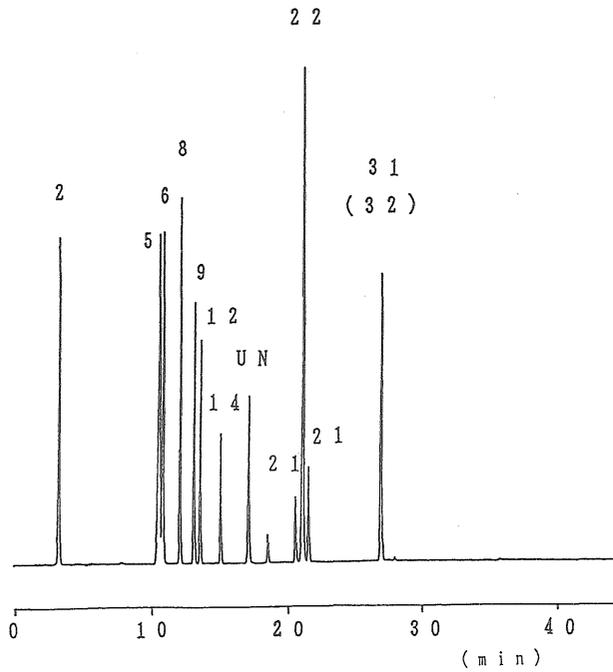


図3. 黄系色素の HPLC によるクロマトグラム
(番号の色素名は図1を参照)

たが、1994年製造のクロマ社製品は5.7, 10.6, 12.9, 15.5分に、アルドリッチ社製品は10.6, 12.9, 20.5, 21.4分にそして東京化成社製品は20.5, 21.4分にピークを検出した。

4) 青系色素

青系色素9種類の HPLC のクロマトグラムを図4に示した。検出限界は BV-4B が0.8ng, 他の色素は0.5ngであった。

3. PDA検出器による一斉分析

PDA 検出器を用いて38種類の食用タール色素について検討した。検出波長254nmにおけるクロマトグラムを図5に示した。OG と BPN のピークは重なりR6Bと分離不良であった。また O-I と PO-SX, QY と G3及び O-II と CR-O のピークも分離できなかった。しかし O-II と CR-O を除いてそれぞれ最大吸収波長及び波形が異なるため、PDA 検出器で測定した200~650nmの吸収スペクトルのパターンを比較することにより、図6に示したように明確に分別することができた。

一方、これらの色素の定性分析はペーパークロマトグラフィーで展開溶媒としてアセトン・iso-アミルアルコール・水(6:5:5), n-ブタノール・無水エタノール・1% NH₃水(6:2:3)及び25%エタノール溶液・5%NH₃水(1:1)⁹⁾のいずれを用いることによっても O-II と CR-O を除いて分別可能であった。

しかし O-II と CR-O の HPLC のピークは重なり、

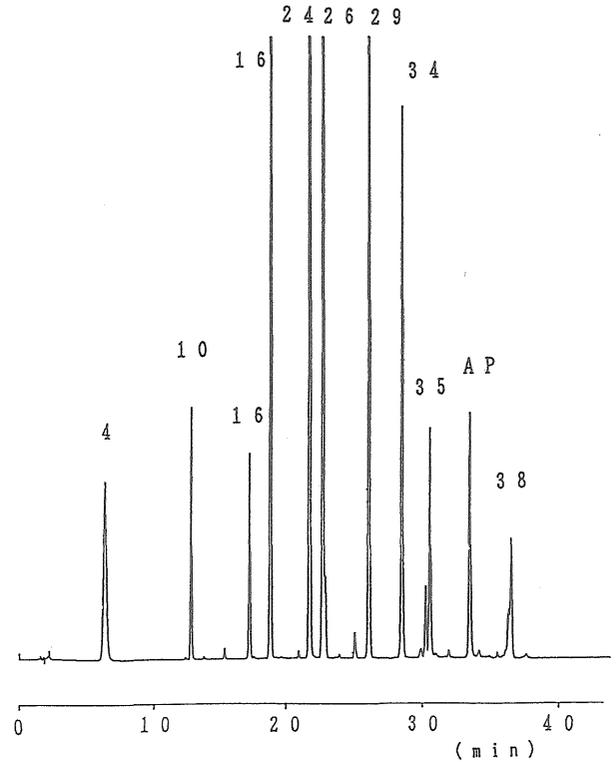


図4. 青系色素の HPLC によるクロマトグラム
(番号の色素名は図1を参照)

PDA 検出器を用いた場合も最大吸収波長及び波形が似ているため分別できなかった。更に衛生試験法・注解のペーパークロマトグラフィー⁹⁾や薄層クロマトグラフィー¹⁰⁾でも分別は困難であった。なお、植松等¹¹⁾はペアードイオンを用いて両者の分離を行っており良好な結果を得ている。そこで O-II と CR-O の分別については植松等の方法を採用することとした。

各色素と内部標準色素 AP とを比較したピークの相対保持時間の再現性は良好であり、検量線は20~80ppmで原点を通る直線性($r=0.9975\sim 0.9986$)を示した。検出限界は BMG が100ng, AZR, NA-S, QY, XY, B1, AZB-VX, PTB-Vが50ng, 他の色素は10ngであった。

4. 添加回収実験

許可色素12種類及び違反事例に多くみられる7種類の食用タール色素(AZR, R2G, QY, O-II, GS, PTB-V及びBPN)について添加回収実験を行った。無果汁清涼飲料水に各色素を50ppmになるように添加して一夜放置後、ポリアミドで抽出を行い回収率を求め、その結果を表1に示した。GSは84.3%であったが、他の色素は92.0%以上と良好な結果が得られた。

また各色素の HPLC のピーク保持時間と内部標準色素 AP の保持時間とを比較した相対保持時間も表1に示したが、その標準偏差($n=5$)は ± 0.0005 以下とほとんど

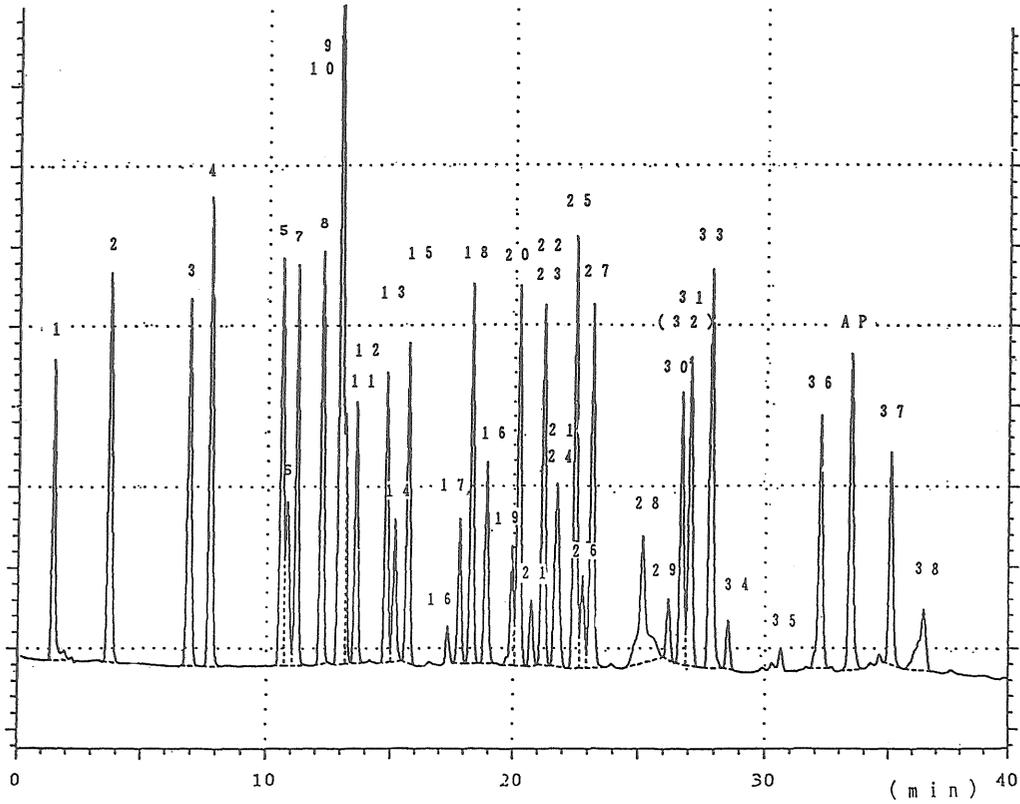


図5. 食用タール色素38種類の HPLC によるクロマトグラム
(番号の色素名は図1を参照)

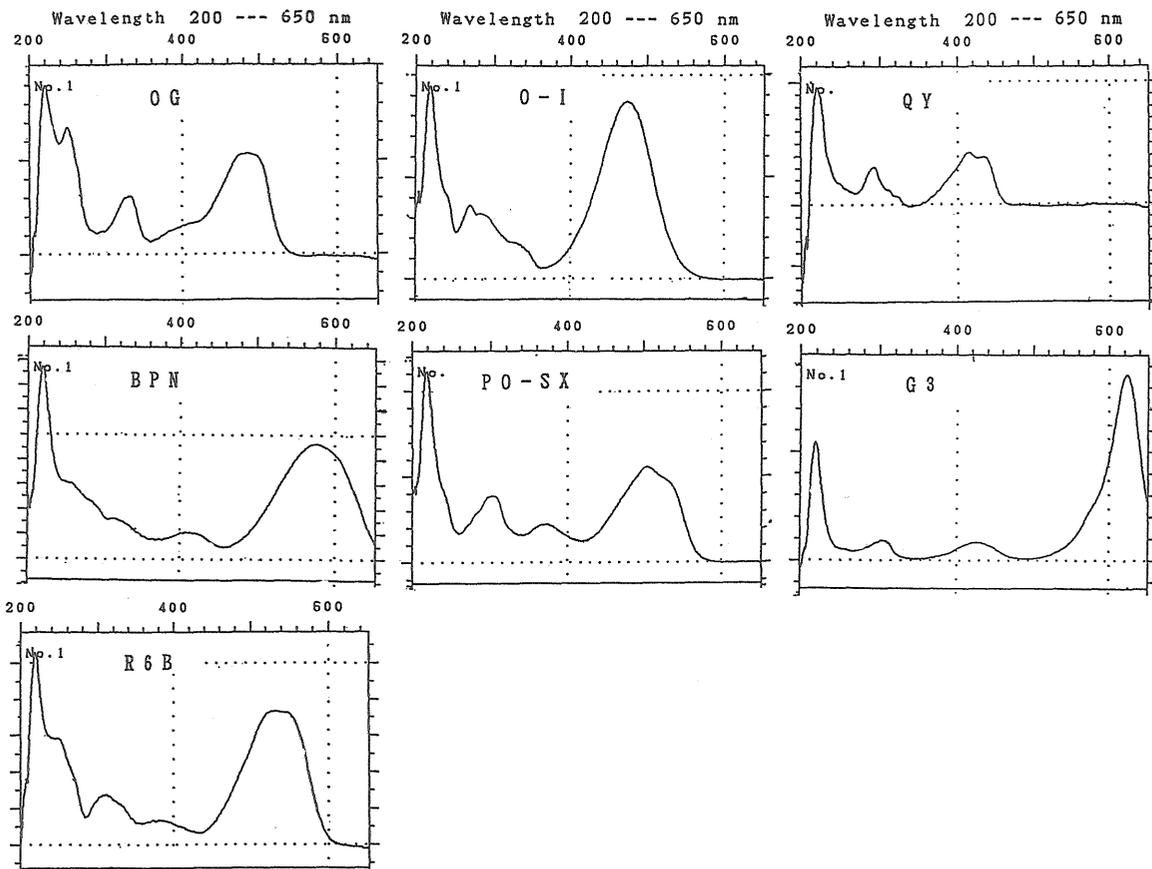


図6. PDA による食用タール色素の吸収スペクトル

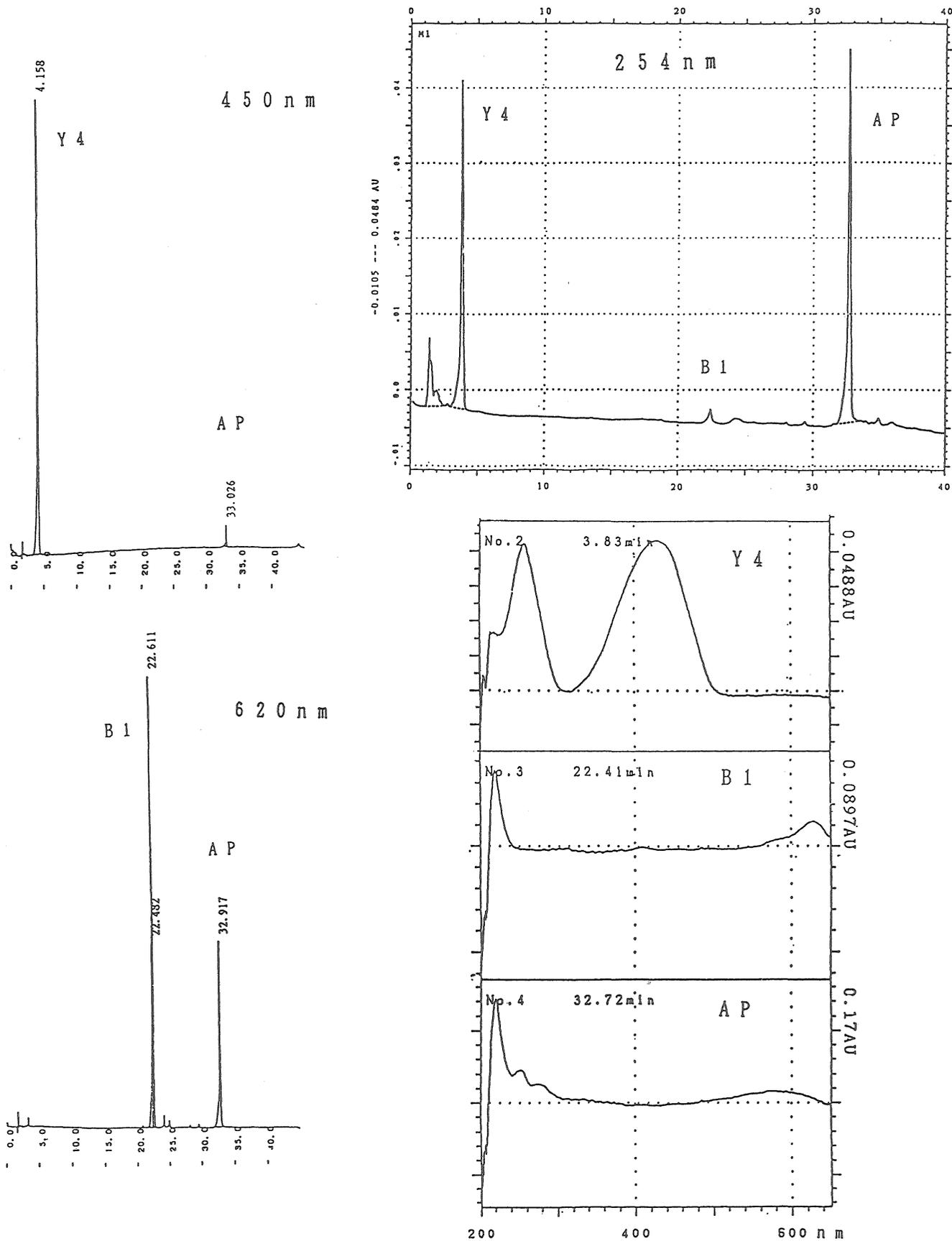


図7. 清涼飲料水中食用タール色素のHPLCクロマトグラム及びPDA吸収スペクトル

表1. 清涼飲料水からの食用タール色素の回収率及び相対保持時間

色素名	回収率(%)*	相対保持時間**
AP		1.00
R2	98.6±0.13	0.22
R40	98.4±1.52	0.45
R102	98.6±1.30	0.34
AZR	94.4±2.07	0.60
R2G	98.2±1.64	0.47
R3	97.8±1.30	0.80
R104	96.3±3.21	0.96
R105	92.0±3.51	1.05
R106	96.5±1.89	0.84
Y4	98.8±0.47	0.12
Y5	98.2±0.84	0.37
QY	94.5±1.53	0.62, 0.65
O-II	94.3±2.22	0.81
G3	95.4±0.55	0.65
B1	94.8±1.10	0.68
B2	94.0±1.41	0.24
GS	84.3±1.16	0.52, 0.57
PTB-V	93.0±0.99	0.76, 0.86
BPN	95.8±0.49	0.40

*平均±標準偏差 (n=5)

**色素保持時間/AP 保持時間

変動しなかった。

5. 市販清涼飲料水中の妨害について

無果汁及び10%果汁含有清涼飲料水8件を各10ml用いて分析したところ、いずれの試料もVIS検出器分析では特に妨害なく、またUV検出器(254nm)分析では食用タール色素以外の食品成分等のピークが検出されるが、PDA検出器のスペクトルにより同定できた。図7に清涼飲料水中食用タール色素のHPLCのクロマトグラム及びPDAの吸収スペクトルの一例を示した。なお本品中より6.6ppmのY4を、1.2ppmのB1を検出した。

まとめ

食用タール色素38種類(アゾ赤系色素13, キサンテン赤系色素5, 黄系色素11, 青系色素9種類)のHPLCによる一斉分析法を検討した。

①グラジエント溶離法により38種類の色素を40分以内

に良好に分離することができた。また内部標準色素(AP又はUN)を用いることで各色素のピークの相対保持時間及び相対面積の再現性は良好であった。

②感度良く分析するためには、食品成分等色素以外の妨害物の影響を受けにくいVIS検出器を用い450, 520, 620nmで測定した。検出限界は0.4~4ngであった。

③38種類の色素の一斉分析のためには254nmで検出したピークを、PDA検出器で測定した200~650nmの吸収スペクトルパターンにより同定した。検出限界は10~100ngであった。

④清涼飲料水への添加回収実験は許可色素12種類及び違反事例に多くみられる7種類の不許可色素について行った。回収率はGSが84.3%であったが、他の色素は92.0%以上と良好な結果が得られた。

文 献

- 1) 谷村顕雄, 藤井正美, 義平邦利, 伊藤誉志男, 城照雄 監修: 食品中の食品添加物分析法解説書, 260-270, 1992, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 2) 長南隆夫, 堀義宏: 北海道立衛生研究所報, 36, 1-7, 1986.
- 3) 外海泰秀, 伊藤誉志男, 原田基夫: 食衛誌, 25, 10-18, 1983.
- 4) 伊藤誉志男, 外海泰秀, 他: 分析化学, 32, 47-54, 1983.
- 5) 桑野和民, 三田村敏男: 食衛誌, 27, 278-282, 1986.
- 6) 大戸幹也, 松永明信, 山本敦, 他: 食衛誌, 29, 192-198, 1988.
- 7) 石川ふさ子, 斉藤和夫, 中里光男, 他: 東京衛研年報, 41, 101-107, 1990.
- 8) 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, 142-146, 1989, 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 9) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 351-365, 1980, 金原出版株式会社, 東京.
- 10) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 532-543, 1990, 金原出版株式会社, 東京.
- 11) 植松洋子, 広門雅子, 中島和雄, 他: 東京衛研年報, 39, 151-155, 1988.

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(第12報*) —平成6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 Toxicants in Tokyo (XII) —1994—

MASAMITSU KAMMURI**, KIMIKO KAN**, HIDEKI HASHIMOTO***,
TOSHIO MAKI** and YUKIHIRO TAMURA****

Keywords: 化学性食中毒 chemical food poisoning, ヒスタミン histamine, クサウラベニタケ *Rhodophyllus rhodopolius*, カキシメジ *Tricholoma ustale*, アルカリ洗剤 alkaline cleanser, 界面活性剤 surface active agent

著者らは前報¹⁻⁵⁾において都内で発生した化学性食中毒事件等を報告してきた。

今回は平成6年度に起きた化学物質による食中毒等事例, 1. 洗剤の誤食による有症苦情3件, 2. 魚介類の鮮度低下(ヒスタミン)による食中毒1件の合計4件, 及び自然毒による食中毒事例, キノコ(クサウラベニタケ, カキシメジ)の誤食による食中毒2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. 洗剤の誤食による有症苦情事例

事件の概要 事例1, 平成6年4月, 飲食店で会社の同僚の女性2名がアイスコーヒーを注文し, 店に備え付けのガムシロップを入れて飲んだ1名とガムシロップだけをなめた他の1名の計2名が直後に異味及び舌と咽喉に痛みを感じ, 口の中のもの全てを吐き出した。ただちに本人が保健所に連絡し, 病院で診察を受けたところ, 2名とも急性咽喉炎と診断された。

事例2, 平成6年6月, カラオケ店で友人5名が日本酒を注文し, 女性1名が一口飲んだところ口の中が焼けるようだと異常を訴えた。それを確認しようと男性1名が一口飲み同様な異臭及び喉と胸が焼ける感じを呈し,

嘔吐した。男性は病院で診察を受けたところ口腔内が焼けただれており, 口腔粘膜及び舌の火傷で10日間の加療を要すとの診断を受けた。

事例3, 平成6年11年, 会社で仕出し弁当の白菜漬けを一口食べた男性1名が違和感を呈し, すぐ吐き出したが, 下口唇の内側と舌の先が赤く腫れたため, ただちに保健所に届け出た。

①**試料** 事例1は飲食店で患者に提供した参考品のガムシロップと同店で使用していた洗剤の計2検体。事例2は患者に日本酒として提供された日本酒ビン内の残品2mlとカラオケ店で使用していたガラス拭き用洗剤の計2検体。事例3は患者に提供された仕出し弁当の残品でフライ, 炒め物, マーボドウフ, 白菜一夜漬け, 昆布の佃煮, てんぷら, ミカン及び弁当箱の計8検体, 参考品として仕出し店で作られた白菜一夜漬け, 同店で保管していた検食, 洗浄済みの弁当箱及び洗剤の各1検体。

②**原因物質の検索** 洗剤による事件はいずれの場合も飲食した直後に異味異臭を感じている。事例1及び2の場合は残品が店の従業員に廃棄されたため, 事例1は無く, 事例2では2mlと極少量であった。

事例1の場合は同店で使用されていた参考品のガムシ

*第11報, 東京衛研年報, 45, 111-115, 1994

**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

***東京都立衛生研究所生活科学部乳肉研究科

****東京都立衛生研究所多摩支所

表1. 平成6年度に発生した化学性食中毒等の概要

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6年4月	2/2	アイスコーヒー	洗剤
2	6月	2/2	日本酒	洗剤
3	11月	1/1	仕出し弁当	洗剤(NaOH)
4	7年1月	2/2	ワカシの塩焼き	ヒスタミン
自然毒				
4	平成6年10月	1/1(3/5)	クサウラベニタケ	自然毒
5	11月	3/19	カキシメジ	自然毒

()内は他県関連を含む

ロップ中に洗剤が混入しているかの確認と現場の聞き取り調査から原因と思われる店内で使用されていた洗剤の成分分析を行った⁶⁾。その結果、洗剤は参考品のガムシロップから検出されなかったまま使用中の洗剤は薄層クロマトグラフィー(TLC)により分析し、非イオン系界面活性剤のポリオキシエチレンアルキルエーテル(POE)と陰イオン系界面活性剤の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)であることを明かにした。

事例2では日本酒として患者に提供された残品は酒の臭いがせず無臭であった。pHは10倍溶液で12.8、発泡試験は10,000倍溶液まで発泡を認めた。洗剤はPOE系界面活性剤が検出されたが、LAS、アルキル硫酸エステル塩(AS)等は検出されなかった。更に蛍光X線分析により無機成分を分析したところ主成分はカリウム(K)であり、少量のナトリウム(Na)も含有していることが示唆された。そこで原子吸光分析計で定量したところKは15,000 $\mu\text{g/g}$ 、Naは1,300 $\mu\text{g/g}$ 検出された。また家具用洗剤等でpHの緩衝、調整剤または泡の安定化及び洗浄性能の向上剤として使用されているエタノールアミン類^{7,8)}をガスクロマトグラフィーにより測定した。条件は以下のとおりである⁹⁾。カラム：TENAX-GC、 ϕ 3mm \times 1m、温度は90°と150°の2条件、検出器：FID、キャリアガス：N₂、40ml/min。その結果、残品からモノエタノールアミンが5%検出され、ジエタノールアミン及びトリエタノールアミンは検出されなかった。アルカリ度は123であり、強アルカリ物質を含有していることが判明した。なおアルカリ度は試料10gを中和(pH7.0)するに要する0.1N塩酸量(ml)である。一方参考品の同店で使用していたガラス拭き用洗剤はpHが原液で10.0、発泡試験は100倍溶液まで発泡が認められ、LASを検出したが、AS及びPOEは検出されなかった。

Naは300 $\mu\text{g/g}$ 、Kは検出されずエタノールアミン類も検出されなかった。またアルカリ度0.7であり、明らかに日本酒中の残品とは異なっていた。

事例3では、患者が喫食した残品の白菜一夜漬けは褐変しており、強い刺激臭を認めた。また炒め物とマーボドウフが入っていたアルミホイルの外側は白く腐食していた。食品のpHは残品の白菜一夜漬け14.0、昆布の佃煮11.0であり、アルカリ度は350と30であった。なお他の食品残品及び参考品の検食のpHはいずれも7.0以下であった。食品を除いた弁当容器の汚染状況をpHを指標として調べた。その結果、白菜一夜漬けがあった部位では13.9と一番高い値を示し、フライ、炒め物、マーボドウフ及び昆布の佃煮の各部位は10.0以上で、テンプラと焼き魚部位は9.1であり、食品と比較し容器の汚染は広範囲であった。一方、洗浄した容器はいずれも6.0以下であった。また仕出し店で使用していた洗剤は水酸化ナトリウムであり、アルカリ度1250、Na含有量は27.4%、Kは600 $\mu\text{g/g}$ であった。なお、pH測定は食品では2倍量の水を加え混和した時の値であり、容器は食品を取り除き容器のくぼみに蒸留水を5ml加え5分間放置した時のpH値である。また、食品のNa、K濃度を測定したが、食塩等の影響が大きく汚染の指標にはならなかった。

③考察 今年度は洗剤による事件が3件続いた。事例1の場合は残品がすべて廃棄されていたため原因物質の特定は不可能であった。患者や従業員の聞き取り調査により、この事件は洗剤によるものらしいということ、また患者の症状が急性咽頭炎であることから界面活性剤系の洗剤であることが疑われた。そこで事故の拡大を防ぐ目的で同店で使用していた洗剤の成分を明らかにし、同店のガムシロップ中の洗剤の有無を分析し、混入がな

いことを明らかにした。後日の調査から、この事件は従業員が食器洗浄器用の洗剤を空のペットボトルに入れてガムシロップ保存用の棚に置いたものを、翌日他の従業員が小分けして客に提供したことが判明した。しかし医師から食中毒の届出が得られなかったため、食中毒として処理せず、食品衛生法第4条2号、第19条の18第3項並びに第20条違反として、7日間の営業停止処分と食品の取扱い改善及び施設の改善命令がなされた。

事例2では事件発生直後、従業員が残品の日本酒を廃棄したため、試料は患者が証拠品として確保したビン内に付着している2mlだけであった。残品は発泡していたことから、洗剤に注目し分析した。残品は、強アルカリ性で界面活性剤としてPOEが検出され、無機成分ではK含有量がNaの約10倍多く含まれていた。強アルカリの主成分は水酸化カリウムか炭酸カリウムが推察されX線回析分析をこころみたら試料が少量なため判別ができなかった。また家具や換気扇等の住宅用洗剤によく使用されるエタノールアミン類もモノエタノールアミンが5%検出されたこと、またアルカリ度123から水酸化K濃度を計算すると5.7%であり、これは「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」で液状家庭用洗剤は水酸化ナトリウム及びカリウムを5%以下と規制している値¹⁰⁾とほぼ一致したことから強アルカリ性住宅用洗剤等が疑われた。しかし分析結果から同店で使用していた洗剤とは成分組成が異なっており、他の洗剤による事件であることが示唆された。この事件は、後日の聞き取り調査により、店長が短期間のうちに2回交代し、前任の店長が洗剤を入れたビンに洗剤含有の表示をせず棚に置き、かたづけ忘れ、新店長が知らずにそれを客に提供してしまったものであった。

事例3では仕出し弁当は当日2,228食分仕出しており、患者の事業所には5食分配達された。その中で異常を認めたのは1食分だけであった。事故をおこした仕出し弁当でpHとアルカリ度が一番高いのは白菜一夜漬けとその弁当箱部分であり、となりの昆布の佃煮が次に汚染されていたことから白菜一夜漬けが事故の汚染源と考えられた。また容器内壁のpHが全体に高く汚染は容器全体に広がったものと思われる。またアルカリ度が非常に高いことから事例2と同様に水酸化ナトリウムと炭酸カリウムが疑われた。従業員の聞き取り調査により、同店では汚れが強い容器は水酸化ナトリウム溶液の水槽につけ洗浄することが明らかになり、汚染原因物質はこの水酸化ナトリウムと推察された。

洗剤による事件は、最近、洗浄力の強い洗剤を使用す

るケースが多く、その洗剤の管理がずさんな結果事件が起きている。食品従事者は、洗剤と表示された容器以外には絶対に洗剤をいれないこと、保管場所は一定にし食品などとは隔離しておくこと、また洗剤を使用した場合はよく洗浄し、洗剤がついた手で食品や容器に触れないこと等を厳守することが大切であり、従業員教育も必要である。

2. ヒスタミンによる中毒事例

事件の概要 平成7年1月、飲食店で同僚の男性2名が昼食に定食のワカシの塩焼きを食した。2名が30分から1時間後に脱力感、倦怠感、動悸、はきけ、頭痛及び、顔、肘、膝に発疹を呈した。病院で診察を受けたところ中毒疹と診断され、この発疹は抗ヒスタミン剤の投与により消失した。そして診察した医師から保健所に食中毒の一報がよせられた。

①**試料** 患者が喫食したものと同一ロットで飲食店が保存していたワカシ干物残品1検体。

②**原因物質の検索** 患者の中毒症状が典型的なヒスタミン様物質によるものであること、またワカシが赤身の魚であることからヒスタミン中毒が推測された。そこで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い、さらに液体クロマトグラフィーによる定量分析を行った¹¹⁾。その結果、ヒスタミン460mg%、カダベリン27mg%が検出された。なおチラミン、スベルミジン、及びプトレシンは検出されなかった。

③**考察** これまでに都内で発生したヒスタミンによる食中毒及び有症苦情事例はマグロ、イワシ、サンマ等で多数発生しているが、今回はブリの子であるワカシで発生している。ブリは成長に伴い呼び名が変わりワカシ、イナダ、ワラサ最後にブリとなる。これらのいずれも中毒事例は少ない。事件を起こしたワカシは福井県の水産業者が干物にしたものを飲食店で仕入れ、到着後冷蔵保存し2日目まで客に提供している。一方製造所で作られたワカシの干物は大部分が製造後15日以内で販売されていたが、当該品は製造後4カ月近く販売されず保存されていた。また宅急便で飲食店へ配達されたとき、冷却用に入れた氷が解けていたこと等から、製造所の保存及び運搬時に問題があり、鮮度が低下し高濃度のヒスタミンを生成したものと推察される。飲食店での取扱い原因による可能性は少ないが、仕入れ等の責任は免れないとして、区食品衛生関係行政処分取扱い内規により7日間の営業停止及び取扱い改善命令がなされた。

3. キノコによる食中毒事例

事件の概要 事例1, 平成6年10月, 神奈川県厚木市

に住む親戚の者が自宅付近の山で採取したキノコを都内に住む患者1名が譲り受け、めんつゆとしてキノコをナスと炒め、うどんと共に喫食したところ、40分後から吐き気、嘔吐(4回)及び発熱の症状を呈し入院した。その後、医院から食中毒の一報が保健所によせられた。また患者からキノコの一部を譲り受けキノコ汁で喫食した他県の1家族4名中2名も同様な症状を呈していた。

事例2、平成6年11月、知人が10月17・18日頃に山梨県八ヶ岳山麓美森山で採取し、冷凍保存しておいたキノコで7家族19名がキノコパーティーを行い、そのうち2家族3名が2時間後から吐き気、嘔吐、下痢及び発熱の症状を呈し、病院に搬入され入院した。

①試料 事例1は患者が病院に持ち込んだ未調理キノコ残品で、全体の形があるもの2本と破片30個、及び自宅にあった残品で全体の形があるもの8本と破片1個の計2検体。

事例2はキノコパーティーに参加した者が持ち帰ったキノコ鍋の未調理残品を冷凍したキノコで形状があるもの7本と破片36個、及びキノコ汁の残品でキノコの破片4個の2検体。

②原因物質の検索 事例1及び2の食中毒症状は吐き気、嘔吐及び下痢等を呈し、典型的な消化器系障害型症状を呈していた。この症状を示す我が国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。事例1は患者の自宅や病院にあった全てのキノコはイッポンシメジ科イッポンシメジ属のキノコと思われた。このうち形状がしっかりしているキノコで病院にあった2本と自宅にあった8本は食用のウラベニホテイシメジであった。しかし自宅にあったキノコから一見ウラベニホテイシメジに良く似ているが、大きさが小型なキノコが2本確認された。ウラベニホテイシメジは傘が褐色を帯びたねずみ色の表面に白色絹糸様の繊維で中心から放射状に薄く覆われているのに対し、この残品は傘の表面がピロード状の光沢を呈し白色絹糸様の繊維が認められなかった。柄はウラベニホテイシメジでは中実で下方が太く、いわゆるホテイ状であるのに対し残品は中空で柄の太さが上下同じであった。これらの特長から中毒原因のキノコはクサウラベニタケと判定した¹¹⁾。

事例2は試料が冷凍したものであり、更に1検体は調理したもので原形を保ったものが少なかった。そこで原形をとどめたキノコを鑑定したところ食用種ではアカモミタケとチャナメツムタケを認め、その多くは後者であった。その中から傘の表面が粘性で平滑、黒褐色、中

央部はこんもりふくらみ暗色、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本見つけた。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、また菌糸はクランプが観察されなかったこと等、総合的に判断してカキシメジと判定した¹¹⁾。また大木等¹²⁾の呈色反応も試みたが凍結し変質がはげしく判定不能であった。

③考察 キノコ中毒は毎年のように起き、昨年もカキシメジによる食中毒が起きている⁵⁾。今年の特長はどれもキノコ鑑定に自信を持った採取者の誤認によるものであり、いずれも鑑別が難しく食用キノコと間違いやすいと言われるものであった。事例1はクサウラベニタケをウラベニホテイシメジと、事例2はカキシメジをチャナメツムタケと誤認している。

事例1の場合はクサウラベニタケはウラベニホテイシメジの発生場所と同じ場所で混生する場合が多く、1本ずつ確認して食用にする必要がある。また翌日の10月6日には、事例1のキノコ採取場所付近の神奈川県南足柄市大雄山で採取したクサウラベニタケにより8名全員が嘔吐、腹痛、下痢の症状を呈した同様な食中毒が起きている。

事例2はキノコの採取時期を過ぎた11月に食中毒が発生している。これはキノコを採取し、冷凍庫で保存して事件発生日に取り出し料理して起きたものである。キノコ中毒はキノコ採取時期に起きるものと思われがちであるが、この様に時期はずれでも起きる。試料は冷凍したキノコとそれをキノコ汁にした残品であり極めて判別が困難であった。キノコ汁のキノコは加熱加工されたものであり変質が激しく鑑定不能であった。冷凍品のキノコ及びキノコの破片を取り出し白紙の上に並べ鑑定した。採取者はチャナメツムタケ、アカモミダケ、ヌメリスギタケモドキ、ハナイグチ、ナラタケ、クリタケ、オオツガタケ及びアンズタケを採取したと証言したが、チャナメツムタケ、アカモミダケ及び中毒原因のカキシメジは確認できたが、他のキノコは確認できなかった。

クサウラベニタケ及びカキシメジは形態だけでも判別できるが、大木等¹²⁾の呈色反応による鑑別法も有効な方法である。この方法も今後のキノコ判定に利用したい。

事件発生防止のために、山野で採取したキノコを喫食する場合、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、不確実なものは絶対に食しないことが必要である。またキノコ中毒は知人から譲り受けて発生する場合は比較的多

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である。また熟練したキノコ採取者も慎重にキノコを判別する必要がある。採取者の鑑定教育だけでなく、発生地での警告も必要であること、特に食中毒情報は迅速に行う必要があることが望まれる。

以上、平成6年度に起きた化学物質による食中毒等のうち、洗剤の誤食による有症苦情事例3件、魚介類の鮮度劣化(ヒスタミン)による食中毒事例1件、及びキノコ(クサウラベニタケ、カキシメジ)の誤食による食中毒事例2件の食中毒等事例を取り上げた。

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。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 真木俊夫, 観公子, 永山敏廣, 橋本秀樹, 他: 東京衛研年報, 44, 162-165, 1993.
- 5) 冠政光, 観公子, 橋本秀樹, 真木俊夫, 他: 東京衛研年報, 45, 111-115, 1994.
- 6) 下山徳重: 東京都消費者センター, 36, 27-37, 1993, 東京都.
- 7) 日本中毒情報センター: 急性中毒処理の手引, 2, 1994, 薬事時報社.
- 8) 荻野圭三: 改訂増補合成洗剤の知識, 139, 1981, 幸書房.
- 9) ガスクロ工業(株): 充填剤カタログ, 43, 1979.
- 10) 東京都: ちょっと気をつけて!, 49, 1987, 東京都.
- 11) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 287, 1990, 金原出版株式会社.
- 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) 大木正行, 吉川進, 三浦則男, 食品衛生研究, 36, 95-98, 1986.

輸入食品中の放射能濃度(第6報*) —平成6年度—

観 公 子**, 冠 政 光**, 橋 本 秀 樹***,
真 木 俊 夫**, 田 村 行 弘****

Radioactive Contamination in Imported Foods(VI)

— Apr. 1994 ~ Mar. 1995 —

KIMIKO KAN**, MASAMITSU KAMMURI**, 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, キノコ mushroom, 蜂蜜 honey, ホーソソリーフ hawthorn leaves, NaI(Tl)シンチレーションディテクタ NaI(Tl) scintillation detector

緒 言

今から9年前,旧ソビエト連邦チェルノブイリ原子力発電所事故により世界的規模で放射能汚染が広がった。そのため我が国は放射能濃度の暫定限度値(セシウム-134 (^{134}Cs)とセシウム-137 (^{137}Cs)の合計で1 kg当たり370ベクレル(Bq)以下)を定め,検疫所において,放射能汚染食品が輸入されないようチェックが行われてきた。最近では,平成6年11月,3年8カ月ぶりにフィンランド産トナカイ肉から暫定限度値を超えて検出され,積み戻しされた¹⁾。しかし,チェックの網を抜けて輸入されてしまった食品もあった。

著者らは事故後の昭和61年12月より,輸入食品等について,暫定限度値を超えた食品の排除及び放射能汚染実態調査のため検査を行ってきた²⁻⁶⁾。その結果,暫定限度値を超えたものが昭和63年度に1件あり,本年度にも1件見いだされ,今なお原発事故の影響が及んでいることが確認された。

そこで,都内市販輸入食品を中心に調査を行ったので,前報に引き続き平成6年度の放射能調査結果を報告する。

また,測定法として波高分布についても検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

1994年4月から1995年3月までに東京都内に流通していた輸入食品等で食品監視員が収去した334試料を検査した。

2. 器具及び装置

前報²⁻⁶⁾に従った。

3. 試料の調整

前報²⁻⁶⁾に従った。

4. 分析方法

前報²⁻⁶⁾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。

ただし,25Bq/kg以上を検出したものについては,チャンネル数をLL=27からUL=46の範囲で,幅を1と狭く設定して3回測定し,そのカウント数の平均値をプロットし波高分布を描いた。同様にしてセシウム標準品(^{137}Cs)の波高分布と比較することにより同定を行った。なお,LL-ULはエネルギーを示すチャンネル数の幅であってLLは低い方,ULは高い方のエネルギーを示す。また,チャンネル幅1は約20keVに相当するエネ

*第5報,東京衛研年報,45,105-109,1994.

**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

***東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科

****東京都立衛生研究所多摩支所

ルギーであり、LL-ULの27から46とは約540keVから約920keVである。¹³⁷CsはLL=28(560keV)からUL=37(740keV)の間に、¹³⁴CsはLL=37(740keV)からUL=45(900keV)の間にピークがある。

測定時間は各試料の放射エネルギーにより各チャンネル1幅あたり20分以内で増減した。

結果及び考察

1. 測定法の検討

本年度、従来通りの測定で100Bq/kg以上検出したものについて、アイソトープ研究所の核種測定ではセシウム(Cs)放射能が検出されないという極めて希な1事例を経験した。そこで、このことについて種々検討したところ、NaI(Tl)シンチレーションディテクタでは、Cs放射能濃度を測定する際に¹³⁴Csと¹³⁷Csの両核種の含まれるチャンネル幅(LL-UL=28-45)で広く測定するため、Csの近くにあるタリウム(²⁰⁸Tl)やアクチニウム(²²⁸Ac)等のγ線が同時に測定されてしまうという事が判明した。

そこで、NaI(Tl)シンチレーションディテクタで従来通り測定した後、25Bq/kg以上を検出したものについてはチャンネル幅を(LL-UL=27-28, 28-29, 29-30, ……44-45, 45-46)と小さくかつ細かく設定しカウント測定した。次に各幅カウント数をプロットして波高分布を描き、標準品¹³⁷Csの波高分布と比較するという方法を採用した。このことにより誤認を回避し、同定に良好な結果が得られた。

試料及び標準品¹³⁷Csの波高分布を図1に示した。ピエ・ド・ムトン(カノシタ)及びジロル(アンズタケ)は

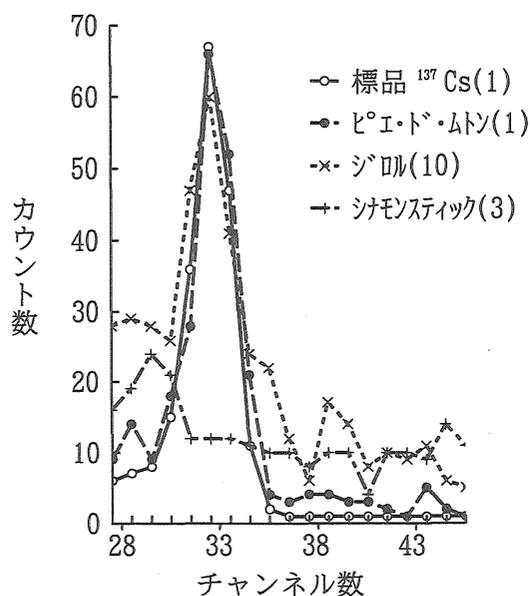


図1. 試料及び¹³⁷Csの波高分布 ()内の数字は測定時間(分)を示す

LL-UL=30-36において標準品¹³⁷Csのピークに一致しているが、シナモンスティックはLL-UL=27-31にピークがあり、標準品¹³⁷Csとは一致していなかった。

²⁰⁸Tlや²²⁸Ac核種は土壌等を測定したときに検出されるといわれ、この試料には砂塵が混入していたためにシンチレーションディテクタで100Bq/kg以上が検出されたものと推測される。

2. 放射能汚染状況

都内に流通していた輸入食品等334試料について、放射能濃度を測定した。その結果、50Bq/kgを超えたものは4試料であり全て100Bq/kgを超えていた。そのうち1試料が暫定限度値370Bq/kgを超えていた。東京都はこの輸入業者に対しこのものの回収を指示するとともに、厚生省に検査の強化を要請した。

3. 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101~200Bq/kgのものが3試料(0.9%)、370Bq/kg以上のものが1試料(0.3%)であった。また、51~100Bq/kg及び201Bq/kg~370Bq/kgのものはなく、50Bq/kg以下のものは330試料で総試料の98.8%を占めていた。昭和63年度から平成6年度までの50Bq/kgを超えた試料の検出率を図2に示した。検出率は、チェルノブイリ事故から時間の経過に伴い減少してきているものの、予想に反して平成3年度からは1%前後の横ばい傾向にある。

表1. 放射能濃度別の検出試料数及び検出率

放射能濃度 (Bq/kg)	検出試料数	検出率 (%)
0~50	330	98.8
51~100	0	0
101~200	3	0.9
201~370	0	0
370~	1	0.3
計	334	100

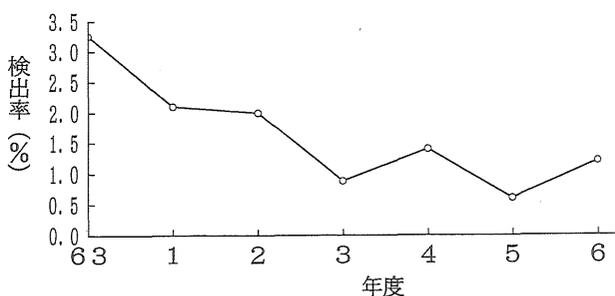


図2. 放射能濃度が50Bq/kgを超えた試料の年度推移

2) 食品群別

食品群別の検出状況を表2に、総検査試料の食品群別割合を図3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試料は野菜・果実・加工品、香辛料・ハーブ及び蜂蜜の各群に含まれていた。その中で暫定限度値370Bq/kgを超えたものが野菜・果実・加工品群の中にあつた。

検出頻度の高い食品群は限定されて判明してきたため、今後はそれらを中心に監視を行う必要があると考える。

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4に示した。

産国別にフランス、アメリカ、日本、ドイツ連邦、デンマークの順に検査数が多く、これらで全体の約50%を占めた。この中にはフランス産で50Bq/kgを超えて検出されたものが2試料あり、そのうちの1試料は暫定限度値

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 ナッツ類	19	0	0
2 香辛料・ハーブ類	54	1	1.9
3 ジャム・マーマレード類	2	0	0
4 乳・乳製品	38	0	0
5 食肉・食肉製品	53	0	0
6 蜂蜜	10	1	10.0
7 魚介・加工品	29	0	0
8 菓子類	1	0	0
9 酒類	21	0	0
10 穀類	35	0	0
11 野菜・果実・加工品	18	2	11.1
12 油脂類	0	0	0
13 調味料	1	0	0
14 その他	53	0	0
計	334	4	1.2

* : ¹³⁴Cs及び¹³⁷Csの放射能濃度の合計が50Bq/kgを超えた試料数

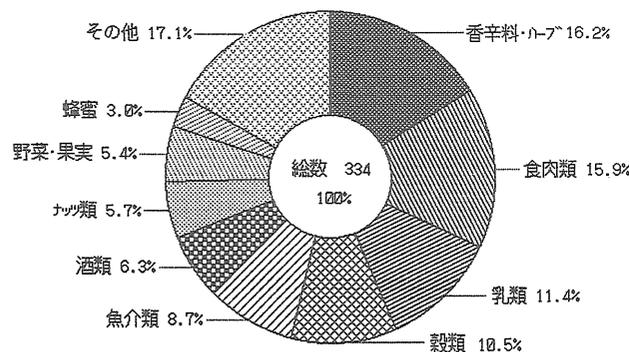


図3. 放射能検査試料の食品群別割合

370Bq/kgを超えていた。

また、イタリア産及びチェコスロバキア産で50Bq/kgを超えて検出されたものが各々1試料あつた。

50Bq/kgを超えて検出されたものは全てチェルノブイリ事故により高い放射能汚染を被った国のものであり、今後ともこれらの国のものについては検査対象として注目していく必要がある。

事故当時国の旧ソ連産のものを1試料検査したが50Bq/kgを超えて検出されなかつた。汚染原料を輸入し生産、加工又は製造したものはその国の原産となるので、放射能汚染が比較的少なかった国のものも測定したが50Bq/kgを超えて検出されなかつた。

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、¹³⁴Cs及び¹³⁷Csの合計が100Bq/kgを超えたものについては精密検査のため都立アイソトープ総合研究所で測定した値である。

50Bq/kgを超えた試料はピエ・ド・ムトン(カノシタ)及びジロル(アンズタケ)の2種類のキノコ、蜂蜜(栗の花)及びホーソソリーフ(ハーブ)の4試料であつた。これらの試料を写真1から4に示した。この中でピエ・ド・ムトンから暫定限度値を超えて830Bq/kgが検出された。

このように限度値を超えたものが流通してしまった事は、このキノコには輸出国の公的な検査機関の「放射能は検出されない」という成績書が添付されていたために、そのまま輸入が許可になったとの事であつた。このキノコは広い地域から集荷されており、輸入されたものの中に汚染地域から収穫されたものが混入していたと思われる。また、これは「食品衛生法第4条2号」違反で回収処分該当品であつたが、生鮮食品でさらに輸入量も少なかったため検査結果の得られたときには全て消費されていた。しかし、このキノコを少量摂取した程度では人体

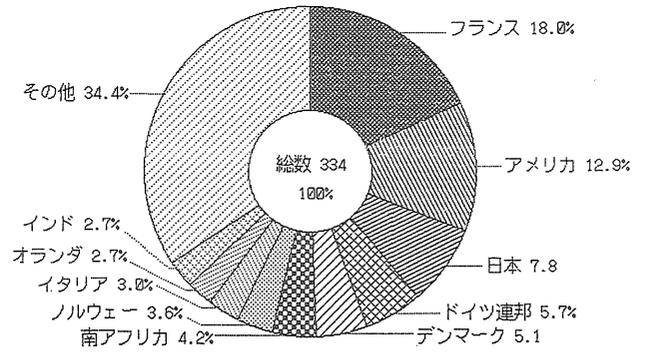


図4. 放射能検査試料の国別割合

表3. 国別の測定試料数と検出数*

原産国名	試料数	検出数*	原産国名	試料数	検出数*
フランス	60	2	スイス	3	0
アメリカ	43	0	アイルランド	2	0
日本	26	0	台湾	2	0
ドイツ連邦	19	0	チリ	2	0
デンマーク	17	0	ユーゴスラビア	2	0
南アフリカ	14	0	メキシコ	2	0
ノルウェー	12	0	ギリシャ	2	0
イタリア	10	1	ガアテマラ	1	0
インド	9	0	モロッコ	1	0
タイ	8	0	イラン	1	0
中国	8	0	旧ソビエト連邦	1	0
カナダ	6	0	インドネシア	1	0
オランダ	9	0	ルーマニア	1	0
チェコスロバキア	4	1	ポーランド	1	0
ハンガリー	4	0	スリランカ	1	0
オーストラリア	4	0	オーストリア	1	0
トルコ	4	0	スーダン	1	0
ブラジル	4	0	ペルー	1	0
ベルギー	3	0	フィリピン	1	0
ポルトガル	3	0	エジプト	1	0
スウェーデン	3	0	アルバニア	1	0
イギリス	3	0	アルゼンチン	1	0
スペイン	3	0	不明	25	0
ニュージーランド	3	0			

* : ^{134}Cs 及び ^{137}Cs の放射能濃度の合計が 50Bq/kg を超えた試料数
 : チェルノブイリ事故放射能汚染が比較的少なかった国

表4. 放射能濃度が 50Bq/kg を超えた試料の内訳と検出値

No	品名	検出値(Bq/kg)			原産国	製造または 輸入年月日
		$^{134}\text{Cs}+^{137}\text{Cs}$	^{134}Cs	^{137}Cs		
1	ピエ・ド・ムトン (カノシタ) (生)	830	20	810	フランス	1994.12.07
2	蜂蜜 (栗の花)	181	6	175	イタリア	1993.05.27
3	ホーソンリーフ (ハーブ)	166	6	160	チェコスロバキア	不明
4	ジロール (アンズタケ) (生)	134	4	130	フランス	1994.12.07

に影響が無いものと思われる。キノコについては報告によりCsを取り込むこと^{7,8)}が明かされているため特に注意を要するものであり、検疫所においてこの種の食品は厳重チェックが望まれる。

蜂蜜については、昭和63年度においても蜂蜜(栗の花)から同様な放射能濃度が検出されている²⁾。蜂蜜やジャム等は長期に保存が可能であるため放射能汚染の監視が必要と考える。

5) 核種割合

100Bq/kg を超えて検出され、アイソトープ研究所で核種分析が行われたものについて、Cs核種の放射能濃

表5. 100Bq/kg を超えた試料のセシウム核種割合 (^{134}Cs : ^{137}Cs)

No	品名	実測値		理論値*	測定日
		^{134}Cs : ^{137}Cs	^{134}Cs : ^{137}Cs		
1	ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生)	1:41	1:33	1:33	1994.12.21
2	蜂蜜(栗の花)	1:29	1:29	1:29	1994.08.11
3	ホーソンリーフ(ハーブ)	1:27	1:29	1:29	1994.08.30
4	ジロール(アンズタケ)(生)	1:33	1:34	1:34	1995.02.27

*: それぞれの半減期から算出した割合

※ チェルノブイリ原発事故当時(1986年)降下塵中の核種割合(^{134}Cs : ^{137}Cs)は1:2であった

度割合を検討し、表5に示した。

^{134}Cs ： ^{137}Cs の比は事故当時1：2であったが半減期から算出すると、1994年8月に測定した蜂蜜及びホーソソリーフはおよそ1：29、12月に測定したピエ・ド・ムトンはおおよそ1：33、1995年2月に測定したジロルはおよそ1：34の割合になる。

これら4試料について、上記の半減期から算出した理論比と比較すると、ピエ・ド・ムトンの ^{134}Cs ： ^{137}Cs 実測比が1：41とやや多く、核実験のフォールアウトも影響していると考えられた。他3試料の核種割合は理論値と実測値とで一致していた。半減期が2年の ^{134}Cs が検出され、 ^{134}Cs ： ^{137}Cs 比が一致していたことはチェルノブイリ原発事故の汚染によるものと推測できる。

6) 放射能濃度が25Bq/kg以上50Bq/kg以下の試料

放射能濃度が25Bq/kg以上50Bq/kg以下の試料の内訳を表6に示した。

食品中の低濃度放射能を調査するために、50Bq/kg以下についても測定を行い、各試料の重量及び測定時間から算出し、各試料の検出限界値までの値を示した。

放射能濃度が25Bq/kg以上50Bq/kg以下の試料はブラジルナッツ、黒胡椒末、セップ(ヤマドリタケ)の3試料であった。

ナッツ類、香辛料、キノコは過去においても放射能汚染がよく発見されたものであり、これらの食品についても監視を緩める事はできないものとする。

ま と め

チェルノブイリ原子力発電所爆発事故による放射能汚染食品の排除及び実態調査のため、1994年4月から1995年3月までに都内で流通していた輸入食品等334試料について放射能濃度を調査した。

NaI(Tl)シンチレーションディテクタによる従来の測定法に加えて、波高分布を取り入れ測定を行った。同定に良好な結果が得られた。

放射能濃度が50Bq/kgを超えて検出された試料は4試料(1.2%)であり、その中に暫定限度値370Bq/kgを超えて検出されたものが1試料あった。

50Bq/kgを超えて検出された食品群はキノコ類の2試

料、蜂蜜及びハーブ類各1試料であった。原産国はそれぞれフランス、イタリア及びチェコスロバキアであった。放射能濃度は暫定限度値を超えたピエ・ド・ムトン(カノシタ)が830Bq/kg、蜂蜜(栗の花)181Bq/kg、ホーソソリーフ166Bq/kg及びジロル(アンズタケ)134Bq/kgであった。

放射能濃度が25Bq/kgから50Bq/kgの試料はブラジルナッツ、黒胡椒末及びセップ(ヤマドリタケ)の計3試料であった。

100Bq/kgを超えて検出された試料の核種分析では ^{134}Cs ： ^{137}Cs の割合が1：30前後であり、放射能半減期から考えて、チェルノブイリ事故による放射能汚染の食品と考えられた。

今後、チェルノブイリ事故による放射能汚染は、キノコ等自然環境に依存度の高い食品や蜂蜜等長期保存可能食品において認められ、その他の食品においてはほとんど無いものとする。しかし、いままも続いている放射能汚染の実態と、国の検疫の網を通過してしまう事実に対し、我々は最低限厚生省通達(平成5年1月11日衛検第10号⁹⁾)による品目について、監視を強化し有害食品の排除に努めなければならない。

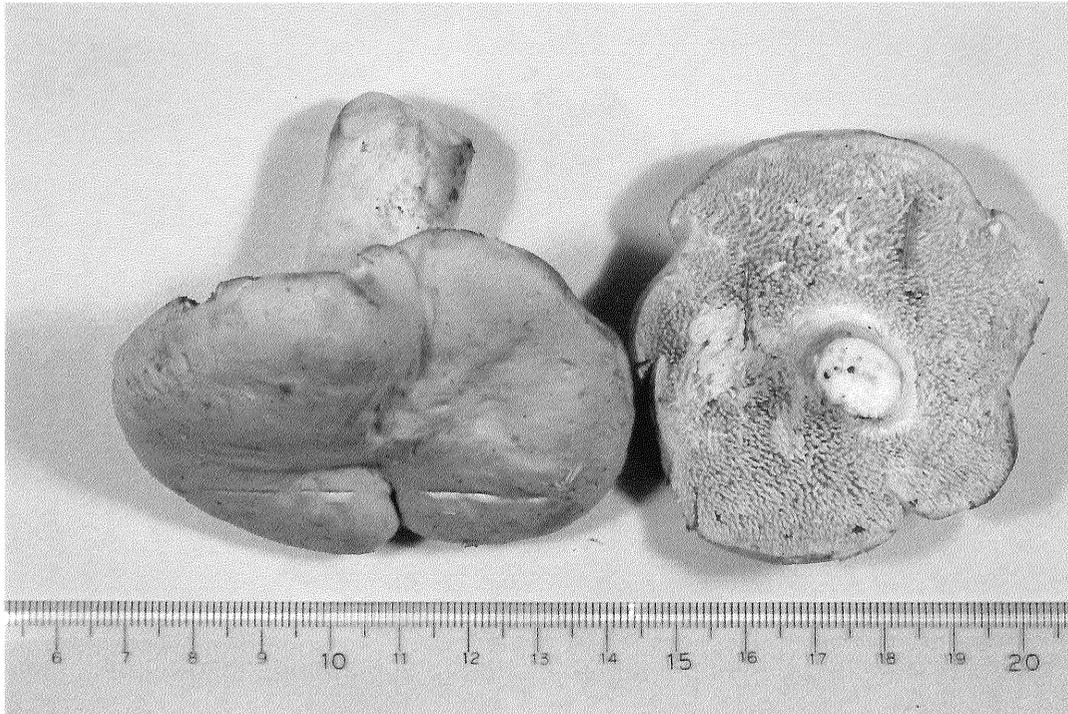
また、核保有国が核爆発実験の再開を宣言していることで再度世界的な放射能汚染が懸念され、監視の継続が望まれる。

文 献

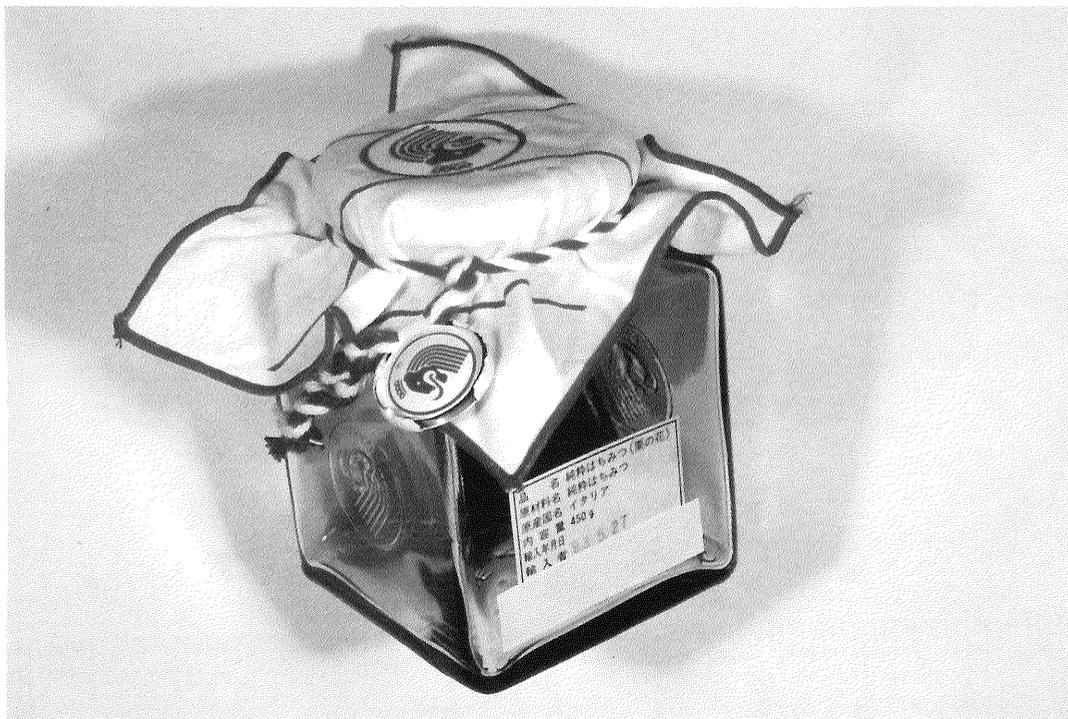
- 1) 検疫所における輸入食品の食品衛生法違反事例、厚生省生活衛生局食品保健課、事務連絡、平成7年2月13日。
- 2) 観 公子、真木俊夫、永山敏廣、他：東京衛研年報、41、113-118、1990。
- 3) 観 公子、真木俊夫、橋本秀樹、他：東京衛研年報、42、152-161、1991。
- 4) 観 公子、真木俊夫、橋本秀樹、他：東京衛研年報、43、142-148、1992。
- 5) 観 公子、真木俊夫、橋本秀樹、他：東京衛研年報、44、166-173、1993。
- 6) 観 公子、冠 政光、橋本秀樹、他：東京衛研年報、45、105-109、1994。
- 7) Korky J.K., Kowaiki L. : *J. Agric. Fd. Chem.*, 37, 568-569, 1989。
- 8) 杉山英男：第21回放医研環境セミナー予稿集、27-28、1993。
- 9) 厚生省生活衛生局：食品衛生小六法、平成6年版、2528-2529、1993。

表6. 放射能濃度が25Bq/kg以上50Bq/kg以下の試料

No	品 名	検出値(Bq/kg)		原産国	製造または 輸入年月日
		^{134}Cs	^{137}Cs		
1	ブラジルナッツ	40		ブラジル	1994.03.07
2	黒胡椒末	31		不 明	不 明
3	セップ(ヤマドリタケ)(生)	28		フランス	1994.12.07



1. ピエ・ド・ムトン(カノシタ) (生) PIEDS DE MOUTON



2. 蜂蜜 (栗の花)



3. ホーソソリーフ (ハーブ) HAWTHORN LEAVES



4. ジロル (アンズタケ) (生) GIROLLES

輸入農産物中の残留農薬実態調査 — 平成6年度 —

小林麻紀*, 永山敏廣*, 伊藤正子*,
田村康宏*, 塩田寛子**, 田村行弘***

Survey of Pesticide Residues in imported Crops — Apr. 1994. ~ Mar. 1995. —

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

Pesticide residues in 250 imported crops 6 organophosphorus insecticides residues were detected at trace-0.14ppm. Organochlorine pesticides of fungicide was found at 0.01-0.06ppm.

In the others two carbamate insecticides, one fungicide and one herbicide were present at 0.02-4.5ppm, 0.01-0.24ppm, and 0.01-1.7ppm.

Methomyl in tarragon apaeceeded the maximum limit in the standards for withholding registration.

The Residues of these pesticides were less than the tolerance for pesticide residues in Japan and FAO/WHO tolerances for residues.

Differences in pesticide content in five regions have decreased, but have increased in regions carbamate pesticides have been found.

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, 収穫後使用 postharvest application

緒 言

近年, 生鮮青果物の輸入が急増しており¹⁻⁴⁾, 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。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⁵⁻¹²⁾。今回は平成6年度の調査結果を報告する。

実験の部

1. 試料

平成6年4月から平成7年3月にかけて東京都内に入荷した輸入野菜・果実類等77種250品目について調査し

た。これら農作物の特徴及び品目数の内訳をTable 1に示した。なお, 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, クロルフェンピホス(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, フェントロ

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

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

** 同理化学部医薬品研究科

*** 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市紫崎町 3-16-25

*** Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 japan

Table 1. The List of Investigated Imported Crops

Commodities	
Vegetables	Artichoke (1) ¹⁾ , Treviso (5), Brussels sprouts [MEKYABETU] ²⁾ (1), Chicory (4), Lettuce [RETASU] (1), Saboi [CHIRIMENKYABETU] (1), Spinach [HORENSO] ²⁾ (2), Tarragon (1), Fennel [UIKYO] (2), Carrot [NINJIN] ²⁾ (2), Horse radish [SEIYOWASABI] (1), Indian lotus [RENKON] ²⁾ (1), Asparagus ²⁾ (5), Garlic (2), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] ²⁾ (14), Leek [RIKI] (3), Onion [TAMANEGI] ²⁾ (4), Salsify [SEIYOGOBO] ²⁾ (4), Shallot [ESHAROTTO] (5), Celery (2), Okra (2), Pimento [PIMAN] ²⁾ (13), Pumpkin [KABOCHA] (12), Summer squash [ZUKKINI] ²⁾ (1), Tomato (2), Broccoli ²⁾ (4), Baby corn (5), Cauliflower ²⁾ (1), Sweet corn ²⁾ (1), Broad bean [SORAMAME] ¹⁾ (1), Chinese pea [SAYAENDO] ²⁾ (1), String pea [SAYAINGEN] ²⁾ (3), Green soybean [EDAMAME] ²⁾ (4), Other bean ²⁾ (1), Potato ³⁾ (1), Mashed potato (4), Taro [SATOIMO] ²⁾ (1)
Fruits	37 species 118 crops
Citrus ⁴⁾	Grapefruit (6), Lemon (5), Lime (3), Orange (5) 4 species 19 crops
Others	Apple (7), Avocado ⁴⁾ (1), Banana ⁴⁾ (12), Cherry [SAKURANBO] (6), Grape [BUDO] (2), Kiwifruit ⁴⁾ (5), Litchi ⁴⁾ (1), Chestnut [MUKIGURI] (2), Mango ⁴⁾ (4), Melon ⁴⁾ (3), Papaya ⁴⁾ (3), Persimmon [KAKI] (1), Pineapple ⁴⁾ (4), Pomegranate [ZAKURO] ⁴⁾ (2), Strawberry [ICHIGO] (3) 15 species 57 crops
Beans	Soybean [DAIZU] (5), Small red bean [AZUKI] (1), Coffee bean (3), Other beans ⁵⁾ (5) 7 species 14 crops
Mushrooms	Shiitake fungus [SHIITAKE] (4) 1 species 4 crops
Nuts	Almond (1), Brazil nut (1), Cashew nut (1), Hazelnut (1), Peanut (1), Pine seed [MATYUNOMI] (1), Walnut (1) 7 species 7 crops
Cereals	Flour [KOMUGIKO] (5), Malt [BAKUGA] (9), Corn [TOMOROKOSHI] (2), Corngrits (4), Corn meal (1), Buckwheat [GENSOBA] (5), Buckwheat flour [SOBAKO] (5) 7 species 31 crops
Total 77 species 250 crops	

- 1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
 2) include the cut or frozen commodity
 3) precooked frozen potato
 4) This sample is analyzed both whole and flesh.
 5) Other beans have 3 kinds of bean.

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, 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), テトラクロルピリホス (CVMP), テルブホス, プロチオホス, 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), フェンスルホチオン, エトプロホス, エトリムホス, エディフェンホス (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31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), デイルドリン, アルドリン, エンドリン, キャプタン, カプタホール(ダイホルタン), クロルベンジレート, ジコホール(ケルセン), イプロジオン, エンドスルファン(-I, -II; α -, β -ベンゾエピン), ピンクロゾリン, ジクロラン(CNA), メトキシクロル

計20種
 (3) カーバメイト系農薬: カルバリル(NAC), カルボフラン, アルジカルブ, エチオフェンカルブ, オキサミル, ジエトフェンカルブ, ピリミカーブ, ベンダイオカルブ, イソプロカルブ(MIPC), クロルプロファミ(CIPC) 計10種
 (4) その他の農薬: トリクロロエタン, 2,4-D, イマザリル, ビテルタノール 計4種
 総計65種

これらのうち、穀類は有機リン系農薬について、柑橘類は有機リン系、カーバメイト系及びその他の農薬について調査した。また、アジンホスメチル, CNA, メトキシクロル及びトリクロロエタンは、米国における収穫後使用認可農薬であるため、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認可農薬である

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質量分析計：Finigan Mat 社製 Incos-50, TRACKER

(5) 原子発光検出器：Hewlett Packard 社製 A E D HP5921A

(6) 粉碎器：(有)廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

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¹³⁾, 増補残留農薬分析法¹⁴⁾及び残留農薬分析法Draft¹⁵⁾等に準じた。

また, これらに分析法が記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¹⁶⁾。

結果及び考察

1. 農薬残留実態

77種250作物中12種45作物(検出率18%, 以下同様)から12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・果実類はTable 2に, 柑橘類はTable 3に, 穀類はTable 4に示した。

(1) 野菜類

野菜類では, 37種118作物中2種2作物(1.7%)から2種の農薬が検出された(Table 2)。

食品衛生法による残留基準のある農薬は検出されな

Table 2. Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Vegetables						
Okura	Thailand	4	1	NAC	0.49	
Tarragon	France	1	1	Methomyl	4.5	0.5 ¹⁾
Fruits						
Apple	Newzealand	2	2	Chlorpyrifos	0.02, 0.03	1 ²⁾ , 1 ³⁾
	USA	5	1	Chlorpyrifos	0.03	1.5 ⁴⁾
Banana (whole)	Ecuador	5	4	Bitertanol	0.07, 0.07, 0.11, 0.11	0.5 ²⁾ , 0.5 ³⁾
	Philippines	7	4	Bitertanol	0.02, 0.05, 0.09, 0.13	
(flesh)				Chlorpyrifos	Tr ⁵⁾ , 0.02, 0.03	
	Ecuador	5	1	Bitertanol	0.03	
Cherry	Philippines	7	4	Bitertanol	0.01, 0.03, 0.09, 0.10	
	USA	6	4	Iprodione	0.01, 0.06	10 ¹⁾ , 20 ⁴⁾
Litchi (whole)				NAC	0.21, 0.33	10 ⁴⁾
	Taiwan	1	1	NAC	0.06	0.1 ⁴⁾
(flesh)		1	1	NAC	0.03	
Kiwifruits						
(whole)	Newzealand	4	2	Chlorpyrifos	0.03	2 ²⁾ , 2 ³⁾
Strawberry				Diazinon	0.02	0.5 ⁵⁾
	USA	3	1	NAC	0.02	10 ⁴⁾

1) standard for withholding resistration

2) tolerance for pesticide residue

3) FAO/WHO tolerance for residues

4) tolerance in each country

5) Tr:below 0.01ppm

かった。

検出された農薬は、NAC(検出作物名:オクラ)及びメソミル(タラゴン)であり、いずれもカーバメイト系殺虫剤であった。タラゴンから検出されたメソミルには、環境庁の登録保留基準が設定されているが、今回の検出値は、基準値0.5ppmの9倍であった。メソミルは、国内産からはピーマン及び食用菊などから検出される傾向がある^{17,18,19)}。一日摂取許容量(ADI)が0.01mg/kg/dayの劇物であるが、比較的分解の速い農薬であり、水洗いなどによっても若干除去される²⁰⁾。また、多量のタラゴンを継続的に喫食することは少ないので、特に問題はないと考える。しかし、今後過量の農薬が残留しないよう注意深く観察する必要がある。

一方、非常に検出率の高かったポテト中のCIPCが一昨年度¹¹⁾と同様、全く検出されなかった。検査を行ったポテトは全て冷凍フライドポテト及びマッシュポテトなどの半加工品である。従って、原料となったポテトの収穫時期及び保存方法などは特定できないが、ポテトからのCIPCの検出率が低くなった原因として、収穫後直ちに加工されたか、あるいは、CIPCを使用しない保存方法が用いられたことによるとも考えられる。

(2) 果実類(柑橘類を除く)

15種57作物中6種26作物(46%)から5種の農薬が検出された(Table 2)。

喫食に供さない果皮を含む全果から、比較的多数の農薬が検出された。残留基準値のある農薬では、クロルピリホス(リンゴの全果、バナナの全果、キウイの全果)、ピテルタノール(バナナの全果)及びイプロジオン(チェリー)が5種16検体から検出された。いずれも基準値以内であった。

ピテルタノールは、昨年度¹²⁾バナナから高頻度で検出された殺菌剤である。今年度は検出率67%、検出値0.02~0.24ppm(平均:0.11ppm)の範囲で検出された。昨年度の検出率89%、検出値0.10~0.79ppm(0.35ppm)よりは減少しており、今後の推移に留意する必要がある。イプロジオンは、過去の検査結果においてチェリーからの検出頻度の高い農薬である⁸⁻¹²⁾。平成7年1月1日から残留基準値10ppmが適用されたが、今回の検出値はその1/100及び1/60であり、喫食上特に問題はない。

基準値の設定されていない農薬では、カーバメイト系殺虫剤のNAC(チェリー、ライチ及びイチゴ)が3種3検体から検出された。その検出値は、FAO/WHO及び原産国の最大残留許容量以内であった。

(3) 豆類、キノコ類及び種実類

豆類、キノコ類及び種実類からは昨年度¹²⁾と同様農薬は検出されなかった。過去の調査結果では、中国産のものから比較的良好に総BHCなどの有機塩素系農薬が検出された^{8,10,11)}。しかし、総BHCは中国では1980年代頃から使用されなくなったと推察されることから、土壤残留量が減少したことにより、ほとんど検出されなくなったと考える。また、原産国の使用農薬の変化及び調査対象作物の違いなど種々の要因に起因するとも考えられ、今後さらに動向を注意深く観察する必要がある。

(4) 柑橘類

4種19作物中4種15作物(79%)から6種の農薬が検出された(Table 3)。

残留基準値のある農薬では、クロルピリホス(レモンの全果)及びイマザリル(グレープフルーツ、レモン、ライム及びオレンジ)が検出された。検出値はいずれも基準値以内であった。

イマザリルは、平成4年度¹¹⁾まで検出率及び検出値とも減少傾向にあったが、食品添加物使用基準による残留量の規制及び残留基準値が設定された平成5年度¹²⁾は検出率77%、検出値0.01~2.8ppm(平均値0.73ppm)であり、今年度は検出率79%、検出値0.01~3.0ppm(1.1ppm)とわずかではあるが増加している。今後も引き続き、使用頻度及び残留状況の動向を把握していく必要がある。

登録保留基準のある農薬では、エチオン(グレープフルーツ)及びDMTP(オレンジ)が検出された。いずれも基準値以内であった。これら農薬は柑橘類から検出されやすいが、過去の調査結果からもその残留量は比較的少ない^{8-12,21,22)}。

2,4-Dは、3作物(グレープフルーツ及びレモン)から検出され、検出率15%、検出値0.04~0.24ppm(0.12ppm)であった。いずれも米国及びFAO/WHOの許容量以内であった。調査当初から平成4年度までは検出率は31%から6%へ、また、検出量は平均値で0.03ppmから0.02ppmへとともに減少傾向が認められた⁹⁻¹¹⁾。しかし、平成5年度以降、検出量が平均値で0.05ppmから0.12ppmと増加し、また今年度は過去最も高い値検出値0.24ppmを検出するなど、検出量の増加が認められた。

(5) 穀類

7種31作物中2種4作物(13%)から3種の農薬が検出された(Table 4)。

残留基準のある農薬では、ピリミホスメチル(麦芽)、MEP(麦芽)及びクロルピリホス(オートミール)が検出された。いずれも基準値以内であった。

Table 3. Pesticide Residues in Citrus Fruits

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)	
Grapefruits (whole)	USA	4	4	Ethion	0.01, 0.05	2 ¹⁾ , 2 ²⁾ , 0.3 ³⁾	
				2,4-D	0.08	2 ¹⁾ , 5 ²⁾	
				Imazalil	0.12, 0.77, 0.83	5 ¹⁾ , 10 ²⁾ , 5 ⁴⁾	
				NAC	0.05	7 ¹⁾ , 10 ²⁾	
	Swaziland	2	2	Imazalil	0.22, 0.44		
	(flesh)	USA	4	1	Imazalil	0.05	
Swaziland		2	1	Imazalil	0.06		
Lemon (whole)	USA	4	3	Chlorpyrifos	0.05	0.3 ¹⁾ , 1.0 ²⁾ , 0.3 ⁴⁾	
				Imazalil	0.57, 0.83, 2.8, 3.0	5 ¹⁾ , 10 ²⁾ , 5 ⁴⁾	
				2,4-D	0.04, 0.24	2 ¹⁾ , 5 ²⁾	
	(flesh)	USA	4	3	Imazalil	0.07, 0.20	2 ¹⁾ , 5 ²⁾
					2,4-D	0.01, 0.02	
	Lime (whole)	Mexico	3	1	Imazalil	0.01	5 ¹⁾ , 10 ²⁾
Orange (whole)	USA	5	5	DMTP	0.05, 0.14	2 ¹⁾ , 2.0 ²⁾ , 0.3 ³⁾	
				Imazalil	0.57, 0.85, 0.99, 1.2, 1.7	5 ¹⁾ , 10 ²⁾ , 5 ⁴⁾	
				NAC	0.21	7 ¹⁾ , 10 ²⁾	
(flesh)	USA	5	3	Imazalil	0.04, 0.04, 0.14		

- 1) FAO/WHO tolerance for residues
- 2) tolerance in each country
- 3) standard for withholding registration
- 4) tolerance for pesticide residue

Table 4. Pesticide Residues in Cereals

Crops	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Malt	Australia	2	1	MEP	0.04	1 ¹⁾
	Newzealand	1	1	MEP	0.09	
	England	2	1	Pirimiphos-methyl	0.03	1 ¹⁾
Corn meal	USA	1	1	Chlorpyrifos	Tr ²⁾	3.0 ¹⁾

- 1) tolerance for pesticide residue
- 2) Tr: below 0.01ppm

穀類からは、収穫後の使用が認められている、ピリミホスメチル及びMEPなどの有機リン系殺虫剤が比較的検出されやすい⁸⁻¹²⁾。

検出率は、昨年度と同様10%前後であり、過去と比較して減少傾向が認められた⁸⁻¹²⁾。これは、貯蔵及び輸送

中の設備や保存条件の変化などが要因として考えられる。

2. 地域別による比較

輸入農産物の原産国を前報¹²⁾と同様5地域に分類し、地域別に農薬の検出状況をまとめてTable 5に示した。

農薬の検出率は、調査対象作物数の少ないアフリカ産

Table 5. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No. of samples	No. of positive samples					Total	Detected rate (%)	
		Organophosphorus	Organochlorine		Carbamate				Others
		insecticides	insecticides	fungicides	insecticides	herbicides			
America	110	6(3) ¹⁾	0	2(1)	5(1)	0	18(2)	25(7)	23
Asia	61	3(1)	0	0	2(1)	0	7(1)	9(3)	15
Oceania	26	6(3)	0	0	1(1)	0	0	8(5)	31
Europe	51	1(1)	0	0	1(1)	0	0	1(1)	2
Africa	2	0	0	0	0	0	2(2)	2(2)	100
Total	250	15(5)	0	2(1)	8(2)	0	27(3)	45(12)	18

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

を除くと、前年度と同様、オセアニア産が最も高く、次いでアメリカ産、アジア産及びヨーロッパ産の順であった。ヨーロッパ産の検出率が昨年度の20%から2%に減少した。これは使用農薬の種類及び使用方法、調査対象作物の違いなどによると考えられる。

各地域ともに、有機リン系殺虫剤及びカーバメイト系殺虫剤の検出される頻度が高い傾向が認められた。一方、有機塩素系殺菌剤はアメリカ産のみから検出され、また、有機塩素系殺虫剤を検出した地域はなく、有機リン系殺虫剤の検出率も減少傾向にある。しかし、カーバメイト系殺虫剤が昨年度同様4地域で検出され、広い範囲で使用されていることが推察された。

昨年度に引き続き、使用される農薬の種類は地域差が縮まる傾向が認められた。これは、各地域で使用されている農薬の種類及び使用方法がより細分化され、農作物ごとに適用農薬を変えるなど、先進国の技術が導入されつつあるとも推察されるが、他方、種々の農薬が様々な地域で使用される傾向を示しているとも考えられる。調査対象作物の違いや天候の影響などにもよるが、今後さらに実態把握に努め、推移を明らかにする必要がある。

まとめ

1994年4月から1995年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等77種250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

6種の有機リン系殺虫剤が痕跡～0.14ppmの範囲で検出された。

有機塩素系農薬では1種の殺菌剤が0.01～0.06ppmの範囲で検出された。

その他の農薬では、2種のカーバメイト系殺虫剤が0.02～4.5ppm、1種の除草剤が0.01～0.24ppm及び1種の殺菌剤が0.01～1.7ppmの範囲で検出された。

タラゴンから検出されメソミルは登録保留基準値を超

えていた。しかし、食品衛生法による残留基準値、FAO/WHOの定めた最大残留許容量及び各輸出国の農薬許容量を超えたものではなく、喫食上特に問題となる農作物はなかった。

2. 地域別による比較

検出された農薬に地域による差が小さくなる傾向が認められた。

また、カーバメイト系殺虫剤の検出される地域の増加が認められた。

本調査は東京都衛生局食品環境指導センターと共同で行ったものである。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局検疫所業務管理室輸入食品監視情報検討会、厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1989—統計に見る食品輸入の実態—、1990、(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・パイナップルその他)、1994、(社)日本青果物輸入安全推進協会、東京。
- 3) 1994年度(平成6年)輸入青果物統計資料(バナナ・シトラス・パイナップルその他)、1995、(社)日本青果物輸入安全推進協会、東京。
- 4) 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。
- 5) 永山敏廣、田村行弘、真木俊夫他：東京衛研年報、**34**、165-170、1983。
- 6) 永山敏廣、観 公子、田村行弘他：東京衛研年報、**35**、210-218、1984。
- 7) 永山敏廣、真木俊夫、観 公子他：食衛誌、**30**、438-443、1989。
- 8) 永山敏廣、真木俊夫、川合由華他：東京衛研年報、**41**、125-132、1990。
- 9) 永山敏廣、小林麻紀、塩田寛子他：東京衛研年報、

- 42, 134-140, 1991.
- 10) 塩田寛子, 永山敏廣, 小林麻紀他: 東京衛研年報, 43, 130-136, 1992.
- 11) 小林麻紀, 永山敏廣, 塩田寛子他: 東京衛研年報, 44, 155-161, 1993.
- 12) 塩田寛子, 永山敏廣, 小林麻紀他: 東京衛研年報, 45, 98-104, 1994.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 未発表.
- 17) 塩田寛子, 永山敏廣, 小林麻紀他: 東京衛研年報, 44, 150-154, 1993.
- 18) 小林麻紀, 永山敏廣, 塩田寛子他: 東京衛研年報, 45, 92-97, 1994.
- 19) 伊藤正子, 永山敏廣, 小林麻紀他: 東京衛研年報, 46, 127-133, 1995.
- 20) 「植物防疫講座 第2版」編集委員会: 植物防疫講座 第2版—農薬・行政編一, 229, 1989, (社)日本植物防疫協会, 東京.
- 24) 佐藤正幸, 長南隆夫, 内藤深雪他: 道衛研所報, 43, 18-24, 1993.
- 25) 食品環境部: 広島市衛研年報, 9, 82-83, 1990.

野菜・果実中の残留農薬実態調査 —平成6年度—

伊藤正子*, 永山敏廣*, 小林麻紀*
田村康宏*, 塩田寛子**, 田村行弘***

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits — Apr. 1994 ~ Mar. 1995 —

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

The presence of pesticide residues in 30 crops and 20 organic cultivation crops was investigated. Residues in 3 organophosphorus insecticides, 3 carbamate insecticides and 2 organochlorine fungicides were found. Organophosphorus insecticide (prothiofos and dimethoate), carbamate insecticide (BPMC, methomyl and thiodicarb) and organochlorine fungicide (procymidone and TPN) levels were 0.03-0.04 ppm in 2 crops, at trace - 2.4 ppm in 5 crops and 0.06-6.7 ppm in 3 crops, respectively.

Thiodicarb in chrysanthemum (relish) and TPN in lettuce exceeded maximum limits of standards for withholding registration.

Residues of organophosphorus insecticides (DMTP), carbamate insecticides (methomyl) and organochlorine fungicides (procymidone and TPN) in 3 and 4 organic cultivation crops were detected respectively, at concentrations of 0.01-0.38 ppm.

Keywords : 残留農薬 pesticide residues, 野菜 vegetables, 果実 fruits, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticides, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, カーバメイト系農薬 carbamate pesticides, 殺虫剤 insecticides, 殺菌剤 fungicides, 無農薬栽培 organic cultivation

緒言

著者らは、生鮮野菜・果実類における農薬の残留実態調査を行ってきた¹⁻¹⁴⁾。今回は平成6年度の残留農薬の調査結果を報告する。

近年、消費者の農作物中の残留農薬に対する関心が高まり、無・減農薬栽培と表示された野菜・果実類の市販が増えつつある。農林水産省は1993年4月に「有機農産物に係わる青果物等特別表示ガイドライン」を設定し、これらの作物の生産・流通の円滑化を図り、消費者の商

品選択に役立つように表示方法などを定めた。

しかし、これら無・減農薬栽培表示作物中の農薬実態はほとんど明らかにされていない。そこで、これらの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い野菜・果実等を中心に残留農薬の調査をしたので、併せて報告する。

実験の部

1. 試料

(1) 慣行栽培(一般流通)野菜・果実類

* 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

** 同理化学部医薬品研究科

*** 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

1994年4月から1995年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実及び食用花など13種30作物について調査した。

(2) 無・減農薬栽培野菜・果実類

1994年4月から1995年3月にかけて、無・減農薬栽培と表示され東京都内に入荷した野菜・果実など10種20作物について調査した。

2. 調査農薬名

(1) 有機リン系農薬：EPN, クロロピリホス, クロロフェンピホス (CVP-E及び-Z), ジクロロボス (DDVP), ジメトエート, ダイアジノン, パラチオン, パラチオンメチル, 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, トリクロロホン (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), クロロピリホスメチル, ホルモチオン, プロチオホス, メチダチオン (DMTP), テトラクロロピホス (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36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), op'-DDT, デイルドリン, 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 -及び β -ベンゾエピン), クロロベンジレート, 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, ピンクロゾリン, イプロジオン, クロロニトロフェン (CNP)

計25種

(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, ピリミカルブ, フェノブカルブ (BPMC), ベンダイオカルブ, メソミル, イソプロカルブ (MIPC), チオベンカルブ

計13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, ピテルタノール, フルシトリネート

計5種

総計79種

3. 機器

(1) ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-9A (検出器 ECD), 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), 3400 (検出器 FPD及び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 ウォーターズ社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, Traker™ System

(5) 原子発光検出器：Hewlett Packard社製 AED HP 5921A

4. 分析方法

前報⁶⁾に従った。

結果及び考察

1. 慣行栽培野菜・果実類

(1) 有機リン系農薬

野菜・果実13種30作物中2作物 (検出率：7%, 以下同様) から殺虫剤プロチオホス及びジメトエートを0.04及び0.03ppm検出した (Table 1).

プロチオホス (検出作物名：ピーマン), ジメトエート (レタス) は共に厚生省が定めた残留農薬基準はないが, 今回の検出値は, 他の野菜の基準値 (0.1ppm及び1.0ppm) の2/5及び3/100であった. レタスやピーマンは生でそのまま喫食されることがあるが, 特にジメトエートは水洗いによって残留量が半減する農薬であるため¹⁵⁾, 喫食時における残存量は非常に少ないと考えられる. プロチオホスは普通物であり, 急性毒性は低い. また, 1日摂取許容量 (ADI) は0.0015mg/kgで, 今回のピーマンからの検出量は, 体重50kgの人で約1.9kgを毎日継続して喫食する量に相当する. いずれも, 喫食する上で特に問題はないと考える.

(2) カーバメイト系農薬

カーバメイト系農薬は殺虫剤であるチオジカルブ (小菊), BPMC (食用菊) 及びメソミル (レタス及び小菊) の3農薬が, 3種3作物 (10%) から0.06~6.7ppmの範囲で検出された.

食用菊から検出された BPMC は残留農薬基準値 (0.3ppm) 以内であった. メソミル及びチオジカルブは残留農薬基準は設定されていないが, 登録保留基準が設定されている. レタス及び刺身のつまとして用いられる小菊から検出されたメソミルは基準値 (0.5ppm) 以内であったが, 小菊から検出されたチオジカルブは基準値 (2ppm) の3倍以上の残留が認められた. チオジカルブ

Table 1. Residues of Organophosphorus¹⁾ and Carbamate²⁾ Pesticides in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Organophosphorus Insecticide		Carbamate Insecticide		
			Prothiofos (ppm)	Dimethoate (ppm)	Thiodicarb (ppm)	BPMC (ppm)	Methomyl (ppm)
Vegetable							
Pimento [PIMAN]	3	1	0.04	— ³⁾	—	—	—
Mini tomato	2	0	—	—	—	—	—
Carrot [NINJIN]	4	0	—	—	—	—	—
Lettuce [RETASU]	5	2	—	0.03	—	—	0.44
Eggplant [NASU]	1	0	—	—	—	—	—
Cucumber [KYURI]	3	0	—	—	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage [KOMATUNA]	1	0	—	—	—	—	—
Tomato	2	0	—	—	—	—	—
Spinach [HORENSO]	1	0	—	—	—	—	—
Chinese lettuce [HAKUSAI]	1	0	—	—	—	—	—
Edibleflower							
Chrysanthemum [SYOKUYOGIKU]	3	1	—	—	—	0.06	—
Chrysanthemum (relish) [KOGIKU]	1	1	—	—	6.7	—	0.15
Fruit							
Grape [BUDO]	3	0	—	—	—	—	—

1) Insecticides : Chlorpyrifos, CVP, dimethoate, EPN, parathion, parathion-methyl, MEP, MPP, PAP, phosalone, DEP, DDVP, diazinon, salithion, EPBP, ethylthiometon, ECP, CYAP, formothion, chlorpyrifos-methyl, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, pirimiphos-methyl, PMP, pyridaphenthion, dialifol and malathion are investigated.

Fungicides : EDDP and IBP are investigated.

2) Insecticides : Aldicarb, bendiocarb, diethofencarb, ethiofencarb, NAC, BMC, methomyl, oxamyl, pirimicarb, MIPC and thiodicarb are investigated.

Herbicides : Thiobencarb is investigated

3) — : not detected

は ADI が 0.03mg/kg の劇物である。しかし、小菊は刺身の飾りとして添えられるもので、通常多量に喫食するものではなく特に問題にはならない。また、メソミルはチオジカルブの分解物としても知られている¹⁶⁾。今回の検出はチオジカルブに由来している可能性が考えられる。

菊花のような花卉が多く重なり合ったものや、ハクサイの様に葉が巻かれている作物の場合、一度隙間に農薬が入ると雨や光の暴露を受けにくいので残留しやすくなる。農薬の正しい使用法の遵守や使用方法の改善が望まれる。今回は平成 5 年度の調査で小菊から検出されたチオジカルブの残留量 9.0ppm に比べて少ないが、接触した他の食品への移行も考えられることから、今後とも引き続き残留農薬実態の把握に努めていく必要があると考える。

(3) 有機塩素系農薬

有機塩素系農薬では 3 種 5 作物 (17%) から殺菌剤であるプロシミドン (ピーマン及びキュウリ) 及び TPN (レタ

ス及びキュウリ) を痕跡 ~ 2.4ppm の範囲で検出した (Table 2)。

プロシミドン及び TPN はいずれも残留基準は設定されていないが、登録保留基準が設定されている。プロシミドンはピーマン及びキュウリから痕跡 ~ 0.09ppm 検出されたが、登録保留基準値 (2 ppm) の 1/20 以下であった。TPN は、キュウリでは登録保留基準値 (1 ppm) の 1/100 量であったが、レタス 2 作物中 1 作物は基準値の 2 倍以上の残留が認められた。TPN は過去の調査においても登録保留基準を超えて検出される例が多く⁶⁻¹³⁾、今後とも残留実態の動向を見守る必要がある。TPN は、水洗いによって除去されやすいため¹⁵⁾、喫食前によく水洗いすることによってそのほとんどを取り除くことができると考える。

除草剤は CNP について調査したが、いずれからも検出されなかった。

Table 2. Residues of Organochlorine Pesticides¹⁾ in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Procymidone (ppm)	TPN (ppm)
Vegetable				
Pimento	3	2	Tr ²⁾ , 0.01	— ³⁾
Mini tomato	2	0	—	—
Carrot	4	0	—	—
Lettuce	5	2	—	Tr.2.4
Eggplant	1	0	—	—
Cucumber	3	1	0.09	0.01
Young leaves of chinese cabbage	1	0	—	—
Tomato	2	0	—	—
Spinach	1	0	—	—
Chinese lettuce	1	0	—	—
Edibleflower				
Chrysanthemum	3	0	—	—
Chrysanthemum (relish)	1	0	—	—
Fruit				
Grape	3	0	—	—

1) Fungicides : Captan, captafol, procymidone, TPN, vinclozolin and iprodione are investigated.

Insecticides : T-BHC (total of α , β , γ , δ -BHC), T-DDT (total of pp'-DDT, pp'-DDE and pp'-DDD), op'-DDT, dieldrin, aldrin, endrin, α - and β -benzoepin, chlorobenzilate, dicofol, heptachlor and heptachloronoxide are investigated.

Herbicides : CNP is investigated.

2) Tr : below 0.01 ppm

3) — : not detected

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10種20作物について調査したところ、3種3作物(15%)から有機リン系殺虫剤1種、カーバメイト系殺虫剤1種及び有機塩素系殺菌剤2種が検出された(Table 3)。今回検出されたDMTP(ミニトマト)、TPN(レタス)、プロシミドン(レタス)及びメソミル(ピーマン)には、残留基準は設定されていないが、いずれも登録保留基準は設定されている。このうちTPN、プロシミドン及びメソミルは基準値の2/5以下と低い値であったが、DMTPは基準値(0.1ppm)と同程度の残留が認められた。DMTPは慣行栽培では温州ミカンなどの柑橘類から比較的多く検出される¹⁷⁾。しかしミニトマトなどの果菜類からの検出は少なく、慣行栽培時と農薬の使用方法が違うことが推察された。またDMTPはADIが $\leq 0.005\text{mg/kg}$ の劇物であるが、水洗いで除去されやすい農薬¹⁵⁾なので通常の喫食では問題はないと考えられる。一方、メソミルはピーマンからよく検出される¹⁷⁾。これはADIが $\leq 0.01\text{mg/kg}$ の劇物であり、ピーマンは生食されることもあることから過量のメソミルが残留しないよう、留意する必要がある。また、このピーマンは表示ガイドラインによる有機農産物に該当するが、虫よけの目的に漢方薬を使用した旨の表示があった。今後、有機栽培、無及び減農薬栽培表示の適正化のため、漢方薬などの天然農薬の使用動向も併せて調査検討していく必要があると考える。

Table 3. Residues of Pesticides¹⁾ in Organic Cultivathion Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Organophosphorus	Organochlorine		Carbamate
			Insecticide	Fungicide		Insecticide
			DMIP (ppm)	TPN (ppm)	Procymidone (ppm)	Methomyl (ppm)
Vegetable						
Pimento	4	0	— ²⁾	—	—	0.17
Mini tomato	3	1	0.14	—	—	—
Lettuce	4	1	—	0.01	0.38	—
Cucumber	2	0	—	—	—	—
Carrot	3	0	—	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage	1	0	—	—	—	—
Chinese cabbage	1	0	—	—	—	—
Tomato	1	0	—	—	—	—
Fruit						
Grape	1	0	—	—	—	—

1) 65 kinds of insecticides (organophosphorus : 34, organochlorine : 17, carbamate : 11, others : 3), 11 kinds of fungicides (organochlorine : 9, others : 2), 3 kinds of herbicides (organochlorine : 1, carbamate : 2)

2) — : not detected

Table 4. Details in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	Pesticide residues (ppm)
Pimento	Prothiofos (0.04) ¹⁾ , procymidone (Tr)
Cucumber	Procymidone (0.09), TPN (0.01)
Chrysanthemum (relish)	Thiodicarb (6.7), Methomyl (0.15)
Lettuce ²⁾	Procymidone (0.38), TPN (0.01)

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

2) Organically cultivated crop

なお、除草剤 CNP は、いずれの作物からも検出されなかった。

3. 農薬の複数残留実態

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、Table 4に示した。

複数残留はピーマン、キュウリ、小菊及びレタス(低農薬栽培)の4種4作物(8%)に認められた。ピーマンでは有機リン系殺虫剤と有機塩素系殺菌剤、キュウリ及び低農薬栽培表示のあったレタスから2種類の有機塩素系殺菌剤、小菊では2種類のカーバメイト系殺虫剤の組み合わせによる複数残留であった。

キュウリ及び小菊は平成5年度も農薬の複数残留が認められている。また、残留していた農薬は調査年度によって異なることから、今後も注意深く実態把握に努める必要があると考える。

ま と め

1994年4月から1995年3月までに都内に入荷した野菜・果実類14種50作物について、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. 慣行栽培野菜・果実類

有機リン系農薬は、プロチオホス及びジメトエートの2種が2種2作物から、0.04及び0.03ppm検出された。

カーバメイト系農薬では、チオジカルブ、BPMC及びメソミルが3種3作物から0.06~6.7ppmの範囲で検出された。

有機塩素系農薬では、プロシミドン及びTPNが3種5作物から痕跡~2.4ppmの範囲で検出された。

2. 無・減農薬栽培野菜・果実類

有機リン系農薬では、DMTPが1種1作物から0.14ppm検出された。

カーバメイト系農薬では、メソミルが1種1作物から0.17ppm検出された。

有機塩素系農薬では、プロシミドン及びTPNの2種が1種1作物から0.38及び0.01ppm検出された。

3. 農薬の複数残留実態

農薬の複数残留はピーマン、キュウリなど4種4作物に認められた。

いずれも農薬残留基準を超えたものはなく、通常の喫食では健康上特に問題にはならないと考えられる。

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。

和 文 要 旨

1994年から1995年3月までに都内に入荷した野菜・果実類30検体について、残留農薬実態調査を行った。

ピーマン1検体から有機リン系殺虫剤のプロチオホスが0.04ppm検出されました。またレタス1検体からはジメトエートが0.03ppm検出された。レタス、食用菊及び小菊からカーバメイト系殺虫剤チオジカルブ、BPMC及びメソミルが0.06~6.7ppmの範囲で検出された。また、ピーマン、キュウリ及びレタスから有機塩素系殺菌剤プロシミドン及びTPNが痕跡~2.4ppmの範囲で検出された。これらのうち、レタスから検出されたTPNと小菊から検出されたチオジカルブは登録保留基準を超えていた。

無・減農薬栽培作物として都内に内荷した野菜・果実類20検体について調査した。

ミニトマト1検体から有機リン系農薬DMTPが0.14ppm検出された。ピーマン1検体からカーバメイト系殺虫剤メソミルが0.17ppm検出された。レタス1検体から有機塩素系殺菌剤プロシミドン及びTPNが0.38ppm及び0.01ppm検出された。

いずれも、通常の喫食では健康上、特に問題にはならないと考える。

文 献

- 1) 小関正道, 島村保洋, 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, 舘 公子他: 東京衛研年報, 39, 130-138, 1988.
- 9) 永山敏廣, 真木俊夫, 舘 公子他: 東京衛研年報, 40, 155-162, 1989.
- 10) 永山敏廣, 真木俊夫, 舘 公子他: 東京衛研年報, 41, 119-124, 1990.
- 11) 永山敏廣, 真木俊夫, 舘 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) 小林麻紀, 永山敏廣, 塩田寛子他: 東京衛研年報, 45, 92-97, 1994.
- 15) 「植物防疫講座 第2版」編集委員会: 植物防疫講座 第2版—農薬・行政編一, 229, 1989, (社)日本防疫協会, 東京.
- 16) The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration: *Code of federal regulations* 40 Parts 150 to 189, 1990.
- 17) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子他: 食衛誌, 35, 652-660, 1994.

炊飯改良剤の品質調査

船山 恵市*, 安野 哲子*, 広門 雅子*, 平田 恵子*
植松 洋子*, 貞升 友紀*, 安田 和男*, 鈴木 助治*

Survey on Qualities of Foods and Food Additives for Improving the Cooking Properties of Rice Grains

KEIICHI FUNAYAMA*, TETSUKO YASUNO*,
MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, YOKO UEMATSU*,
YUKI SADAMASU*, KAZUO YASUDA* and SUKEJI SUZUKI*

Keywords: 食品添加物 food additives, 品質 quality, 改良 improvement, 米飯 rice, 分析 analysis, 植物油 plant oil, 酵素製剤 enzyme preparation, カルシウム製剤 calcium preparation, 重金属 heavy metal

緒 言

平成5年の冷夏による米の大凶作は、消費者の食卓に混乱を引き起こすとともに、比較的関心の薄かった米問題に、消費者の目を向けさせるのに十分なインパクトを与えた。その際に緊急輸入された外国産米は、国内産米しか食べたことのない消費者にとって、不安と新しい物に対する興味を引き起こさせるものであったが、現実問題としてその調理に困惑した消費者は多い。

また、外食産業、弁当製造業、飲食店などにとっては、その調理いかんでは死活問題にも発展しかねず、外国産米の調理法が大きな関心事となった。とりわけ、質の異なる外国産米と国内産米のブレンド米は、浸漬時間や加熱時間の調節などの炊飯技術の改善だけでは対応が困難であった。

そこで、炊飯前に添加し炊飯中に改善効果をもたらすように作られた、いわゆる炊飯改良剤と称せられる一連の食品添加物製剤及び食品が市販されるようになり、注目を集めるようになった。

本来、毎日食べる主食の米飯には、栄養素強化の目的以外に添加物を加えるという発想は少なく、今後これらの炊飯改良剤が日常的に使用されることとなると、衛生化学的見地からの品質評価が必要である。

そこで、一般家庭向けに市販されている炊飯改良剤について、各種理化学検査を行い、その品質について若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 試料 平成6年度に都食品機動監視班が都内小売り店、スーパー及びデパートより入手した炊飯改良剤12種19検体を試料とした。各試料についての分類、表示成分及び形態を表1に示す。

2. 分析方法 酸価、過酸化価、保存料(安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル類、サリチル酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸)、酸化防止剤〔ブチルヒドロキシアニソール及びジブチルヒドロキシルエン(以下BHA及びBHTと略す)〕は衛生試験法・注解¹⁾に準じた。総窒素はケルダール法、デンプンはヨウ素反応、レシチンは薄層クロマトグラフ法²⁾に従った。グリセリン脂肪酸エステル³⁾及びグリセリン⁴⁾はそれぞれ文献の方法に準じてガスクロマトグラフ法を用いた。サイクロデキストリン⁵⁾、アスコルビン酸ナトリウム⁶⁾、アスコルビン酸ステアリン酸エステル⁷⁾、ビタミンD⁸⁾、ビタミンE¹⁾及び麦芽糖⁹⁾は、それぞれ文献の方法に準じて高速液体クロマトグラフ法を用いた。 α -アミラーゼはデンプン糊精化力測定法¹⁰⁾、 β -アミラーゼはデンプン糖化力測定法¹¹⁾、プロテアーゼはタンパク消化力測定法¹²⁾を用いた。

また、液性、蒸発残留物、乾燥減量、強熱減量、塩酸不溶物及び炭酸塩は食品添加物公定書¹³⁾に従い、塩化物¹⁴⁾及び硫酸塩¹⁵⁾はそれぞれ文献の方法に準じてイオンクロマトグラフ法を用いた。

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

表1. 炊飯改良剤分析試料

分類	試料No.	表示成分	形態
植物油系	1-1~2	米油, 乳化剤 (レシチン)	油
	2-1~2	トウモロコシ胚芽油, 小麦胚芽油, ビタミンE, 被包剤 (ゼラチン, グリセリン)	油 (カプセル)
	3	食用トウモロコシ油, 食用ナタネ油, 乳化剤	油
	4	食用トウモロコシ油, グリセリンエステル, レシチン	油
	5	食用トウモロコシ胚芽油, 乳化剤 (レシチン等), 酸化防止剤 (ビタミンC), ビタミンE	油
酵素系	6	β -アミラーゼ (5%), 食品素材 (95%)	粉末
	7	プロテアーゼ (1.6%), α -アミラーゼ (0.08%), シクロデキストリン (6.0%), 食品素材 (92.32%)	粉末
デンプン系	8	もち種でん粉, 骨カルシウム (Ca 140mg/g), ビタミンD ₃ (50IU/g), 糊料 (キサンタンガム)	顆粒
カルシウム系	9-1~3	食用牡蠣殻粉	水溶液
	10-1~4	サンゴ未焼成カルシウム (99.5%), ビタミンCナトリウム (0.5%)	顆粒 (ティーバッグ)
寒天	11	海藻	粉末
木炭	12	炭	固形

ナトリウム, カリウム, カルシウム, マグネシウム, 鉄, リン, ストロンチウム, ホウ素, バリウム, ニッケル, 銅, 亜鉛, カドミウム, 鉛, マンガン, ヒ素, アルミニウム, スズ, コバルト, クロム及び水銀 (以下Na, K, Ca, Mg, Fe, P, Sr, B, Ba, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Mn, As, Al, Sn, Co, Cr及びHgと略す)は原子吸光光度法^{1,16)}あるいは誘導結合プラズマ発光分光分析法^{1,14)}を用いた。

試料No.10のPbは食品添加物公定書¹³⁾の重金属試験法に準じ, 溶出液については誘導結合プラズマ発光分光分析法^{1,14)}を用いた。

3. 試薬 引用した文献に記載のある試薬はそのものを, その他は試薬特級品を用いた。また, 原子吸光光度法及び誘導結合プラズマ発光分光分析法には, 関東化学(株)製及び和光純薬工業(株)製原子吸光分析用標準液を用いた。

4. 装置 窒素自動測定装置: ケルテック社製1030型, カールフィッシャー水分測定装置: 京都電子工業(株)製MKS-210型, 紫外可視分光光度計: (株)鳥津製作所製UV-2200型, ガスクロマトグラフ: ヒューレットパッカード社製HP-5890シリーズII型(FID検出器付)及び(株)鳥津製作所製GC-15A型(FID検出器付), 高速液体クロマトグラフ: 日本分光(株)製880-PU型〔示差屈折計; 昭和電工(株)製SE-51型, 紫外可視検出器; 日本分光(株)製870-UV型, 蛍光検出器; (株)日立製作所製F1000型〕, イオンクロマトグラフ: 日本ダイオネクス(株)製4000i, 原子吸光光度計: (株)パーキンエルマージャパン製2380型, 誘導結合プラズマ発光分光分析装置

: サーモジャーレルアッシュ社製ポリスキャン61ESS型, 全自動水銀分析装置: 日本インスツルメンツ(株)製マーキュリー/SP-3D型

結果及び考察

調査した炊飯改良剤は, 表1に示すようにその特徴から植物油系, 酵素系, デンプン系, カルシウム系, 寒天及び木炭に分類できる。そこで各分類ごとに分析結果を示し, 考察を加えた。

試験項目については, 表示成分及び有害性成分を中心に調査した。

1. 植物油系改良剤

昔から生活の知恵として, 古米をおいしく食べるために, 炊飯時に植物油を少量添加することが行われてきた。これは植物油が米粒を皮膜で包み保水効果を出すためであり, また風味を改善するためである。さらに, 植物油を添加することにより, 米飯加工産業などでは米飯の「釜離れ」が向上し, 作業性が大幅にアップされるとしている¹⁷⁾。

今回分析した5種7試料のうち, 4種の植物油には, 分散性を良くするために乳化剤が添加されており, 残りの1種の植物油には, 被包剤としてゼラチンが使用されていた。ゼラチンは炊飯時に溶解し, 米飯に粘りを与えるといわれている¹⁷⁾。

植物油系の分析結果を表2に示す。酸価は0.1~0.4, 過酸化価は2~5の値を示し, 日本農林規格に定められている植物油の規格「酸価0.15~2.0以下」¹⁸⁾, 及びレシチンの食品添加物規格「酸価40以下, 過酸化価10以下」¹⁹⁾と比較して低い値であることから, 食品衛生上

表2. 植物油系炊飯改良剤の分析結果

試料 No.	酸価	過酸化 物 価	BHA・ BHT	ビタミンE〔トコフェロール(%)〕			そ の 他	Zn μg/g	他元素 μg/g
				α	γ	δ			
1-1	0.2	5	-*1	0.025	0.007	0.001	レシチン +*2	ND*3	ND
-2	0.3	4	-	0.042	0.007	0.001	レシチン +	ND	ND
2-1	0.1	2	-	1.9	0.31	0.23	グリセリン +	ND	ND
-2	0.1	3	-	1.9	0.30	0.22	グリセリン +	ND	ND
3	0.1	3	-	0.015	0.041	0.002	グリセリン脂肪酸エステル +	0.15	ND
4	0.2	3	-	0.022	0.079	0.003	レシチン +, グリセリン脂肪酸エステル +	0.15	ND
5	0.4	3	-	0.068	0.091	0.005	レシチン + アスコルビン酸ステアリン酸エステル0.004%	ND	ND

*1 - : 不検出
 *2 + : 検出
 *3 ND : 定量限界以下
 定量限界 Ni, Pb ; 0.5 μg/g
 Zn, Cu, Cd ; 0.05 μg/g

特に問題ないものと思われる。

酸化防止剤であるBHA及びBHTは、いずれの試料からも検出されなかった。

試料No.2及びNo.5には表1に示すようにビタミンEが添加されている。試料No.2の表示成分であるトウモロコシ胚芽油にはγ-トコフェロールが多く²⁰⁾、小麦胚芽油にはα-及びβ-トコフェロールが多いこと²¹⁾が報告されている。しかし、分析の結果は、多量のα-トコフェロールが検出されたのに対してβ-トコフェロールがほとんど検出されなかった。このことから考えると、試料No.2にはα体の多いビタミンEが添加されたものと推察された。また、この試料には「玄米の10倍のビタミンE」という表示があったため、トコフェロールの組成比を米ぬか油中の組成比²⁰⁾と比較したところ、比較的近似していた。

試料No.5のビタミンE検出量は、他の無添加の試料の約2～3倍程度であった。

有害金属であるPb及びCdの含量は定量限界以下であり、食品衛生上問題はないものと思われる。

2. 酵素系改良剤

炊飯時における酵素利用の開発は、1977～1979年にかけて、古米や古々米対策として始まった。SHIBUYAら²²⁾は、酵素で胚乳細胞壁を分解すると、米飯が軟化して粘度が増すことを見だし、また、WATANABEら²³⁾は、胚乳細胞壁やアミロプロスト包膜のような生体膜の構成成分及び、細胞内の間隙を埋めるように存在する塩溶性タンパク質を酵素処理することが、古米の米飯軟化及び粘りの発現に有効であることを報告している。

インディカ種米についても、新井ら²⁴⁾はセルラーゼ

等の酵素により、米飯の軟化、粘性特性の向上が見られたと報告している。

以上のことから、試料に表示されているα-及びβ-アミラーゼは、胚乳細胞壁やアミロプロスト包膜の加水分解を目的に、プロテアーゼは、デンプンを胚乳細胞内に固定している塩溶性タンパク質の加水分解を目的に添加されているものと思われる。

酵素系の分析結果を表3に示す。試料No.6では、β-アミラーゼのデンプン糖化力が5 U/gであり、食品製造用酵素製剤では690～21,300 U/gであるとの報告¹¹⁾から考えると、試料の酵素活性力はかなり低い。また、製品の95%を占める食品素材の多くがデンプンと推察されること及び、炊飯された良食味米ではマルトオリゴ糖含量が比較的多いという報告²⁵⁾があることから考えると、酵素は膜構造を加水分解するというよりも、米粒に作用する前にデンプンに作用し、マルトオリゴ糖を生成することにより米飯に甘味を与える作用の方が強いものと推察される。

試料No.7では、表3に示すようにα-アミラーゼの糊精化力は50 U/g及びプロテアーゼのタンパク消化力は2,800 U/gであり、当所で分析した食品製造用酵素製剤では、それぞれ20～15,000 U/g及び109～1,130,000 U/gであることから、試料の酵素活性力は、米粒に作用して米飯の軟化及び粘性特性の向上を得るのに、効果があるものと思われる。また、検出された麦芽糖は、酵素の増量剤として使用されているだけではなく、米飯の呈味性の向上²⁵⁾あるいは保水性による米飯の硬化の抑制を目的としたものと推察される。

試料No.7中には4.5%の塩化ナトリウムが含まれてい

表3. 酵素系炊飯改良剤の分析結果

試料 No.	酵素の活性力	その他	塩化ナトリウム %	Cu	Zn	Mn	他元素
				----- μg/g -----			
6	β-アミラーゼのデンプン糖化力 5 U/g	デンプン	+*1	ND*2	ND	0.4	ND
7	α-アミラーゼのデンプン糊精化力 50 U/g プロテアーゼのタンパク消化力 2800 U/g	サイクロデキストリン+ 麦芽糖	+	4.5	0.2	1.8	1.0
							ND

*1 + : 検出

*2 ND : 定量限界以下

定量限界 塩化ナトリウム ; 0.02 %

Cu, Mn, Cd, Pb, As ; 0.1 μg/g

表4. デンプン系炊飯改良剤の分析結果

試料No.	ビタミンD ₃ IU/g	As	Pb	Cd	Cu	Zn	Mn	Ca	P
		----- μg/g -----						mg/g	mg/g
8	44	ND*1	1.6	ND	0.6	30	4.1	150	71

*1 ND : 定量限界 0.1 μg/g以下

た。塩化ナトリウムは酵素の活性を保持するために添加されることが多いが、製品の用法から計算すると、茶わん一杯(米飯150g)中に約20mgの塩化ナトリウムが含まれることになり、呈味にも関係するものと思われる。

FAO/WHO及びFood Chemicals Codexの酵素剤の一般規格^{26,27)}で、PbとAsはそれぞれ10μg/g以下及び3μg/g以下と規定されているが、2試料ともこの限度以下であった。

3. デンプン系改良剤

もち米デンプンはうるち米デンプンに比べ、最高粘度が高く、崩壊しやすく、老化しにくいといわれている²⁸⁾。

このことから、試料No.8の表示にあるもち種デンプンは米飯に粘りを与え、保水性を高めて老化を遅らせる目的で添加されているものと推察される。

試料No.8の分析結果を表4に示す。栄養強化の目的で骨カルシウムが添加されていたが、用法から計算すると茶わん一杯当たり約130mgのCaが摂取でき、これは日本人平均一人一日当たりの栄養所要量600mg²⁹⁾の約20%に相当する。その他の元素では、PがCaの約1/2、ZnがCaの約1/5000含有されており、これらの組成比は一般的骨粉の組成比³⁰⁾と近似していた。

Caの吸収を促進するビタミンD₃は44IU/gの値を示し、表示量に近い値であった。

4. カルシウム系改良剤

炊飯水としてアルカリ性の硬度の高い水を使用することにより、米粒に水分が浸透しやすくなり沸騰が早くなる結果、米粒の可溶性デンプンが溶けにくくなる。従って米粒もくずれにくく、沸騰水中の米の立ち上がりが良くなるといわれている³¹⁾。

松下³²⁾によれば、カルシウムなどの金属イオンを含むアルカリイオン水では、水分子同士の水素結合が切断されて水分子集団が小さくなり、水はタンパク質の狭い間隙に入り込んで強く結合し、これにより保水力が高まる。実際、水の分子集団を小さくした電子水を利用した製パン工場では、小麦粉の吸水性が高まり、グルテンなどのタンパク質との結合水量が増し、保水性が高く老化しにくい製品ができるといわれ、また、タンパク質との結合水の増加は内部への熱伝導を良くし、デンプンのα化を促進させるといわれている³³⁾。

試料No.9及びNo.10の分析結果を表5及び表6に示す。試料No.9では液性がpH12.3~12.5であることから、使用された牡蠣殻粉は、貝殻の主成分である炭酸カルシウムが焼成されて酸化カルシウムとなったものと推察される。液性がこのように強アルカリ性であるにもかかわらず、容器には特に注意書きもないことから、誤飲等による健康への危害を防ぐ上からも、何らかの表示が望まれる。

元素分析の結果は、No.9の3試料ともCaが440~680

表5. カルシウム系炊飯改良剤の分析結果-1

試料 No.	保存料	液性 pH	蒸発残留物 W/V %	塩化物(Cl) μg/ml	Ca	Na	K	Sr	B	Ba	他元素	
												μg/ml
9-1	-*1	12.5	0.16	54	680	56	1.5	1.0	0.51	0.04	ND*2	
-2	-	12.3	0.11	39	440	39	4.1	1.2	0.16	0.03	ND	
-3	-	12.5	0.13	10	640	12	0.77	1.0	0.45	0.03	ND	
*1	-	: 不検出										
*2	ND	: 定量限界以下										
		定量限界	P	; 1 μg/ml								
			Pb, As, Ni, Sn, Al, Mg	; 0.1 μg/ml								
			Co	; 0.05 μg/ml								
			Cd, Mn, Cr, Cu, Zn, Fe	; 0.01 μg/ml								
			Hg	; 0.0005 μg/ml								

表6. カルシウム系炊飯改良剤の分析結果-2

試料 No.	アスコルビン 酸ナトリウム %	総窒 素 %	乾燥 減量 %	強熱 減量 %	塩酸 不溶 物 %	塩化物 (Cl) μg/g	炭酸 塩 +	Ca	Mg	Na	Sr	Al	Fe	K	B	Mn	Cr	As	他元 素
10-1	0.5	ND*1	0.11	6.1	18	75	+*2	27×10 ⁴	1.8×10 ⁴	2,700	2,300	220	140	89	40	42	15	5.0	ND
-2	0.5	ND	0.06	4.8	9.8	110	+	30×10 ⁴	1.9×10 ⁴	2,800	2,600	200	170	110	50	30	20	1.8	ND
-3	0.5	ND	0.09	5.7	4.7	110	+	32×10 ⁴	2.0×10 ⁴	3,000	2,800	150	140	87	45	25	15	2.0	ND
-4	0.4	ND	0.02	7.0	2.3	84	+	33×10 ⁴	2.2×10 ⁴	2,900	2,600	99	110	86	45	15	15	1.4	ND

*1 ND : 定量限界以下

定量限界

総窒素

; 0.1 %

P : 500 μg/g

Pb : 10 μg/g

Ni, Sn : 50 μg/g

Cu, Zn, Cd, Ba : 5.0 μg/g

Co : 25 μg/g

Hg : 0.0005 μg/g

*2 + : 検出

μg/mlと多く検出され、次にNa>K, Sr>B>Baの順に含まれていた。Mgが少ない点を除いては、概ね貝殻の構成成分比³⁴⁾を反映していた。瓶の器壁への沈着物も認められたが、主成分はCaで、試料成分が不溶化して沈着したものと考えられる。沈着量は溶存量の約4~8%であった。

As, Pb, Cd及びSnはいずれも定量限界以下であり、清涼飲料水の成分規格³⁵⁾と比較しても特に問題は認められなかった。

試料No.10のサンゴ未焼成カルシウムの主成分は、貝殻同様炭酸カルシウムであるといわれ³⁶⁾、その他に砂れき等のケイ酸塩を含有する。このケイ酸塩に相当する塩酸不溶物は表6に示すように2.3~18%とロットにより大きな差が見られた。なお、サンゴ未焼成カルシウムには、120~200℃で乾熱殺菌したものと、250~600℃で焙焼して有機物を燃焼させたものがあるといわれる³⁶⁾。試料No.10は、総窒素として0.1%以下であるが、アミノ酸が検出されており、前者のタイプであると推察され

る。

元素分析の結果は、Srを除き、概ねサンゴ粉の文献値³⁶⁾と一致していた。Srは文献値の約10倍で、貝殻中の含量³⁴⁾に比較的近い値を示していた。これは、原料のサンゴ砂組成中に貝殻や有孔虫の殻等が含まれる³⁶⁾ことから、採取地域や種類の違いが現れたとも考えられる。

サンゴ未焼成カルシウムには、食品衛生法に基づいた成分規格は定められていないが、(財)日本健康・栄養食品協会では、「食用造礁サンゴ粉」の原材料基準³⁷⁾で、Ca含量については30%以上、Asについては2 ppm以下という限度を設定している。試料No.10-1では、Ca 27%及びAs 5.0 μg/g (ppm)を示し、この基準に適合しなかった。

ただし、試料No.10はティーバッグ形式で、直接摂取する製品ではないため、表示された使用方法に準じて沸騰水での溶出試験も行った。結果及び溶出条件を表7に示す。液性はpH7.6~8.3の弱アルカリ性となり、炊飯に

表7. カルシウム系炊飯改良剤の溶出試験結果

試料 No.	液性 pH	蒸発残留物 W/V%	Ca	Mg	Na	Sr	Al $\mu\text{g/ml}$	Fe	K	B	他元素
10-1	7.6	0.009	14	1.0	8.5	0.15	ND*	ND	0.32	0.20	ND
-2	7.9	0.01	15	1.1	9.2	0.17	ND	0.02	0.40	0.17	ND
-3	8.3	0.01	18	1.2	9.4	0.21	0.2	0.04	0.25	0.15	ND
-4	7.8	0.002	2.7	0.2	2.5	0.03	ND	ND	0.20	ND	ND

溶出条件

10-1~3 : 1パック (2.5g) + 蒸留水 200ml → 沸騰15分間 → 200ml

10-4 : 1パック (3g) + 蒸留水1000ml → 沸騰15分間 → 1000ml

* ND : 定量限界以下

定量限界 P ; 1 $\mu\text{g/ml}$
 Al, Pb, As, Ni, Sn ; 0.1 $\mu\text{g/ml}$
 B, Co ; 0.05 $\mu\text{g/ml}$
 Fe, Mn, Cr, Cu, Zn, Cd, Ba ; 0.01 $\mu\text{g/ml}$

表8. 寒天及び木炭の分析結果

試料No.	液性 pH	乾燥減量 %	塩化物(Cl) $\mu\text{g/g}$	硫酸塩(SO ₄) $\mu\text{g/g}$	As	Pb	Cd	Cu $\mu\text{g/g}$	Zn	Mn	ホウ酸 g/kg
11 (規格値)					ND* ¹	0.3	ND	0.4	3.4	23	0.25 (<1)
12 (活性炭規格値)	8.3	5.8	23 (<5300)	19 (<4800)	ND (<3.0)	0.2 (<10)	ND	2.5	1.3 (<1000)	20	

*1 ND : 定量限界 0.1 $\mu\text{g/g}$ 以下

は好適であった。溶出された元素はほとんど試料中の含量比を反映していた。NaはCaに次いで高い値を示したが、これは、水道水の塩素臭を除く目的³⁸⁾で添加されている、水溶性のアスコルビン酸ナトリウムが溶出したためと考えられる。

「食用造礁サンゴ粉」の原材料基準に適合しなかった試料No.10-1でも、溶出試験ではAsは検出されず、表示された使用方法では、食品衛生上問題はないことがわかった。しかし、サンゴ未焼成カルシウムは強化剤として直接用いられることもある³⁶⁾ことから、その純度については今後も監視していく必要がある。

5. 寒天及び木炭

寒天や木炭も、古米をおいしく食べる目的で使用されてきた。寒天は米飯の粘りに関与し、木炭は臭いの吸着作用のほかに粘りにも関与するといわれている¹⁷⁾。木炭がなぜ米飯に粘りを出すのかは不明であるが、例えば白炭(炭化温度約1000℃)は酸を吸着し溶液をアルカリ性にする³⁹⁾ということから考えると、カルシウム系のアルカリイオン水と同様の効果があることも考えられる。

試料の分析結果を表8に示す。寒天には食品衛生法に基づいて規格⁴⁰⁾が定められており、ホウ酸の含量が規定されている。分析結果は規格値(1 g/kg)以下で、そ

の他の元素についても食品衛生上問題となる量は検出されなかった。

木炭は、化学的合成品以外の食品添加物(いわゆる天然添加物)であるが、規格がないため、類似の食品添加物である活性炭の規格⁴¹⁾に基づいて分析した。活性炭の吸着力を調べる確認試験を除き、各分析項目はいずれも規格に適合した。液性はpH8.3の弱アルカリ性を示し、炊飯に好適であった。元素分析では、各元素とも食品衛生上問題となるような量は検出されなかった。

以上のことから、今回調査した炊飯改良剤については、各製品の使用方法に従う限り、食品衛生上ただちに健康に影響を与える製品は認められなかった。しかし、強いアルカリ性を示すもの、あるいは、サンゴを原料とする製品でAsを検出するものなどが見られたことから、炊飯改良剤については、今後も継続して衛生化学的な調査を行っていく必要があるものとする。

要 約

いわゆる炊飯改良剤と称せられる製品12種19検体について、衛生化学的見地から品質調査を行った。

1. 植物油系の製品では、酸価及び過酸化値に問題は認められなかった。また、酸化防止剤で問題となる成分は認められなかった。

2. 酵素系製品では、酵素のデンプン糖化力が低い製品が見られた。

3. カルシウム系製品では、強アルカリ性の製品が見られたが、その旨の表示がなく、何らかの表示が望まれる。

また、サンゴ未焼成カルシウム製品では、Ca 及び As 含量において「食用造礁サンゴ粉」の原材料基準に適合しない製品があり、ロットによるばらつきが認められた。しかし、使用法に基づいた溶出試験では、食品衛生上問題となる元素は認められなかった。

4. いずれの試料においても、その他の金属で食品衛生上問題となるものは認められなかった。

謝辞 本調査を実施するに当たり、試料収集にご協力いただいた食品機動監視班の皆様には深謝いたします。

文 献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，1990，金原出版，東京。
- 2) Vitiello, F. and Zanetta, J.-P. : *J.Chromatogr.*, **166**, 637-640, 1978.
- 3) 植松洋子：未発表。
- 4) 植松洋子，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**40**，183-186，1989。
- 5) 日本添加物協会編：第二版化学的合成品以外の食品添加物自主規格，257-259，1993，日本添加物協会，東京。
- 6) 大森秀明，福田 裕，吉田 宏，他：広島市衛研年報，**7**，27-30，1988。
- 7) 武田明治：食品衛生研究，**44**(1)，67-70，1994。
- 8) 山田隆雄，志村恭子，桜井憲三，他：三重衛研年報，**31**，101-104，1985。
- 9) 中島和雄，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**40**，175-177，1989。
- 10) (財)日本公定書協会監修：第十二改正日本薬局方・第一追補，4-5，1993，広川書店，東京。
- 11) 広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：食衛誌，**35**，28-33，1994。
- 12) 平田恵子，広門雅子，植松洋子，他：食衛誌，**35**，380-384，1994。
- 13) 第六版食品添加物公定書，1992，日本食品添加物協会，東京。
- 14) 安野哲子，荻野周三，小関正道，他：東京衛研年報，**42**，170-175，1991。
- 15) 安野哲子，栗原裕子，荻野周三，他：東京衛研年報，**43**，155-157，1992。
- 16) 西垣 進，田村行弘，真木俊夫，他：東京衛研年報，**25**，221-225，1974。
- 17) 食の科学，**197**，47-49，1994。
- 18) 農林水産省監修：植物油脂の日本農林規格，27-36，1994，(社)日本農林規格協会，東京。
- 19) 第六版食品添加物公定書，528-529，1992，日本食品添加物協会，東京。
- 20) 香川 綾監修：四訂食品成分表，388-389，1990，女子栄養大学出版部，東京。
- 21) 高木 徹，印南 敏，斎藤衛朗：食の科学，**44**，30-40，1978。
- 22) Shibuya, N. and Iwasaki, T. : 日食工誌，**31**，656-660，1984。
- 23) Watanabe, M., Arai, E., Honma, K., et al. : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2725-2731, 1991.
- 24) 新井映子，渡辺道子：日食工誌，**41**，619-626，1994。
- 25) 田島 眞，加藤万里子，飯塚敏恵：日食工誌，**41**，339-340，1994。
- 26) *FAO Food and Nutrition Paper*, **19**，214-216，1981。
- 27) *Food Chemicals Codex, 3rd ed.*, 107-110, 1981, National Academy Press, Washington, D.C..
- 28) 庄司一郎：ジャパンフードサイエンス，(9)，31-40，1994。
- 29) 厚生省保健医療局監修：第五次改訂 日本人の栄養所要量，93-97，1994，第一出版，東京。
- 30) 農林水産省農林水産技術会議事務局編：日本標準飼料成分表，152-153，1987，(社)中央畜産会，東京。
- 31) 平田孝一：食品と科学，(2)，54-61，1994。
- 32) 松下和弘：月刊フードケミカル，(4)，42-46，1990。
- 33) 井戸勝富：月刊フードケミカル，(4)，63-70，1992。
- 34) 太田直一：*Gypsum & Lime*, **146**，41-46，1977。
- 35) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法 平成6年版，178-185，1993，新日本法規出版，東京。
- 36) 大江匡親：食品工業，**35**(18)，40-55，1992。
- 37) (財)日本健康・栄養食品協会：「カルシウム含有食品」「カルシウム含有加工食品」原材料基準。
- 38) 松下和弘：月刊フードケミカル，(4)，43-48，1992。
- 39) 岸本定吉：木炭の博物誌，49-50，1984，総合科学出版，東京。
- 40) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法 平成6年版，215-216，1993，新日本法規出版，東京。
- 41) 第六版食品添加物公定書，201-202，1992，日本食品添加物協会，東京。

熱分解生成物の赤外吸収スペクトルによるゴムの系統的鑑別法

渡辺 悠二*, 金子 令子*

Systematic Identification of Rubbers by Infrared Spectra of Pyrolysis Products

YUJI WATANABE and REIKO KANEKO

Keywords: ゴム rubber, 熱分解生成物 pyrolysis product, 鑑別 identification, 赤外吸収スペクトル法 infrared absorption spectroscopy

はじめに

ゴムは食品の製造, 加工装置あるいは貯蔵, 保存などの容器にあまり多くはないが重要な素材として利用されている。この場合そのゴム製品には食品衛生法に基づく「食品, 添加物等の規格基準(告示第85号)」の規格が適用される¹⁾。この規格で, ゴム製品は塩素を含むものと含まないものとに区別されているため, 規格の適否試験を行う場合その区別を行わなければならないが²⁾, 行政試験の場合さらにその材質の鑑別を行う必要がある。

一方, ゴムはその種類が多く, 化学薬品あるいは化成品の形で通常入手しにくい物質であり, 標準品としての各種ゴムの確保することが困難な物質である。また, ゴムの鑑別は従来の化学反応試験法に替わり, 最近では赤外吸収スペクトル(以下 IR スペクトルと略す)法等の機器分析法が行われている³⁻⁵⁾。IRスペクトル法の場合, 国内ではこれまで試料の出所(商品名)が明記されたスペクトルデータはなく, またスペクトルのピークの帰属に関する解析は行われているものの識別のためのスペクトルパターンによる系統的な鑑別図は作成されていない。著者らは, 今回日本ゴム工業会より種類の明らかな試料(商品名明記)の提供を受けたので, これを標準試料とした各ゴムの熱分解生成物によるIRスペクトルライブラリーを作成し, かつ各ゴムのスペクトルに示された特性吸収ピークによる系統的鑑別図を作成したので報告する。

実験方法

1. 試料

日本ゴム工業会より提供された天然ゴム(2種12品目), 合成ゴム(ジエン系, オレフィン系, 有機ケイ素化合物, フッ素化合物系及びウレタン系; 15種57品目)及び熱可

塑性エラストマー(1種11品目)の国内製品18種80品目を標準試料として用いた。その内訳を表に示してあるが, そのうち未加硫(原料)ゴムは18種65品目, 加硫ゴムは14種15品目(表中*印)である。

2. 試料の前処理

未加硫ゴムはそのまま試料として用いたが, 加硫ゴムの場合非極性ゴムのイソプレンゴム(以下IRと略す, 以下同じ), クロロスルホン化ポリエチレン(CSM), フッ素ゴム(FKM)では試料4gにアセトン/クロロホルムの等量混液100mlを, 極性ゴムのアクリロニトリル-ブタジエンゴム(NBR), 水素化ニトリルゴム(HNBR), クロロプレンゴム(CR)では*n*-ヘキサン100mlを加え, ソックスレー抽出器を用いて4時間抽出後, その残渣物(不溶分)を十分に乾燥し, 試料とした⁴⁾。

3. IR スペクトル測定法

1) 装置 フーリエ変換赤外分光光度計: 日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製FTS-60型及びFTS-175型; 分析条件: 測定波長範囲4000-500 cm^{-1} , 分解能4 cm^{-1} 。

2) 試料の調製及び測定 細切した試料約0.1gを試験管に入れ, その底部をブンゼンバーナーで加熱する。試験管上部に凝縮した熱分解生成物をガラス棒等がかき取り, 赤外用結晶塩化ナトリウム窓板に塗布した後, 常法によりIRスペクトルを測定した^{4,5)}。

結果及び考察

1. ゴム標準品

ゴムには天然ゴムと合成ゴムがあるが, その他ゴムではないが高分子化合物でゴムと同様の弾性を持ち使用される熱可塑性エラストマー(TPE)と称される一群がある。

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

表. ゴム標準試料及び分類

種 類	略 称	標 準 試 料(商品名)
天然ゴム	NR	No.3 RSS, 1X Tin Pale Crepe*, Air Dried Sheet
天然ゴムラテックス	NRL	NR Latex 生皮膜, 加硫ラテックス*, 医療用ゴム管, バルーンカテーテル, 手術用手袋
イソプレンゴム	IR	カリフレックス IR307*, JSR IR2200
ブタジエンゴム	BR	ジエン 35NF, JSR BR01*, JSR RB830
スチレン-ブタジエンゴム	SBR	JSR 1502, JSR 0061, JSR SL552
アクリロニトリル-ブタジエンゴム	NBR	NIPOL DN002 (AN53%), JSR N220SH (AN41%), JSR N232S (AN35%)*, NIPOL DN215 (AN33.5%), JSR N240S (AN26%), JSR N250S (20)%
〃 (塩ビブレンド)	NBR/PVC	NIPOL 1203JN (70/30 AN33.5%)
水素化ニトリルゴム	HNBR	Zetpol 1020 (AN44%), Zetpol 2000 (AN36%)*
クロロプレンゴム	CR	ネオプレンW, ネオプレンWRT*, ネオプレンG
ブチルゴム	IIR	JSR Butyl 268*, JSR (Exxon) Chlorobutyl 1066 (Cl-IIR) JSR Bromobutyl 2255 (Br-IIR)
エチレン-プロピレンゴム	EPM EPDM	JSR EP11 JSR EP21*, JSR EP35
クロロスルホン化ポリエチレン	CSM	ハイパロン40*
シリコンゴム	Q	LIMS KE 1940, TSE260-5U (50)*
シリコンゴム/EPDM	Q/EPDM	TEQ EXA6410
フロロシリコンゴム	FVMQ	FQE 201-5U (50)
フッ素ゴム	FKM	AFLAS 150P, SF700, SF905, Daiel G-501* Daiel G-755, Daiel G-902, フローレル FM-60*
ウレタンゴム	U	ポリエステル系(AU): タケネートL1280, ウレパン 600, スミパン 640S*, ミラセン 76 ポリエーテル系(EU): サンプルンP632, ミラセンE-34*
熱可塑性エラストマー	TPE	スチレン系(SBC): JSR TR2000, JSR TR2400, JSR SIS5000, JSR SIS5002 オレフィン系(TPO): Santoprene 203-40, サーモラン3601N, サーモラン2920N 塩ビ系(TPVC): アロンエラスト311-11 ウレタン系(TPU): Miractran C565MNAT エステル系(TPEE): ヘルプレンP55B アミド系(TPAE): ポリアミドエラストマーA150

*印: 加硫ゴムのあるもの

ここではこの3者を標準試料として用いた(表参照)。また、ゴムには2種類以上の構成成分で作られる共重合体のものや2種類以上のゴムを混合するブレンドゴムもある。なお、ゴムは通常、未加硫(原料)ゴムにイオウあるいは有機過酸化物等の加硫剤のほか老化防止剤(酸化防止剤)、補強剤、充填剤等の有機、無機系の種々の添加剤を加えて加硫ゴムとして製品化されている³⁻⁵⁾。したがって、実際に使用されるゴムはほとんどが加硫ゴムである。

今回、日本ゴム工業会より提供されたゴムは食品にかかわる装置、容器等で使用されているゴム製品の国内原

料ゴムのほとんどを網羅していると思われる。

2. IR スペクトル法による鑑別

1) 試料の前処理と測定

IR スペクトルの測定にあたって、ゴム製品中に含有される種々の添加剤等の影響が予測されることから、予めこれらの物質を除去するための溶媒処理を行った。溶媒にはゴムを溶かさず、かつ添加剤を抽出除去することが可能な、非極性ゴムではアセトン/クロロホルムの等量混液、極性ゴムでは*n*-ヘキサンを用いた。

また、ゴムはその性質上弾性や伸縮性があり、かつ有機溶媒にも溶けにくいいためそのままではIRスペクトルの

測定が困難な、扱いにくい物質である。そこで、今回のIRスペクトルの測定は、ゴムの加熱分解生成物によるサンプリングが極めて簡単なヌジョール法を採用して行った。

2) IR スペクトルによるゴムの識別

得られた各ゴムの熱分解生成物のIRスペクトルのうち種類別に代表的なものを図1に示す。なお、未加硫ゴムと加硫ゴムのスペクトルを比較するとほぼ同じスペクトルが得られたので、加硫ゴムのあったものについてはそれを記載している。また、図1の各スペクトルについてはピークの相対強度が比較出来るようにピーク強度の補正を行っている。すなわち、個々のスペクトル中、最も強いピークの吸光度が1.0(透過率10%)になるようにスペクトル図を補正した。

図1の結果から、各スペクトルは個々のゴム特有のスペクトルパターンを示したので、ゴムの識別を行うことが可能であった。そこで、得られたIRスペクトルを基にゴムの識別のための系統的な鑑別図の作成を行った。その結果を図2に示す。ただし、図2中波数の括弧内はピークの幅の形と強さの程度を表している。ピーク幅は鋭い(s)と幅広い(b)に、ピーク強度は透過率50%以下のものを(s)、同50~80%のものを(m)、同80~95%のピークを(w)として表している。

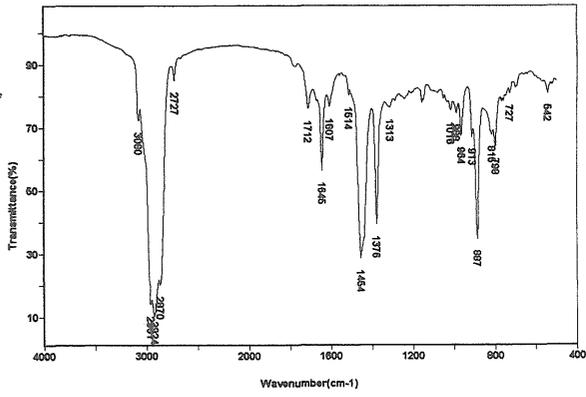
ゴムは一般にジエン系、オレフィン系、ウレタン系、有機ケイ素化合物やフッ素化合物系などに分類される。このうち構成成分としてケイ素、フッ素または窒素の化学結合を有するゴムは特有のピークを持つスペクトルパターンを示しており、前者にはシリコンゴム(Q)、フロロシリコンゴム(FVMQ)及びFKMが、後者にはニトリル系ゴムとウレタン系ゴムが属する。図1及び2に示すように前者のQ、FVMQとFKMは1050~1200 cm^{-1} にSi-O-Si基またはCF基による幅広く、非常に強度の強いピークを持つスペクトルを示すが、さらにQは805と1262 cm^{-1} にSi-CH₃基による鋭く、強い2本の特有のピークを示し、FVMQは1211 cm^{-1} と1267 cm^{-1} にそれぞれSi-CH₃基、-CF基による鋭く、強い2本の特有のピークを示している。後者のニトリル系ゴムに属するNBR、塩ビブレンドニトリルゴム(NBR/PVC)とHNBRおよびウレタン系ゴム(エーテル系U-etherとエステル系U-ester)の場合は窒素結合による特有のピークを持つスペクトルを示している。すなわち、ニトリル系ゴムの場合2238 cm^{-1} 付近にニトリル基(-CN基)による鋭く、中程度の強い特有のピークを示すが、ウレタン系ゴムの場合2269 cm^{-1} 付近に残存遊離イソシアヌル基(-N=C=O基)

によるピークが3313 cm^{-1} にアミン基(-NH基)による中程度の強さを持つ特有のピークを示す場合がある。また、ニトリル系ゴムは913 cm^{-1} にビニル基(-CH=CH₂基)による弱いピークを示すのでウレタン系ゴムと識別が可能である。さらにNBRの場合969 cm^{-1} にトランス1,4-構造(-CH=CH-)による弱いピークを示すのでHNBRとの識別ができる。ウレタン系ゴムのU-etherは1113 cm^{-1} にエーテル結合(-O-)による非常に強いピークを示すが、U-esterはU-etherに比べて1730 cm^{-1} のカルボニル基による吸収が強く、2900 cm^{-1} 付近のメチレン基による吸収は弱いことから識別が出来る。

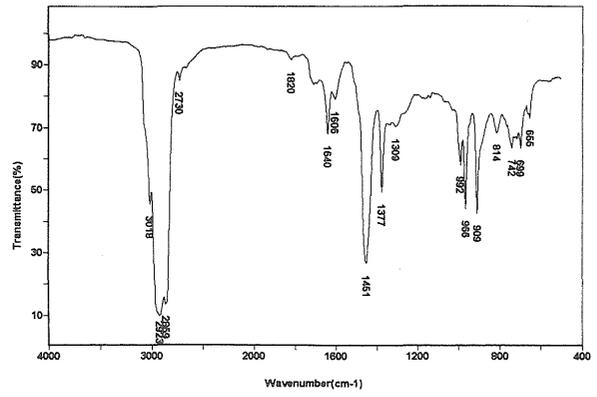
次にジエン系やオレフィン系ゴム等は1460 cm^{-1} 付近にメチレン基(-CH₂-基)による強いピークを示すが、さらに、887 cm^{-1} に3,4-付加成分のビニリデン構造(>C=CH₂基)などによる中程度の強さの特有ピークを示すものがある。この887 cm^{-1} にピークを示すゴムとしてイ)天然ゴム(NR)、天然ゴムラテックス(NRL)、IR、CR、ロ)エチレン-プロピレンゴム(EPM、EPDM)、ブチルゴム(IIR)の共重合体ゴム、ハ)NR(IR)とスチレン-ブタジエンゴム(SBR)、NR(IR)とブタジエンゴム(BR)、QとEPDMのブレンドゴム(NR/SBR、IR/SBR、NR/BR、IR/BR、Q/EPDM)、ニ)スチレン系熱可塑性エラストマー(TPE-SBC)のグループがある。また、887 cm^{-1} にピークを示さないものとしてはSBR、BR、CSMおよび各種熱可塑性エラストマー(TPE-SBC、TPE-TPVC等)がある。

887 cm^{-1} にピークを示すものうち、908及び991 cm^{-1} にビニル基(-C=CH₂基)等による弱い~中程度の強さの2本のピークを示すものがQ/EPDM、EPM、EPDM、TPE-TPO、NR(IR)/SBRとNR(IR)/BRで、ピークを示さないものとしてはNR、NRL、IR、IIR、CRとTPE-SBCがある。

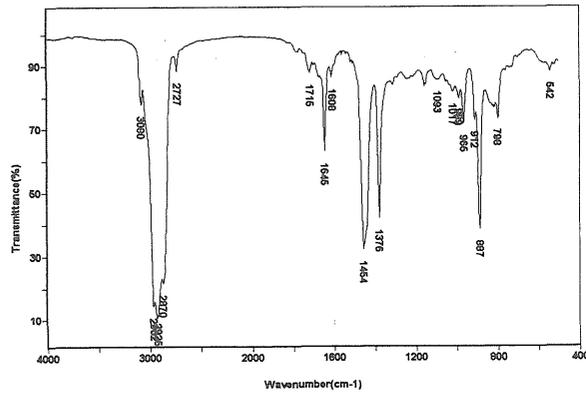
887、908と991 cm^{-1} にピークを示すものうち、Q/EPDMは1023と1075 cm^{-1} にSi-O-Si基による2本の中程度の強さのピークを示し、ブレンドゴムであるNR(IR)/SBRは695、752 cm^{-1} に芳香環による中程度の強さのピークを示している。これらのピークを示さないNR(IR)/BRは815 cm^{-1} に弱いが特異的なピークを示し、EPM、EPDMとTPE-TPOはこれらのピークを示さない。しかし、EPMは1720 cm^{-1} に中程度の強さのピークを示すことからEPDM、TPE-TPOとの識別ができるが、EPDMとTPE-TPOはほぼ同じスペクトルを示す。887、908と991 cm^{-1} にピークを示さないIIRは1230 cm^{-1} に四級炭素の吸収による弱い特異的なピークと1365、1388 cm^{-1} に-C



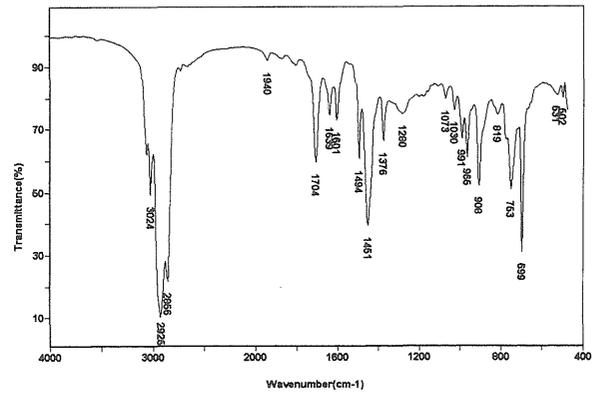
天然ゴム (NR, 1X Thin Pale Crepe)



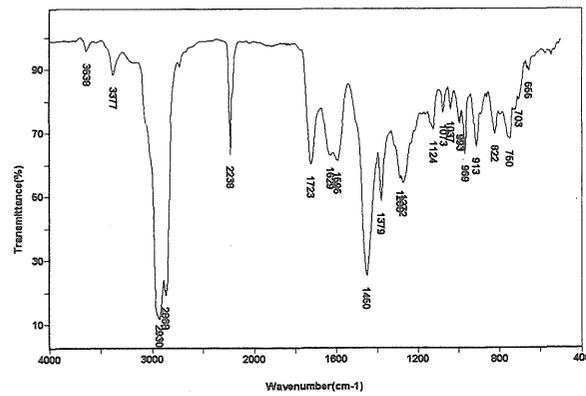
ブタジエンゴム (BR, JSR BR01)



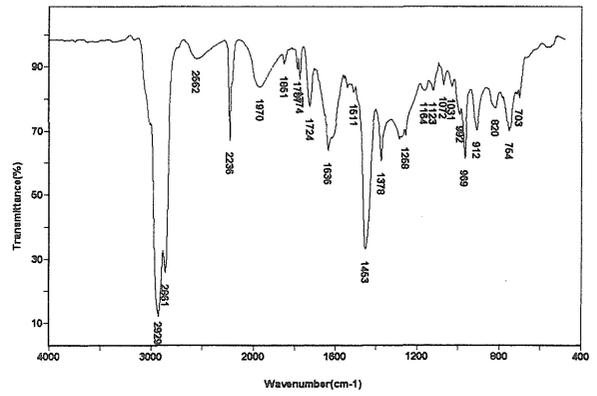
イソプレングム (IR, カリフレックスIR307)



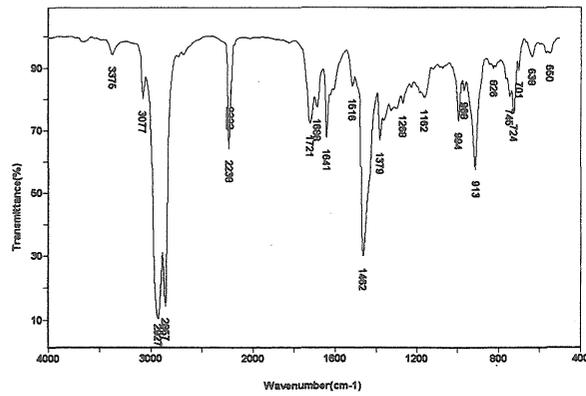
スチレン-ブタジエンゴム (SBR, JSR SL552)



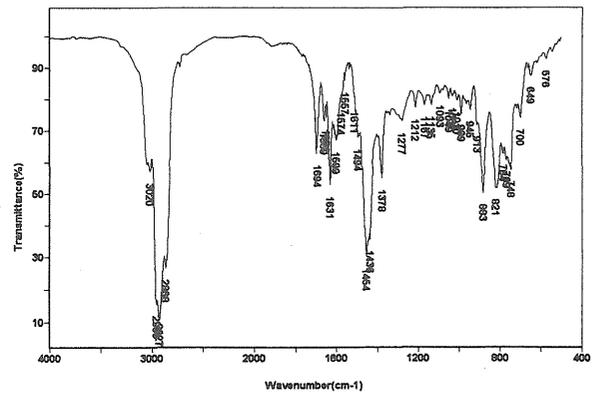
アクリロニトリル-ブタジエンゴム (NBR, JSR N232S)



塩ビブレンド NBR (NBR/PVC, NIPOL 1203JN)

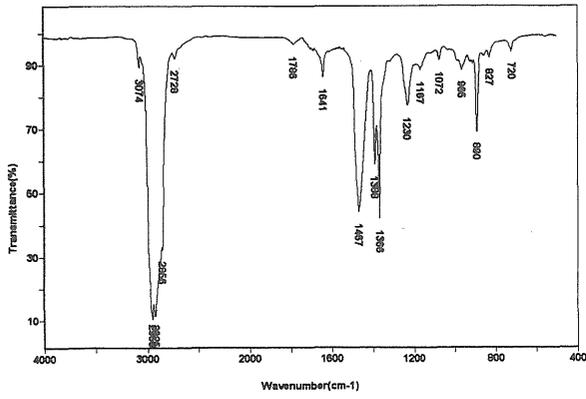


水素化ニトリルゴム (HNBR, Zetpol 2000)

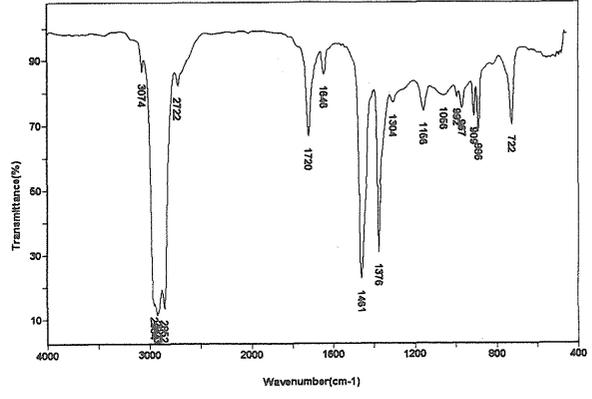


クロロプレレン (CR, ネオプレレンWRT)

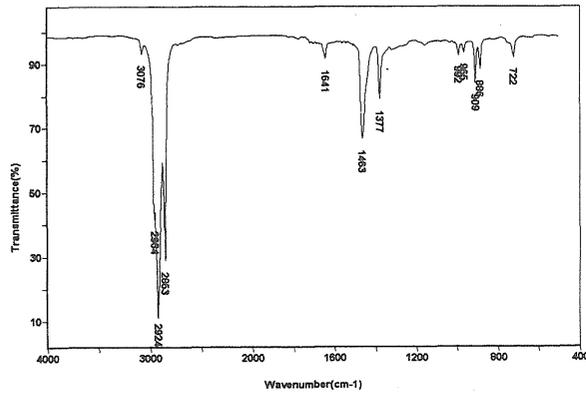
図1-1. ゴムの熱分解生成物の赤外吸収スペクトル



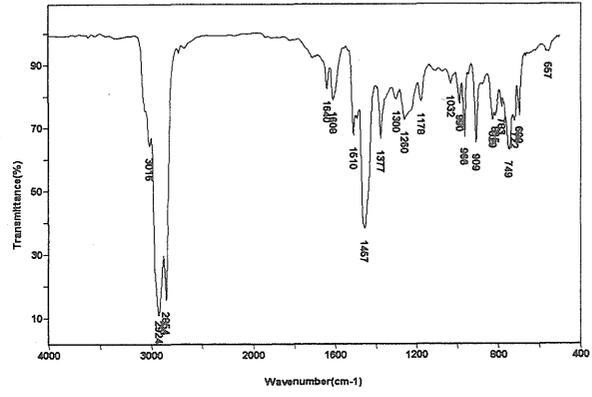
ブチルゴム (IIR, JSR Butyl268)



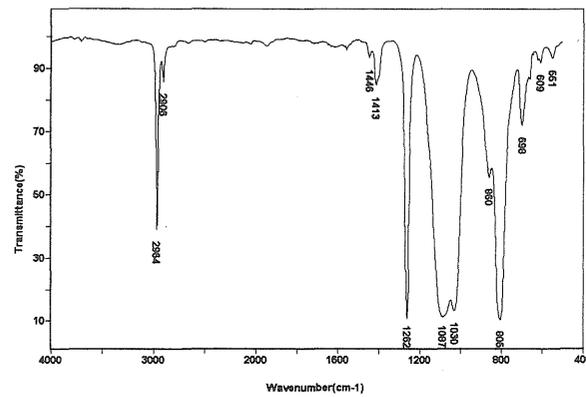
エチレン-プロピレンゴム (EPM, JSR EP11)



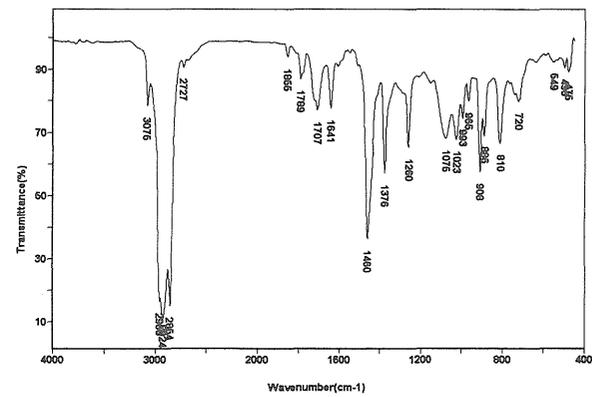
エチレン-プロピレンゴム (EPDM, JSREP21)



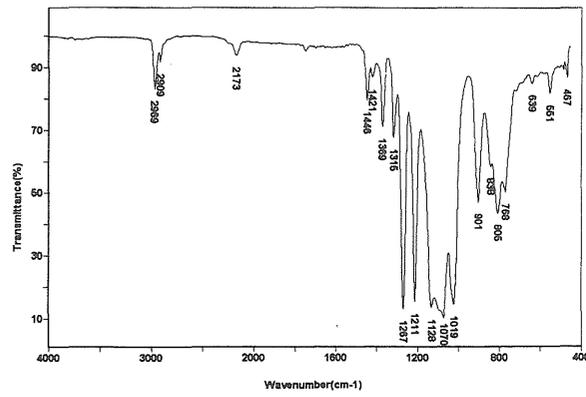
クロルスルホン化ポリエチレン (CSM, ハイロン 40)



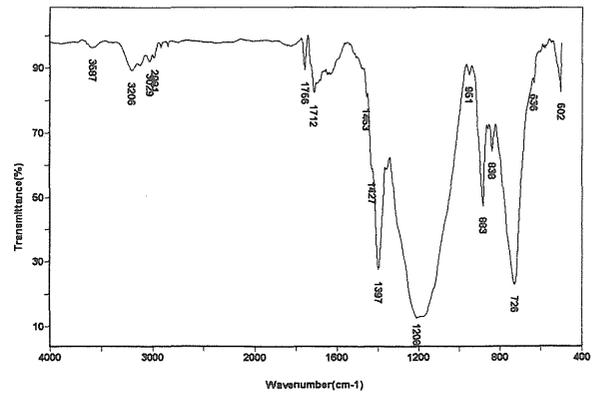
シリコンゴム (Q, TSE260-5U)



シリコンゴム/EPDM (Q/EPDM, TEQ EXA6410)

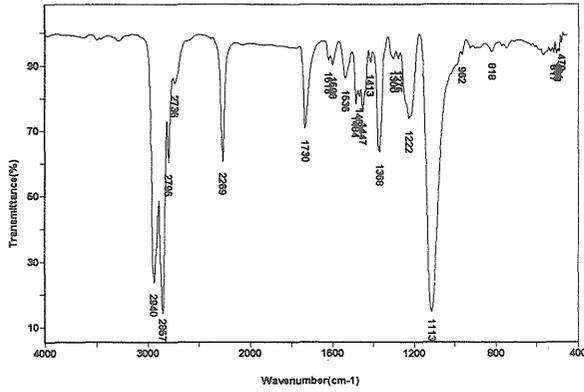


フロロシリコンゴム (FVMQ, FQE 201-5U)

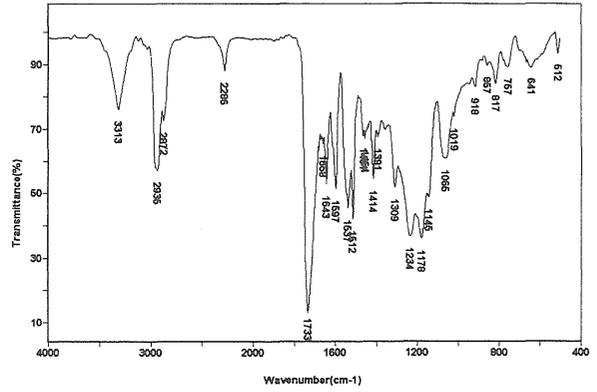


フッ素ゴム (FKM, フローレルFM-60)

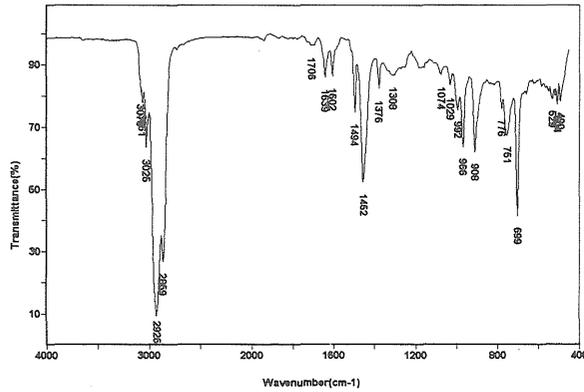
図1-2. ゴムの熱分解生成物の赤外吸収スペクトル



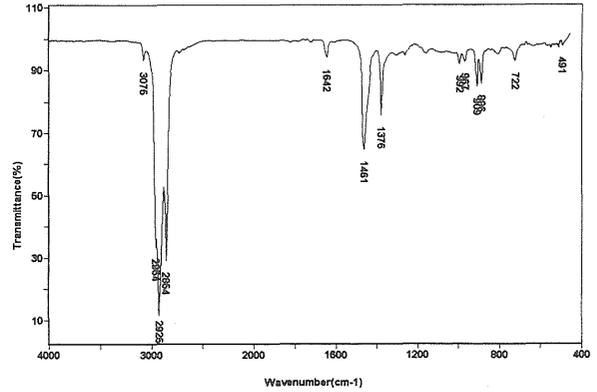
ウレタンゴム (U-ether, ミラセンE-34)



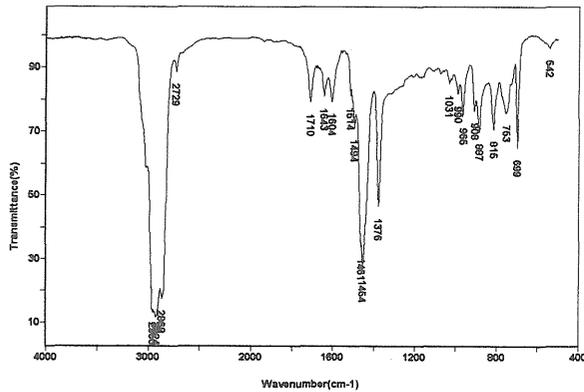
ウレタンゴム (U-ester, スミパン640S)



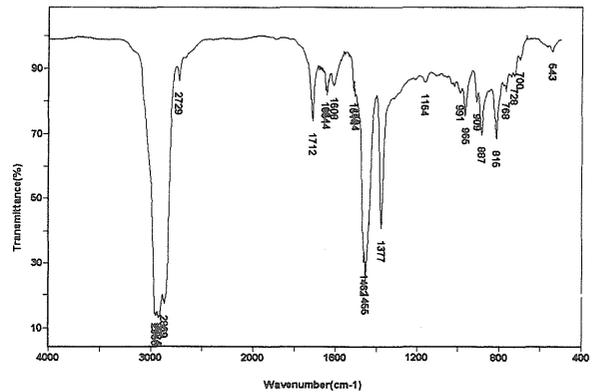
熱可塑性エラストマー (TPE-SBC, JSR TR2000)



熱可塑性エラストマー (TPE-TPO, サーモラン2920N)



NR(IR)/SBR ブレンドゴム



NR(IR)/BR ブレンドゴム

図1-3. ゴムの熱分解生成物の赤外吸収スペクトル

(CH₃)₂基のダブルバンドによる鋭い、中程度の強さのピークを示している。NR(IR)とスチレンの共重合体のエラストマーであるTPE-SBCは695cm⁻¹に芳香環による中程度の強さのピークを示し、CRは821cm⁻¹に芳香環による中程度の強さのピークと1631cm⁻¹にC=C-基による鋭く、強い特有のピークを示している。また、CRの場合銅線による炎色反応(バイルシュタイン反応)で塩素を確認することができる。NR, NRLとIRは化学構造が同一のためIRスペクトルによる識別は困難で、その識別は薄層クロマトグラフィーで行われている³⁾。なお、NR, NRLとIRは908と991cm⁻¹にわずかにピークを示す

場合があり、このピークを(+)と判定した場合図2中NR(IR)/BRとEPM, EPDM, TPE-TPOのグループに属することになる。しかし、NR(IR)/BRで示される815cm⁻¹の特異的なピークがNR等では799cm⁻¹の肩にわずかに示されるのみで、またEPM, EPDM, TPE-TPOとは887/908cm⁻¹のピーク強度比で識別することができる(NR, NRL, IRでの比が大きい)。

887cm⁻¹にピークを示さないゴムとしてSBR, BR, CSMと熱可塑性エラストマー類がある。このうちSBRとTPE-SBCは699と752cm⁻¹に芳香環等による鋭く、中程度の強さの2本のピークを示し、さらにSBRは

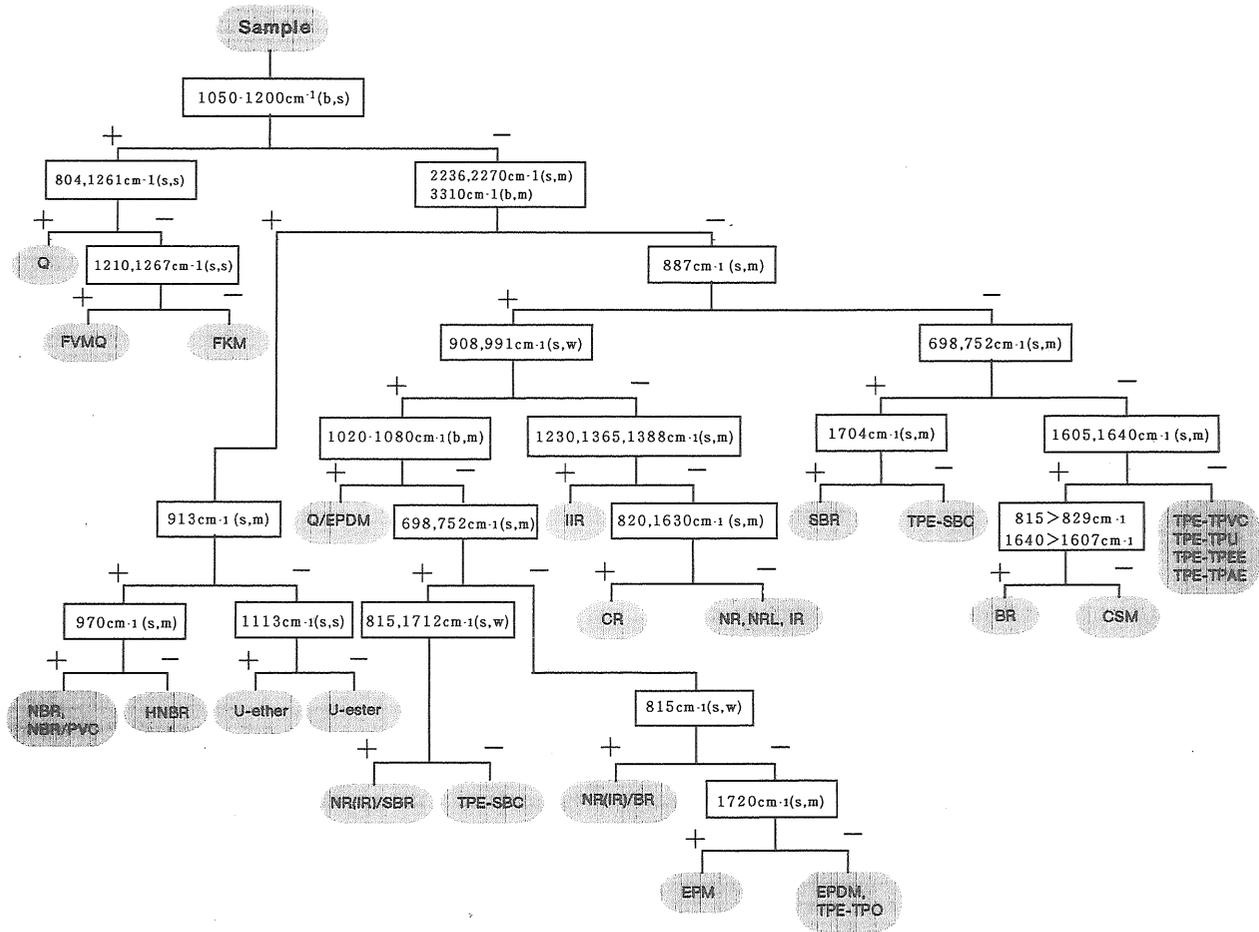


図2. ゴムの熱分解生成物の赤外吸収スペクトルによる系統的鑑別図

1704cm⁻¹に鋭く、中程度の強さのピークを示している。芳香環の吸収を示さないBR, CSM及び各種熱可塑性エラストマーのうちBRとCSMは1640(-C=C-基)と1607cm⁻¹に中程度の強さのピークを示している。また、BRはCSMに比べて815>829cm⁻¹と1640>1607cm⁻¹のピーク強度比を示しているが、850cm⁻¹以下のスペクトルパターンを比較することでも識別ができる。

以上の結果から、特性吸収ピークのバンドの形と強度に基づく図2のような系統的鑑別図を作成した。

しかし、最終的には得られたスペクトルを標準スペクトルと比較し判定を行う必要がある。また、ブレンドゴムの場合その配合割合や構成成分によっては鑑別が困難なことがある。

まとめ

赤外吸収(IR)スペクトル法によるゴムの鑑別法の検討を日本ゴム工業会より提供されたゴムを標準試料として行った。標準試料は国内で提供されている天然ゴムや合成ゴム及びその加硫ゴム並びに熱可塑性エラストマーの18種80品目(種別と商品名を明記)である。

鑑別法として、各ゴムの熱分解生成物のIRスペクトルをヌジョール法によって測定し、得られたIRスペクトルを基にその特性ピークによる図2の系統的鑑別図を作成した。その結果、ほとんどのゴムの場合その熱分解生成物のIRスペクトルを測定することによって識別を行うことが可能となった。

謝辞 本研究にあたり標準試料を提供された日本ゴム工業会・食品医療用品部会並びに鈴木ゴム(株)高橋明氏に深謝いたします。

文献

- 1) 厚生省告示第85号 官報 1986, 4, 1.
- 2) 厚生省通達 衛食第64号 1986, 4, 7.
- 3) 日本分析化学会編: 高分子分析ハンドブック, 516-532, 1990, 朝倉書店.
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, 746-762, 1990, 金原出版.
- 5) 日本ゴム協会編: 新ゴム技術入門, 400-410, 1970, 日本ゴム協会.

天然または合成イソプレングムをブレンドしたブタジエン系ゴムの鑑別

金子 令子*, 樺島 順一郎*, 渡辺 悠二*, 鈴木 助治*

Identification of Isoprene-Butadiene Component Blended Rubber

REIKO KANEKO*, JUN-ICHIRO KABASHIMA*, YUJI WATANABE*
and SUKEJI SUZUKI*

The titled identification was investigated by fourier transform infrared absorption spectroscopy (FT-IR) and pyrolysis gas chromatography (PyGC). Standard sample was identified by FT-IR but not commercial rubber products. Isoprene and butadiene peaks in pyrolysis products were separated by PyGC following the GC conditions column ; DB-1 (0.25mm i.d.×60m, 5 μm film), column temperature ; 50°C - 10°C/min - 280°C (5min). In commercial rubber products (20 samples), isoprene rubber (IR) and styrene butadiene rubber were found blended in 17 samples. IR and butadiene rubber blended in 1 and IR in 2. Relative composition ratios (isoprene, butadiene, styrene) of same commercial products showed scattered values. Based on these values, used rubber material and combined additives in each commercial rubber product appeared to differ.

Keywords : イソプレングム isoprene rubber, ブタジエンゴム butadiene rubber, 鑑別 identification, 熱分解ガスクロマトグラフ法 pyrolysis gas chromatography (PyGC), フーリエ変換赤外吸収スペクトル法 fourier-transform infrared absorption spectroscopy (FT-IR), 材質 material

緒 言

食品用プラスチックは食品衛生法に基き、一般規格の他に材質別に14種の個別規格が適用され、ゴムの場合は塩素の有無により規格が異なる¹⁾。このためプラスチック及びゴムは試験を行う前に材質を鑑別することが必要である。食品用ゴムには合成イソプレングムであるイソプレングム(以下 IR と略す)、天然イソプレングムである天然ゴム(以下 NR と略す)、ブタジエンゴム(以下 BR と略す)、スチレン・ブタジエンゴム(以下 SBR と略す)及びこれらのブレンドゴムがよく使われる。市販のゴム製品には種々の添加剤が配合されておりその妨害や、IR (NR)と BR の化学構造の類似性のため、実際の試料がこれらのブレンドゴムの場合は鑑別が難しい。そこで添加剤除去のような前処理を要しない簡便な鑑別法を、フーリエ変換赤外吸収スペクトル法(以下 FT-IR と略す)、熱分解ガスクロマトグラフ法(以下 PyGC と略す)、質量分析法(以下 MS と略す)により検討し良好な結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

市販の密封ガラスびんゴムパッキン(フランス製)9検体、ラムネびんゴムパッキン10検体、料理用ゴムべら1検体

2. 標準品

IR, NR, BR, SBR, スチレン・イソプレン共重合体(日本ゴム工業会提供品)

3. 装置

フーリエ変換赤外分光光度計: 日本バイオラッドラトリーズ(株) FTS-60型

PyGC, MS: 以下の熱分解装置(Py), ガスクロマトグラフ(GC), 質量分析計(MS)を組み合わせて使用した。

Py; 日本分析工業(株) キューリーポイント JHP-3S型, JHP-2型

GC; ヒューレットパッカード社 5890型, (株)日立製作所 163型

MS; 日本電子(株) オートマス50型

*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

4. 操作法

FT-IR: 細切した試料約0.1 gを試験管に入れ, 直火で加熱し, 試験管上部に凝縮した熱分解生成物を結晶塩化ナトリウム窓板に塗布しスペクトルを測定した.

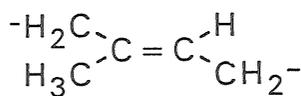
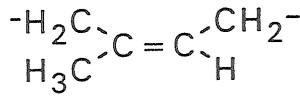
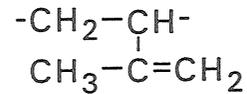
PyGC, MS: 試料0.2~0.3mgを590°Cで5秒間熱分解を行い, 生成物をGCに導入し, Table 1, 2の条件で測定し, MSで確認を行った.

結果及び考察

1. FT-IRによる検討

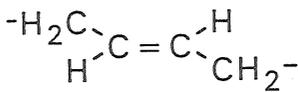
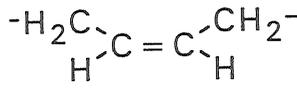
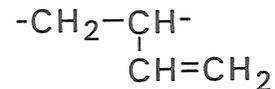
Fig. 1に示したようにIR及びNRとBRは類似した化学構造で3種の結合様式を持っている^{2,3)}. IRとNRは合成と天然のちがいであり, 化学構造は同じである. IR(NR), BRはともに1640(C=C), 1450(-CH₂-), 1375(-CH₃), 970(trans 1,4付加構造)cm⁻¹付近に赤外吸収

ピークがあるため類似したスペクトルを示す. しかしIR(NR)では3,4付加のビニリデン構造由来のピークが890cm⁻¹付近(Fig. 2), BRでは1,2付加のビニル構造由来のピークが910,990cm⁻¹付近(Fig. 3)にあるため標準品の場合は容易に鑑別ができる. SBR, スチレン・イソプレン共重合体のスペクトルにはさらに752cm⁻¹付近にスチレン(以下Stと略す)の芳香環由来のピークがある(Fig. 4)⁴⁾. Fig. 5に示したように実際の試料においてStの存在は752cm⁻¹にピークがあることから明確に推定された. しかしIR(NR), BRに特有の888,908,989cm⁻¹のピークはかなり小さく他の配合添加剤のピークである可能性も考えられるため, IR, BRの存在は判定できず鑑別が困難であった.

*trans* 1,4 addition*cis* 1,4 addition

3,4 addition

IR(NR)

*trans* 1,4 addition*cis* 1,4 addition

1,2 addition

BR

Fig. 1. Chemical Structures of IR(NR) and BR

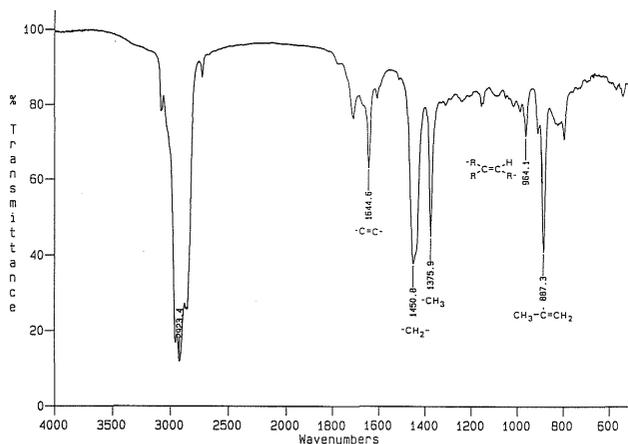


Fig. 2. FT-IR Spectrum of IR

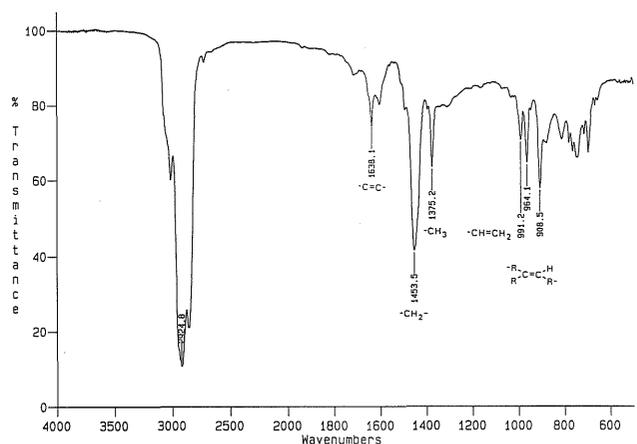


Fig. 3. FT-IR Spectrum of BR

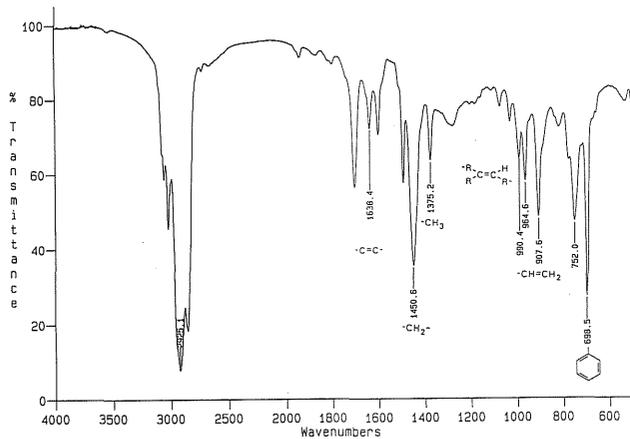


Fig. 4. FT-IR Spectrum of SBR

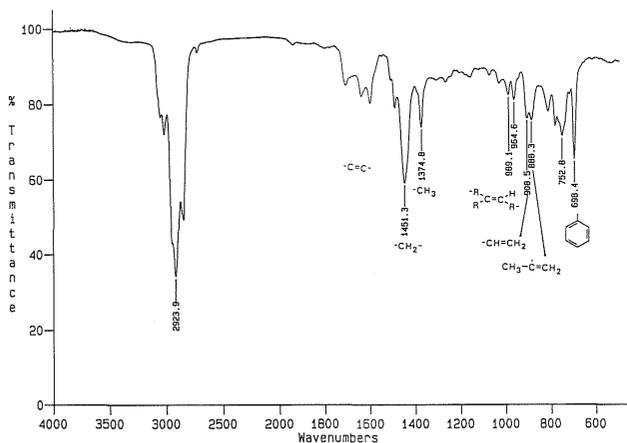


Fig. 5. FT-IR Spectrum of Rubber Seal in Airtight Jar

2. PyGC, MS による検討

IR と BR は590℃で熱分解を行うとそれぞれモノマーのイソプレン (以下Isoと略す), ブタジエン (以下 But と略す), ダイマーのジペンテン (以下 DP と略す), 4-ビニルシクロヘキセン (以下4VCH と略す) が生成する。ゴム, プラスチックの材質鑑別を行う通常の GC 条件 (Table 1) では, Fig. 6に示したように Iso, But はともに分子量が小さく低沸点であるため分離できなかった。また分離できても保持時間が接近しているため試料では判別が困難である⁵⁾。しかし Iso, But が確認できない場合でも, ダイマーである DP, 4VCH のピークが明確に現れれば Iso と But が存在することがわかる。DP は相対強度で Iso 100 に対し70程度と生成量が多く, Iso が存在すれば必ず現れるピークである。しかし4VCH は But 100 に対し40程度と少なく⁶⁾, 1,4付加Butからしか生成しないため, But の配合量が少ない場合や原料が1,2付加 But の場合は4VCH のピークは現れない⁷⁾。そこで IR, BR が存在すれば必ず現れる Iso, But のピークを分離するため, Table 1の条件とは極性, 膜厚などが異なるキャピラリーカラムを用いて GC 条件の検討を行った。その結果Table 2の条件で実際の試料においても, Iso, But を明確に分離することができた (Fig. 7)。それぞれのピークの確認は MS で行った。

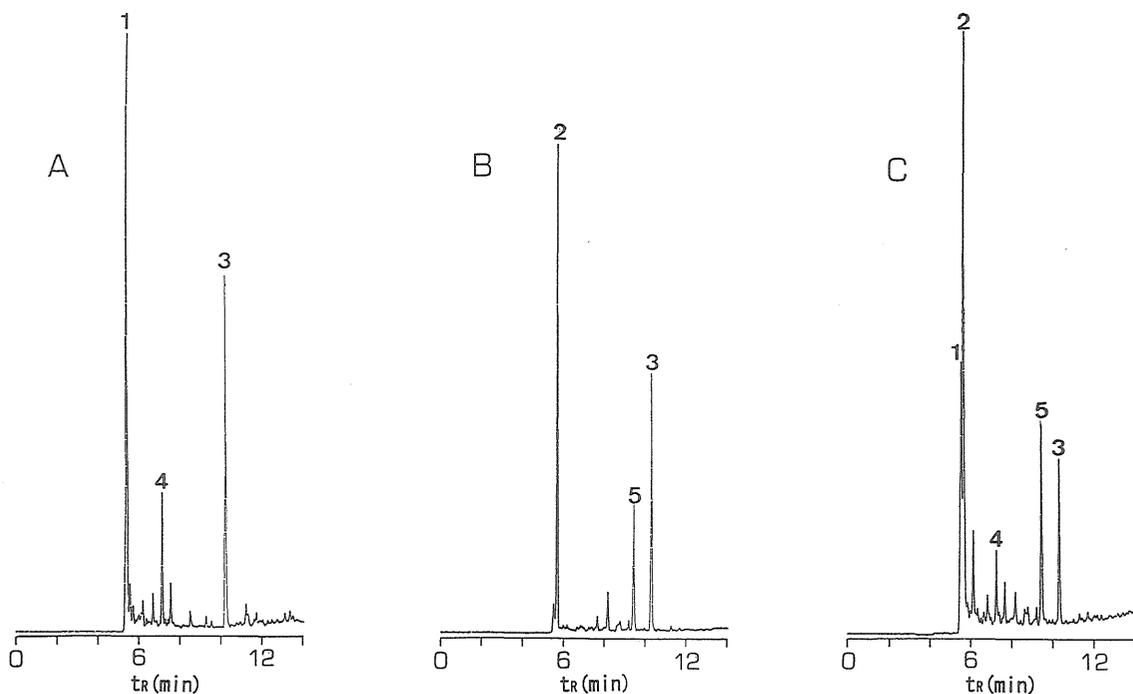


Fig. 6. Pyrogram of Isoprene-Butadiene Component Blended Rubber

Pyrogram A : SBR, B : Styrene-Isoprene Copolymer, C : Rubber Seal in Airtight Jar

Peaks 1 : Butadiene, 2 : Isoprene, 3 : Styrene, 4 : 4-Vinylcyclohexene, 5 : Dipentene

Table 1. Usual Pyrolysis GC Conditions for Material Identification

Pyrolyzer	
Instrument	Japan analytical industry curie point model JHP-2
Pyrolysis	590°C, 3s
Oven temp.	160°C
Transfer line temp.	170°C
Sample weight	0.2~ 0.3mg
GC	
Instrument	Hitachi model 163
Column	G-100+G-300, 1.2mm i.d.×60m, 1μm film
Column temp.	50-200°C, 10°C/min
Detector	FID

Table 2. Pyrolysis GC Conditions for Isoprene Butadiene Component Blended Rubber

Pyrolyzer	
Instrument	Japan analytical industry curie point model JHP-3S
Pyrolysis	590°C, 5s
Oven temp.	300°C
Needle temp.	300°C
Sample weight	0.2~ 0.3 mg
GC	
Instrument	HP model 5890
Column	DB-1, 0.25mm i.d.×60m, 5μm film
Column temp.	50-280°C, 10°C/min
MS	
Instrument	JEOL model Automass 50

3. 市販品への適用

市販品の食品用ゴム製品20検体にこの方法を適用し鑑別を行った結果、密封ガラスびんゴムパッキン9検体、ラムネびんゴムパッキン7検体、料理用ゴムべら1検体はIR(NR)とSBRのブレンドゴム、ラムネびんゴムパッキン1検体はIR(NR)とBRのブレンドゴム、2検体はIR(NR)であることがわかった。なお正確な組成比は標準品がないため測定できなかったが、PyGC-MSにおけるIso, But, Stの各ピーク面積値より相対的な組成比を計算した(Table 3)。密封ガラスびんゴムパッキンのように同種の製品においてIso, But, Stの組成比がか

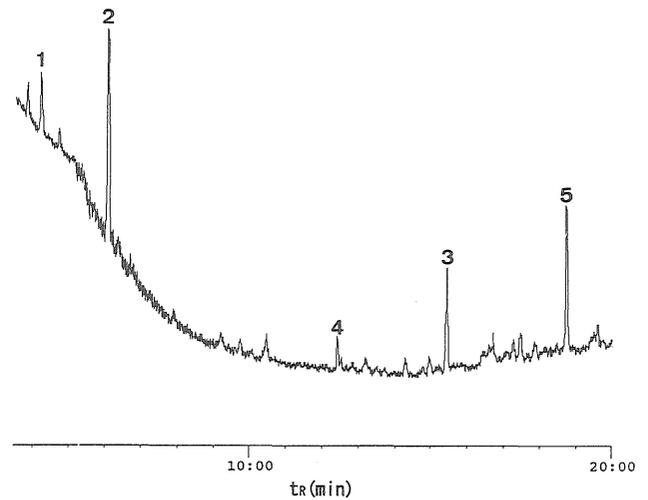


Fig. 7. Total Ion Pyrogram of Rubber Seal in Airtight Jar
1: Butadiene, 2: Isoprene, 3: Styrene,
4: 4-Vinylcyclohexene, 5: Dipentene

Table 3. Relative Composition Ratio of Commercial Rubber Products

Commercial rubber products	Iso	But	St
Rubber seal of airtight jar	100	49	26
	100	26	14
	100	27	22
	100	20	24
	100	39	48
	100	13	16
	100	20	30
Rubber seal of soda pop bottle	100	24	28
	100	20	45
	100	37	19
	100	25	20
	100	22	5
	100	27	28
	100	33	42
Rubber spatula	100	37	20
	100	9	8
	100	27	92

なりばらついていたことより、原料ゴム自体にそれぞれ異なったものが使用されている可能性があり、配合されている添加剤にもちがいがあることが推測された。したがって規制されている材質中の鉛、カドミウムといった重金属の含量が異なっていることもあるため、規格試験を行う場合、プラスチック製品に比較してゴム製品は同種類のものにつき複数個の検体を検査することがのぞましいと考えられた。

ま と め

IR (NR)とBR系のブレンドゴムの前処理を要しない簡便な鑑別法を、FT-IR及びPyGC-MSを用いて検討した。FT-IRでは標準品は鑑別が可能だが、実際の試料では困難であった。PyGC-MSではTable 2の条件によりIR (NR), BRに特有の熱分解生成物であるIso, Butが分離しMSで確認されたため、実際の試料の鑑別が可能であった。この方法を適用し市販品20検体の鑑別を行った結果、IR (NR)とSBRのブレンドゴム17検体、IR (NR)とBRのブレンドゴム1検体、IR (NR) 2検体であることがわかった。Iso, But, Stの相対的な組成比を計算したところ、同種の製品においてもかなり大きなばらつきが認められた。このことより原料ゴム自体にそれぞれ異なったものが使用されている可能性があり、配合されている添加剤にもちがいがあることが推測された。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994年10月)で発表した。)

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課, 乳肉衛生課, 食品化学課監修:平成6年版食品衛生小六法, 1021-1057, 1993, 新日本法規出版, 東京.
- 2) 日本ゴム協会編:ゴム工業便覧, 第4版, 21-22, 1995, 日本ゴム協会, 東京.
- 3) 日本分析化学会, 高分子分析研究懇談会編:高分子分析ハンドブック, 初版, 466-467, 1990, 朝倉書店, 東京.
- 4) 錦田晃一, 岩本令吉:赤外法による材料分析, 初版, 215-219, 1989, 講談社, 東京.
- 5) 信平和代, 平柳滋敏:日本ゴム協会誌, 62, 77-83, 1989.
- 6) 柘植新, 大谷肇:高分子の熱分解ガスクロマトグラフィ基礎およびデータ集, 第2版, 218-223, 1991, テクノシステム, 東京.
- 7) 武内次夫, 柘植新:高分子の熱分解ガスクロマトグラフィ, 第1版, 144-146, 1977, 化学同人, 東京.

有機農産物の栄養成分について

高橋 巖*, 横山 知子*, 坂牧 成恵*, 牛尾 房雄*,
植田 忠彦*, 市川 久次*, 友松 俊夫**, 加藤 芳美***,
小宮 三紀子***, 小林 俊明****, 寺門 和也****

Nutritional Components in Vegetables Cultivated Using Organic Materials

IWAO TAKAHASHI*, TOMOKO YOKOYAMA*, NARUE SAKAMAKI*, FUSAO USHIO*,
TADAHIKO UETA*, HISATSUGU ICHIKAWA*, TOSHIO TOMOMATSU**,
YOSHIMI KATOH***, MIKIKO KOMIYA***, TOSHIAKI KOBAYASHI****
and KAZUYA TERAKADO****

Keywords : 有機栽培 organic cultivation, 栄養成分 nutritional components, 野菜 vegetables

緒 言

今日、市場には数多くの食品が豊富に出回り、我々は豊かな食生活を営むことが可能となった。しかし一方で、農薬、抗生物質、放射能等による食品汚染や食品添加物の問題が指摘され、食品の安全性を確保することが求められている。こうした状況の中で、消費者の健康志向、食品の安全性に対する関心の高まりに伴って、有機農産物に対する需要が年々増加してきている¹⁾。また、平成5年4月に農林水産省は「有機農産物等に係わる青果物等特別表示ガイドライン」を施行し、これにより青果物等の生産及び流通の円滑化を図り、消費者の適正な選択が可能となるよう表示のガイドラインが定められた。

有機農産物に対しては「栄養価が高い」、「健康に良い」と言われている¹⁾。しかし、有機農産物が化学肥料を主体とした慣行栽培農産物に比べて栄養学的に優れているか否かについては、客観的な判断が下せるほどのデータが現在のところない。

そこで、有機農産物についての栄養学的評価を行うことを目的に、同一環境下で栽培された有機農産物と化学肥料栽培農産物の栄養成分含量の比較検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

平成5年5月から平成6年7月にかけて東京都農業試験場実験圃場で収穫された野菜を試料として用いた。

- 1) 品名、品種名、収穫時期 表1に示す。
- 2) 栽培法 A : 有機農法(以下、A群と記す)
B : 減農薬農法(以下、B群と記す)
C : 慣行(以下、C群と記す)

栽培法の構成を表2に示す。

2. 分析方法

試料を水洗後、可食部をとり、カロチン、ビタミンC、糖度、酸度の分析を行った。その他の分析項目については、凍結乾燥した後、ミキサーで粉末・均一化したものについて分析を行った。

水分：凍結乾燥法、タンパク質：セミマイクロゲルダール法²⁾、脂質：ソックスレー抽出法³⁾、灰分：直接灰化法⁴⁾、炭水化物：計算値(100gから水分、タンパク質、脂質、および灰分の合計値を差し引いた値)、エネルギー：FAOのエネルギー換算計数をを用いた⁵⁾、食物繊維：酵素重量法⁶⁾、ミネラル：高周波誘導結合プラズマ発光分析法⁷⁾、カロチン：高速液体クロマトグラフィー⁸⁾、チアミン：チオクローム蛍光法⁹⁾、リボフラビン：ルミ

*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

**同食品研究科

***東京都衛生局健康推進部健康推進課

****東京都農業試験場園芸部

表1 試料

品名	品種	収穫時期
ダイコン	天春, 富美勢	平成5年5月
キャベツ	Y R 錦秋, 中早生	平成5年7月
トマト	ふじみ, おおみや	平成5年7月
ナス	千黒2号, 千両2号	平成5年7月
コマツナ	せいせん, さおり, みすぎ	平成5年10月
ホウレンソウ	アクティブ, おかめ, 深緑	平成5年10月
タマネギ	パワー	平成6年6月
キュウリ	つばさ	平成6年7月
ジャガイモ	男爵	平成6年7月
トウモロコシ	ピーターコーン	平成6年7月

表2 栽培法の構成

	A:有機	B:減農薬	C:慣行
有機質肥料	○	△	○
化学肥料	×	△	○
農薬	×	△	○

○慣行施用 △半量施用 ×無施用

フラビン蛍光法¹⁰⁾, ビタミンC:ヒドラジン・高速液体クロマトグラフィー¹¹⁾, 糖度:屈折計法, 酸度:滴定法(0.1N水酸化ナトリウムで滴定, 値はクエン酸として)

結 果

結果を表3, 4, 5に示した. 栽培法間の分析値の有意差検定は分散分析, t検定により行った(危険率は5%とした).

(1) 一般成分について

慣行(C群)に比して有意な差を示したものは, エネルギーと水分ではコマツナ, ホウレンソウ, トウモロコシであった. タンパク質ではダイコン, コマツナ, ホウレンソウ, トウモロコシ, ジャガイモであった. また, 炭水化物と食物繊維ではキャベツ, トマト, コマツナ, ホウレンソウ, トウモロコシであった. しかし, 品種間で同一傾向が認められない場合があり, このうち同一傾向を示したのはホウレンソウのエネルギー, 水分, 炭水化物と食物繊維であった.

(2) ビタミン類について

ビタミン類でC群に比して有意な差を示したものは, カロチン, チアミン, リボフラビン, アスコルビン酸に見られたが, 品種間で同一傾向は認められなかった.

(3) ミネラルについて

ミネラルでC群に比して有意な差が認められた主な成

分は, カルシウム, リン, 鉄, カリウム, マグネシウムおよび亜鉛であった. カルシウムではC群がホウレンソウ(A群に比して)とコマツナ(B群に比して)で高値を示した. リンではナス, キュウリ, ジャガイモでA群がC群に比して高値を示し, ホウレンソウでは逆にC群がA群に比して高値を示した. 鉄ではホウレンソウでC群がA群, B群に比して高値であった. カリウムではホウレンソウ, ジャガイモでA群がC群に比して高値を示した. マグネシウムではコマツナ, ジャガイモでA群がC群に比して高値を示した. 亜鉛ではキャベツ, ホウレンソウ, タマネギなどでC群がA群, B群に比して高値であった.

考 察

蜷木は有機肥料の施用が野菜のビタミンCおよび糖含有量を高める可能性を示唆している¹²⁾. 鯨は市販の有機栽培野菜と化学肥料主体の慣行栽培野菜についてブロッコリー, ニンジンおよびダイコンを対象として, ビタミンCと糖質含有量の比較検討を行っているが, ビタミンCはブロッコリー, ニンジン共に有機栽培のものが若干高く, ダイコンでは逆に慣行栽培のものが高い. また, 糖質はダイコンでは差が認められないと報告している¹³⁾. 吉田らは肥料の違いによるトマトの還元糖, 有機酸およびビタミンC含量について3年間調査した結果を報告しているが, いずれの成分についても一貫した傾向が見られていない¹⁴⁾. ミネラルについては, ダイコンにおける栽培試験でリン, カリウム, 亜鉛の含有量が土壌成分濃度の傾向とはほぼ一致したとの報告があり, 今後は土壌成分の調査の必要も考えなければならない.

農産物の栄養成分は天候, 気温等の気象条件, 土壌成分等の影響を受けることが知られているが, 肥料の種類および施用方法による作物中の栄養成分含量への影響に関する調査は現在のところ少なく, 今回の我々の調査結果を考え併せても, 有機農産物の栄養評価について一定の結論を得るには至らなかった.

本調査では, 有機栽培法, 化学肥料を主体とする慣行栽培法および低農薬栽培法で栽培した10種の野菜について栄養成分含有量の比較調査を行ったが, これらの間に大きな差は認められなかった. しかし, 現在の東京都農業試験場の有機栽培圃場で施用されている有機肥料は鶏糞, 堆肥, 骨粉, 油粕等であり, 施肥を開始してから4~5年を経過したところである. 有機栽培圃場として成熟するためにはさらに年月が必要と考えられる. したがって, 今後さらに栄養成分含有量の比較調査を継続し, 有機農産物の栄養学的評価のためのデータを蓄積する必要がある.

表3 エネルギー、水分、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、食物繊維の測定結果

品名 (品種)	栽培法	エネルギー kcal	水分 g	タンパク質 g	脂質 g	炭水化物 g	灰分 g	食物繊維 g
ダイコン ^a (天春)	A	20±0.6	94.0±0.2	0.5±0.06*	0.1±0.0	4.7±0.2	0.7±0.00	1.4±0.1
	B	19±0.6	94.4±0.1	0.5±0.06*	0.1±0.0	4.3±0.2	0.7±0.06	1.3±0.1
	C	20±1.1	94.1±0.3	0.7±0.06	0.1±0.0	4.4±0.2	0.7±0.06	1.4±0.1
ダイコン ^a (富美勢)	A	20±0.6	94.0±0.2	0.6±0.06*	0.1±0.0	4.7±0.2	0.6±0.00	1.3±0.0
	B	20±0.6	94.2±0.2	0.7±0.06	0.1±0.0	4.3±0.2	0.6±0.00	1.3±0.1
	C	20±0.6	94.2±0.1	0.7±0.00	0.1±0.0	4.4±0.1	0.6±0.00	1.2±0.1
キャベツ ^a (Y R 錦秋)	A	24±0.6	92.5±0.1	1.1±0.00	0.1±0.0	5.8±0.1*	0.5±0.00	2.1±0.1*
	B	23±0.6	92.9±0.2	1.2±0.06	0.1±0.0	5.3±0.2	0.5±0.00	1.9±0.1
	C	23±0.0	92.6±0.1	1.2±0.00	0.1±0.0	5.5±0.1	0.6±0.00	1.9±0.1
キャベツ ^a (中早生)	A	24±0.6	92.5±0.2	1.1±0.06	0.1±0.0	5.7±0.2*	0.6±0.00	1.9±0.1*
	B	25±2.1	92.2±0.6	1.2±0.00	0.1±0.0	5.9±0.6	0.6±0.00	1.8±0.0*
	C	23±0.6	92.8±0.1	1.2±0.00	0.1±0.0	5.3±0.1	0.6±0.00	1.6±0.1
ナス ^a (千黒2号)	A	19±0.0	94.1±0.1	0.8±0.00	0.1±0.0	4.6±0.1	0.5±0.06	1.5±0.1
	B	19±0.0	94.0±0.1	0.8±0.06	0.1±0.0	4.5±0.1	0.5±0.00	1.5±0.1
	C	20±0.6	94.0±0.0	0.8±0.06	0.1±0.0	4.7±0.1	0.4±0.06	1.6±0.1
ナス ^a (千両2号)	A	20±0.0	93.8±0.1	0.8±0.00	0.1±0.0	4.8±0.1	0.5±0.00	1.6±0.0
	B	20±0.0	93.7±0.1	0.9±0.00	0.1±0.0	4.8±0.1	0.5±0.00	1.7±0.1
	C	20±0.6	93.9±0.2	0.8±0.06	0.1±0.0	4.8±0.2	0.5±0.00	1.7±0.1
トマト ^a (ふじみ)	A	18±0.6	94.5±0.0*	0.7±0.06	0.1±0.0	4.2±0.1*	0.5±0.00	1.2±0.1*
	B	17±0.6	94.8±0.2	0.7±0.10	0.1±0.0	4.0±0.1	0.5±0.06	1.0±0.1
	C	16±0.6	94.8±0.0	0.7±0.06	0.1±0.0	3.9±0.2	0.5±0.00	1.0±0.1
トマト ^a (おおみや)	A	18±0.0	94.4±0.1	0.7±0.00	0.1±0.0	4.3±0.1	0.5±0.00	1.2±0.0
	B	17±1.5	94.6±0.4	0.7±0.00	0.1±0.0	4.1±0.3	0.5±0.06	1.1±0.1
	C	17±0.6	94.6±0.1	0.7±0.00	0.1±0.0	4.1±0.1	0.5±0.06	1.1±0.1
コマツナ ^a (すいせん)	A	18±0.6	93.2±0.1*	2.0±0.06	0.2±0.0	3.3±0.1	1.3±0.00	1.8±0.1
	B	17±0.6*	93.8±0.1*	1.7±0.06*	0.2±0.0	3.0±0.1*	1.3±0.06	1.6±0.1*
	C	19±0.0	92.9±0.1	2.1±0.15	0.2±0.0	3.5±0.2	1.3±0.06	1.8±0.0
コマツナ ^a (さおり)	A	21±0.0*	92.1±0.2*	2.4±0.06	0.2±0.0	3.8±0.1*	1.5±0.06	2.2±0.1*
	B	19±0.6	92.7±0.1	2.2±0.12	0.2±0.0	3.4±0.2	1.5±0.00	2.2±0.2
	C	20±0.6	92.5±0.1	2.4±0.06	0.2±0.0	3.4±0.1	1.5±0.00	1.9±0.1
コマツナ ^a (みすぎ)	A	20±0.6*	92.7±0.2	2.3±0.06	0.2±0.0	3.4±0.2*	1.4±0.00	1.8±0.1
	B	17±0.0*	93.5±0.0*	1.9±0.10*	0.2±0.0	3.1±0.1*	1.3±0.00	1.7±0.1*
	C	21±0.6	92.3±0.2	2.2±0.06	0.2±0.0	4.0±0.2	1.4±0.00	2.0±0.0
ハウレンソウ ^a (アクティブ)	A	19±0.6*	92.3±0.2*	2.5±0.06*	0.2±0.0	3.3±0.1*	1.7±0.06	2.0±0.2*
	B	21±0.6*	92.0±0.2*	2.7±0.12	0.2±0.0	3.5±0.2*	1.7±0.06	2.4±0.2*
	C	29±0.6	89.4±0.3	2.7±0.10	0.2±0.0	5.9±0.1	1.8±0.10	3.0±0.3
ハウレンソウ ^a (おかめ)	A	21±0.0*	91.8±0.1*	2.7±0.12	0.2±0.0	3.5±0.2*	1.8±0.06*	2.5±0.3*
	B	23±0.6*	91.4±0.1*	2.7±0.06	0.2±0.0	3.9±0.2*	1.7±0.06*	2.3±0.2*
	C	30±1.2	89.3±0.3	2.8±0.06	0.2±0.0	6.0±0.3	1.6±0.00	3.2±0.1
ハウレンソウ ^a (深緑)	A	18±0.6*	92.6±0.1*	2.4±0.10	0.2±0.0	3.1±0.1*	1.7±0.00	2.0±0.2*
	B	22±0.6*	91.5±0.2*	2.8±0.10*	0.2±0.0	3.7±0.1*	1.8±0.00	2.0±0.1*
	C	26±1.0	90.7±0.3	2.4±0.06	0.2±0.0	5.1±0.2	1.6±0.00	2.7±0.1
タマネギ ^b (パワー)	A	38±1.1	89.7±0.3	0.9±0.05	0.1±0.0	8.9±0.2	0.4±0.00	1.5±0.1
	B	36±1.3	90.0±0.3	1.0±0.12	0.1±0.0	8.5±0.4	0.4±0.00	1.4±0.0
	C	38±1.3	89.4±0.3	0.9±0.05	0.1±0.0	8.9±0.4	0.4±0.00	1.5±0.1
キュウリ ^b (つばざ)	A	19±0.8	94.0±0.3	0.8±0.04	0.1±0.0	4.6±0.3	0.5±0.00	1.0±0.1
	B	17±0.5	94.5±0.1	0.8±0.04	0.1±0.0	4.0±0.1	0.5±0.00	0.9±0.1
	C	18±1.1	94.3±0.3	0.8±0.00	0.1±0.0	4.3±0.3	0.5±0.00	1.0±0.1
トウモロコシ ^b (ピーターコーン)	A	109±4.3	73.8±0.9	3.6±0.24	2.6±0.2	19.3±0.5	0.8±0.00	3.0±0.2
	B	107±2.7*	74.3±0.6*	3.5±0.26*	2.5±0.2	19.0±0.6*	0.8±0.05	2.7±0.3*
	C	113±2.6	73.0±0.5	3.8±0.14	2.7±0.2	19.7±0.3	0.8±0.00	3.1±0.2
じゃがいも ^b (男爵)	A	71±2.1	81.0±0.5	2.0±0.00*	0.2±0.0	15.8±0.5	1.0±0.00	1.2±0.1
	B	70±2.0	81.2±0.5	1.9±0.15	0.2±0.0	15.7±0.6	1.0±0.00	1.2±0.1
	C	69±1.7	81.5±0.4	1.8±0.13	0.2±0.0	15.6±0.5	1.0±0.05	1.2±0.1

平均値±標準偏差, 可食部100gあたり, ^a: N=3, ^b: N=5, *:栽培法Cに比して有意差有り(危険率5%)

表4 ビタミン類, 糖度, 酸度の測定結果

品名 (品種)	栽培法	α -カロチン μg	β カロチン μg	ビタミンA効力 IU	チアミン mg	リボフラビン mg	アスコルビン酸 mg	糖度 g	酸度 g
ダイコン ^a (天春)	A				0.016±0.003	0.019±0.002	23±1.5		
	B				0.016±0.001	0.016±0.002	21±1.0		
	C				0.016±0.003	0.015±0.002	22±1.0		
ダイコン ^a (富美勢)	A				0.017±0.002	0.015±0.002	20±1.0		
	B				0.020±0.002	0.015±0.000	20±1.2		
	C				0.022±0.003	0.015±0.001	21±1.0		
キャベツ ^a (Y R 錦秋)	A	nd	3±1.2	ϕ ±0.0	0.036±0.001	0.043±0.002	38±2.1		
	B	nd	1±0.6	ϕ ±0.0	0.040±0.002*	0.042±0.001	37±1.2		
	C	nd	3±2.0	ϕ ±0.0	0.034±0.000	0.044±0.004	39±1.5		
キャベツ ^a (中早生)	A	nd	4±1.2	ϕ ±0.0	0.062±0.001*	0.038±0.002	46±0.6		
	B	nd	2±1.0	ϕ ±0.0	0.063±0.002*	0.039±0.001	44±4.0		
	C	nd	1±0.6	ϕ ±0.0	0.066±0.002	0.042±0.003	44±1.5		
ナス ^a (千黒2号)	A	nd	38±7.6	21±4.5	0.039±0.004	0.029±0.002	6±0.6		
	B	nd	40±9.5	22±5.5	0.040±0.004	0.027±0.003	6±0.3		
	C	nd	41±6.8	23±4.2	0.038±0.004	0.030±0.003	6±1.0		
ナス ^a (千両2号)	A	nd	34±5.5	19±2.9	0.035±0.002	0.027±0.002	6±0.4		
	B	nd	36±9.0	20±5.0	0.035±0.008	0.027±0.001	6±0.2		
	C	nd	33±4.5	18±2.5	0.036±0.001	0.030±0.003	6±0.3		
トマト ^a (ふじみ)	A	nd	560±66	310±36	0.049±0.003	0.027±0.001	16±1.2	4.8±0.3	0.39±0.05
	B	nd	490±84	270±49	0.050±0.002	0.028±0.002	17±1.5	4.8±0.3	0.39±0.09
	C	nd	630±170	350±98	0.049±0.002	0.028±0.003	17±1.0	5.0±0.0	0.41±0.02
トマト ^a (おおみや)	A	nd	520±82	290±46	0.052±0.002	0.031±0.002	19±3.1	4.0±0.0	0.35±0.02
	B	nd	560±35*	310±20*	0.053±0.002	0.031±0.002	17±1.5	5.3±1.5	0.35±0.06
	C	nd	420±40	230±25	0.052±0.002	0.030±0.002	18±1.2	4.8±0.3	0.35±0.05
コマツナ ^a (せいせん)	A	nd	2800±150	1600±100	0.060±0.000	0.14±0.01	61±4.6		
	B	nd	2800±210	1500±150	0.060±0.000	0.14±0.00	57±3.5*		
	C	nd	2900±120	1700±58	0.060±0.000	0.15±0.01	68±4.0		
コマツナ ^a (さおり)	A	nd	3400±200	1900±100	0.073±0.006	0.17±0.01	65±8.5		
	B	nd	3400±400	1900±200	0.070±0.000	0.16±0.01	62±2.1		
	C	nd	3500±150	2000±120	0.070±0.000	0.17±0.01	64±7.0		
コマツナ ^a (みすぎ)	A	nd	3300±290	1800±170	0.060±0.000	0.16±0.01*	68±11		
	B	nd	3200±100	1800±58	0.057±0.012	0.14±0.01	63±8.3		
	C	nd	3500±230	2000±120	0.057±0.006	0.14±0.00	71±11		
ホウレンソウ ^a (アクティブ)	A	nd	3000±310*	1700±150*	0.11±0.01	0.21±0.02	63±10		
	B	nd	3200±210*	1800±100*	0.10±0.01	0.22±0.03	66±12		
	C	nd	4600±250	2600±150	0.11±0.01	0.23±0.01	73±5.5		
ホウレンソウ ^a (おかめ)	A	nd	2700±100*	1500±100*	0.12±0.01	0.20±0.01*	61±7.5		
	B	nd	2900±58*	1600±58*	0.11±0.01	0.21±0.01	59±6.8		
	C	nd	3700±200	2100±150	0.12±0.01	0.22±0.01	64±3.5		
ホウレンソウ ^a (深緑)	A	nd	3100±350	1700±200	0.10±0.01	0.20±0.01	57±4.7		
	B	nd	3500±350	2000±200	0.10±0.01	0.21±0.01	73±3.1*		
	C	nd	3200±250	1800±150	0.11±0.01	0.20±0.01	59±4.7		
タマネギ ^b (パワー)	A				0.029±0.003	0.014±0.002	11±1.6		
	B				0.031±0.003	0.014±0.001	10±1.4		
	C				0.029±0.003	0.013±0.002	10±0.7		
キュウリ ^b (つばさ)	A	nd	340±31*	190±18*	0.041±0.001	0.045±0.003	15±2.2		
	B	nd	295±55	170±30	0.042±0.002	0.043±0.001	15±1.3		
	C	nd	234±53	130±28	0.041±0.002	0.043±0.003	15±2.4		
トウモロコシ ^b (ピーターコーン)	A	21±2.8*	28±5.6	27±4.3	0.18±0.01	0.14±0.01	15±1.5		
	B	26±2.6	30±2.7	31±3.0	0.17±0.01	0.14±0.01	16±2.6		
	C	28±4.8	33±5.2	34±5.9	0.18±0.01	0.14±0.01	15±2.6		
ジャガイモ ^b (男爵)	A				0.074±0.002	0.030±0.000	28±1.3		
	B				0.076±0.009	0.030±0.000	27±6.0		
	C				0.078±0.014	0.030±0.000	26±1.6		

平均値±標準偏差, 可食部100gあたり, ^a: N=3, ^b: N5, *: 栽培法Cに比して有機差有り (危険率5%)

表5 ミネラルの測定結果

品名 (品種)	栽培法	Ca	P	Fe	Na	K	Mg	Zn	Cu
		mg	mg	mg	mg	mg	mg	μg	μg
ダイコン ^a (天春)	A	20±0.0	33±2.6*	0.3±0.06	9±1.2	300±10	8±0.6*	0.15±0.01*	0.02±0.00
	B	19±0.6	29±1.0	0.2±0.00	5±0.6	290±6	10±1.0	0.15±0.01*	0.02±0.00
	C	23±3.1	28±1.2	0.2±0.00	6±1.5	280±15	13±1.7	0.19±0.01	0.02±0.00
ダイコン ^a (富美勢)	A	18±1.5*	27±1.0*	0.2±0.00	6±0.6	270±6	7±0.6*	0.13±0.01	0.02±0.00
	B	20±0.0*	23±0.6	0.2±0.00	4±0.6	290±15	10±0.6	0.15±0.01	0.02±0.00
	C	25±1.0	22±0.6	0.2±0.00	4±1.0	270±12	9±0.6	0.15±0.01	0.01±0.00
キャベツ ^a (YR錦秋)	A	39±0.6	28±0.0	0.2±0.00	3±0.0	190±0	15±0.0	0.13±0.00*	0.02±0.00
	B	42±0.0*	27±0.0	0.2±0.00	3±0.0	190±0	15±0.6	0.14±0.00*	0.03±0.00
	C	38±0.6	27±0.0	0.2±0.00	3±0.0	200±0	14±0.0	0.25±0.00	0.03±0.00
キャベツ ^a (中早生)	A	32±0.0*	32±0.6*	0.3±0.06	4±0.0*	210±6	15±0.0*	0.15±0.00*	0.02±0.01
	B	36±0.6	29±0.6*	0.4±0.06*	3±0.0	220±0	14±0.0*	0.14±0.00*	0.02±0.00
	C	36±0.6	27±0.0	0.2±0.00	2±0.0	210±0	12±0.0	0.27±0.00	0.02±0.00
ナス ^a (千黒2号)	A	14±0.0	26±1.0*	0.2±0.00	φ±0.0	200±0	11±0.0	0.10±0.00	0.04±0.00
	B	13±0.6	25±0.6*	0.2±0.00	φ±0.0	210±6	13±1.0	0.10±0.00	0.03±0.00
	C	14±0.6	19±0.6	0.2±0.00	φ±0.0	200±6	12±0.6	0.09±0.01	0.04±0.01
ナス ^a (千両2号)	A	18±0.0*	30±1.5*	0.2±0.00	φ±0.0	210±6	12±0.0	0.13±0.01	0.04±0.00
	B	19±0.6*	26±0.6*	0.2±0.00	φ±0.0	220±6	14±0.6*	0.12±0.00	0.03±0.00
	C	15±0.6	23±1.0	0.2±0.00	φ±0.0	210±0	12±0.0	0.11±0.01	0.04±0.00
トマト ^a (ふじみ)	A	8±1.0	30±0.0*	0.2±0.00	1±0.0	230±0*	10±0.0	0.14±0.01	0.06±0.01
	B	9±0.6	28±1.5*	0.2±0.06	1±0.0	220±10	10±0.6	0.14±0.01	0.05±0.01
	C	8±0.6	25±1.0	0.2±0.00	1±0.0	210±0	10±0.6	0.14±0.02	0.06±0.01
トマト ^a (おのみや)	A	8±0.0	30±1.7	0.2±0.00	1±0.0	220±6	10±0.6	0.14±0.01	0.05±0.01
	B	10±1.2	30±2.1	0.2±0.00	1±0.0	220±17	10±1.0	0.14±0.02	0.05±0.01
	C	8±0.6	27±1.5	0.2±0.00	1±0.0	210±6	11±0.6	0.15±0.01	0.05±0.00
コマツナ ^a (せいせん)	A	150±0.0*	40±1.5	0.7±0.00*	5±0.6	440±21	38±2.5*	0.21±0.01*	0.05±0.01
	B	130±5.8*	38±1.0*	0.7±0.00*	3±0.0	430±6*	36±0.6*	0.20±0.01*	0.04±0.00
	C	180±5.8	41±0.6	0.9±0.00	3±0.6	410±6	26±1.0	0.25±0.02	0.05±0.00
コマツナ ^a (さおり)	A	160±5.8*	54±2.0*	1.2±0.06	3±0.0	520±10	42±3.0*	0.29±0.02*	0.05±0.01
	B	150±5.8*	47±1.0	1.2±0.06	2±0.0	520±6	37±1.5*	0.24±0.02	0.05±0.00
	C	180±0.0	46±0.6	1.2±0.06	3±0.6	500±10	33±0.6	0.26±0.01	0.06±0.01
コマツナ ^a (みすぎ)	A	160±11	43±0.6	0.9±0.00	4±0.0	470±10	43±2.1*	0.24±0.00	0.05±0.00
	B	130±5.8*	42±0.6*	0.9±0.10	3±0.0	450±6	38±1.5*	0.24±0.02	0.05±0.00
	C	180±5.8	46±2.1	1.0±0.10	4±1.0	470±10	33±1.0	0.28±0.03	0.05±0.01
ハウレンソウ ^a (アクティブ)	A	38±1.0*	50±0.6*	1.3±0.10*	3±0.0	780±23*	77±2.1*	0.48±0.01*	0.08±0.00*
	B	49±1.0*	52±2.1*	1.8±0.12*	5±0.6*	730±23	92±1.0*	0.54±0.01*	0.08±0.01*
	C	73±2.3	72±2.3	4.6±0.40	3±1.0	690±35	100±0.0	1.2±0.06	0.12±0.01
ハウレンソウ ^a (おかめ)	A	34±1.0*	47±2.6*	1.3±0.00*	2±0.0	840±15*	81±1.0*	0.58±0.02*	0.09±0.00*
	B	35±1.2*	50±1.2*	1.4±0.10*	2±0.0	780±6*	80±1.5*	0.64±0.01*	0.09±0.00*
	C	58±4.4	59±1.5	2.8±0.23	3±0.0	640±15	99±1.2	1.2±0.06	0.12±0.01
ハウレンソウ ^a (深緑)	A	39±1.0*	56±0.6*	1.0±0.06*	2±0.6	760±15*	90±2.1	0.68±0.03*	0.08±0.00*
	B	58±3.5	61±1.7	1.8±0.06*	6±0.6*	730±6*	110±5.8*	0.78±0.01*	0.09±0.00
	C	63±2.3	63±1.5	2.6±0.23	2±0.0	620±6	93±2.1	1.3±0.06	0.10±0.00
タマネギ ^b (パワー)	A	18±1.3	24±1.0*	0.2±0.00	1±0.0	160±8	11±0.8*	0.14±0.01*	0.03±0.00
	B	15±2.0	24±2.9	0.2±0.00	1±0.0	160±8	10±0.0*	0.17±0.01*	0.03±0.00
	C	16±1.6	22±1.4	0.2±0.05	1±0.0	160±9	9±0.5	0.26±0.02	0.03±0.00
キュウリ ^b (つばさ)	A	18±1.3	31±1.8*	0.3±0.05	1±0.0	200±14	15±1.2*	0.18±0.01	0.06±0.01
	B	18±1.1	27±1.3	0.3±0.00	1±0.0	190±5	13±0.5	0.17±0.01	0.06±0.01
	C	17±0.8	27±1.1	0.2±0.04	1±0.0	190±9	13±0.7	0.18±0.01	0.06±0.00
トウモロコシ ^b (ピーターコーン)	A	2±0.5	110±5.5	0.7±0.00*	φ±0.0	290±11	33±2.1	0.83±0.07*	0.09±0.01*
	B	2±0.0	96±5.5	0.7±0.04*	φ±0.0	290±10	32±1.3*	0.82±0.06*	0.09±0.01
	C	2±0.5	100±4.5	0.9±0.05	φ±0.0	290±7	34±0.7	1.1±0.05	0.10±0.01
ジャガイモ ^b (男爵)	A	4±0.0	59±3.2*	0.4±0.00	φ±0.0	450±7*	26±1.2*	0.28±0.01*	0.13±0.01
	B	4±0.5	53±5.7	0.4±0.00	1±0.1	430±13*	23±0.8	0.27±0.03*	0.13±0.01
	C	4±0.5	49±3.2	0.4±0.00	φ±0.0	400±15	22±1.3	0.33±0.02	0.14±0.01

平均値±標準偏差, 可食部100gあたり, ^a: N=3, ^b: N=5, *:栽培法Cに比して有意差有り(危険率5%)

文 献

- 1) 国民生活センター編：多様化する有機農産物の流通，1992，学陽書房，東京.
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，272-274，1990，金原出版，東京.
- 3) 同上，323-324，同上.
- 4) 同上，261-263，同上.
- 5) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，16，1982，大蔵省印刷局，東京.
- 6) Prosky, L., Asp, N, G., furda, I. et al. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 677-679, 1985.
- 7) 日本薬学会編：衛生試験法注解，17-32，1990，金原出版，東京.
- 8) 同上，347-349，同上.
- 9) 同上，356-359，同上.
- 10) 同上，362-363，同上.
- 11) 小高 要，稲垣節子，氏家 隆，他：ビタミン，**59**，451-455，1985.
- 12) 蜷木 翠：東農大農学集報，**38**，213-259，1994.
- 13) 鯨 幸夫：栄食誌，**47**，148-151，1994.
- 14) 吉田企世子，森 敏，長谷川和久，他：栄食誌，**37**，123-127，1984.

報 文 IV

生活環境に関する調査研究

REPORTS IV

PAPERS ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

IV 生活環境に関する調査研究

生活環境に関する調査研究として7編の論文が報告されており、このうち生活環境の変化、汚染状況の調査に関して2編、環境変化、汚染が都民の健康に与える影響に関して2編、測定、分析方法等の開発、改良を行った成果が3編掲載されている。

湖沼やダム湖など淡水域における植物プランクトンの増殖が問題となっているが、特に極度に富栄養化された水域では、藍藻類の種類や量的な増大があげられる。皇居外苑壕、千鳥が淵に出現する藍藻 *Microcystis* 属の種類と量について調査し *M. wesenbergii*, *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* 及び *Microcystis* sp の4種が存在し、特に8月には高い細胞数を示し、1994年には760,000/mlとなっていたと報告している。

大気汚染による影響を評価するための生化学的指標が望まれているが、二酸化窒素やオキシダントのような酸化力の強い物質による呼吸器へのストレス影響を反映する尿中チオバルビツール酸反応性物質 (TBAR) に着目して、幹線道路沿道付近の住民を対象として尿中 TBAR を測定し、周囲環境の汚染レベルとの関係を調べた結果、沿道に近い住民ほど TBAR 値は高く、NO₂の汚染レベルと良い相関がみられ、TBARは交絡因子に対する配慮を行えば大気汚染による影響を反映する生化学的指標として有望と述べている。

ディーゼル排気ガス暴露実験経過中、ラットに明らかな胸郭の変化を認めたため、ディーゼルエンジン排気ガスをラット新生仔期から12カ月暴露し、骨密度、骨代謝マーカー物質の測定を行っている、その結果排気ガスは骨吸収を抑制して、骨代謝を低下させること、骨代謝の変化には排気ガス中のガス状成分が関与し、粒子状物質が加わることによって、その作用が増強されることが示唆されている。

花粉症と大気汚染との関連を免疫学的に検討している。即ち、スギ花粉抗原に対する IgE 抗体産生を亢進させるディーゼル排気ガス粒子中の化学物質のアジュバント (免疫効果を高める補助物質) 作用のある物質を検索している。スギ花粉抗原とディーゼル排気ガス中の各化学物質を混合してマウスに経鼻的に感作し、IgE 抗体産生を亢進するかを測定する方法で調べた結果、アントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ (a) ピレン、がアジュバント物質として作用することを明らかにした。

金属化合物の毒性は化学形態によって大きく異なる、従って金属元素の環境中での濃度、及び人体への影響を考える場合、その存在形態を明らかにする必要がある、金属形態分析の一手法として、HPLCと高周波誘導結合発光分光分析計を用いてヘキサシアノ鉄 (Ⅱ) とヘキサシアノ鉄 (Ⅲ) の分離定量法を確立した。

平成4年12月に水道法が改正され、消毒副生成物であるホルムアルデヒド、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロアセトニトリル及び抱水クロラールが新たに監視項目として設定された。これら物質は不安定で検体の濃度が変化しやすく、即日処理が必要である。その分析法は個別に測定する煩雑な方法となるために、一斉分析法を検討している。この結果2系統の抽出と4回のガスクロマトグラフ分析で分析が完了し、分析操作に要する時間も2/3程度に短縮する事が出来た。

環境大気中の NO_x の分析は公定法であるザルツマン法が用いられるが、多数の検体を簡易に測定する方法として長期型 PTIO 法が開発されている。そこで PTIO 法とザルツマン法とを同一場所で測定し、PTIO 法の温湿度を補正して比較したところザルツマン法の値とよく一致した、PTIO 法の信頼性を高める成果である。

ディーゼルエンジン排気ガス暴露がラットの骨代謝に及ぼす影響

渡辺 伸枝, 池田 真悟, 大沢 誠喜
大西 和夫, 鈴木 重任

Inhalation of Diesel Engine Exhaust Affects Bone Metabolism in Rats

NOBUE WATANABE, SHINGO IKEDA, MASANOBU OHSAWA,
KAZUO OHNISHI and SHIGETOU SUZUKI

Animal experiments were conducted to determine whether diesel engine exhaust would effect bone metabolism in growing rats. There were three groups: those exposed to total diesel engine exhaust (particulate matter ; 5.63mg/m³, nitrogen dioxide; 4.10ppm, nitrogen monoxide : 8.10ppm), those exposed to filtered exhaust without particles and those exposed to clean air. Exposure was conducted from birth to 3,6,9,12 months of age (6hours/day:5days/week).

For diesel exhaust exposure for 3 months, bone mineral density (BMD : mg/cm²) in lumbar vertebral bone and mid-femur significantly increased compared to animals exposed to clean air. Urinary excretion of deoxy-pyridinoline, a biochemical marker for bone resorption, significantly decreased in those exposed to diesel exhaust. Exposure to total diesel engine exhaust for 12 months, resulted in significantly reduced BMD in the lumbar vertebral bone and the femur compared to the clean air group. Femur length was also reduced.

The inhalation of diesel engine is clearly shown to reduce bone resorption, increase in bone mass in cancellous and cortical regions in growing rats. These effects were not inhibited by filtration, and thus the gaseous phase of the exhaust is considered responsible for the reduction in bone resorption.

Keywords : ディーゼルエンジン排気ガス Diesel engine exhaust, 長期暴露 Long term inhalation, ラット Rats, 骨密度 Bone mineral density, 腰椎 Lumbar vertebra, 大腿骨 Femur, 尿中デオキシピリジノリン Urinary excretion of deoxypyridinoline, 血中 オステオカルシン Serum osteocalcin

緒 言

軽油を燃料とする燃費の安いディーゼルエンジンは、トラックやバスはもちろん、最近では乗用車にも用いられている。このような背景から、ディーゼルエンジンから出される排気ガスの生体に及ぼす影響が問題となつてい

る。ディーゼル排気ガスの生体影響に関する研究は、排気ガス中に粒子状物質が含有されることから、その発癌性に重点がおかれてきた^{1,2)}。動物実験においても、比較的高い濃度の排気ガスを成熟期にある動物に暴露し、呼吸器に及ぼす影響を評価した報告が多い^{3,4)}。

一方、著者らは、低濃度に希釈したディーゼルエンジ

ン排気ガスに出生時より暴露されたラットについて一連の研究を進め^{5,6,7)}、排気ガスの暴露は、肺のみならず、中枢神経や骨組織にも影響を及ぼすことを報告してきた^{8,9)}。

本報告は、骨組織に及ぼす影響についてさらに検討を加えるため、出生時から3, 6, 9, 12ヶ月間、ディーゼルエンジン排気ガスに暴露されたラットについて、骨密度の変化並びに骨代謝マーカー物質について検討したものである。

実験方法

1) ディーゼルエンジン排気ガスの暴露方法

暴露源としては比較的小型の暴露装置として、ヤン

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生科 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

マーディーゼルエンジンNFAD-50-EX型、直噴式、排気量309ccを使用し、燃料には軽油を用いて、その排気ガスを粒子量 6 mg/m^3 、 NO_2 濃度を2ppmになるように活性炭層(SX, HC-6:ツルミコール)、ヘパフィルターを通した清浄空気で希釈し、暴露チャンバー内(チャンバー容量; 1.6 m^3 、換気回数; 15回/時、換気容量; 405 l/min 、温度; $23\text{--}25^\circ\text{C}$ 、相対湿度; $45\text{--}65\%$)に導入した。

2) 吸入暴露の条件

Table 1に、粉塵濃度計(β 線式質量濃度計BAM-102型, SHIBATA), 窒素酸化物測定器(8440型, Monitor Lobs Co)でモニターしたチャンバー内の環境条件を示した。

また、アンダーセン型ロープレッシャー・インパクター(LP型, 東京ダイレックKK)を用いて計測した排気ガス中の粉塵の粒径は、90%以上が $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 以下であった。

3) 実験動物

用いた実験動物とその暴露スケジュールは、Fischer 344/Ducrg系, SPFの妊娠ラット(妊娠19日目)30匹を、対照群(control)・全排気ガス暴露群(total exhaust)・除塵群(filtered exhaust)の3群にわけ、チャンバー内で1日6時間の暴露を行いながら飼育・出産させた。母ラット1匹につき9-11匹の乳仔ラットを得、雌雄あわせて100匹の乳仔ラットから一群を構成した。生後21日目までは母仔同居のまま、離乳後も同条件で暴露を続行した。飼料は、100g中にカルシウム1.03%、リン0.70%、ビタミンD³200IUを含有するラット用標準飼料で(MF, Oriental Yeast Co. LTD, Tokyo, Japan), 飼料並びに飲水は自由摂取とした。生後3, 6, 9, 12ヶ月目に各群から6匹の雄ラットをとりだし、実験に供した。

採尿は、代謝ケージを用いて、暴露実験終了の前日の午後4時から翌日の10時までに行った。採血は、ネブタールによる深麻酔下で行った。摘出した大腿骨と腰椎は、70%エタノールで固定した後、骨塩量を測定した。

4) 血清・尿の生化学的検査の方法

血清成分の分析は、カルシウム(Ca^{++})・無機リン(Pi)・アルカリ性ホスフォターゼ(ALP)・総タンパク

(TP)・クレアチニン(CRE)について、各々の測定用試薬を用いて(ダイアヤトロン), 日立705型自動分析装置で測定した。尿成分の分析は、カルシウム(Ca^{++})・無機リン(Pi)・クレアチニン(CRE)について、血清の場合と同様の試薬を用いて行った。

5) 骨代謝マーカー物質の測定

尿中ピリジノリン・デオキシピリジノリンの測定には、PYRILINKS Assay キット(METRA Biosystems Inc.; USA)を用いた。血中オステオカルシンの測定には、Rat Osteocalcin RIA Reagents(Biomedical Technologies Inc.)を用いた。

6) 骨塩量・骨密度の測定方法

骨塩量の測定は、二重x線骨塩量測定装置(DEXA, DSC-600, アロカ社製)にて行い、骨塩量BMC(mg/bone)及び骨密度BMD(mg/cm^2)にわけて集計した。

腰椎は、椎体骨に直角に1mm間隔でスキャン(Area Scan Mode)し、パソコン上で測定結果を再構築し、2-5腰椎部の骨塩量・骨密度を算出した。

大腿骨は、10分割した際の各部位の測定値を示し、骨塩量は各パート(近位部(Pro.; 1-3/10)・中位部(Mid.; 4-7/10)・遠位部(Dis.; 8-10/10)あたり、及びtotalの絶対量(mg)で表示した。骨密度は各パートあたりの平均値(mg/cm^2)で表示した(Fig.1)。

7) 統計学的処理

実験の結果得られた各測定値について、Student's

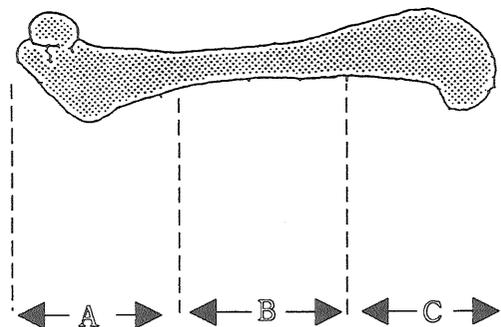


Fig. 1 Bone Mineral Density (BMD) of the Femur Measured in 10 equally divided parts. A: Proximal (scan 1-3). B: Mid (scan 4-7). C: Distal (scan 8-10).

Table 1. Experimental Conditions in Diesel Exhaust Inhalation.

	Particle (mg/m^3)	NO_2 (ppm)	NO (ppm)
Control group	0.01 ± 0.81	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Total exhaust exposure group	5.63 ± 1.94	4.10 ± 0.04	8.10 ± 0.40
Filtered exhaust exposure group	0.03 ± 0.02	3.90 ± 0.50	7.80 ± 0.40

T-test によって統計学的解析を行った。

結 果

1) 体重の変化

Fig. 2に暴露3, 6, 9, 12ヶ月後の対照群・全排気ガス暴露群・除塵群各々の雄ラットの体重を示した。各群の体重の平均値には、全実験期間を通して有意な差はみられなかった。

2) 腰椎の骨密度

Fig. 3に暴露3, 6, 9, 12ヶ月後の対照群・全排気ガス暴露群・除塵群各々の雄ラットの第2-5腰椎の骨密度を示した。暴露3ヶ月後の骨密度は、対照群に比べ、両暴露群ともに有意に高く、特に、除塵群での変化が著しく認められ、暴露は海綿骨の骨密度を増すことが明らかになった。暴露12ヶ月後では、全排気ガス暴露群の腰椎の骨密度は、対照群に比べ有意に低かった。また、各群の骨塩量の経時的推移も骨密度の場合と同様の傾向が

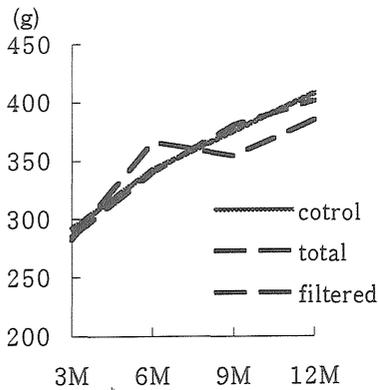


Fig. 2 Body Weight Changes in the Growing Male Rats exposed to Diesel Engine Exhaust.

みられた。

3) 大腿骨の骨長、並びに骨密度

Fig. 4に暴露12ヶ月後までの対照群・全排気ガス暴露群・除塵群各々の雄ラットの大腿骨の各パート別骨密度を示した。大腿骨は、部位によって骨の構成成分が大きく異なるため、皮質骨と海綿骨からなる近位部・遠位部、皮質骨からなる中位部にわけて、暴露の骨量に及ぼす影響を解析した。

暴露3ヶ月後では、両暴露群の中位部の骨密度は、対

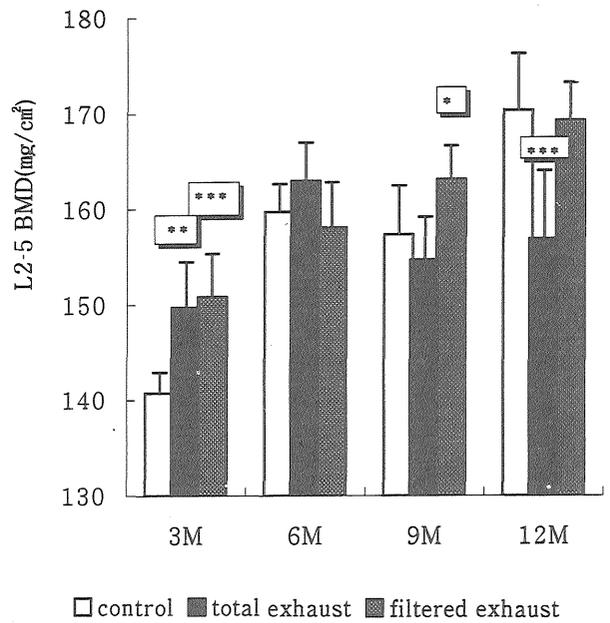


Fig. 3 BMD Values of the Vertebrae (L2-5), assessed by DXA, in the Male Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust. Significantly different from control, *p<0.05,**p<0.01,***p<0.001.

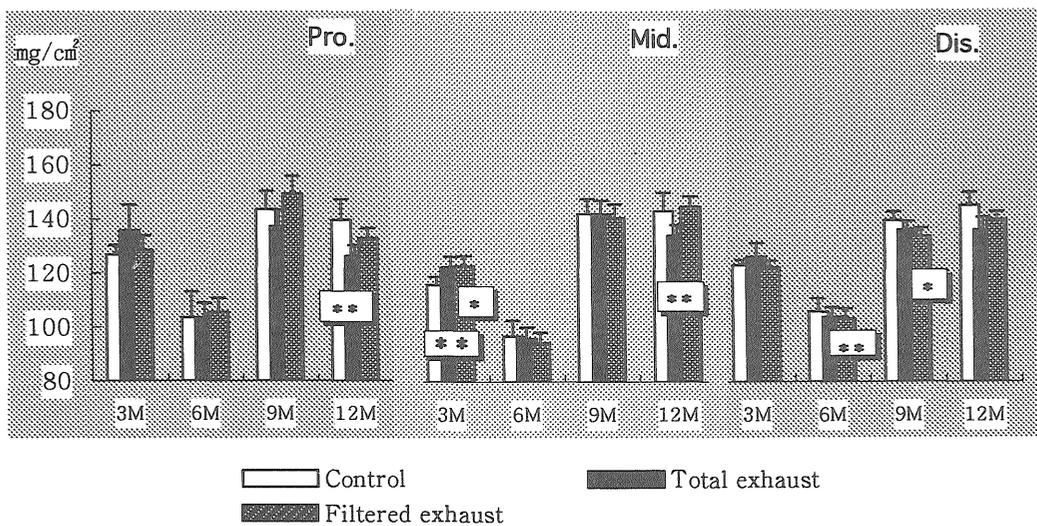


Fig. 4 Regional Values Bone Mineral Density of the Femur in Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust for 3,6,9,12 Months. Significantly different from control, *p<0.05, **p<0.01.

照群に比べ有意に増加していた。両暴露群の近位部・遠位部では、有意ではないが対照群に比べ増加する傾向がみられた。このことから、暴露は、海綿骨とともに皮質骨の骨密度も増加させることがわかった。

暴露12ヶ月後では、全排気ガス暴露群において、近位部・中位部の骨密度は対照群に比べ有意な低下がみられた。遠位部では有意ではないが対照群に比べ低下する傾向がみられた。大腿骨においても、腰椎の場合と同様に長期暴露の後に両暴露群における影響の違いが明らかになった。

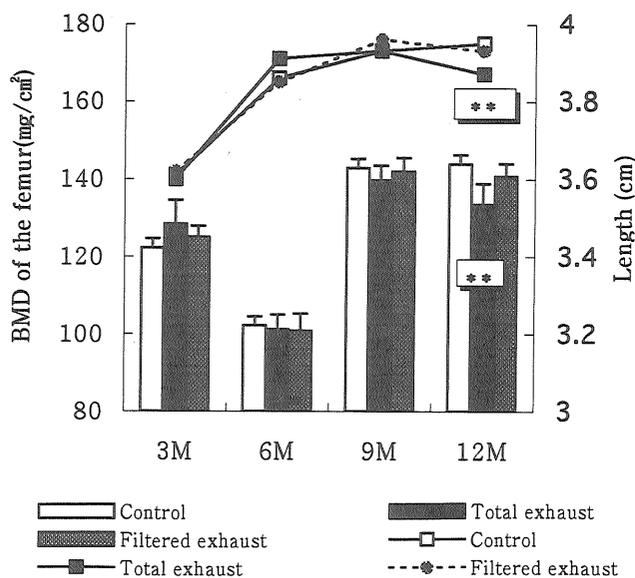


Fig. 5 BMD and Length of the Femur, assessed by DXA, in Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust. Significantly different from control, **p<0.01.

Fig. 5に暴露12ヶ月後までの大腿骨全体の骨密度の推移と骨長の変化を示した。大腿骨の長さは暴露9ヶ月までは3群とも同様であったが、12ヶ月後では全排気ガス暴露群の骨長は対照群に比べ有意な低下がみられた。

また、骨塩量についても骨密度の場合と同様な結果が得られ、暴露3ヶ月後では両暴露群とも対照群に比べ骨塩量が増加する傾向がみられた。暴露12ヶ月後の全排気ガス暴露群の骨塩量は対照群に比べ低い傾向がみられた。

4) 骨代謝マーカー物質の変化

Fig. 6に暴露12ヶ月後までの対照群・全排気ガス暴露群・除塵群各々の雄ラットについて、骨吸収マーカーとされている尿中ピリジノリン・デオキシピリジノリンを測定した結果を示した。

暴露3ヶ月後の尿中デオキシピリジノリンは、対照群に比べて、両暴露群とも有意な低下がみられた。一方、ピリジノリンの尿中排泄量は各群ともに同様に高く、成長期に高く、生後9ヶ月以降はほぼ一定の値を維持することが示された。

Fig. 7に骨形成マーカーの一つである血中オステオカルシンの測定結果を示した。暴露3、6ヶ月後の血中オステオカルシン値は各群とも同様であったが、暴露9ヶ月後では、両暴露群間で有意な違いがみられ、除塵群が全排気ガス群に比べ有意に高かった。暴露12ヶ月後では、除塵群の血中オステオカルシン値は、対照群・全排気ガス暴露群に比べ有意に高かった。

5) 血清・尿の一般的生化学的検査

暴露3、6、9、12ヶ月後の対照群・全排気ガス暴露

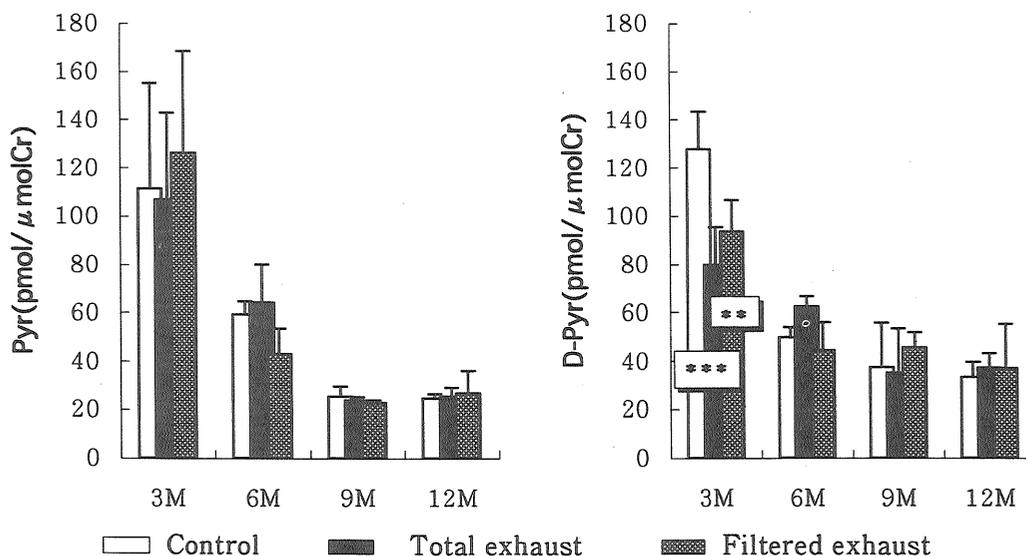


Fig. 6 Urinary Parameters in the Male Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust. Significance Levels between Exposed to Clean Air and Diesel Exhaust Conditions, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

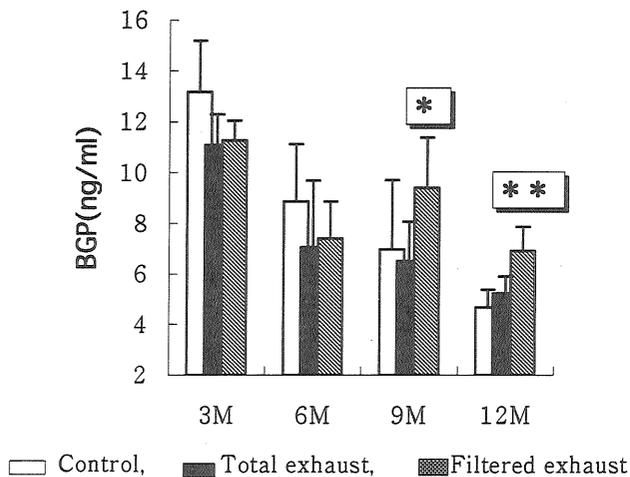


Fig. 7 Change in Serum Bone Gla-Protein in Male Rats Exposed to Diesel Engine Exhaust. Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

群・除塵群各々の雄ラットの、血清中カルシウム (Ca^{++})・無機リン (Pi)・アルカリ性ホスファターゼ (ALP)・総タンパク (TP), 尿中カルシウム (Ca^{++})・無機リン (Pi)・クレアチニン (CRE) の生化学的検査の結果は、3群間に有意差はなかった。

考 察

本研究の結果、排気ガス暴露はラットの骨代謝に以下のような影響を及ぼすことが明らかになった。

まず、成長期にあるラットにおいては、腰椎の骨密度の増加とデオキシピリジノリンの尿中排泄量を減少させることが明らかにされた。また、この時期においては、骨の長軸方向への成長は妨げられないことが示された。

次に、成長期以降では全排気ガス暴露群においては、腰椎の骨密度の減少、大腿骨の骨密度と骨長の減少がみられた。一方、除塵群においては、血中オステオカルシン値の有意な上昇がみられた。骨密度、骨長は、対照群と同じであった。

骨の代謝は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって行われているが、成長段階によって骨組織の構造が異なることも知られている。すなわち、成長期はモデリングが盛んな時期で、主として骨の形態形成が行われる。成熟期以降はリモデリングを主体とした時期で、血中カルシウムイオン濃度の調整等生体の恒常性の維持を測っている。成長に伴う骨の構造的な変化は、海綿骨と皮質骨とで異なり、海綿骨では次のようである。

骨端の軟骨細胞から供給される石灰化軟骨部は、破骨細胞によって吸収され、残った石灰化軟骨が第一次骨梁の芯となり、その上に骨芽細胞が配列し一次海綿骨が形

成される。一次海綿骨は、その後骨梁の骨髓腔側に多く分布する破骨細胞によって吸収され、骨のリモデリングが行われる。皮質骨では、骨幹部の内側で骨吸収、外側で骨形成が行われ、皮質骨の厚さを次第に増していく。骨形成と骨吸収は連関した事象であるが、成長期においては骨形成の方が骨吸収に比べ優位にあるため骨量が増加していくことが知られている^{10,11)}。

骨密度並びにデオキシピリジノリンの尿中排泄量の測定結果から、排気ガスの暴露は、海綿骨・皮質骨における骨形成と骨吸収の不均衡を引き起こすことが考えられる。生後3ヶ月までの骨のモデリングによる骨量の増加が主体をしめる時期には、排気ガスの暴露で骨吸収が抑制される結果、腰椎・大腿骨中位部に明らかに示された様に、骨密度の増加を起こすことが考えられる。大腿骨の近位部・遠位部においても骨密度が増したのは、骨幹端軟骨の吸収が抑制されたことによると考えられる。また、大腿骨の骨長に違いがなかったことから、骨端の軟骨細胞からの骨の供給は障害されていないことが考えられる。

ピリジノリン・デオキシピリジノリンは共に骨吸収マーカーとしてその有用性が認められているが、ピリジノリンは、骨・軟骨・腱に由来し、デオキシピリジノリンは骨特異であるとされている¹²⁾。本研究においては、デオキシピリジノリンは排気ガス暴露によるラットの骨吸収の抑制を示すマーカーとして有用であることが示された。

排気ガスの継続的暴露は、成長期を過ぎリモデリングが主体となる時期においては、両暴露群の各パラメーターに違いがでてくる。すなわち、全排気ガス暴露群では骨密度の減少を招くが、除塵群では対照群との差をみとめなかった。これに関連して、骨吸収抑制剤を高濃度に投与した場合、初期には骨密度の増加がみられるが、長期投与を行うと石灰化が抑制され、骨密度の減少と骨長の減少を起こすことが報告されている¹³⁾。ガス状成分に粒子状成分が加わることによって、その作用が増強されることが考えられるが、骨強度試験並びに骨の形態学的検査の結果を待ってさらに解析を行いたい。

以上に示したように、長期暴露の後には全排気ガス暴露群と除塵群とでは骨におよぼす影響に違いがでてくるが、骨吸収の抑制を起こす物質として、基本的には排気ガス中のガス状成分による作用が主であると考えられる。一酸化窒素 (NO) は破骨細胞の機能を抑制して骨吸収を調整することが報告されている^{14,15,16)}。排気ガス中の成分や肺の組織障害の連鎖反応中に生じたラジカル類が、

循環系を介して骨組織中の破骨細胞の機能を抑制すること、あるいは骨髄における破骨細胞の分化を抑制することが考えられる。また、骨吸収の抑制の起因物質としてカルシトニンの作用も考えられる。カルシトニンは甲状腺のC-細胞の他、肺の神経内分泌細胞からも分泌され、骨吸収抑制作用を持つことが知られている。タバコ煙の吸入はヒト・ハムスターの肺内のカルシトニンの分泌量と血中カルシトニン濃度を増加させることが報告されている^{17,18,19)}。また、都市大気中に暴露されたラットの肺には、カルシトニン陽性細胞が多く認められることが報告されている²⁰⁾。

本研究では、排気ガスの暴露は骨代謝に影響をおよぼすことを初めて明かにすることができた。排気ガス暴露による骨組織の病態生理に関しては、今後検討していかなければならない。

文 献

- 1) Carey, P. M. : EPA Technical Report Sep, EPA-AA-TSS-PA-86-5. pp.1-29, 1987.
- 2) Garshick, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O. C. et al. : *J Clin Invest.*, **85**, 632-639, 1990.
- 3) Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R. O., Stober, W. : *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*. 1986, Elsevier Science, Amsterdam.
- 4) McClellan, R. O. : *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 279-300, 1987.
- 5) 渡辺伸枝, 池田真悟, 大沢誠喜他 : 東京都衛研年報, **39**, 187-192, 1988.
- 6) Watanabe N, Kato T, Hamai A, Sakurai K : *Connective Tissue*, **22** : 71-78, 1991.
- 7) Watanabe N, Ikeda S, Kato T. et al. : *Connective Tissue*, **23** : 1-13, 1992.
- 8) Watanabe N : *Connective Tissue*, **23** : 15-27, 1992.
- 9) 渡辺伸枝, 林豊 : 東京都衛研年報, **44**, 211-224, 1993.
- 10) Frost, H. M. and Jee, W. S. S. : *Bone Miner.*, **18**, 227-236, 1992.
- 11) Woodard, J. C. and Jee, W. S. S. : *Handbook of Toxicologic Pathology*. 1991, Academic Press
- 12) Delmas, P. D., Dchlemmer, A., Gineyts, E. et al. *J. Bone Miner. Res.*, **6**, 639-644, 1991.
- 13) Schenk, R., Merz, W. A., Muhlbauer, R. C. et al. : *Calcif. Tiss. Res.*, **11**, 196-214, 1973.
- 14) Damoulis, P. D. and Hauschka, P. V. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 924-931, 1994.
- 15) McIntyre, L., Zaidi, M., Alam, A. S. M. T. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 2936-2940, 1991.
- 16) Garrett, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O. C. et al. : *J. Clin. Invest.*, **85**, 632-639, 1990.
- 17) Becker, K. L. : *Am. Rev. Respir. Dis.*, **140**, 436-440, 1989.
- 18) Becker, K. L. : *Am. Rev. Respir. Dis.*, **148**, 1166-1168, 1993.
- 19) Tabassian, A. R., Nysten, E. S., Giron, A. E., et al. : *Life Sci.*, **42**, 2323-2329, 1989.
- 20) Ito, T., Kitamura, H., Ogawa, T. et al. : *Exp. Pathol.*, **36**, 89-96, 1989.

スギ花粉抗原特異的マウス IgE 抗体産生における ディーゼル粒子中のアジュバント活性物質の検索

鈴木孝人*, 石森真子**, 保坂幸子***, 池田真悟****,
大澤誠喜*****, 加納堯子*****

Adjuvanticity of Chemical Compounds in Diesel-Exhaust Particles on Specific IgE Antibody Production to Japanese Cedar Pollen Allergen in Mice

TAKAHITO SUZUKI*, MAKO ISHIMORI**, SACHIKO HOSAKA***,
SHINGO IKEDA*****, MASANOBU OHSAWA***** and TAKAKO KANO*****

Study was made of the adjuvant activity of chemical compounds in diesel-exhaust particles (DEP) on IgE antibody production to Japanese cedar pollen allergen (JCPA) inoculated intranasally in mice.

The mice were inoculated seven times at 2-week intervals intranasally with JCPA (10 μ g or 30 μ g) alone, JCPA (10 μ g or 30 μ g) plus 40 μ g anthracene, JCPA (10 μ g or 30 μ g) plus 400 μ g pyrene, JCPA (10 μ g or 30 μ g) plus 400 μ g fluoranthene, JCPA (10 μ g or 30 μ g) plus 40 μ g benzo(a)pyrene or JCPA (10 μ g or 30 μ g) plus 100 μ g DEP.

IgE antibody response to JCPA in mice immunized with JCPA plus anthracene, JCPA plus pyrene, JCPA plus fluoranthene, JCPA plus benzo(a)pyrene or JCPA plus DEP was significantly enhanced compared with the animals immunized with JCPA alone.

These results suggest that the four chemical compounds in DEP clearly act as adjuvants in IgE antibody production following immunization with JCPA.

Keywords : IgE 抗体 IgE antibody, アジュバント adjuvant, ディーゼル排気ガス粒子 diesel-exhaust particles, 日本スギ花粉抗原 Japanese cedar pollen allergen, ピレン pyrene, アントラセン anthracene, フルオランテン fluoranthene, ベンゾ(a)ピレン benzo(a)pyrene, P C A passive cutaneous anaphylaxis, マウス mice

諸 言

我が国独特の花粉アレルギーであるスギ花粉症が1964年に堀口と斉藤¹⁾によって栃木県で発見されて以来、日本各地でスギ花粉症患者が年々急増している²⁾。東京都の調査でも、花粉の飛散数は多いが比較的大気汚染の少ない多摩地区よりも、花粉の飛散数は少ないが、自動車排気ガスを起因とする都内の大気汚染地区のほうがスギ花粉症で悩む人が多い傾向が見られている³⁾。また、自

動車の通行量の多い日光街道のいろは坂での調査では、道路沿道とその後背地に居住する人々を比較すると、スギ花粉症患者は道路沿道に住む人に多く認められるとの報告もある⁴⁾。更に、スギ花粉アレルギーの罹患年数の調査でも10年以下が最も多く、大部分の症例が年齢を問わず罹患年数20年以下であった⁵⁾。これらの調査結果から、昔からスギ花粉を吸入してきたにも係わらず、比較的最近になってスギ花粉症に罹患したことが推察される。

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 169 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

*** 東京文化短期大学家政科

**** 麻布大学環境保健学部環境保健学科

***** 都立衛生研究所環境保健学部環境衛生研究科

***** 順天堂大学医学部細菌学教室

すなわち、スギ花粉症の発症にはディーゼル自動車の急増による排気ガス中の大気汚染物質が関与している可能性が示唆されてきた。東京都の場合では、大気環境中に存在する粒子状成分の約40%はディーゼル自動車由来である⁶⁾。Muranaka *et al.*⁷⁾は、卵白アルブミン(ovalbumin, O A)またはスギ花粉抗原(Japanese cedar pollen allergen, JCPA)にディーゼル自動車の排気ガス粒子(diesel-exhaust particles, DEP)を混合してマウスにそれぞれ腹腔内へ感作したところ、マウス血清中のIgE抗体価は、抗原単独で感作したマウスと比較して、上昇したことから、DEPにはマウスのIgE抗体産生におけるアジュバント作用があることを動物実験で初めて確認した。更に、Takafuji *et al.*⁸⁾は、O Aを抗原として、DEPとその他の燃焼生成物を含む大気環境中の浮遊微粒子(SPM)と混合してマウスに経鼻的に感作した場合でもIgE抗体産生の亢進することを報告している。しかし、DEP中には非常に多種類の化合物が含まれており⁹⁾、どのような化学物質がIgE抗体産生を亢進させるアジュバント作用を示すのか不明であった。

尚、前報^{10,11)}ではDEPを有機溶媒で分画し、どの分画成分にアジュバント作用があるかを検討した結果、O A抗原に対して中性画分に一過性であるがアジュバント作用があること、更に、中性画分に比較的多く含まれるピレンをO A抗原あるいはJCPAに混合し、腹腔内感作または経鼻的感作をしてIgE抗体価を測定した結果、O AあるいはJCPAの抗原単独で感作したマウスに比べて、抗原にピレンを混合したマウスではIgE抗体産生の亢進が認められ、ピレンは抗原感作によるIgE抗体産生を亢進させるアジュバント物質のひとつであることを報告した。しかし、ピレンはDEPと比較すると、IgE抗体産生においてアジュバント作用が弱かったことからDEP中の中性画分に含まれるピレン以外の化学物質にもアジュバント作用があることが推測された。

そこで、本研究では中性画分に含まれるピレン(4員環化合物)以外のアントラセン(3員環化合物)、フルオランテン(4員環化合物)、ベンゾ(a)ピレン(5員環化合物)についてもJCPA経鼻感作におけるIgE抗体産生について検討した結果、これらの物質にもアジュバント作用があることが判明したので報告する。

実験方法

1) 実験動物

実験動物としては、日本チャールスリバー社の6週令の雌のBDF1マウスを抗原感作の動物として用い、また、体重200~300gの雄のウイスター系ラットをIgE抗体価

測定に用いた。

2) スギ花粉抗原

スギ花粉は青梅保健所と五日市保健所の職員の方々の好意により採取されたものを使用した。JCPAの調製はTakahashi *et al.*¹²⁾の方法を用いた。すなわち、80mlの0.125M重炭酸ナトリウムに4gのJapanese cedar pollen (*Cryptomeria japonica*)を加えて室温で1時間攪拌後、10分間1,100×gで遠心し、その上清を粗JCPA抗原とした。また、粗JCPAに含まれるメジャー抗原であるCry j I濃度は国立相模原病院の安枝博士の御好意により測定して戴いた。粗JCPA中のCry j I濃度は0.05 µg Cry j I/10 µg JCPA proteinであった。尚、抗原の蛋白濃度はキット(micro bicinchonic acid protein assay reagent kit, Pierce Co. USA)を用いて測定した。

3) DEPとアジュバント作用物質

DEPはディーゼル排気ガスを実験動物に暴露している暴露チャンバー内から採取した。チャンバー内にハイボリュームエアサンプラー(柴田科学機械工業, HV-1000型)を設置し、排気ガスを約1000L/min流量で約3時間吸引して、DEPをサンプラーに装着したフィルター(Pallflex Products Co., 2500QAT-UP)上に採取した。尚、DEP中に含まれることが確認されている化学物質としてGLサイエンス社製のアントラセン、フルオランテン、ベンゾ(a)ピレンとAldrich Chemical社製(USA)のピレンを用いた。

4) 抗原の感作方法

マウスを1群5匹として、JCPA(10 µg or 30 µg)単独群、JCPA(10 µg or 30 µg)+40 µgアントラセン群、JCPA(10 µg or 30 µg)+400 µgピレン群、JCPA(10 µg or 30 µg)+400 µgフルオランテン群、JCPA(10 µg or 30 µg)+40 µgベンゾ(a)ピレン群、JCPA(10 µg or 30 µg)+100 µg DEP群に分けて、2週間隔で7回マウスの鼻の前庭部に滴下して感作した。更に、10 µgのJCPAを抗原量に使用した場合は最終感作後9週目に10 µgのJCPA単独で再度感作し、30 µgの抗原量を使用した場合は最終感作後11週目に30 µgのJCPA単独で再度感作した。

5) マウス血清のIgE抗体価の測定

マウスの眼窩静脈から経時的に採血し、遠心して抗血清を得た。IgE抗体価の測定は受身皮膚アナフィラキシー(passive cutaneous anaphylaxis, PCA)反応によって実施した¹³⁾。すなわち、IgE抗体が生体内に注入されると、この抗体は親和性細胞に結合するが、再び抗原が注入されると、抗原がIgE抗体と結合して肥満細胞から

ケミカルメディエーターが細胞外に放出される。その結果、血管透過性が亢進し抗原と共に加えたエバンスブルーが滲出して青色斑が作られ、この斑点の大きさが注入されたIgE量に比例することによりIgE抗体価を測定する方法である。

生理食塩水で連続2倍希釈したマウス血清の希釈系列を作製し、バリカンで体毛を刈ったウイスター系のラットの背中中の皮膚内に、100 μ lの希釈血清液を注射した。48時間後、0.5mlの生理食塩水に溶かした抗原と0.5mlの2%エバンスブルーの混合液を静脈内に投与した。PCA反応に使用した抗原の蛋白量は0.4mgのJCPAを用いた。約1時間後にラットを放血死させて背中中の皮を剥ぎ、エバンスブルーで染まったスポットの直径を計測し、5mm以上のスポットを陽性とした。血清中のIgE抗体価は、PCA反応で陽性と判定された血清の最大の希釈倍数で表示した。

6) マクロファージの化学発光の測定

マウスの腹腔から約10mlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.0)を用いて常在性の腹腔マクロファージを採取した。採取したマクロファージに5mlのPBSを加えて4 $^{\circ}$ C, 300 \times gで15分間遠心して2回洗浄し、得られたマクロファージをPBS 2mlに再浮遊させた。細胞数は血球計算盤でカウントした。4.7 \times 10⁶~3 \times 10⁸cells/ml PBSのマクロファージ浮遊液100 μ lに、330 μ g/ml PBS濃度のルミノール(和光純薬)を100 μ l, 更に、PBS 790 μ lを加えて4分間37 $^{\circ}$ Cで加温後、10 μ lのdimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬)に溶解した50 μ gアントラセン、200 μ gピレン、100 μ gフルオランテン、100 μ gベンゾ(a)ピレンをそれぞれ添加して、37 $^{\circ}$ Cで20分間、Biolumat LB 9500T (Berthold GmbH Co., Germany)を用いて化学発光を連続測定した。更に、300unitsのsuperoxide dismutase (SOD)をマクロファージ、ルミノール等の混合液に予め加えた後に、200 μ gのピレンを添加した場合の化学発光も測定した。

7) インターロイキン-1 α (IL-1 α)の測定

マウスの腹腔から加熱処理で非動化した5%牛胎児血清(FCS, GIBCO Laboratories, USA)を含む10mlのHank's balance salt solution (HBSS, GIBCO Laboratories)を用いて常在性の腹腔マクロファージを採取した。採取したマクロファージを5mlの5%FCSを加えたHBSSを加えて4 $^{\circ}$ C, 300 \times gで10分間遠心して3回洗浄し、得られたマクロファージを5%FCSを加えたRPMI 1640 (GIBCO Laboratories)に再浮遊させて、6.6 \times 10⁶cells/mlに調製した。更に、Lab-Tek tissue culture chamber/slide (4

chamber/slide, Miles Laboratories, USA)の各チャンバー内に0.5mlの浮遊液を添加して37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂インキュベーター中で1-2時間培養した。培養後、スライド面に吸着しなかった細胞を除去し、スライド面に吸着したマクロファージをフェノールレッドとFCSを含まないRPMI 1640で3回洗浄した。更に、フェノールレッドとFCSを含まないRPMI 1640を0.3ml添加後、アントラセン(5, 10, 20, 40, 60 μ g/5 μ l DMSO), ピレン(25, 50, 100, 200, 400 μ g/5 μ l DMSO), フルオランテン(5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 μ g/5 μ l DMSO), ベンゾ(a)ピレン(10, 20, 30, 40, 60 μ g/5 μ l DMSO), DEP(1, 2, 3, 5 μ g/5 μ l RPMI 1640)をそれぞれ添加して、37 $^{\circ}$ Cで24時間5%CO₂インキュベーター中で培養した。培養後、8,000 \times gで10分間遠心し、その上清はmouse IL-1 α ELISA kit (Genzyme Co., USA)を用いて反応させ、450nmの測定波長でマイクロプレートリーダー(MPR-4A型, 東ソーk.k.)で測定して、マクロファージから分泌されたIL-1 α 濃度を分析した。

実験結果

1) JCPAの経鼻的感作によるPCA値

JCPAを抗原としてアントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、DEPを混合して感作し、PCA反応によって感作により産生されたIgE抗体価を示すPCA値をFig. 1とFig. 2に示した。

Fig. 1は感作抗原量として10 μ g (0.05 μ g Cry j I相当量)のJCPAを用いた結果である。JCPA単独感作群は20週目までPCA値の上昇が認められなかったが、JCPA+アントラセン感作群とJCPA+ピレン感作群では感作開始後10週目からPCA値の上昇が認められ、JCPA+アントラセン群とJCPA+ピレン群では14週目にPCA値が1:39と1:31とそれぞれ最高値を示した。JCPA+フルオランテン感作群とJCPA+ベンゾ(a)ピレン感作群では12週目からPCA値の上昇が認められ、JCPA+フルオランテン群とJCPA+ベンゾ(a)ピレン群では14週目に1:23, 1:15というPCA値を示した。また、JCPA+DEP感作群では、14週目に1:60という高いPCA値が認められたが、それ以降は低下が認められた。更に、最終感作後9週目に10 μ gのJCPA単独で再度感作したところ、その1週間後の各群のPCA値はJCPA+アントラセン群(1:113), JCPA+ピレン群(1:67), JCPA+フルオランテン群(1:28), JCPA+ベンゾ(a)ピレン群(1:22), JCPA+DEP群(1:80)とそれぞれ高値を示した。また、JCPA単独群ではPCA値が1:10と初めて上昇が認められた。

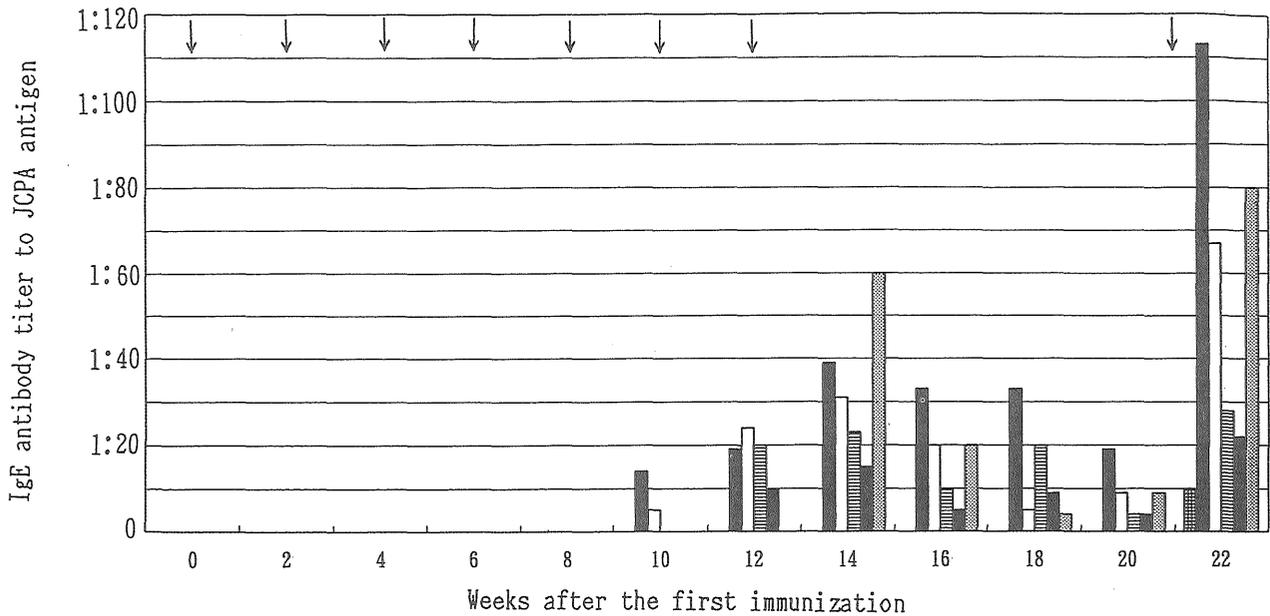


Fig. 1 Anti-JCPA IgE antibody Responses in Mice.

Mice were immunized with **10 µg JCPA** (0.05 µg Cry j I) and adjuvants seven times at 2-week intervals by the intranasal route (↓), and boosted with 10 µg JCPA alone at 9 weeks after the final immunization.

□ = JCPA alone ; ▨ = JCPA plus 40 µg Anthracene ; □ = JCPA plus 400 µg Pyrene ; ▤ = JCPA plus 400 µg Fluoranthene ; ■ = JCPA plus 40 µg Benzo(a)pyrene ; ▥ = JCPA plus 100 µg DEP.

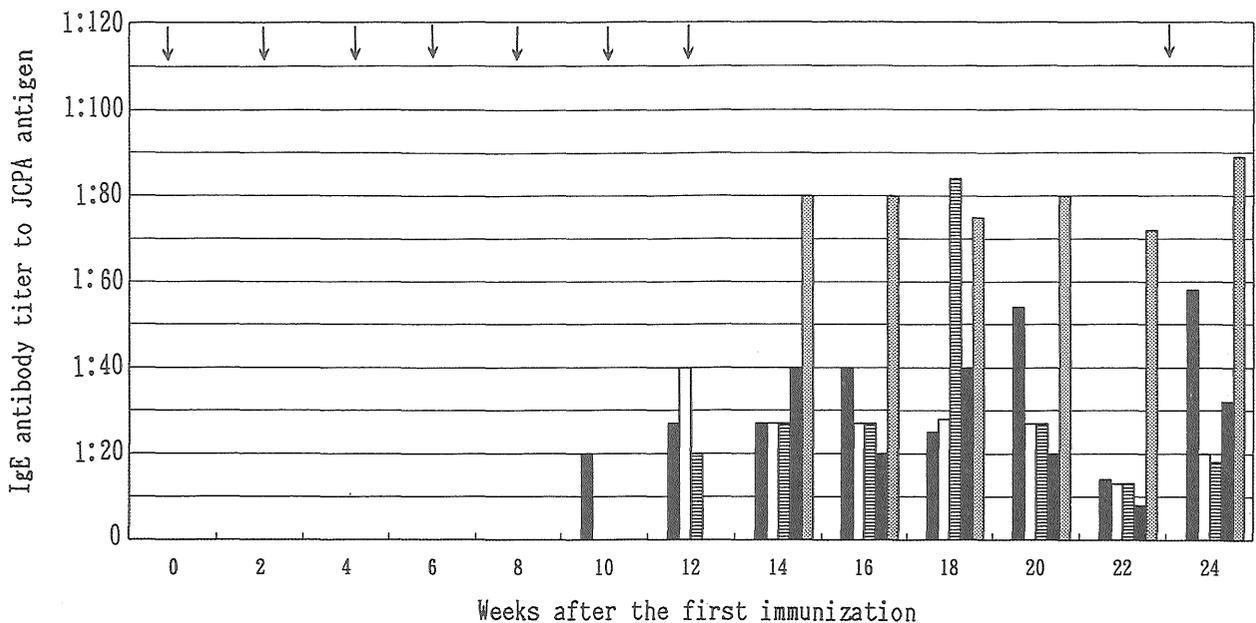


Fig. 2 Anti-JCPA IgE Antibody Responses in Mice.

Mice were immunized with **30 µg JCPA** (0.15 µg Cry j I) and adjuvants seven times at 2-week intervals by the intranasal route (↓), and boosted with 30 µg JCPA alone at 11 weeks after the final immunization.

□ = JCPA alone ; ▨ = JCPA plus 40 µg Anthracene ; □ = JCPA plus 400 µg Pyrene ; ▤ = JCPA plus 400 µg Fluoranthene ; ■ = JCPA plus 40 µg Benzo(a)pyrene ; ▥ = JCPA plus 100 µg DEP.

Fig. 2は感作抗原量として30 µg (0.15 µg Cry j I 相当量)のJCPAを用いた結果である。JCPA単独感作群は実験中を通じてPCA値の上昇が認められなかったが、

JCPA + アントラセン感作群では感作開始後10週目からPCA値の上昇が認められ、20週目にPCA値が1:54と最高値を示した。JCPA + ピレン感作群とJCPA + フル

オランテン感作群では12週目から PCA 値の上昇が認められ、JCPA +ピレン群では1:40と PCA 値の最高値を示し、一方、JCPA +フルオランテン群では18週目に1:84の最高値を示した。また、JCPA +ベンゾ(a)ピレン感作群と JCPA +D E P 感作群では、14週目から PCA 値の上昇が認められ、JCPA +ベンゾ(a)ピレン群では14週目と18週目に1:40という最高値が認められ、JCPA +D E P 群では14週目以降22週目まで1:80~1:72の範囲で高い PCA 値が維持された。更に、最終感作後11週間目に30 μ g のJCPA単独で再度感作したところ、その1週間後の各群のPCA値はJCPA +アントラセン群(1:58), JCPA +ピレン群(1:20), JCPA +フルオランテン群(1:18), JCPA +ベンゾ(a)ピレン群(1:32), JCPA +D E P 群(1:89)というPCA値を示したが、JCPA 単独群では PCA 値の上昇が認められなかった。抗原感作量を10 μ g JCPA (0.05 μ g Cry j I)から30 μ g JCPA (0.15 μ g Cry j I)と増やし、アジュバント物質の量を同一にして感作した PCA 値を比べると、感作抗原量の多いほうが比較的 PCA 値が高い結果が得られた。

2) マクロファージの化学発光

Fig. 3に示すように、マクロファージにアントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ(a)ピレンを添加すると、極めて短時間にマクロファージが刺激され、それぞれにおいてルミノールによる化学発光の上昇が認められた。しかし、S O Dを添加すると、ピレンの場合では、ルミノール依存性の化学発光は完全に抑制された。

3) マクロファージの IL-1 分泌

マクロファージと DMSO に溶解されたアントラセン、ピレン、フルオランテン及びベンゾ(a)ピレンとPBSに懸濁されたD E Pをそれぞれ濃度を変えて培養すると、それぞれの上清中の IL-1 α 濃度は上昇することが認められた(Fig. 4)。即ち、5 μ g ~60 μ g の範囲で添加されたアントラセンでは、20 μ g 以上では用量依存的に増加するが、一方、25 μ g ~400 μ g の範囲で添加されたピレン、5 μ g ~400 μ g の範囲で添加されたフルオランテン及び10 μ g ~60 μ g の範囲で添加されたベンゾ(a)ピレンではマクロファージの刺激による IL-1 α 分泌量にはこれらの添加量による至適濃度があることが分かった。その至適添加量はピレンでは200 μ g、フルオランテンでは20 μ g、ベンゾ(a)ピレンでは40 μ gであった。また、D E Pの場合、他の化学物質と比べると1 μ g ~5 μ g の範囲という非常に少量の添加量で他の4つの化学物質と同等のレベルの IL-1 α 分泌が認められた。

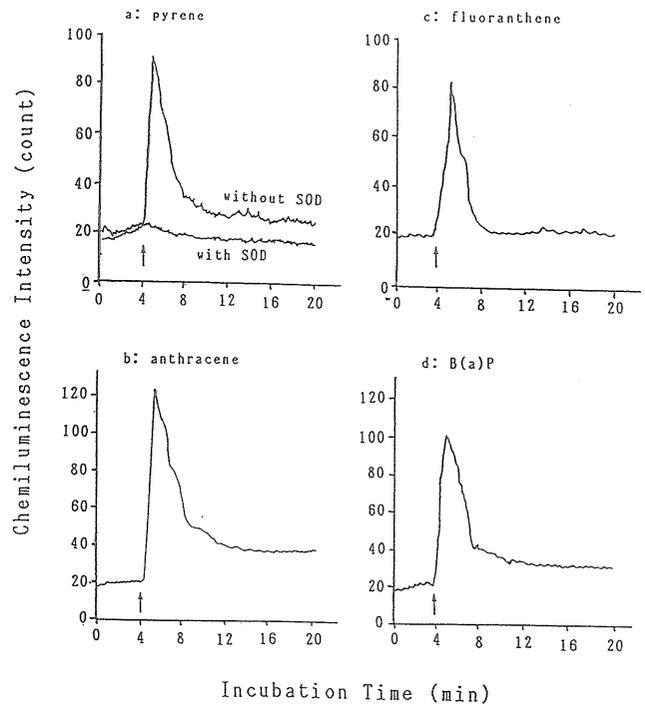


Fig. 3. Chemiluminescence Response Profiles of Mouse Intraperitoneal Macrophages Treated with Various Adjuvants.

Mixture of macrophages, luminol and each adjuvant was incubated at 37°C.

- a : Mixture of 3×10^8 cells/ml in PBS, 33 μ g luminol/ml PBS and 200 μ g of pyrene dissolved in DMSO (10 μ l) with or without SOD (300 units);
- b : Mixture of 4.7×10^6 cells/ml in PBS, 33 μ g luminol/ml PBS and 50 μ g of anthracene dissolved in DMSO (10 μ l);
- c : Mixture of 4.7×10^6 cells/ml in PBS, 33 μ g luminol/ml PBS and 100 μ g of fluoranthene dissolved in DMSO (10 μ l);
- d : Mixture of 4.7×10^6 cells/ml in PBS, 33 μ g luminol/ml PBS and 100 μ g of benzo (a) pyrene dissolved in DMSO (10 μ l).

Arrow indicates the additional point of adjuvant substances.

考 察

D E P から有機溶媒での抽出物中の中性画分に含まれているアントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ(a)ピレンと JCPA をそれぞれ混合して、経鼻的感作をした群のマウスでは、Fig. 1及び Fig. 2に示したように、JCPA 単独感作群と比較して、IgE 抗体産生亢進を示す PCA 値の上昇が明らかに認められたことから、これらの化学物質はマウスの IgE 抗体産生におけるアジュバント物質であることが確認された。

また、Okudaira と Ishizaka¹⁴⁾によれば、抗原を感作

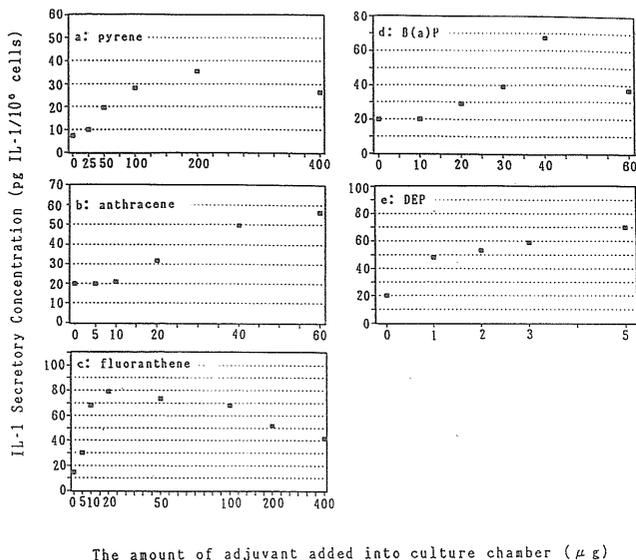


Fig. 4. Secretion of IL-1 from Mouse Intrapertitoneal Macrophages Treated with Various Adjuvants.

The mixture of 3×10^6 cells/ml in RPMI 1640 and various concentrations of adjuvant substances dissolved in DMSO were cultured in a 5% CO₂-incubator at 37°C. Twenty-four hours later, the culture supernatants were collected by centrifugation, and IL-1 in the supernatants was measured by using a mouse IL-1 α ELISA kit.

a : pyrene ; b : anthracene ; c : fluoranthene ;
d : benzo(a)pyrene ; e : DEP

されたマウスにおいて、抗原の刺激なしでも長期間生存する IgE 抗体産生細胞 (B 細胞) が存在しており、その間血清中の IgE 抗体レベルを維持することを報告しているので、Fig. 1 及び Fig. 2 に示したように、最終感作後でもある一定期間は JCPA に対する血清中の IgE 抗体価は維持されたものと考えられる。更に、JCPA + 各アジュバント物質の最終感作が終了した時点から 9~11 週間経過後に、再び JCPA を単独でマウスに経鼻的投与したところ、いずれの場合も著しく PCA 値が上昇するブースター現象が認められた。すなわち、抗原としての JCPA を識別できる記憶細胞 (T 細胞) が最終感作終了後にもある一定期間存在することが確認された。

Fig. 3 に示したように、ルミノール反応による化学発光測定により、これらの 4 つの化学物質は明らかにマクロファージを刺激することが確認された。また、マクロファージで産生される活性酸素種には、O₂⁻、 \cdot OH、¹O₂、H₂O₂ 等が知られているが、O₂⁻ のスクベンジャーである SOD の添加により、ピレンの場合では化学発光が消失した結果から考えると、ピレン添加でマクロファージ内で産生される活性酸素は O₂⁻ であることが

推測された。更に、Allen と Loose¹⁵⁾ はウサギの腹腔マクロファージと肺胞マクロファージが生体にとって異物の貪食作用で刺激された時、ルミノール依存性の化学発光が、SOD 添加で著明に減少することから、ルミノール酸化の減少をもたらすのは SOD による O₂⁻ 除去の結果であることを示唆している。

免疫学的知見によると、典型的な抗原提示細胞であるマクロファージが異物の貪食などで刺激されると、サイトカインの 1 種である IL-1 を産生分泌し¹⁶⁾、その IL-1 はリンパ球のヘルパー T 細胞に作用して IL-2 と IL-4 の産生を亢進する^{17,18)}。この IL-2 はヘルパー T 細胞を増殖させ、IL-4 はリンパ球の B 細胞に作用して IgE 抗体を産生する形質細胞に変化することが知られている¹⁹⁻²³⁾。本研究でも、Fig. 4 に示したように、4 つのアジュバント物質と DEP をマクロファージに添加して培養した時、その至適濃度は添加する物質により異なるが、明らかにマクロファージによる IL-1 分泌の亢進が認められた。更に、DEP は他の 4 つの化学物質と比べると、非常に少量の添加量で他の化学物質と同等のレベルの IL-1 α 分泌が認められたことから、今回検討した化学物質以外にも IL-1 分泌を亢進させる化学物質が DEP 中に存在することが推測された。

また、Fujimaki *et al.*²⁴⁾ は抗原 (OA または スギ花粉) と DEP の混合液を気管内投与したマウスの気管支周囲の縦隔リンパ節中の T 細胞における IL-2 と IL-4 産生量が、抗原を単独に投与した群と比較すると有意に増加することを報告している。本研究では IL-2 と IL-4 を測定していないが、これらの事実から考えると、JCPA と DEP に含まれるアントラセン、ピレン、フルオランテン、ベンゾ(a)ピレン、DEP の混合液でそれぞれ感作されたマウスでは、これらがマクロファージによって貪食された結果、マクロファージを刺激し IL-1 が産生され、それがヘルパー T 細胞での IL-2 と IL-4 の産生を誘導し、更に、B 細胞を形質細胞へと分化させ、IgE 抗体の産生亢進が生じたものと推測される。

すなわち、動物実験の段階においても DEP 及び DEP に含まれている化学物質によって、ヘルパー T 細胞の増殖や B 細胞の増殖と分化を促進させるサイトカインの分泌増加による IgE 抗体産生亢進のメカニズムが明らかになってきた。

謝辞. 日本医科大学医学部教授の 大國壽士博士による懇切なるご指導に対して、また、国立相模原病院・臨床研究部の 安枝浩博士による JCPA 中の Cry j I 濃度の測定の御協力に対して、更に、スギ花粉を患与して戴いた

青梅保健所と五日市保健所の職員の皆様に対して深く感謝いたします。

(本研究の概要は第35回大気汚染学会盛岡大会1994年11月で発表した。)

文 献

- 1) 堀口申作, 斉藤洋三: アレルギー, **13**, 16-18, 1964.
- 2) 兼子順男, 島田和哉, 堀内博人 他: 耳鼻咽喉科展望, **23**, 270-281, 1980.
- 3) 斉藤洋三, 大原 栄, 佐橋紀男 他: 花粉症対策に係る基礎的研究総合解析報告書, 東京都衛生局編, p 4-41, 1990.
- 4) Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikemori, R. *et al.*: *Ann. Allergy*, **58**, 265-270, 1987.
- 5) 小泉一弘: 栃木県日光地区のスギ花粉アレルギー患者における罹患年数の調査成績, 村中正治, 谷口克編, IgE抗体産生と環境因子—スギ花粉アレルギー急増の原因解明への学際的アプローチ, p.81-91, 1990, メディカルトリビューン社, 東京.
- 6) 芳住邦雄, 渡辺武春, 石井康一郎 他: 東京都環境科学研究所年報1989, p.3-10.
- 7) Muranaka, M., Suzuki, S., Koizumi, K. *et al.*: *J. Allergy Clin. Immunol.*, **77**, 616-623, 1986.
- 8) Takafuji, S., Suzuki, S., Koizumi, K. *et al.*: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **90**, 1-7, 1989.
- 9) Tong, H. Y. and Karasek, F. W.: *Anal. Chem.*, **56**, 2129-2134, 1984.
- 10) Suzuki, T., Kanoh, T., Kanbayashi, M. *et al.*: *Jpn. J. Allergol.*, **42**, 963-968, 1993.
- 11) 鈴木孝人, 上林真子, 池田真悟 他: 東京衛研年報, **44**, 202-209, 1993.
- 12) Takahashi, Y., Mizoguchi, J., Katagiri, S. *et al.*: *Jpn. J. Allergol.*, **38**, 1354-1358, 1989.
- 13) Ovary, Z., Caiazza, S. S. and Kojima, S.: *Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **48**, 16-21, 1975.
- 14) Okudaira, H. and Ishizaka, K.: *Cell. Immunol.*, **58**, 188-201, 1981.
- 15) Allen, R. C. and Loose, L. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 245-252, 1976.
- 16) Hogquist, K. H., Unanue, E. R. and Chaplin, D. D.: *J. Immunol.*, **147**, 2181-2186, 1991.
- 17) Lichtman, A. H., Chin, J., Schmidt, J. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9699-9703, 1988.
- 18) Araneo, B. A., Dowell, T., Moon, H. B. *et al.*: *J. Immunol.*, **143**, 1737-1744, 1989.
- 19) Snapper, C. M., Finkelman, F. D. and Paul, W. E.: *J. Exp. Med.*, **167**, 183-196, 1988.
- 20) Pene, J., Rousset, F., Brancine, F. *et al.*: *J. Immunol.*, **141**, 1218-1224, 1988.
- 21) Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P. *et al.*: *J. Immunol.*, **140**, 4193-4198, 1988.
- 22) Maggi, E., Del Prete, G., Macchia, A. T. D. *et al.*: *Clin. Exp. Immunol.*, **73**, 57-62, 1988.
- 23) Coffman, R. L., Seymour, W. P., Lebman, D. A. *et al.*: *Immunol. Rev.*, **102**, 5-28, 1988.
- 24) Fujimaki, H., Nohara, O., Ichinose, T., *et al.*: *Toxicology*, **92**, 261-268, 1994.

幹線道路周辺住民の尿中チオバルビツール酸反応性物質(TBAR)調査

瀬戸 博*, 大久保 智子**, 斎藤 育江*,
大西 和夫*, 鈴木 重任*

Survey of Urinary Thiobarbituric Acid Reactants Value of the Residents Living Near Arterial Road

HIROSHI SETO*, TOMOKO OHKUBO**, IKUE SAITO*,
KAZUO OHNISHI* and SHIGETOH SUZUKI*

Keywords: 道路沿道 road side, 大気汚染 air pollution, 健康影響 health effect, 過酸化脂質 lipid peroxide, 酸化
的ストレス oxidative stress, チオバルビツール酸反応性物質 TBAR, マロンアルデヒド malonaldehyde, 尿 urine

緒 言

道路沿道付近では自動車排ガス由来の窒素酸化物や粉塵等の汚染物質の濃度レベルが高いことが種々の調査で明らかになっている¹⁻³⁾. 自動車排ガスに由来するオキシダントや窒素酸化物は酸化力が強いいため呼吸器に対する影響として酸化的傷害作用が重視されている⁴⁻⁷⁾. また, ディーゼル排ガス粒子にも脂肪酸の酸化を促進したり⁸⁾ 活性酸素の産生を触媒する作用がある⁹⁾.

オゾンや二酸化窒素(NO₂)を吸入したラットの肺のチオバルビツール酸反応性物質(TBAR, 有害な脂質過酸化のマーカー)は有意に増加するが, これは酸化性のガスによって生体内の脂質の過酸化が昂進するためと考えられている⁵⁾. 尿中TBARは主として過酸化脂質の2次分解物であるマロンアルデヒド様物質がアミノ酸等と結合して排泄されたもので, その量は生体内の脂質過酸化の程度と密接な関係がある¹⁰⁾.

我々はディーゼル排ガスによる生体内の脂質過酸化作用を検討するため, ラットにディーゼル排ガスを暴露し尿中のTBARの量を測定した¹¹⁾. その結果, 明確な量-反応関係を伴う尿中TBAR値の増加を認めた. 本影響の発現には暴露初期においてはガス成分の寄与が, また慢性期においては粒子成分の寄与が大きいことが判明した¹²⁾. 同時に測定したグルタチオンペルオキシダーゼ系の抗酸化酵素群の活性にもディーゼル排ガス暴露に起因すると考えられる変動が観察された. これらの

実験結果から尿中TBAR値は大気汚染物質による生体影響の指標, 特に脂質の過酸化を反映する指標の一つになりうると考えられた.

東京都では大気汚染による健康への影響を明らかにするためアンケート調査, 肺機能調査, 生化学的指標物質(ヒドロキシプロリン)の測定等の疫学調査を実施してきた. この種の調査では大気汚染の影響を忠実に反映する選択性と感度の高い生化学的指標が要求される¹³⁾. そこで, これまでに得られた知見に基づいて尿中TBAR値が大気汚染の健康影響指標として有用か否かを検証するため自動車排ガスによる汚染の著しい都内幹線道路周辺住民を対象に予備調査を行ったのでその結果について報告する.

材料及び方法

試薬

マロンアルデヒド水溶液: Marnettらの方法¹⁴⁾により調製した. 固相抽出カートリッジ: ボンドエリートC₁₈(500mg, バリアン社製). TBA 試薬: 2-チオバルビツール酸(TBA)はシグマ社製を使用した. 使用直前に0.3% TBA 水溶液100mlに対し, 5 NHClを0.5ml加えた.

装置

高速液体クロマトグラフ: 日本分光工業製880 P U型ポンプ, 同870 U V検出器, ヌクレオシル100-5 C 18 カラム(4.6mm i.d.*250mm).

オートアナライザー: 日立7150型.

*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

**東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

調査対象

都内のある幹線道路の端から20mまでの地区(沿道地区)、それに続く20m~150mまでの地区(後背地区)及び自動車排ガス汚染レベルが低いと考えられる地区(対照地区)の3地区に3年以上居住する喫煙習慣のない主婦とした。住民基本台帳に基づき無作為に対象者を抽出し、アンケート調査(郵送、面談回収方式)により調査協力に応じた者(1地区50人)を調査対象者とした。調査は、1回目を1988年5月、2回目を1989年5月に行った。検体は前夜10時以降絶食後の早朝第一尿とし、分析時まで-20℃で凍結保存した。無作為に選んだ5人分の尿を等量づつ合わせて1試料とし、1地区につき10試料を調製した。

表1に各地区の被験者の年齢の平均値及び標準偏差を示した。沿道・後背地区の被験者の平均年齢は対照地区のそれに比べて有意に高かった。しかし、沿道と後背地区の被験者の年齢間には差がなかった。また、各地区とも1回目と2回目の間に有意差はなかった。

表1. 地区別被験者の年齢

(n = 50)

地区	1回目	2回目
沿道	46.9±8.0**	50.3±6.6**
後背	47.8±7.3**	50.8±6.8**
対照	43.2±8.2	45.9±8.9

対照地区との有意差 ** : P<0.01.

分析方法

尿中T B A Rの分析は既報¹¹⁾に準じて行った。すなわち、あらかじめ沈殿物を遠心分離して除いた尿の上清0.2mlに塩酸加0.3% T B A 試薬を2ml加えて密栓し、95℃の湯浴中で30分間反応させた。反応液を水冷して室温に戻した後、ボンドエルトC₁₈に負荷した。3mlの水で洗浄した後、更に3mlの30%アセトニトリル/水を流してT B A R画分を溶出した。マロンアルデヒド水溶液(約10⁻⁵M)についても同様の操作を行った。この溶液の一部をH P L Cに注入し、別に力価を求めておいたマロンアルデヒド・T B A 付加物との比較によりT B A Rを測定した。尿中T B A R値は尿1mlに含まれるマロンアルデヒドの重量(μg)で表示した。

クレアチニン(C R E)は、オートセラ試薬を用いてオートアナライザーで分析した。尿中T B A R値をC R E値(mg/ml)で除した値をT B A R/C R E比とした。

調査地区の汚染程度を把握するため窒素酸化物(NO₂)

について調査対象者の室内、室外濃度及び個人暴露濃度の測定をフィルターバッジ・ザルツマン法により行った。

調査期間は2日間で各地区のデータ数は沿道・後背地区n=16~28, 対照地区n=12であった。なお、個人暴露濃度の被験者は尿中T B A Rの被験者と必ずしも一致しない。

統計的検定は調査年度と調査地区との二元配置の分散分析法(F検定)及びStudentのt検定法(両側)により行った。

結 果

窒素酸化物(NO₂)の室内、室外濃度及び個人暴露濃度

表2から表4にNO₂の室内、室外濃度及び個人暴露濃度を示した。NO₂室外濃度は沿道>後背>対照の順で低くなる傾向が認められた。個人暴露濃度は2回の調査とも対照地区のみが他地区に比べて低かった。すなわち、沿道・後背地区の被験者ともに約35ppbで有意差はな

表2. 室内の二酸化窒素濃度

(単位: ppb)

地区	1回目	2回目
沿道	37±8(n=28)**	34±9(n=23)**
後背	36±9(n=16)**	28±8(n=22)**#
対照	16±4(n=12)	16±3(n=12)

数値は平均値±標準偏差(データ数)
対照地区との有意差 ** : P<0.01.
沿道地区との有意差 # : P<0.05.

表3. 室外の二酸化窒素濃度

(単位: ppb)

地区	1回目	2回目
沿道	57±12(n=28)**	47±10(n=23)**
後背	45±11(n=16)**##	40±9(n=22)**#
対照	17±2(n=12)	21±2(n=12)

数値は平均値±標準偏差(データ数)
対照地区との有意差 ** : P<0.01.
沿道地区との有意差 # : P<0.05. ## P<0.01

表4. 二酸化窒素の個人暴露濃度

(単位: ppb)

地区	1回目	2回目
沿道	35±8(n=28)**	35±7(n=23)**
後背	36±7(n=16)**	31±9(n=21)**
対照	18±4(n=12)	17±4(n=12)

数値は平均値±標準偏差(データ数)
対照地区との有意差 ** : P<0.01.

かったが、対照地区では17-18ppbで沿道・後背地区の被験者の約半分の濃度レベルであった。

調査対象地区の被験者の尿中TBAR/CRE比

表5及び図1に各地区別の被験者の尿中TBAR/CRE比を示した。分散分析表を表6に示した。これらの結果より1回目、2回目の調査とも地区間に有意な差が認められた。沿道地区の被験者の尿中TBAR/CRE比は後背及び対照地区のそれに比べて有意に高かった。しかし、測定年度間には有意な差がなくまた交互作用も認められなかった。

尿中TBAR/CRE比とNO₂濃度の相関

調査対象地区ごとに2回の調査結果を合わせて尿中TBAR/CRE比とNO₂濃度を対応させプロットしたのが図2-4である。図2は室内NO₂濃度、図3は室外NO₂濃度、

NO₂濃度、図4はNO₂個人暴露濃度との相関を示し、各組の相関係数は順に0.686、0.815、0.621で比較的高い

表5. 地区別被験者の尿中TBAR/CRE比(×10³) (n = 10)

地区	1回目	2回目
沿道	0.309±0.157	0.278±0.055
後背	0.219±0.046*	0.231±0.047*
対照	0.188±0.068**	0.228±0.025*

数値は平均値±標準偏差。
沿道地区との有意差 * : P<0.05, ** : P<0.01.

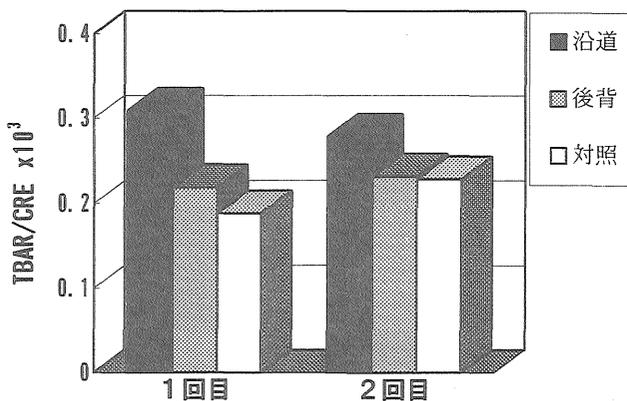


図1. 各地区の被験者の尿中TBAR/CRE比

表6. 分散分析表(尿中TBAR調査)

変動因	自由度	偏差平方和	不偏分散	分散比
全体	59	0.4075		
因子(地区)	2	0.0824	0.0412	7.141**
因子(年度)	1	0.0007	0.0007	0.126
交互作用	2	0.0129	0.0064	1.1143
誤差	54	0.3115	0.0058	

** : P<0.01で有意.

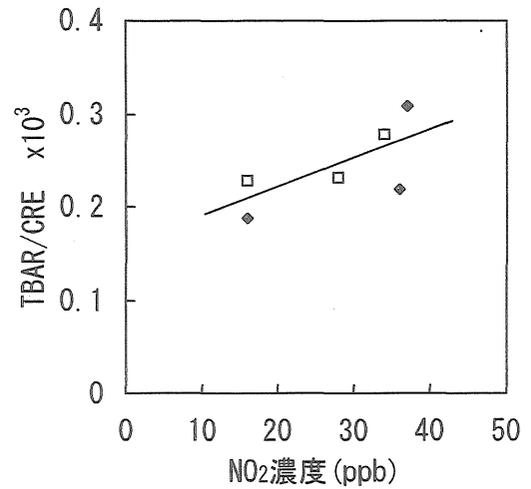


図2. 尿中TBAR/CREとNO₂室内濃度の関係
◆ 1回目 □ 2回目

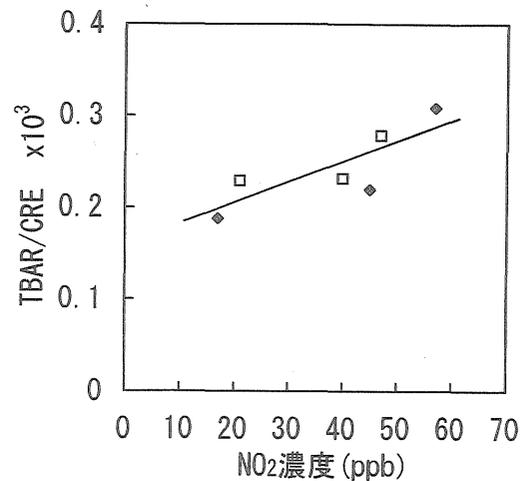


図3. 尿中TBAR/CREとNO₂室外濃度の関係
◆ 1回目 □ 2回目

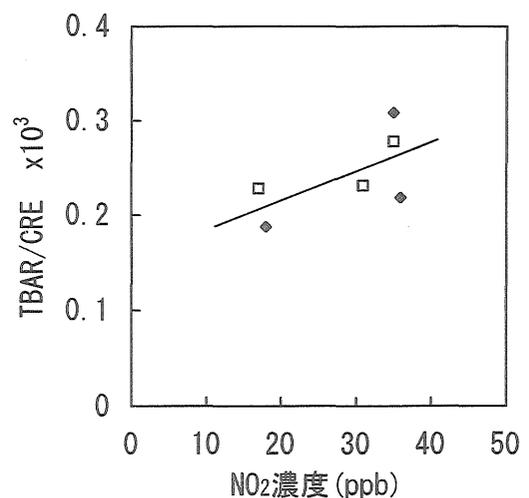


図4. 尿中TBAR/CREとNO₂個人暴露濃度の関係
◆ 1回目 □ 2回目

相関を示したが特に室外NO₂濃度との間に高い相関が見られた。なお、NO₂濃度をx, TBAR/CRE比をyとする回帰式は下記のとおりであった。

$$y = 0.00310x + 0.156 \quad (x = \text{室内NO}_2\text{濃度})$$

$$y = 0.00223x + 0.156 \quad (x = \text{室外NO}_2\text{濃度})$$

$$y = 0.00308x + 0.154 \quad (x = \text{NO}_2\text{個人暴露濃度})$$

考 察

異なった年齢層の集団について、ある指標を比較する場合にその指標が年齢とどのような関係があるかをあらかじめ知っておく必要がある。尿中TBAR/CRE比の年齢依存性については既に報告しているように30歳から60歳程度の範囲であれば集団の年齢構成の影響を受けない¹⁵⁾。したがって今回の調査では対象地区の年齢がやや低かったが尿中TBAR/CRE比に影響しないものと考えられる。

調査対象地区の汚染程度をNO₂を指標にして比較すると室外濃度測定で特に顕著な減衰傾向(沿道>後背>対照の順で低くなる)が認められた。別の調査¹⁶⁾でも一酸化窒素(NO)、粉塵及び多環芳香族炭化水素濃度で明らかな減衰傾向を示しており道路沿道付近は自動車排ガスの汚染をより直接的に強く受けていることが裏付けられた。一方、室内NO₂の汚染程度を見てみると対照地区で低い他は沿道と後背地区に差がなく、室外ほどには自動車排ガスの影響は見られなかった。全体に室外濃度よりも低いのは窓、壁などの構造物による遮蔽効果があるためとみられる。室内のNO₂発生源としてはガスレンジ、ストーブ、タバコなどがあるが調査時期は5月であったので暖房器具の影響はほとんどないものと考えられた。個人暴露濃度は室内濃度と同程度で地区間の傾向も同様であった。これは一日の大半を室内で過ごすため室内の汚染状況がそのまま反映されたものとみられる。

尿中TBAR/CRE比は沿道地区の被験者で最も高かった。この傾向は1, 2回目の調査とも同様であった。2回の調査結果を合わせて、NO₂との関係をみると室外NO₂濃度との相関が最も高く($r = 0.815$)次いで室内濃度($r = 0.686$)、個人暴露濃度($r = 0.621$)の順であった。沿道地区の被験者の尿中TBAR/CRE比の増加はNO₂で代表される自動車排ガス濃度の増加と関連があることを示唆している。しかし、幹線道路の沿道周辺を特徴づけるのはNO₂に代表される排ガスばかりではないことに留意する必要がある。騒音、振動、粉塵などのレベルもまた後背・対照地区に比較して高くそれらのストレスによる影響も無視できないであろう。実際、騒音ストレス¹⁷⁾や重金属類¹⁸⁾の負荷によって生体内の過酸化脂

質のレベルが上昇したという報告がある。

生体内の過酸化脂質の生成はビタミンEやアスコルビン酸等の抗酸化物質や抗酸化系酵素群によって抑制・制御されている。したがって生体の抗酸化能力を上回るような酸化性物質の投与は過酸化脂質の生成あるいはTBAR値を増加する方向に傾かせることになる。高感受性グループとしては抗酸化機能の低下する高齢者が想定される。生体内過酸化脂質の増加は酸化的ストレスを反映するものでガンや老化、各種の成人病との関連が示唆されており、これらの疾患の予防の上で環境因子との因果関係の解明は重要な課題である。

今回の調査では季節変動をみていない。一般の住宅では季節によって室内換気量が異なる¹⁶⁾。また冬季には開放型暖房器具の使用によってNO₂の室内及び個人暴露濃度に地区間の差がなくなる傾向がある¹³⁾。そのためNO₂などの酸化性ガスの影響を反映するとみられる尿中TBAR/CRE比を大気汚染の疫学調査に指標として使用するには調査時期を適切に選ぶ必要がある。尿中TBAR/CRE比は喫煙、食事、疾病などの交絡因子に対する配慮を適切に行えば大気汚染の影響を反映する生化学的指標として有望と考えられる。

なお、今回の調査は極めて少数例の標本を用いた予備的なものであり、したがって道路沿道の住民への健康影響を結論づけるものではない。

本研究は、大気汚染保健対策事業の一環として、衛生局医療福祉部公害保健課と協力して実施しているものである。

(この報告の概要は第35回大気汚染学会(1994年11月)で発表した。)

文 献

- 1) 中村 貢, 平野耕一郎, 沖津正樹, 他: 横浜市公害研究所報, 3, 5, 1978.
- 2) 北村洋子, 四十物良一, 松浦 勉: 宮城県保健環境センター, 2, 159, 1984.
- 3) 多田宇宏, 斎藤育江, 狩野文雄, 他: 東京衛研年報, 42, 214, 1991.
- 4) Tothmas, H.V., Mueller, P.K. and Lyman, R.L.: *Science*, 159, 532, 1968.
- 5) Sagai, M. and Ichinose, T.: *Environ. Health Perspect.*, 73, 179, 1987.
- 6) Goldstein, B.D., Lodi, C., Collinson, C., et al.: *Arch. Environ. Health*, 18, 631, 1969.
- 7) Menzel, D.B.: The role of free radicals in the toxicity of air pollutants (nitrogen oxide and ozone). In

- Pryor, W.A. (ed.), *Free Radicals in Biology*, Vol. II, 181-202, 1976, Academic Press, New York.
- 8) 瀬戸 博, 未発表データ.
- 9) Seto, H., Ohkubo, T., Saitoh, M. *et al.* : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 789, 1994.
- 10) Draper, H.H., Polensek, L., Hadley, M. *et al.* : *Lipids*, **19**, 836, 1984.
- 11) Seto, H., Suzuki, T., Ohkubo, T. *et al.* : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 582, 1990.
- 12) 瀬戸 博, 大久保智子, 鈴木孝人, 他, 第31回大気汚染学会講演要旨集, 1990.
- 13) 瀬戸 博, 鈴木孝人, 資源環境対策, **29**, 1133, 1993.
- 14) Marnett, L.J. and Tuttle, M.A. : *Cancer Res.*, **40**, 276, 1980.
- 15) 大久保智子, 瀬戸 博, 鈴木孝人, 他, 第33回大気汚染学会講演要旨集, 1992.
- 16) 大気汚染保健対策に係る健康影響調査, 道路沿道の健康影響調査総合解析報告書, 東京都衛生局, 1991.
- 17) 佐々間信行, 本間 寛, 小岩裕幸, 他, *日衛誌*, **37**, 424, 1982.
- 18) 与那覇政憲: 重金属, 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編, 過酸化脂質と生体, 317-332, 1985, 学会出版センター.
- 19) 松村年郎, 関田寛, 安藤正典, 他: 第35回大気汚染学会講演要旨集, 1994.

長期型 PTIO 法とザルツマン法による NO, NO₂濃度の比較結果について

小野塚 春吉*, 福田 雅夫**, 牧野 国義**,
長嶋 親治**, 大西 和夫**

Comparison of the Concentrations of NO and NO₂ by PTIO Method for Long-Term Measurement with the Concentrations by Saltzman Method

HARUKICHI ONOZUKA *, MASAO FUKUDA **, KUNIYOSHI MAKINO **,
CHIKAHARU NAGASHIMA ** and KAZUO OHNISHI **

Keywords : 拡散型サンプラー passive sampling device, PTIO法 PTIO method, 簡易測定器 simple sampler, 窒素酸化物 nitrogen oxides, NO₂ nitrogen dioxide, NO nitrogen monoxide, 大気汚染 air pollution, 窒素酸化物測定法 measurement method for nitrogen oxides

緒 言

環境大気中の窒素酸化物の測定には、ザルツマン試薬を用いる吸光光度法(以下ザルツマン法という)が広く用いられており、二酸化窒素の環境基準の測定法としても採用されている。また、最近においては、小型で取り扱いも簡便な各種の簡易測定法が開発され¹⁾⁻¹⁰⁾、その多くは電源が不要で携帯も可能なことから、大気中の窒素酸化物の測定はもとより窒素酸化物の個人暴露量の測定等にも広く使用されつつある。

平野ら⁶⁾⁹⁾¹⁰⁾によって開発された拡散型NO, NO₂サンプラー(以下PTIO法という)も簡易測定法の一つで、一酸化窒素(NO)と二酸化窒素(NO₂)を同時に測定することが可能で、捕集器は小さく、しかも屋外で測定する際に受ける風の影響を小さくする工夫などが施されている。本法は、NO₂と窒素酸化物(NO_x=NO₂+NO)をそれぞれ測定し、両測定値の差からNO値を求めるものである。このPTIO法には短期測定用(1日から3日間程度)と長期測定用(1ヵ月間程度)が開発されている。

我々は、長期型PTIO法による測定データの有効性を確認することを目的として、大気汚染常時測定局によるデータ(ザルツマン法)と、長期型PTIO法との比較試験を行ったので、その結果について報告する。

また、PTIO法における温度湿度の補正式の改良法が報告されている¹¹⁾ので、従来法との比較も行ったので、

その結果についてあわせて報告する。

実験方法

大気汚染常時測定局3ヵ所(国設東京、大田区大森南、青梅市東青梅)に長期型PTIO法の捕集容器を取り付けて、1991年3月から1995年2月までの48ヵ月間、捕集容器を1ヵ月毎に交換してザルツマン法との比較測定を行った。ただし、国設東京測定局については、測定局が1993年3月に当衛生研究所構内から新宿御苑に移設されたため、1993年2月までとした。

(1) PTIO 法による測定

PTIO法の試料の採取及び分析方法は、平野ら¹⁰⁾の方法によって行った。

①試料の採取

試料の採取に用いた捕集容器の構造を図1に示した¹⁰⁾。内径26.5mm、外径30mm、高さ50mmのガラス容器に捕集エレメントを入れ、これを遮光用の黒色プラスチック容器に入れたものを用いた。捕集容器の上部は空気の交換ができるように開放されており、開放部には風の影響を防ぐためのステンレス鋼製金網を三層(100×100, 50×250, 12×64メッシュ)に接着し重ね合わせたものを取り付けた。

捕集容器に雨の進入を防ぐため、ステンレス鋼製のシュルター(直径12cm、高さ11cm、下部開放)の中に捕集容器を設置して試料を採取した。

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

** 同環境保健部環境衛生研究科

*, ** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

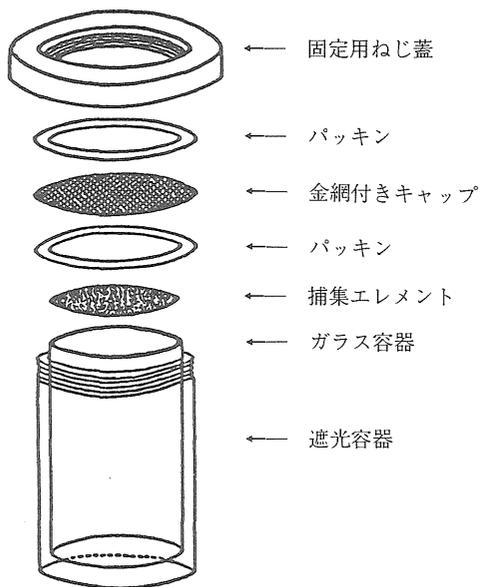


図1. 拡散型長期暴露サンプラーの構造図¹⁰⁾

また、NOの測定値を補正するためブランク用として、捕集容器の開放部をシリコンゴムで密閉したものを同一条件で設置した。

②捕集及び分析用試薬の調製

NO₂吸収液及び捕集エレメント：トリエタノールアミン10mlをアセトン100mlに溶解してNO₂吸収液を調製し、これを直径26mmに打ち抜いたセルロース繊維ろ紙(No.514A)にマイクロピペットを用いて200 μ l滴下した。アセトンが揮散した後捕集容器に捕集エレメントを入れ密閉保存した。

NO_x捕集液及び捕集エレメント：2-フェニル-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-3-オキサイド-1-オキシル(PTIO, 東京化成工業製)0.8gを10mlのNO₂吸収液に溶解してNO_x捕集液を調製し、これを上記と同様にセルロース繊維ろ紙に200 μ l添加し密閉保存した。

NO₂標準液：亜硝酸ナトリウム1.500gを精秤し、精製水に溶かして全容を1,000mlとし標準原液とした。これを冷暗所に保存し分析時に適宜希釈して用いた。

ザルツマン試薬(発色試薬)：スルファニルアミドを40gとり、リン酸100mlを加え、精製水に溶解し全容を500mlとした(スルファニル溶液)。別に、N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩0.28gを精製水に溶解し全容を50mlとした(NEDA溶液)。分析時にスルファニル溶液とNEDA溶液を混合(10:1)して用いた。

③分析方法

試料採取した捕集エレメントを40mlの精製水で抽出した後、希釈し、これにザルツマン試薬を加えて発色させ、波長545nmで吸光度を測定した。

なお、NOはNO_xとNO₂の測定値の差から求めた。

(2) 測定データの補正及び処理

①PTIO法による測定値の補正

NOのブランク補正には、暴露用サンプラーと同一条件にて野外に放置したものを用いた¹²⁾。

温度湿度の補正は、平野ら¹¹⁾によって報告されている従来法及び改良法を用いて補正した。計算に用いた温度、湿度のデータは、大気汚染常時測定局¹³⁾のそれぞれの月平均値(1日～末日)を使用した。

従来法

$$\alpha_{\text{NO}} = 100 \div (-0.780 \times \text{RH} \div 100 + 2.20) \div 60.5$$

$$\alpha_{\text{NO}_2} = 100 \div (0.677 \times \text{RH} \div 100 + 2.009 \times 10^{-2} \times T + 0.898) \div 56.4$$

ここで、RH：相対湿度(%)

T：温度(°C)

改良法

従来法のRHにP(蒸気圧補正係数)を乗ずる。

$$\alpha_{\text{NO}} = 100 \div (-0.780 \times \text{RH} \times \text{P} \div 100 + 2.20) \div 60.5$$

$$\alpha_{\text{NO}_2} = 100 \div (0.677 \times \text{RH} \times \text{P} \div 100 + 2.009 \times 10^{-2} \times T + 0.898) \div 56.4$$

Pは次の式により求める。

$$\text{P} = (\text{P}_\text{N} / \text{P}_\text{T})^{\frac{1}{2}}$$

P_N：20°Cにおける水蒸気圧(mmHg)

P_T：測定月の月平均気温における水蒸気圧

②ザルツマン法の測定値

大気汚染常時測定局に設置されているザルツマン法による窒素酸化物自動計測器の測定データ¹³⁾を使用した。

この方法は、吸収液(ザルツマン試薬)を用いる吸光度法によって、試料大気中に含まれるNOとNO₂を同時に連続測定する方法である。

NOは酸化液(硫酸酸性過マンガン酸カリウム溶液)でNO₂に変えてから、NO₂と同様に吸収液に通気して吸光度を測定する。酸化液によるNOからNO₂への酸化率は70%が用いられている。また、NO₂が吸収液に吸収され、反応して生成する亜硝酸イオン(NO₂⁻)の生成比率(ザルツマン係数 NO₂⁻/NO₂)は、0.84が用いられている。

なお、自動計測器のガス吸収液部分には、一定温度に保たれるよう温度調整機構が備わっており、計測器の保守点検は定期的に行われている。

測定値の比較にあたっては、PTIO法の暴露期間(通常当該月の上旬から翌月上旬)と同一期間の平均値(算術平均)を求めて使用した。

結果及び考察

結果：大気汚染常時測定局(国設東京、大田、青梅)に

おける長期型PTIO法によるNO及びNO₂の測定結果とザルツマン法によるNO及びNO₂の測定結果を図2から図7に示した。

また、回帰分析の結果を表1に、散布図を図8から図11に示した。

(1) PTIO法(従来法)とザルツマン法の比較

① NO

全般的にザルツマン法の方が高い傾向を示した。特にNO濃度が高くなる11月、12月頃にこの傾向が顕著であ

る。

個々のPTIO法の測定値とザルツマン法の測定値の比(PTIO法/ザルツマン法)を取り、この値を平均したものは、国設東京で0.786、大田で0.825、青梅で0.779となり、17~22%ザルツマン法の方が高い値を示した。

回帰分析の結果(表1)は、相関係数は国設東京で0.983、大田で0.969、青梅で0.861、全体で0.978と高い相関が認められた。

青梅は都心部から約50km離れたところに位置し、都

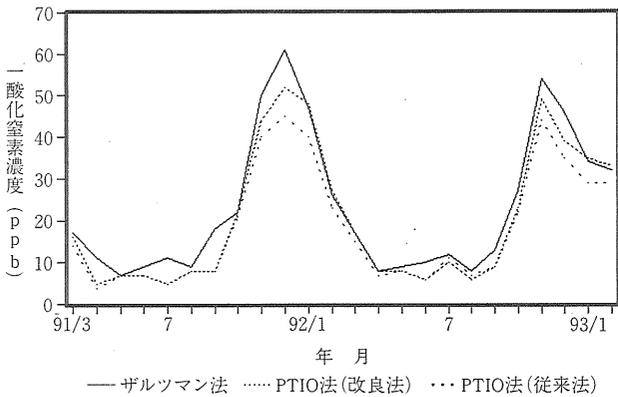


図2. ザルツマン法とPTIO法の比較 (国設東京, NO)

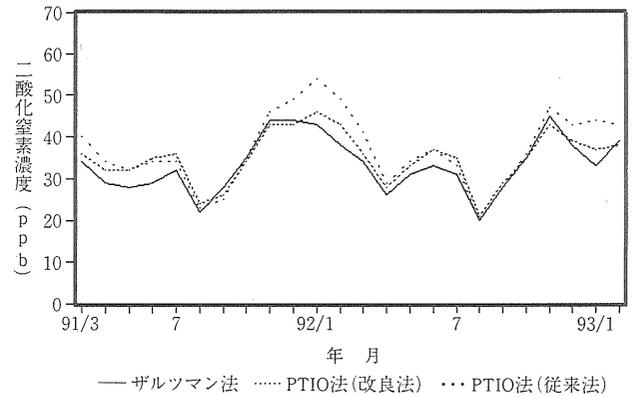


図3. ザルツマン法とPTIO法の比較 (国設東京, NO₂)

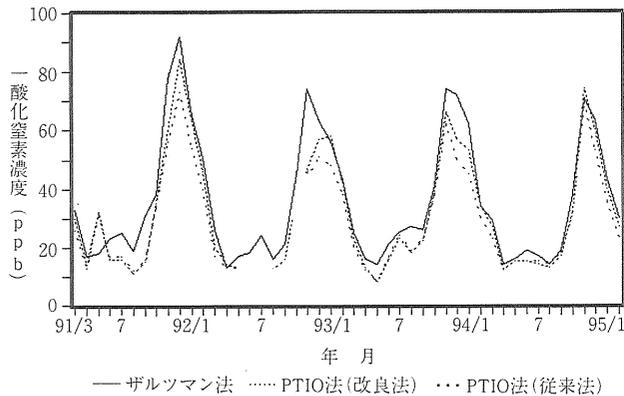


図4. ザルツマン法とPTIO法の比較 (大田, NO)

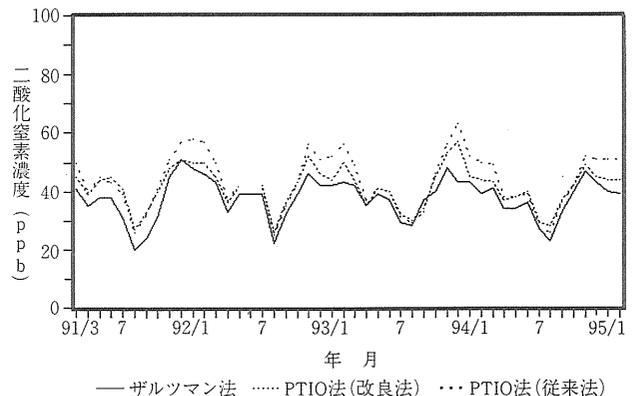


図5. ザルツマン法とPTIO法の比較 (大田, NO₂)

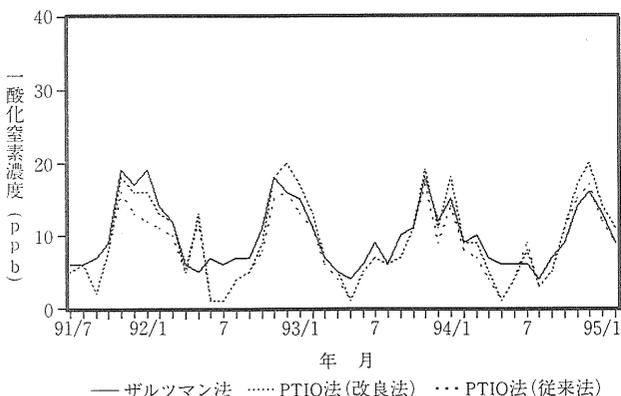


図6. ザルツマン法とPTIO法の比較 (青梅, NO)

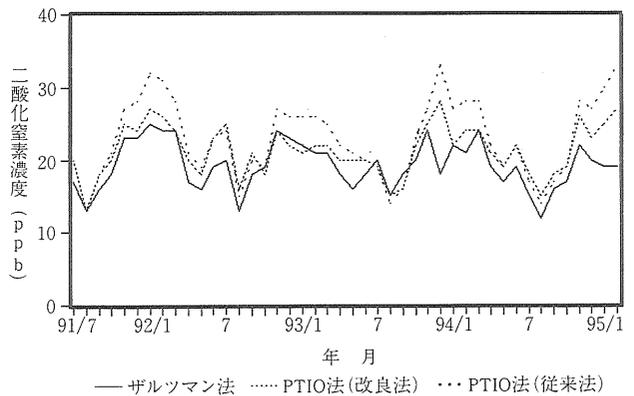


図7. ザルツマン法とPTIO法の比較 (青梅, NO₂)

表1. ギルツマン法とPTIO法の回帰分析の結果

測定地点	温度湿度補正方法	NO				NO ₂			
		n	r	a	b	n	r	a	b
国設東京	従来法	24	0.983	0.806	-0.25	24	0.926	1.207	-3.11
	改良法	24	0.981	0.943	-1.43	24	0.940	0.886	5.55
大田	従来法	45	0.969	0.792	0.85	47	0.922	1.244	-2.98
	改良法	45	0.971	0.922	-1.46	47	0.923	0.916	7.11
青梅	従来法	44	0.861	0.906	-0.75	45	0.808	1.281	-1.57
	改良法	44	0.894	1.165	-2.16	45	0.786	0.827	5.40
全体	従来法	113	0.978	0.803	0.25	116	0.957	1.150	0.35
	改良法	113	0.977	0.906	-0.33	116	0.969	1.024	2.06

n: データ数 r: 相関係数 a: 傾き b: y切片

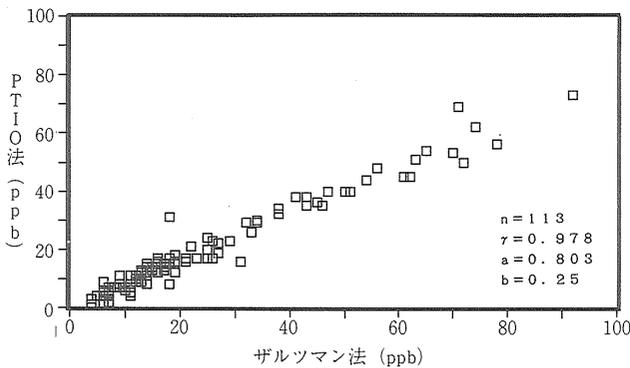


図8. ギルツマン法とPTIO法の散布図 (従来法, NO)

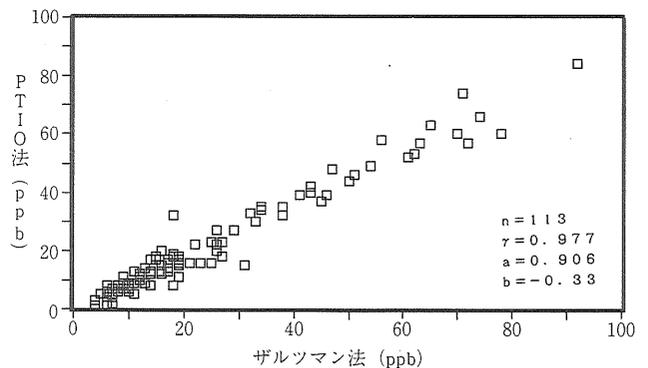


図9. ギルツマン法PTIO法の散布図 (改良法, NO)

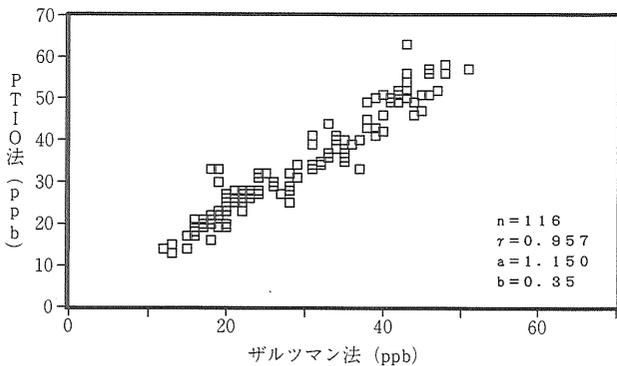


図10. ギルツマン法とPTIO法の散布図 (従来法, NO₂)

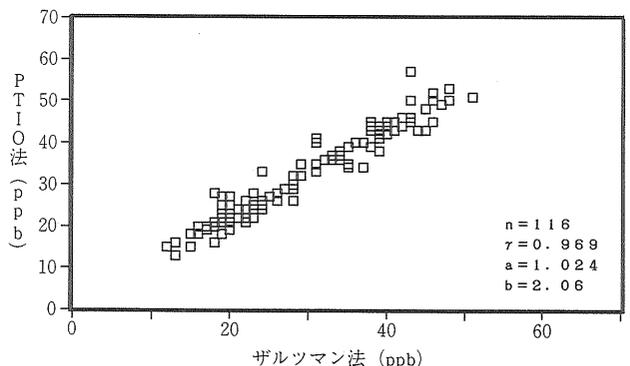


図11. ギルツマン法とPTIO法の散布図 (改良法, NO₂)

内ではかなり清浄な地域で、夏期のNO濃度レベルは5ppb前後となる(図6)。1991年3月から1994年12月までの測定期間中に、ギルツマン法では数ppbを示しているのに対し、PTIO法では1ppbしか示さないことが4回生じた(図6)。これは、NOをNO₂に酸化するために使用しているPTIO(濃紫赤色)によるブランク値のバラツキが、低濃度時には相対的に大きく影響しているためと推定され、濃度レベルの低い地域における測定値の信頼

性はやや劣っていた。

② NO₂

全般的にPTIO法の方が高い傾向を示した。個々のPTIO法の測定値とギルツマン法の測定値の比を取り、この値を平均したものは、国設東京で1.11、大田で1.16、青梅で1.20で、11~20% PTIO法の方が高い値を示した。

回帰分析の結果(表1)は、相関係数が国設東京で0.926、大田で0.922、青梅で0.808、全体で0.957と高い

相関が認められた。

(2) 温度湿度補正における従来法と改良法の比較

PTIO法とザルツマン法を比較した場合、NOが低め、NO₂が高めの傾向を示し、この傾向は冬期の測定において特にその差が大きくなることが指摘されており、我々の実験においても同様であった。

平野らによりその後温度湿度の補正に関して検討が行われ、従来の補正式に水蒸気圧補正項を加味した補正式に修正されている。

PTIO法により測定した個々のデータを、従来法及び改良法それぞれの補正式で補正し、その結果を図2から図7に示した。

図から明かなように、NO及びNO₂とも改良法の方がザルツマン法の値により近似した。

ま と め

1) 長期型PTIO法とザルツマン法の測定値を比較するため、1991年3月から1995年2月の48ヵ月間、都内3地点で1ヵ月毎にPTIO法の捕集サンプラーを交換し並行測定をおこなった。

その結果、長期型PTIO法とザルツマン法による測定値は、NOはPTIO法の方がザルツマン法よりやや低め、NO₂はやや高めの傾向であったが比較的よく一致していた。

2) 測定値の温度湿度の補正を従来法と改良法それぞれにて補正し比較した。

その結果、改良法の方がザルツマン法により近似した。

謝辞 野外試験の実施にあたりサンプラーの交換等でお世話になった関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 天谷和夫：大気汚染研究, 9, 192, 1974.
- 2) 天谷和夫：人間と環境, 3, 64-66, 1977.
- 3) 青木一幸：第19回大気汚染学会講演要旨集, 240, 1978.
- 4) 柳沢幸雄, 西村肇：大気汚染学会誌, 15, 316-323, 1980.
- 5) 中土井隆, 岡三知夫, 馬島富行 他：第23回大気汚染学会講演要旨集, 443, 1982.
- 6) 平野耕一郎, 前田裕行, 石井哲夫：第25回大気汚染学会講演要旨集, 437, 1984.
- 7) 青木一幸：大気汚染学会誌, 20, 394-399, 1985.
- 8) 松本光弘, 溝口次夫：大気汚染学会誌, 23, 85-91, 1988.
- 9) 松田敬吾, 平野耕一郎, 前田裕行：第29回大気汚染学会講演要旨集, 580, 1988.
- 10) 平野耕一郎, 前田裕行, 松田敬吾：横浜市公害研究所報, 第15号, 3-12, 1991.
- 11) 平野耕一郎, 前田裕行, 松田敬吾：第34回大気汚染学会講演要旨集, 243, 1993.
- 12) 小野塚春吉, 福田雅夫, 牧野国義 他：東京衛研年報, 44, 225-230, 1993.
- 13) 東京都環境保全局大気保全部：大気汚染常時測定局測定結果報告, 1991年3月～1995年2月.

高速液体クロマトグラフィ/高周波誘導結合プラズマ発光分光分析による ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)及びヘキサシアノ鉄(Ⅲ)の分離定量

中川 順一*, 高橋 保雄*, 土屋 悦輝*

Determination of Hexacyanoferrate(Ⅱ) and Hexacyanoferrate(Ⅲ) by High Performance Liquid Chromatography/Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

JUNICHI NAKAGAWA*, YASUO TAKAHASHI* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords : 高周波誘導結合プラズマ発光分光分析 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), 高速液体クロマトグラフィ high performance liquid chromatography (HPLC), ヘキサシアノ鉄(Ⅱ) hexacyanoferrate(Ⅱ), ヘキサシアノ鉄(Ⅲ) hexacyanoferrate(Ⅲ)

はじめに

金属化合物の毒性は化学形態により異なる。例えば有機水銀と無機水銀の毒性は、有機水銀のほうがはるかに強く、また逆にヒ素化合物は有機ヒ素より無機ヒ素のほうが毒性が強いことはよく知られている。

シアンイオンは遷移金属化合物としばしば安定な錯化合物を生成する。そして生成したシアン錯体の毒性はもとのシアンあるいは金属イオンと大きく異なる。これらのことより金属元素の環境中の濃度及び人体への影響を考える場合、その存在形態を明らかにする必要がある。

金属の元素形態を測定する方法の一つとして、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)¹⁾がある。しかし、HPLCは優れた分離機能を持っているが、ガスクロマトグラフィのように選択性に優れた検出器が少なく、特にHPLCの検出器として汎用されているUV検出器は、環境サンプル及び生体サンプルの測定においては選択性が劣ることによりデータの信頼性に乏しく判断に迷うことがしばしばある。

一方、現在金属分析に広く用いられている高周波誘導結合発光分光分析(ICP-AES)は金属元素を化学形態として定量することは出来ないが、高い検出感度と元素選択性を持ち、また化学干渉が少なく、ダイナミックレンジが広いという特徴を持っている。

最近、これらの特徴を生かしたHPLCとICPの組み合わせにより、またさらに高感度分析が可能なICP

-MSとの結合により生体及び環境中の元素の形態分析の研究が行われている²⁻⁴⁾。

今回、シアン錯体の分析の一環として、HPLCとICPを組合わせたシステムによりヘキサシアノ鉄(Ⅱ)及びヘキサシアノ鉄(Ⅲ)の分離定量法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)カリウム、ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)カリウム、炭酸ナトリウム及びリン酸は和光純薬工業(株)社製(特級)を用いた。アセトニトリルはHPLC測定用を用いた。水酸化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム(TBAH)(0.4Mol水溶液)は関東化学社製を用いた。

2. 装置

高速液体クロマトグラフ：ポンプLC-6A、UV検出器SPD-6A(株島津製作所製)

ICP発光分析装置：JY48P型ジョバンイボン社製。分析装置のシステムはHPLCとICPを組み合わせ用いた。HPLCの流速とICPの試料吸入流速はほぼ同じであるのでHPLCの出口とネブライザをシリコンチューブにより直接接続した。

3. HPLC及びICP-AESの測定条件

表1にHPLC及びICP-AESの測定条件を示した。

4. 標準液

ヘキサシアノ鉄(Ⅱ)及び、ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)を各々

*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. HPLC 及び ICP-AES の測定条件

1. ICP-AES	
高周波出力	1.8kW
冷却ガス	22 l/min
補助ガス	0.3 l/min
キャリアーガス	20psi
測光位置	ワークコイル上12mm
分析線	259.94nm
2. HPLC	
カラム	NovaPak C18 ϕ 3.9×150mm
移動相	アセトニトリル：水 12：88 (炭酸ナトリウム 0.2mM, TBAH 5mM)
流速	2ml/min

0.592 g, 0.758 g を秤りとり, 移動相(アセトニトリル : 水, 12 : 88)100ml に溶かし, 1,000 μ g Fe/ml 溶液を調製した.

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

HPLC 測定条件の検討は UV 検出器を用い, 測定波長は 210nm を使用した.

1) カラムの選択

イオンペアカラムは SMSO-153 (横河アナリティカルシステムズ(株)社製), 逆相カラムは Nova-Pak C18 (50A 4 μ m 3.9×150mm) (ウォーターズ社製) を用い検討した. イオンペアカラム及び逆相カラムの移動相は, アセトニトリル : 水 各々 38 : 62, 12 : 88 (TBAH 5mM, 炭酸ナトリウム 0.2mM) である. その結果, 図 1 に示したとおり逆相カラムのほうがピーク形状及びベースラインの

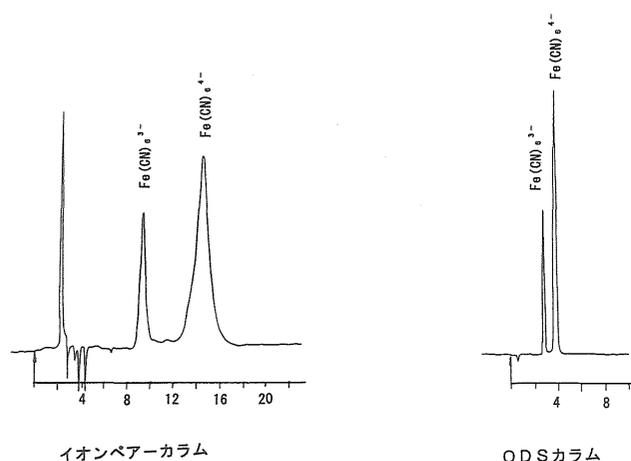


図 1. イオンペアーカラムと ODS カラムによるヘキサシアノ鉄(II)及びヘキサシアノ鉄(III)の HPLC クロマトグラム

安定性が優れていたため, 以後の検討を逆相カラムを用いて行った.

2) TBAH の濃度

炭酸ナトリウム 0.2mM, pH 7 で TBAH の濃度を 1, 2, 4, 6, 8 mM の濃度範囲で変化させ, クロマトグラムに与える影響を図 2 に示した. その結果 4 mM の濃度でピーク分離が最もよかった.

3) 炭酸ナトリウムの濃度

TBAH 5 mM, pH 7 で炭酸ナトリウムの濃度を 0.1-1.0mM の範囲で変化させ, クロマトグラムに与える影響を図 3 に示した. その結果ヘキサシアノ鉄(II)及びヘキサシアノ鉄(III)のピークは炭酸ナトリウムの濃度が濃くなるほど分離が悪くなり, 0.1-0.4mM の範囲ではピーク高はほとんど変わらなかった.

4) pH の影響

pH により鉄錯体の解離状態が異なり, イオンペアの形成やイオン抑制によるカラムへの保持に移動相の pH が影響を与える事が考えられるため, TBAH 5mM, 炭酸ナトリウム 0.2mM で pH のクロマトグラムに及ぼす影響を pH 6-11 の間で検討した. その結果を図 4 に示した. pH 調整はリン酸を用いて行った. その結果ヘキ

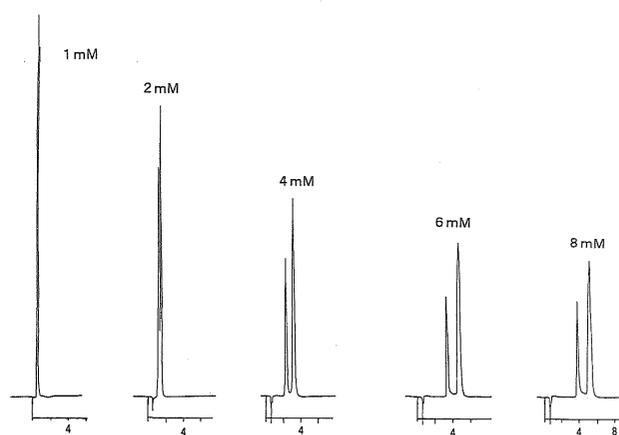


図 2. TBAH 濃度が HPLC クロマトグラムに与える影響

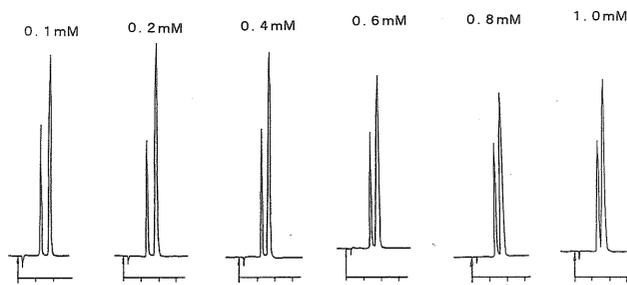


図 3. 炭酸ナトリウム濃度が HPLC クロマトグラムに与える影響

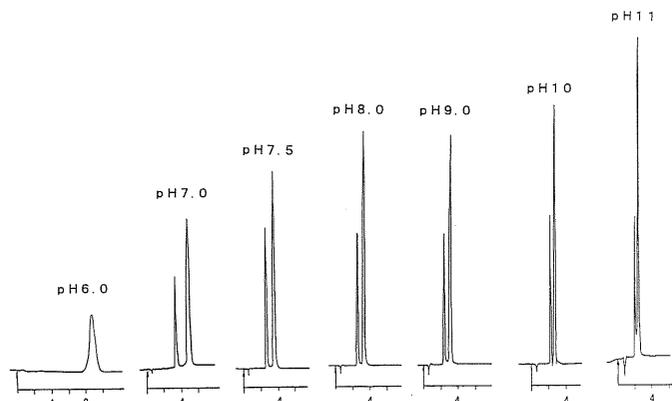


図4. pHがHPLCクロマトグラムに与える影響

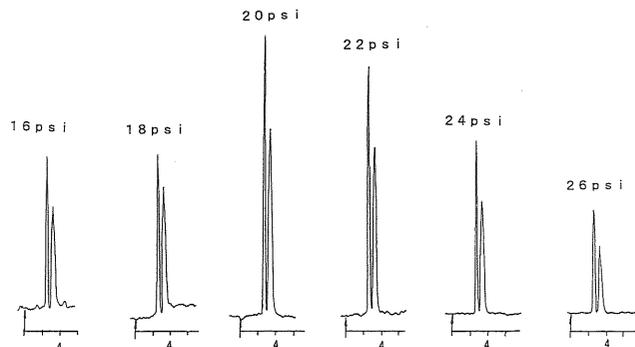


図5. ネブライザ圧力がHPLC/ICPクロマトグラムに与える影響

サシアノ鉄(II)及び、ヘキサシアノ鉄(III)の分離はpH 6ではできなかった。また、pH 9以上でも分離ができず、pH 8が最も良い結果を示した。

2. ICP-AESの測定条件の検討

1) 測光位置

ICPは元素により測光位置の最大強度が異なるため、鉄元素の最適測光位置を検討した。その結果ワークコイル上から12mmの観測位置でのS/B比が最も良かった。

2) ネブライザ圧力

TBAH 5 mM, 炭酸ナトリウム0.2mM及びpH8.0の時、ネブライザの圧力の変化によるクロマトグラムを図5に示した。ネブライザの圧力が高くなれば試料の吸い上げ量は多くなり、それに伴いプラズマへの試料導入量も増加し発光強度が強くなるはずであるが20psiで感度が最も良かった。この結果は、試料の導入量の増加に伴い発光強度は大きくなりピークは高くなる。しかし試料導入量をいたずらに増やしても、プラズマ温度を下げる結果となり、このため発光強度が逆に下りピークの高さが低くなったと思われる。

3) 高周波出力

一般的に高周波出力と発光強度の関係は、高周波出力を上げていくと発光強度は増加するがバックグラウンドも上昇するためS/B比の最も良いところに設定する必要がある。高周波出力は水溶液試料では1-1.5kWで十分であるが、移動相にアセトニトリルを用いているためやや高めにし、プラズマを安定させてから高周波出力を1.2kWから2kWまで変化させ、溶離液と同じ組成のブランクと標準液の発光強度を測定した。この結果発光強度は1.2kWから徐々に上がり、S/B比は1.8kWで最大となった。

3. 再現性

ヘキサシアノ鉄(II)とヘキサシアノ鉄(III)の標準液(10 µg Fe/l)を用いての繰り返し測定(n=5)の結果はcv約8%と良好であった。

4. 検量線

ヘキサシアノ鉄(II)とヘキサシアノ鉄(III)の標準液をそれぞれ1, 10, 100 µg/lになるように希釈し、各100 µlを注入しピーク高により検量線を作成した。その結果検量線は、この範囲においては直線性を示した。

まとめ

シアンは排水基準があり厳しく規制されているが、公定法により測定される全シアンはフリーのシアン化水素ばかりではなくて錯体として含有されているシアンも含んでいる。従って、メッキ工場などから排出される全シアン値と生物に与える毒性とは直接の関係はないことになる。全シアンとしての規制も重要であるが、同時に個々のシアン錯体の環境における挙動などきめ細かい知識の集積も重要なものと考えられる。そのためには、化合物の形態で測定できる分析法が必要であり、今回検討したHPLCとICPを組合わせたシステムにより、シアン錯体であるヘキサシアノ鉄(II)及びヘキサシアノ鉄(III)が分離定量できる。

文 献

- 1) Grigorova, B., Wright, S. A. and Josephson, M. : *J. Chromatogr.*, **410**, 419-426, 1987.
- 2) Gast, C.H., Kraat, J.C., Poopé, H. and Maessen, F. J. M. J. : *J. Chromatogr.*, **185**, 549-61, 1979.
- 3) Morita, M., Uehiro, T. and Fuwa, K. : *Anal. Chem.*, **52**, 349-351, 1980.
- 4) Morita, M. and Shibata, Y. : *Anal. Sci.*, **3**, 575-577, 1987.

水道水中の消毒副生成物の系統分析法

細川 奈津子*, 中川 順一*, 土屋 悦輝*, 高橋 保雄*

Simultaneous Quantification Analysis of Disinfectant by-Products in Supply Water

NATSUKO HOSOKAWA*, JYUNICHI NAKAGAWA*,
YASUO TAKAHASHI* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords: 系統分析 simultaneous quantification analysis, 消毒副生成物 disinfectant by-products, ホルムアルデヒド formaldehyde, ジクロロ酢酸 dichloroacetic acid, トリクロロ酢酸 trichloroacetic acid, ジクロロアセトニトリル dichloroacetonitrile, 抱水クロラール chloral hydrate

諸 言

近年, 各種産業界で使用される化学物質の種類は著しく増加している. こうした化学物質の利用の拡大に伴い, 河川水, 湖沼水等の環境水の水質の悪化が懸念されてきた. 一方, 分析技術の高度化に伴い, 環境水中の微量有機化合物に関する報告が数多く見られるようになり, 米国 EPA (環境保護庁) は, 水道原水から400種類以上の化学物質を同定している¹⁾.

こうした状況を踏まえて, わが国では, 将来にわたって水道水の安全性を確保していくため, 平成4年12月に30年ぶりに水道法水質基準が改正され, 平成5年12月に施行された.

今回の基準改正では, 基準項目が26項目から46項目に増やされ, 更に, 監視項目, 快適水質項目が, 新たに設定されている. 従来の水質基準と比較して, 消毒副生成物, 揮発性有機化合物, 農薬等の有機化合物の項目が多く取り入れられているのが特徴である. これらの項目は, 水道水中で濃度が変化しやすいため, 即日処理が必要である. そのため, 分析は系統的に一括して行えることが望ましい.

しかし, 上水試験法において, 監視項目の消毒副生成物については, 分析方法が系統化されていない. 消毒副生成物の系統分析としては, 鶴川, 宮野等の報告²⁾³⁾があるが, 今回, 上水試験方法に基づいて検討を加え, 系統分析方法を得たので報告する. また, 得られた分析方法を用いて実試料の分析を行ったので合わせて報告する.

実験の部

1. 装置 ECD付ガスクロマトグラフ (GC-ECD): Hewlett Packard 社製 (HP社製) HP5890, ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS): HP社製 HP5890/5970, キャピラリーカラム 1) DB-1: 膜厚0.25 μm , 内径0.25mm, 長さ30m, 2) SPB-5: 膜厚0.25 μm , 内径0.25mm, 長さ30m, 3) ハロマテクス: 膜厚0.25 μm , 内径0.32mm, 長さ30m, 4) ボコール: 膜厚0.25 μm , 内径0.32mm, 長さ30m

2. 試薬 チオ硫酸ナトリウム (特級), アスコルビン酸ナトリウム (特級), 塩化ナトリウム (特級), 無水硫酸ナトリウム (特級), 硫酸 (特級), n-ヘキサン (残留農薬試験用1000倍), メタノール (残留農薬試験用300倍) 及びホルムアルデヒド (特級) は和光純薬社製, tert-ブチルメチルエーテル (MTBE) (HPLC用) はアルドリッチ社製, ジクロロ酢酸 (水質試験用1 mg/ml MTBE溶液), トリクロロ酢酸 (水質試験用1 mg/ml MTBE溶液), ジクロロアセトニトリル (水質試験用1 mg/ml アセトニトリル溶液), 抱水クロラール (1級) 及びN-メチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン (鹿1級) は関東化学社製のものを用いた. 塩化ナトリウムは, あらかじめ400°Cの電気炉で8時間焼いたものを使用した.

3. 標準液の調製 ホルムアルデヒド及び抱水クロラールは上水試験方法通りに1 mg/ml溶液を調製して各標準原液とした. また, ジクロロアセトニトリル, ジクロロ酢酸, トリクロロ酢酸, については市販の1 mg/ml

* 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

溶液をそのまま各標準原液とした。各標準原液をホルムアルデヒドはメタノールで、その他の4物質はMTBEで100倍希釈して各標準液とした。

4. 分析条件の検討 分析方法を系統化して短時間で目的物質の分析を行うためには、ガスクロマトグラフによる分析の回数やカラム交換の回数を最少限にとどめ、分析機器を効率よく使用すること、共通した抽出条件を用いることが重要である。

そこで、以下の分析条件の検討を行った。

1) ガスクロマトグラフ(GC)条件の検討 蒸留水にホルムアルデヒド標準液を指針値の1/10の濃度である8 µg/lになるように添加し、これを試料として、上水試験方法に従って前処理を行いGC試料とした。このGC試料を用いて、適当な検出器とキャピラリーカラムの選択を行った。上水試験方法に基づき、使用した検出器はECDとMS、キャピラリーカラムは、DB-1、SPB-5、ハロマチクス、ボコールである。ハロマチクスとボコールについては内径が0.32mmであるためMSには使用できなかった。同様に、他の消毒副生成物についてもGC条件を個別に検討した。調製した試料中の各消毒副生成物の濃度は指針値の1/10の濃度とし、ジクロロアセトニトリル8 µg/l、抱水クロラール3 µg/l、ジクロロ酢酸4 µg/l、及びトリクロロ酢酸30 µg/lである。

次に、蒸留水に各消毒副生成物とトリハロメタンを添加した混合試料を試料として同様に検討を行い、各キャピラリーカラムによる分離状況を調べた。混合試料の添加濃度は、各消毒副生成物が指針値の1/10の濃度、トリハロメタンはそれぞれ、クロロホルム10 µg/l、ジブromクロロメタン5 µg/l、ブromジクロロメタン5 µg/l、ブromホルム1 µg/lである。

2) 抽出条件の検討 水道水中の消毒副生成物を測定する場合、はじめに、アスコルビン酸ナトリウムやチオ硫酸ナトリウム等の定められた試薬を用いて残留塩素を除去する必要がある。ホルムアルデヒドの場合、残留塩素を除去する試薬が他の消毒副生成物と異なり、前処理を個別に行わざるを得ない。そのため、ホルムアルデヒドについては、抽出条件の検討を省略し抽出方法は上水試験方法通りとした。

上水試験方法では、試料中のジクロロアセトニトリルと抱水クロラールをMTBEで抽出し、必要があれば、あらかじめヘキサン抽出を行い妨害物質を除去する方法が採られている。一方、ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸では、試料のpHを0.5以下に調整しMTBEで抽出する方法が採られている。

即ち、抽出条件を共通化していくためには、それぞれに固有の操作であるヘキサン抽出とpH調整が各消毒副生成物の抽出に与える影響を調べる必要がある。そこで、ジクロロアセトニトリル、抱水クロラール、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸についてヘキサンによる抽出率及び、試料のpHを7.0、0.5にした場合のMTBEによる抽出率を調べた。

3) 抽出後の試料中の各消毒副生成物の安定性 実際に試料の分析を行う場合、安定性の悪いものから順にGC分析を行う必要がある。各消毒副生成物の安定性を調べるため、抽出後の試料を保管して3日後、5日後、7日後にGC分析を行い、抽出直後の値と比較した。ただし、抽出後の試料は脱水した後、別の容器に移して密閉して4℃の冷蔵庫に保管した。ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸のメチル化は、GC分析する直前に行った。

5. 系統分析化 4. 分析条件の検討で得られた結果をまとめ、分析方法を系統化した。

6. 実試料の分析 5. 系統分析化で得られた分析方法を用いて、水道原水32件と浄水28件の合計60件の試料の分析を行った。

結果及び考察

1. 分析条件の検討 1) GC条件の検討 表1にGC-ECD、GC/MSとDB-1、SPB-5、ハロマチクス、ボコールのキャピラリーカラムを用いて、各消毒副生成物を分析した結果を示した。ホルムアルデヒドはGC-ECD、GC/MSのどちらの検出器でも測定が可能であった。ジクロロアセトニトリルと抱水クロラールは、保持時間が短く溶媒ピークと重なるため、GC/MSでは測定できなかった。また、ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸は、誘導体化試薬に由来するのピークと重なるため、GC-ECDでは測定できなかった。この結果は上水試験方法と異なるものであった。上水試験方法では、ジクロロアセトニトリル、抱水クロラール、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸のいずれの物質もGC-ECDとGC/MSで測定できることになっている。この相違は、ジクロロアセトニトリル、抱水クロラールの分析においては、用いたキャピラリーカラムの長さの違い、ハロ酢酸の分析においては、用いた誘導体化試薬の純度の違い等によるものと考えられる。

表2に混合試料を用いて分析した時の分離状況を示した。ジクロロアセトニトリル、抱水クロラールを同時に単独ピークとして分離できるキャピラリーカラムはなく、両者の分離が不十分であるか、ジブromクロロメタンのピークがどちらかのピークと重なって妨害となった。こ

表1. 個別分析時における消毒副生成物の分離状況

	GC-ECD				GC/MS	
	DB-1	SPB-5	ハロマチクス	ボコール	DB-1	SPB-5
ホルムアルデヒド	○	○	—	—	○	○
ジクロロアセトニトリル	○	○	○	○	×	×
抱水クロラール	○	○	△	○	×	×
ジクロロ酢酸	×	×	×	×	○	○
トリクロロ酢酸	×	×	×	×	○	○

○：分離状況が良いもの，△：分離状況は良いがピーク形状が悪いもの，×：溶媒ピーク等の妨害物質の影響で測定不能のもの

表2. 混合試料分析時における消毒副生成物の分離状況

	GC-ECD				GC/MS	
	DB-1	SPB-5	ハロマチクス	ボコール	DB-1	SPB-5
ジクロロアセトニトリル	BDM	CH	○	○	×	×
抱水クロラール	○	DCAN	BDM	BDM	×	×
ジクロロ酢酸	×	×	×	×	○	○
トリクロロ酢酸	×	×	×	×	○	○

○：分離状況が良いもの，BDM：プロモジクロロメタンのピークと重なるもの，CH：抱水クロラールのピークと重なるもの，DCAN：ジクロロアセトニトリルのピークと重なるもの，×：溶媒ピーク等の妨害物質の影響で測定不能のもの

のことから，あらかじめヘキサン抽出を行い，ジブロモクロロメタンを除去する操作が必要であることがわかった。また，ジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸はDB-1またはSPB-5で同時分析が可能であった。

2) 抽出条件の検討 ジクロロアセトニトリル，抱水クロラール，ジクロロ酢酸，トリクロロ酢酸及びトリハロメタンに対するヘキサンによる抽出率を調べた結果，抱水クロラール，ジクロロ酢酸，トリクロロ酢酸は全く抽出されず，ジクロロアセトニトリルが約85%，トリハロメタンが約100%抽出されることがわかった。次に，試料のpHを0.5と7.0にした時のMTBEによる抽出率を調べた結果，試料のpHが0.5の場合には，ジクロロ酢酸，トリクロロ酢酸，ジクロロアセトニトリル，抱水クロラール，及びトリハロメタンの全ての物質とも抽出率は約100%であったが，試料のpHが7.0の場合には，ジクロロ酢酸，トリクロロ酢酸が全く抽出されなかった。

3) 抽出後の試料中の各消毒副生成物の安定性

表3に抽出後の試料中の各消毒副生成物の安定性を調べた結果を示した。ホルムアルデヒド誘導体の安定性が一番悪く3日後で82%，5日後で78%まで減少していた。また，他の物質については3日以内に測定を行えば約5%程度の誤差で測定できることがわかった。

表3. 抽出溶媒中の消毒副生成物の残存率 (%)

	直後	3日後	5日後	7日後
ホルムアルデヒド	100	82	78	70
ジクロロアセトニトリル	100	100	95	96
抱水クロラール	100	95	92	90
ジクロロ酢酸	100	98	101	98
トリクロロ酢酸	100	100	97	97

2. 系統分析化 これまでの結果をまとめて以下に示した。

1) MTBE抽出を行う前にヘキサン抽出を行い，ジブロモクロロメタンを除去する必要があること。

2) ヘキサン層にはジブロモクロロメタンとジクロロアセトニトリルが抽出されるため，ジクロロアセトニトリルの測定には，これらを分離できるSPB-5，ハロマチクス，あるいはボコールのキャピラリーカラムを使用すること。

3) ヘキサン抽出後もジクロロアセトニトリルが試料中に約15%程度残留するため，抱水クロラールの分析にはジクロロアセトニトリルとの分離が可能なDB-1，またはボコールのキャピラリーカラムを使用すること。

4) MTBEによる抽出操作は、試料のpHを0.5以下に下げても行うことで、抱水クロラール、ジクロロ酢酸及びトリクロロ酢酸を同時に抽出できること。

5) 抽出後の試料中のホルムアルデヒド誘導体は短時間で分解するため、GC分析は、はじめにホルムアルデヒド誘導体を測定し、他の消毒副生成物も3日以内に測定すること。

これらをもとに系統分析化を行い得られた方法を図1

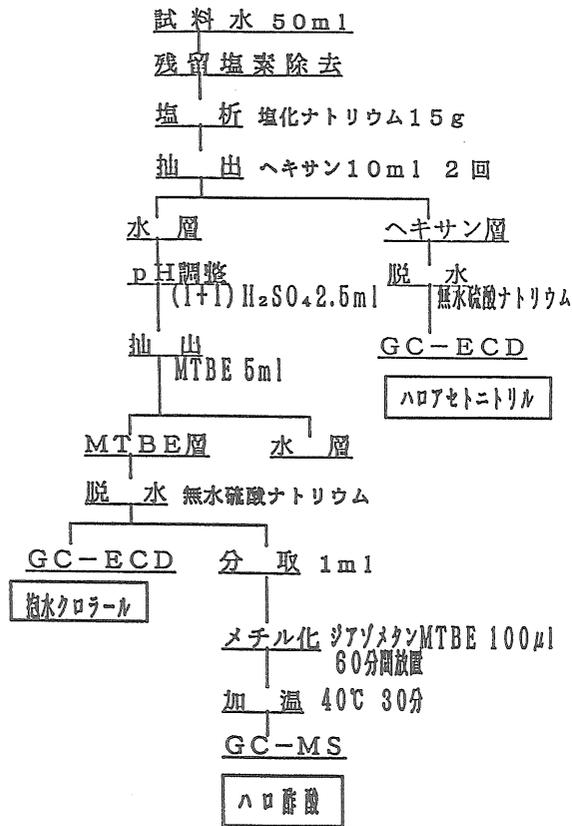


図1. 消毒副生成物の系統分析方法

表4. 消毒副生成物のガスクロマトグラフ条件

	ホルムアルデヒド	ジクロロ酢酸 トリクロロ酢酸	ジクロロアセトニトリル 抱水クロラール
装置	GC/MS	GC/MS	GC-ECD
検出器温度	250℃	250℃	280℃
注入口温度	200℃	200℃	200℃
キャピラリーカラム	SPB-5	SPB-5	ポコール
昇温条件	50℃(5分) →15℃/分→ 200℃(5分)	50℃(5分) →20℃/分→ 200℃(2分)	45℃(5分) →5℃/分→ 140℃(16分)
測定質量数	181, 161	DCA*: 83, 85 TCA**: 117,	-

*: DCA はジクロロ酢酸, **: TCA はトリクロロ酢酸

に、GC条件を表4に示した。この方法ではカラム交換が不要であり、各検出器とも分析回数は2回である。また、個別に分析した場合に比べてサンプリング操作と抽出操作の回数が少ない。そのため、全行程に要する時間を2/3程度に短縮することができた。また、ジクロロアセトニトリルでは抽出率が個別の分析時に比べて、100%から85%に減少したが、消毒副生成物の分析における検量線の作成は、標準液を直接GC分析するのではなく、蒸留水に標準液を段階的に添加して試料と同様に抽出操作から行うため、ジクロロアセトニトリルの実試料分析には差し支えないと考えられる。

3. 実試料の分析 表5に実試料の分析結果を示した。ホルムアルデヒドとトリクロロ酢酸はいずれの試料からも検出されなかった。ジクロロアセトニトリルは、浄水で2検体から0.006-0.013mg/lの範囲で検出された。また、抱水クロラールは、原水で2検体から、浄水で6検体から0.002-0.004mg/lの範囲で検出された。ジクロロ酢酸は、原水で1検体から、浄水で2検体から0.002-0.006mg/lの範囲で検出された。この各消毒副生成物の検出率は、惣名等の調査結果⁴⁾と比べていずれも低いものであった。その原因としては、地下水を原水として使用している試料が多かったことが考えられる。

まとめ

ホルムアルデヒド、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、ジクロロアセトニトリル及び、抱水クロラールについてガスクロマトグラフ条件、抽出条件、抽出後の安定性を検討し分析方法の系統化を試みた。その結果、ホルムアルデヒドを除く4物質について系統分析方法を得た。この系統分析方法と得られたガスクロマトグラフ条件を用いることによって、2系統の抽出と4回のガスクロマト

表5. 水道原水及び浄水中の消毒副生成物の検出状況

	試料	検出数	検出値 (mg/l)
ホルムアルデヒド	原水	0	-
	浄水	0	-
ジクロロアセトニトリル	原水	0	-
	浄水	2	0.006-0.013
抱水クロラール	原水	2	0.003
	浄水	6	0.002-0.004
ジクロロ酢酸	原水	1	0.002
	浄水	2	0.002-0.006
トリクロロ酢酸	原水	0	-
	浄水	0	-

グラフ分析で、目的とした5物質の分析が可能となり、分析操作に要する時間を2/3程度に短縮することができた。ジクロロアセトニトリルについては抽出率が100%から85%に減少したが、実試料の分析に用いて特に支障はなかった。そのため、本分析法は監視項目の依頼等、処理件数の多い場合の検体処理に有用であると考えられる。

(本研究の概要は第31回全国衛生化学技術協議会年会で発表した。)

文 献

- 1) Report to the U.S. congress on suspect carcinogens in water supplies, June 17, U.S. EPA, 1975.
- 2) 鵜川昌弘, 中村清一, 宮野啓一, 布浦雅子: 大阪府立衛研年報, **26**, 63-71, 1988.
- 3) 宮野啓一, 布浦雅子, 宗芳和: 大阪府立衛研年報, **29**, 77-81, 1991.
- 4) 惣名史一, 相沢貴子, 真柄泰基: 第43回全国水道, 研究発表会講演集, 702-704, 1992.

皇居外苑濠の植物プランクトン(第6報*) — *Microcystis* 属について —

渡辺 真利代**, 土屋 悦輝**

Phytoplankton in the Moats around the Imperial Palace (VI*) — *Microcystis* species —

MARIYO F. WATANABE** and YOSHITERU TSUCHIYA**

Keywords: ミクロシステイス *Microcystis*, 濠 moat, 植物プランクトン phytoplankton

緒 言

湖沼やダム湖など淡水域における富栄養化により植物プランクトンの種組成にもたらされる変化としては、一般的に藍藻種の種類や量的増大があげられ、藍藻の中でとりわけ *Microcystis* 属は最も多くの水域で、比較的長期間にわたって優占種となったり、アオコ状態となることが観察されている。日本の湖沼における *Microcystis* 属は1980年代はじめまで全て *M. aeruginosa* と記載されていたが、渡辺らの報告¹⁾により Komárek²⁾の分類が取り入れられ、*M. aeruginosa* のほか、*M. viridis* や *M. wesenbergii* を識別するようになった。その後、アイソザイムを取り入れた我々の研究³⁾により、*M. aeruginosa* とされる集団は2つのグループに分けることが可能であることが明らかとなった。しかし、Komárek⁴⁾により、日本産 *Microcystis* 属には *M. ichthyoblabe* などいくつかの種が存在することが報告されている。

ここでは皇居外苑濠、千鳥が淵に出現する *Microcystis* 属の種類と量について報告する。

方 法

表面水を採取し、ホルマリンを1%になるように加えた後、沈澱させ濃縮し、フークスローゼンタール血球計算盤を用いるか、界線スライドグラスを用いて計数した。

結果及び考察

図1には皇居外苑千鳥が淵で観察された主な *Microcystis* 属の写真を示した。*M. wesenbergii* (A)は *M. viridis* とともに通常の顕微鏡下で群体周辺の寒天基質の境界が明

瞭に観察される種類である。*M. wesenbergii* の特徴は細胞が群体表面に1層となっていることであり、しばしば袋状の小群体が多数集合しているのが観察される。これに対し *M. aeruginosa* (B)や *M. ichthyoblabe* (C)は群体周辺の寒天基質が通常では観察されない種類である。*M. aeruginosa* は細胞が比較的大きく群体周囲の凹凸が少なく、黒みが強い細胞が集合しているが、*M. ichthyoblabe* では明らかに細胞が小さく時に褐色がかって見える。これより細胞がまばらな群体(D)もしばしば観察される。

図2には年4回実施している調査で計数されたここ3年間での *Microcystis* 属4種の合計の細胞数の変化を示した。*Microcystis* 属は通常8月に高い細胞数を示し、1993年の8月には460,000/ml、1994年の8月では760,000/mlとなっていた。濠は最大でも2m前後と浅いため、冬期においても *Microcystis* は表面水に 10^3 /ml程度観察されることが多い。しかし、1992年の冬は13,000/mlと比較的細胞数が多く見られた。1993年には前報で報告⁵⁾したような藍藻 *Anabaena tenericaulis* の冬期のブルームがみられたため2月から4月にかけて週1回の試料採取を行った。この時期はちょうど *Microcystis* 属としての成長の立ち上がりの時期にあるので、その種類組成と細胞数の変化を追跡した。この時期については *M. wesenbergii*, *M. viridis*, *M. aeruginosa* の3種の同定は可能であったが、細胞の小さい種類については群体が小さく多くは *M. ichthyoblabe* であると思われるが明確ではないため、*Microcystis* spp.とした。ここではおおよそ3月の半ばから4月にかけて細胞の増殖が観察されているが、種類組成か

*第5報, 東京衛研年報, 44, 253-257, 1993

**東京都立衛生研究所 169 東京都新宿区百人町3-24-1

**The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

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

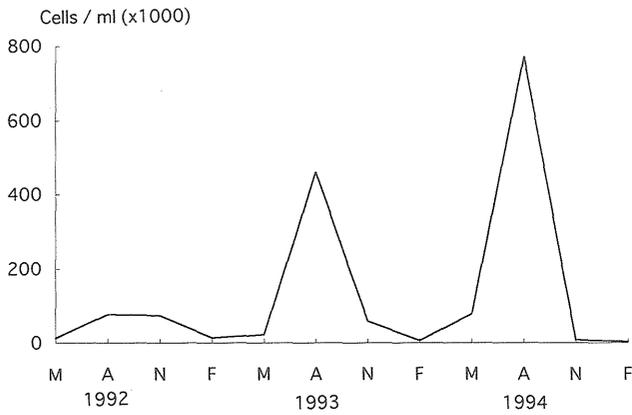


図2. 千鳥が淵における *Microcystis* 属の細胞数の変化

らは *M. wesenbergii* と細胞の小さい種類である *Microcystis* spp. の割合が高くなっていった。なお、この時期の水温は午前11時頃の測定で8℃から13℃であった。

都内公園池で *Microcystis* の種類組成を2週間毎に調査した結果では⁶⁾、*M. ichthyoblabe* が大部分である *Microcystis* の細胞サイズの小さいグループが秋期に優占していたため、このグループが低温で優占する可能性があると考えたが、千鳥が淵ではその傾向は認められなかった。

文 献

1) 渡辺真之, 千原光雄: 筑波の環境研究, 5 A, 80-86, 1980.
 2) Komárek, J.: Die taxonomische Revision der planktonische Blau algen der Tschechoslowakei. In J. Komárek and H. Ettl, eds., Alogologische Studien,

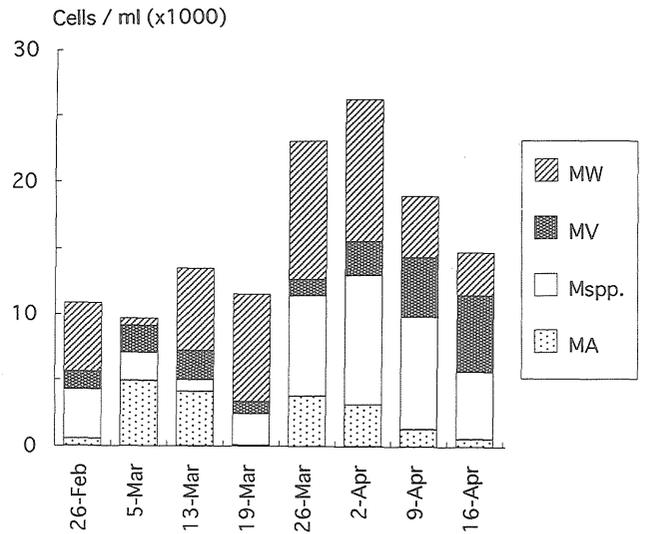


図3. *Microcystis* 属の成長開始時期における細胞数と種類組成の変化

10-206 Tscheco. Akademie der Wissenschaften, 1958.
 3) Kato, T., Watanabe, M.F. and Watanabe, M.: Arch. Hydrobiol. Suppl. 92: 129-140, 1991.
 4) Komárek, J.: Arch. Hydrobiol. Suppl. 92, 115-127, 1991.
 5) 渡辺真利代, 土屋悦輝: 東京衛研年報, 44, 253-257, 1993.
 6) Watanabe, M.F., Park, H.D. and Watanabe, M. Verh. Internat. Verein. Limnol. 25, 2226-2229, 1994.

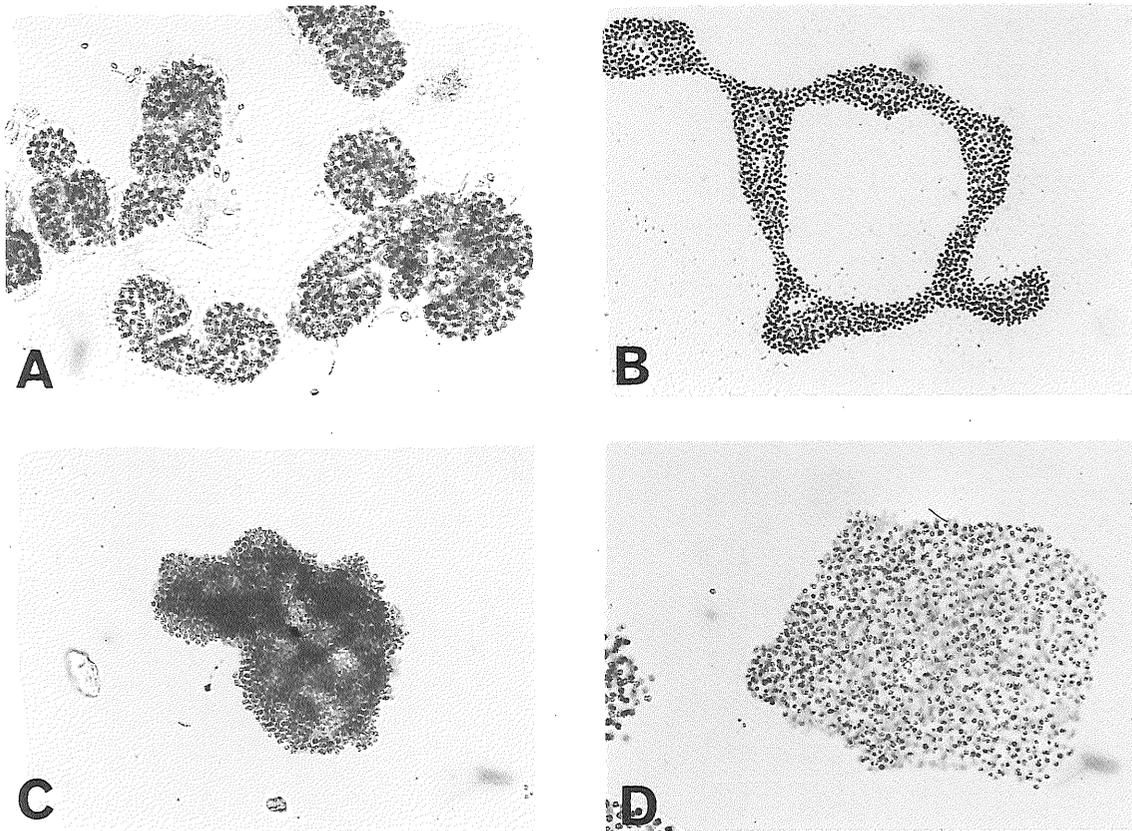


図1. *Microcystis* 属
A : *M. wesenbergii*
B : *M. aeruginosa*
C : *M. ichthyoblabe*
D : *Microcystis* sp.

報 文 V

毒性に関する調査研究

REPORTS V

PAPERS ON TOXICOLOGY

V 毒性に関する調査研究

各種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、広範に活用されている。本章では毒性に関する研究報告が11編掲載されており、医薬品に関して6編、食品添加物を取り上げたもの2編、環境汚染物質を対象にしたもの1編、実験動物の性状に関したのものが2編である。

医薬品に関する6編のうち5編は漢方方剤を扱っている。毒性部では東洋医学研究事業プロジェクトの一員として漢方方剤・生薬の安全性・有効性について基礎医学的試験を実施しているが、これらはその成果の一端を示している。漢方方剤についての報告5編のうち4編は六味丸を扱っており各報告者は各々異なった方面から六味丸の作用を分析しており、全体としてこの方剤についての総合的分析が可能となっている。このうち癌や成人病の発生過程に重要と思われる過酸化反応に対する六味丸の影響をラット脳を用いた報告では、いくつかの指標では過酸化を促進する作用がみられ、グルタチオンペルオキシダーゼ活性に対しては補完的であったが、全体としては顕著な変化はみられなかった、としている。サルモネラ菌を用いた変異原性を検出するAmes試験を3種類の菌株を用いた六味丸に応用した報告では、既知の変異原に対する六味丸の影響を見ている。その結果、4-NQO, AF-2, 2-AAという3種類の既知変異原に対しては2種類の菌株で六味丸による変異原性の増強がみられ、紫外線の変異原性は六味丸により1菌株では増強されたが1菌株では変化がみられず、T-P-1では2菌株で六味丸による変異原性抑制がみられた、としている。次の2編の報告はいずれも病態動物に対する六味丸の作用を見たものである。漢方薬をヒトに投与するときには実際にはなんらかの症状や訴え（漢方では証といわれるもの）に基づき投与されるものなので、動物実験においてもなんらかの病的状態を有するものに対する漢方方剤の作用を見る事はヒトにおける実際の投与状況により近いものを再現したものといえる。2編のうち1編はMRL/lprマウスという自己免疫疾患のモデル動物であり、もう1編はAKR/Nというリンパ腫・白血病のモデル動物を用いている。その結果、六味丸はMRL/lprマウスに対しては自己免疫疾患に対して大きな影響をおよぼさず、正常臓器機能に対しても明かな障害作用を認めなかった。また、AKR/Nマウスに対しては正常臓器機能に対しては明かな障害作用を認めなかったが、血液中の腫瘍細胞様細胞の増加や、脾臓や胸腺重量の増加がみられ、腫瘍促進的傾向があるような所見であるが明確な結論を得るためには更なる検討が必要と思われる。漢方を扱った報告のもう1編は十全大補湯を扱ったもので、正常のラットに13週間にわたる毒性試験を行ったものである。その結果、雄では血中の中性脂肪が用量反応をもって下降していたが雌では変化がみられなかった。また臓器の病理学的変化は何れの投与群にも見られなかった。

医薬品に関するもう1編は緩下剤である酸化マグネシウムについての報告である。ラットに種々の量の酸化マグネシウムを投与した結果、投与群に用量相関をもって軟便、下痢がみられ体重増加の抑制がみられ、雄では軽度の貧血傾向がみられたが、投与に関連した病理学的変化は何れの投与群にもみられず、本来の薬理作用にともなう影響以外には害作用は見られなかった。

食品添加物に関する報告は2編ある。1編は酸化防止剤である没食子酸プロピル及び関連エステルの作用を遊離肝細胞を用いて観察したものである。その結果、没食子酸エステル類は細胞死を伴う細胞毒性を示し、長鎖アルキル基をもつものは没食子酸プロピルより強い毒性を示し、メチル、エチルエステル及び没食子酸は没食子酸プロピルと同程度あるいはそれより弱い毒性を示した。また、これらの毒性の標的部位の一つとしてミトコンドリア呼吸系が考えられた。他の1編は前述のAmes試験を用いたもので、24種の食品添加物について試験を行った。その結果、コレカルシフェロール、オルトフェニールナトリウムが変異原性陽性と判定され、他の22

種の化合物は変異原性陰性と判断された。

環境汚染物質に関するものは1編である。これまでに著者らはアスベストの経口投与により、ごく少量のアスベスト繊維が消化管を通じ肝臓や脾臓に検出される事を示しており、この経路として消化管からの血流を介しアスベストが運ばれるであろう事を提唱していた。今回、著者らはこれを確認するため消化管と肝臓をつなぐ血管である門脈内に直接アスベストを投与した。その結果、肝臓のみならず脾臓、腎臓、肺において沈着を認め、生体に侵入したアスベストは血流を介し全身の組織に移行する可能性が示唆された。

実験動物の性状に関する報告は2編である。1編はマウスを用いた繁殖毒性試験における仔マウスの産仔数と仔体重の関係に関するものである。即ち、繁殖毒性試験において仔体重に変化があった場合、薬物投与による影響の他に産仔数の変化による栄養状態等の影響を考慮に入れる事の必要性についての検討を行った。その結果、産仔数の少ない群では体重が増加し、多い群では体重の増加が抑制される事がわかり、今後の繁殖実験では結果の評価の際に産仔数の分布などに十分注意を払わなければいけないとしている。他の1編はラットに対する食餌の制限が及ぼす影響をみるための方法としてどの様な食餌制限法が適切であるかに関する報告であり、併せて食餌制限と漢方方剤である十全大補湯の影響を見たものである。その結果、午前中2時間のみ給餌を行った群では体重増加率は自由食群の90-60%で、摂餌の率も50%であった。また、午前と午後合計2時間給餌を行った群では体重増加率は自由食群の95-70%、摂餌の率も80%を維持した。また十全大補湯混餌飼料を午前と午後合計2時間給餌を行った群では同様に標準飼料を与えた群にくらべて体重抑制が少ない傾向がみられた。

酸化ストレスによるラット脳抗酸化系の変動におよぼす六味丸散剤の影響

市川久次*, 浦野四郎**

Effects of Rokumi-gan Powder on the Antioxidative Functions of the Rat Brain through Oxidative Stress

HISATSUGU ICHIKAWA* and SHIRO URANO**

Keywords: 漢方方剤 Kampo, 六味丸散剤 Rokumi-gan powder, 抗酸化系 antioxidative functions, 酸化ストレス oxidative stress, ラット rat

緒言

好気性生物は、酸素を酵素の制御の基に活性化(活性酸素)し、酸化反応や酸素添加反応に適用して、エネルギーの産生・物質の代謝に利用している。反面、活性酸素は生体内の脂質、核酸、蛋白質、酵素等を攻撃し、脂質の過酸化、DNA損傷、蛋白変性等を引き起こし、発癌、老化、動脈硬化等生体に障害をもたらすといわれている。従来より、漢方方剤および生薬には活性酸素の消去作用が認められているが六味丸散剤の酸化ストレスに及ぼす影響について情報は殆ど無いといって良い。動物を高濃度の酸素に暴露し、体内における酸素消費の1/5を示す脳における酸化ストレスに対する漢方方剤六味丸散剤の影響を検討した。

実験材料ならびに方法

1. 使用動物

日本チャールスリバー社産生の生後4週齢の雄ラット(F344/DuCrj, 体重50-60g)を購入し、予備飼育を一週間行い一般状態に異常のないものを一群6匹とし、ステンレス製網ケージで飼育した。

2. 被験物質

六味丸散剤はウチダ和漢薬(株)より原料生薬を購入後、同社に委託し、熟地黄8、山薬4、山茱萸4、沢瀉3、茯苓3、牡丹皮3の割合で調製、粉末化したもの(Lot. No. 900830)を使用した。

3. 投与方法ならびに投与期間

被験物質は0, 0.4(おおよそヒトの服用量に相当),

3.6%の割合で粉末飼料(日本クレア(株)製CE-2)に混合し、固形飼料とシラットに3ヶ月間摂取させた。動物は1群を6匹とし、六味丸散剤混餌飼料により3ヶ月間飼育後3匹を酸化ストレス(酸素暴露)群、残り3匹を対照群とした。水は自由に摂取させ、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に調整された飼育室内にて飼育した。

4. 酸素暴露

Fig. 1に示すように $25\text{cm} \times 40\text{cm} \times 18\text{cm}$ のケージにラットを3匹ずつ入れ、これを密閉した後100%酸素を流量 2.0l/min でボンベより送った。水および飼料は自由に摂取させ、48時間飼育した。

5. シナプトソームの分離

ラットを断頭して全脳を摘出し、氷冷した 0.32M シュウクロース液(1mM カリウムEDTA/ 10mM トリスHCl緩衝液(pH7.4)) 9ml の中でタイト型テフロンガラスホモジナイザー(クリアランス 0.1mm)を用いて正確に12回上下してホモゲナイズした。得られたホモジネートを 4°C 、 3000rpm で、3分間遠心し、上清を得た。残った沈殿に更に 0.32M シュウクロース液を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、同様に遠心し上清を取り、前記の上清と併せる(=脳ホモジネート上清)。これを 4°C で 13000rpm にて10分遠心し、上清を除き、ミエリン、ライソゾーム、シナプトソーム等が混在する沈殿を得た。この沈殿に12%(w/w)フィコール含有の 0.32M シュウクロース液を約 6ml 加え、ルーズ型ホモゲナイザー(クリアランス 0.15mm)で穏やかに5回上下してホモジナイズし

*東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科 現所属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

**東京都老人総合研究所

**Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

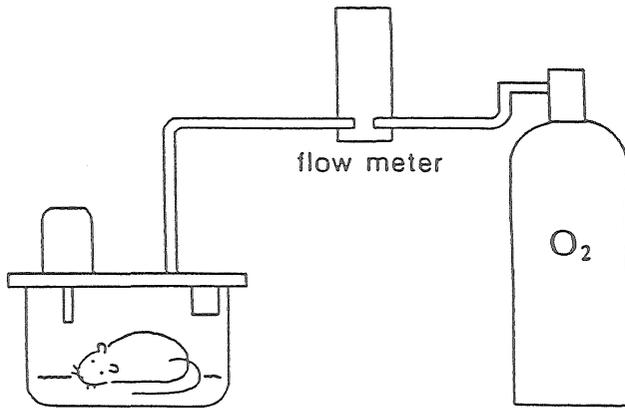


Fig. 1 Method of Exposure by 100% Oxygen to Animal

た。ホモジネートを超遠心管に移し、その上にメスピペットを用いて7.5% (w/w) フィコール含有0.32M シュークローズ液約3ml, 次にこの上に0.32M シュークローズ液約4 mlを静かに加えて密度勾配を作製した。これを超遠心分離し(4℃, 30000rpm, 1時間)シナプトソームを層を採取した。

6. シナプトソーム膜タンパク質の定量¹⁾

実験材料ならびに方法5(以下5)で得られたシナプトソーム懸濁液200 μ lに膜溶解剤として1% SDS150 μ l, 0.1M トリス HCl緩衝液(pH7.4)300 μ lを加えてボルテックスで攪拌し, 100 μ lを試験管に取り4倍希釈の発色試薬(Coomassie Brilliant Blue G-250試薬)5 mlを加えて攪拌し, 5分-1時間以内に595nmにて吸光度を測定した。1% SDS150 μ l, 0.1M トリス HCl緩衝液(pH7.4)500 μ lを加えたものをブランクとし, スタンダードによる検量線を用いてタンパク質量を算出した。他のタンパク質量測定試料(脳ホモゲネート上清等)についても, 同様に発色試薬を加えて行った。

7. シナプトソーム膜コレステロールの定量²⁾

5で得られたシナプトソーム懸濁液100 μ lにデタミナーTC555コレステロール定量試薬3 mlを加え, 5分間インキュベートし550nmにおける吸光度を測定した。0.1M トリスHCl緩衝液(pH7.4)100 μ lをブランクに用い, 検量線よりmgタンパク質あたりの量を算出した。

8. シナプトソーム膜リン脂質の定量³⁾

5で得られたシナプトソーム懸濁液100 μ lにデタミナー PL リン脂質定量試薬3 mlを加え37℃, 5分間インキュベートし500nmにおける吸光度を測定した。0.1M トリス HCl緩衝液(pH7.4)100 μ lをブランクに用い, 検量線よりmgタンパク質あたりの量を算出した。

9. 脳中の過酸化脂質(TBARS)の定量^{4),5)}

5で得られた脳ホモジネート200 μ lをネジ蓋付きガラ

ス製遠心管に取り, 3 mlの1% (v/v)リン酸と1 mlの0.7%チオバルピツール酸(TBA), 0.5mlの5 m MEDTAを加えて攪拌し, 沸騰水浴中で45分間加熱した。加熱後直ちに氷水中に浸して冷却した後室温に戻した。n-ブタノール4 mlを加えて振盪抽出し, 4℃, 2800rpmで10分間遠心し上層のn-ブタノール層を取り535nmにおける吸光度を測定し, 過酸化脂質(TBARS)量はモル吸光係数 1.56×10^5 を用いて算出した。0.1M トリスHCl緩衝液(pH7.4)200 μ lをブランクとして使用した。

10. シナプトソーム膜透過性の測定⁶⁾

5で得られたシナプトソーム懸濁液100 μ lにリン酸緩衝液(pH8.0)を0.5ml加え攪拌した後20 μ lの硫酸マグネシウム溶液を加えて混合した。これを氷水中で約60分間放置後³H-グルコースを加え攪拌した後15時間4℃にてインキュベートした。No.27ゲージのシリンジを用いてシェアリングを繰り返した後, 4℃, 5000rpm, 5分間遠心した。沈殿をリン酸緩衝液で2回洗浄し, 全量8 mlに希釈後0.5ml(この0.5mlを直接液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した値を100%とする)ずつ分注した。この試料を37℃で60分間, インキュベートした後, 4℃, 10000rpmで, 10分間遠心して得られた上清100 μ lを取り, 液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定し, 留出した³H-グルコースの量よりシナプトソーム膜の透過性(%)を算出した。

11. シナプトソーム膜流動性の測定⁷⁾

5で得られたシナプトソーム懸濁液の一部(10 μ l)を取り, リン酸緩衝液(pH7.4)2 mlを加え, さらに膜流動性測定のためのプローブとして膜表面近くの測定には trimethyl-ammoniumdiphenylhexatriene (tma-DPH)を, 膜内部の測定には diphenylhexatriene (DPH)を, 2 ml(それぞれ 4.0×10^{-6} Mの濃度)加え混合した。これを37℃で45分-60分間インキュベートした。tma-DPH, DPHはそれぞれ 2.0×10^{-3} Mのテトラヒドロフラン溶液を保存液として調製し, 遮光, 室温保存した。使用直前に100 μ lの保存液を50mlのPBSで希釈し 4.0×10^{-6} Mとして使用した。

膜流動性の測定は蛍光偏光解消法により行った。測定機器 Elint Microviscosimeter model mv-la (Elcint Co., イスラエル)を用いて蛍光偏光度P値を測定した。P値は励起光に対して垂直の方向(I_V), 平行の方向(I_H)の偏光蛍光が同時に測定され, 計算により自動的に表示される。

P値が大きいかほどプローブ近辺の流動性は低いことを示す。

$$P = (I_V - I_H) / (I_V + I_H)$$

12. 脳中のカタラーゼ活性の測定⁸⁾

5で得た脳ホモゲネート(0.32Mシュウクロース液)上清200 μ lを石英製キュベットに取り0.5mMカリウムリン酸緩衝液(pH7.0)1.8mlを加えて攪拌した後, 30mMH₂O₂1mlを加えて再び攪拌した. 240nmにおけるH₂O₂の吸光度の1分間の減少を測定し, その傾きに0.003(反応液容量(1))/43.6(H₂O₂のモル吸光係数)を乗じて減少したH₂O₂のモル数を算出した.

13. 脳中のグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)活性の測定⁹⁾

5で得た脳ホモゲネート上清200 μ lに10mMGSHP 100 μ l, 2.4U/mlグルタチオンレダクターゼ100 μ lに加え, 37°Cで10分間インキュベートした. これに1.5mMNADPHを100 μ lに加え攪拌し, 340nmにおける吸光度を測定した. 更に1.5mMH₂O₂を100 μ l加えて良く攪拌し340nmのNADPHの吸光度を経時的に測定した. 活性はmgタンパク質あたり340nmのNADPHの吸光度の変化量/分として算出した.

14. 脳中のスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性の測定¹⁰⁾

リン酸緩衝液(pH8.2)0.2ml, 0.5mMヒポキサンチン0.2ml, 10mMヒドロキシアミン・HCl-1mg/mlのヒドロキシアミン- α -スルホン酸混液0.1ml, 精製水0.2mlを小試験管に取り5で得た脳ホモゲネート上清を0.1ml(0.1ml中に脳ホモゲネート上清を0.1, 0.08, 0.02ml含むものを調整)ずつ加え, 37°C, 5分間インキュベートした後, 0.2mlの5 \times 10⁻³U/mlキサンチンオキシダーゼを加えて攪拌し, 37°Cで30分間インキュベートする. 次に発色液30 μ M-Nナフチル・エチレンジアミン・HClと3mMスルファニル酸・25%氷酢酸の混液2.0mlを加え攪拌し, 室温にて30分間放置後, 550nmにおける吸光度を測定した. ブランクに0.32Mシュウクロース液用い同様に行った. ブランクの吸光度の1/2を50%O₂阻害として, この時の希釈率の逆数を片対数グラフから求めSOD活性とした.

実験結果および考察

1. 脳中のコレステロール量(C)/リン脂質量(P)におよぼす影響

Fig. 2に示したごとく, 六味丸散剤投与および酸素暴露による影響は殆どみられなかった. 一般に, 過酸化により高度不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質は大きな影響を受けるが, コレステロールは過酸化の影響を殆ど受けないことからリン脂質が過酸化を受けることにより除去されれば, コレステロール量(C)/リン脂質量(P)は大

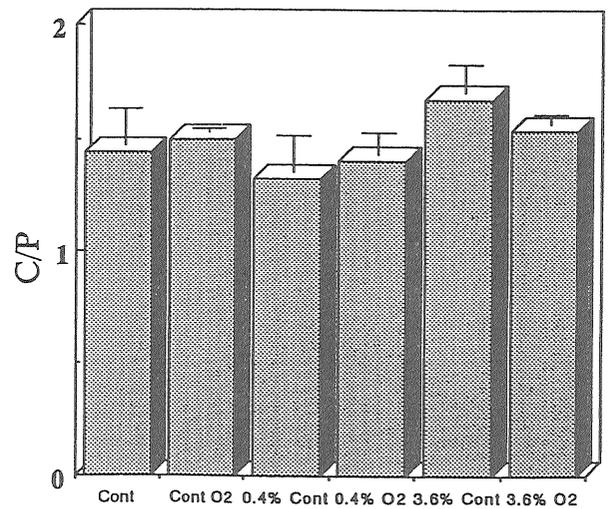


Fig. 2 Effects of Rokumi-gan Powder on Ratio of Cholesterol and Phospholipids (C/P) in Ras Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean \pm SD of 3 rats

Cont : control in air

Cont O2 : control in 100% O₂

0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air

0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂

3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air

3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

きくなることになる. 従って, 六味丸散剤投与および酸素暴露により脳中のリン脂質の減少は殆どなかったと考えられる.

2. 脳中の過酸化脂質(TBARS)量におよぼす影響

Fig. 3に示した如く, 脳中過酸化脂質(TBAS)量の上昇は酸素暴露による影響よりも, 六味丸散剤投与による影響の方が大きいことが認められ, 脳において, 六味丸散剤は脂質の過酸化・ラジカルの発生を促進¹¹⁾することが推察された.

3. 脳シナプトソーム膜透過性におよぼす影響

六味丸散剤投与および酸素暴露による影響は殆ど無いものと考えられたが, Fig. 4に示した如く, 全体として酸素暴露により六味丸散剤投与群においても膜透過性が増す傾向がみられた. このことは, 膜構造を疎にしたものと考えられ, 六味丸散剤は脳シナプトソーム膜の過酸化を促進することをうかがわせた.

4. 脳シナプトソーム膜の流動性におよぼす影響

Fig. 5に示した如く, 顕著な変化はみられなかったが, 膜表面近辺および膜内部において, 膜透過性が増すと同時に酸素暴露時においても膜流動性が増す傾向がみられ, 六味丸散剤は脳シナプトソーム膜の構造に影響をおよぼすことがうかがえた.

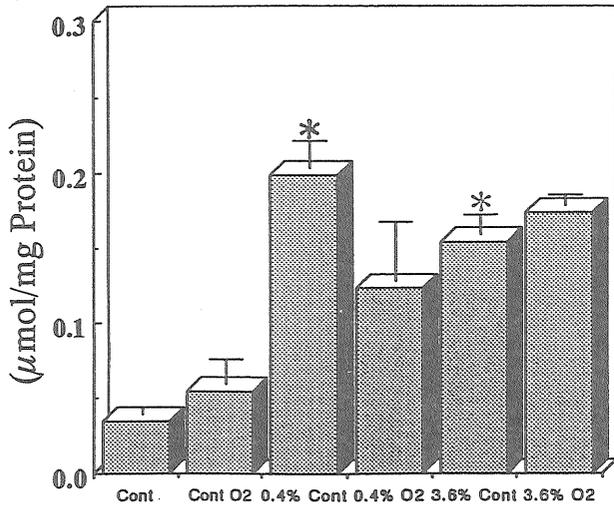


Fig. 3 Effects of Rokumi-gan Powder on TBARS in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean ± SD of 3 rats

* : significantly different from values of air control
 Cont : control in air
 Cont O2 : control in 100% O₂
 0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air
 0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂
 3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air
 3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

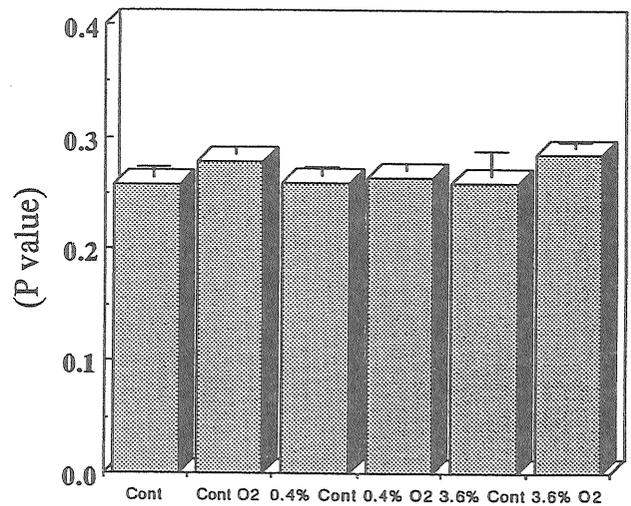
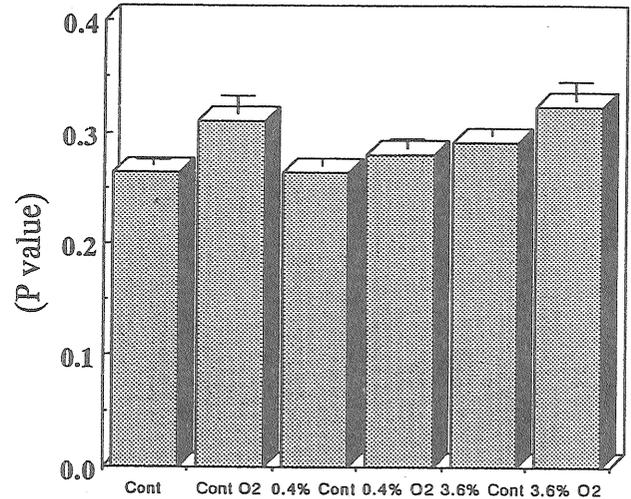


Fig. 5 Effects of Rokumi-gan Powder on the Membrane Fluidity of Synaptic Membrane in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean ± SD of 3 rats

Cont : control in air
 Cont O2 : control in 100% O₂
 0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air
 0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂
 3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air
 3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

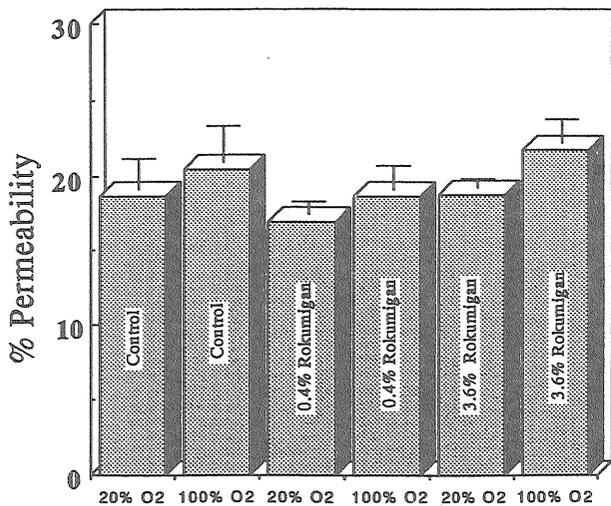


Fig. 4 Effects of Rokumi-gan Powder on the Permeability of Synaptic Membrane in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean ± SD of 3 rats

Cont : control in air
 Cont O2 : control in 100% O₂
 0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air
 0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂
 3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air
 3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

5. 脳中のカタラーゼ活性におよぼす影響

Fig. 6に示した如く、脳中のカタラーゼ活性は酸素暴露により低下し、六味丸散剤投与により更に低下を示した。脳中のカタラーゼはミエロキシゾームに局在し、量的にも少ない。従って、過酸化により発生した過酸化水素(H₂O₂)の分解に消費されるために活性の低下を起こすと考えられている。このことより、六味丸散剤は脳中において過酸化の促進をすることが推察された。

6. 脳中のグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)活性におよぼす影響

Fig. 7に示した如く、六味丸散剤投与により脳中のグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)活性の上昇がみ

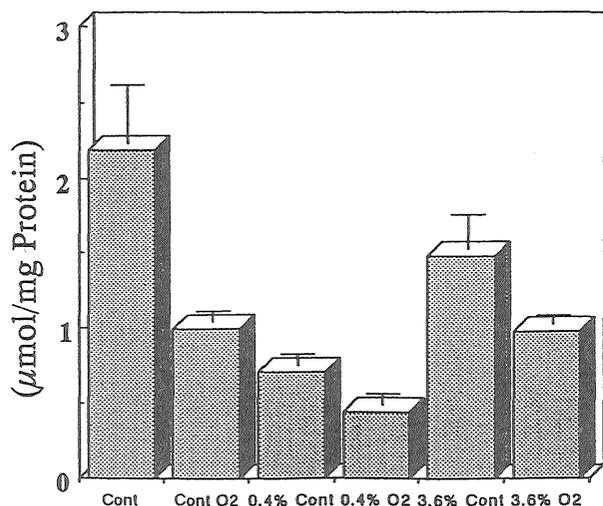


Fig. 6 Effects of Rokumi-gan Powder on the Catalase in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean \pm SD of 3 rats

Cont : control in air

Cont O2 : control in 100% O₂

0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air

0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂

3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air

3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

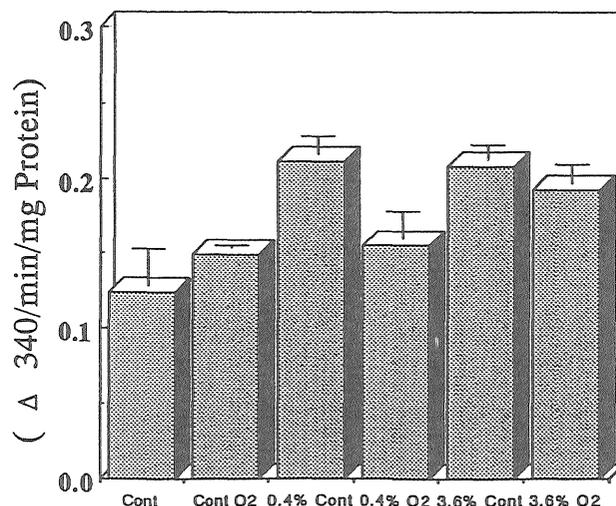


Fig. 7 Effects of Rokumi-gan Powder on the GSH-Px in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean \pm SD of 3 rats

Cont : control in air

Cont O2 : control in 100% O₂

0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air

0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂

3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air

3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

られ、この上昇は酸素暴露により対照群までは回復しないが低下を示した。このことは、六味丸散剤は脳中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) を活性化あるいは誘導することが推察された。一方、酸素暴露時に低下がみられたことより、六味丸散剤は脳中の酸化ストレスに対して、部分的には補完的に作用することがうかがえた。

7. 脳中のスーパーオキシジスムターゼ (SOD) 活性におよぼす影響

Fig. 8に示した如く、顕著な変化はみられなかったが六味丸散剤投与酸素暴露群において酸素非暴露群よりも上昇傾向を示した。このことより、六味丸散剤は脳中において過酸反応化が促進されることが示唆された。

結 論

漢方方剤の一つである六味丸散剤をラットに混餌法により3ヶ月間摂取させた後、48時間酸素暴露による酸化ストレスを与え、ラット脳中の抗酸化系におよぼす影響を検討した。

全体として顕著な変化はみられなかったが、六味丸散剤はラット脳に対して一部グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性に対しては補完的であったが、他は過酸化を促進する傾向がうかがえた。

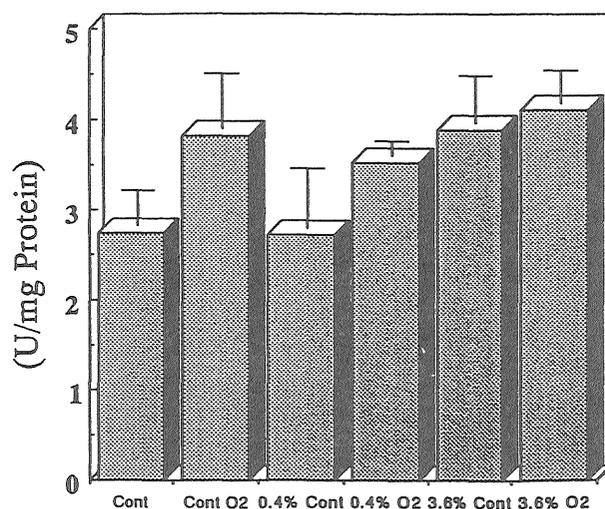


Fig. 8 Effects of Rokumi-gan Powder on the Super oxididismutase (SOD) in Rats Brain through Oxidative Stress. Each value shows the mean \pm SD of 3 rats

Cont : control in air

Cont O2 : control in 100% O₂

0.4% Cont : 0.4% Rokumigan-Powder in air

0.4% O2 : 0.4% Rokumigan-Powder in 100% O₂

3.6% Cont : 3.6% Rokumigan-Powder in air

3.6% O2 : 3.6% Rokumigan-Powder in 100% O₂

文 献

- 1) Bradford, M. M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
- 2) 加瀬澤信彦, 村上博美 : 医学のあゆみ, **127**, 646-652, 1983.
- 3) 北村元仕ら : 実験臨床医学(増補版) : **58**, 1982.
- 4) Uchiyama, M. and Mihara, M. : *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278, 1970.
- 5) Buege, J. A. and Aust, S. T. D. : *Methods in Enzymology*, **52**, 302-310, 1978.
- 6) Urano, S., Inomori, Y., Sugawara, T., et al. : *J. Biol. Chem.*, **267**, 18365-18370, 1992.
- 7) Urano, S., Yano, K. and Matsuo, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**(1), 469-475, 1988.
- 8) Aebi, H. : *Methods in Enzymology*, **105**, 121-126, 1984.
- 9) Flohe, H. and Gunzler, W. A. : *Methods in Enzymology*, **105**, 114-121, 1984.
- 10) Elstner, B. F. : *Anal. Biochem.* : **70**, 616-620, 1978.
- 11) 牛山慶子, 長井二三子, 加納いつ : 第53回日本癌学会, 名古屋, 1994.11.

いくつかの既知変異原に対する六味丸水抽出物の影響

藤田 博*, 青木 直人*, 佐々木 美枝子*

Effect of Water Extract of Rokumigan on Some Known Mutagens

HIROSHI FUJITA*, NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

Keywords: 漢方薬 Chinese medicine, 六味丸 rokumigan, 変異原 mutagen, 助変異原性 comutagenicity, 抗変異原性 antimutagenicity

緒 言

近年、漢方薬が医療機関で多用されるようになった。このような傾向に対して東京都では東洋医学事業プロジェクトを企画し、漢方薬の効用と安全性についての検討を行ってきた。六味丸は、検討対象漢方薬の一つとしてとりあげられたものである。

化学物質の安全性を評価する場合、様々な毒性情報が必要とされる。対象となる化合物の毒性に加えて、明らかな毒性物質などに対する影響についても重要な情報である。変異原性の検討においても、変異原性の有無に加え、既知の変異原に対する効果についての検討も行われてきた。変異原性を抑制¹⁾あるいは増強²⁾する効果を示す化合物が知られている。生薬の中にも変異原性を抑制^{3,4)}あるいは増強⁵⁾する作用があるものが見いだされている。

われわれは、六味丸水抽出物の変異原性について Amesら⁶⁻⁸⁾が開発した、いわゆる Ames 試験を用いた検討を行い、六味丸水抽出物に変異原性が見られることを報告^{9,10)}してきた。更に今回は、六味丸水抽出物の既知変異原に対する影響についても Ames 試験により検討したところ、変異原性を変動させる効果が見られたので報告する。

実験材料及び方法

試料 六味丸水抽出物は、(株)ウチダ和漢薬において作製した。本プロジェクト研究¹¹⁻¹³⁾の共通生薬である熟地黄、山薬、山茱萸、沢瀉、茯苓、牡丹皮を細切し(山茱萸は全形のまま)、それぞれを六味丸散剤処方⁸の8:4:4:3:3:3に混合した。水を加え100℃まで加熱し、1時間抽出した。抽出液をろ過し、ろ液を60℃で減圧濃

縮した後、凍結乾燥した。原料からの抽出率は36.0% (w/w)であった。

六味丸水抽出物は、雑菌が混入していたことから、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。

変異原物質は、4-ニトロキノリン-N-オキシド(中井製薬、以下4-NQOと略す)、フリルフラマイド(上野製薬、以下AF-2と略す)、ベンツ[a]ピレン(和光純薬、以下BPと略す)、2-ニトロフルオレン(Aldrich、以下2-NFと略す)、2-アミノアントラセン(和光純薬、以下2-AAと略す)、トリプ-P-1(和光純薬、以下T-P-1と略す)をジメチルスルホキシド(和光純薬)に溶解し用いた。また、紫外線(以下UVと略す)は、15W殺菌灯、照射距離900mmの照射箱を用い照射した。

菌株 *Salmonella typhimurium* TA98⁶⁾、TA100⁶⁾及びTA102^{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。

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^{8,16)}により行った。代謝された後の変異原性を見るための代謝活性化には、アロクロール1254(ジエールサイエンス)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S9⁸⁾を用いた。S9mix^{8,16)}中のS9量は、10%(50 μ l/プレート)とした。

変異原溶液0.1ml及び六味丸水抽出物溶液0.05ml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、更に一夜培養した菌液を0.1ml加え、37℃で20

*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

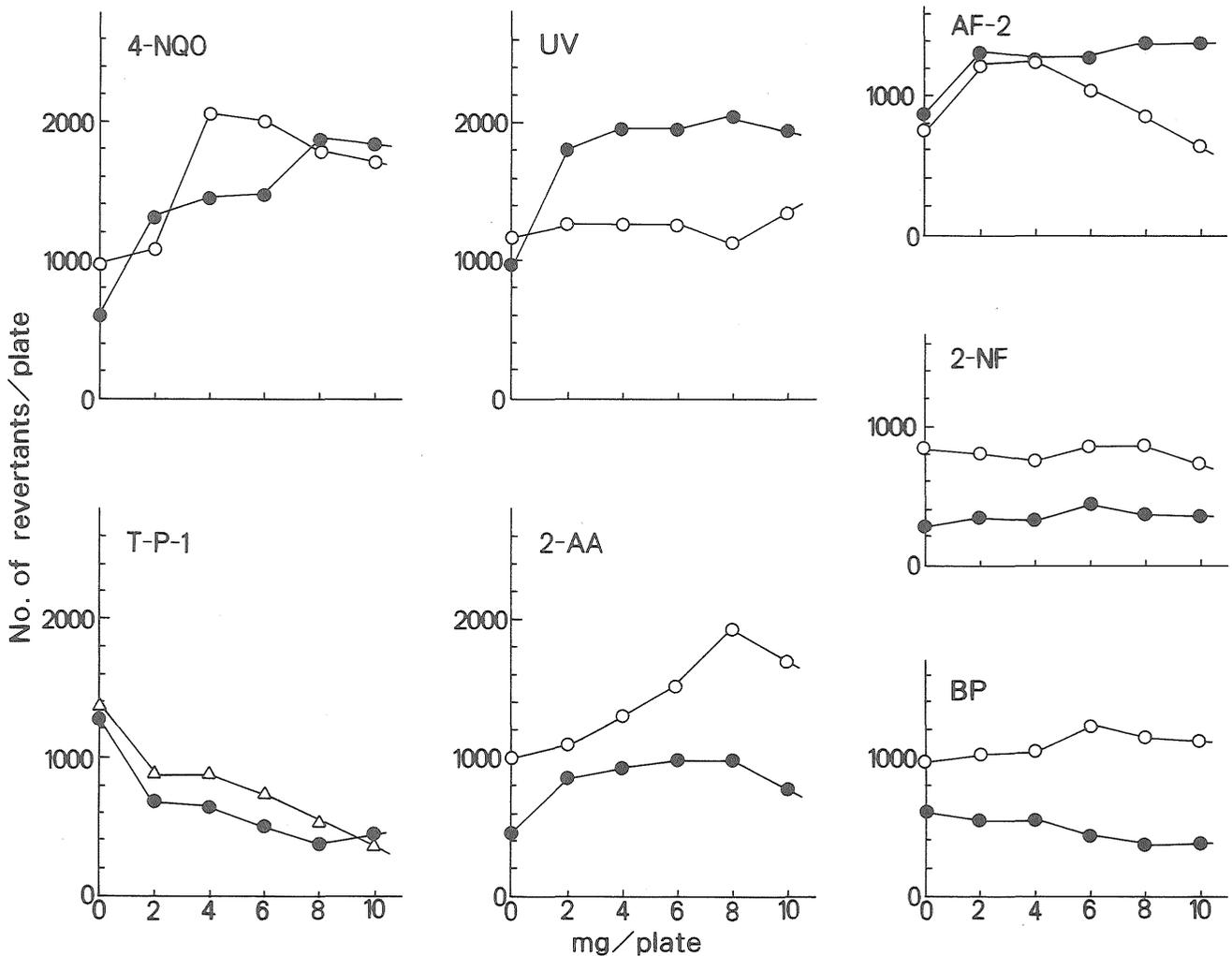


図1. 既知変異原の変異原性に対する六味丸水抽出物の影響.

△: TA98, ○: TA100, ●: TA102. 以下の変異原の濃度はプレート当たりの量. 4-NQO: TA100 0.1 μg , TA102 1 μg . UV: TA100 8erg/mm², TA102 80erg/mm². AF-2: TA100 0.02 μg , TA102 0.05 μg . T-P-1: TA98 0.1 μg , TA102 5 μg . 2-AA: TA100 5 μg , TA102 5 μg . 2-NF: TA100 5 μg , TA102 30 μg . BP: TA100 5 μg , TA102 10 μg .

分間の前培養を行った. これに45℃に保温した軟寒天⁸⁾ 2 mlを加え混合後, 最少グルコース寒天培地⁸⁾に重層した. 37℃で2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した.

各濃度にプレート3枚を用い, 結果は, 平均値で示した. 統計解析は, Kruskal-Wallis 検定¹⁷⁾を行い, 更に Mooreら¹⁸⁾のプログラムにより回帰分析を行った. 両検定において有意な場合変異原性が影響を受けていると判断した.

結果及び考察

六味丸水抽出物の既知変異原に対する影響を見た結果を図1に示した. 六味丸水抽出物は, 高濃度では単独でも弱い変異原性を示す⁹⁾. そこで, 今回の実験では六味丸水抽出物の変異原性を除くために, 変異原性がほとんど発現しない濃度である10mg/プレートまでで行った.

更に, 結果は, 六味丸水抽出物の復帰コロニー数を引いた値で示した.

4-NQO, AF-2及び2-AAのTA100及びTA102において, 六味丸水抽出物を加えたときの復帰コロニー数は, 変異原単独のときよりも増加し, 変異原性が增强されることがわかった. UVでは, TA102において, UV単独の時よりも高い値を示し, 変異原性が增强された. しかし, TA100においては全く変異原性は変化しなかった. 菌株により反応性が異なる特徴が見られた. T-P-1は, 上記変異原とは逆にTA98及びTA102において, 復帰コロニー数は減少した. 生菌数の計数は行っていないが, lawnの観察から菌株に対する致死的作用は起こっていない. したがって, この減少は, 変異原性が抑制されているものと思われる. BPは, TA102でわずかに変異原性が減少したが, TA100ではほとんど変化は無かった.

2-NF は、両株で全く変化は見られなかった。

いくつかの既知変異原に六味丸水抽出物を加えたときに、その変異原性は様々に変動した。変異原による違いに加え、UV のように菌株によっても反応が異なる場合が見いだされた。六味丸水抽出物は、高濃度では弱い変異原性が見られる⁹⁾。今回、変異原性が増加した場合に、その由来が六味丸の変異原性である可能性も考えられるが、かなり大きな増加が見られるところでは、強い変異原性を持つ既知変異原の変異原性が増強されている可能性の方が高いと考えられる。おそらく、六味丸水抽出物に含まれる多くの化合物が、様々な反応に関与し、既知変異原の変異原性を増強したり抑制したりしているであろう。

変異原に対する生薬抽出物の影響については、抑制効果に関するものとして、T-P-1の変異原性を抑制する13種の生薬³⁾、BPの変異原性を抑制する生薬4種類⁴⁾、マイトマイシンCにより誘導されるSOS反応の抑制をする生薬11種類¹⁹⁾とかなりの数の生薬についての報告がある。また、生薬ではないが、UVの変異原性を抑制する25種類の植物²⁰⁾、いろいろな茶によるT-P-1及びBPなどの変異原性抑制²¹⁾の報告も見られる。一方、生薬抽出物の増強効果に関しては、柴胡によるT-P-1、トリプ-P-2及びBPの変異原性の増強⁵⁾、生姜によるAF-2及びニトロソグアニジンの変異原性の増強²²⁾などの報告が見られる。このように多くの生薬には変異原性を変動させる効果があり、抑制あるいは増強の作用がある化合物が含まれていることは明らかである。今回の六味丸のような方剤についての報告は見られなかった。構成生薬6種については、沢瀉がT-P-1の変異原性を抑制³⁾すること、また、地黄はSOS反応を抑制¹⁹⁾することが報告されている。六味丸水抽出物に見られたT-P-1の変異原性の抑制効果は、これらの構成生薬に含まれる成分によって引き起こされたのであろうと考えられる。

4-NQOの変異原性は、チオール及び酸化防止剤によって抑制される²⁾。UVの変異原性をラジカルスカベンジャーが抑制²³⁾することも報告されており、これらの変異原性の発現には、酸化物質または酸化反応が関与しているのではないかとと思われる。一方、われわれは、六味丸水抽出物の変異原性がカタラーゼによって消失する⁹⁾ことから、六味丸水抽出物中には活性酸素が存在することを指摘してきた。今回、4-NQO及びUVの変異原性は六味丸水抽出物を加えることにより増強された。これは、六味丸水抽出物中に存在する活性酸素による影響ではないかと考えている。

六味丸水抽出物は弱い変異原性を示す⁹⁾。この変異原性は、構成生薬の混合によって増強されることも報告¹⁰⁾してきた。今回、いくつかの変異原に対して増加と抑制の効果がみられ、非常に複雑な反応が関わっているようである。更に、方剤として生薬を混合したことにより、単独生薬の作用にはない効果も生じているようにも思われる。今後、これらのさまざまな反応について明らかにしていきたい。

ま と め

サルモネラを用いたAmes試験により既知変異原に対する六味丸水抽出物の影響について検討した。実験にはAmesらが開発した*Salmonella typhimurium* TA98, TA100及びTA102の3菌株を用いた。4-NQO, AF-2及び2-AAのTA100及びTA102において変異原性が増強された。UVでは、TA102において変異原性は増強されたが、TA100においては変化はなかった。T-P-1のTA98及びTA102において変異原性が抑制された。

文 献

- 1) De Flora, S., Rosenkranz, H. S. and Klopman, G. : *Mutagenesis*, **9**, 39-45, 1994.
- 2) Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., *et al.* : *Proc. Japan Acad.*, **53**, 95-98, 1977.
- 3) 渡辺富士雄, 森本 功, 興津知明 : *生薬学雑誌*, **41**, 248-252, 1987.
- 4) Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y., *et al.* : *Mutation Res.*, **174**, 1-4, 1986.
- 5) Niikawa, M., Sakai, Y., Ose, Y., *et al.* : *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2035-2039, 1990.
- 6) McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
- 7) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. : *Mutation Res.*, **31**, 347-364, 1975.
- 8) Maron, D. M. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
- 9) 藤田 博, 佐々木美枝子 : *東京衛研年報*, **43**, 228-230, 1992.
- 10) 藤田 博, 佐々木美枝子 : *東京衛研年報*, **44**, 274-277, 1993.
- 11) 安田一郎, 浜野朋子, 高野伊知郎, 他 : *東京衛研年報*, **42**, 27-32, 1991.
- 12) 藤井孝, 佐々木美枝子, 角千代 : *東京都衛生局学会誌*, **86**, 64-65, 1991.
- 13) 藤井孝, 角千代, 佐々木美枝子, 他 : *東京衛研年報*, **42**, 235-242, 1991.

- 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) Zuoshu, J., Linghua, W. and Zhongfu, C. : *Mutation and the Environment*, Part E, 329-338, 1990.
- 20) Ishii, R., Yoshikawa, K., Minakata, H., *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2587-2591, 1984.
- 21) Yen, G. and Chen, H. : *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 27-32, 1995.
- 22) Nakamura, H. and Yamamoto, T. : *Mutation Res.*, **103**, 119-126, 1982.
- 23) Fujita, S. and Taira, J. : *Free Radical Biol. Med.*, **17**, 273-277, 1994.

ヒト病態モデルマウスによる六味丸添加飼料投与実験(第1報) 白血病好発系マウス(AKR/N)の一般症状および臨床検査結果

坂本義光*, 安藤 弘*, 池田虎雄*, 小縣昭夫*,
久保喜一*, 小嶋昭江*, 高橋 博*, 多田幸恵*,
田山邦昭*, 長澤明道*, 林田志信*, 福森信隆*,
三栗谷久敏*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*, 吉田誠二*,
青木直人*, 佐々木美枝子*

Study on the Effects of Rokumi-gan Using Model Mice for Human Disease (I) Clinical and Blood Examination Data on High Leukemia AKR/N Mice

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, HIROSHI ANDO*, TORAO IKEDA*
AKIO OGATA*, YOSHIKAZU KUBO*, AKIE KOJIMA*
HIROSHI TAKAHASHI*, YUKIE TADA*, KUNIAKI TAYAMA*
AKEMICHI NAGASAWA*, SHINOBU HAYASHIDA*,
NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA*
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, SEIJI YOSHIDA*,
NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

AKR/N mice are model animals of leukemia which are derived from thymic lymphoma. The therapeutic and/or toxic effects of Rokumi-gan, a chinese medicine, were examined. AKR/N mice were fed diet containing 0% (control), 0.4% and 3.6% Rokumi-gan. The 0.4% of Rokumi-gan corresponds to the therapeutical dose for humans. Number of animals were 9 males and 9 females in control group (0%) and 8 of each sex in 0.4% and 3.6% groups. The experiment was completed when half the animals of any experimental group had died and all the mice were sacrificed in this week.

Thirty weeks after the start of the experiment, half the female mice in 0.4% and 3.6% group died. Survivals of other groups at 30th week of the experiment was 8/9 (males in control), 7/8 (males in 0.4%), 5/8 (males in 3.6%) and 7/9 (females in control). Body weight was similar in the experimental and control group during the experimental period. On the peripheral blood smear examination, a high rate of atypical lymphoid cell were noted in male and female mice of 3.6% groups, and increased weight of thymus and spleen of male experimental groups were noted. It seems that Rokumi-gan may have tendency to enhance the growth and extension of lymphoma.

Keywords: 漢方薬 Chinese medicine, 六味丸 rokumi-gan, AKR マウス AKR/N mice, 投与実験 feeding study

緒 言

六味丸は、東京都東洋医学事業において老人性疾患、
泌尿器系疾患に多用されている薬剤の一つとして集中的

にとりあげられ、当所プロジェクト研究でもその安全性
・有効性に関して多方面から検討を行ってきた。このう
ちラットによる投与試験では明らかな害作用は認められ

* 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

ず、また腎障害誘発物質の作用やラット自然発症病変である腎症の発現を軽減するなどの効果が認められた¹⁻³⁾。

今回引き続き六味丸の有効性など生物学的効果を観察する目的でヒト病態モデル動物を用いた六味丸の投与実験を実施した。ヒト病態モデル動物としては白血病誘発マウス (AKR/N) および自己免疫疾患マウス (MRL/lマウス) などが知られているが、ここでは AKR マウスを用いた六味丸がこれらのマウスの特徴的な病変の発現にどのように影響するかを観察、その有効性を検討した。

本報では AKR マウスによる六味丸の添加飼料投与実験における体重、生存率、摂餌摂水量、臓器重量、血液・血清生化学的検査結果について報告する。

実験材料および方法

被験物質：六味丸は熟地黄 8、山薬 4、山茱萸 4、澤瀉 3、茯苓 3、牡丹皮 3 の割合で均一に混合、粉末化した薬剤を用いた (ウチダ和漢薬株式会社 ; Lot No. 900830)。

動物および飼育条件：AKR/N slc マウス (AKRマウス ; 日本エスエルシー(株))、雌雄、4 週齢を購入、1 週間予備飼育後実験に用いた。動物は換気10回/時 (HEPA フィルター経由)、温度24-26℃、湿度50-60%、照明6 : 00-18 : 00 に制御された飼育室内で、飼育した。飼料および水 (滅菌フィルター経由水道水) を自由に摂取させた。雌雄のマウスはチップ敷プラスチックケージ (160×225×110mm) に 1 匹飼育した。

投与方法および期間：六味丸の投与は粉末飼料 (CE-2 ; 日本クレア製) に添加、固形化した飼料の摂取によって行った。飼料中の六味丸濃度は既に報告したラットによる長期投与試験³⁾において用いた濃度と同様で0.4および3.6%とし、対照群には一般飼料 CE-2粉末のみを同様に固形化したものを摂取させた。動物数は対照群は雌雄各9匹、0.4および3.6%群は雌雄 8 匹を用いた。なお0.4%はヒトの常用量180mg/kg/日に相当し、また高用量の3.6%は前実験³⁾において軽度な体重増加抑制の見られた経口投与量3170mg/kgの1/2に相当する量を飼料添加濃度に換算したものである。投与は対照群及び投与群のいずれかの群の半数の動物が死亡する時期まで行った。この間、瀕死および死亡のチェックおよび異常行動の有無、被毛、可視粘膜など一般状態の観察を実験終了時まで毎日行った。また体重、摂餌・摂水量の測定を毎週1回、投与開始後13週間にわたって測定した。死亡例については発見時または冷蔵後速やかに剖検し、瀕死例および実験終了時生存例についてはエーテル麻酔下放血屠殺し以下の検査を実施した。

血液学的検査：実験終了後の解剖時にエーテル麻酔下で採血し、Coulter Model S-Plus IV (Coulter Electric INC) を用いて赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘモグロビン量 (Hgb)、ヘマトクリット値 (Hct)、平均血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、血小板数 (PLT) を測定した。さらに血液塗末標本より白血球について分画を行った。

血清生化学的検査：解剖時に得た血液を3000rpm、10 分間遠心して調製した血清について Automatic Analyzer705 を用いアルブミン (ALB)、アミラーゼ (AMY)、ビリルビン (BIL)、カルシウム (CA)、コレステロール (CHO)、クレアチン (CRE)、グルコース (GLU)、リン脂質 (PL)、総グリセリド (TG)、総タンパク (TP)、尿酸 (UA)、尿素窒素 (UN)、アルカリフォスファターゼ (LP)、コリンエステラーゼ (CHE)、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK)、 γ -グルタミルトランスアミナーゼ (GGT)、グルタミン酸-オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を測定した。

解剖、臓器重量：解剖は途中死亡および終了時屠殺例のすべてについて行ない、脳、心、肝、腎、肺、脾、副腎、精巣、前立腺、子宮、卵巣、腋窩リンパ節について重量および体重比重量を測定した。

推計学的分析：体重、摂餌・摂水、血液、血清生化学的検査および臓器重量の測定値の検定は Bartlett 検定法を用い、分散の均一性について検定し、分散が一樣であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った。また分散が非一樣であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った。

結 果

一般状態：投与開始後30週目に0.4%および3.6%群において雌の半数が死亡し、実験を終了した。実験期間中の死亡例は Table 1 に示すように雄では対照群 2/9 (9 例中 2 例)、0.4%群 1/8、3.6%群 3/8、雌ではそれぞれ 2/9、4/8、4/8 であった。以上の対照群および投与群における死亡例では死亡の 2-3 週間前より活動性の低下、立毛、背を丸めた姿勢等の症状が見られ、体重も顕著に減少した。また頸部の皮下リンパ節の軽度な腫大が見られる例も見られた。Table 1 に示すように死亡発生のみられた最も早い週は雄の3.6%、雌の対照群および3.6%群の投与開始後22週 (27週齢) であった。以上の死亡例の剖検所見では、胸腔内出血や胸腺の顕著な腫大、また腫大した胸腺の胸膜への癒着などが見られ

たが対照群と投与群では大きな差はなかった。生存例では立毛や体重の減少を見る例があったが、投与との関係はなかった。

体重：Table 1 に実験開始時および終了時の平均体重を示した。投与群の生存率および終了時体重は対照群に比べ有意な差はなかった。実験期間中29週目までの体重の体重増加推移は Fig. 1 および 2 に示すようには雌雄の対照群、投与群ともに投与20週(25週齢)頃まで順調な増加を示しその後30週目(35週齢)まで雄はほぼ水平、雌ではやや下降する傾向が見られた。後半死亡例の発生や

Table 1. Survival, Week of Death and Mean Body Weights.

Group ¹⁾	Survival	Week of death	Mean body weights (g)	
			initial(0wk)	final(30wk)
Male				
0% (Control)	7/9 (78) ²⁾	26, 29	27.6±2.4 ³⁾	42.2±7.3
0.4%	7/8 (88)	27	28.2±1.4	44.4±2.0
3.6%	5/8 (63)	23, 26, 30	28.1±1.0	40.1±5.8
Female				
0% (Control)	7/9 (78)	22, 26	22.7±3.1	31.6±3.4
0.4%	4/8 (50)	23, 23, 28, 29	22.9±0.8	31.8±9.2
3.6%	4/8 (50)	22, 28, 29, 29	22.9±1.4	33.8±7.5

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice surviving/initial number in group : numbers in parentheses show percentage. 3) Mean ± SD

それらの動物による体重の減少のため各曲線の変動が大きくなったが雌雄とも対照群と同様な傾向にあった。

摂餌・摂水量：投与後1, 6, 12週目の摂餌摂水量を Table 2 に示した。マウスに1日当たりの摂餌量は各群とも雄で4~6g, 雌で3~5gの範囲で投与期間に伴い増加傾向を示した。また1日当たりの摂水量は雄では6~4ml, 雌で5~4mlの範囲で投与期間にともない減少する傾向であった。いずれも実験期間をとうして雌雄ともに、投与に関連する変動はなかった。

血液学的検査：Table 3 に示すよう白血球数(WBC), 赤血球数(RBC)およびその関連の測定項目では各投与群ともに対照群に比べ有意な差はなかった。また白血球分類で通常のリンパ球に比べやや大形で不整形の核をもつリンパ球様細胞が見られた。本報ではこれを異型リンパ球様細胞(Atypical lymphoid cell: ALC)として分類した。Table 3 に示すように白血球分画のいずれの値も対照群に比べ有意な差は見られなかった。

血清生化学検査：Table 4, 5 に示すように雄では0.4群でBIL, I-BILが, 3.6%群でCREが対照群に比べ有意に低下していた。また雌では変化のあった項目は認められなかった。

器官重量：雌雄の器官重量を Table 6, 7 に示した。雌雄ともに投与と関連した変化を示した臓器はなかった。脾臓, 胸腺では“白血病”の発症と関連して個体差が大きかった。また胸腺では終了時屠殺例のうち雄3.6%群で2例, 雌の対照群2例および3.6%群の1例では、腫

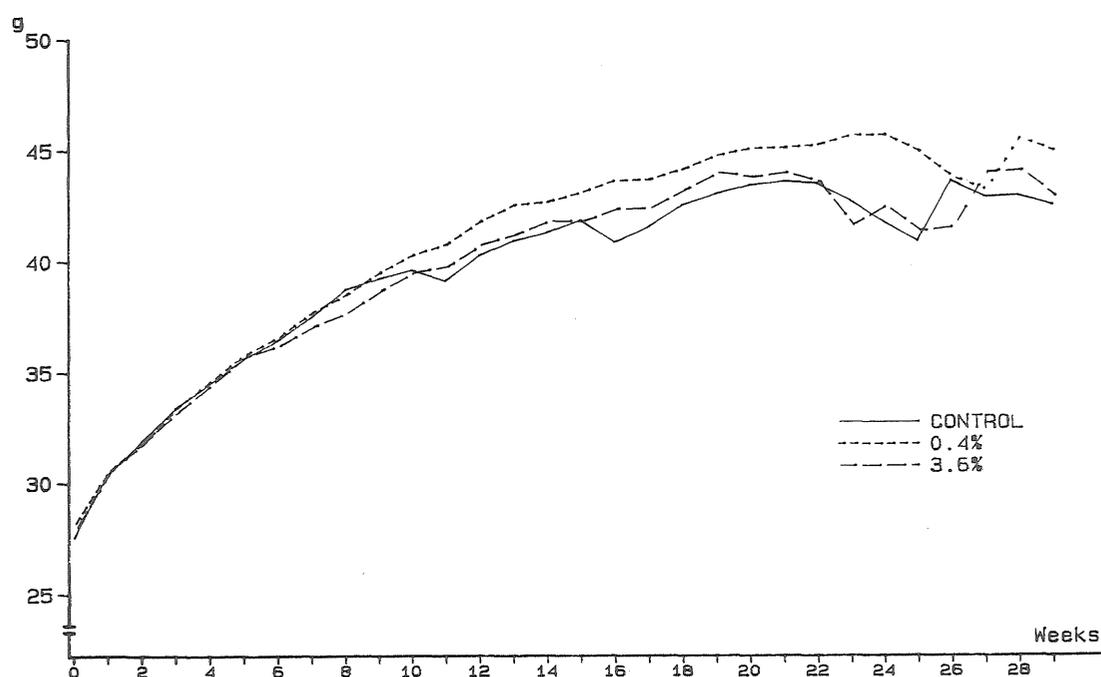


Fig.1. Body weight changes in Male AKR/N Mice

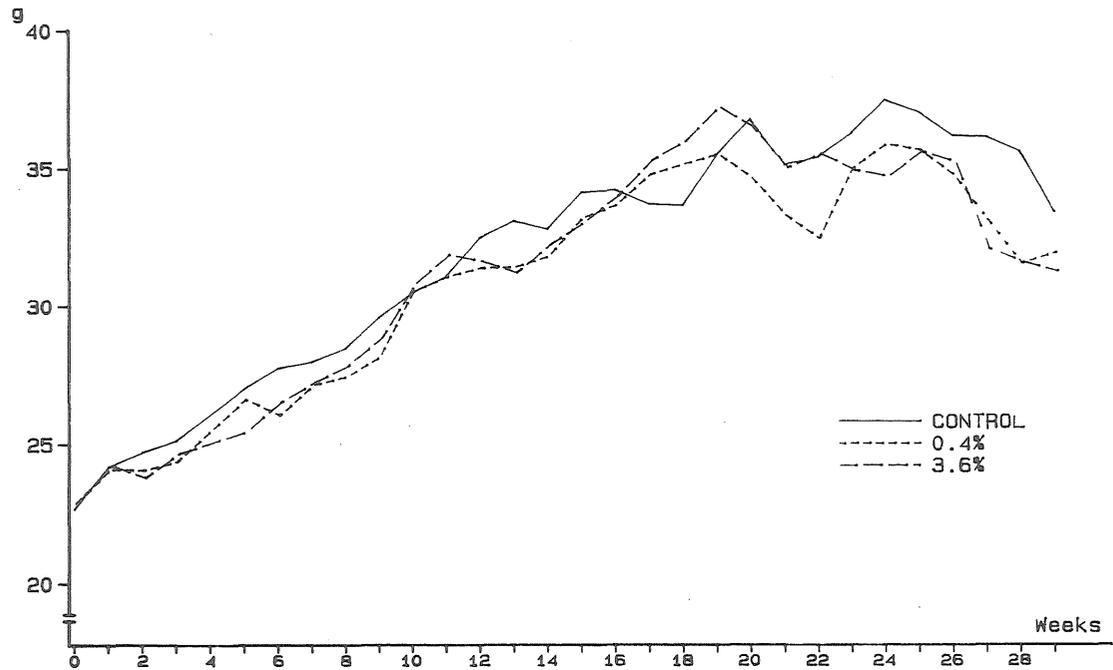


Fig.2. Body weight changes in Female AKR/N Mice

Table 2. Changes Food and Water Intake in AKR Mice.

Group ¹⁾	Food intake (g/mouse/day)			Water intake (g/mouse/day)		
	wk1	wk6	wk12	wk1	wk6	wk12
Male						
0% (Control)	4.8±0.4 (9) ²⁾	4.4±0.4 (9)	5.2±0.6 (9)	5.6±0.6 (9)	4.9±0.4 (9)	4.5±1.3 (9)
0.4%	4.6±0.3 (8)	3.9±0.3 (8)	5.1±0.4 (8)	5.4±0.4 (8)	4.8±0.5 (8)	4.3±0.5 (8)
3.6%	5.0±0.6 (8)	4.7±1.7 (8)	5.8±1.6 (8)	6.3±0.8 (8)	5.5±0.9 (8)	4.9±1.1 (8)
Female						
0% (Control)	4.0±0.5 (9)	4.0±0.5 (9)	5.1±0.4 (8)	4.9±0.6 (9)	5.1±0.7 (9)	4.8±0.7 (8)
0.4%	4.0±0.4 (8)	3.4±0.7 (8)	4.8±0.9 (8)	4.9±0.6 (8)	4.7±0.7 (8)	4.4±0.9 (6)
3.6%	3.6±0.3 (8)	3.7±0.6 (8)	4.6±0.9 (8)	4.8±0.7 (8)	4.5±0.5 (8)	4.1±0.6 (5)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Mean ± SD : numbers of mice examined were shown in parentheses.

大の程度が顕著でさらに一部胸膜への癒着のため胸腺単独での秤量ができなかった。そのためこれら腫大の顕著な例は Table 6, 7 の平均値には加えられていない。

個体別 WBC, ALC, 脾, 胸腺重量: 今回得られた結果のうち“白血病”に関連し個体差の大きかった WBC, ALC および脾, 胸腺重量について個々のマウスの数値を Table 8 に示した。WBC は各群でほとんどが $5 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3$ の範囲にあったがこのうち雌雄の 3.6% 群では WBC が 50×10^3 以上の特に多い例が各 1 例またこれらを含めて ALC 百分比が 70% 以上のものが各 2 例みられた。総体的に WBC の多い例では ALC も高い傾向が見られた。また脾臓, 胸腺について個々の重量をみると, 脾臓

は一般的に同程度の体重のマウスでは 100mg 前後であるが, 今回の AKR では 200mg 以上のものが, 雄の対照群で 1/8, 0.4% 群 2/7, 3.6% 群 2/5, 雌では対照群 4/7, 0.4% 群 1/4, 3.6% 群 2/4 にみられ, 雄では投与群で大きなものが多い傾向にあった。また胸腺重量は未秤量の例 (700mg 以上) を考慮に入れて比較すると脾臓と同様, 雄では投与群で大きなものが多い傾向にあった。白血球数 (WBC) および白血球分画中の ALC の割合との関係を見ると ALC の割合が高いマウスでは脾, 胸腺重量も大きい傾向にあった。

考 察

“白血病”好発系マウス AKR/N を用いた六味丸の添

Table 3. Summary of Hematological Examination.

Group ¹⁾	0% (Control)	0.4%	3.6%
Male			
No. of mice	7 ²⁾	7	5
WBC ($\times 10^3$)	11.3 \pm 5.1 ³⁾	12.8 \pm 6.6	32.8 \pm 45.2
RBC ($\times 10^6$)	8.99 \pm 0.31	8.55 \pm 0.20	8.96 \pm 0.33
Hgb (gm)	14.1 \pm 0.6	13.9 \pm 0.4	13.8 \pm 0.8
Hct (%)	45.1 \pm 1.5	44.2 \pm 1.0	44.6 \pm 2.1
PLT ($\times 10^3$)	901 \pm 254	883 \pm 172	634 \pm 347
MCV (μ^3)	50.2 \pm 0.8	49.9 \pm 1.0	49.8 \pm 0.9
MCH ($\mu \mu g$)	15.7 \pm 0.6	15.7 \pm 0.4	15.4 \pm 0.6
MCHC (%)	31.4 \pm 0.8	31.4 \pm 0.5	30.9 \pm 0.9
Differential of leukocytes (%)			
Lymphocytes	52.6 \pm 14.3	41.3 \pm 17.4	29.7 \pm 21.4
Atypical lymphoid cell	11.1 \pm 6.8	14.9 \pm 12.9	35.5 \pm 38.4
Neutrophils	33.0 \pm 17.2	39.1 \pm 13.0	30.0 \pm 17.1
Eosinophils	2.1 \pm 2.1	3.3 \pm 2.3	3.4 \pm 3.5
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	1.1 \pm 1.2	1.4 \pm 1.1	1.4 \pm 1.1
Female			
No. of mice	7	4	4
WBC ($\times 10^3$)	11.0 \pm 4.2	14.5 \pm 10.2	20.6 \pm 21.7
RBC ($\times 10^6$)	8.64 \pm 1.56	9.34 \pm 0.73	8.50 \pm 1.44
Hgb (gm)	13.3 \pm 2.9	14.6 \pm 1.3	13.3 \pm 2.6
Hct (%)	42.8 \pm 8.3	47.8 \pm 2.2	43.8 \pm 5.9
PLT ($\times 10^3$)	563 \pm 315	649 \pm 219	497 \pm 422
MCV (μ^3)	49.4 \pm 1.9	51.4 \pm 3.6	51.8 \pm 2.6
MCH ($\mu \mu g$)	15.3 \pm 0.8	15.6 \pm 0.5	15.6 \pm 0.7
MCHC (%)	31.0 \pm 0.9	30.5 \pm 2.8	30.2 \pm 1.8
Differential of leukocytes (%)			
Lymphocytes	44.6 \pm 28.1	40.3 \pm 20.1	35.5 \pm 33.8
Atypical lymphoid cell	17.4 \pm 11.9	9.5 \pm 5.6	46.8 \pm 43.5
Neutrophils	33.0 \pm 17.2	39.1 \pm 13.0	30.0 \pm 17.1
Eosinophils	2.1 \pm 1.5	2.3 \pm 1.7	3.3 \pm 1.7
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.7 \pm 0.8	1.3 \pm 1.0	0.3 \pm 0.5

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of rats examined. 3) Mean \pm SD

加飼料による投与実験を行った。AKR/N マウスの“白血病”は生後6ヶ月(26週齢)頃より胸腺に初発する胸腺型リンパ腫として発生，加齢にともない白血病化し，1年でその発生率は80-90%に達し，寿命は雌でほぼ45週，雄では50週であるとされている^{4,5)}。また今回の実験で

Table 4. Summary of Blood Biochemical Examination in Male Mice

Group ¹⁾	0% (Control)	0.4%	3.6%
ALB g/dl	1.7 \pm 0.2(6) ²⁾	1.7 \pm 0.1(7)	1.4 \pm 0.4(4)
ALP IU/l	159 \pm 70(6)	126 \pm 7(7)	219 \pm 158(5)
AMY IU/l	7341 \pm 1209(6)	7603 \pm 361(7)	7346 \pm 528(5)
BIL mg/dl	0.07 \pm 0(6)	0.05 \pm 0(7)*	0.09 \pm 0.02(5)
D-BIL mg/dl	0.07 \pm 0(6)	0.05 \pm 0(7)*	0.06 \pm 0.02(5)
I-BIL mg/dl	0.01 \pm 0.01(6)	0.0 \pm 0.0(7)	0.03 \pm 0.02(5)
Ca mg/dl	9.9 \pm 0.6(6)	9.4 \pm 0.7(7)	9.8 \pm 0.9(5)
CHE Δ pH	1.32 \pm 0.27	1.22 \pm 0.10	1.26 \pm 0.21
CHO mg/dl	80 \pm 17(6)	80 \pm 4(7)	74 \pm 19(5)
F-CHO mg/dl	22 \pm 6(6)	19 \pm 3(7)	17 \pm 4(5)
ECHO mg/dl	58 \pm 11(6)	60 \pm 3(7)	57 \pm 13(5)
CPK IU/l	4896 \pm 2288(6)	3027 \pm 1155(7)	2905 \pm 1410(4)
CRE mg/dl	0.37 \pm 0.07(6)	0.33 \pm 0.05(7)	0.27 \pm 0.02*(5)
GGT IU/l	5.2 \pm 0.5(6)	5.2 \pm 0.2(7)	5.0 \pm 0.4(5)
GIu mg/dl	214 \pm 44(6)	229 \pm 21(7)	192 \pm 52(5)
GOT IU/l	126 \pm 101(6)	128 \pm 129(7)	347 \pm 353(5)
GPT IU/l	36 \pm 16(6)	38 \pm 22(7)	67 \pm 42(5)
O/P	3.26 \pm 0.88(6)	2.95 \pm 1.01(7)	4.38 \pm 2.73(5)
IP mg/dl	7.6 \pm 0.8(6)	7.6 \pm 1.2(7)	7.9 \pm 0.9(5)
LAP GR-U	49 \pm 26(6)	39 \pm 8(7)	43 \pm 17(5)
LDH IU/l	1218 \pm 507(6)	1317 \pm 1162(7)	944 \pm 378(5)
PL mg/dl	196 \pm 52(6)	191 \pm 17(7)	170 \pm 53(5)
TG mg/dl	149 \pm 87(6)	131 \pm 71(7)	87 \pm 62(5)
TP g/dl	5.1 \pm 0.2(6)	5.0 \pm 0.1(7)	4.9 \pm 0.4(4)
UA mg/dl	2.9 \pm 0.4(6)	2.5 \pm 0.5(7)	3.0 \pm 1.1(5)
UN mg/dl	30.7 \pm 6(6)	27.5 \pm 5.7(7)	19.0 \pm 6.6(5)
Na mg/dl	152.4 \pm 1.6(6)	151.6 \pm 2.2(7)	153.3 \pm 1.6(5)
K mEq/l	6.65 \pm 0.82(6)	5.94 \pm 0.47(7)	6.35 \pm 0.89(4)
Cl mEq/l	113.0 \pm 2.9(6)	113.5 \pm 1.5(7)	113.5 \pm 2.9(5)
A/G	0.48 \pm 0.05(6)	0.51 \pm 0.02(7)	0.42 \pm 0.15(4)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Mean \pm SD : Number of mice examined are shown in parentheses.

* Significant difference from control (* : $p < 0.05$)

用いたマウスと同じ生育場のマウスの45%生存年齢は雌で35，雄で40週齢であることが報告されている⁶⁾。今回の実験では投与開始後22週(27週齢時)より死亡するマウスが見られ，このうち0.4%，3.6%投与群の雌では投与29週(34週齢)に半数が死亡した。今回用いたマウスは発生年齢および死亡経過については既に報告⁶⁾されているAKRマウスと同様の性状を有していたものと思われる。

血液学的検査では3.6%投与群の雌雄でWBCおよび異型リンパ様細胞の割合が特に多い例の発現がみられた。

AKRマウスでは胸腺リンパ腫からリンパ腫細胞が放出され，全身性へと進展し，白血病化の過程をとるとさ

Table 5. Blood Biochemical Examination in Female AKR Mice

Group ¹⁾	0% (Control)	0.4%	3.6%
ALB g/dl	1.6±0.1 (6) ²⁾	1.7±0.1 (2)	1.7±0.1 (4)
ALP IU/l	267±207 (7)	114±13 (4)	336±373 (4)
AMY IU/l	7586±1087 (7)	7225±100 (3)	7556±449 (4)
BIL mg/dl	0.09±0.04 (7)	0.07±0.02 (3)	0.13±0.12 (4)
D-BIL mg/dl	0.06±0.03 (7)	0.07±0.02 (3)	0.08±0.03 (4)
I-BIL mg/dl	0.03±0.05 (7)	0.0±0.0 (3)	0.05±0.09 (4)
Ca mg/dl	9.5±0.7 (7)	9.4±0.2 (2)	9.7±0.5 (4)
CHE △pH	1.56±0.34 (6)	1.65±0.22 (2)	1.79±0.20 (4)
CHO mg/dl	65±22 (7)	61± 5 (3)	57±20 (4)
F-CHO mg/dl	17±12 (7)	12± 2 (3)	14± 1 (4)
ECHO mg/dl	48±11 (7)	49± 4 (3)	47±24 (4)
CPK IU/l	2070±1139 (7)	3200±1866 (3)	2893±2114 (4)
CRE mg/dl	0.28±0.03 (7)	0.28±0.0 (2)	0.35±0.07 (4)
GGT IU/l	5.1±0.4 (7)	4.5±1.8 (4)	5.4±0.5 (4)
Glu mg/dl	172±45 (7)	230±17 (3)	164±52 (4)
GOT IU/l	567±689 (7)	258±290 (4)	424±525 (4)
GPT IU/l	56±38 (7)	37±15 (4)	53±45 (4)
O/P	7.21±5.48 (7)	5.91±4.16 (4)	6.19±2.90 (4)
IP mg/dl	6.5±1.0 (7)	7.4±0.9 (2)	7.4±0.3 (4)
LAP GR-U	47±18 (7)	36± 2 (2)	56±29 (4)
LDH IU/l	691±148 (5)	1726± 945 (4)	1585±991 (3)
PL mg/dl	138±20 (7)	183± 9 (3)	134±51 (4)
TG mg/dl	60±31 (7)	60±20 (3)	75±44 (4)
TP g/dl	4.8±0.4 (6)	4.9±0.2 (2)	5.2±0.4 (4)
UA mg/dl	2.3±0.4 (7)	2.7±0.6 (2)	2.8±0.6 (4)
UN mg/dl	20.1±6.8 (7)	18.1±0.8 (2)	23.1±4.2 (4)
Na mg/dl	151.0±3.9 (7)	149.4±0.7 (3)	154.0±6.4 (4)
K mEq/l	5.89±0.55 (7)	6.17±0.51 (3)	6.39±0.23 (4)
Cl mEq/l	114.9±3.5 (7)	113.4±2.6 (3)	115.5±3.1 (4)
A/G	0.50±0.01 (6)	0.52±0.0 (2)	0.50±0.04 (4)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Mean ± SD: Number of mice examined are shown in parentheses.

Table 6. Organ Weight of Male AKR Mice.

Group ¹⁾	No. of mice	Body weight (g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney (R) (mg)	Kidney (L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Testis (R) (mg)	Testis (L) (mg)	Adrenal (R) (mg)	Adrenal (L) (mg)	Thymus (mg)
0% (Control)	7 ²⁾	42.2±7.3 ³⁾	468±12 (1139±212) ⁴⁾	2.19±0.30 (5.24±0.40)	202±32 (483±69)	317±50 (762±135)	311±43 (746±104)	142±196 (393±620)	188±17 (456±78)	61.0±2.9 (148±24)	59.7±4.6 (149±23)	2.3±0.7 (5.6±2.0)	2.6±0.6 (6.2±1.3)	87.2±89 (203±192)
0.4%	7	44.4±2.0	465±13 (1049±40)	2.27±0.17 (5.12±0.50)	209±14 (472±12)	326±26 (733±35)	309±32 (695±50)	156±156 (359±382)	186±19 (421±51)	62.4±4.0 (141±7.4)	51.6±20.2 (117±46)	2.6±0.6 (5.9±1.1)	2.1±0.4 (4.8±1.0)	197±235 (446±523)
3.6%	5	40.1±5.8	474±26 (1203±185)	2.23±0.23 (5.63±0.83)	203±38 (507±91)	322±51 (808±132)	315±58 (791±158)	265±239 (711±683)	222±50 (566±159)	64.8±3.2 (164±26)	61.1±5.6 (156±30)	2.4±0.6 (5.9±1.1)	2.8±1.1 (7.1±2.3)	201±293 ⁵⁾ (439±622)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets. 2) Number of mice examined. 3) Absolute mean weight ± SD. 4) Relative mean weight ± SD. 5) The thymus weights of 3.6% group are shown by the mean weight of three mice and the other two mice's thymus weights were not weighed because of severe enlargement and adhesion to pleura.

れている⁷⁾. 今回観察した異型リンパ様細胞はこの腫瘍細胞と同一のものと考えられ、程度の差はあるものの全てのマウスで認められていることから全例でリンパ腫の白血球化が生じていたと考えられる。さらに白血球分画のうち ALC の高い例が 3.6% 投与群で雌雄に各 2 例みられたことから六味丸が胸腺リンパ腫から白血球化への進展をより強めた可能性も考えられる。臓器重量のうち胸腺、脾臓では顕著に大きなものが各群にみられ、雄では投与群でこの程度がやや強く現れる傾向がみられが、これはリンパ腫の進展の程度を反映したと思われる。

リンパ腫に関係する因子としての胸腺、脾臓以外の臓器では、重量変化や肝、腎の機能に関する血清成分の測定項目にも顕著な変動がないことからラットでの実験結果¹⁾と同様、六味丸による臓器障害作用はなかったものと思われる。

文 献

- 1) 藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯沢勝廣, 他: 東京衛研年報, 42, 235-242, 1991.
- 2) 藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯沢勝廣, 他: 東京衛研年報, 42, 243-251, 1991.
- 3) 藤井 孝, 福森信隆, 多田幸恵, 三栗谷久敏, 他: 和漢医薬学会誌: 10, 149-160, 1993.
- 4) 志佐 端: 現代病理学大系, 飯島宗一, 他編, 9c, 267-369, 1984, 中山書店, 東京.
- 5) J.B. Storer: *J. Gerontol.* 21, 404-409, 1966.
- 6) 実験動物データ集: 46-47, 1992, 日本エスエルシー株式会社.
- 7) 横路謙次郎, 今村展隆, 長尾健治: ヒトの癌と動物モデル, 451-454, 1979, 南江堂, 東京.

Table 7. Organ Weight of Female AKR Mice.

Group ¹⁾	No. of mice	Body weight (g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney (R) (mg)	Kidney (L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Ovary (R) (mg)	Ovary (L) (mg)	Uterus (mg)	Adrenal (R) (mg)	Adrenal (L) (mg)	Thymus (mg)
0% (Control)	7 ²⁾	31.6±3.4 ³⁾	477±12 (1521±147) ⁷⁾	1.86±0.29 (5.99±1.37)	154±16 (476±38)	214±27 (686±129)	205±12 (656±90)	264±217 (867±718)	206±34 (665±177)	11.3±5.3 ⁴⁾ (35.7±18.7)	11.0±4.6 ⁵⁾ (34.3±15.7)	115±23 (367±70)	3.8±0.8 (12.0±2.4)	4.2±1.1 (13.2±2.8)	83.5±18.9 ⁶⁾ (263±74)
0.4%	4	31.8±9.2	474±25 (1596±494)	1.82±0.22 (6.35±3.08)	157±28 (512±88)	214±21 (710±184)	214±23 (707±168)	157±100 (537±365)	193±38 (689±409)	8.1±1.7 (28.8±16.2)	8.1±1.3 (28.1±12.4)	130±53 (403±77)	3.3±0.7 (11.4±5.0)	3.5±0.6 (11.8±4.4)	275±132 (886±366)
3.6%	4	33.8±7.5	476±25 (1457±306)	2.73±1.47 (8.85±6.38)	158±17 (475±61)	213±35 (639±83)	202±41 (600±68)	485±480 (1670±1711)	221±56 (692±275)	10.8±2.2 (33.9±13.6)	8.6±3.1 (27.5±15.0)	97±21 (291±64)	4.2±0.5 (12.6±2.1)	4.9±0.2 (15.0±3.6)	60.3±18.0 ⁸⁾ (199±48)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets. 2) Number of mice examined. 3) Absolute mean weight ± SD. 4,5) The ovary weights of control group are shown by the mean of six mice. 6) The thymus weights of control group are shown by the mean of five mice and the other two mice's thymus weights were not weighed because of severe enlargement and adhesion to pleura. 7) Relative mean weight ± SD. 8) The thymus weights of 3.6% group are shown by the mean of three mice and the other one mouse's thymus weights were not weighed because of severe enlargement and adhesion to pleura.

Table 8. Individual Values of WBC Counts, WBC Differential Count, Spleen and Thymus Weight in Male and Female AKR Mice.

Sex/ Group ¹⁾	Mice number	WBC count ×10 ³	WBC differential counts		Spleen weight mg	Thymus weight mg	
			Lymphocyte	Atypical lymphoid cell			
			%	%			
Male							
0% (Cont.)	1003	4.1	50.0	18.0	585.3	98.4	
	1004	10.8	48.0	14.0	77.8	98.4	
	1005	16.5	25.0	8.0	81.8	19.7	
	1006	14.5	66.0	10.0	76.7	46.4	
	1007	17.8	65.0	21.0	51.8	34.5	
	1008	7.4	51.0	3.0	64.9	275.4	
	1009	8.2	63.0	4.0	53.0	38.2	
	0.4%	1010	14.4	66.0	5.0	59.4	34.3
		1011	7.1	51.0	10.0	65.5	48.3
1012		6.5	42.0	8.0	64.8	38.8	
1014		23.7	19.0	42.0	487.1	362.1	
1015		16.6	52.0	15.0	116.7	41.6	
1016		15.2	19.0	18.0	216.1	652.1	
1017		6.2	40.0	6.0	79.8	207.1	
3.6%	1019	112.9	1.5	83.5	525.1	>700 ²⁾	
	1020	19.4	16.0	71.5	529.9	>700	
	1022	7.2	42.0	9.0	95.2	43.4	
	1023	6.1	56.0	6.0	108.1	21.7	
	1024	18.6	33.0	8.0	68.7	539.0	
Female							
0% (Cont.)	2001	18.5	12.0	32.0	618.0	112.8	
	2003	8.6	66.0	4.0	57.8	65.8	
	2004	12.0	32.0	30.0	466.8	>700	
	2005	14.0	4.0	26.0	259.5	>700	
	2007	10.3	53.0	16.0	299.2	84.4	
	2008	6.4	73.0	6.0	75.6	67.9	
	2009	7.8	68.0	8.0	71.9	86.8	
	0.4%	2010	10.8	50.0	15.0	85.4	362.3
		2011	9.6	44.0	12.0	288.5	400.9
2013		29.6	11.0	2.0	180.2	222.5	
2014		7.8	56.0	9.0	73.8	113.2	
3.6%	2019	52.5	1.0	95.0	670.7	>700	
	2020	8.7	12.0	72.0	1082.1	41.5	
	2021	5.3	65.0	13.0	96.4	62.2	
	2025	15.7	64.0	7.0	100.1	77.3	

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) >700 : Not weighed because of severe enlargement and adhesion to pleura.

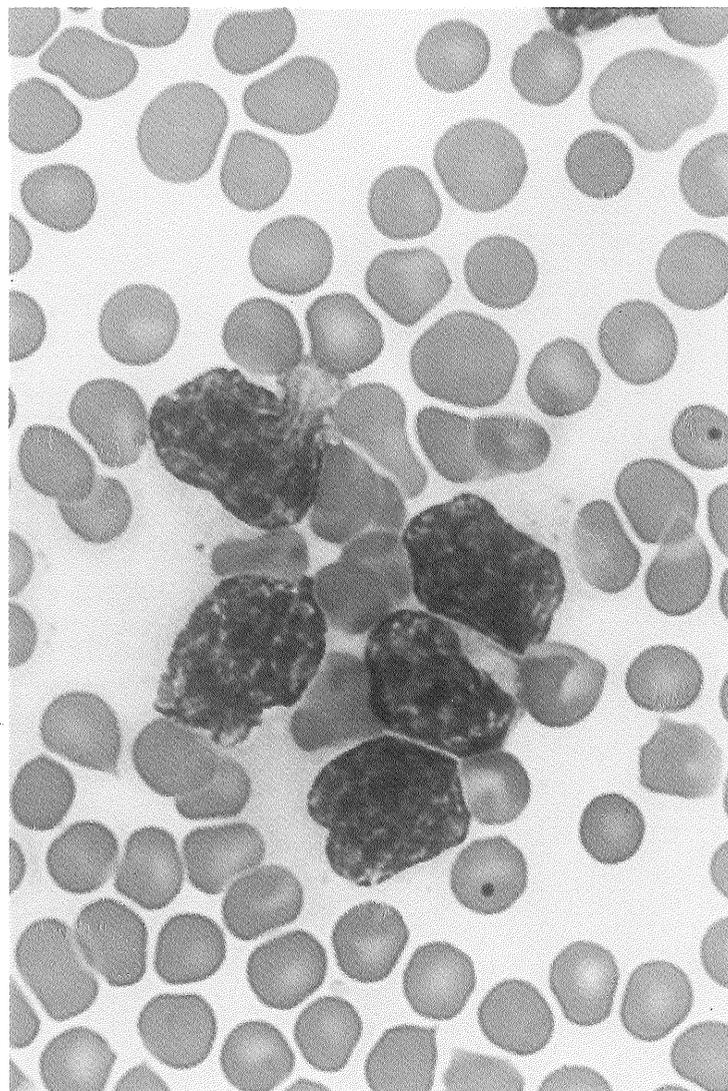


Fig.3. Atypical lymphoid cell in Female AKR/N Mice given Feed containing 3.6% Rokumi-gan. $\times 1000$ May-Grünwald Giemsa Stain.

ヒト病態モデルマウスによる六味丸添加飼料投与実験(第2報) 自己免疫疾患マウス(MRL/lpr)の一般症状および臨床検査結果

坂本 義光*, 安藤 弘*, 池田 虎雄*, 小縣 昭夫*,
久保 喜一*, 小嶋 昭江*, 高橋 博*, 多田 幸恵*,
田山 邦昭*, 長澤 明道*, 林田 志信*, 福森 信隆*,
三栗谷 久敏*, 矢野 範男*, 湯澤 勝廣*, 吉田 誠二*,
青木 直人*, 佐々木 美枝子*

Study on the Effects of Rokumi-gan Using Experimental Model Mice for Human Disease (II) Clinical and Blood Examination Data on Autoimmune MRL/lpr Mice

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, HIROSHI ANDO*, TORAO IKEDA*
AKIO OGATA*, YOSHIKAZU KUBO*, AKIE KOJIMA*,
HIROSHI TAKAHASHI*, YUKIE TADA*, KUNIAKI TAYAMA*
AKEMICHI NAGASAWA*, SHINOBU HAYASHIDA*,
NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA*,
NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*, SEIJI YOSHIDA*,
NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

MRL/l mice spontaneously develop autoimmune disease. The therapeutic and/or toxic effects of Rokumi-gan, a Chinese medicine, on MRL/l mice were examined. MRL/l mice were fed diet containing 0% (control), 0.4% and 3.6% Rokumi-gan for 13 weeks. The 0.4% Rokumi-gan corresponds to the therapeutic dose for humans. Numbers of animals were 9 males and 9 females in control group(0%), 8 of each sex in 0.4% and 3.6% groups. Following completion of the experiment, all male group animals had survived and survival rate of 0(control), 0.4 and 3.6% group were 8/9, 6/8, 5/8 respectively in the female. Hematological examination and organ weight data revealed no significant difference between Rokumi-gan treated and control group.

Keywords: 漢方薬 Chinese medicine, MRLマウス MRL mice, 13週間投与試験 13 week feeding test

緒 言

前報¹⁾にひきつづき六味丸の有効性など生物学的効果を検討する目的として、ヒト病態モデルの一つである自己免疫疾患マウス(MRL/lpr; MRLマウス)を用いた六味丸添加飼料による13週間投与実験を行い、六味丸がMRLマウスに特徴的な病変の発現にどのように影響するかを観察し、その有効性を検討した。本報では得られた結果のうち体重、生存率、血液・血清生化学検査値、臓器重量について報告する。

実験材料および方法

被験物質: 前報¹⁾と同様に六味丸は熟地黄8, 山薬4, 山茱萸4, 澤瀉3, 茯苓3, 牡丹皮3の割合で均一に混合, 粉末化した薬剤を用いた(ウチダ和漢薬株式会社; Lot No.900830)。

動物および飼育条件: MRL/M_{lpr} lpr/lpr マウス(MRLマウス), 4週齢, 雌雄を日本エスエルシー(株)より購入, 1週間予備飼育後実験に用いた。動物の飼育条件は前報¹⁾と同様である。

*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

投与方法および期間：前報¹⁾と同様に六味丸を0.4, 3.6%の濃度で粉末飼料(CE-2; 日本クレア製)に添加固形化したものを各々雌雄8匹に13週間投与した。なお対照群として一般飼料CE-2のみを同様に固形化したものを雌雄9匹に投与した。一般状態の観察, 体重, 摂餌・摂水量の測定および血液・血清学的検査, 統計学的評価は前報¹⁾と同様である。

結 果

一般状態：対照群および投与群で腋窩, 鼠径, 顎下部の皮膚が小豆大に膨隆, 触診により皮下結節の発現が認められた。これらの変化は投与濃度に関係なく雌では投与開始後7週目より, 雄では8週目より見られ, 雌雄とも8および9週目にはほぼ全例に認められ, 実験期間にともない大きくなった。また皮下結節の腫大の程度は外観的に, 雄にくらべ雌で強かった。

雄では各群で全例が終了時まで生存したが, 雌では途中死亡が対照群で1例(投与開始後12週目), 0.4%投与群群2例(7, 11週目), 3.6%投与群3例(9, 9, 12週目)で, 投与に関連して多い傾向にあった(Table 1)。途中死亡例では剖検時いずれも全身のリンパ節が小豆~柿の種大に腫大し, そのうち腸間膜リンパ節の腫大は特に顕著であった。また多くは出血性の胸水や腹水の貯留が見られた。3.6%投与群の1例を除いて胸腺, 脾臓の腫大は軽度であった。

体重：実験開始時および終了時生存例の平均体重(Table 1)および実験期間中の増加推移(Fig.1, 2)は投

与群では雌雄とも順調な推移を示し対照群と比べていずれも顕著な差は見られなかった。しかしながら雌では後半死亡例が生じ各群で変動が大きかった。

摂餌・摂水量：投与後1, 6, 12週目の摂餌摂水量をTable 2に示した。摂餌量は実験期間をとうして雌雄ともにほぼ5g前後で, 濃度との関連や投与期間にともなう変化は認められなかった。摂水量は雌雄ともに投与期間にともなって減少する傾向を示したが, 投与との関連をうかがわせる変化はなかった。

Table 1. Survival and Mean Body Weights.

Group ¹⁾	Survival	Mean body weights (g)	
		initial	final
Male			
0% (Control)	9/9(100) ²⁾	34.6±3.4 ³⁾	50.2±4.4
0.4%	8/8(100)	34.5±0.9	51.4±4.0
3.6%	8/8(100)	34.3±1.2	50.9±3.7
Female			
0% (Control)	8/9(89)	28.0±2.2	44.2±3.0
0.4%	6/8(75)	28.0±1.1	43.7±8.2
3.6%	5/8(72)	28.0±2.2	45.1±1.7

1) Mice in each group were fed 0(control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice surviving/initial number in group : the numbers in parentheses show percentage.

3) Mean ± SD

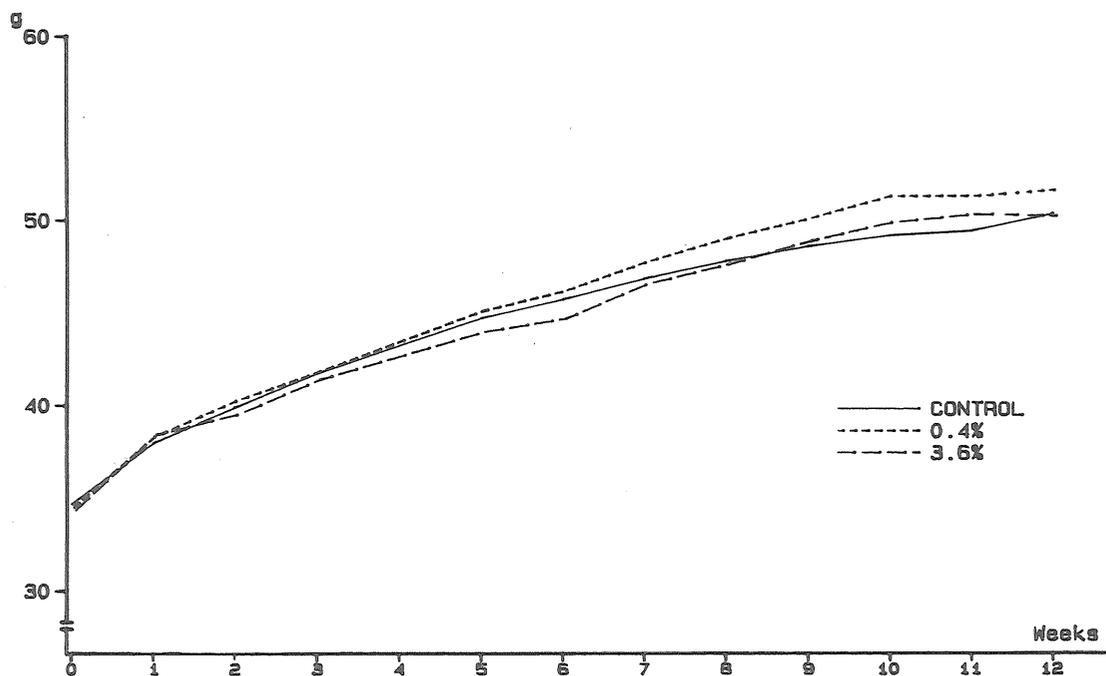


Fig. 1. Body weight changes in Male MRL/1 Mice

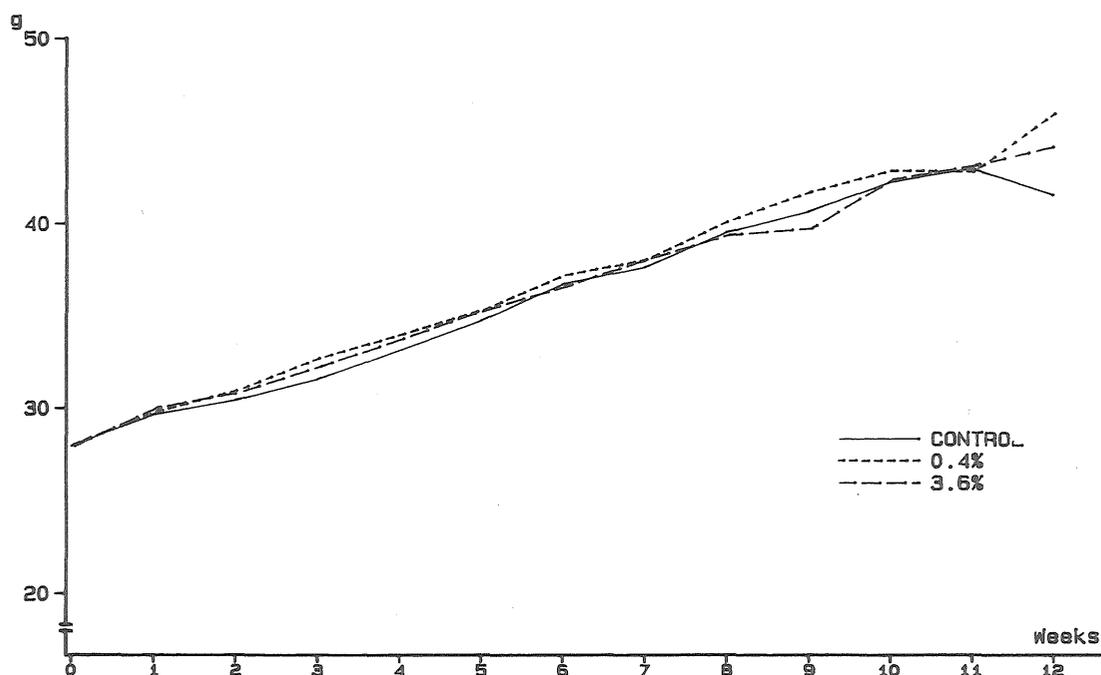


Fig. 2. Body weight changes in Female MRL/l Mice

Table 2. Food and Water Intake

Group ¹⁾	Food intake (g/mouse/day)			Water intake (g/mouse/day)		
	wk1	wk6	wk12	wk1	wk6	wk12
Male						
0% (Control)	5.4±0.3 (9) ²⁾	5.3±0.4 (9)	5.1±0.3 (9)	8.3±0.8 (9)	6.1±0.8 (9)	4.7±0.3 (9)
0.4%	5.5±0.4 (8)	5.3±0.4 (8)	5.6±1.3 (8)	8.3±1.3 (8)	6.4±1.1 (8)	4.3±1.0 (8)
3.6%	5.2±0.3 (8)	5.2±0.3 (8)	5.3±0.5 (8)	7.9±1.5 (8)	6.3±0.9 (8)	4.3±1.8 (8)
Female						
0% (Control)	5.1±1.5 (9)	5.0±0.8 (9)	4.8±1.2 (8)	8.2±1.3 (9)	6.7±1.0 (9)	5.8±1.2 (8)
0.4%	4.9±0.4 (8)	5.5±1.0 (8)	5.8±3.5 (6)	7.8±0.9 (8)	6.6±1.2 (8)	5.5±1.4 (6)
3.6%	4.8±0.4 (8)	5.9±1.8 (8)	5.5±0.6 (5)	7.5±1.7 (8)	5.8±1.3 (8)	5.9±1.3 (5)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Mean ± SD : numbers of mice examined were shown in parentheses.

血液学的検査：Table 3 に示すように投与との関連のある変化はなかった。0.4%投与群では雌雄ともWBCが大きな値を示したが個体差が大きく有意な差はなかった。その他の測定項目では各投与群とも対照群に比べ顕著な差はなかった。白血球分画では通常のリンパ球に比べ大形で不整形の核をもつリンパ球が見られた。本報ではこれを異型リンパ球 (Atypical lymphoid cell ; ALC) と分類した。3.6%群では雌においてALCの百分比が対照群に比べ有意に高かった。そのほか白血球分画において雌雄ともに変化のあった項目はなかった。

血清生化学検査：Table 4, 5 に示すように0.4群の雄ではでCIが、雌ではLAP, TPが対照群に比べ有意に

高かったが、いずれも濃度との相関は認められなかった。

器官重量：雌雄の器官重量をTable 6, 7に示した。雌の胸腺, 脾臓, 副腎は対照群, 投与群とも雌のほうが雄に比べて大きく、特に胸腺重量は雄のほぼ2倍であった。投与に関連した変化を示した臓器はなかった。

個体別WBC, ALC, 脾, 胸腺重量：個体差の大きかったWBC, 脾, 胸腺重量および推計学的に有意差の見られたALCについて個々のマウスで比較した。Table 8, 9 に示すようにWBCは雌雄のほとんどのマウスで 10×10^3 以上の値を示した。また雌雄の0.4%群では 100×10^3 以上を示すものが1例づつみられたが、WBCの多いマウスの発現例数と投与との関連はなかった。

Table 3. Summary of Hematological Examination.

Group ¹⁾	0% (Control)	0.4%	3.6%
Male			
No. of mice ²⁾	8	8	8
WBC($\times 10^3$)	25.0 \pm 14.8 ³⁾	42.2 \pm 74.8	23.6 \pm 7.8
RBC($\times 10^6$)	9.81 \pm 0.39	10.15 \pm 0.58	9.84 \pm 0.51
Hgb(gm)	14.8 \pm 0.6	15.2 \pm 0.9	15.3 \pm 0.9
Hct(%)	47.1 \pm 2.0	48.2 \pm 4.2	46.9 \pm 2.3
PLT($\times 10^3$)	736 \pm 254	696 \pm 323	612 \pm 299
MCV(μ^3)	48.0 \pm 0.1	47.4 \pm 1.6	47.7 \pm 0.9
MCH($\mu \mu g$)	15.1 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6	15.5 \pm 0.6
MCHC(%)	31.5 \pm 0.9	31.6 \pm 1.8	32.5 \pm 0.8
Differential of leukocytes(%)			
Lymphocytes	75.0 \pm 10.6	74.1 \pm 15.6	78.5 \pm 11.6
Atypical lymphoid cell	5.6 \pm 3.8	5.9 \pm 4.3	4.9 \pm 5.6
Neutrophils	16.5 \pm 8.0	17.4 \pm 9.9	14.6 \pm 7.5
Eosinophils	1.1 \pm 1.1	1.1 \pm 1.4	0.9 \pm 1.1
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	1.8 \pm 1.3	1.5 \pm 1.3	1.1 \pm 0.8
Female			
No. of mice	8	6	5
WBC($\times 10^3$)	24.0 \pm 20.3	47.4 \pm 36.9	25.6 \pm 12.7
RBC($\times 10^6$)	8.64 \pm 1.84	9.86 \pm 0.48	9.08 \pm 0.99
Hgb(gm)	13.5 \pm 3.0	15.0 \pm 0.4	14.5 \pm 1.1
Hct(%)	41.5 \pm 8.9	47.4 \pm 1.8	45.0 \pm 3.0
PLT($\times 10^3$)	616 \pm 313	535 \pm 241	468 \pm 346
MCV(μ^3)	48.1 \pm 0.6	48.1 \pm 1.3	49.8 \pm 3.5
MCH($\mu \mu g$)	15.7 \pm 0.7	15.2 \pm 0.5	16.0 \pm 1.1
MCHC(%)	32.2 \pm 1.2	31.7 \pm 0.5	32.2 \pm 0.3
Differential of leukocytes(%)			
Lymphocytes	89.8 \pm 6.4	90.8 \pm 2.9	88.8 \pm 3.4
Atypical lymphoid cell	0.6 \pm 1.2	1.7 \pm 1.6	3.4 \pm 1.8*
Neutrophils	9.0 \pm 6.2	6.8 \pm 3.4	6.8 \pm 3.0
Eosinophils	0.4 \pm 0.7	0.5 \pm 0.6	0.6 \pm 0.6
Basophils	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Monocytes	0.3 \pm 0.5	0.2 \pm 0.4	0.4 \pm 0.6

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice examined. 3) Mean \pm SD

* significant difference from the control(0%) ($p < 0.05$)

ALCの百分比は雄では投与に関係なくほぼ全例が1~14%のいずれかの値を示した。雌では0~5%と雄に比べ低い割合で、対照群で0%すなわちALCが認められなかった例が多かったのに対し3.6%群では全例に認められた。雌雄の各群でWBCが多い例でALCが高いという関係はなかった。また脾重量は1000mg以上の大きなもの

のが雌雄の各群で1, 2例見られた。胸腺重量は雄ではいずれも50mg前後と比較的揃っていたが、雌では100mg以上の大きなものが各群に数例みられた。白血球数との関係を見ると雌雄とも脾重量の大きな例ではWBCも多い傾向にあったが、雌の胸腺重量の大きな例では必ずしもWBCの多い例と一致しなかった。

考 察

自己免疫疾患マウス(MRLマウス)を用いた六味丸の添加飼料による13週間摂取実験を行った。MRLマウスでは異常リンパ球の増殖にともなう末梢リンパ節や脾臓の肥大、さらに血清中のリウマチ因子、抗核抗体の増加、それらに関連した糸球体腎炎や関節炎などが自然発症する。以上の症状や病変はいずれも8週齢前後より発現し、また平均寿命は雄22週齢、雌17週齢で雌の方が雄より寿命が短いことが知られている²⁻⁵⁾。今回用いたMRLマウスの症状や病変に関係する血液、血清成分の値を他の系統のマウス^{6,7)}と比較すると雌雄の各群で白血球数は平均値では 20×10^3 以上を示し、またA/G比は低下し、UNが高い値を示した。これらは各々リンパ増殖、グロブリン濃度の増加、腎機能の低下を反映していることが示唆される。本実験におけるマウスの週齢は18週齢に相当しており、ここに示したMRLマウスに見られる症状は軽度~中等度に発現していると考えられた。

今回の実験では途中死亡が雌だけにみられた。MRLマウスの死亡は免疫複合体の沈着による糸球体腎炎によるとされている⁶⁾。免疫機能異常の結果生じる病変の程度も雌で強く現れているものと考えられた。

血液学的検査における白血球分画で3.6%投与群の雌では異型リンパ様細胞の百分比が高かった。現在までMRLマウスにおいて増殖するリンパ球について、腫瘍の性質すなわち悪性リンパ腫としての性状は証明されていない⁷⁾。また雌における百分比より高い値を示す例が雄でも散見されることから、3.6%投与群の雌で認められた結果は増殖の顕著な状態で観察される範囲内での変化であって投与との関連はないものと思われる。

臓器重量のうち脾臓は雌雄ともに大きく特に雌で増加の割合が大きかった。胸腺はマウスでは雄に比べ雌でやや大きい臓器である⁶⁾。胸腺重量について体重が同程度その他系統のマウスと比較すると、今回のMRLマウスの雄は特に大きいとはいえないが雌ではより増加していた。これらの臓器重量はリンパ増殖の程度を反映しており、雌ではその程度が強かったものと思われるが、今回の成績からはリンパ増殖の発現に対する六味丸の直接的な影響は明かではなかった。

Table 4. Summary of Blood Biochemical Examination in Male Mice

Group ¹⁾	No. of mice	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY IU/l	BIL mg/dl	D-BIL mg/dl	Ca mg/dl	CHE ΔpH	CHO mg/dl	F-CHO mg/dl	CPK IU/l	CRE mg/dl	GGT IU/l	GLU mg/dl	GOT IU/l
Control	9 ²⁾	1.7±0.1 ³⁾	161±38	8927±1739	0.08±0.01	0.07±0.01	10.0±0.4	1.93±0.30	146±37	38±11	1886±1068	0.34±0.03	5.6±0.6	188±23	110±30
0.4%	8	1.6±0.1	148±30	8902±2448	0.08±0.01	0.07±0.01	9.6±0.5	2.02±0.70	196±151	55±51	1528±965	0.34±0.04	5.2±1.1	178±27	146±110
3.6%	8	1.6±0.1	155±25	9567±2678	0.08±0.01	0.08±0.01	9.5±0.4	1.98±0.48	189±91	50±29	1767±942	0.32±0.03	5.5±0.8	191±26	124±53

	No. of mice	GPT IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	A/G	O/P
Control	9	36±6	6.6±0.9	67±8	901±103	274±47	104±42	6.9±0.8	2.8±0.6	42.5±13.6	148.4±2.7	7.48±0.48	110.1±1.5	0.32±0.05	3.18±0.87
0.4%	8	34±17	6.9±0.4	69±21	836±277	335±187	133±139	6.5±0.6	3.1±0.9	39.4±7.1	150.6±2.0	7.19±0.60	112.3±2.1*	0.33±0.03	4.14±1.32
3.6%	8	39±10	7.1±0.8	60±7	887±100	358±134	95±65	6.2±0.4	3.2±0.6	39.4±10.4	149.1±1.9	7.80±0.99	111.4±1.4	0.34±0.02	3.30±1.18

1) Mice in each group were fed 0(control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice examined

3) Mean ± SD

* Significant difference from the control(0%) : (p<0.05)

Table 5. Summary of Blood Biochemical Examination in Female Mice

Group ¹⁾	No. of mice	ALB g/dl	ALP IU/l	AMY IU/l	BIL mg/dl	D-BIL mg/dl	Ca mg/dl	CHE ΔpH	CHO mg/dl	F-CHO mg/dl	CPK IU/l	CRE mg/dl	GGT IU/l	GLU mg/dl	GOT IU/l
Control	7 ²⁾	1.5±0.1 ³⁾	264±49	9326±1404	0.07±0.02	0.06±0.02	10.1±0.7	2.51±0.54	184±91	47±30	1802±1089	0.33±0.05	5.4±0.6	163±21	119±41
0.4%	5	1.5±0.2	234±25	8724±1537	0.09±0.05	0.07±0.03	10.2±0.4	2.44±0.31	108±32	28±6	1347±567	0.34±0.06	4.8±0.3	141±24	261±168
3.6%	5	1.6±0.1	283±55	10132±1828	0.07±0.01	0.06±0.01	10.1±0.3	2.64±0.26	140±28	32±8	1726±1643	0.37±0.07	5.4±0.6	164±15	117±44

	No. of mice	GPT IU/l	IP mg/dl	LAP GR-U	LDH IU/l	PL mg/dl	TG mg/dl	TP g/dl	UA mg/dl	UN mg/dl	Na mEq/l	K mEq/l	Cl mEq/l	A/G	O/P
Control	7	31±10	6.9±1.0	58±11	807±140	293±134	102±38	5.9±0.6	2.7±0.6	38.3±5.3	149.0±2.0	7.17±0.68	113.0±1.3	0.34±0.03	3.95±1.02
0.4%	5	43±18	7.3±0.7	80±9*	958±288	195±53	67±35	6.7±0.9*	4.0±0.9	38.7±15.5	151.3±1.6	6.96±0.84	112.9±1.2	0.30±0.07	6.06±2.51
3.6%	5	30±6	6.4±0.6	62±16	934±255	251±50	66±20	6.3±0.1	3.6±0.9	42.9±21.9	150.8±1.4	6.78±0.41	113.9±2.7	0.34±0.03	3.99±1.28

1) Mice in each group were fed 0(control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice examined

3) Mean ± SD

* Significant difference from the control(0%) : (p<0.05)

Table 6. Organ Weight of Male MRL/l Mice.

Group ¹⁾	No. of mice	Body weight(g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney (R) (mg)	Kidney (L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Testis (R) (mg)	Testis (L) (mg)	Adrenal (R) (mg)	Adrenal (L) (mg)	Thymus (mg)
0% (Control)	9 ²⁾	50.2±4.4 ³⁾	525±14 (1052±83) ⁴⁾	2.70±0.31 (5.37±0.27)	203±14 (406±25)	427±31 (857±95)	421±33 (842±83)	621±437 (1200±769)	239±24 (477±32)	95.9±6.6 (192±20)	96.2±6.5 (192±15)	4.4±1.4 (8.8±2.8)	3.9±1.0 (7.9±2.0)	41.7±8.9 (83.2±15.7)
0.4%	8	51.4±4.0	520±17 (1017±76)	2.80±0.32 (5.46±0.59)	202±22 (394±33)	426±69 (829±119)	436±72 (849±130)	880±762 (1719±1531)	243±19 (474±36)	92.8±8.6 (182±22)	93.4±8.0 (183±21)	5.2±1.4 (10.3±3.1)	4.4±0.8 (8.7±1.8)	40.8±7.0 (79.4±11.5)
3.6%	8	50.9±3.7	519±16 (1024±73)	2.58±0.21 (5.07±0.34)	200±15 (395±33)	394±41 (778±102)	393±47 (778±134)	661±595 (1307±1212)	238±18 (468±34)	97.0±6.2 (191±20)	96.8±5.4 (191±19)	3.8±0.7 (7.5±1.4)	4.1±1.6 (8.2±3.4)	45.4±13.1 (88.3±21.1)

1) Mice in each group were fed 0(control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice examined 3) Absolute mean weight ± SD 4) Relative mean weight ± SD

Table 7. Organ Weight of Female MRL/1 Mice.

Group ¹⁾	No. of mice	Body weight (g)	Brain (mg)	Liver (g)	Heart (mg)	Kidney (R) (mg)	Kidney (L) (mg)	Spleen (mg)	Lung (mg)	Ovary (R) (mg)	Ovary (L) (mg)	Uterus (mg)	Adrenal (R) (mg)	Adrenal (L) (mg)	Thymus (mg)
0% (Control)	8 ²⁾	44.2±3.0 ³⁾	524±15 (1190±78) ⁴⁾	2.50±0.27 (5.67±0.55)	191±26 (435±72)	311±34 (707±86)	303±42 (687±95)	801±506 (1775±1030)	223±18 (506±44)	11.7±6.4 (26.4±13.4)	10.1±5.3 (22.9±11.5)	185±83 (421±188)	6.7±0.7 (15.2±1.7)	7.5±1.6 (17.2±4.3)	76.2±31.4 (171±66)
0.4%	6	43.7±8.2	511±11 (1210±262)	2.31±0.69 (5.20±0.84)	176±15 (417±94)	313±46 (723±47)	323±47 (746±50)	1244±627 (2721±1258)	244±33 (577±145)	11.3±4.1 (28.0±17.3)	10.7±2.8 (25.3±9.0)	133±46 (304±81)	6.8±1.9 (15.3±3.3)	6.8±1.4 (16.1±3.0)	88.8±98.3 (189±196)
3.6%	5	45.1±1.7	516±15 (1145±54)	2.64±0.21 (5.86±0.44)	187±3.5 (415±11)	318±36 (705±77)	328±31 (727±73)	888±613 (1945±1292)	219±10 (486±10)	12.7±2.8 (28.3±6.6)	13.3±1.5 (29.6±4.1)	171±27 (378±55)	7.5±1.5 (15.5±2.9)	8.1±1.1 (17.8±2.0)	89.3±19.2 (199±48)

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

2) Number of mice examined 3) Absolute mean weight ± SD 4) Relative mean weight ± SD

Table 8. Individual Values of WBC Counts, WBC Differential Count, Spleen and Thymus Weight in Male MRL/1 Mice.

Group ¹⁾	Mice number	WBC count ×10 ³	WBC differential counts		Spleen weight mg	Thymus weight mg
			Lymphocyte %	Atypical lymphoid cell %		
Male						
0% (Cont.)	3001	19.4	72.0	1.0	437.9	47.4
	3002	—	—	—	125.4	44.8
	3003	49.5	85.0	5.0	1140.2	51.5
	3004	41.2	85.0	4.0	1477.9	40.8
	3005	24.6	72.0	11.0	811.7	47.9
	3006	8.4	66.0	10.0	373.9	23.1
	3007	10.0	66.0	5.0	420.6	46.9
	3008	15.5	63.0	8.0	335.7	39.6
	3009	31.5	91.0	1.0	464.8	33.1
0.4%	3010	226.2	94.0	3.0	2547.3	32.4
	3011	16.3	96.0	0.0	632.0	37.9
	3012	20.9	58.0	11.0	560.1	44.4
	3013	8.1	57.0	12.0	365.7	33.1
	3014	15.7	69.0	5.0	434.5	40.3
	3015	33.0	84.0	3.0	428.4	47.6
	3016	8.8	73.0	4.0	1487.0	38.3
	3017	8.4	62.0	9.0	585.7	52.7
3.6%	3019	23.6	88.0	3.0	347.5	45.9
	3020	37.1	81.0	1.0	2099.9	44.1
	3021	14.9	80.0	4.0	295.1	50.8
	3022	22.0	76.0	13.0	411.5	20.3
	3023	16.2	74.0	0.0	352.4	36.9
	3024	29.0	82.0	4.0	548.6	52.6
	3025	16.7	54.0	14.0	585.6	65.8
	3026	29.4	93.0	0.0	646.2	47.1

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

Table 9. Individual Values of WBC Counts, WBC Differential Count, Spleen and Thymus Weight in Female MRL/l Mice.

Group ¹⁾	Mice number	WBC count ×10 ³	WBC differential counts		Spleen weight mg	Thymus weight mg
			Lymphocyte	Atypical lymphoid cell		
			%	%		
Male						
0% (Cont.)	4001	23.1	87.0	2.0	535.0	62.0
	4002	12.5	95.0	0.0	662.4	103.7
	4003	9.4	93.0	0.0	734.0	112.7
	4004	23.2	93.0	0.0	1293.6	101.7
	4005	14.9	86.0	0.0	700.5	82.1
	4007	72.3	97.0	0.0	1788.2	68.5
	4008	24.5	77.0	0.0	166.2	15.2
	4009	12.4	90.0	3.0	530.0	63.5
0.4%	4010	24.6	90.0	4.0	968.3	62.1
	4011	29.8	92.0	0.0	1739.1	75.1
	4012	77.2	94.0	2.0	1963.9	284.1
	4013	25.0	86.0	1.0	1318.8	53.8
	4015	108.9	93.0	3.0	1291.7	48.8
	4016	18.9	90.0	0.0	186.3	8.8
3.6%	4019	36.1	91.0	1.0	1960.8	77.1
	4021	12.6	93.0	5.0	790.7	74.8
	4024	41.6	89.0	2.0	669.8	106.9
	4025	22.3	85.0	4.0	565.0	106.9
	4026	15.6	86.0	5.0	453.5	74.2

1) Mice in each group were fed 0 (control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.

藤井らは六味丸がラットの自然発生病変である慢性腎障害の発生を軽減することを報告した⁸⁾。MRLマウスでは7週齢頃より免疫複合体の沈着により糸球体腎炎を発現が始まることが知られている⁴⁾。こうした観点から今回の実験では免疫疾患としての腎炎の発生に対する六味丸の影響に注目した。しかしながら今回得えられた結果のうち腎機能の指標としてのUNやUAの値には性差や投与との関連はなく、腎炎発現への影響はないと考えられるが、引き続き組織学的検討によつて明らかにしたい。

文 献

- 坂本義光, 安藤 弘, 池田虎雄, 小縣昭夫, 他: 東京衛研年報, 46, 1995.
- B.S.Andrews, R.A.Eisenberg, A.N.Theofilopoulos, S.Izumi, et. al.: *J. Exp. Med.*, 148, 1198-1215, 1978.
- L.Hang, A.N.Theofilopoulos and F.J.Dixon: *J. Exp. Med.* 155, 1690-1701, 1982.
- G. J. Kolaja and P. E. Fast: *Vet. Pathol.*, 19, 663-668, 1982.
- 安部千之: *Exp. Anim.*, 30, 161-172, 1981.
- 実験動物データ集: 17-21, 1992, 日本エスエルシー株式会社.
- 谷本義文: 実験動物の生化学的特性データ, 田嶋嘉雄, 監修, ソフトサイエンス社, 東京, 99-201, 1989.
- 藤井 孝, 福森信隆, 多田幸恵, 三栗谷久敏, 他: 和漢医薬学会誌: 10, 149-160, 1993.

酸化マグネシウムの13週間毒性試験

藤井 孝*, 三栗谷 久敏**, 矢野 範男**, 湯澤 勝廣**,
長澤 明道**, 多田 幸恵**, 福森 信隆**, 池田 虎雄**,
高橋 博**, 佐々木 美枝子**

Toxicity Test of Magnesium Oxide in Rats by Dietary Administration for 13 Weeks

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA**, NORIO YANO**, KATSUHIRO YUZAWA**,
AKEMICHI NAGASAWA**, YUKIE TADA**, NOBUTAKA FUKUMORI**, TORAO IKEDA**,
HIROSHI TAKAHASHI** and MIEKO SASAKI**

Magnesium oxide (MgO) is a laxative, and known a raw material of ceramics. MgO was given in pelleted diets at dietary levels of 0.5, 1 or 2% to groups of ten F344/DuCrj rats of each sex for 13 weeks. The mean intakes of MgO of the 0.5, 1 and 2% groups were 68, 132 and 253mg/kg/day in males; and 50, 100 and 185mg/kg/day in females, respectively. Body weight showed dose-related decrease throughout the experiment. Moreover, mean body weight in 2% groups of each sex were significantly lower than those of the controls. Soft to liquid feces were observed for the dosed rats. No pathological change could be seen in any dosed group. Under the test conditions, there was no evidence for toxic activity of the compound in the male or female rats.

Keywords: 酸化マグネシウム magnesium oxide, セラミックス原材料 raw material for ceramic, 緩下剤 laxative, 13週間毒性試験 13 weeks toxicity test, ラット rats

緒言

酸化マグネシウム(以下, MgO と略す)は, セラミックスの原材料であり, 抗菌作用をもつことが報告されている¹⁾. また, 医薬品としては緩下剤及び抗酸化剤として用いられている²⁾. 本実験は, MgO の安全性評価に必要な基礎資料の獲得を目的として, ラットを用い, 添加飼料摂取による13週間連続投与を実施, この結果を基にMgO の経消化管投与による生体への影響を検討した.

実験材料及び方法

被検物質: MgO は, 重質 (CAS No.1309-48-4) とし, 和光純薬(株)のJIS試薬特級を購入し, 実験に用いた. 本品は白色, 微細, 無臭の粉末である.

実験動物及び飼育環境: 4 週齢の F344/DuCrj ラット

雌雄(日本チャールスリバー, 神奈川)を購入し, 入室後は自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式個別ケージに1匹ずつ収容した. 飼育室はバリアー飼育区域内にあり, 室温22~24℃, 湿度50~60%, 換気1時間に10回(効率99.9% HEPA フィルター経由), 照明6:00~18:00に, それぞれ制御されている. 環境への馴化と疾病の有無を観察するために, ラットを1週間予備飼育した. この期間は基礎飼料 CE-2(日本クレア, 東京)と水道水(細菌ろ過器経由)とを自由に摂取させた. 各投与群へのラットの割付けは, 層別化ランダム方式を用いた.

投与方法及び期間: MgO を, 日本クレア(株)の粉末飼料CE-2に各設定濃度で添加し, 固形飼料化した後,

* 東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎 3-16-25

* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research

Laboratory of Public Health. 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

** 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 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

ラットに自由に摂取させ、投与した。投与期間は、ラットが5週齢になった時点から13週間とした。

投与濃度及び群の構成：MgO は、5 mg/mlで大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対し静菌または殺菌作用を示すことから¹⁾、0.5% (5 mg/ml)添加飼料摂取を低濃度投与群とし、更に公比2で1及び2%を、それぞれ中、高濃度投与群として設定した。ラットは入室1日後に体重測定し、層別化ランダム方式により、雌雄とも4群に分けた。投与群は、雌雄とも対照群、低濃度群、中濃度群及び高濃度群を、それぞれC, L, M及びH群とし、各群10匹のラットで構成した。

一般状態観察：瀕死、死亡および異常行動の有無、被毛、可視粘膜の観察は1日2回、1週間に5日行った。土、日曜日及び祝祭日の観察は午前1回とした。摂餌および摂水量(重量)は1週間に1回測定した。この際は、自動給水装置ではなく、給水瓶で飲料水を与えた。

血液学的検査：投与終了後、エーテル麻酔下で大腿動静脈より採血し、多項目自動血球計数装置E-4000(東亜医用電子)により、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘモグロビン濃度(Hg)、ヘマトクリット値(Ht)及び血小板数を測定した。これらの数値から、平均赤血球容量(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。また、メイ・ギムザ染色血液塗抹標本により異常血液細胞の検索および白血球の分画を行った。

血清生化学的検査：血液学的検査試料採取後の血液を遠心管にとり、3000rpm/secで10分間遠心、上清を分離し、自動分析装置 Automatic Analyzer7150(日立)を用いて、アルカリホスファターゼ活性(ALP)、アミラーゼ活性、コリンエステラーゼ活性、クレアチン磷酸酵素活性、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性(GGT)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)、ロイシンアミノペプチダーゼ活性(LAP)、乳酸脱水素酵素活性、アルブミン量、クレアチニン量(CRE)、尿酸量(UA)、尿素窒素量(UN)、血糖量(GLU)、無機性磷酸塩量(IP)、総コレステロール量、遊離型コレステロール量(FCHO)、エステル型コレステロール量、磷脂質量、中性脂肪(TG)、総蛋白量、血清カルシウム量、血清塩素量(Cl)、血清カリウム量、血清ナトリウム量を測定した。

病理学的検査：投与期間終了後、生存例は放血屠殺し、解剖、肉眼的検索を行った。途中死亡及び瀕死屠殺例も、生存例に準拠して処置した。脳、心臓、肺、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、子宮及び卵巣は摘出

後、器官重量を測定した。その他、顎下腺、舌下腺、耳下腺、食道、胃、大・小腸、膵臓、膀胱、包皮腺、陰核腺、乳腺及び大腿骨を摘出した。摘出した器官、組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従ってパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン重染色後、光学顕微鏡にて組織学的検索を行った。

統計学的分析：体重、摂餌及び摂水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量等の測定値の検定は、Bartlett 検定法を用い、分散の均一性について検定し、分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った。また、分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った。危険率は全て5%においた。

結 果

投与期間中、雌雄のC群(対照群、0%添加飼料摂取)及び投与群ともに死亡例は無く、全例が投与終了時まで生存した。一般状態観察では、投与期間を通して投与群雌雄の全例に、軟便あるいは下痢が記録された。軟便は便の形状は保たれているが硬度が低下したもので、下痢は原則として液状を呈するものとした。これら症状の程度は、L群(0.5%添加飼料摂取)では軽度の軟便、M群(1%添加飼料摂取)では中等度の軟便から軽度の下痢、H群(2%添加飼料摂取)では中等度の下痢であった。この症状は投与濃度に比例して増強されており、H群とM群との差は顕著であった。また、この症状に伴う消瘦及び自発運動の低下などは各群とも明らかではないが、投与終了時において、H群のラットはC群に比べ小型であった。

体重増加の推移を Fig. 1及び2に示した。雄では、C群に比べ投与群の体重増加曲線の勾配は、投与開始時から終了時まで緩やかであり、投与濃度に比例して緩やかさが増していた。雌では、C群に比べL群及びH群は緩やかな増加であったが、M群(1%添加飼料摂取)はC群とほぼ同様の増加曲線を描いた。Table 1に、各群の平均体重値の変動を示した。C群に比べ、H群雌雄の絶対重量及び増加率(投与前の体重値を100とした各週の体重値)は、投与開始から終了時まで有意に低い値であった。雌のL群は、投与前の平均体重が低く、絶対値では終始C及びM群以下であったが、増加率で見ると、C群と等しいか、または、上回る値であった。最終時におけるC群雌雄の増加率の平均値をそれぞれ100とすると、投与群の値は、雄ではL群98、M群93、H群84、雌ではL群103、M群100、H群87となり、投与濃度に関連して体重増加が抑制されていた。また、雌雄ともH群はM群に

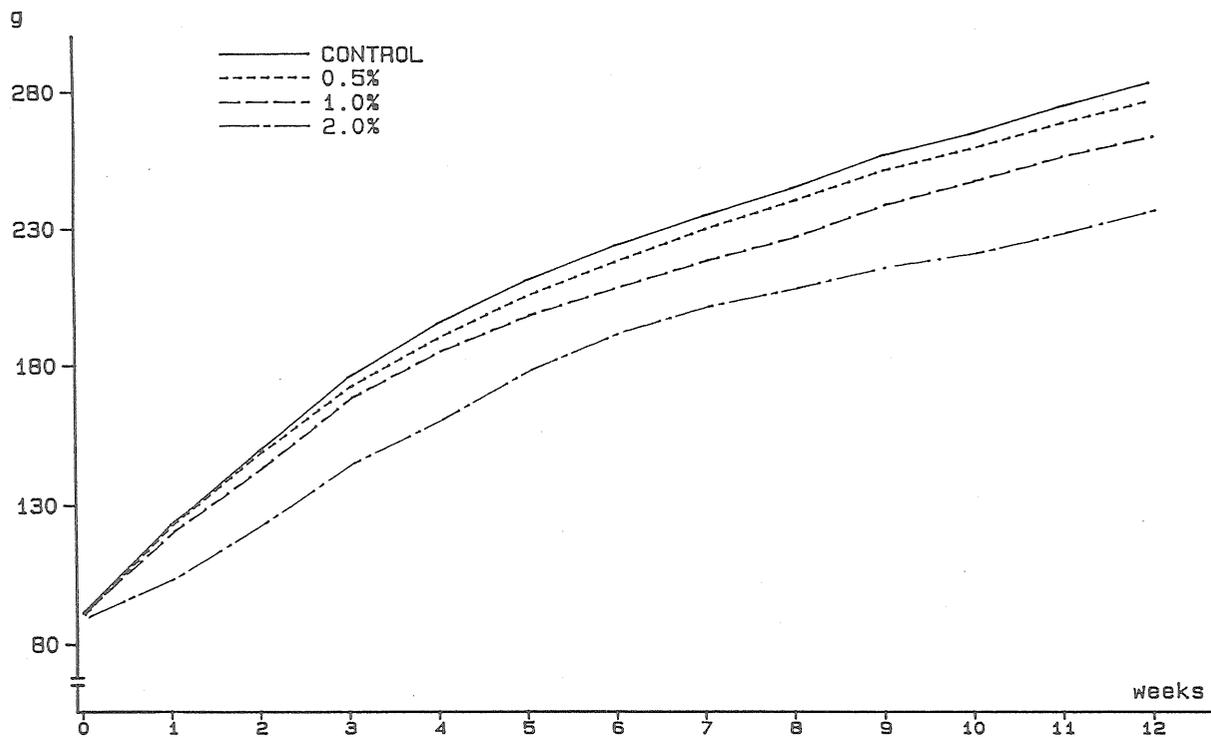


Fig. 1. Body weight changes in male rats

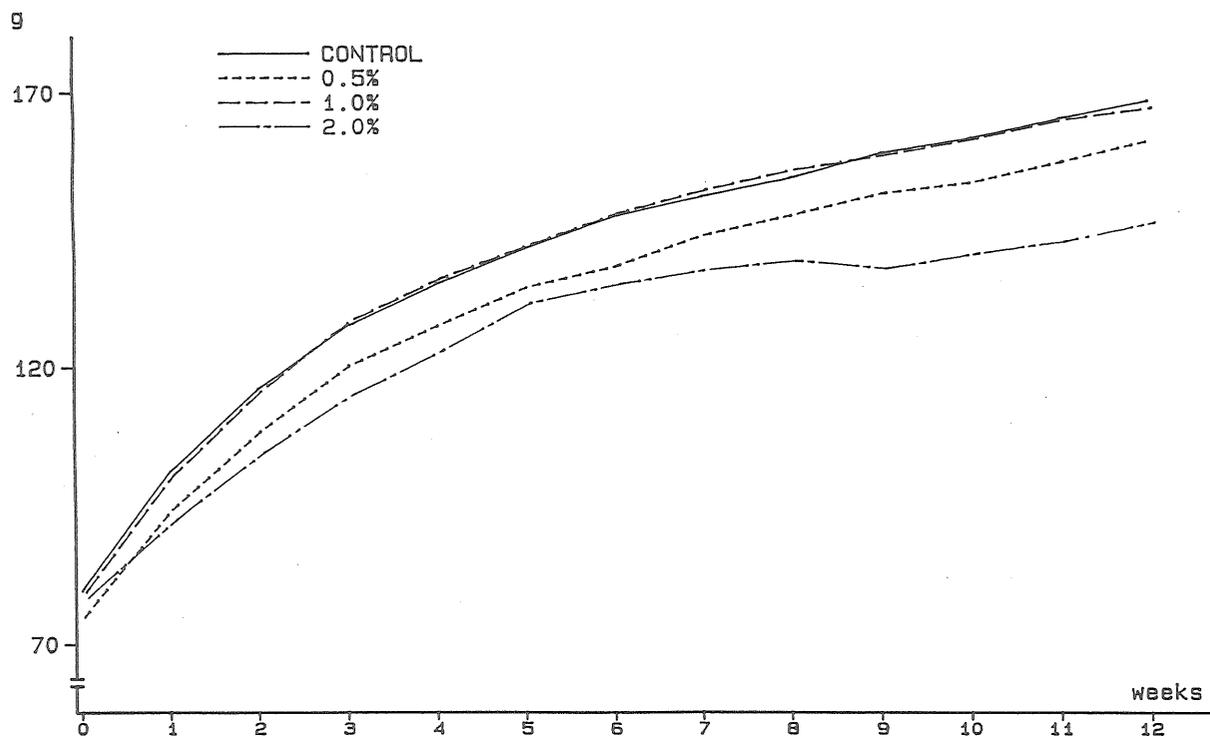


Fig. 2. Body weight changes in female rats

比べ、より顕著な増加抑制であった。

摂餌量の変化を Table 2 に示した。投与群雌雄の摂餌量は、C群に比べ、投与開始から終了時まで少なかった。とくに、第1週では全投与群が有意に少なく、投与濃度に比例した摂餌量の減少が認められた。H群雄は第3週

まで有意に少なかった。投与各群の間で摂餌量を比較すると、雄では第5週、雌では第2週までやや差がみられたが、以後は相互にほぼ近似した値で推移した。しかし、体重当たりに換算すると、投与濃度に伴い増加していた。そこで、試験期間中の通算平均摂餌効率(通算1日当たり

Table 1. Body weight changes in rats fed diets containing magnesium oxide for 13 weeks

Group ¹⁾	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10	10	10	10	10
Wk								
1	91± 4 ³⁾	91± 4	92± 3	90± 4	80± 3	75± 4*	80± 3	79± 3
2	123± 6 135± 3 ⁴⁾	123± 6 135± 3	121± 3 131± 4	104± 7* 116± 8*	101± 4 127± 3	94± 6* 126± 3	101± 4 127± 2	92± 7* 118± 6*
3	150± 9 164± 5	149± 9 164± 6	144± 5 156± 8	123± 9* 138± 11*	116± 5 146± 3	108± 7* 145± 5	116± 5 146± 5	105± 7* 133± 7*
4	175± 11 193± 6	172± 10 190± 7	169± 7 184± 11	145± 7* 162± 9*	128± 5 160± 5	120± 6* 160± 5	129± 5 162± 5	115± 7* 147± 8
5	195± 12 213± 7	190± 11 210± 9	185± 11 202± 17	161± 8* 179± 9*	135± 6 170± 7	128± 6* 170± 4	136± 5 171± 5	123± 8* 157± 9*
6	211± 14 231± 8	205± 13 227± 19	198± 14 216± 19*	179± 10* 199± 12*	142± 8 178± 10	135± 5 179± 5	142± 6 179± 6	132± 8* 168± 8*
7	224± 15 245± 10	218± 14 241± 12	209± 15* 227± 20*	192± 12* 214± 17*	147± 10 185± 11	138± 6* 184± 8	148± 6 186± 7	135± 9* 172± 8*
8	235± 16 257± 12	230± 15 254± 13	218± 17 238± 23	201± 17* 225± 21*	151± 10 190± 13	144± 7 192± 10	152± 7 192± 7	138± 10* 175± 9*
9	245± 17 268± 12	240± 16 265± 14	227± 19 247± 24	208± 19* 233± 26*	154± 11 194± 13	148± 8 197± 13	156± 9 196± 9	139± 10* 177± 11*
10	257± 18 281± 14	251± 17 278± 15	239± 25 260± 30	216± 19* 241± 25*	159± 12 199± 14	152± 8 202± 14	159± 9 199± 10	138± 10* 176± 13*
11	264± 19 290± 16	259± 18 287± 17	247± 25 269± 29	221± 25* 247± 33*	162± 13 203± 16	154± 9 205± 16	161± 8 203± 9	140± 9* 179± 11*
12	274± 18 301± 17	268± 17 297± 15	257± 25 280± 30	228± 19* 256± 28*	165± 14 207± 17	157± 9 210± 16	165± 10 208± 12	143± 11* 182± 15*
13	283± 19 310± 18	276± 17 306± 15	264± 25 287± 30	237± 24* 265± 33*	169± 14 212± 17	161± 9 215± 17	167± 8 210± 10	146± 11* 186± 15*
Final ⁵⁾	288± 18 316± 18	283± 17 310± 15	270± 24 293± 30	236± 24* 264± 33*	170± 12 213± 17	164± 9 219± 17	170± 8 213± 10	147± 11* 186± 15*

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.5 (L), 1 (M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats weighed throughout the study. 3) Absolute weights (g, Mean ± SD). 4) Increasing rate (weight × 100/the initial weight, Mean ± SD). 5) Weights at the day of the autopsy.

* Significant differences to the control (P < 0.05).

平均体重増加量 g / 通算1日当たり平均摂餌量 g) を概算すると、雄ではC群0.16, L群0.16, M群0.15, H群0.13, 雌ではC群0.09, L及びM群0.10, H群0.08となった。すなわち、効率は雄ではやや投与濃度に伴う低下、雌では、H群のみ軽度な低下がみられた。飼料のコボシ量をみると、C群に比べ投与群では、投与開始から雄が第8週、雌が第4週目まで多量であり、とくに、H群雌雄が多かった。その後は投与終了時まで、C群と投与群との間に大差はみられなかった。試験期間を通しての1日当たり投与薬物量 (mg/体重kg) の単純平均値を摂餌量から換算すると、雄のL群68, M群132, H群256, 雌のL群49, M群100, H群185であり、雌雄ともL群からH群にかけて、ほぼ公比2で増加していた。

摂水量の変化を Table 3 に示した。投与群雌雄の摂水量は、C群に比べ、投与開始から終了時まで多く、投与濃度に伴う増加がみられた。とくに、M及びH群雌雄は終始有意に多量であり、H群とM群との差は大きかった。

血液学的検査の結果を Table 4 に示した。雄では、C群に比べ投与群のWBC, RBC及びHgは少なく、Htは低く、M及びH群のRBCは有意な減少であった。雌では、C群に比べ投与群のRBC及びHgは多く、Htは高く、H群のRBC及びHtは有意であった。また、MCVがH群で低く、MCHがL群で高く、H群で低く、何れも有意であった。雌雄とも白血球の分画では特記すべき変化は認められなかった。これらの変化のうち、投与濃度に伴う一定の増減傾向がみられたのは、雄ではHgの減少及び

Table 2. Food consumption in rats fed diets containing magnesium oxide for 13 weeks

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
Wk	10	10	10	10	10	10	10	10
1	13.1±0.8 ³⁾ 2.5±0.4 ⁴⁾	10.3±0.8* 3.5±0.8	8.6±0.5* 2.0±0.4	5.5±0.3* 3.1±1.0	11.1±0.5 2.1±0.5	8.1±0.5* 3.4±0.7*	7.2±0.7* 1.6±0.3*	4.6±0.8* 1.7±0.4
2	13.0±1.0 2.4±0.5	13.3±1.2 3.6±1.0*	12.6±0.5 2.7±0.6	11.1±1.5* 5.0±2.1*	10.5±0.7 2.0±0.5	10.3±0.9 3.9±1.3*	10.4±0.5 1.9±0.4	9.8±0.7 3.5±1.5*
3	14.7±1.1 2.8±0.6	14.4±1.1 3.9±1.1*	14.1±0.7 2.6±0.7	13.1±0.9* 5.0±2.4*	11.6±0.6 2.2±0.5	11.1±0.8 3.6±0.9*	11.9±0.6 2.7±0.6	11.0±1.4 3.5±1.0*
4	14.2±1.0 2.9±0.8	13.9±1.0 3.6±1.2	13.5±0.9 2.4±0.5	13.4±0.9 4.0±1.0*	10.7±0.9 2.3±0.4	10.1±0.9 3.1±1.1	11.3±1.0 2.1±0.4	10.6±1.2 3.5±1.2*
5	14.4±1.0 2.7±0.6	14.2±1.1 3.4±1.0	13.9±1.1 2.5±0.8	13.4±1.6 4.6±2.5	10.2±1.0 2.3±0.7	10.2±1.2 2.4±0.4	9.6±0.9 2.0±0.4	9.7±0.8 1.6±0.5*
6	15.1±1.3 2.7±0.9	14.2±0.8 3.8±1.1	13.7±1.0 2.3±0.4	14.3±1.2 5.0±2.8	10.6±1.4 2.4±0.8	10.5±1.1 3.4±1.0*	11.2±0.8 2.0±0.6	11.0±1.0 2.7±1.2
7	13.9±1.0 2.9±0.7	13.5±1.1 3.2±1.6	13.6±1.5 2.3±0.8	13.4±2.1 3.9±2.7	9.8±1.4 2.0±0.6	9.9±1.0 2.6±0.7	10.4±0.8 1.9±0.7	9.7±1.5 1.9±0.8
8	13.9±1.0 2.6±0.5	13.8±1.1 3.1±1.1	13.7±1.4 2.5±0.9	13.4±2.3 4.0±2.4	9.5±1.2 2.0±0.8	9.8±1.1 2.4±0.9	10.4±1.0 1.8±0.4	9.7±1.4 1.9±0.9
9	14.7±0.7 3.1±1.0	13.8±1.1 3.0±0.9	13.6±1.8 2.3±0.7	13.5±2.3 3.1±1.5	9.2±1.3 1.9±0.6	9.6±0.9 2.2±0.6	9.9±1.2 1.4±0.6	8.4±1.9 1.2±0.4
10	13.8±1.1 2.5±0.5	13.1±1.1 2.6±1.1	13.1±1.9 1.8±0.5	13.7±2.8 3.1±1.8	9.3±1.4 2.0±0.7	9.2±1.1 2.1±0.6	9.3±0.9 1.4±0.6	8.9±1.3 1.7±1.0
11	14.2±1.0 3.0±0.7	13.5±0.7 2.5±0.9	13.4±1.7 2.1±0.6	13.6±2.6 3.5±2.0	9.3±1.5 2.0±0.8	9.5±1.0 2.1±0.4	9.6±0.9 1.6±0.5	9.1±1.3 1.6±0.7
12	14.0±1.3 2.7±0.8	13.8±1.2 2.6±0.8	13.7±1.7 2.3±1.0	13.6±2.3 3.6±3.2	9.4±0.9 1.6±0.5	9.3±1.1 2.2±0.7	9.7±0.9 1.4±0.5	8.5±1.6 1.4±0.7
13	15.1±1.3 3.2±0.8	14.4±0.8 2.8±1.1	14.7±1.8 2.4±0.8	14.3±1.9 3.7±2.6	10.1±1.3 1.7±0.6	10.1±1.0 2.4±1.0	10.2±0.5 1.6±0.4	9.3±1.4 1.6±0.7

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.5(L), 1(M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats weighing food intake throughout the study. 3) Food consumption (g/rat/day, Mean±SD). 4) Weight of broken food in a dish under a cage (g/rat/day, Mean±SD).

* Significant differences to the control (P<0.05).

Table 3. Water consumption in rats fed diets containing magnesium oxide for 13 weeks

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
Wk	10	10	10	10	10	10	10	10
1	16.0±1.3 ³⁾	20.4±1.4*	24.3±1.5*	22.2±2.2*	14.6±1.3	16.6±1.8	21.2±1.9*	19.2±2.8*
2	17.1±1.7	21.7±1.7	27.3±2.3*	36.8±5.1*	15.4±2.6	17.5±2.0	24.1±2.5*	31.0±4.2*
3	19.1±3.3	22.4±1.9	28.6±2.8*	40.5±4.2*	16.3±1.8	17.6±1.6	25.3±2.3*	31.3±4.8*
4	18.1±1.9	21.7±1.8*	28.2±3.5*	43.4±2.7*	15.5±1.6	16.4±1.2	25.1±3.7*	33.4±4.5*
5	18.3±1.8	21.7±1.9	27.9±2.9*	42.3±5.7*	16.1±4.1	15.8±1.7	22.9±3.6*	30.9±3.3*
6	19.1±1.8	23.1±2.1	28.5±4.3*	44.3±4.7*	15.4±1.9	16.5±2.0	24.9±1.9*	31.0±4.6*
7	18.4±1.5	21.3±2.0	27.2±4.7*	40.8±7.4*	14.9±1.9	16.4±1.3	22.4±1.6*	29.2±5.9*
8	17.9±1.8	22.0±3.4	27.4±5.8*	39.3±7.1*	14.0±2.5	15.6±2.1	21.9±4.0*	28.0±4.5*
9	18.3±1.6	20.6±2.5	26.3±5.4*	38.5±7.2*	13.6±2.8	15.0±1.7	20.4±2.9*	24.7±4.7*
10	17.5±1.9	20.7±2.6	26.7±5.3*	39.9±7.1*	14.3±3.1	15.3±1.8	20.3±3.8*	26.0±3.5*
11	18.1±1.6	21.5±2.8	27.0±5.6*	40.4±6.9*	14.3±3.3	16.4±2.1	20.1±3.9*	27.0±3.4*
12	17.2±1.8	21.3±2.6	26.9±5.7*	39.4±6.7*	14.5±1.8	15.3±1.7	21.7±5.6*	25.7±4.2*
13	18.8±1.7	22.1±2.5	27.7±5.1*	40.1±4.9*	15.0±2.6	17.1±1.9	21.4±2.4*	27.1±3.4*

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.5(L), 1(M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats for measuring water consumption throughout the study. 3) Water consumption (g/rat/day, Mean±SD).

* Significant differences to the control (P<0.05).

Table 4. Summary of hematological examination

Group ¹⁾		C	L	M	H
No. of rats ²⁾		10	10	10	10
Male					
WBC ³⁾	(10 ³ /mm ³)	6.3±0.7 ⁴⁾	5.6±0.6	5.8±1.1	5.7±0.8
RBC ⁵⁾	(10 ⁶ /mm ³)	9.92±0.28	9.79±1.16	9.58±0.23*	9.64±0.27*
Hemoglobin	(g/dl)	17.0±0.4	16.9±0.2	16.7±0.4	16.7±0.3
Hematocrit	(%)	50.2±1.6	49.7±0.5	49.3±0.8	49.3±1.6
Platelet	(10 ³ /mm ³)	652±80	664±52	678±35	642±47
MCV ⁶⁾	(μ ³)	50.6±0.5	50.8±0.7	51.5±0.9	51.1±1.0
MCH* ⁷⁾	(μ μg)	17.2±0.3	17.3±0.3	17.5±0.4	17.3±0.3
MCHC ⁸⁾	(%)	33.9±0.6	33.9±0.4	33.9±0.6	33.9±0.8
<u>Differential of leukocytes (%)</u>					
Neutrophils		41.7±10.8	43.3± 8.8	45.7±11.4	49.6±11.5
Lymphocytes		55.4±11.6	54.2± 8.9	51.2±11.6	48.0±10.1
Monocytes		1.5± 1.5	1.2± 0.8	1.8± 1.5	1.6± 1.1
Eosinophils		1.5± 0.9	1.2± 1.1	1.2± 1.1	1.4± 0.9
No. of rats		10	10	10	10
Female					
WBC	(10 ³ /mm ³)	5.1±0.9	6.3±0.6	5.2±0.6	5.3±0.5
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	9.01±0.19	9.02±0.17	9.03±0.19	9.39±0.23*
Hemoglobin	(g/dl)	16.4±0.3	16.8±0.3	16.6±0.4	16.7±0.4
Hematocrit	(%)	48.1±0.9	48.3±0.9	48.3±1.1	49.3±1.2*
Platelet	(10 ³ /mm ³)	741±77	650±44*	697±47	642±28*
MCV	(μ ³)	53.4±0.5	53.5±0.3	53.5±0.4	52.6±0.6*
MCH	(μ μg)	18.2±0.2	18.6±0.2*	18.4±0.1	17.8±0.3*
MCHC	(%)	34.2±0.5	34.7±0.4*	34.3±0.3	33.9±0.4
<u>Differential of leukocytes (%)</u>					
Neutrophils		35.0±11.6	35.2±10.3	35.8± 8.8	35.7± 9.6
Lymphocytes		61.4±11.6	62.1±10.2	61.4± 9.5	61.7± 9.8
Monocytes		1.8± 0.8	1.8± 1.1	1.5± 1.6	1.4± 1.1
Eosinophils		1.8± 1.3	0.8± 0.9	1.3± 1.2	1.3± 1.2

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.5(L), 1(M) or 2%(H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats examined. 3) White blood cell count. 4) Mean ± SD). 5) Red blood cell count. 6) Mean corpuscular volume. 7) Mean corpuscular hemoglobin. 8) Mean corpuscular hemoglobin concentration.

* Significant differences to the control (P<0.05).

Htの低下であり、雌ではHtの上昇であった。これら変化を個体別に見てみると、雄でRBCがC群の最低値未満であった例は、M群で2/10(10例中2例の意)、H群で3/10であり、これらはHgも未満であった。さらにH群の1例はHtも最低値未満であり、これら5例は軽度ながら貧血傾向と診断できる。雌でRBCがC群の最高値を超えた例は、L及びM群で1/10、H群で8/10であり、これらのうちH群の4例を除き他はHg及びHtも最高値を超えていた。また、H群の6/10はMCVがC群の最低値未満であり、多血傾向とともに小赤血球性であ

ることを示した。

血清生化学検査では、Table 5及び6に示すごとく、雌雄とも多くの項目において、投与群とC群との間に有意差が認められた。投与に関連した増減を示したのは、雄では、ALP、LAP及びCIの上昇、GGT、GPT、UA、GLU、FCHO、TGの低下であった。このなかで、ALP、GGT、FCHO及びTGは投与群間の差異が顕著であり、GLUは殆ど差異は無かった。雌では、ALP、GGT、LAP、FCHO及びCIは雄と同様の変動であったが、GPTは逆に上昇していた。雌のみで見られた変動は、ア

Table 5. Summary of serumchemistry of male rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Alkaliphosphatase (IU/l)	550±33 ³⁾	545±40	613±56	710±146*
Amylase (IU/l)	6215±655	6583±668	6695±602	5858±1197
Cholinesterase (ΔpH)	0.05±0.01	0.07±0.02	0.07±0.03	0.09±0.04
CPK ⁴⁾ (IU/l)	3165±1534	5805±1071*	2905±437	3592±1306
GGT ⁵⁾ (IU/l)	3.9±0.3	1.8±0.6*	0.8±0.3*	0.7±0.3*
GOT ⁶⁾ (IU/l)	118±18	136±19	96±7*	116±17
GPT ⁷⁾ (IU/l)	58±6	57±9	43±2*	48±5*
GOT/GPT	2.05±0.29	2.41±0.27	2.25±0.13	2.42±0.39*
LPA ⁸⁾ (GR-U)	176±5	185±4*	183±4*	199±8*
LDH ⁹⁾ (IU/l)	1252±258	1411±193	884±64*	968±155
Albumin (g/dl)	2.8±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1
Albumin/globulin ratio	0.76±0.02	0.77±0.03	0.75±0.03	0.81±0.04
Creatinine (mg/dl)	0.50±0.03	0.54±0.03*	0.47±0.04	0.50±0.03
Uric acid (mg/dl)	1.6±0.2	1.5±0.2	1.1±0.2*	1.2±0.2*
Urinary nitrogen (mg/dl)	24.7±1.5	25.2±1.0	23.1±1.1	26.1±2.3
Glucose (mg/dl)	196±11	167±15*	165±7*	165±19*
Inorganic phosphate (mg/dl)	5.8±0.3	5.6±0.5	6.7±0.8*	5.8±1.1
Total bililubin (mg/dl)	0.03±0	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.02
Total cholesterol (mg/dl)	55±3	58±2	55±2	52±5*
F-cholesterol ¹⁰⁾ (mg/dl)	15±1	15±1	13±1*	10±2*
E-cholesterol ¹¹⁾ (mg/dl)	40±2	43±2*	43±2*	41±3
Phospholipid (mg/dl)	136±6	135±6	126±4*	124±7*
Triglyceride (mg/dl)	134±11	111±33*	56±14*	26±15*
Total protein (g/dl)	6.4±0.1	6.5±0.2	6.5±0.2	6.1±0.1*
Calcium (mg/dl)	10.2±0.1	9.8±1.1	10.1±0.3	9.6±0.3*
Chlorine (mEq/l)	104.8±1.5	106.4±1.2	115.8±3.6*	115.2±3.8*
Kalium (mEq/l)	4.99±0.22	5.49±0.33*	5.57±0.37*	5.20±0.51
Natrium (mEq/l)	140.7±1.4	142.1±0.8	143.9±0.9*	142.7±2.5*

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.5 (L), 1 (M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean±SD. 4) Creatine phosphokinase. 5) γ -glutamir transaminase. 6) Glutamic oxalacetic transaminase. 7) Glutamic pyruvic transaminase. 8) Leusin aminopeptidase. 9) Lactic dehydrogenase. 10) Free cholesterol. 11) Esterified cholesterol. * Significant differences to the control (P<0.05).

ルブミン/グロブリン比 (A/G), CRE及びUNの上昇, IPの低下であった。このなかで, ALP, LAP, UN及びFCHOは投与群間の差異がやや顕著であり, A/G, CRE及びClは殆ど差異は無かった。

臓器重量測定の結果を Table 7及び8に示した。絶対重量では, C群に比べ投与群で有意に低かったのが, H群雌雄の脳, 心臓, 肺, 胸腺, 脾臓及び肝臓, H群雄の腎臓及び前立腺, H群雌の副腎, 卵巣及び子宮, M群雄の肝臓, L群雌の脾臓であった。これらのうち, 相対重量(体重100g当りの重量)においても有意に低かったのは, 肝臓, 副腎, 卵巣及び子宮であり, 逆に高かったのは脳, 肺及び腎臓であった。投与濃度に関連した重量変動は, 絶対重量では, 雄の肺, 胸腺, 脾臓, 肝臓, 精巣

及び前立腺, 雌の胸腺及び子宮の低下であった。一方, 相対重量では雄の肺, 副腎及び精巣の増加, 雄の胸腺, 脾臓, 肝臓及び前立腺, 雌の肝臓及び子宮の低下であった。

剖検時の肉眼的検査では, 雌雄の各群とも外観から, 被毛, 可視粘膜等に異常はなかったが, H群雌雄はC群及び他の投与群に比べ, やや痩せて小柄であった。解剖所見では, H群雌雄は皮下及び腹腔内の脂肪組織は少ないものの, 臓器組織に明らかな異常は認められなかった。

組織学的検査の結果, 肝臓では, 核形が不整で細胞質が少なく, 小型化した肝細胞が瀰漫性に観察される例がH群雄の1/10にみられた。この例では, 脾臓において, 赤脾髄の細胞密度が軽度に低下し, 被膜にやや皺襞を形

Table 6. Summary of serumchemistry of female rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Alkaliphosphatase (IU/l)	438±26 ³⁾	533±40*	517±51*	751±80*
Amylase (IU/l)	4469±185	4597±554	4747±378	6028±786*
Cholinesterase (ΔpH)	0.79±0.17	0.86±0.16	0.90±0.11	0.47±0.20*
CPK ⁴⁾ (IU/l)	2814±1542	7227±2033*	3390±2386	3183±1012
GGT ⁵⁾ (IU/l)	2.7±0.5	1.0±0.6*	0.4±0.4*	0.6±0.3*
GOT ⁶⁾ (IU/l)	90±18	143±24*	104±33	115±10*
GPT ⁷⁾ (IU/l)	40±6	50±6*	42±6	49±6*
GOT/GPT	2.24±0.21	2.83±0.29*	2.43±0.38	2.36±0.21
LPA ⁸⁾ (GR-U)	169±14	182±12	183±15	217±14*
LDH ⁹⁾ (IU/l)	881±186	1528±364*	982±401	883±119
Albumin (g/dl)	2.7±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1
Albumin/globulin ratio	0.80±0.04	0.82±0.02	0.82±0.04	0.90±0.04*
Creatinine (mg/dl)	0.43±0.03	0.47±0.03	0.49±0.05*	0.49±0.04*
Uric acid (mg/dl)	1.2±0.8	1.2±0.1	1.3±0.3*	1.2±0.1
Urinary nitrogen (mg/dl)	19.9±1.1	22.3±2.0	21.9±1.4	28.5±3.4*
Glucose (mg/dl)	164±7	164±8	170±14	152±7*
Inorganic phosphate (mg/dl)	6.2±1.0	5.6±0.6	5.0±0.8*	4.4±1.0*
Total cholesterol (mg/dl)	75±4	72±5	74±5	72±4
F-cholesterol ¹⁰⁾ (mg/dl)	22±1	20±1*	18±2*	16±2*
E-cholesterol ¹¹⁾ (mg/dl)	53±4	52±4	56±4	56±3
Phospholipid (mg/dl)	149±7	165±8*	157±11	152±11
Triglyceride (mg/dl)	33±6	46±18	26±8	16±6*
Total protein (g/dl)	6.0±0.4	6.1±0.2	6.1±0.2	6.0±0.2
Calcium (mg/dl)	9.9±0.6	9.9±0.3	9.8±0.2	9.0±1.1*
Chlorine (mEq/l)	109.8±2.5	119.0±1.7*	119.7±1.6*	119.7±1.0*
Kalium (mEq/l)	5.01±0.95	5.26±0.34*	4.79±0.37	5.08±0.22
Natrium (mEq/l)	143.1±1.4	142.3±0.8	142.5±0.6	142.5±1.1

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.5 (L), 1 (M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean±SD. 4) Creatine phosphokinase. 5) γ -glutamic transaminase. 6) Glutamic oxalacetic transaminase. 7) Glutamic pyruvic transaminase. 8) Leusin aminopeptidase. 9) Lactic dehydrogenase. 10) Free cholesterol. 11) Esterified cholesterol. * Significant differences to the control ($P<0.05$).

成する像もみられた。腎臓では、局所性に遠位尿管の上皮細胞の腫脹、核の膨化、基底膜の肥厚が、胸腺では、胸腺リンパ球が減少し、皮質の細胞密度が低下、皮質幅が狭小化しているのが観察された。これらの変化は、H群雄で軽度及びごく軽度な例が各1例出現した。他の雌雄各群では、上記の変化は認められなかった。その他、心臓の局所性炎症、肺の局所性炎症及び血管壁の石灰化が、何れも軽度に、C群および投与各群で1、2例散見された。

考 察

投与期間中、飼育及び投与に関わる事故並びに感染性疾患による損失例は発生せず、実験環境及び手技は良好であった。すなわち、本試験では供試動物に対するMgOの作用が、その他の要因によって影響される危険

性は極めて低かったと評価できる。また、MgO投与量は雌雄ともL群からH群にかけて、設定のごとく、ほぼ公比2で増加していた。これらから、本試験で観察される種々の変化、とくに投与群で投与濃度に伴って発現した変化はMgO摂取に起因するとともに、用量に依存していると思なすことができる。

投与期間を通して観察された軟便あるいは軽～中等度の下痢は、投与群雌雄の全例に見られ、投与量に比例して増強されており、明らかにMgO投与に関連した症状である。これは、MgOが瀉下作用を有し、医薬品としては緩下剤に分類されていることから²⁾、経口投与による実験では、開始以前に予測された不可避の症状が発現したと言えよう。しかし、雌雄とも中等度の下痢が持続したH群においても、死亡は発生せず、MgOに特異的あ

Table 7. Summary of organ weight changes in male rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Brain (mg)	1935 ± 35 ³⁾	1930 ± 30	1937 ± 29	1901 ± 29*
	673 ± 34 ⁴⁾	684 ± 36	723 ± 61	811 ± 76*
Heart (mg)	780 ± 53	785 ± 54	729 ± 60	632 ± 67*
	270 ± 8	278 ± 9	270 ± 7	267 ± 11
Lung (mg)	877 ± 43	868 ± 42	861 ± 78	770 ± 71*
	305 ± 13	307 ± 11	319 ± 10*	326 ± 15*
Thymus (mg)	175 ± 19	175 ± 12	156 ± 17	130 ± 27*
	61 ± 5	62 ± 6	58 ± 8	55 ± 11
Spleen (mg)	523 ± 27	516 ± 31	505 ± 43	416 ± 55*
	182 ± 8	183 ± 7	188 ± 8	176 ± 14
Liver (g)	9.30 ± 0.73	8.58 ± 0.77	7.91 ± 0.77*	6.17 ± 1.10*
	3.23 ± 0.07	3.02 ± 0.10	2.93 ± 0.07*	2.60 ± 0.29*
R. kidney (mg)	881 ± 58	818 ± 40	820 ± 71	746 ± 75*
	306 ± 13	290 ± 11*	304 ± 13	316 ± 10
R. adrenal (mg)	17.3 ± 1.0	17.3 ± 1.9	17.2 ± 2.7	17.4 ± 2.0
	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.5	6.4 ± 0.7	7.5 ± 1.3*
R. testis (mg)	1347 ± 47	1346 ± 42	1339 ± 56	1208 ± 182
	468 ± 21	477 ± 24	498 ± 27	512 ± 63*
Postate (mg)	252 ± 34	211 ± 61	220 ± 83	163 ± 68*
	87 ± 11	74 ± 19	80 ± 25	67 ± 22

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.5 (L), 1 (M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats weighed organs weight. 3) Absolute weights (Mean ± SD). 4) Relative weight (mg or g/100g body weight; Mean ± SD).

* Significant differences to the control (P < 0.05).

るいは非特異的致死作用は無いと考えられる。

体重増加の抑制は MgO 投与量に比例してみられ、摂取に関連した変化である。これは、腸内細菌叢の代謝活性は宿主の栄養や生理状態に関係しているとの報告があることから³⁾、MgO の抗菌作用が細菌叢のインバランスを起こしたとも推定できる。しかし、摂取に伴う摂餌効率の顕著な低下はなく、MgO が栄養吸収機構を直接障害したとは考えられない。従って、抑制の原因は摂餌量の減少、とくに投与初期での激減に起因すると思われる。摂餌量の減少は、とくに投与初期に餌のコボシが多量であったことから、ラットが MgO 添加飼料の摂取を忌避したことに因ると思われる。投与終了時の肉眼的検査において、H群雌雄は皮下及び腹腔内等の脂肪組織が少なく、小型であった。すなわち、この週齢時のラットにおいては体重増加の抑制は一般的に成長の遅延と表現できよう。従って、MgO は摂餌量の減少及び下痢の持続によってラットに栄養状態の悪化を惹起させ、成長遅延を招いたと考えられる。また、摂水量の増加も、投与量に

比例しており、MgO の摂取に関連した変化である。この増加は、M 及び H 群雌雄で、終始有意に多量であり、持続する下痢による脱水症状を改善するための適応⁴⁾であったと考えられる。このように、体重、摂餌及び摂水量の変動は、相互に関連しており、いずれも MgO 摂取に起因している。また、これらの変化は、雌よりも雄に強く現れているが、雌は雄に比べ、体重当たりの MgO 摂取量が少ないこと、若齢期での発育または成熟速度が早いことなどが関与していると思われる。

血液検査の結果、投与に関連して現れた変化は軽度ではあるが、雄の貧血傾向と雌の多血傾向である。これらは、MgO の瀉下作用によって生じた下痢、栄養低下、体重の増加抑制と同様に生体影響に対する反応として捉えられる。すなわち、雄では栄養低下に因る貧血傾向であり、雌では貧血からの修復過程にあるため小赤血球性で多血傾向を示したと考えられる。雌雄で貧血と多血という相反する反応がみられた原因は、主として前述した発育速度における性差によって適応に至るまでの時間的

Table 8. Summary of organ weight changes in female rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Brain (mg)	1808±35	1784±25	1800±25	1738±33*
	1067±63	1092±56	1062±42	1175±69*
Heart (mg)	509±38	499±36	505±26	423±37*
	300±17	305±12	297±13	285±12*
Lung (mg)	678±55	634±38	663±39	564±48*
	399±29	388±18	391±17	380±10
Thymus (mg)	153±24	137±14	143±8	117±13*
	90±15	83±6	84±5	79±6
Spleen (mg)	373±27	344±18*	351±17	280±33*
	220±11	210±10	207±11*	188±10
Liver (g)	4.81±0.63	4.82±0.20	4.67±0.38	3.65±0.34*
	2.82±0.26	2.95±0.06	2.75±0.11	2.45±0.12*
R. kidney (mg)	553±32	549±31	555±24	539±32
	326±21	336±16	327±8	364±12
R. adrenal (mg)	20.9±2.0	22.5±2.3	21.1±1.7	16.4±3.0*
	12.3±1.0	13.7±1.4*	12.4±1.2	11.0±1.5*
R. ovary (mg)	29.9±2.8	29.0±3.7	29.7±4.1	18.6±6.1*
	17.6±1.6	17.7±2.1	17.5±2.4	12.4±3.6*
Uterus (mg)	395±90	382±97	352±87	166±92*
	231±44	232±50	207±49	110±57*

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.5 (L), 1 (M) or 2% (H) magnesium oxide in diets. 2) No. of rats weighed organs weight. 3) Absolute weights (Mean±SD). 4) Relative weight (mg or g/100g body weight; Mean±SD).

* Significant differences to the control (P<0.05).

ズレが生じた結果であると推察される。

血清生化学検査において投与に関連して現れた測定値の変動のなかで、雌雄共通に現れた尿酸及び血糖値、FCHO, TG等の低下は代謝機能の低下、栄養失調を示唆するものであると考えられる。投与群雌雄でのALPの増加傾向は、この酵素が骨代謝に関与し成長期には高値を示すとされていることから⁵⁾、この時点で骨代謝が活性化していることを表現していると思われる。すなわち、MgO摂取によってC群に比べ、成長が遅れた、あるいは緩やかに進行したため、この週齢に至って活性化が起こったと考えられる。従って、ALPの増加はMgO摂取による特異的反応ではなく、前述の下痢、栄養状態悪化による二次的変化が原因と推定される。その他、雌で肝臓機能に関する指標がごく軽度に変動したが、薬物投与に対する適応現象の範囲内であると考えられる。

臓器重量測定で、H群でC群との間に有意差があり、しかも投与量に関連して絶対及び相対値ともに同様の変動を呈した臓器をみても、低下傾向は、雄の肝臓、

脾臓、胸腺及び前立腺、雌の子宮であり、上昇傾向を示す例は無い。さらに、より軽度ながら低下傾向は雌においても雄と同じ臓器に認められている。また、これらの臓器は組織学的検査において、ごく軽度ながら萎縮性変化または退縮の形態変化を示している。すなわち、体重測定、血液、血清生化学検査の項で述べたと同様に、各臓器の重量低下は、MgOの特異的作用ではなく、個体レベルでの栄養状態悪化及び成長遅延を反映したものと考えられる。一方、H群では雌雄の脳及び肺は絶対重量で低い相対重量では高くなっており、低下した各臓器とは異なる反応を示した。これは、各臓器で発育時期とその速度とに差異があることが主な原因であり、その遅速によって影響の強弱程度が異なったためと推定される。

組織学的検索では、少数例に軽度な変化が認められたのみで、投与に関連した器質的変化は殆ど生じなかったと判断できる。少数例のうち、H群雄の1例でみられた脾臓及び胸腺の像はごく軽度な萎縮性変化及び退縮であった。これらの変化は、これまでも述べた如く、個体

レベルでの栄養及び成長遅延の影響によるものと考えられる。

以上のごとく、投与に伴う種々の変化は、MgOの薬理作用である瀉下作用が過剰及び連続投与によって強調されたことに主たる原因を求めることができる。また、最高用量での瀉下作用の発現はやや顕著であるが、静菌あるいは殺菌効果を現す用量では軽度の軟便を除いて、この作用は明らかではない。さらに、この瀉下作用から派生する変化以外に、新たな特異的障害作用は発現しなかった。これらの結果から、本実験条件下では、MgOの安全性は高いと推定される。

文 献

- 1) 澤井淳, 五十嵐英夫, 橋本篤, 清水賢: 日本食品工業学会第40回大会講演集, pp72, 1993.
- 2) Martha Windholz: The Merck Index, pp 811, 1983, Merck & Co. Inc., Rahway.
- 3) 光岡知足: トキシコロジーフォーラム, 9(2), 3-6, 1986.
- 4) Goodmann, A. G., Goodmann, L. S., Rall: T. W. & Murad, F.: The Pharmacological basis of Therapeutics, pp 998, 1985. Macmillan Publishing Co. In., New York.
- 5) 飯野四郎: 臨床医学, 19, 128-129, 1993.

十全大補湯の13週間毒性試験

藤井 孝*, 三栗谷 久 敏**, 矢野 範 男**, 湯澤 勝 廣**,
長澤 明 道**, 多田 幸 恵**, 福森 信 隆**, 池田 虎 雄**,
高橋 博**, 坂本 義 光**, 佐々木 美 枝子**

Toxicity Test of Juzen-taiho-to in Rats by Dietary Administration for 13 Weeks

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA**, NORIO YANO**, KATSUHIRO YUZAWA**,
AKEMICHI NAGASAWA**, YUKIE TADA**, NOBUTAKA FUKUMORI**, TORAO IKEDA**,
HIROSHI TAKAHASHI**, YOSHIMITSU SAKAMOTO** and MIEKO SASAKI**

Juzen-taiho-to (Shi-Quan-Da-Bu-Tang), a Chinese medicine, was given in pelleted diets at dietary levels of 0.2, 0.8 or 3.2% to groups of ten F344/DuCrj rats of each sex for 13 weeks. The mean intakes of the compound of the 0.2, 0.8 or 3.2% groups were 142, 561 and 2,272mg/kg/day in males, and 150, 610 and 2,458mg/kg/day in females, respectively. No dose-related change in body weight, food consumption, water intake or organ weight could be detected. In serum chemistry, dosed male rats showed dose-related decrease of triglyceride. No pathological changes was seen in any dosed group. Under the test conditions of the present study, there was no evidence for toxic activity of the test compound in the male or female rats.

Keywords: 漢方薬 Chinese medicine, 十全大補湯 Juzen-taiho-to: Shi-Quan-Da-Bu-Tang, 13週間毒性試験 13 weeks toxicity test, ラット rats

緒 言

漢方方剤及び生薬(以下、漢方薬とする)には歴史的背景と経験とに支えられた信頼性がある。近年、高齢化社会を目前にして、中年以降の健康保持や老人医療への関心が高まり、とくに漢方薬による療法がこれらに適しているとして期待されている。この社会状況を背景にして、東京都は昭和63年度より「東洋医学検討会」を設置し、漢方医療を科学的に解明し取り入れていく方向で、体系的に取り組んできた。このなかで、著者らは漢方薬の安全性及び有効性の評価に関する研究を担当し、これまで六味丸散剤について検討、報告した¹⁻³⁾。今回は病後の体力低下、疲労倦怠、食欲不振に効果があるとされている十全大補湯 (Juzen-taiho-to: Shi-Quan-Da-Bu

-Tang)⁴⁾を検討対象とした。

材料と方法

被検物質: 十全大補湯は(株)ツムラに製造委託し、乳糖を添加しないエキス末を購入し用いた。エキス末は人參、黄耆、蒼朮、茯苓、当帰、芍薬、地黄、川芎、桂皮各3、甘草1.5の配合比率であり、日本薬局方試験に適合し、高品質の薬剤であると報告されている⁵⁾。本剤は硬質ポリエチレン製容器に乾燥剤とともに充填され、ボトルインナーシールで密封された状態で搬入され、使用開始まで当所低温薬品庫にて4℃で保管された。

実験動物及び飼育環境: F344/DuCrj ラット雌雄(日本チャールス・リバー、神奈川)各40匹を4週齢で購入し、バリア飼育室の自動給水装置付きベルト式飼育棚のステ

*東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎3-16-25

*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research

Laboratory of Public Health, 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 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

ンレス製懸垂式個別ケージに1匹ずつ収容した。予備飼育は1週間とし、この期間は基礎飼料CE-2(日本クレア、東京)と水道水(細菌ろ過器経由)とを自由に摂取させた。飼育室は室温22~24℃、湿度50~60%、換気1時間に10回(効率99.9%HEPA フィルター経由)、照明6:00~18:00にそれぞれ制御されている。

投与方法及び用量: 被検物質は飼料に添加し、これをラットに摂取させ投与した。本試験に用いた十全大補湯エキスは、ヒトでは1日5g(乳糖添加の場合は、7.5g)を服用することから、1日の薬用量は100mg/kg体重(5g/50kg体重)とした。この薬用量を最低投与量とするため、ラットに摂取させる飼料中の薬剤最低濃度を以下の如くに設定した。すなわち、当所の蓄積データでは、F344/DuCrj ラットの体重kg当り1日摂取量は50~100gであるが、本実験では最小値の50gとし、濃度0.2%(十全大補湯100mg/飼料50g)でヒトの薬用量を投与できると考えた。そこで、これを低濃度とし、公比4で0.8及び3.2%を、それぞれ中及び高濃度とした。これらに薬剤無添加の飼料を加え、合計4種類の試験飼料を用いることとした。試験飼料は日本配合飼料(株)知多工場に製造依頼し、粉末飼料CE-2(日本クレア)に各設定濃度で添加混合し、ペレットにしたものを購入した。試験飼料は使用開始まで、4~10℃の冷蔵飼料庫に保管した。

投与群及び期間の設定: ラットは入室1日後に体重測定し、層別化ランダム方式によって雌雄各4群に分け、各群10匹のラットで構成した。試験飼料はラットが5週齢になった時点から13週間摂取させた。

一般状態観察: 瀕死、死亡および異常行動の有無、被毛、可視粘膜の観察は1日2回、1週間に5日行った。土、日曜日及び祝祭日の観察は午前1回とした。摂取および摂水量(重量)は1週間に1回測定した。この際は、自動給水装置ではなく、給水瓶で飲料水を与えた。

血液学的検査: 投与終了後、エーテル麻酔下で大腿動静脈より採血し、多項目自動血球計数装置E-4000(東亜医用電子)により、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘモグロビン濃度(Hg)、ヘマトクリット値(Ht)及び血小板数を測定した。これらの数値から、平均赤血球容量(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。また、メイ・ギムザ染色血液塗沫標本により異常血液細胞の検索および白血球の分画を行った。

血清生化学的検査: 血液学的検査試料採取後の血液を遠心管にとり、3000rpm/secで10分間遠心、上清を分離

し、自動分析装置 Automatic Analyzer7150(日立)を用いて、アルカリホスファターゼ活性、アミラーゼ活性、コリンエステラーゼ活性、クレアチン磷酸酵素活性(CPK)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性(GGT)、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)、ロイシンアミノペプチダーゼ活性、乳酸脱水素酵素活性(LDH)、アルブミン量、クレアチニン量、尿酸量(UA)、尿素窒素量(UN)、血糖量(GLU)、無機性磷酸塩量、総コレステロール量、遊離型コレステロール量(FCHO)、エステル型コレステロール量、燐脂質量(PL)、中性脂肪(TG)、総蛋白量、血清カルシウム量、血清塩素量(Cl)、血清カリウム量、血清ナトリウム量(Na)を測定した。

病理学的検査: 投与期間終了後、生存例はエーテル麻酔下で放血屠殺し、肉眼的検索を行った。脳、心臓、肺、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣、前立腺、子宮、卵巣は摘出し、器官重量を測定した。その他、顎下腺、舌下腺、耳下腺、食道、胃、大・小腸、膵臓、膀胱、包皮腺、陰核腺、乳腺、大腿骨を摘出した。摘出した器官組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従ってパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン重染色後、光学顕微鏡にて組織学的検索を行った。

統計学的分析: 体重、摂取及び摂水量、血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器重量等の測定値の検定は、Bartlett 検定法を用い、分散の均一性について検定し、分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った。また、分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った。危険率は全て5%においた。

結 果

投与期間中、雌雄のC群(対照群、0%添加飼料摂取)及び投与群ともに死亡例は無く、全例が投与終了時まで生存した。一般状態観察では、投与期間を通して各群とも自発運動は活発であり、投与群にのみ発現した行動、異常症状、あるいはC群に比べ投与群に強く現れた外観の変化は見られなかった。

体重増加の推移を Fig 1 及び 2 に示した。C群に比べ、投与群雌雄の体重増加曲線の勾配は、投与開始時から終了時まで、やや緩やかであった。投与群間の比較では、投与濃度に比例した増加曲線の勾配の差異は見られなかった。

Table 1 に、各群の平均体重値の変動を示した。C群に比べ投与群の平均体重は、第2及び4週のM群(0.8%

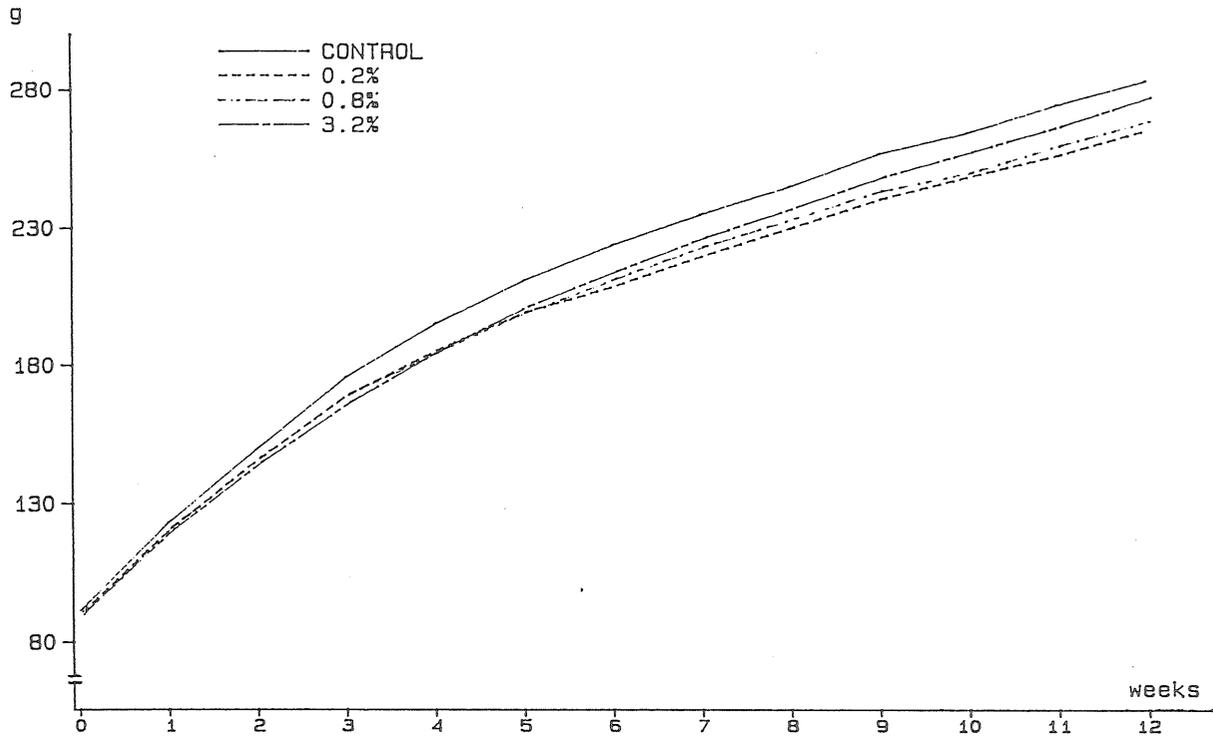


Fig. 1. Body weight changes in male rats

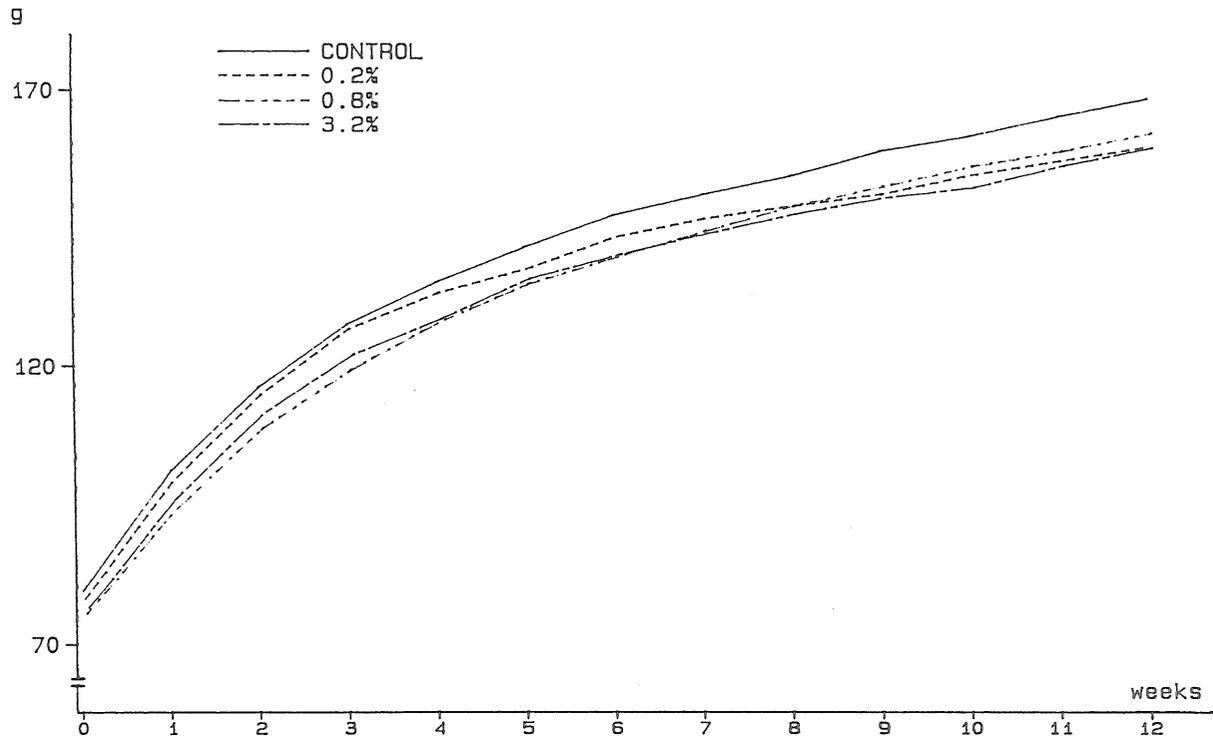


Fig. 2. Body weight changes in female rats

添加飼料摂取)雌で絶対重量が有意に低い値を示した。しかし、その他の測定週ではM群雌雄を含め、L群(0.2%添加飼料摂取)、H群(3.2%添加飼料摂取)雌雄の絶対重量及び増加率(投与前の体重値を100とした各週の

体重値)はC群よりやや低い程度の値で終始した。最終時におけるC群雌雄の増加率の平均値をそれぞれ100とした指数で表すと、投与群は、雄ではL群94、M群97、H群98、雌ではL群97、M群102、H群99であった。これ

Table 1. Body weight changes in rats fed diets containing Juzen-taiho-to for 13 weeks

Group ¹⁾	Male				Female				
	C	L	M	H	C	L	M	H	
No. of rats ²⁾	10	10	10	10	10	10	10	10	
Wk									
1	91 ± 4 ³⁾	91 ± 4	90 ± 3	91 ± 3	80 ± 3	78 ± 4	76 ± 4	77 ± 4	
2	123 ± 6	121 ± 5	122 ± 5	121 ± 7	101 ± 4	99 ± 5	94 ± 7*	96 ± 4	
	135 ± 3 ⁴⁾	133 ± 3	135 ± 4	132 ± 5	127 ± 3	127 ± 2	124 ± 3	126 ± 4	
3	150 ± 9	146 ± 10	147 ± 7	145 ± 11	116 ± 5	115 ± 7	109 ± 8	112 ± 6	
	164 ± 5	161 ± 7	163 ± 6	159 ± 8	146 ± 3	147 ± 4	144 ± 5	146 ± 5	
4	175 ± 11	169 ± 12	170 ± 8	167 ± 15	128 ± 5	127 ± 7	119 ± 8*	126 ± 6	
	193 ± 6	187 ± 9	189 ± 8	183 ± 12	160 ± 5	162 ± 5	158 ± 5	159 ± 7	
5	195 ± 12	185 ± 14	185 ± 8	185 ± 19	135 ± 6	133 ± 8	128 ± 9	129 ± 7	
	213 ± 7	205 ± 12	206 ± 9	204 ± 17	170 ± 7	170 ± 5	169 ± 7	168 ± 8	
6	211 ± 14	166 ± 14	200 ± 10	202 ± 23	142 ± 8	138 ± 9	135 ± 9	136 ± 7	
	231 ± 8	220 ± 14	222 ± 11	222 ± 21	178 ± 10	176 ± 10	178 ± 7	177 ± 9	
7	224 ± 15	209 ± 16	212 ± 12	215 ± 25	147 ± 10	143 ± 11	140 ± 11	140 ± 7	
	245 ± 10	231 ± 16	235 ± 14	236 ± 25	185 ± 11	183 ± 8	185 ± 10	183 ± 11	
8	235 ± 16	220 ± 19	223 ± 15	227 ± 28	151 ± 10	147 ± 13	144 ± 12	144 ± 8	
	257 ± 12	243 ± 20	248 ± 17	249 ± 28	190 ± 13	187 ± 9	191 ± 12	188 ± 13	
9	245 ± 17	230 ± 20	233 ± 19	237 ± 30	154 ± 11	149 ± 13	149 ± 13	147 ± 7	
	268 ± 12	254 ± 21	259 ± 21	260 ± 31	194 ± 13	190 ± 9	197 ± 13	193 ± 13	
10	257 ± 18	240 ± 22	243 ± 20	248 ± 30	159 ± 12	151 ± 14	153 ± 15	150 ± 8	
	281 ± 14	265 ± 23	270 ± 23	273 ± 31	199 ± 14	193 ± 11	202 ± 16	197 ± 14	
11	264 ± 19	248 ± 23	250 ± 21	258 ± 31	162 ± 13	155 ± 13	156 ± 14	152 ± 7	
	290 ± 16	274 ± 24	278 ± 25	283 ± 31	203 ± 16	197 ± 10	207 ± 14	199 ± 15	
12	274 ± 18	256 ± 22	260 ± 22	267 ± 32	165 ± 14	157 ± 13	159 ± 15	156 ± 7	
	301 ± 17	283 ± 24	289 ± 26	293 ± 33	207 ± 17	201 ± 11	210 ± 16	205 ± 15	
13	283 ± 19	265 ± 22	269 ± 21	277 ± 32	169 ± 14	160 ± 14	162 ± 15	160 ± 8	
	310 ± 18	293 ± 24	299 ± 26	305 ± 32	212 ± 17	204 ± 11	215 ± 17	209 ± 15	
Final ⁵⁾	288 ± 18	270 ± 21	275 ± 21	281 ± 29	170 ± 12	162 ± 13	165 ± 14	162 ± 8	
	316 ± 18	298 ± 25	305 ± 27	309 ± 33	213 ± 17	207 ± 11	218 ± 17	211 ± 15	

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.2(L), 0.8(M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets.

2) No. of rats weighed throughout the study. 3) Absolute weights (g, Mean ± SD). 4) Increasing rate (weight x 100/the initial weight, Mean ± SD). 5) Weights at the day of the autopsy.

* Significant differences to the control (P < 0.05).

らの指数でみると、雌雄とも H 群の抑制が L 群よりも軽度であったごとく、投与濃度に関連した体重増加の抑制は投与終了時においても認められなかった。

摂餌量の変化を Table 2 に示した。投与群雌雄の摂餌量は C 群に比べ、第 1 週的全投与群、第 9 から 10 週の L 及び M 群雄、第 11 週の L 群雄で有意に少なかった。その他は、各投与群とも終了時までやや少ない値で推移した。投与濃度に比例した摂餌量の増減は認められなかった。

試験期間中の通算平均摂餌効率(通算 1 日当たり平均体重増加量 g / 通算 1 日当たり平均摂餌量 g) を概算すると、雄では C 群を含む全群が 0.16、雌では C 群が 0.09 で、投与群は全て 0.10 であった。飼料のコボシ量をみると、C 群に比べ H 群雄雌雄は、投与開始から少量であり、雄では第 4 週目までと第 13 週、雌では第 2 週から第 7 週までと第 10 及び 11 週目は有意に少なかった。その他の投与群も、やや少ない量で終始した。試験期間を通しての 1 日当た

Table 2. Food consumption in rats fed diets containing Juzen-taiho-to for 13 weeks

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
Wk	10	10	10	10	10	10	10	10
1	13.1±0.8 ³⁾	11.5±0.5*	10.4±0.7*	10.7±2.3*	11.1±0.5	9.7±0.4*	8.4±0.8*	9.1±0.8*
	2.5±0.4 ⁴⁾	2.6±0.9	2.1±0.3	1.8±0.3*	2.1±0.5	2.4±0.6	2.6±0.7	1.6±0.4
2	13.0±1.0	12.3±1.0	12.7±0.6	12.4±0.8	10.5±0.7	10.4±0.9	9.7±0.9	10.0±0.7
	2.4±0.5	2.5±0.7	2.6±0.7	1.8±0.6*	2.0±0.5	2.3±0.6	2.3±0.6	1.5±0.4*
3	14.7±1.1	13.8±1.2	13.7±0.4	13.6±1.1	11.6±0.6	11.2±1.0	11.1±0.8	11.0±0.9
	2.8±0.6	2.6±0.6	2.8±0.9	1.9±0.5*	2.2±0.5	2.3±0.7	2.2±1.0	1.4±0.5*
4	14.2±1.0	13.6±1.1	13.4±0.9	13.5±1.5	10.7±0.9	10.6±1.3	10.1±1.1	9.7±1.5
	2.9±0.8	2.9±0.8	2.8±0.9	1.8±0.4*	2.3±0.4	2.4±0.7	2.3±0.4	1.6±0.4*
5	14.4±1.0	13.1±1.0	13.1±0.9	13.5±1.7	10.2±1.0	10.2±1.2	9.6±0.9	9.7±0.8
	2.7±0.6	2.7±0.7	2.4±0.5	2.1±0.8	2.3±0.7	2.4±0.4	2.0±0.4	1.6±0.5*
6	15.1±1.3	14.6±1.2	14.2±1.4	14.1±2.1	10.6±1.4	10.4±1.0	10.6±0.9	9.9±0.9
	2.7±0.9	3.0±0.9	3.1±0.8	2.5±1.0	2.4±0.8	2.2±0.6	2.3±0.6	1.3±0.5*
7	13.9±1.0	12.4±1.4	12.6±1.7	13.2±1.9	9.8±1.4	9.3±1.4	9.3±1.5	9.3±1.2
	2.9±0.7	2.2±0.7	2.4±0.9	2.1±0.7	2.0±0.6	1.9±0.7	2.1±0.8	1.1±0.3*
8	13.9±1.0	12.7±1.5	12.7±1.4	13.6±1.6	9.5±1.2	9.1±1.3	9.7±1.1	9.3±1.4
	2.6±0.5	2.7±0.8	2.4±0.6	2.3±0.8	2.0±0.8	1.8±0.4	2.0±0.5	1.4±0.6
9	14.7±0.7	13.0±1.8*	12.9±1.6*	13.8±1.6	9.2±1.3	8.9±1.2	9.6±1.4	8.8±0.9
	3.1±1.0	2.4±0.9	2.4±0.9	2.3±0.8	1.9±0.6	1.6±0.5	1.9±0.6	1.1±0.3
10	13.8±1.1	12.2±1.1*	12.2±1.4*	13.5±1.7	9.3±1.4	8.3±1.2	9.1±1.2	8.0±1.1
	2.5±0.5	2.5±0.8	1.9±0.7	1.9±0.7	2.0±0.7	1.6±0.4	1.9±0.6	1.2±0.6*
11	14.2±1.0	12.4±1.2*	13.2±1.6	13.9±1.5	9.3±1.5	8.7±1.2	9.6±1.2	9.2±0.8
	3.0±0.7	2.4±0.9	2.1±0.6*	2.2±1.0	2.0±0.8	1.7±0.4	2.2±0.4	1.3±0.5*
12	14.0±1.3	12.6±1.2	13.4±1.3	13.6±1.3	9.4±0.9	8.7±0.9	9.4±1.2	8.7±0.8
	2.7±0.8	2.2±0.5	2.3±0.9	2.0±1.0	1.6±0.5	1.5±0.3	2.0±0.5	1.2±0.4
13	15.1±1.3	13.8±1.0	13.9±2.2	14.3±1.4	10.1±1.3	9.6±1.0	9.8±0.8	9.3±0.9
	3.2±0.8	2.6±0.8	2.5±0.7	2.2±0.5*	1.7±0.6	1.7±0.6	1.9±0.4	1.2±0.4

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.2(L), 0.8(M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets.

2) No. of rats weighing food intake throughout the study. 3) Food consumption (g/rat/day, Mean ± SD). 4) Weight of broken food in a dish under a cage (g/rat/day, Mean ± SD).

* Significant differences to the control (P < 0.05).

り薬物投与量(mg/体重kg)の単純平均値は、摂餌量から換算すると、雄のL群142, M群561, H群2,272, 雌のL群150, M群610, H群2,458であり、雌雄ともL群からH群にかけて、ほぼ公比4で増加していた。

摂水量の変化をTable 3に示した。投与群雌雄の摂水量は、C群に比べ第11週のL群雄で有意に少なかったが、他は投与開始から終了時まで、顕著な差異は見られなかった。また、投与濃度に比例した摂水量の減少は認められなかった。

血液学的検査の結果をTable 4に示した。雄では、C群に比べ投与群のWBC, RBC, Hg及びHtは少なく、H群ではHt以外の項目は有意に減少していた。白血球の分画では、C群に比べM及びH群の好中球の比率が高く、リンパ球が低く、H群では何れも有意であった。雌では、C群に比べM群のWBCは有意に多く、投与群のRBC及びHtはごく軽度に少なかった。M群のMCH及びMCHCが有意に高く、H群も軽度に高かった。白血球の分画では、C群に比べ投与群の好中球の比率が低く、リ

Table 3. Water consumption in rats fed diets containing Juzen-taiho-to for 13 weeks

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
Wk	10	10	10	10	10	10	10	10
1	16.0±1.3 ³⁾	16.4±1.5	15.3±1.3	14.9±5.1	14.6±1.3	14.6±1.0	14.3±3.3	14.1±1.9
2	17.1±1.7	16.8±2.1	17.0±1.3	16.6±1.0	15.4±2.6	14.8±2.9	15.3±2.2	15.4±1.4
3	19.1±3.3	17.5±2.5	17.6±1.0	18.3±1.6	16.3±1.8	15.6±1.3	15.5±1.1	15.5±2.0
4	18.1±1.9	17.7±2.1	17.4±1.7	17.6±1.6	15.5±1.6	15.8±1.4	15.5±1.3	15.6±1.5
5	18.3±1.8	16.7±1.8	17.0±1.3	17.4±2.3	16.1±4.1	14.6±1.6	14.3±1.7	14.8±1.5
6	19.1±1.8	18.5±2.3	18.6±2.0	18.5±2.7	15.4±1.9	14.9±2.2	16.1±1.4	15.0±1.8
7	18.4±1.5	16.6±2.4	17.4±1.9	17.4±2.7	14.9±1.9	14.0±1.8	14.6±1.9	14.9±2.5
8	17.9±1.8	16.4±2.5	16.9±1.8	17.1±2.3	14.0±2.5	13.8±1.5	15.3±1.8	15.4±4.1
9	18.3±1.6	16.0±2.6	16.4±1.6	17.5±2.2	13.6±2.8	12.7±2.0	13.7±2.1	14.0±2.7
10	17.5±1.9	16.1±2.8	16.8±1.9	18.3±2.6	14.3±3.1	12.1±2.0	14.0±2.1	12.8±2.0
11	18.1±1.6	15.9±2.4*	16.7±1.6	18.3±2.2	14.3±3.3	13.4±1.5	14.2±2.1	13.5±2.1
12	17.2±1.8	16.4±2.1	17.3±1.7	18.3±2.5	14.5±1.8	13.0±1.7	14.6±2.6	14.3±4.2
13	18.8±1.7	17.1±1.9	17.4±2.1	19.2±2.6	15.0±2.6	14.7±2.4	15.0±1.7	14.3±2.4

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats for measuring water consumption throughout the study. 3) Water consumption (g/rat/day, Mean ± SD). * Significant differences to the control (P<0.05).

ンパ球が高かった。これら各検査項目のうち、雄の WBC, RBC, Hg 及び Ht は軽度ながら投与濃度に関連した低下であったが、その他の項目は投与濃度に伴う変動を示さなかった。雄での変化を個体別にみても、測定値がC群の最低値未満であった例は、WBC では、L 群 7/10 (10例中7例の意)、M群 5/10、H群 7/10であった。RBC では、L群 2/10、M群 0/10、H群 4/10、RBC と Hg または Ht ではH群が 1/10であった。また、WBC, RBC, Hg 及び Ht が全て C群の最低値未満であった例は見られなかった。

血清生化学検査の結果は Table 5 及び 6 に示す如くであり、多数の項目で、投与群とC群との間に有意差が認められた。このうち、H群で有意差があり、しかも投与濃度の増加に伴い一定の増減傾向を示した項目は、雄では、GGT, UA, GLU, FCHO, PL 及び TG の低下、CI 及び Na の上昇、雌では CPK, GOT, GPT, GOT/GPT, LDH 及び UN の上昇であった。このうち顕著な変動を示したのは、雄では TG の低下、雌では CPK, GOT 及び LDH の上昇であった。これらの測定値を個体別にみても、TG の低下において、C群の最低値未満であった例は、L群 4/10、M群 9/10、H群10/10であり、このうち最低値の 1/2 以下と顕著な低下を示した例が

H群で 4/10にみられた。さらに、この4例中2例は体重増加率がC群の最低値以下であり、この2例中1例は血液検査において RBC と Hg とがC群の最低値未満であった。雌での CPK, GOT 及び LDH の上昇において、C群の最高値を超えた例はL群ではみられず、CPK または LDH では、M群各 2/10、H群各 5/10、GOT では M 群 1/10、H群 4/10であった。GOT の上昇を示した全例が、CPK 及び LDH の上昇例と一致していた。

臓器重量測定の結果を Table 7 及び 8 に示した。絶対重量でC群との間に有意差を生じたのは、雌の L及び H 群の肺の減少であったが、相対重量(体重100g 当りの重量)ではほぼ同じであり、有意差は無かった。相対重量で、C群との間に有意差を示したのは、雄では L 及び H 群の肝臓の減少、H群の右副腎の増加、雌では M群の肝臓の増加であった。これら臓器重量は、投与濃度と明らかに関連した変動ではなかった。一方、これらの測定値を個体別にみても、雄では体重増加率及び TG が C 群の最低値未満であった H群の 2例は肝臓の相対重量も C群の最低値未満であった。雌では GOT が C群の最高値以上であった M 及び H群の各 1例が肝臓の相対重量も C群の最高値を超えていた。

剖検時の肉眼的検査では、雌雄の各群とも外観から、

Table 4. Summary of hematological examination

Group ¹⁾		C	L	M	H
No. of rats ²⁾		10	10	10	10
Male					
WBC ³⁾	(10 ³ /mm ³)	6.3±0.7 ⁴⁾	5.1±0.7*	5.3±0.7*	4.9±0.7*
RBC ⁵⁾	(10 ⁶ /mm ³)	9.92±0.28	9.78±0.28	9.74±0.14	9.57±0.22*
Hemoglobin	(g/dl)	17.0±0.4	16.8±0.3	16.8±0.2	16.6±0.2*
Hematocrit	(%)	50.2±1.6	50.0±1.2	49.6±0.8	49.3±0.6
Platelet	(10 ³ /mm ³)	652±80	702±39	699±42	726±47*
MCV ⁶⁾	(μ ³)	50.6±0.5	51.1±0.8	51.0±0.8	51.5±1.0
MCH* ⁷⁾	(μ μg)	17.2±0.3	17.1±0.4	17.2±0.3	17.4±0.3
MCHC ⁸⁾	(%)	33.9±0.6	33.5±0.7	33.8±0.7	33.7±0.2
<u>Differential of leukocytes (%)</u>					
Neutrophils		13.5±3.8	11.8±2.6	16.1±4.3	19.1±5.4*
Lymphocytes		84.8±4.1	87.0±2.6	82.0±4.8	78.8±5.5*
Monocytes		1.0±1.1	0.6±0.7	0.7±0.8	0.9±1.2
Eosinophils		0.7±1.1	0.6±0.7	1.2±0.9	1.2±0.9
No. of rats		10	10	10	10
Female					
WBC	(10 ³ /mm ³)	5.1±0.9	5.2±0.6	6.2±1.0*	5.4±0.6
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	9.01±0.19	8.95±0.14	8.96±0.15	8.92±0.27
Hemoglobin	(g/dl)	16.4±0.3	16.3±0.2	16.7±0.3	16.5±0.6
Hematocrit	(%)	48.1±0.9	47.5±0.7	47.9±0.8	47.7±1.5
Platelet	(10 ³ /mm ³)	741±77	697±28	700±45	721±52
MCV	(μ ³)	53.4±0.5	53.2±0.5	53.5±0.3	53.5±0.2
MCH	(μ μg)	18.2±0.2	18.3±0.2	18.6±0.2*	18.5±0.3
MCHC	(%)	34.2±0.5	34.4±0.2	34.8±0.4*	34.5±0.4
<u>Differential of leukocytes (%)</u>					
Neutrophils		15.3±9.0	14.2±4.1	12.7±8.8	15.0±2.8
Lymphocytes		82.5±9.2	83.7±4.0	85.6±4.3	84.1±3.2
Monocytes		1.1±1.0	1.1±0.9	0.8±0.8	0.6±0.7
Eosinophils		1.1±0.9	1.0±1.1	0.7±1.1	0.3±0.5

1) Rats in each group were fed diet containing 0(C), 0.2(L), 0.8(M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats examined. 3) White blood cell count. 4) Mean ± SD. 5) Red blood cell count. 6) Mean corpuscular volume. 7) Mean corpuscular hemoglobin. 8) Mean corpuscular hemoglobin concentration.

* Significant differences to the control (P<0.05).

被毛, 可視粘膜等に異常は無かった. 解剖所見では, 皮下, 各腔内及び各臓器組織に明らかな異常は認められなかった.

組織学的検査において, 投与群にのみ見られた変化, C群に比べ投与群で強く見られた変化あるいは高頻度に出現した変化は認められなかった.

考 察

投与期間中, 飼育及び投与に関わる事故並びに感染性

疾病による損失例は発生せず, 実験環境及び手技は良好であった. すなわち, 本試験では供試動物に対する被検薬剤の作用が, その他の要因によって影響される危険性は極めて低かったと考えられる. 薬剤投与量は雌雄ともL群からH群にかけて, 設定のごとく, ほぼ公比4で増加していた. 従って, 本試験で観察される種々の変化, とくに投与群で濃度に伴って発現する変化は十全大補湯摂取に起因するとともに, 用量に依存していると思なす

Table 5. Summary of serumchemistry of male rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Alkaliphosphatase (IU/l)	550±33 ³⁾	504±44*	543±34	498±51*
Amylase (IU/l)	6215±655	6126±356	6388±609	6161±885
Cholinesterase (ΔpH)	0.05±0.01	0.07±0.03	0.07±0.02	0.07±0.02
CPK ⁴⁾ (IU/l)	3165±1534	3785±931	3236±1510	2052±886
GGT ⁵⁾ (IU/l)	3.9±0.3	3.6±0.6	3.2±0.4*	2.8±0.3*
GOT ⁶⁾ (IU/l)	118±18	114±19	106±21	96±19
GPT ⁷⁾ (IU/l)	58±6	55±13	51±9	48±10
GOT/GPT	2.05±0.29	2.10±0.16	2.07±0.26	1.99±0.23
LPA ⁸⁾ (GR-U)	176±5	176±4	176±3	175±4
LDH ⁹⁾ (IU/l)	1252±258	1203±170	1061±276	1079±133
Albumin (g/dl)	2.8±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1	2.8±0.1
Albumin/globulin ratio	0.76±0.02	0.78±0.03	0.77±0.04	0.77±0.03
Creatinine (mg/dl)	0.50±0.03	0.51±0.03	0.55±0.01*	0.48±0.03
Uric acid (mg/dl)	1.6±0.2	1.6±0.5	1.4±0.2	1.1±0.1*
Urinary nitrogen (mg/dl)	24.7±1.5	23.4±1.7	25.0±1.3	22.6±1.7
Glucose (mg/dl)	196±11	184±17	182±6	172±8*
Inorganic phosphate (mg/dl)	5.8±0.3	5.6±0.5	5.4±0.5	6.6±0.4*
Total cholesterol (mg/dl)	55±3	56±2	57±5	53±5
F-cholesterol ¹⁰⁾ (mg/dl)	15±1	14±2	13±1*	12±2*
E-cholesterol ¹¹⁾ (mg/dl)	40±2	41±2	43±3	41±3
Phospholipid (mg/dl)	136±6	131±9	131±4	122±10*
Triglyceride (mg/dl)	134±11	110±38	92±12*	64±24*
Total protein (g/dl)	6.4±0.1	6.3±0.1	6.4±0.1	6.3±0.2
Calcium (mg/dl)	10.2±0.1	9.9±0.3*	9.9±0.1*	9.9±0.3*
Chlorine (mEq/l)	104.8±1.5	106.9±1.7*	107.3±1.4*	107.4±1.9*
Kalium (mEq/l)	4.99±0.22	5.10±0.30	5.17±0.30	5.16±0.30
Natrium (mEq/l)	140.7±1.4	142.0±1.2	142.8±1.3*	143.0±1.5*

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean±SD. 4) Creatine phosphokinase. 5) γ -glutamir transaminase. 6) Glutamic oxalacetic transaminase. 7) Glutamic pyruvic transaminase. 8) Leusin aminopeptidase. 9) Lactic dehydrogenase. 10) Free cholesterol. 11) Esterified cholesterol. * Significant differences to the control (P<0.05).

ことができる。また、これらの投与量はヒトの薬用量に比べ、雄で1.4~23倍、雌で1.5~25倍に相当することから、ヒトの薬用量から極量に近い量まで投与できたと考えられる。以上のことから、本試験は供試動物に対する十全大補湯の作用を十分に観察できる条件を満足するものであったと評価できる。

投与期間を通して一般症状に異常は無く、死亡例も見られないことから、十全大補湯に特異的あるいは非特異的致死作用は無いと考えられる。

体重増加の抑制はL群雄で軽度、その他の投与群雌雄においてもごく軽度に見られたが、各群のラットに自発運動の低下、削瘦または小型化は認められないことから抑制は栄養状態の悪化、成長阻害を表現するものではないと思われる。また、摂餌量及び摂水量は対照群に比べ、投与各群でやや少ないが、摂餌効率に差異はないことから、L群雄を含め体重増加抑制は消化吸收等の障害に起因するものではなく、摂餌量の大小に比例した体重増加であったと考えられる。また、投与群の飼料のコボ

Table 6. Summary of serumchemistry of female rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Alkaliphosphatase (IU/l)	438±26 ³⁾	475±55	503±57*	472±74
Amylase (IU/l)	4469±185	4846±710	4873±795	4793±329
Cholinesterase (ΔpH)	0.79±0.17	0.71±0.13	0.81±0.18	0.73±0.12
CPK ⁴⁾ (IU/l)	2814±1542	2407±722	5219±1343*	6574±2090*
GGT ⁵⁾ (IU/l)	2.7±0.5	3.0±0.4	3.3±0.5	3.4±0.9
GOT ⁶⁾ (IU/l)	90±18	88±9	122±13*	137±29*
GPT ⁷⁾ (IU/l)	40±6	39±2	48±5*	49±4*
GOT/GPT	2.24±0.21	2.25±0.18	2.56±0.23*	2.77±0.43*
LPA ⁸⁾ (GR-U)	169±14	184±13*	175±8	183±10*
LDH ⁹⁾ (IU/l)	881±186	843±89	1263±192*	1456±337*
Albumin (g/dl)	2.7±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1	2.7±0.1
Albumin/globulin ratio	0.80±0.04	0.83±0.03	0.82±0.043	0.81±0.06
Creatinine (mg/dl)	0.43±0.03	0.44±0.03	0.49±0.04*	0.48±0.03*
Uric acid (mg/dl)	1.2±0.8	1.0±0.1	1.3±0.2*	1.5±0.2*
Urinary nitrogen (mg/dl)	19.9±1.1	21.7±2.5	22.9±1.5*	22.0±1.8*
Glucose (mg/dl)	164±7	159±6	167±11	167±14
Inorganic phosphate (mg/dl)	6.2±1.0	5.5±0.3	5.5±0.5	5.3±0.8
Total cholesterol (mg/dl)	75±4	71±4	74±5	73±4
F-cholesterol ¹⁰⁾ (mg/dl)	22±1	19±1*	20±2*	18±1*
E-cholesterol ¹¹⁾ (mg/dl)	53±4	52±3	54±4	55±3
Phospholipid (mg/dl)	149±7	142±8	162±11*	149±8
Triglyceride (mg/dl)	33±6	34±10	76±27*	54±38
Total protein (g/dl)	6.0±0.4	5.9±0.1	6.2±0.3	6.1±0.3
Calcium (mg/dl)	9.9±0.6	9.5±0.2*	9.8±0.2	9.8±0.2
Chlorine (mEq/l)	109.8±2.5	112.3±1.5*	109.6±1.2	111.0±0.7
Kalium (mEq/l)	5.01±0.95	4.73±0.16	5.00±0.39	5.02±0.29
Natrium (mEq/l)	143.1±1.4	144.3±1.2	143.1±1.0	143.3±0.8

1) Rats in each group were fed diet containing 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean±SD. 4) Creatine phosphokinase. 5) γ -glutamir transaminase. 6) Glutamic oxalacetic transaminase. 7) Glutamic pyruvic transaminase. 8) Leusin aminopeptidase. 9) Lactic dehydrogenase. 10) Free cholesterol. 11) Esterified cholesterol. * Significant differences to the control (P<0.05).

シ量は対照群に比べ各群とも少ないことから、摂餌量の低下はラットが被検薬剤の摂取を忌避したことに因るものではない。すなわち、十全大補湯投与は一般健康状態または成長発達に悪影響を及ぼさなかったと判断できる。

血液検査の結果、投与に関連した有意な変動が認められたが、これらはC群に比べての群としての増減または高低での一定傾向を示すものである。これに対し、測定値を個体別に検討する際は、C群の最高値と最低値との幅から逸脱した例について、さらに他の検査結果とを照

合して判断すべきと思われる。これらを前提として変動をみてみると、投与に関連して現れた群としての変化は極めて軽度ではあるが、雄での貧血傾向である。これを個体別にみてみると、RBCに加えてHgまたはHtがC群の最低値以下であったのは、H群での1例のみであり、これを貧血と仮定しても発生頻度においてC群との間に有意な差はない。従って、現時点では十全大補湯が雄ラットに貧血を惹起するとは言えない。

血清生化学検査における変動にも血液検査の項と同様

Table 7. Summary of organ weight changes in male rats

Group ¹⁾	C	L	M	H
No. of rats ²⁾	10	10	10	10
Brain (mg)	1935 ± 35 ³⁾	1934 ± 36	1926 ± 36	1926 ± 54
	673 ± 34 ⁴⁾	721 ± 47	705 ± 49	691 ± 57
Heart (mg)	780 ± 53	740 ± 56	732 ± 58	769 ± 78
	270 ± 8	274 ± 8	267 ± 11	274 ± 10
Lung (mg)	877 ± 43	844 ± 55	822 ± 49	865 ± 67
	305 ± 13	314 ± 17	300 ± 12	309 ± 15
Thymus (mg)	175 ± 19	167 ± 9	179 ± 19	169 ± 26
	61 ± 5	62 ± 6	65 ± 6	61 ± 10
Spleen (mg)	523 ± 27	508 ± 37	507 ± 26	518 ± 48
	182 ± 8	188 ± 5	185 ± 7	185 ± 10
Liver (g)	9.30 ± 0.73	8.22 ± 1.07	8.59 ± 0.85	8.69 ± 1.06
	3.23 ± 0.07	3.04 ± 0.17*	3.12 ± 0.09	3.09 ± 0.11*
R. kidney (mg)	881 ± 58	807 ± 58	837 ± 84	860 ± 84
	306 ± 13	299 ± 10	304 ± 11	307 ± 8
R. adrenal (mg)	17.3 ± 1.0	16.0 ± 1.7	16.6 ± 1.8	18.3 ± 1.9
	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.6	6.1 ± 0.3	6.6 ± 0.7*
R. testis (mg)	1347 ± 47	1259 ± 152	1321 ± 46	1378 ± 91
	468 ± 21	470 ± 66	483 ± 28	493 ± 32
Postate (mg)	252 ± 34	204 ± 70	230 ± 69	245 ± 77
	87 ± 11	75 ± 20	83 ± 19	86 ± 20

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats weighed organs weight. 3) Absolute weights (Mean ± SD). 4) Relative weight (mg or g/100g body weight; Mean ± SD).

* Significant differences to the control (P < 0.05).

のことが前提となる。投与に関連して現れた群としての変動は、雄ではTGの低下、雌ではCPK、GOT及びLDHの上昇であった。雄でのTGの低下は代謝機能の低下、栄養失調を示すものであるが、一般状態に異常はなく、体重増加抑制は極めて軽度であった。さらに、個体別にみると、顕著な低下はH群の2例のみであり、これらのGLU、FCHO及びPLの低下は軽度であることから、本実験でのTGの低下が上記の障害を示唆するとは考え難い。また、組織学的検査でも、H群では投与に関連した器質的障害像を認めていない。すなわち、十全大補湯投与が代謝及び栄養障害を惹起したとは判断できない。一方、本実験でのTGの低下が脂肪酸の合成阻害あるいは分解処理機能の亢進を示唆する変化と仮定すれば、病的状態ではない生体に対する作用ではあるが、十全大補湯は高脂血症、動脈硬化に対して改善効果を有するとの知見であると解釈することも可能であろう。しかし、この変化は雌では見られず、作用機序は不明ながら、い

わゆる性差を示した。雌でみられたCPKの上昇、GOT及びLDHの上昇は、それぞれ骨格及び心筋の障害、肝臓障害の指標とされている。しかし、個体別にみるとGOTがC群の最高値以上であったM及びH群の各1例は肝臓の相対重量もC群の最高値以上であったが、組織学的検査では、これに関連した障害像が認められていない。従って、各変化は十全大補湯摂取による特異的反応ではなく、各臓器組織機能に関与する指標の変動であり、薬物投与に対する適応現象であると考えられる。

以上のごとく、投与に伴う種々の変化は障害またはその前駆症状と判断するに足るものではないことから、本実験条件下では、十全大補湯の安全性は高いと推定される。

Table 8. Summary of organ weight changes in female rats

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	C 10	L 10	M 10	H 10
Brain (mg)	1808±35 ³⁾	1779±20	1792±35	1791±39
	1067±63 ⁴⁾	1105±90	1093±81	1111±48
Heart (mg)	509±38	494±42	511±33	504±33
	300±17	306±17	311±9	313±22
Lung (mg)	678±55	617±37*	641±47	629±31*
	399±29	382±20	390±17	390±17
Thymus (mg)	153±24	152±19	145±11	148±11
	(90±15)	94±10	88±8	91±3
Spleen (mg)	373±27	365±22	352±27	354±20
	220±11	226±14	214±19	219±10
Liver (g)	4.81±0.63	4.35±0.42	5.12±0.49	4.94±0.37
	2.82±0.26	2.69±0.15	3.11±0.09*	3.07±0.23
R. kidney (mg)	553±32	559±32	554±43	536±23
	326±21	346±13	337±12	332±16
R. adrenal (mg)	20.9±2.0	18.7±3.7	22.2±4.1	21.4±2.2
	12.3±1.0	11.6±2.0	13.4±1.4	13.3±1.5
R. ovary (mg)	29.9±2.8	26.1±3.4	27.5±5.6	27.2±3.1
	17.6±1.6	16.2±2.2	16.6±2.5	16.9±2.2
Uterus (mg)	395±90	336±90	379±92	374±106
	231±44	207±53	228±45	231±60

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.2 (L), 0.8 (M) or 3.2% (H) Juzen-taiho-to in diets. 2) No. of rats weighed organs weight. 3) Absolute weights (Mean±SD). 4) Relative weight (mg or g/100g body weight; Mean±SD).

* Significant differences to the control (P<0.05).

文 献

- 1) 藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯澤勝廣, 長澤明道, 多田幸恵, 福森信隆, 角 千代, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, 42, 252-242, 1991.
- 2) 藤井 孝, 三栗谷久敏, 矢野範男, 湯澤勝廣, 長澤明道, 多田幸恵, 福森信隆, 角 千代, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, 42, 243-251, 1991.
- 3) 藤井 孝, 福森信隆, 多田幸恵, 三栗谷久敏, 池田虎雄, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 長澤明道,

佐々木美枝子: 和漢医薬学会誌, 10, 149-160, 1993.

- 4) 矢数道明: 臨床応用漢方処方解説, 241-244, 1966, 創元社, 大阪.
- 5) 安田一郎, 高橋奈穂子, 浜野朋子, 瀬戸隆子, 高野伊知郎, 渡辺四男也, 秋山和幸, 末次大作, 新江徹, 森 由子, 清水虎雄, 山川洋平: 東京衛研年報, 43, 39-45, 1992.

没食子酸プロピル及び関連化合物のラット遊離肝細胞における毒性

中川好男*, 田山寿美子*

Cytotoxicity of Propyl Gallate and Related Compounds in Isolated Rat Hepatocytes

YOSHIO NAKAGAWA* and SUMIKO TAYAMA*

Keywords: 没食子酸プロピル propyl gallate, 没食子酸エステル類 gallate esters, 細胞毒性 cytotoxicity, 抗酸化剤 antioxidant, 肝細胞 hepatocytes, ラット rat

没食子酸プロピル(PG)及びそのエステル類は、ジブチルヒドロキソトルエン(BHT)及びブチルヒドロキシアニソール(BHA)と同様に抗酸化剤として加工食品、化粧品、食品容器等に広く使用されている。

PGの毒作用については、急性試験、亜急性試験、長期試験¹⁻³⁾、発ガン性試験^{4,5)}、催奇形性試験⁶⁾、変異原性試験^{7,8)}等の実験系で検討されている。これらの結果に基づき、PGは比較的低毒性のクラスに入る化合物であることが推察される。一方、PGは組織、細胞機能に種々の作用を及ぼすことが報告されている。例えば、PGは核酸合成及び呼吸系の阻害により微生物の成長を抑制した⁹⁾。PGはラット肝のミクロゾームの水酸化、脱メチル化活性を抑制し¹⁰⁻¹²⁾、さらにPGの遊離ラジカルは酸化還元酵素系の活性を阻害した¹³⁾。また、PGはミトコンドリア呼吸系に対して脱共役作用を示した¹⁴⁾。そしてPGはある種の化合物による発ガン作用、催奇形作用に対して抑制効果を示した^{15,16)}。

今回の実験では、組織器官の構成単位である細胞系に及ぼすPGおよび関連エステル類の作用について、ラット遊離肝細胞を用いて検討し、PG細胞毒性の発現機序を考察した。

実験材料と方法

試薬 PG, 没食子酸(GA)及びこのエステル類;メチルエステル(MG), エチルエステル(EG), ブチルエステル(BG), オクチルエステル(OG), ドデシルエステル(DG)は東京化成工業(株)製, 牛血清アルブミンはSigma社製, コラゲナーゼは和光純薬工業(株)製, 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¹⁷⁾のコラゲナーゼ還流法により調製した。肝細胞は12.5mM Hepesと0.1%アルブミンを加えたKrebs-Henseleit緩衝液(pH7.4)に分散(10^6 細胞/ml)させた。95%酸素-5%二酸化炭素気流下、37℃で加温した細胞液に、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したPGまたは関連エステル類を加えて反応を開始した。細胞反応液に加えたDMSOの終濃度は0.5%以下にした。反応開始後、経時的に細胞液を分取し、細胞死とアデニンヌクレオチド濃度を測定した。生細胞は0.16%トリパンブルーの排除能より計数した。またブレップ細胞数は生細胞についてのみ計数した。アデニンヌクレオチドはJones¹⁸⁾によるHPLC法で定量した。

結果

Fig. 1は遊離肝細胞に及ぼすPGの毒作用を示す。PG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、その毒性はPG濃度(0-2.0mM)に依存した。2mM PGを暴露した細胞において、細胞内ATP濃度の速やかな減少を認めた。Fig. 1には示していないが、ATPの減少は一時的なADPとAMPの増加を伴い、反応時間の経過とともにアデニンヌクレオチドプールは枯渇した。また、細胞死に先立ち、細胞膜ブレップが出現した。なおATPを溶解した緩衝液において、PGの添加はそのATP濃度に影響をおよぼさなかった。

Table 1はPG及び関連エステル類の遊離肝細胞に及ぼす毒性を比較した。肝細胞にたいする1mM OG, DG, BGの暴露は急激な細胞死を惹起した。またTableには示していないが、細胞死は細胞内ATPの急激な減少と細胞ブレップの形成を伴った。これらのエステル類はいず

*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

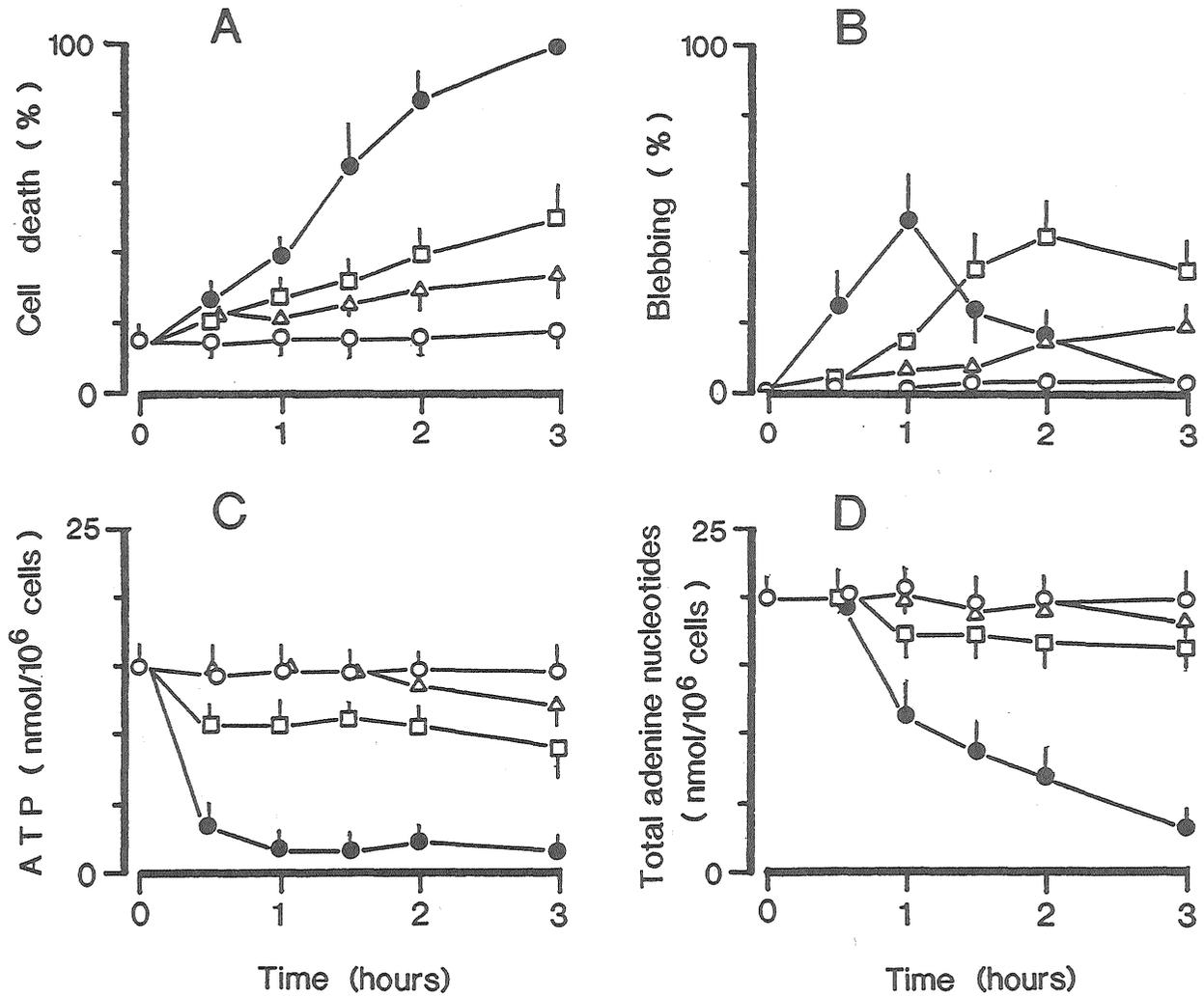


Fig. 1. Effects of PG on cell death (A), cell blebbing (B), levels of intracellular ATP (C) and total adenine nucleotides (D) in isolated rat hepatocytes. Hepatocytes were incubated at 10⁶ cells/ml in Krebs-Henseleit buffer, pH7.4, with no addition (○), 0.5 mM (△), 1.0 mM (□) or 2.0 mM (●) PG. Results are expressed as the mean ± SE of three experiments.

Table 1. Comparative cytotoxicity of PG and related galates on isolated rat hepatocytes.

Treatment (1mM)	Cell death (%)		
	Incubation time (min)		
	30	60	120
None	21 ± 5	19 ± 3	23 ± 4
Gallic acid	17 ± 4	19 ± 7	20 ± 4
Methyl gallate	16 ± 8	21 ± 4	20 ± 5
Ethyl gallate	21 ± 4	22 ± 7	19 ± 5
Propyl gallate	18 ± 6	29 ± 5	30 ± 8
Butyl gallate	25 ± 9	43 ± 11	81 ± 7
Octyl gallate	100	100	100
Dodecyl gallate	67 ± 13	93 ± 3	100

The values are expressed as the means ± SE of three experiments.

れも PG より強い毒性を示した。一方, MG, EG, GA による細胞死は90分までPGと同等であった。なお, 3 時間後において, PG, EG, MG, GA による細胞死はそれぞれ平均60, 45, 40, 25%に達した。

考 察

ここで得られた結果は, PG 及び関連エステル類が遊離肝細胞に急性の障害を引き起こすことを示している。肝細胞内の ATP, アデニンヌクレオチド濃度の減少は暴露したPG の濃度に依存し, 同時に細胞毒性と良く相関する。

関連エステル類の比較毒性において, 特にOG, 次いで DG が強い細胞毒性を示した (Table 1)。しかしラットの経口急性毒性試験において, OG と DG の LD₅₀値 (16.6mmol/kg と 19.2mmol/kg) は PG (17.9mmol/kg) のそれと大差が無かった¹⁹⁾。ラット個体と肝細胞に及ぼす

これらエステル類の毒性の差は、経口的に吸収されたエステル類の血中、組織内濃度の差あるいは没食子酸に結合したエステルの酵素的加水分解及び抱合体形成の速度に関係しているのかもしれない。

没食子酸エステル類による細胞毒性の強さは、没食子酸に結合したアルキル側鎖の分子量の増加に依存した。脂溶性抗酸化剤である BHT と BHA の細胞毒性は、(1) 両化合物の細胞膜疎水相への挿入及び(2)両化合物による酵素機能と膜機能の障害に起因する^{20,21)}。また BHT は親水性部位より膜の内部疎水部位に作用する²²⁾。没食子酸への長鎖アルキル基の導入はそれ自身の疎水性を高める。それゆえに没食子酸エステル類の疎水性の増加は、標的部位に対するエステル類の親和性を必然的に高め、結果的に毒性を増強したものと思われる。

肝細胞において、ミトコンドリアは酸化的磷酸化に依存する主要な ATP 産生器官である。PG はミトコンドリア呼吸系に対して脱共役作用を示した¹⁴⁾。それゆえに PG および関連エステル類による ATP, アデニンヌクレオチドプールの枯渇はミトコンドリア呼吸系の障害を介していることが示唆される。細胞内 ATP の不可逆的減少は化学物質による細胞障害の主要な一因である²³⁻²⁵⁾。事実、この実験においても ADP と AMP の一時的な増加を伴った ATP の急激な減少は、PG による細胞死に先行していた (Fig. 1)。ATP から ADP, AMP への不可逆的代謝は呼吸阻害剤の暴露または酸素欠乏状態の肝細胞で生じる現象である²⁶⁾。BHA 及びほかのフェノール性化合物は FAD および NAD⁺ と関連したオキシダーゼまたはデヒドロゲナーゼの阻害剤でもある^{27,28)}。さらに BHA と BHT による細胞毒性は膜機能の攪乱を介したミトコンドリアエネルギー産生系の障害に依存している²¹⁾。これらの結果は、没食子酸エステル類のフェノール性水酸基がミトコンドリア呼吸の阻害作用に直接関与しており、没食子酸に結合したアルキルエステルがその毒性を高める間接因子と思われる。

肝細胞の細胞膜ブレップの形成は毒物及び酸素欠乏による初期の傷害であると考察されている²⁶⁾。PG によるブレップの出現は細胞死の開始に先行していた (Fig. 1)。細胞内 ATP 濃度の維持がマイクロフィラメントおよび微小管の重合作用に必須であることから²⁹⁾、細胞内 ATP の枯渇は細胞骨格及び細胞膜に傷害を与え、結果的にブレップを形成したと思われる。また、ブレップ形成は細胞内 Ca²⁺ の上昇、ミトコンドリア膜電位の崩壊、細胞内骨格蛋白質における SH 基の酸化またはアルキル化に関与する²⁹⁾。なお予備実験において、PG (500 μM)

は単離したラット肝ミトコンドリアから Ca²⁺ を遊離することを認めた。これらの結果は、PG 及び没食子酸エステル類によるブレップの形成が細胞内アデニンヌクレオチドプール及び Ca²⁺ 恒常性の攪乱と関係していることを示唆する。

要 旨

没食子酸エステル類は遊離肝細胞において、細胞内 ATP, アデニンヌクレオチドプールの枯渇を伴う細胞死を惹起した。長鎖アルキルエステルの OG, DG, BG などの細胞毒性は PG の毒性より強く、GA 及び短鎖アルキルエステルの MG と EG は PG と同程度あるいはそれより弱い毒性を示した。これらエステル類の標的部位のひとつとしてミトコンドリア呼吸系が示唆された。

文 献

- 1) Orten, J.M., Kuyper, A.C. and Smith, A.H. : *Food Technol.*, **2**, 308-316, 1948.
- 2) Lehman, A.G., Fitzhugh, O.G., Nelson, A.A., et al. : *Food Res.*, **3**, 197-208, 1951.
- 3) Dacre, J.C. : *Food Chem. Toxicol.*, **12**, 125-129, 1982.
- 4) NTP, NIH Publication no. 83-1796, 1982, US Department of Health and Human Services.
- 5) Abdo, K.M., Huff, J.E., Haseman, J.K., et al. : *J. Am. Coll. Toxicol.*, **2**, 425-433, 1983.
- 6) Tanaka, S., Kawashima, K., Nakaura, S., et al. : *Shokuhin Eiseigaku Zashi* **20**, 378-384, 1979.
- 7) Kawachi, T., Yahagi, T., Kada, T., et al. : Cooperative program on short-term assays for carcinogenicity in Japan. In Montesano, R., Bartsch, H. and Tomatis, L (eds.), *Molecular and Cellular aspects of carcinogen screening tests*. IARC Scientific Publication, **20**, 323, 1980.
- 8) Abdo, K.H., Huff, J.E., Haseman, J.K., et al., *Food Chem. Toxicol.* **24**, 1091-1097, 1986.
- 9) Boyd, I. and Berveridge, E.G. : *Microscopy* **24**, 173-184, 1979.
- 10) Torrielli, M.V. and Slater, T.F. : *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2027-2032, 1971.
- 11) Yang, C.S. and Strickhart, F.S. : *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 3129-3138, 1974.
- 12) Depner, M., Kahl, G.F. and Kahl, R. : *Food Chem Toxicol.*, **20**, 507-511.
- 13) Brzhevskaya, O.N., Kayushin, L.P. and Nedeline, O.S. : *Biofizika*, **11**, 213-216, 1966.
- 14) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S., et al. : *Mol.*

- Pharmacol.*, **47**, 1021-1027, 1995.
- 15) DeSesso, J.M. : *Teratology*, **24**, 19-35, 1981.
- 16) McCay, P.B., King, M.M. and Pitha, J.V. : *Cancer Res.*, **41**, 3745-3748, 1981.
- 17) Moldeus, P., Hogberg, J. and Orrenius, S. : Isolation and use of liver cells. In Fleisher, S. and Packer L. (eds.) . *Methods in Enzymology*, **52**, 60-71, 1978. Academic Press, New York.
- 18) Jones, D.P. : *J. Chromatogr.*, **225**, 446-449, 1981.
- 19) Van der Heijden, C.A., Janssen, P.J.C.M. and Strik, J.J.T.W. : *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 1067-1070, 1986.
- 20) Tinger, H.M., Packer, L. and Keith, A. : *Biochem. Biophys. Acta*, **283**, 193-205, 1972.
- 21) Thompson, D. and Moldeus, P : *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 2201-2207, 1988.
- 22) Law, P., Cambell, S.D., Lepock, J.P., et al., *Cryobiology*, **23**, 317-322, 1986.
- 23) Regegeld, F.A.M., Moison, R.M.W., Koster, A.S. J., et al. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 215-222, 1988.
- 24) Cannon, J.R., Harvison, P.J. and Rush, G.F. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **108**, 407-416, 1991.
- 25) Nakagawa, Y., Tayama, S., Moore, G.A. et al. : *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1431-1437, 1992.
- 26) Kehrer, J.P., Jones, D.P., Lemasters, J.J., et al. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 165-178, 1990.
- 27) Henneke, C.M. and Wedding, R.T. : *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 446-449, 1975.
- 28) Ferreira, J. : *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 677-684, 1990.
- 29) Nicotera, P., Bellomo, G. and Orrenius, S. : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **32**, 449-470, 1992.

Salmonella typhimurium TA97, TA102を用いた 食品添加物の変異原性試験(第10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 (X*)

HIROSHI FUJITA**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

The mutagenicity of 24 food additives, including 4 flavoring agents, 4 dietary supplements, 4 emulsifiers and 12 others were examined in *Salmonella typhimurium* TA97 and TA102. The mutation test was carried out by the preincubation procedure described by Ames *et al.*¹⁻³⁾. The test chemicals were preincubated with S9mix or phosphate buffer (pH7.4) for 20 min. Weak mutagenic activity in cholecalciferol was detected with TA97 in the absence of S9mix. Sodium *o*-phenylphenate showed weak mutagenicity in TA102 with S9mix. The other 22 chemicals showed no mutagenicity in TA97 or 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及び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試験による検討は、主にTA98及びTA100が用いられ、TA97及びTA102を用いた試験報告は少ない。そこでAmesらの提案に従いTA97及びTA102を用いた試験を実施する必要があると考えられた。試験開始に当たりTA98及び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⁴⁻¹³⁾において277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、着色料(4種)、強化剤(4種)、乳化剤(4種)、食品製造用剤(3種)、結着剤(2種)、保存料

(1種)、着色料(1種)、調味料(1種)、チューインガム基礎剤(1種)、離型剤(1種)、殺菌漂白剤(1種)、防虫剤(1種)の計24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。

実験材料及び方法

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。

着色料：ギ酸シトロネリル(CAS No. 105-85-1, Lot No. TWE3179), ヒドロキシシトロネラル(CAS No. 107-75-5, Lot No. TWE3189), イオノン(CAS No. 8013-90-9, Lot No. KCF4497), dl-メントール(CAS No. 15356-70-4, Aldrich)。

強化剤：ピロリン酸二水素カルシウム(CAS No. 14866-19-4, Lot No. TWM6168), コレカルシフェロール(CAS No. 67-97-0, Lot No. KCL7925), エルゴカルシフェロール(CAS No. 50-14-6, Lot No. CAH1829), ビタミンA(CAS No. 68-26-8, Aldrich Lot No. 14H5015)。

乳化剤：レシチン(CAS No. 8002-43-5, Lot No.

*第9報, 東京衛研年報, 45, 191-199, 1994.

**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

CAL1473), プロピレングリコール脂肪酸エステル(CAS No. 1323-39-3, 東京化成 Lot No. GA01), ソルビタン脂肪酸エステル(CAS No. 1338-41-6, Lot No. KCG5555), ショ糖脂肪酸エステル(東京化成 Lot No. GC01).

食品製造用剤: 活性炭(CAS No. 7440-44-0, Lot No. CAK1692), カオリン(CAS No. 1332-58-7, Lot No. CAJ2878), 二酸化ケイ素(Lot No. CAR2838).

結着剤: ピロリン酸二水素二ナトリウム(CAS No. 7758-16-9, ナカライテスク Lot No. M4K3247), ポリリン酸カリウム(CAS No. 68956-75-2, ナカライテスク Lot No. M4B6188).

保存料: オルトフェニルフェノールナトリウム(CAS No. 132-27-4, 東京化成 Lot No. GA01).

着色料: 食用赤色40号(CAS No. 25956-17-6, Lot No. KCF5928).

調味料: L-アルギニンL-グルタミン酸塩(ナカライテスク Lot No. M4A9599).

チューインガム基礎剤: ポリブテン(CAS No. 9003-29-6, Aldrich Lot No. 03005TY).

離型剤: 流動パラフィン(CAS No. 8012-95-1, Lot No. AWE7011).

殺菌漂白剤: 高度さらし粉(CAS No. 7778-54-3, 関東化学 Lot No. 608E1655).

防虫剤: イマザリル(CAS No. 35554-44-0, Lot No. YLK9134).

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, エタノール, 50%エタノールまたはジメチルスルホキシドに溶解した。ただし, 活性炭, カオリン及び二酸化ケイ素は, 何れの溶媒にも溶けなかったことから蒸留水に懸濁した状態で試験を行った。

菌株 *Salmonella typhimurium* TA97¹⁴⁾ 及び TA102^{15,16)} を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2, OXOID)で一晩培養し用いた。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ーベーション法^{3,17)}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^{3,17)}中のS9量は, 10%(50 μ l/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S9mix0.5ml, 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, 更に一夜培養した菌液を0.1ml加え, 37°Cで20分間の前培養を行った。これに45°Cに保温した軟寒天³⁾2mlを加え混合後, 最少グルコース寒天培地³⁾に重層した。37°Cで2日間培養後, プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した。

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¹⁸⁾を行い, 更にMooreら¹⁹⁾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。

結果及び考察

24種の食品添加物のTA97及び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, 5濃度段階を設定した。ただし, 活性炭, カオリン及び二酸化ケイ素は, 全く溶解しないため, 懸濁液として10mg/プレートからの試験を行った。

コレカルシフェロールのTA97 S9無添加の場合に復帰コロニーが増加し, 1mg/プレートでコントロールの1.8倍であった。コレカルシフェロールnmole当たりでは0.045個の復帰コロニーが誘発された。この変異原性は, 陽性対象に用いた9-アミノアクリジンに比べると非常に弱いものであるが, 統計的には有意であり, 再現性のある増加であった。

コレカルシフェロールの変異原性に関する報告としては, Ishidateら²⁰⁾が, TA98, TA100などを用いた試験において変異原性陰性, 更に染色体異常試験においても陰性の報告をしている。今回の試験において陽性となったのは, コレカルシフェロールの変異原性がTA97においてのみ検出されるのかもしれない。

オルトフェニルフェノールナトリウムのTA102 S9添加において復帰コロニーが増加した。10 μ g/プレートにおいてコントロールの1.2倍であり, 極めてわずかであるが, オルトフェニルフェノールナトリウムnmole当たりでは1.23個の復帰コロニーが誘発された。10 μ g/プレート以上の濃度では抗菌作用によるものと思われる復帰コロニーの減少が起こる。

オルトフェニルフェノールナトリウムの変異原性については, コウジカビの分生子において体細胞分離の増加が報告²¹⁾されているが, ナトリウム塩ではないオルトフェニルフェノールについては, Haworthら²²⁾が,

Table 1. Results of Mutation Test on Food Additives

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Flavoring agents						
Citronellyl Formate [105-85-1] ^{b)}	DMSO	0.1	107	182	27	324
		0.05	97	183	129	346
		0.01	115	173	210	332
		0.005	134	199	197	300
		0.001	120	184	210	333
		0	122	169	263	320
Hydroxycitronellal [107-75-5]	DMSO	1	104	165	85	314
		0.5	146	184	156	335
		0.1	125	173	208	309
		0.05	130	171	216	338
		0.01	126	183	214	344
		0	122	169	212	320
Ionone [8013-90-9]	DMSO	0.1	115	158	13	247
		0.05	122	189	73	310
		0.01	122	158	153	309
		0.005	111	183	142	299
		0.001	119	173	160	315
		0	134	155	171	304
dl-Menthol [15356-70-4]	DMSO	0.1	149	178	156	287
		0.05	148	185	167	301
		0.01	136	205	199	299
		0.005	136	203	203	326
		0.001	143	210	196	324
		0	145	203	206	304
Dietary supplements						
Calcium Dihydrogen Pyrophosphate [14866-19-4]	DW	1	133	176	159	235
		0.5	160	180	164	246
		0.1	137	208	164	254
		0.05	151	188	170	249
		0.01	160	180	201	286
		0	151	193	185	278
Cholecalciferol [67-97-0]	DMSO	1	261 ^{c)}	254	218	305
		0.5	216	213	210	325
		0.1	141	180	201	295
		0.05	142	181	211	284
		0.01	154	200	174	269
		0	145	190	166	279
Ergocalciferol [50-14-6]	DMSO	1	130	180	281	320
		0.5	145	191	223	312
		0.1	131	184	194	284
		0.05	145	194	196	280
		0.01	131	182	185	297
		0	132	190	166	279

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Retinol [68-26-8]	DMSO	0.1	184	164	176	327
		0.05	140	178	167	302
		0.01	152	191	159	340
		0.005	152	179	190	350
		0.001	150	185	192	303
		0	145	203	206	304
Emulsifiers						
Lecithin [8002-43-5]	50%EtOH	1	139	204	96	319
		0.5	155	204	98	333
		0.1	177	211	104	348
		0.05	134	178	115	321
		0.01	155	211	125	331
		0	155	189	135	318
Propylene Glycol Fatty Acid Ester [1323-39-3]	DMSO	10	152	163	129	348
		5	139	177	233	379
		1	141	186	207	347
		0.5	131	208	194	335
		0.1	124	192	194	342
		0	158	197	213	326
Sorbitan Fatty Acid Ester [1338-41-6]	DMSO	1	137	181	166	328
		0.5	135	178	141	300
		0.1	115	161	140	306
		0.05	127	180	129	261
		0.01	130	168	151	298
		0	134	155	171	304
Sucrose Fatty Acid Ester [-]	DMSO	0.1	106	195	48	328
		0.05	159	209	132	352
		0.01	144	210	205	347
		0.005	149	190	191	338
		0.001	144	199	206	330
		0	158	197	213	326
Other agents						
Activated Carbon [7440-44-0]	DW	10	131	133	187	291
		5	129	147	203	295
		1	134	179	214	325
		0.5	138	184	216	344
		0.1	147	193	241	359
		0	141	208	219	341
L-Arginine L-Glutamate [-]	DW	1	137	191	121	280
		0.5	151	183	185	334
		0.1	142	175	168	303
		0.05	151	196	167	290
		0.01	146	189	202	290
		0	134	192	168	285

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Chlorinated Lime [7778-54-3]	DW	0.1	0	200	0	286
		0.05	0	193	0	315
		0.01	151	172	175	301
		0.005	125	167	188	297
		0.001	129	155	166	301
		0	124	180	187	295
Disodium Dihydrogen Pyrophosphate [7758-16-9]	DW	10	132	159	201	183
		5	156	189	209	196
		1	155	192	203	282
		0.5	154	205	179	305
		0.1	160	185	179	321
		0	137	199	164	280
Food Red No.40 [25956-17-6]	DW	10	116	148	209	319
		5	115	158	188	310
		1	145	163	205	302
		0.5	125	174	176	305
		0.1	138	205	178	314
		0	146	199	184	308
Imazalil [35554-44-0]	DMSO	0.1	116	208	67	283
		0.05	112	176	130	315
		0.01	118	192	172	292
		0.005	105	168	174	284
		0.001	120	173	170	291
		0	113	163	163	296
Kaolin [1332-58-7]	DW	10	128	189	162	271
		5	141	194	206	269
		1	141	166	187	285
		0.5	135	184	169	273
		0.1	127	188	175	285
		0	151	193	185	278
Liquid Paraffin [8012-95-1]	EtOH	1	131	188	133	293
		0.5	141	197	113	321
		0.1	131	184	118	310
		0.05	152	178	118	290
		0.01	128	205	111	302
		0	149	205	128	293
Polybutene [9003-29-6]	EtOH	1	125	188	119	309
		0.5	129	193	130	298
		0.1	126	164	124	255
		0.05	125	198	118	285
		0.01	145	179	125	308
		0	149	205	128	293

Continued on

Table 1. Continued

Chemical	Solvent	Dose mg/plate	No. of Revertants/plate ^{a)}			
			TA97		TA102	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Potassium Polyphosphate [68956-75-2]	DW	10	141	168	156	168
		5	131	202	170	145
		1	148	187	171	280
		0.5	133	181	175	298
		0.1	133	185	178	304
		0	134	192	168	285
Silicon Dioxide [-]	DW	10	150	207	149	267
		5	154	201	162	276
		1	146	188	145	276
		0.5	144	191	161	262
		0.1	135	196	157	277
		0	145	213	160	274
Sodium <i>o</i> -Phenylphenate [132-27-4]	DW	0.1	124	186	68	297
		0.05	150	168	125	315
		0.01	134	173	200	343 ^{c)}
		0.005	152	198	175	328
		0.001	139	207	185	301
		0	146	199	184	279
Positive controls						
9-Aminoacridine	DMSO	50 (μ g)	836 \pm 248 ^{d)}			
Mitomycin C	DMSO	0.5 (μ g)			2,256 \pm 292	
2-Aminoanthracene	DMSO	5 (μ g)	2,813 \pm 650			944 \pm 169

a) Mean of three plates.

b) CAS registry number.

c) Statistically significant difference by Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) and dose-related increase by regression analysis ($P < 0.01$).

d) Mean and standard deviation ($n = 13$).

TA1535 S9無添加において変異原性陽性、人胎児由来細胞においてウアバイン耐性突然変異の増加が報告²³⁾されている。われわれも TA102 S9添加において陽性の報告⁴⁾を行った。また、オルトフェニルフェノールナトリウムには発ガン性の報告²⁴⁾も見られる。

試験した24種のうち上記2種以外の22種の試料については、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。したがって、これらの化合物の TA97及び TA102に対する変異原性は、陰性と判断された。

今回、陰性となった化合物の内、イオンにはRec-assayにおいて陽性²⁵⁾、ビタミン A には SCE 誘発及び染色体異常試験において陽性の報告²⁶⁾が見られた。また、高度サラシ粉には S9添加の TA100において陽性の報告²⁰⁾があり、染色体異常試験陽性の結果も報告²⁰⁾されている。これらの化合物については、今回の試験結果と

は一致しなかった。TA 株での詳細な検討が必要かもしれない。

次に、dl-メントール、エルゴカルシフェロール、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ピロリン酸二水素二ナトリウム、L-アルギニンL-グルタミン酸塩及びポリブテンは、Ishidateら^{20,27)}による TA98及び TA100などにおける陰性の報告があり、今回の TA97及び TA102に対する陰性の結果とも一致し、サルモネラに対しては変異原性陰性と結論出来るであろう。

また、ギ酸シトロネリル、ヒドロキシシトロネラール、ピロリン酸二水素カルシウム、レシチン、活性炭、カオリン、二酸化ケイ素、ポリリン酸カリウム、食用赤色40号、流動パラフィン及びイマザリルに関しては、サルモネラに対する試験報告が十分ではない化合物もあると考

えられ、更に検討する必要があるかもしれない。

食品添加物の TA97及び TA102を用いた変異原性試験は、前報⁴⁻¹³⁾に報告したように277種類が終了しており、今回の24種を加えると301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ル⁴⁾、オルトフェニルフェノールナトリウム、過酸化水素¹⁰⁾、コレカルシフェロール、L-システイン-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⁾、ピペロナル¹⁰⁾、没食子酸プロピル⁷⁾、マルトール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23種類であった。これらの化合物には、TA98及び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

24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。コレカルシフェロール及びオルトフェニルフェノールナトリウムで復帰コロニーが増加し、変異原性陽性と判断した。その他の22種の化合物では、いずれも復帰コロニー数が増加しなかったことから、変異原性陰性と判断した。

文 献

- 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) 藤田 博, 青木直人, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **45**, 191-199, 1994.
- 14) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. : *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
- 15) Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
- 16) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
- 17) 矢作多貴江 : 蛋白質核酸酵素, **20**, 1178-1189, 1975.
- 18) 石居 進 : 生物統計学入門, 133-137, 1975, 培風館.
- 19) Moore, D. and Felton, J. S. : *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
- 20) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., *et al.* : *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
- 21) Georgopoulos, S. G., Kappas, A. and Hastie, A. C. : *Phytopathology*, **66**, 217-220, 1976.
- 22) Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, C., *et al.* : *Environmental Mutagenesis*, Supplement 1, 3-142, 1983.
- 23) 鈴木英子, 中尾順子, 平賀興吾 : 東京衛研年報, **35**, 399-400, 1984.
- 24) Hiraga, K. and Fujii, T. : *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 303-310, 1981.
- 25) 兪 榮植 : 阪市医誌, **34**, 267-288, 1986.
- 26) Mohr, U. Jr. and Emura, M. : *Mutation Res.*, **246**, 67-73, 1991.
- 27) 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.

石綿繊維の経口摂取による生体影響(第7報*) 繊維の分布形態

福 森 信 隆**, 青 木 直 人**, 佐々木 美枝子**

Biological Effects of Ingested Asbestos Fibers (VII) Finestructural Findings of Intravenously Injected Fibers

NOBUTAKA FUKUMORI**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

The movement of fibrous asbestos via blood was examined in male rats by transmission electron microscopy. Fiber deposition in the portal vein was assessed at 10, 30, and 60 minutes following injection using an energy dispersive X-ray spectrometer. Chrysotile asbestos fibers were found in the endothelium of capillary vessels in liver, spleen, kidney, and lung tissue. In the liver, the deposition of fibers was seen in Kupffer stellate cells and microvilli in the space of Disse. Deposition in the cytoplasm was often evident near the vascular lumen. Amosite fiber accumulation in the liver were observed at the same site as chrysotile, although fibers were fewer than chrysotile. Asbestos fibers, which may reach the blood directly or through the digestive tract, thus appear to move by the blood and remain in the organs of the body.

Keywords: クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, アモサイト石綿 amosite asbestos, 門脈内投与 intraportal-venous injection, 沈着 accumulation, ラット rat, 透過型電子顕微鏡 transmission electron microscope

緒 言

アスベスト取扱者の高濃度の職業性吸入曝露においてアスベストが石綿肺, 肺癌, 胸膜肥厚斑及び胸膜炎, 悪性中皮腫等を生じさせることは明らかである¹⁾. しかし, 一般の生活環境中におけるアスベストの一時的あるいは低濃度曝露の健康への影響については, 十分に解明されていない. 一方, Selikoff らは断熱処理作業員では, 呼吸器系疾病や中皮腫等のアスベスト由来の疾患に加え消化器癌が増加することを報告した²⁾. このことは, 吸入されたアスベストが気管の異物排出機能によって咽喉部へ移行し, さらにこのアスベスト繊維を含む分泌液を嚥下することで消化管内へ侵入したため, 消化器癌の原因となると考えられた. こうしたアスベストの経口曝露の可能性は, 1971年に Cunningham らが初めてビール等の飲料や水道水中から繊維を検出して以来³⁾, 多くの報告によって指摘されている¹⁾. またかつて我国では, 諸外

国と比べ日本人の胃癌の多発要因として, 精米時に品質保持のため加えたタルクに混入したアスベスト⁴⁾, 及び日本酒の濁りを清澄にする目的でろ過助材として使用していたクリソタイルアスベスト⁵⁾との関連が指摘されている.

これらの事実から, 消化器癌や腹膜中皮腫との関連が示唆されるアスベスト繊維の消化管内での挙動や消化管壁での貫通現象あるいは移行を検索することは, アスベストの発癌機序を解明するうえで意義が大きい. 一般にアスベスト繊維は, マクロファージに容易に貪食されるが⁶⁾, 消化管の粘膜上皮細胞への移行は困難と考えられる. バターに混ぜたクリソタイルの6ヶ月摂取実験では, 小腸の杯細胞に繊維が認められず⁷⁾, 短期の1回投与でも4日後までに組織内での繊維の著明な蓄積あるいは腸管の粘膜上皮細胞での多数の貫通像は認められていない⁸⁾. しかし一方では, 6%クリソタイル添加飼料を与

*第6報, 東京衛研年報, 45, 215-222, 1994.

**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

えたラットで小腸の杯細胞に繊維の貫通像を観察し、粘膜固有層に沈着しているという報告がみられる⁹⁾。このことは、消化管経由でのアスベスト繊維の生体への移行がある程度認められ、血液やリンパ液を介して体内を移動していることを示唆するものと考えられる。

また最近、ろ過が完全でなかったための注射用薬剤のアスベスト汚染が報告され、吸入あるいは経口曝露以外に直接的にアスベスト繊維が生体内に入り込むという問題も提起された¹⁰⁾。

このような観点から、アスベストが血流を介して生体内を移動し、組織に蓄積するという現象を解明するために、消化管の血流を集める門脈にクリソタイルアスベストを投与し、肝臓、脾臓、腎臓、肺への繊維の移行動態を透過型電子顕微鏡(透過電顕と略す)により観察した。また、径が太く形状の異なるアモサイトアスベストの肝臓への沈着を、クリソタイルと比較した。

実験方法

実験：体重約300 gのF344/DuCrj 雄性ラットを使用し、ネブタール麻酔を施して動物を背位に保定した。開腹後、門脈を露出させ、ツベルクリン注射針で100 μ lのアスベスト懸濁液をゆっくりと門脈内へ投与した。アスベストは、UICC (Union International Contre le Cancer) の標準品であるクリソタイルアスベスト (Chrysotile A) とアモサイトアスベストを各5 mg/mlの割合で孔径0.1 μ mのフィルターでろ過した生理食塩水に混ぜ、超音波装置で分散懸濁した後、上清液を使用した。投与後、開腹した皮膚を閉じて動物の腹部を保温し、10分、30分、60分経過後、各群3匹のラットを大腿部から放血、屠殺した。肝臓は正中葉を、脾臓は中央部、腎臓は右腎皮質部、肺は右側中間葉からの各一定部位を摘出し細切した後、冷3%パラホルムアルデヒド(0.1M磷酸緩衝液、pH7.3)で浸透固定を行った。また同様な方法でアスベストを含まない生理食塩水を与えた動物を対照とした。

試料作製：前固定を行った組織を1.5mm四方にさらに細切して、緩衝液で一晩アルデヒド液を洗浄後、1%オスミウム酸固定液(0.1M磷酸緩衝液、pH7.3)で2時間の後固定を行い、常法にしたがってエタノール脱水、エポキシ樹脂包埋をした。薄切時に再度1mm角にトリミングを行い、やや厚めの切片を作製した。染色は、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色を施した。

観察：倍率を1万倍に設定し、通常の透過電顕の観察法に準じて、1mm四方の試料で検出されたアスベスト繊維の本数と長さ及び繊維径を計測した。沈着している繊

維の確認は、クリソタイルでは管状構造を調べるとともに、走査透過像によりエネルギー分散型微小部X線分析装置(KeveX-7500, EDXと略す)を用いて繊維を構成する組成元素を分析検出し、同定を行った。

実験結果

各組織で沈着が検出されたアスベスト繊維の1mm²当たりの平均本数と繊維長の範囲及び繊維束の概略をTable 1に示した。肝臓では数本の繊維が集合している繊維束が時折観察されたが、1本に数えた。また、縦断面に薄切された繊維は、束状を呈する像が多く認められたがこれも同様に1本として計測した。他の組織での沈着はほとんど集合がみられない単繊維であった。

クリソタイル投与の肝臓では、10分後で繊維の沈着数が多く、繊維束の形状が多数認められた。漸次、繊維束は減少し、1mm²当たりの繊維数も少なくなる傾向を示した。沈着部位では、10分後から類洞のクッパー星細胞で多数の束状繊維がみられ、星細胞の形質膜側での存在も含め細胞の内部まで沈着が認められた。また、ディッセ腔のmicrovilliでの沈着やmicrovilliに隣接する肝実質細胞の辺縁側で認められた。Fig. 1は、類洞の内皮細胞で観察された大小の繊維束を示した。

脾臓では、10分と30分とで繊維数は同程度を示し、肝臓に比べ少数であったが、60分後で若干増加を認めた。主に細胞間隙や脾洞壁の内皮細胞側の細胞に沈着が認められ、大部分が単繊維の形状を示した。

腎臓では、投与10分後で繊維数が極めて少なかったが、以後漸次増加傾向を示した。糸球体や遠位尿細管での沈着は認められず、毛細血管腔や近位尿細管の血管側基底

Table 1. Fiber Counts and Length of Deposited Asbestos

Asbestos	Tissue	10 min	30 min	60 min
Chrysotile	Liver	20(14) ^{a)}	16(4)	9(1)
		0.3-1.1 ^{b)}	0.3-0.7	0.3-1.2
	Spleen	7(2)	7(0)	11(1)
		0.3-0.6	0.3-1.2	0.3-0.9
	Kidney	2(0)	4(0)	7(0)
		0.4-0.5	0.3-0.5	0.4-0.7
Lung		5(0)	4(0)	7(0)
		0.3-0.6	0.4-1.0	0.3-0.6
	Amosite	12(3)	5(2)	2(1)
		0.2-0.6	0.3-0.6	0.6-0.7

a) Number of bundles

b) Range of fiber length (μ m)

膜近傍の細胞質内に単繊維として観察された(Fig. 2).

なお、腎臓では繊維束がみられなかった。

クリソタイル投与の肺では、10分と30分とで繊維数に大差を認めないが、60分で若干増加を示した。沈着は、血管腔壁の内皮細胞(Fig. 3)や間質細胞あるいはオスミウム酸親性の封入体を持つ大型肺胞上皮細胞内に散見された。

繊維径が太いアモサイト投与の肝臓では、クリソタイルと比較して沈着数が全体に少なかったが、経時変化は同様に減少傾向を示した。繊維の沈着は、類洞の内皮細胞やクッパー星細胞の細胞質内あるいはディッセ腔のmicrovilliにみられ(Fig. 4)、一部は肝実質細胞に軽度に入侵している像が観察された。

繊維の沈着状態を比較すると、肝臓や脾臓でやや長い繊維が認められたが、大部分は1 μm 以下の短い繊維であり、また束状の繊維は、他の組織と比べクリソタイル、アモサイトとも肝臓で多く認められた。なお、組織内に残留している赤血球への繊維の沈着は、みられなかった。

Fig. 1 と Fig. 4 では、沈着した繊維を確認するために、EDX分析の結果を示した。組織の固定や染色に使用したオスミウムや鉛、ウラン元素が若干検出されたが、それぞれのアスベストが持つ固有の元素組成が分析され、投与したアスベスト繊維と同定した。

考 察

アスベストは、通常の化学物質と異なり、代謝、分解を受けず、しかもその形状が針状あるいは繊維状を呈しているために、様々な影響を生体を与えている。しかし、その有用性からこれまでに3000種に及ぶ製品に汎用されたため、生活の中で日常的にアスベストに接触する機会が多かった。しかも、アスベストに起因する疾病の発症が極めて遅いため、その因果関係を明確にすることが困難であった。そのためにアスベストの作用に関して、多くの未解明な問題が残っている。経口投与を行ったラットの実験で、消化管を貫通し、生体内に移行するアスベストは非常に少なかったが、肝臓、脾臓での蓄積が認められたことから⁸⁾、生体内での繊維の移動に血液の介在が考えられる。したがって、消化管からの吸収に大きく関与する門脈にアスベストを投与して、繊維の分布を形態的に検索した。

沈着した繊維の本数は、肝臓でクリソタイル、アモサイトとも時間経過に伴って減少しているのに対し、脾臓、腎臓、肺では漸次繊維数の増加傾向を示した。このことは投与部位が門脈であるため、一時的に血流の初期標的臓器である肝臓に多く沈着し、以後他の組織へ移動した

と考えられる。クッパー星細胞や肝実質細胞に取り込まれないでディッセ腔のmicrovilliに付着している繊維は、血流の作用で容易に移動が可能であると思われる。これらは他の組織でも同様に、細胞内に沈着しない限り、血流中に残存する場合は常に血管内を繊維が移動していると推察される。また、肝臓での繊維束は10分後でもクッパー星細胞に認められたことから、投与後の早期から異物の貪食機能が働いていると思われる。

沈着した繊維の長さは、超薄切のため全て正確に反映していると考えられないが、クリソタイルの特有な管状構造を持つ繊維では、その長さを表していると思われる。今回観察された繊維は、2 μm 以下の短い繊維であり、多くの組織で血管腔の内皮細胞やmicrovilliに沈着が認められた。このことは、Stantonらによる長さ8 μm 以上のアスベストは毒性が強いという報告¹¹⁾を考えると、今回観察された短い繊維は毒性が弱く重大な疾患に結びつく可能性は少ないと思われる。しかし、かなり多量の繊維が投与されたにもかかわらず、組織への沈着数が少ないという事実は、血管内に残存している可能性が高いことを示しているとも考えられる。また太くて長い繊維は、組織へ移行する過程で血管の狭窄部に固着して、自由な移動が困難である状態にあるとも考えられるが、実際にこのような状態があるかどうかは明らかでない。アスベストの生体内分布で組織への蓄積を調べた報告は多い¹⁾が、繊維の沈着に関する局在部位の証明はほとんどない。このことは、放血による組織内血液の残留量が繊維数の計測に過大な影響を与えるためと考察される。

肝臓では、クッパー星細胞の貪食やディッセ腔でのmicrovilliへの沈着のほかに、繊維が肝実質細胞の辺縁で認められた。培養した肝細胞とアスベスト繊維をincubationした時、繊維と接触した細胞膜で陥入がみられ、徐々に細胞質内へ取り込まれるという報告¹²⁾から、単に針状の形態に基づく物理的作用による細胞内侵入とは考えられない。細胞内での沈着は、形質膜の複雑な要因が関与していると考察される。最終的には、細胞質に取り込まれたアスベスト繊維は、含鉄蛋白質で周囲を被われてアスベスト小体を形成する¹³⁾と考えられる。

肺における沈着は、血管腔や構成細胞で観察され、気道である肺胞腔や肺胞マクロファージにはみられなかった。このことは、今回の実験では経気道的吸入曝露とは繊維の投与経路が全く異なる経路を使用したことを反映していると思われる。

結 語

アスベストが、血液を介して生体内で移動することを

確認するために、実験的にラットの門脈へ投与した。透過電顕を用いた観察でクリソタイルは、肝臓、脾臓、腎臓、肺で繊維の沈着が認められ、血管腔の内皮細胞や肝臓ではクッパー星細胞、ディッセ腔の microvilli にみられた。細胞質では、血管腔側の辺縁に沈着する傾向が観察された。アモサイトの肝臓での沈着は、クリソタイルと同様の部位に認められたが、沈着数が減少していた。生体に侵入したアスベストは、血流により全身の組織に移行する可能性が示唆された。

文 献

- 1) *Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres*, 1986, World Health Organization, Geneva.
- 2) Selikoff, I.J., Hammond, E.C. and Seidman, H. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **330**, 91-116, 1979.
- 3) Cunningham, H. M. and Pontefract, R. : *Nature*, **232**, 332-333, 1971.
- 4) Merliss, R. R. : *Science*, **173**, 1141-1142, 1971.
- 5) Ogino, S., Fukumori, N. and Yasuno, T., et al. : *J. Food Protect.*, **51**, 737-739, 1988.
- 6) 福森信隆, 荻野周三, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **41**, 289-296, 1990.
- 7) Davis, M. G., Bolton, R. E. and Garrett, J. : *Environ. Health Perspect.*, **9**, 255-260, 1974.
- 8) 福森信隆, 青木直人, 佐々木美枝子 : 東京衛研年報, **45**, 215-222, 1994.
- 9) Westlake, G.E., Spjut, H.J. and Smith, M.N. : *Lab. Invest.*, **14**, 2029-2033, 1965.
- 10) Addison, J., Browne, K. and Davis, J. M. G., et al. : *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **18**, 371-380, 1993.
- 11) Stanton, M. F., Layard, M. and Tegeris, A. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 965-975, 1981.
- 12) Jocelyne, F., Michel, G. C. and Michel, M., et al. : *Toxicol. Lett.* **19**, 15-22, 1983.
- 13) Hiroshima, K. and Suzuki, Y. : *J. Electron Microsc.*, **42**, 41-47, 1993.



Fig. 1. Several bundles of chrysotile fibers (arrows) remaining in the endothelial cell of sinusoid in rat liver after 10 min of injection. The right inset shows the characteristic EDX spectrum of chrysotile asbestos containing Mg and Si elements. (X29,200)



Fig. 2. Deposition of a chrysotile fiber in the cytoplasm of proximal tubule of the kidney near the basement membrane, after 60 min of injection. (X39,000)



Fig. 3. The deposited fiber is observed in the endothelial cell around the vascular lumen of the lung, 60 min after injection of chrysotile. The straight chrysotile fiber shows a tubular shape. (X44,800)

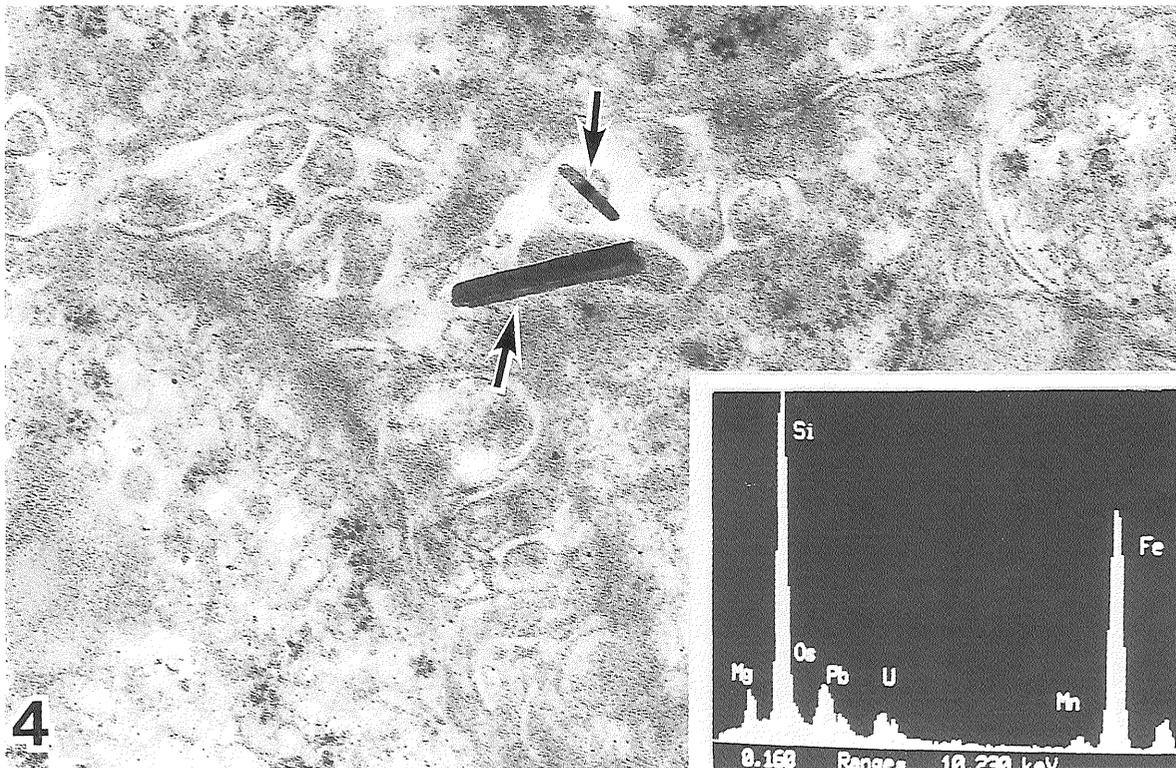


Fig. 4. An electron micrograph of the space of Disse from rat liver 10 min after injection of amosite asbestos. Two fibers (arrows) are deposited in the microvilli. The fibers are identified as amosite by EDX spectrum shown in the inset. (X42,900)

マウスを用いた繁殖毒性試験における対照群の産仔数と仔体重の関係

田中豊人*, 市川久次**

Relationship between Litter Size and Body Weight of Offspring of Control Mice in Reproductive Toxicity Studies

TOYOHITO TANAKA* and HISATSUGU ICHIKAWA**

Examination was made of the relationship between litter size and body weight of offspring in 1142 offspring from 95 litters of CD-1 control mice in reproductive toxicity studies. Litters were divided into 4 groups of litter size 5-7, 8-10, 11-13, and 14-17. The 11-13 group was regarded as the control group. Average body weight of the 5-7 group was significantly increased as compared to controls during lactation period, and that of the 14-17 group was significantly depressed as compared to controls during late lactation period.

Keywords: 産仔数 litter size, 仔体重 body weight of offspring, 繁殖毒性試験 reproductive toxicity study, マウス mice

緒言

我々は食品添加物を中心として、過去にいくつかの繁殖毒性試験をマウスを用いて行っているが、その結果の評価の際に問題となるのは、出生した仔をどのように扱うのかということがある。この問題に対しては、出生後1腹仔数を調整する方法としない方法がある。出生仔数を調整する場合には、栄養条件を近似できる利点があるが、間引きした個体が持っている可能性のある先天的な異常を見落とす可能性がある。また、出生仔数を調整しない場合は、仔の持っている先天的な異常を見落とすことは少ないが、栄養条件が異なってくるので、栄養不良などの影響を受けることがある。

現在、著者らは出生仔数を調整しない方法を取っているが、今のところ、出生仔数と仔の成長や行動発達の関係に言及した研究は数少ない。Romeroら(1992)がラットの発生毒性試験の際の1腹仔数と胎仔体重の関係をまとめたもの¹⁾や、WurtmanとMiller(1976)がラットの産仔数と仔の成長の関係に言及したもの²⁾などが認められるが、マウスについて検討したものはほとんどない。そこで今回、著者らは今まで行ってきた繁殖毒性試験の中から、2世代試験³⁻⁸⁾及び3世代試験⁹⁻¹⁰⁾の対照群の

データを基にして、産仔数と仔の成長の関係について検討した。

材料と方法

動物と飼料：マウスは、日本チャールス・リバー(株) Crj: CD-1 (ICR)のSPFの雌雄を4週齢で購入し、1週間の予備飼育の後に一般状態の良好なマウスを実験に供した。飼料は、日本クレア(株)の標準固形飼料CE-2を用いた。

飼育条件：マウスは、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ・相対湿度 $55 \pm 5\%$ 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。

実験計画：2世代試験³⁻⁸⁾においては、第1世代の5週齢において実験を開始し、対照群として各実験雌雄各10匹を用いた。9週齢時に、各雌を雄1匹と5日間同居交配させ、5日後に雌雄を分離した。交配後、妊娠した雌については出産させ、その仔に対して授乳させた。出生時に産仔数・新生仔の体重・1腹仔の総重量(新生仔の体重の総和)を測定した。産仔数については生存仔のみを測定し、新生仔の体重は1匹ずつ測定した。授乳期間中、出生時を0日齢として4, 7, 14, 21日齢時に仔体重を

*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

**同生活科学部栄養研究科

測定し、仔の成長を観察した。仔の成長率は出生時の1腹仔の平均体重を100%として、1腹仔毎に算出した。出生した第2世代は4週齢時に離乳させた。3世代試験⁹⁻¹⁰⁾においては、2世代試験の第2世代の離乳の際に对照群を雌雄各10匹に調整した後に、9週齢時に2世代試験の第2世代の作成と同様に第3世代を作成し、同様の項目を測定した。

統計解析：仔の体重及び成長率は、一元配置分散分析またはKruskal-Wallisの順位分散分析を行った後に、Bonferroniの多重比較検定を行った。

結 果

2世代試験及び3世代試験の結果、合計95腹仔1142匹の对照群のマウスの仔を得た。平均産仔数は12.02±2.50匹、出生時の平均仔体重は1.578±0.129g、1腹仔の平均重量は18.78±3.52gであった。産仔数の分布は、Fig.1に示すように12~13匹をピークとし、5~17匹の幅を持つものとなった。以上の結果から、産仔数が5~7、8~10、11~13、14~17匹の4群に分けて、産仔数が11~13匹の群を对照群として、マウスの仔の成長について検討した。

授乳期間中の平均仔体重の変化は、Fig.2に示すように産仔数が少ない5~7匹の群が全期間を通じ、仔体重が对照群より増加し、産仔数が多い14~17匹の群では授乳期間が進むにつれて、仔体重の増加が抑制された。産

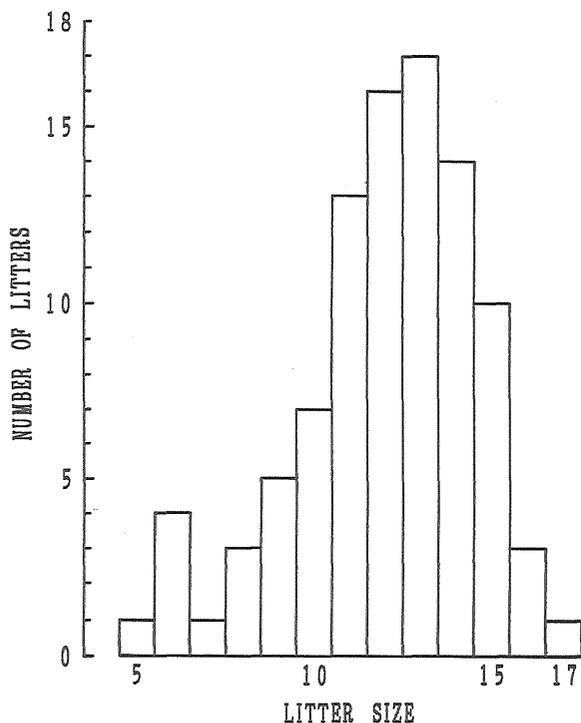


Fig. 1. Distribution of litter size in control data in reproductive toxicity studies of mice.

仔数が8~10匹の群は、授乳期の初期には仔体重が对照群より大きかったが、その後有意な差はなくなった。授乳期間中の平均成長率は、Fig.3に示すように平均仔体重と同様の变化を示した。

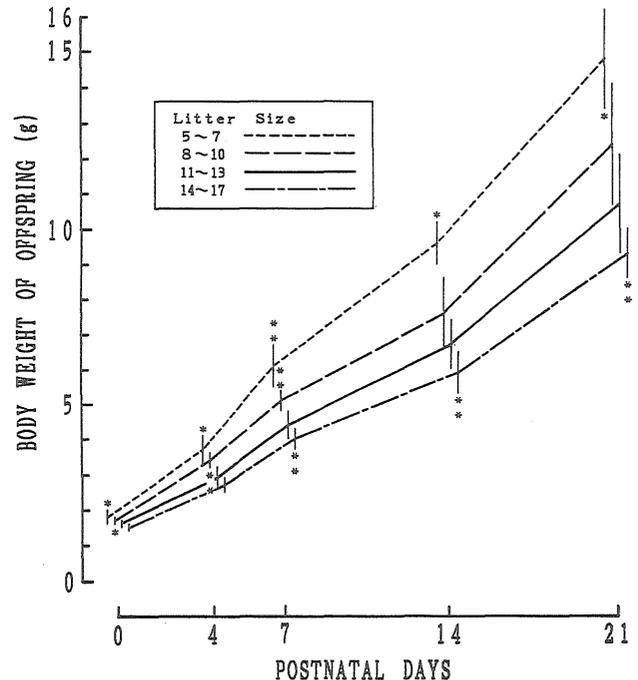


Fig. 2. Average body weight of offspring (g) during the lactation period in control data in reproductive toxicity studies of mice. Significantly different from litter size 11~13 group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

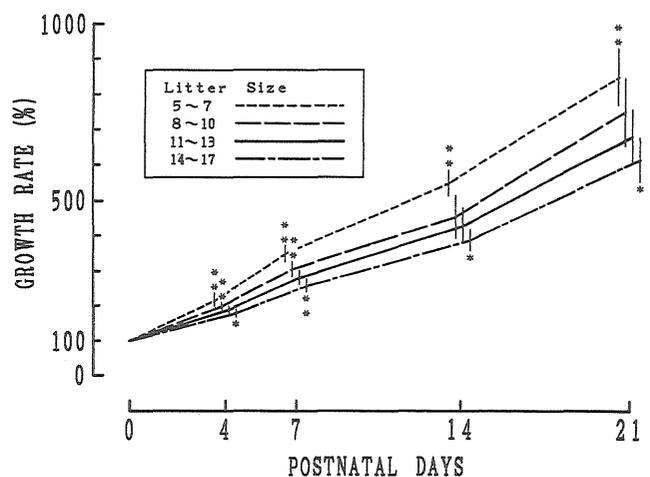


Fig. 3. Average growth rate (%) during the lactation period in control data in reproductive toxicity studies of mice. Significantly different from litter size 11~13 group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

考 察

これまでの繁殖毒性試験の結果から、マウスの産仔数と仔体重の関係には Fig. 2～3 に示すように、産仔数が増えると仔体重が抑制される傾向が見られる。マウスの場合、平均産仔数は11～13匹の範囲に収まることが多いので、これを対照群として見ると、産仔数が5～7匹の少ない群では仔の成長が著しく促進され、14～17匹の多い群では仔の成長が抑制されている。ラットでの知見¹⁻²⁾でも同様の傾向が認められているので、これらの結果は一般的なものと考えられる。これまでの繁殖毒性試験では、産仔数に有意な差が認められたものはなかったため、仔体重に有意な変化があったものは薬物投与の影響によるものと評価できる。しかし、今後の繁殖毒性試験では、結果の評価の際に産仔数の分布などに充分注意を払わなければならない。また、産仔数及び仔体重と行動発達との関係についても、今後検討する必要がある。

文 献

- 1) Romero, A., Villamayor, F., Grau, M.T., *et al.* : *Reprod. Toxicol.*, **6**, 453-456, 1992.
- 2) Wurtman, J.J. and Miller, S.A. : *J. Nutr.*, **106**, 697-701, 1976.
- 3) Tanaka, T. : *Toxicol. Lett.*, **60**, 83-90, 1992.
- 4) Tanaka, T. : *Toxicol. Lett.*, **60**, 315-324, 1992.
- 5) Tanaka, T. : *Food Chem. Toxicol.*, **31**, 1013-1018, 1993.
- 6) Tanaka, T. : *Toxicol. Ind. Hlth.*, **9**, 1027-1035, 1993.
- 7) Tanaka, T. : *Toxicology*, **92**, 169-177, 1994.
- 8) Tanaka, T. : *Toxicol. Ind. Hlth.*, **11**, 1-12, 1995.
- 9) Tanaka, T., Takahashi, O. and Oishi, S. : *Food Chem. Toxicol.*, **30**, 1015-1019, 1992.
- 10) Tanaka, T., Oishi, S. and Takahashi, O. : *Toxicol. Lett.*, **66**, 295-304, 1993.

時間制限給餌法による F344ラットの飼育と漢方方剤投与試験への応用

林 田 志 信*, 佐々木 美枝子*

The Feeding to F344 Rats Restricted by Time and a Try for Feeding-study of a Chinese Drug

SHINOBU HAYASHIDA* and MIEKO SASAKI*

Keywords : 時間制限給餌法 restricted feeding by time, F344ラット F344 rats, 漢方方剤 Chinese drug

緒 言

毒性(安全性)試験に用いられる実験動物は、動物の個体差や実験施設間の実験結果の差違を最小に止めるために、使用する動物の種やその生物学的性状に一定の基準が設けられている。ラットやマウスは最も多様されている実験動物であるが、F344ラットは長期投与毒性試験や発ガン性試験に世界中の実験施設で用いられている実験動物の一つである。

毒性試験は正常の実験動物を用いてその若年齢から試験を行うのが一般的であるが、近年ヒトの病態モデル動物の開発が軌道に乗り、正常な若いヒトに対する毒性のみでなく老人や病人に対する安全性も考慮するとの観点から、病態動物、老化動物などが安全性試験に積極的に使用されるようになってきた。

このような実験動物に対する時代の趨勢を受けて、これまで一般に行われていた実験動物に無制限に餌を与える飼育法が正当なものであるか、との見直しも行われるようになった。例えばマウスやラットの寿命は清浄な実験条件下で無制限に飼料を与えた場合は2~3年であるが、栄養失調にならない程度に摂餌量を制限したマウス、ラットは著しく長命となり、5年近くも生存した例が報告されている^{1,2)}。また制限食で飼育したラットやマウスでは、加齢に伴う広範な生理学的変化や疾患の発生が遅れたり防止されたりすることが報告されている。

東洋医学研究プロジェクトの一つとして、漢方薬が老人性疾患や慢性疾患に投与される例が多いことを考え、漢方方剤投与試験への応用を目的として、制限食下でのラットの飼育と、この実験条件下での漢方方剤(十全大補湯)混餌飼育を実施した。

実験方法

実験動物 : 日本チャールズリバー(株)から F344/DuCrj ラット 4 週令, 雄60匹を購入し, 4 週間の予備飼育後, 実験に供した。

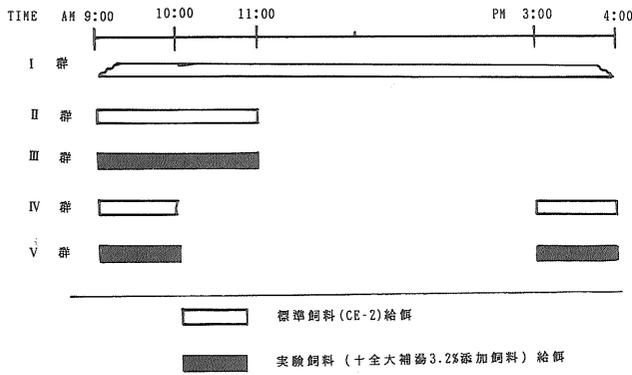
実験飼料 : コントロール飼料としては, 日本クレア(株)製 CE-2を用い, 投与群はCE-2に漢方方剤(十全大補湯)を3.6%混入した添加固形飼料を用いた。

実験群及び給餌法 : 実験動物は1群12匹, 5群に分け, 時間制限給餌は図1に示す方法で行った。すなわち, I群はコントロール飼料(CE-2)を無制限に自由摂取させ, II群はCE-2を午前9時から11時までの2時間自由摂取させ以後絶食, III群は十全大補湯3.2%混入飼料を午前9時から11時まで自由摂取させた後絶食, IV群はコントロール飼料(CE-2)を午前9時から10時までの1時間と午後3時から4時までの1時間(1日合計2時間)に自由摂取させ, V群は十全大補湯3.2%購入飼料をIV群と同様に午前, 午後各1時間摂取させた。飲水制限は行わず, ミリポアフィルターで除菌した水道水を自動給水装置より自由摂取させた。

体重測定, 摂餌量測定及び試験終了時の臓器重量測定 : 動物入荷後, 当部バリア飼育室で4週間標準飼料(CE-2)により予備飼育し, 実験開始前日の夕方(4時)から全動物を絶食させた。実験開始日の午前9時に全実験動物の体重を測定し, I, II, III群については午前11時に測定を行い, IV及びV群については10時と午後3時及び午後4時に測定を行った。飼料摂取量(摂餌量)の測定は, II, III群については午前9時の給餌重量と午前11時の残餌重量を測定し, この差を摂餌量とした。IV, V群については, 午前9時及び午後3時に給餌量測定, 午

*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



各群の給餌飼料と給餌方法	
I 群	標準飼料 (CE-2) を自由摂取 (24時間/日)
II 群	標準飼料 (CE-2) を午前 9 ~ 11 時に給餌
III 群	実験飼料 (十全大補湯) を午前 9 ~ 11 時に給餌
IV 群	標準飼料 (CE-2) を午前 9 ~ 10 時, 午後 3 ~ 4 時に給餌
V 群	実験飼料 (十全大補湯) を午前 9 ~ 10 時, 午後 3 ~ 4 時に給餌

図 1. 時間制限給餌の方法

前10時と午後4時に残餌量測定を行い、一日の合計2時間の摂餌量を求めた。また、餌の自由摂取群であるI群については、午前9時に一日(24時間)の総摂餌量を測定したが、同時に午前9時から11時までの2時間摂餌量も測定した。動物をこのような飼育条件下で4週間飼育した。次いで、制限食による体重減少の回復を観察するために、全群の制限給餌を中止し、標準飼料(CE-2)を4週間自由摂取させ、午前9時に動物の体重測定及び飼料の1日摂餌量の測定を行った。8週間(生後16週令)で実験を終了し、全動物について、エーテル麻酔下で大腿動脈放血による放血死後、解剖及び主要臓器の重量測定を行った。

結 果

1. 体重：食餌制限をしないI群(コントロール群)では図2に示すように体重は順調に増加したが、制限給餌をしたII~V群では体重増加は抑制され、制限給餌開始前日午後4時からの絶食によりコントロール群の94-90%まで低下した。午前9時から11時まで2時間の給餌を行ったII, III群と午前9時から10時、午後3時から4時に給餌したIV, V群では、給餌時間は同じ一日2時間であるが、午前、午後合計2時間の給餌を行ったIV, V群で体重増加は、僅かではあるが午前2時間の給餌のII, III群より勝っていた³⁾。十全大補湯混餌飼料を与えた群(III及びV群)では、午前2時間給餌のIII群は同様に午前2時間標準飼料であるCE-2を与えたII群との間に

体重の差はなかったが、午前、午後合計2時間給餌群(IV, V群)では、十全大補湯混餌飼料群(V群)は、全制限給餌期間においてCE-2給餌群(IV群)より、わずかではあるが体重が増加する傾向が認められた。

図3に標準飼料を自由摂取させたコントロール群(I群)に対する制限給餌群の相対体重増加率を示した。制限給餌終了時、すなわち実験開始4週間後の各群の体重増加率は、各々コントロール群(I群)に対して、II群は57.3%、III群は57.2%、IV群は69.3%、V群は76.6%であった。また4週間の制限給餌終了後、続く4週間は給餌を制限せず、自由摂取させて体重の回復を調べたところ、制限給餌を行った各群で体重は次第に増加したが、試験終了時の体重はコントロール群(I群)の平均体重が270gであるのに対してその約80%である220~230gにとどまった。また、制限給餌中には各群の体重増加に若干の差が認められたが、自由摂取給餌に切り替えた後は、体重抑制が著しい群ほど体重がより増加する傾向がみられ、4週間後には制限給餌群の体重差は殆どなくなった(図2及び3)

2. 摂餌量：図4に各試験群の1日摂餌量を示した。コントロール群(I群)では1日24時間の摂餌量、II, III群では午前2時間の摂餌量、IV, V群では午前、午後合計2時間の摂餌量となる。コントロール群の1日(24時間)の摂餌量は平均15.0gであった。制限給餌群では、II, III群では制限給餌1日目の摂餌量は4~5gであったが、3~4日目からは1日平均8~10gとなった。またIV, V群では制限給餌1日目に7~8g、その後急激に増加し、平均摂餌量は10~13gとなった。摂餌効率はI群に対してII, III群で約50%、IV, V群では約80%となった(図5)。制限給餌を終了し餌の自由摂取に切り替えてからの摂餌量は、自由摂餌開始1日目にはII~V群の制限給餌群がI群に比べて極端に多かったが、その後はバラツキは大きいものの次第にコントロール群(I群)に近い量となった(図6)。午前2時間給餌の対照として、餌を自由摂取させたI群の動物の午前9時から11時の2時間の摂餌量を測定したが、これは午前、午後合計2時間給餌群(IV, V群)、午前のみ2時間給餌群(II, III群)と比較して非常に少なく、平均して約2gであった(図6)。これはI群の1日(24時間)平均摂餌量15.0gの約7.5%であった。

3. 臓器重量：実験終了時(生後16週令)に、動物をエーテル麻酔下で大腿動脈放血によって死亡させ、解剖して主要臓器の重量を測定した。表1に臓器重量を、表2に自由給餌したI群に対する制限給餌群の臓器重量比

を、表3にI~V各群の臓器の体重比を示した。試験終了時の制限給餌群の体重はコントロール群(I群)の約80%であったが、これを反映してII~V群では測定した全臓器の重量はI群と比較して有意に低下した。しかしながら、各臓器の体重比はI群との間に差は見られなかった。また、十全大補湯を投与したIII, V群と、標準飼料を投与したII, IV群との間にも主要臓器重量に差は認められなかった。

考 察

実験動物を適正な制限給餌法により飼育すると、寿命の延長、自然発生腫瘍の抑制や発生時期の遅延、種々の老化現象の遅延等が見られることはかなり以前から知られていた。東京都老人総合研究所、倉本は^{1,2)}、従来実験動物飼育の方法として一般に行われている餌の無制限自由摂取は老化を早めるもので、自由給餌された実験動物(自由食動物)はむしろ老化促進動物であり、制限食で飼育した動物(制限食動物)は老化遅延系であると述べている。従って、一定の実験条件下で自由食動物と制限食動物を比較することは、老化研究の一つの有効な試験法であると思われる。

制限給餌法には、飼料の総量を規定する方法、飼料のカロリーを一定基準に抑える方法、あるいは飼料投与時間を規制する方法(時間制限給餌法)等、種々の試みが行われている。倉本は^{1,2)}、最も容易な時間制限給餌法として間欠給餌法を提唱している。この方法は、1週間のうち、月、水、金曜日のみ実験動物に餌を自由摂取させ、その他の日には動物を完全に絶食させるという給餌方法である。制限給餌の方法としてこれは実験操作に関しても、経済的にも最も簡易な方法である。我々は当初、この給餌法により実験動物を飼育し、毒性部の実験動物施設において安定供給して、東洋医学研究プロジェクトで試みられている老化研究での使用を計画した。しかしながら、倉本の方法に基づき、4週令のF344ラットを週3日給餌法により飼育したところ、体重が極度に減少して死亡する動物が現れた。この予備実験の結果を参考にして、時間制限給餌の有効な方法を開発する目的でこの実験を計画した。まず、実験開始の動物の週令については、ラットの体重増加が最も著しい4週令から8週令を避け、4週令で購入した動物を毒性部の飼育条件下で、標準飼料(CE-2)を自由摂取させて、4週間の順化飼育を行った後、8週令のラットにより実験を開始した。また、動物の飼料摂取の時間帯を知るため、午前と午後に分けた給餌時間を設定した。さらに漢方薬の老化に対す

る影響を調べるために制限食動物を使用することを考慮して、東洋医学研究プロジェクトの共通薬剤である十全大補湯混餌飼料を実験群の動物に給餌した。

この結果、午前2時間のみ給餌を行ったラットでは体重増加率は自由食動物の90~60%、摂餌効率も50%であった。これに対して、午前、午後合計2時間給餌を行ったIV, V群では、体重増加率は自由食群の95~70%、摂餌効率も80%を維持した。なお、コントロール群である自由食動物(I群)では、午前9~11時の2時間の摂餌量は非常に少なく、ラットが主に夜間に捕食していることが確認された⁵⁾。また、制限給餌を中止して自由給餌に切り替えた後、動物の体重は順調に増加したが、飼料摂取量が安定した4週間後でも、制限給餌群の体重はコントロール群の80%にとどまった。また、漢方薬十全大補湯混餌飼料の効果は、午前、午後合計2時間給餌を行ったV群において、同様に標準飼料を投与したIV群に比して、体重抑制が少ない傾向が全制限給餌期間を通じて観察されたが、これが漢方薬の作用であるか、あるいはその他の要因によるものであるかは、この実験からは判別できなかった。

一般に制限食飼育では、飼料摂取量が自由摂取の50~60%、体重が70%程度に抑制された場合に寿命の延長などの有効な効果が得られることが知られている。本実験では、制限食後の自由食という方法で、体重は対照群の約80%に安定した。従って、特に午後の給餌を加味した実験群は、長期飼育試験に用いる実験動物として適当であると思われる。しかしながら、餌の出し入れ、頻回の体重測定や給餌量測定等、操作が煩雑で手間がかかり、多数の実験動物を用いる試験には適さない。今後、間欠給餌法を加味した、より簡潔で有効な制限給餌法を開発し、老化研究のために供給することを計画している。

文 献

- 1) 倉本和直, 朱宮正剛: *Biomed. Gerontol.* **14** (2), 149-150, 1990.
- 2) 倉本和直, 朱宮正剛: *Biomed. Gerontol.* **15** (2), 78-79, 1991.
- 3) 鈴木正成, 千葉啓子: *日本栄養・食糧学会誌*: **36** (3), 175-183, 1983.
- 4) 藤本憲二: *神経精神薬理*: **9** (11), 785-798, 1987.
- 5) 谷 健二, 山本章: *静岡大教育学部研究報告(自然科学篇)* **42**, 1-8, 1992-3.
- 6) John O. Holloszy: *J. Nutr.*, **122** (3), 774-777, 1992.

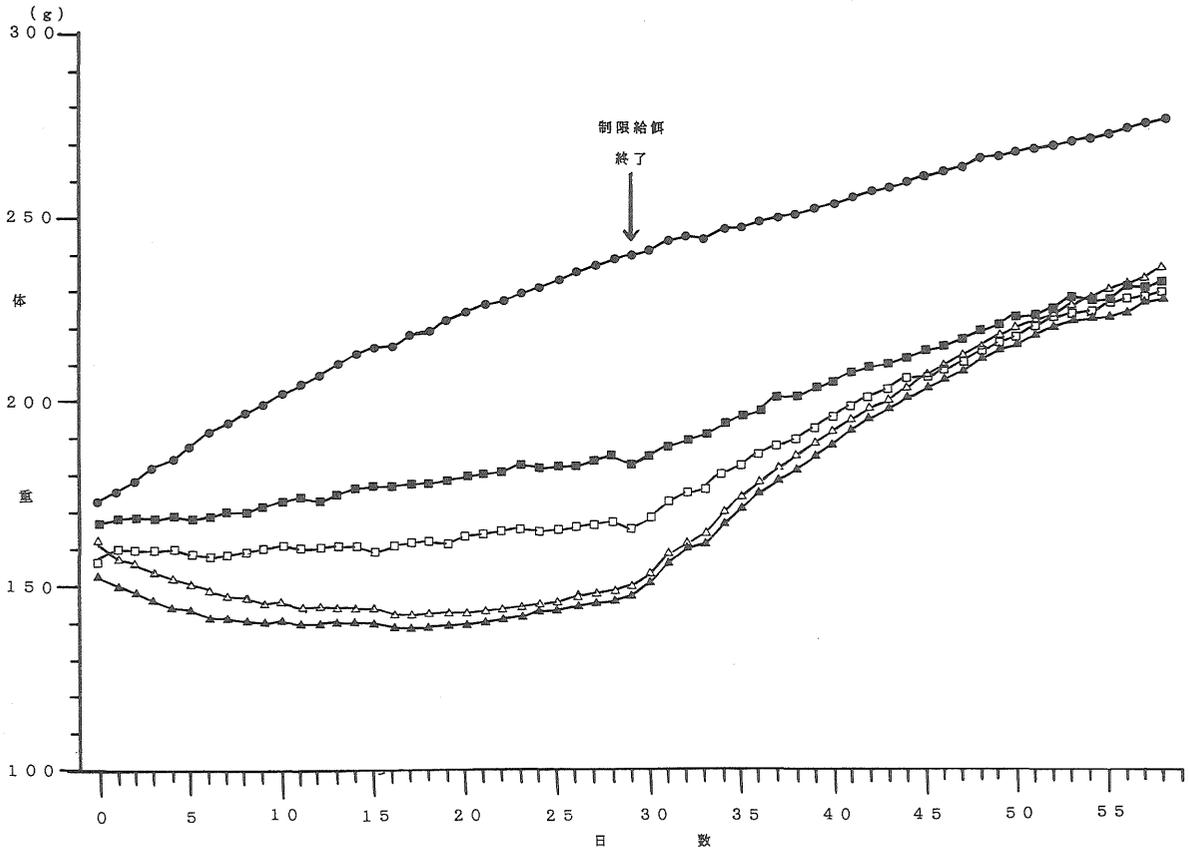


図2. 体重曲線 1群：●—●，2群：△—△，3群：▲—▲，4群：□—□，5群：■—■

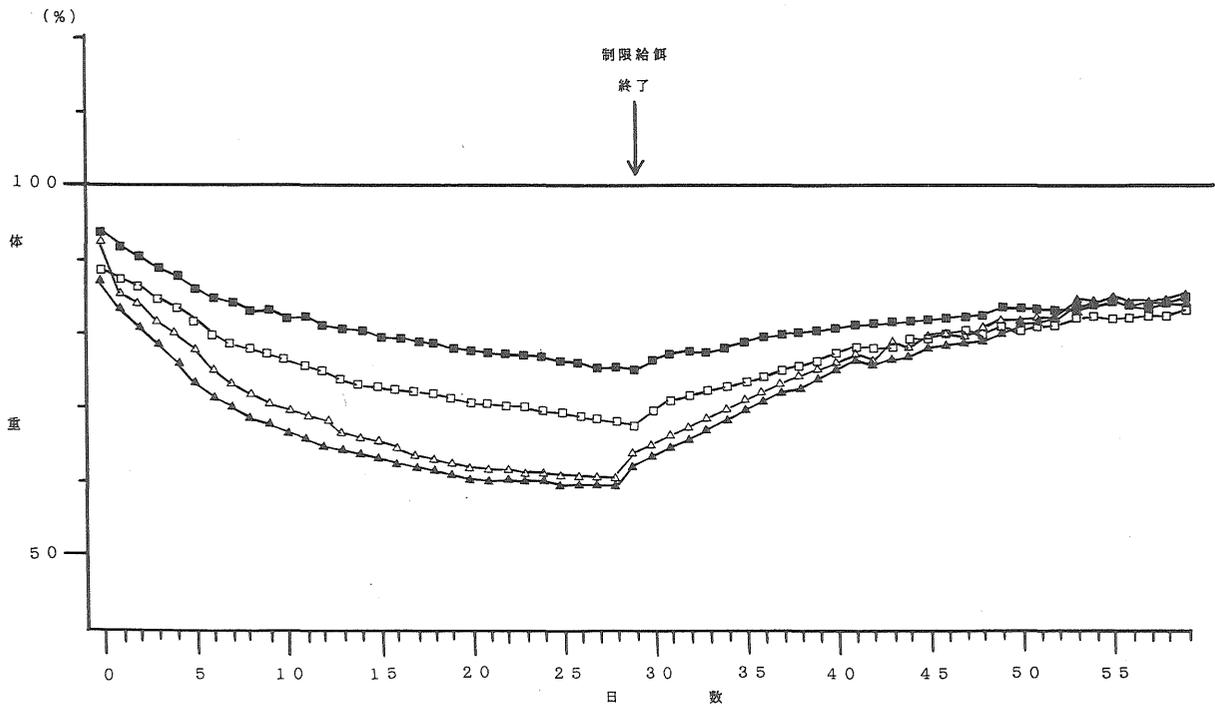


図3. 相对体重增加率 (1群体重/各群体重) 1群：●—●，2群：△—△，3群：▲—▲，4群：□—□，5群：■—■

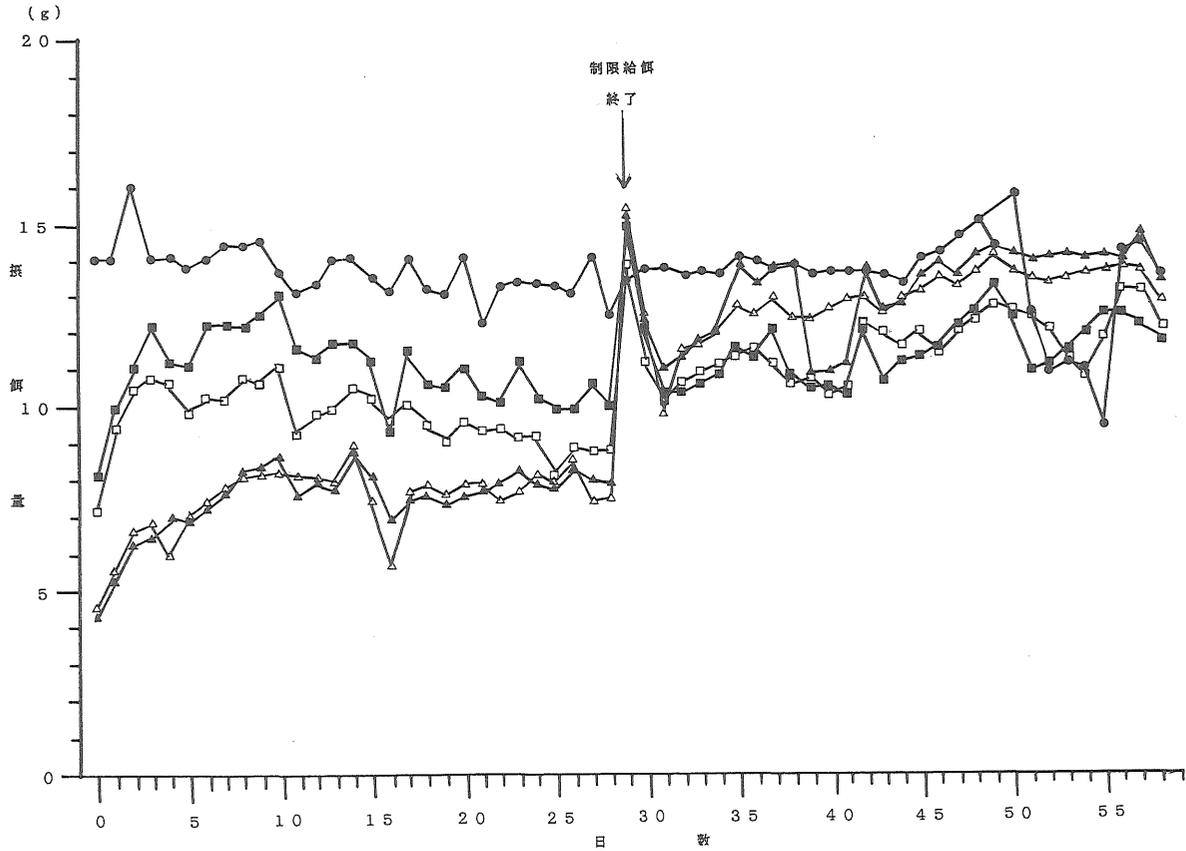


図4. 1日の摂餌料 1群：●—●， 2群：△—△， 3群：▲—▲， 4群：□—□， 5群：■—■

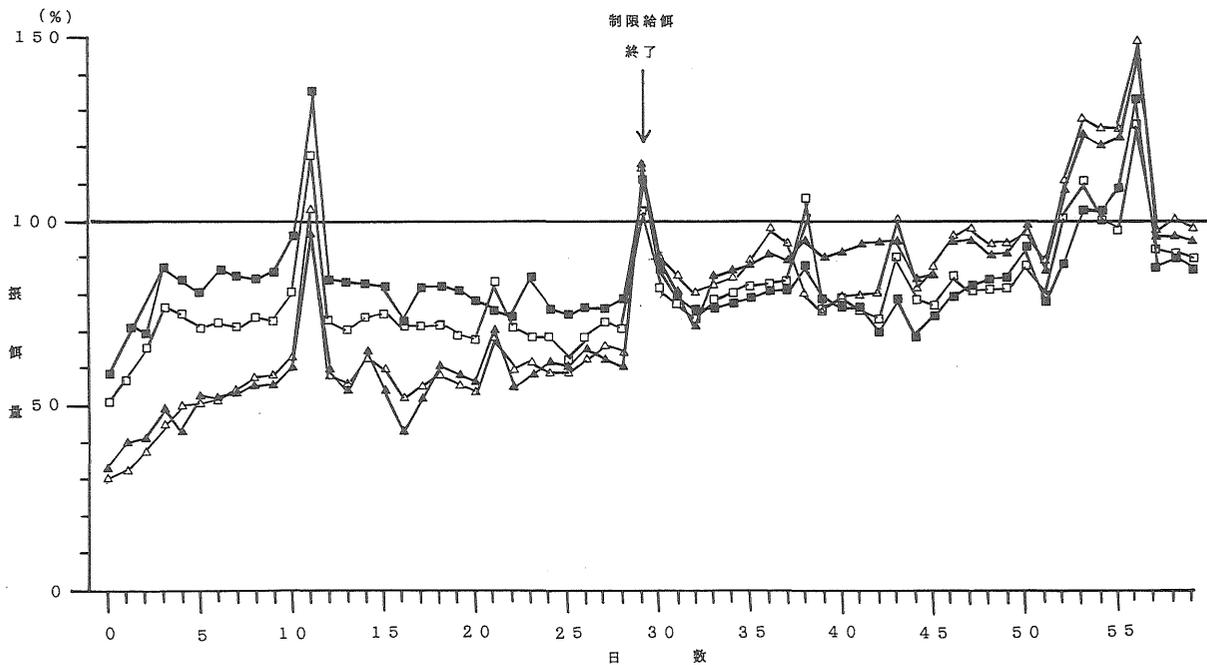


図5. 摂餌量率 (1郡摂餌量/各郡摂餌量) 1群：●—●， 2群：△—△， 3群：▲—▲， 4群：□—□， 5群：■—■

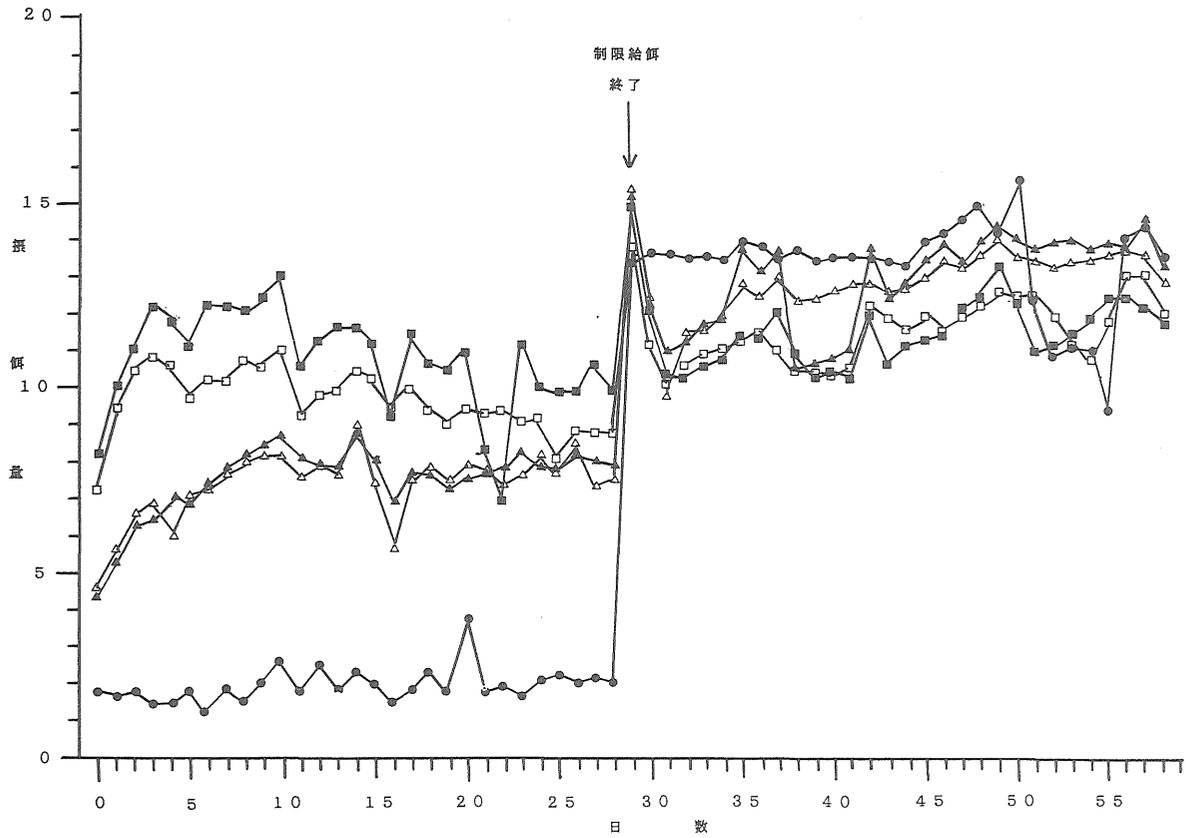


図6. 2時間の摂餌量 1群：●—●, 2群：△—△, 3群：▲—▲, 4群：□—□, 5群：■—■

表1. 臓器重量

項目	郡	I 郡	II 郡	III 郡	IV 郡	V 郡
心 臓	(mg)	754.6	677.0	673.6	641.3	648.9
肺	(mg)	925.6	900.3	814.5	802.8	785.1
肝	(g)	8.8653	7.8885	8.0987	7.5320	7.3854
脾	(mg)	529.6	494.5	470.7	480.1	464.6
腎 (右)	(mg)	1014.3	773.6	786.0	768.0	768.9
腎 (左)	(mg)	870.7	774.7	808.8	770.3	788.5
副 腎(右)	(mg)	13.4	11.9	13.0	11.9	12.0
副 腎(左)	(mg)	16.9	15.4	14.6	14.7	15.0
精 巢(右)	(g)	1.3347	1.2402	1.2874	1.2926	1.2739
精 巢(左)	(g)	1.3649	1.2858	1.3234	1.3463	1.3083
脳	(mg)	2148.4	1839.3	1882.6	1912.6	1860.6
胸 腺	(mg)	196.4	146.0	149.7	153.7	149.2
前立腺	(mg)	274.7	158.5	149.4	111.6	133.5

表 2. 1 郡との臓器重量比

項目 \ 郡	I 郡	II 郡	III 郡	IV 郡	V 郡
心 臓	100	89.7	89.3	85.0	86.0
肺	100	97.3	88.0	86.7	84.8
肝	100	89.0	91.4	85.0	83.3
脾	100	93.4	88.9	90.7	87.7
腎 (右)	100	76.3	77.5	75.7	75.8
腎 (左)	100	89.0	92.9	88.5	90.6
副 腎(右)	100	88.8	97.0	88.8	89.6
副 腎(左)	100	91.1	86.4	87.0	88.8
精 巢(右)	100	92.9	96.5	96.9	95.5
精 巢(左)	100	94.2	97.0	98.6	95.9
脳	100	85.6	87.7	89.0	88.6
胸 腺	100	74.3	76.2	78.3	76.0
前立腺	100	57.7	54.4	40.6	48.6

表 3. 各郡臓器の体重比

項目 \ 郡	I 郡	II 郡	III 郡	IV 郡	V 郡
心 臓 mg/100g	273.8	280.9	272.9	272.6	274.6
肺 mg/100g	335.9	373.6	330.0	341.2	332.3
肝 g/100g	3.22	3.27	3.28	3.20	3.13
脾 mg/100g	192.2	205.2	190.7	204.0	196.6
腎 (右) mg/100g	368.0	321.0	318.5	326.4	325.4
腎 (左) mg/100g	315.9	321.5	327.7	327.4	333.7
副 腎(右) mg/100g	4.86	4.94	5.27	5.06	5.08
副 腎(左) mg/100g	6.13	6.39	5.92	6.25	6.35
精 巢(右) g/100g	0.48	0.53	0.52	0.55	0.54
精 巢(左) g/100g	0.50	0.53	0.54	0.57	0.55
脳 mg/100g	779.5	763.2	762.8	812.8	787.4
胸 腺 mg/100g	71.3	60.6	60.7	65.3	63.1
前立腺 mg/100g	99.7	65.8	60.5	47.4	56.5

報 文 VI

公衆衛生情報に関する調査研究

REPORTS VI

PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION

VI 公衆衛生情報に関する調査研究

公衆衛生情報の解析・提供は、従来より地域保健を支援する科学的技術的拠点としての衛生研究所の主要業務の一つであるが、地域保健法の改正に伴って、その重要性が急速に増大している。従って、当該分野に関する調査研究は本号より一括することにした。ここにその成果としての論文と資料が掲載されている。論文は、疫学調査の方法論に関するもの1編、データ解析及びデータベース構築に関するもの2編、情報ネットワークに関するもの1編で、資料はインターネットの可能性を紹介したもの1編である。

疫学調査の方法論に関する論文においては、大気汚染物質暴露の肺がん死亡率への人口移動の影響が検討されている。大気汚染物質暴露の肺がん死亡率への影響は、人口移動が無い場合は正確に検出されるが、地域、性、年齢別流出人口の統計が得られなければ推定不能とされてきた。ここでは、いくつかの妥当な仮定または近似値を用いて誘導した数学モデルから、人口移動の肺がん死亡率への影響を数量的に表現することを試み、更にこの数学モデルを用いて、東京都区部における大気汚染物質暴露後の肺がん死亡率に及ぼす人口移動の影響について解析を行っている。

データ解析及びデータベース構築に関する1編は、地球観測衛星データ (LANDSAT-TM) 利用の可能性について探ったものである。近年、地球環境保全に対する関心が高まり、国際協力に基づいた地球観測衛星によるリモートセンシングが進展している。ここでは、1975年に開設され画像を提供している(財)リモートセンシング技術センターから入手したデータを用いて、主要河川からの東京湾内への濁水流入の状況を画像解析によって検討した。その結果、湾内における濁水の滞留や拡散、及び濁水の性状の分類に有益な知見を得ることができた。地球観測データの有効利用の可能性を示唆するものである。

データ解析及びデータベース構築に関する他の1編は、疾病対策に関する行政施策立案を支援する知識システム (SAGE) の開発に関するものである。SAGE は長期大規模統計データを用いて、社会の実態、特に疾病の実態を復元することを目的とするもので、種々の表現形式で出力することが可能である。特に、疾病に対する世代の特質を捉えるための世代マップ機能を用いることによって、疾病動向を予測することができる。更に、SAGE は地域環境の安全性と住民の健康を継続的に観測するシステムとしても利用可能であり、衛生行政支援システムとしての有効利用が示唆されている。

情報ネットワークの構築と活用に関する1編は、地方衛生研究所の公衆衛生情報の収集・提供の実態と将来の方向性をアンケート調査したものである。調査対象は全国73の地方衛生研究所で、71の回答が寄せられた。今回の調査で、感染症、食中毒、食品及び飲料水検査、花粉、人口動態統計などに関する情報については、既にデータベース化が進められていること、また都道府県や指定都市単位でのネットワーク化、オンライン化が始まっており、国内レベルでの広域ネットワークも一部実施段階に入っていることが明らかにされた。

インターネットに関する資料では、加速化、広域化する情報流通に対応する手段としてのインターネットを取り上げ、可能性と問題点を検討している。世界的規模の情報収集、最新の情報収集、電子情報伝達による調査研究の活性化などの可能性が述べられており、衛生研究所のネットワーク構築の有効性が示唆されている。

大気汚染物質高濃度発現後の肺がん死亡率への人口移動の影響について

牧 野 国 義*

Effects of Population Movement on Mortality Rates from Lung Cancer after Outbreak of Severe Levels of Air Pollutants

KUNIYOSHI MAKINO*

A methodological study on quantitative effects of the population movement on mortality rate from lung cancer since 1970 was described in this paper. It was estimated that temporary high concentrations of sulfur dioxide observed in Tokyo in the later 1960s made the mortality rates increase after that. In the other hand, the population movement was considered to relate closely to annual transition in the mortality rates. However, these effects have not yet discussed quantitatively.

In this study, a mathematical model was built by using data on mortality from lung cancer, population, age construction of moving population and other factors. Some assumptions on distributions of the mortality and the concentration, age or other factors were employed to estimate constants in the model. As the results from analyses, it was suggested that mortality rate from lung cancer of residents exposed to high concentration would increase about twenty percent if there were no change in population trends, and that the time between exposure and death would be fifteen to twenty years.

Keywords: 肺がん lung cancer, 死亡率 mortality rate, 年次推移 annual transition, 大気汚染物質 air pollutant, 一時暴露 temporary exposure, 人口移動 movement of population, 統計的推定 statistical estimation

緒 言

東京における大気汚染のこれまでの推移を振り返ると、1960年代までは工場からの排ガスによる亜硫酸ガスなどが主体であり、その濃度は、1960年代後半にピークとなった後に、1970年代以降急速に減少した^{1,2)}。一方、1960年代から自動車の排気ガスによる窒素酸化物の濃度が増加し、排気ガスの各種の規制などにより1980年代に平衡ないし微減となったが、1990年代に入り、自動車台数の増加で再び漸増の状況にある³⁾。3,4-benzo (a) pyreneなどの発がん物質は工場からの排ガスや自動車の排気ガスのいずれにも含まれているので、発がん物質の吸入による肺がん罹患率や死亡率が増大したと推察されたときには、自動車の排気ガスの場合は継続暴露による影響とみなせるが、工場からの排ガスの場合は一時暴露による影響とみなせよう。暴露による肺がん罹患までの潜伏期間は大体10年以上で個人差が大きいと考えられて

いるので、影響の検出は継続暴露の方が明らかに困難である。亜硫酸ガス濃度を指標とした解析で、5年間の期間で高濃度時の影響をみると、1960年代後半よりも1970年代前半、さらにそれより後半、そして1980年代の方が顕著であった⁴⁾。しかしながら、時間の経過は、暴露人口の移動つまり流入があるために、一時暴露であっても影響の統計学的な検出をより不明確にする。言い換えれば、人口移動のある集団での大気汚染物質暴露の肺がん死亡率への影響は、人口移動がなければより正確に検出され得ると考えられる。この人口移動の有無による相違を数量として表現することは正確な影響を調べる上で重要であるが、地域、性、年齢別流出入人口の正確な量が得られなければ絶対値として推定することはほとんど不可能である。しかし、いくつかの仮定、または近似値を用いれば、精度が高いとは言えないにしても、概観は可能と思われる。そこで、ここでは大気汚染物質暴露の

*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

肺がん死亡率への影響をより正しく検討するために、人口移動の有無による死亡率への影響を高低汚染地域の死亡率比により数量的に表現する方法論的検討を試みた。

数学モデル

(1) モデルの設定

モデル設定のために以下のような考え方を導入する。

1. 死亡数を大気汚染の影響の有無で分ける。

影響のある死亡数を d_1 、影響のない死亡数を d_2 としたとき、総死亡数 d は $d = d_1 + d_2$

2. 1期を5年とし、大気汚染の影響による死亡数が N 期後を平均とする対数正規分布にしたがうと仮定したとき、 n 期後の死亡数 d_n は、

$$Q(n) = -q_2 \cdot (\ln(n/N))^2 \text{ とおくと,}$$

$$d_n = q_1 \cdot \exp[Q(n)]$$

ここで、 q_1, q_2 は定数。以下、 q_3, q_4, q_5, q_6, q_7 も定数を表す。

3. 大気汚染の影響による死亡数は暴露濃度により指数関数的に増加する。つまり、暴露濃度 C のとき、上記の定数 q_1 は、

$$q_1 = q_3 \cdot \exp[q_4 \cdot C]$$

4. 死亡数は年齢階級 j の関数 $f(j)$ とも指数関数的に増加する。よって、 $q_3 = q_5 \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]$

以上より、年齢階級 j の死亡数のうち d_{1j} は、

$$d_{1j} = q_5 \cdot \exp[q_6 \cdot f(j) + q_4 \cdot C + Q(n)]$$

また、 d_{2j} は、 $d_{2j} = q_7 \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]$ で、

$$d_{nj} = \exp[q_6 \cdot f(j)] \{q_7 + q_5 \cdot \exp[q_4 \cdot C + Q(n)]\}$$

5. n 期後の対象地域、基準集団の年齢階級 j の人口をそれぞれ P_{nj}, P_{0j} とすると、 n 期後の年齢調整死亡率 D_n は、 $D_n = \sum_j (d_{nj}/P_{nj} \cdot P_{0j}) / \sum_j P_{0j}$

6. 大気汚染物質濃度が一時的に高濃度であった地域 A と対照地域 B を選択する。その時期の濃度をそれぞれ C_A, C_B 、 n 期後の両地域の年齢階級 j の人口、死亡数、年齢調整死亡率をそれぞれ $P_{Anj}, P_{Bnj}, d_{An}, d_{Bn}, D_{An}, D_{Bn}$ とする。ここで、 d_2 は地域 A, B で共通とする。

n 期後の両地域の年齢調整死亡率の比 $D_{ABn} = D_{An}/D_{Bn}$ は、 $R_{.nj} = P_{0j}/P_{.nj}$ とおくと、

$$\begin{aligned} D_{ABn} &= \sum_j (d_{Anj} \cdot R_{Anj}) / \sum_j (d_{Bnj} \cdot R_{Bnj}) \\ &= \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_A + Q(n)]\} \cdot \sum_j R_{Anj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)] / \\ &\quad (\{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_B + Q(n)]\} \cdot \sum_j R_{Bnj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]) \end{aligned}$$

7. 人口移動がないとき、 q_7 と $\exp[q_4 \cdot C + Q(n)]$ の大きさの比較で以下のような分類が可能である。

1) $q_7 \ll \exp[q_4 \cdot C_B + Q(n)]$ のとき、

$$X = \exp[q_4 \cdot C_A + Q(n)] / \exp[q_4 \cdot C_B + Q(n)]$$

$$Y = \sum_j R_{Anj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)] / \sum_j R_{Bnj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]$$

とおくと、 $D_{ABn} \sim X \cdot Y$

2) $q_7 \gg \exp[q_4 \cdot C_A + Q(n)]$ のとき、

$D_{ABn} \sim Y$ となり、大気汚染に関連した項が消え、前提に反するので、除外される。

3) その他のとき、

$$Z = \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_A + Q(n)]\} / \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_B + Q(n)]\}$$

とおくと、 $D_{ABn} = Z \cdot Y$

8. 人口移動があるとき、条件を簡略化するため、流出人口と流入人口が等しく、年齢階級共通の人口移動割合を p_j とすると、 n 期後、元の人口割合 S_j は、

$$S_j = \prod_{k=1}^n (1 - p_{j-k}) \quad (j \geq k)$$

であり、移動人口割合は、 $1 - S_j$

流入人口の0期(地域Aが高濃度であった時期)の暴露濃度を C_A, C_B で代表し、地域A, Bのその割合をそれぞれ r_A, r_B とする ($r_A + r_B = 1$)。よって、移動人口があるときは、ないときの C_A, C_B に対応する年齢階級 j における C_{Aj}, C_{Bj} が、それぞれ

$$C_{Aj} = \{S_j + (1 - S_j) \cdot r_A\} \cdot C_A + (1 - S_j) \cdot r_B \cdot C_B$$

$$C_{Bj} = \{S_j + (1 - S_j) \cdot r_B\} \cdot C_B + (1 - S_j) \cdot r_A \cdot C_A$$

となる。したがって、

$$\begin{aligned} D_{ABn} &= \\ &\quad \sum_j \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_{Aj} + Q(n)]\} \cdot R_{Anj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)] / \\ &\quad (\sum_j \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_{Bj} + Q(n)]\} \cdot R_{Bnj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]) \end{aligned}$$

年齢階級 j で、 $C_{Aj} < C_A, C_{Bj} > C_B$ だから、7. と同じ分類が可能である。

1) $q_7 \ll \exp[q_4 \cdot C_B + Q(n)]$ のとき、

$$D_{ABn} \sim \sum_j \exp[q_4 \cdot C_{Aj} + q_6 \cdot f(j)] \cdot R_{Anj} / \sum_j \exp[q_4 \cdot C_{Bj} + q_6 \cdot f(j)] \cdot R_{Bnj}$$

2) $q_7 \gg \exp[q_4 \cdot C_A + Q(n)]$ のとき、

$D_{ABn} \sim Y$ となり、大気汚染に関連した項が消え、前提に反するので、7. 2) 同様除外される。

3) その他のとき、

$$\begin{aligned} D_{ABn} &= \\ &\quad \sum_j \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_{Aj} + Q(n)]\} \cdot R_{Anj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)] / \\ &\quad (\sum_j \{q_7 + \exp[q_4 \cdot C_{Bj} + Q(n)]\} \cdot R_{Bnj} \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]) \end{aligned}$$

(2) 定数等の推定

n 期後の両地域の年齢調整死亡率の比 D_{ABn} を算出するためには、定数 q_2, q_4, q_6, q_7 および死亡数の年齢階級 j による関数 $f(j)$ 、大気汚染の影響による肺がん死亡数発生の平均期間 N 、人口移動割合 p 、地域 A, B における大気汚染物質濃度(地域Aが高濃度時) C_A, C_B 、流入人口の0期の暴露濃度の割合 r_A (または r_B)、さらに地域 A, B の年齢調整死亡率の要素 ($P_{Anj}, P_{Bnj}, d_{An}, d_{Bn}$) が既知または推定できる必要がある。そこで、以下

のように考えた。

1. 肺がん死亡率 d と年齢階級 j との関係は、大気汚染の影響が低い1957~1965年の全国では Fig. 1 のようになり、年齢階級が15(70~74才)と16(75~79才)の間でピークとなる2次曲線を描いた。

そこで、 $f(j) = (15.5 - j)^2$ とし、これと対数変換した肺がん死亡率との相関、回帰分析をみると、

相関係数は、 -0.974 ($p < 0.001$),

回帰式は、 $d = 29.6 \cdot \exp[-0.0395 \cdot (15.5 - j)^2]$ であった。よって、 $q_6 = -0.0395$ とした。

2. q_2 は分布型に関する定数であるが、死亡数は q_1 との積で表現されることから、定数設定の上では q_1 の寄与が大きい。そこで、ここでは $q_2 = 1$, 0.8 のようにパラメータとした。

3. 大気汚染の影響による肺がん死亡数発生平均期間は、7. 1), 8. 1) では不要である。また、必ずしも明らかでないので、7. 3), 8. 3) ではパラメータとして、 $N = 2, 3, 4, 5$ (10, 15, 20, 25年) とした。

4. 5年以内の人口移動割合 P は、国土庁⁵⁾ や東京都⁶⁾ の移動人口報告によれば、大体人口の5~10%程度と思われる。そこで、 P もパラメータとして、 $\sum_j p_j = 0.05, 0.10$ とした。なお、移動人口の年齢構成比を上記資料より Fig. 2 のように推定した。

5. 地域 A, B として、1966~1969年の亜硫酸ガスの区毎の推定濃度⁴⁾ から、23区の中で対照的な地域として、地域 A に中央区、地域 B に杉並区を選択した。このとき、

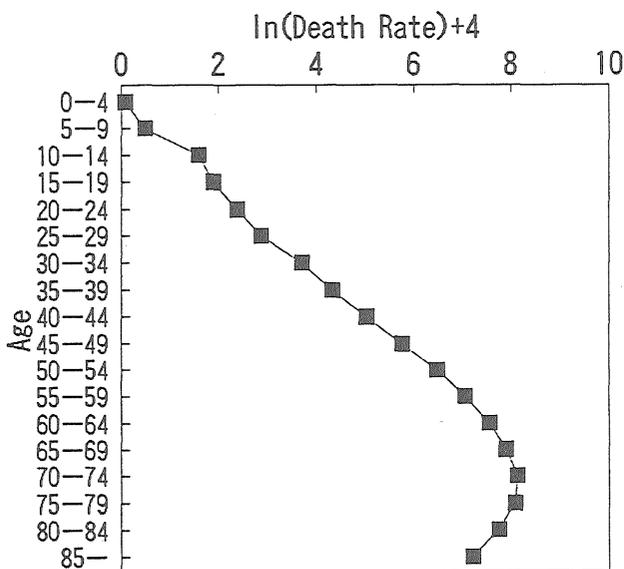


Fig.1. Distribution of Death Rates from Lung Cancer by Age-group Transformed Logarithmically in Japan between 1957 and 1965

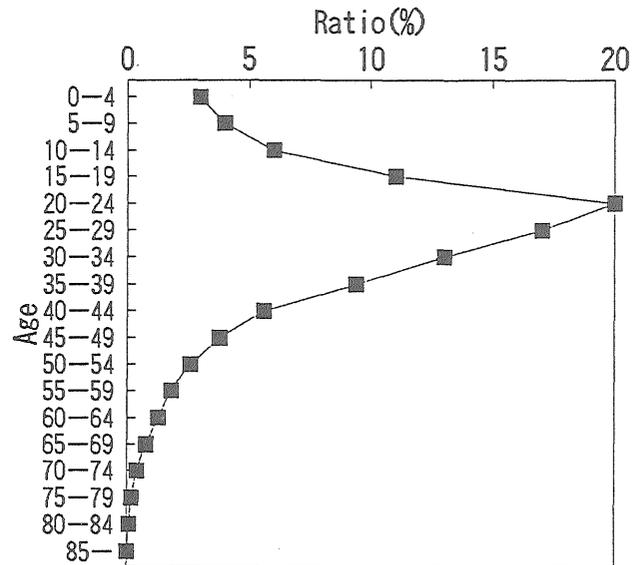


Fig.2. Distribution of Rates Estimated by Age-group for Population Movement

$C_A = 78.4$, $C_B = 16.0$ (ppb)であった。流入人口の0期での暴露濃度が高濃度(C_A)である割合 r_A は地域 A, B で異なる可能性があるが、簡略化のために同一とし、 $r_A = 0.1, 0.2, 0.3$ とパラメータにした。

6. 1975~1989年の地域 A, B の肺がん SMR の比をみると⁴⁾、平均1.340であった。これを基に7. 1) で q_4 を推定すると、 $q_4 = 11.8$ の近似値が得られた。

7. 1970年以前の肺がん死亡への大気汚染の影響が低い時期に地域 A, B の死亡率の差は、

$D_A - D_B = q_7 \cdot \sum_j |R_{Anj} - R_{Bnj}| \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]$ だから、

$$q_7 = (D_A - D_B) / \sum_j |R_{Anj} - R_{Bnj}| \cdot \exp[q_6 \cdot f(j)]$$

ここで、1970年の D_A, D_B は不明であるが、地域 A, B の1975年の肺がんの年齢調整死亡率と地域 A, B の1970, 1975年の肺がんの粗死亡率より、 $D_A = 11.5$, $D_B = 7.4$ と推定され、そこで、 $q_7 = 0.537$ が得られた。

人口移動の影響

(1) パラメータの寄与

まず、 $Q(n) = -q_2 \cdot (\ln(n/N))^2$ で、パラメータ q_2 , N の $Q(n)$ への寄与をみるため Fig. 3 に図示した。 q_2 は、 N に比べて寄与が小さい。ここでは以下 $q_2 = 1$ とした。また、パラメータ P について、 $\sum_j p_j = 0.05$ または 0.10 としたときの D_{ABn} の変動は小さく、その差は全て D_{ABn} の1%未満であったので、 $\sum_j p_j = 0.05$ とした。さらに、 r_A についても D_{ABn} の変動は小さく、 $r_A = 0.1, 0.2, 0.3$ としたときの D_{ABn} の変動係数は全ての年で0.1%未満であったので、 $r_A = 0.1$ とした。以上のように、4つのパラメータを変化の可能性を考慮して検討したとき、

Table.2. Rations between Age-adjusted Death Rates Estimated in Chuo-ku and Suginami-ku in No Population Movement (PM) since 1970 and in PM (Parameter N) and The Ratio of SMRs between Two Wards in 1970-90 and The Differences

Year	A:Not	B:N in Movement				C:SMR Ratio
	Move	2	3	4	5	
1970	1.05	-	-	-	-	1.10
1975	1.55	1.30	1.27	1.21	1.14	1.27
1980	1.58	1.30	1.33	1.31	1.28	1.29
1985	1.64	1.29	1.37	1.39	1.38	1.35
1990	1.70	1.25	1.37	1.41	1.42	1.39
$100 \Sigma (C-B)^2$		2.42	0.24	0.60	1.88	-

Table.3. Ratio of Estimated Statisticses for Death Rates from Lung Cancer in No Population Movement/The Other in Four Years, and SO₂ (ppb) for Five Years of 1966 to 1970

Ward	1975	1980	1985	1990	Mean	SO ₂
Chiyoda	1.20	1.18	1.19	1.22	1.20	72.5
Chuo	1.22	1.19	1.21	1.24	1.22	78.4
Minato	1.10	1.09	1.09	1.10	1.10	40.8
Shinjuku	1.12	1.11	1.11	1.13	1.12	47.2
Bunkyo	1.13	1.11	1.12	1.14	1.13	49.9
Taito	1.20	1.18	1.19	1.22	1.20	71.1
Sumida	1.18	1.16	1.17	1.20	1.18	64.4
Koto	1.14	1.13	1.14	1.16	1.14	54.2
Shinagawa	1.12	1.11	1.12	1.13	1.12	47.8
Meguro	1.08	1.07	1.07	1.08	1.08	35.9
Ohta	1.18	1.16	1.17	1.20	1.18	65.0
Setagaya	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	23.0
Shibuya	1.08	1.07	1.08	1.09	1.08	37.0
Nakano	1.05	1.04	1.05	1.05	1.05	28.4
Suginami	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	16.0
Toshima	1.06	1.06	1.06	1.07	1.06	32.2
Kita	1.09	1.08	1.09	1.10	1.09	39.1
Arakawa	1.17	1.15	1.16	1.19	1.17	61.7
Itabashi	1.09	1.08	1.08	1.09	1.09	38.1
Nerima	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	16.1
Adachi	1.09	1.08	1.08	1.10	1.09	38.6
Katsushika	1.10	1.09	1.09	1.11	1.10	41.3
Edogawa	1.10	1.09	1.09	1.11	1.10	41.8

study と Case-control study とに大別される。前者の方法で、移民については報告されているが、人口移動を考慮した報告は見当たらなかった。後者は個人データを利用し、住所歴を調査している報告もあった。しかし、報

告の多くは住所歴または人口移動を解析項目としていない。それでも、これらの報告の多くが肺がん死亡または罹患への大気汚染の関与を認め、あるいは示唆している。中には関与を疑問視した報告がいくつかみられたが⁷⁻¹⁰⁾、その中で後者の検討方法を利用した報告^{7,9)}は住所歴を調査しているものの、必ずしも解析に充分考慮されていなかった。また、この方法では喫煙の影響が大気汚染の影響を検出する際に強く反映するにもかかわらず、これを排除していなかった。これらの報告も、人口移動の情報を加えたり、解析手法の工夫で、大気汚染の肺がん死亡への影響を検出できる可能性がある。

ここで設定した数学モデルは、いくつかの推定値や仮定を用いており、得られた結果の精度が高くはないにしても、真値を大きく外れてはいないと思われる。したがって、見かけ上の死亡率(観測値)で大気汚染の影響を判断することは誤った結果を導く可能性があることに留意すべきであろう。さらに、大気汚染は一時暴露だけでなく、自動車排気ガスの継続暴露があり、この寄与も死亡率に影響する可能性がある。なお、喫煙や職業性暴露などの他の肺がん危険因子も大気汚染以上に肺がん死亡率に寄与すると思われるので、これらの暴露量の地域分布や時間変化に偏りがあれば数学モデルの定数や統計分布型に影響する可能性がある。

次に、暴露から死亡までの経過期間が15年から20年程度(N=3から4)と推定された。しかし、暴露から罹患までの潜伏期間についてこの結果を基に数量として表すことは、肺がん死亡者の罹患から死亡までの期間が明らかでないこと、肺がん治癒者のデータが含まれていないことなどから適当でなく、また、発生部位によっても異なるので、かなり幅広いと思われる。

ま と め

東京では1960年代後半に一時的に高濃度のSO₂に代表される大気汚染が発現した。この大気汚染による肺がん死亡率への人口移動の影響を検討するため、高濃度の中央区、低濃度の杉並区の1970年から1990年までの肺がん死亡率、人口のデータ、推定された移動人口の年齢構成などを用いて数学モデルによる方法論的検討を行った。その際に、大気汚染物質暴露とその後の時間との関係、死亡数と暴露濃度や年齢階級との関係などを仮定して数学モデルの定数を推定した。これらの推定や仮定があるために設定された数学モデルの正確度が高いとは言えないにしても、高濃度地域と低濃度地域の肺がん死亡率の比は、人口移動がなければあるときに比べて20%程度増加すること、この比は濃度に比例すること、すなわち、

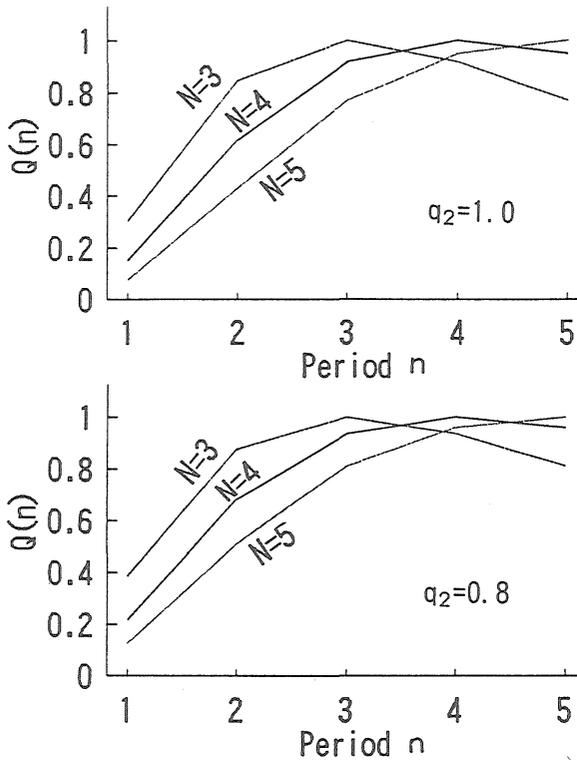


Fig.3. Distribution of Function $Q(n)$ by Parameters of q_2 and N for Five Periods Shown by n

D_{ABn} の変動に寄与が大きいパラメータは N のみであった。

(2) 人口移動の死亡率比への影響

1970年から1990年まで中央区と杉並区の東京都を標準人口とする肺がん SMR を Table 1 に示した。次に、数学モデルから推定された人口移動がある場合とない場合の肺がんの年齢調整死亡率比 (D_{ABn}) の1970年から1990年まで5年毎の変化を Fig. 4 に示した。ここで、人口移動がある場合にパラメータ N を2から5までとした。さらに、SMR比も加えた。Table 2 には人口移動がない場合とある場合との比を示した。その結果によると、SMR比は $N = 3$ から4で、今回の検討から大気汚染物質の高濃度一時暴露による肺がん死亡までの経過期間は15年から20年程度と推定された。また、もし人口移動がない場合には、現実の人口移動がある場合に比べて高汚染地域(中央区)と低汚染地域(杉並区)との死亡率の比が20%程度増加すると推定された。

上記パラメータで $N = 3$ のときの他の区について同様の比を推定した結果がTable 3で、年度間のばらつきはどの区も小さかった。なお、参考として1966年から1970年までの各区の SO_2 平均濃度も併記した。比の増加の割合は、その推定根拠から予想されたことであるが、 SO_2 濃度とほぼ比例した(相関係数0.998)。

Table.1. SMRs in Chuo-ku and Suginami-ku from 1970 to 1990 and The Ratio

Year	A:Chuo	B:Suginami	A/B
1970	136.1	97.9	1.393
1971	140.1	99.3	1.411
1972	139.3	101.3	1.375
1973	124.3	106.2	1.170
1974	135.8	99.1	1.370
1975	135.6	101.6	1.335
1976	130.0	103.2	1.260
1977	113.4	108.5	1.045
1978	129.7	99.9	1.298
1979	143.7	97.3	1.477
1980	148.3	95.9	1.546
1981	144.6	101.1	1.430
1982	137.9	102.5	1.345
1983	120.1	103.7	1.158
1984	111.6	109.1	1.023
1985	119.6	88.3	1.354
1986	135.1	81.5	1.658
1987	129.7	84.4	1.537
1988	118.8	87.7	1.355
1989	112.8	91.3	1.235
1990	120.4	87.8	1.371
Mean	129.9	97.5	1.340

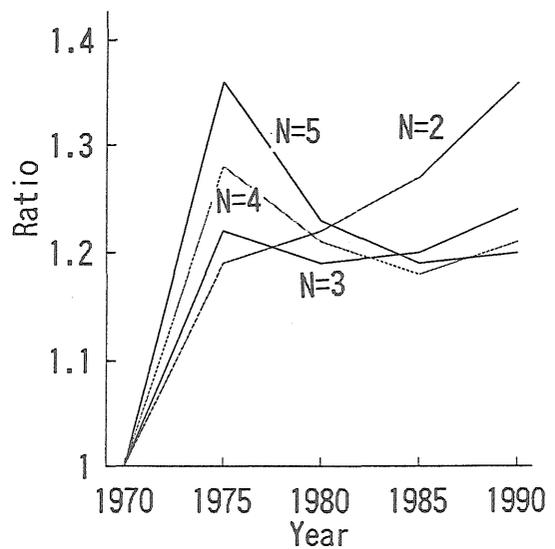


Fig.4. Distribution of Ratios between Age-adjusted Death Rates in No Population Movement (PM) and PM by Parameter N

考 察

大気汚染は喫煙や職業性暴露に次ぐ肺がんの危険因子として知られており、両者の関連性を検討した報告は数多い。関連性の検討方法としては概ね Cross-sectional

高濃度地域の肺がん死亡率は、人口移動がなければあるときに比べて20%程度は増加することが示唆された。また、高濃度暴露から死亡までの経過期間は15年から20年程度と推察された。

(この報告の一部は第54回日本公衆衛生学会総会(1995年10月)で発表した。)

文 献

- 1) 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。
- 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) 環境庁編：環境白書平成5年版，1993，大蔵省印刷局，東京。
- 4) Makino, K. : *Environmental Sciences*, 5, (印刷中), 1995.
- 5) 国土庁編：我が国の人口移動の実態，1983，大蔵省印刷局，東京。
- 6) 東京都総務局：東京都住民基本台帳人口移動報告，1988，東京。
- 7) Vena, J. E. : *Arch. Environ. Health*, 38, 229-236, 1983.
- 8) Trichopoulos, D., Hatzakis, A. Wynder, E. and et al : *Environ. Res.*, 44, 169-178, 1987.
- 9) Holowaty, E. J., Risch, H. A., Miller, A. B. and et al : *Canadian J. Public Health*, 82, 304-309, 1991.
- 10) Talbott, E. O., Day, R. D., Marsh, G. M. and et al : *Sci. Total Environ.*, 127, 139-154, 1992.

東京湾の水質汚濁の解析における LANDSAT-TM データの利用

荻野 周三*, 神谷 信行*, 池田 一夫*,
竹内 正博*, 土屋 悦輝*

Analysis of Water Pollution in Tokyo Bay by LANDSAT-TM Data

SHUZO OGINO, NOBUYUKI KAMIYA, KAZUO IKEDA,
MASAHIRO TAKEUCHI and YOSHITERU TSUCHIYA

Keywords : 東京湾 Tokyo Bay, 水質汚濁 water pollution, LANDSAT

緒 言

東京湾の水質汚濁の原因としては河川を經由した首都圏の生活排水や産業排水, あるいは土石等の流入があげられる. 半閉鎖系の東京湾の水循環のメカニズムと流入河川の湾内水汚濁に対する寄与の度合いを知ることは, 湾の水質と生態系を保全する上で重要な意味を持つ.

著者らは東京湾の水質汚濁を解析する手段として地球観測衛星 LANDSAT から送られる TM (Thematic Mapper) センサーによる観察データの利用を計画した. LANDSAT のデータは既に大気や海洋の汚染, 植生分布, 地質や地形, さらに土地利用といった広い分野で活用されており, データの解析技術も日々進歩を遂げている. 今回は東京湾の水質汚濁に関する TM データを用いた基礎的な画像解析例を紹介し, あわせて TM データの有効性について報告する.

TM データと解析方法

TM データには LANDSAT 5 号が1985年8月3日及び1993年5月21日に観測した関東地方のシーンデータ(パス:107, ロウ:35)から荒川河口付近と木更津をそれぞれ中心に, 間引き率1もしくは5(間引き率5はデータを切り出す際に, 5画素おきに切り出すことで, 間引き率1に比べて画像領域は5倍に拡大するが, 解像度は1/5に低下する)で切り出したフロッピーデータを用いた. なお観測当日の雲量は1985年8月3日が10%, 1993年5月21日は0%であった.

TM データの画像処理と解析には(株)セントラル・コンピュータ・サービス製リモートセンシング用画像処理ソフトウェア μ -CREST を用い, (株)サピエンス製

1,670万色フルカラーフレームメモリ スーパーフレーム2 Σ を装着した(株)NEC製パーソナル・コンピュータ PC-9821Bp を利用して行った.

地表及び水域表層の構成物質はそれぞれの特質に応じた固有のスペクトルを反射もしくは放射している. TM データはこれらのスペクトルのうち, 可視~遠赤外域に至る計7種類のスペクトルバンドの分光輝度を観察したものである. この輝度値をバンド間で合成し, さらに様々な画像処理技術を用いることで, 本来は視認することが困難な事象を画像として明確に現出させることが可能になる.

著者らは TM データのバンド1(波長0.45~0.52 μ m)とバンド2(波長0.52~0.60 μ m)及びバンド3(波長0.63~0.69 μ m)の3種類の可視域スペクトルバンドにおける分光輝度値について, バンド1を青色, バンド2を緑色, バンド3を赤色に着色する, いわゆるトゥルーカラー合成画像を作成した. また合成画像にはコントラスト増幅による濃度変換処理を施して視認性の向上をはかった.

結果および考察

1985年8月3日の荒川河口付近を中心とする, 間引き率5の画像を図1に示した. 濁水は荒川河口や隅田川が流入する東京港, 江戸川河口を中心とした浦安から船橋に至る沿岸部に見られるが, その他の水域には顕著な濁水分布は認められなかった. 一方, 図2に示した1993年5月21日の観察画像では広範囲にわたって, より明瞭な濁水の分布が認められた. 河川からの濁水の流入は荒川, 旧江戸川及び多摩川の各河口で顕著であり, 特に荒川は

* 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

多量の濁水を湾内に排出していた。また東京港、浦安、船橋、横浜港、本牧付近の各沿岸水域では濁水が滞留している様子が認められた。袖ヶ浦の小櫃川河口付近にも陸地に平行する濁水分布が存在した。湾中央に広がる濁水分布は多摩川河口と袖ヶ浦を結ぶ線から南下するにしたがって、徐々に明瞭となり、特に横浜港沖及び本牧沖の水域で顕著であった。それに対して、幕張から市原に至る沿岸と、その沖合いの湾北東奥部の水域では比較的清澈な状態が保たれていた。

1985年8月3日と1993年5月21日の両者における濁水分布の相違の一因としては、東京湾に流入する河川流域での降雨量の差が考えられた。1993年5月14日、関東地方全域には前線の通過に伴う20~50mm/時の比較的強い降雨が記録されており、同年5月21日の濁水は雨によって河川に流入した土砂の影響による可能性が強い。ちなみに1985年8月3日の観察ではそれ以前の12日間にわたって、ほとんどの流入河川流域で10mmを越える降雨は記録されていない。

菱田¹⁾は東京湾における物質移動パターンの特徴として東京港及び横浜港付近の表層の濁水は神奈川県沖の沿岸に沿って南下しつつ、観音崎沖から外洋に流出し、反対に外洋系水は湾中央から千葉県側を北上すると報告している。なお、船橋から千葉沖には反時計回りの停滞水域が存在することと、湾奥部には外洋系水が下層の潮流を形成しつつ、湾中央を経由して到達することをあわせて報告している。図2に示したように荒川及び多摩川の両河口から排出された濁水はいずれも沿岸に沿って南西に尾を引いており、これらの河川からの濁水が神奈川県側の表層の南下潮流によって拡散される様子がうかがえた。

図3は1993年5月21日の荒川河口を中心とする、間引

き率1の画像である。荒川及び旧江戸川から流出した濁水の相互干渉と拡散の様子をより詳細に観察することができる。

1993年5月21日の観察画像(間引き率5)について、最尤法を用いて濁水の分類を行い、疑似着色した結果を図4に示した。東京港や横浜港などの特に閉鎖性の高い港湾水域における滞留濁水(赤及び黄色)と、江戸川河口以西の神奈川県にかけての沿岸部における濁水(紫色)、さらに湾中央部に広がる濁水(緑色)のそれぞれの間で性状の違いがあることが示唆された。

結 語

TMデータを用いた東京湾の合成画像からは、湾の水質汚濁に対する流入河川の影響をはじめとして、濁水の滞留や拡散など、多くの知見を得ることができた。このような環境のマクロ的な観察は、従来から実施されている海水や低質、水生生物の分析を中心とした精密な定点モニタリング調査で得られる知見を補完し、水質汚濁に限らず、環境汚染物質の排出や拡散、蓄積の動態の全体像をより明確に説明するための有効な手段になりうると考える。

謝辞 米国政府が所有するLANDSAT-TMデータは財団法人リモート・センシング技術センターを介してEOSAT/宇宙開発事業団から研究利用を目的に提供を受けた。上記機関各位及びデータの処理について多くの助言と技術支援を賜った財団法人リモート・センシング技術センター業務部の石館和奈技師に深謝いたします。

文 献

- 1) 菱田昌孝：海上保安庁水路部 水路部技報，2，70-74，1984。

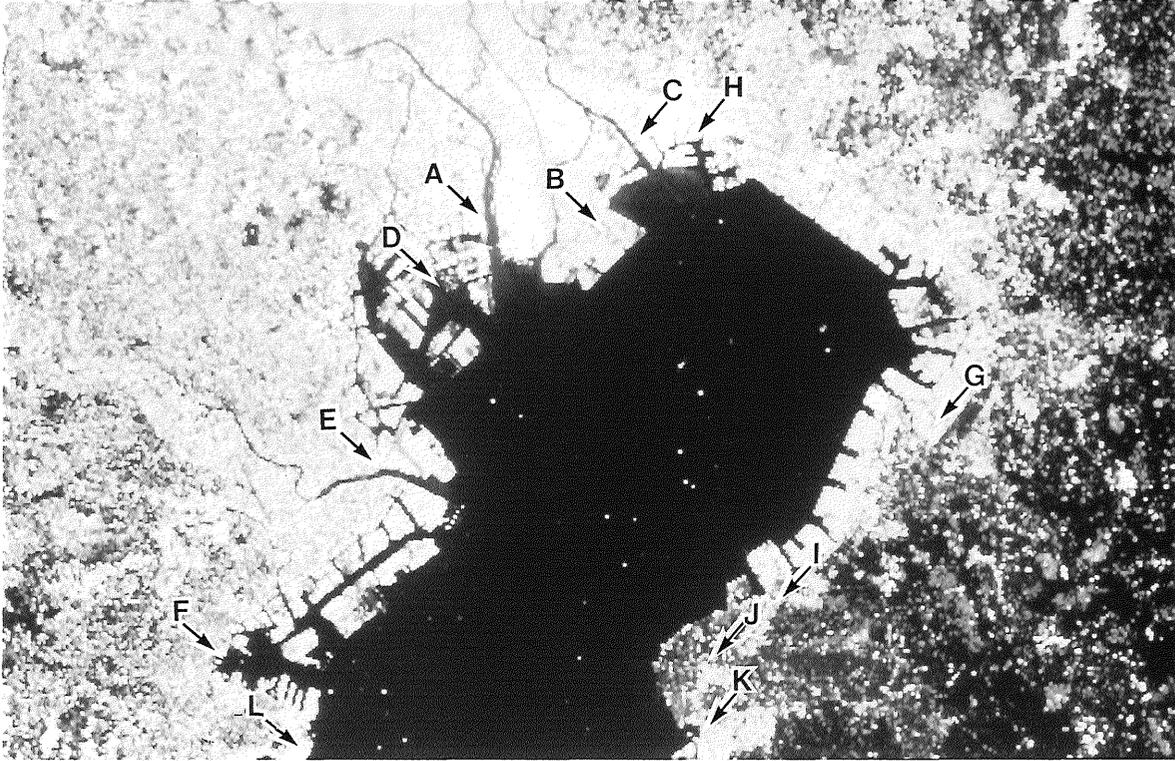


図1. 東京湾TMトゥルーカラー合成写真(1)

観察年月日：1985年8月3日、間引き率：5 A：荒川，B：浦安，C：江戸川，D：東京港E：多摩川，F：横浜港，G：市原，H：船橋I：袖ヶ浦，J：小櫃川，K：木更津，L：本牧

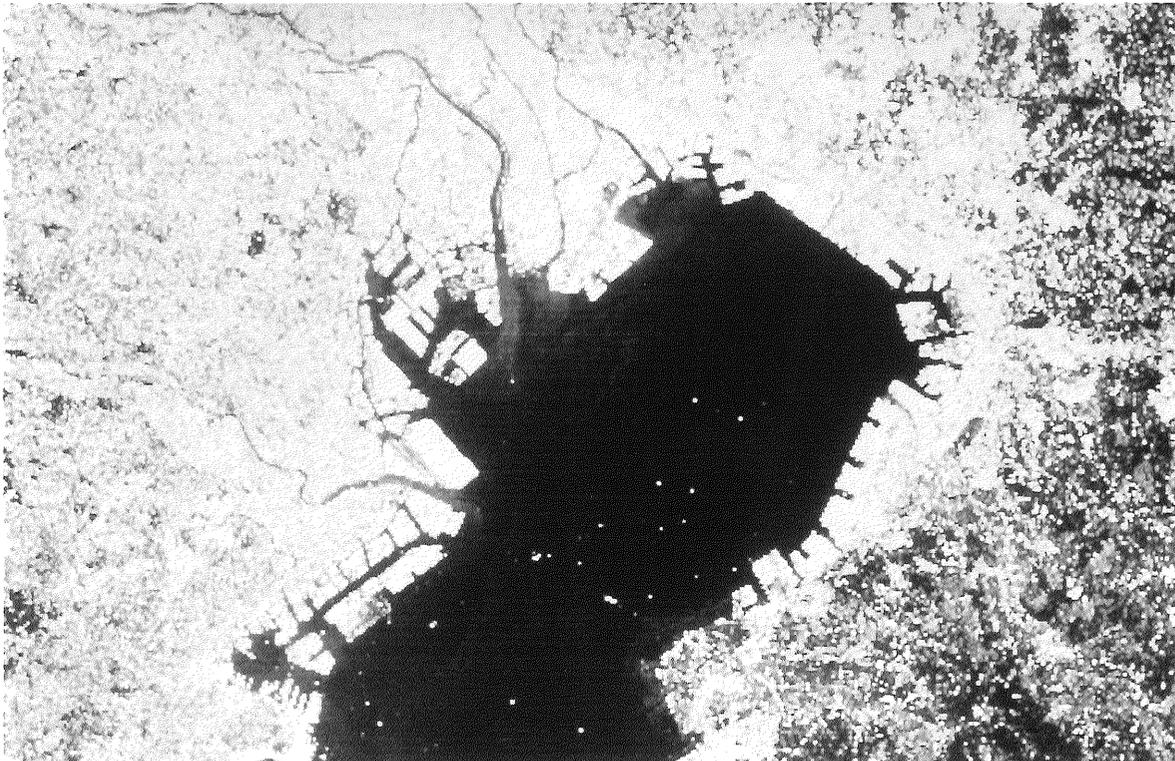


図2. 東京湾TMトゥルーカラー合成写真(2)

観察年月日：1993年5月21日、間引き率：5

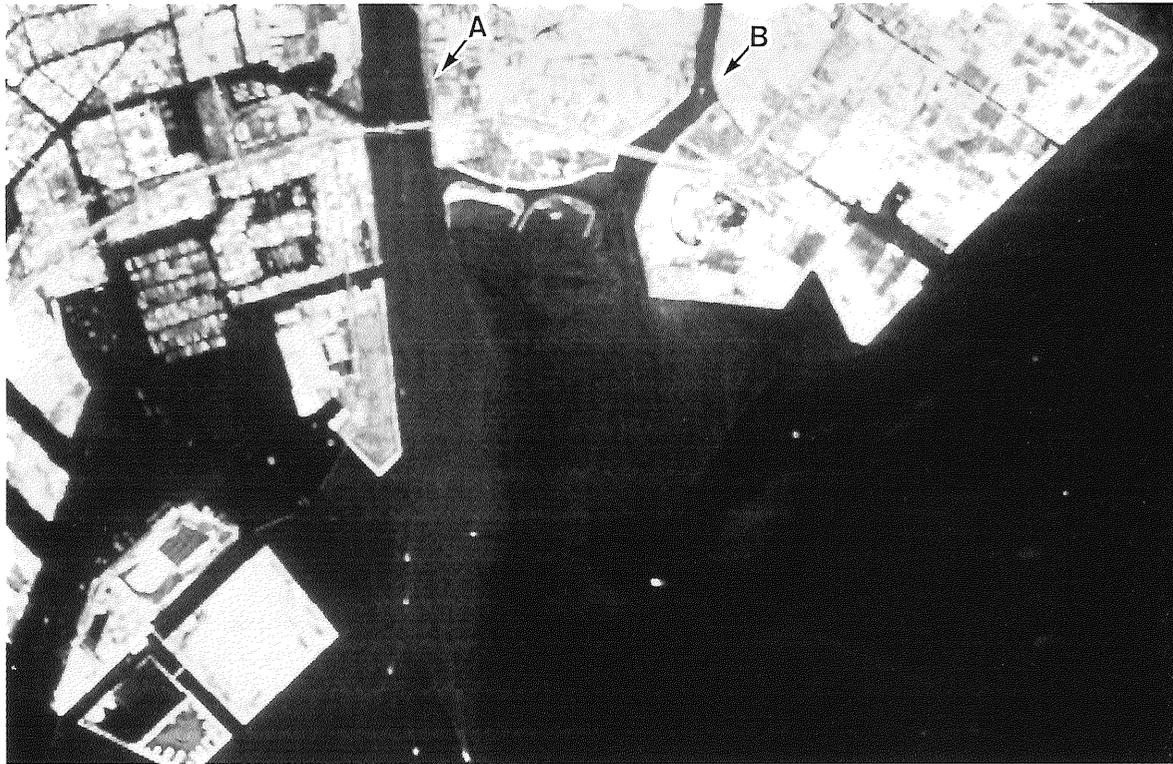


図3. 荒川河口付近TMトゥルーカラー合成写真
観察年月日：1993年5月21日、間引き率：1 A：荒川，B：旧江戸川

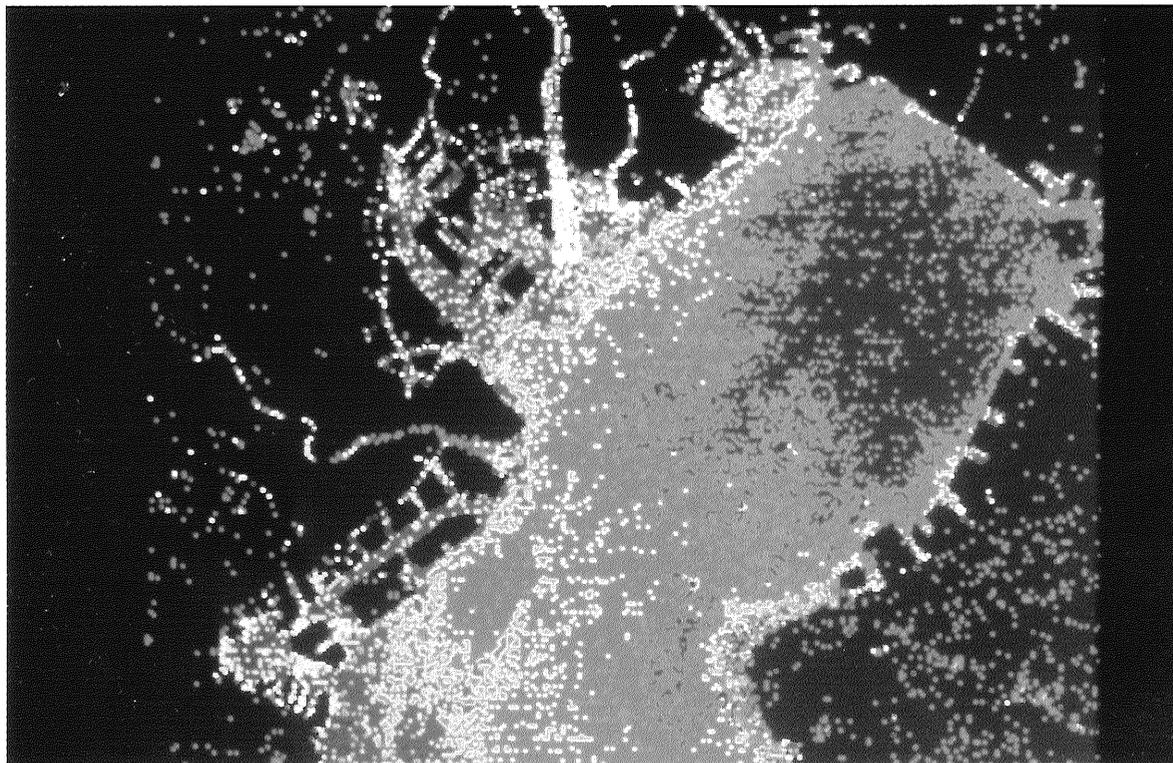


図4. TM画像解析による東京湾の濁水分類
観察年月日：1993年5月21日

疾病構造データベース

池田 一夫*, 竹内 正博*, 鈴木 重任**

Structured Database System of Diseases

KAZUO IKEDA*, MASAHIRO TAKEUCHI* and SHIGETOH SUZUKI**

Keywords: 疫学 epidemiology, 人口動態統計 vital statistics, 世代マップ generation map, 死亡率比 mortality ratio, 平均死亡率比 mean mortality ratio

はじめに

衛生行政の本来の使命は生活環境の安全性の維持と向上にあると考えられる。

この使命を達成するに当たり、地域における生活環境の安全性と地域住民の健康損失の状況を定式的かつ継続的に観測するシステムの構築は非常に重要な意味を持つ。そこで、社会全体の中での地域住民の健康損失状況の観測によって得られるデータの分析結果を行政当局や住民に提供し、衛生行政を支援することを目的として、疾病構造データベース(SAGE)の開発を行った。

本報告では、このSAGEの概要を示し、地域保健サービスへの活用の可能性について考察した。

研究方法

1 システムの構築

次の3つの条件を満たすようにSAGEを開発することにした。

- ①巨視的な疾病の形成過程を精密に把握する
 - ②今後の疾病動向を高い確度で予測することを可能にする
 - ③合理的かつ総合的な保健医療施策の立案を支援する
- 現時点でのSAGEのシステム構成は次のとおりである。

(1) データベースシステム

本 体：VAX Station-II/GPX
主記憶 5MB, HD 800MB
使用言語：VAX FORTRAN Ver. 5.0

(2) プレゼンテーションシステム

本 体：PC-9801 2FD, HD 100MB

使用言語：N88-日本語BASIC(86)

なお、今後の展開を考慮し、データベースシステム、プレゼンテーションシステムのウインドウシステムへの移行作業を現在実施中である。

2 統計資料の蒐集

わが国では、1899年から中央集査による人口動態統計事業が、1905年には国勢調査事業が実施されている。これらの統計情報を蒐集整理することにより、地域における疾病状況を把握することが可能となる。そこで、諸外国も含め国勢調査人口、人口動態統計情報、住民基本台帳人口などの情報を蒐集することとした。

蒐集した主な資料は次のとおりである。

(1) 国勢調査：男女別、各歳別人口

全国(1903-)、都道府県(1903-)

(2) 人口動態統計：死因別、男女別、5歳階級

①日本

全国(1899-)、東京都(1950-)、道府県(1986-)、都2次医療圏(1986-)

② 諸外国

アメリカ(1950-)、西ドイツ(1952-)、イタリア(1951-)、フランス(1951-)、スウェーデン(1951-)、タイ(1955-)

(3) 住民基本台帳人口：男女別、各歳別、区市町村別

東京都(1985-)

3 SAGEで観測可能な事象

SAGEを用いることにより、人口動態統計死亡数表に収録されているすべての死因について、下記の事象を地域別に観測することが可能である。

*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

**東京都立衛生研究所環境保健部

- ①年次推移
- ②世代マップ
- ③死亡率
- ④死亡率比
- ⑤死因別死亡率比
- ⑥地域別死亡率比
- ⑦平均死亡率比：死因・地域行列
- ⑧動向予測

結果および考察

1 疾病の状況把握の実際

(1) 年次推移

実数、粗死亡率および15歳階級別死亡率の年次推移を観測することが可能である。

粗死亡率は、

$$\text{粗死亡率} = \text{期間内死亡数} / \text{期首人口}$$

で計算される。1年単位で全年齢階級におけるそれとして計算され、人口千対で表示されることが多い。

また、人口動態統計の死亡個票には年齢という項目がある。この情報を利用して各歳別に集計し、各歳別に死亡率を計算することも可能である。しかし、死亡という事象はランダム(デタラメ)に発生するため、人口規模の小さい地域の死亡率は各年の変動が大きくなり、その傾向を読みとることが難しい。そこで、変動を平均化し、安定した傾向を明らかにするために、①年齢階級を5歳または10歳にする、②年を各年ではなく5年または10年とする、などの方法が一般的にとられている。

SAGEでは、死亡状況の安定した傾向を把握するために、各年の15歳階級死亡率も観測することができるようにした。このように区分すれば、ヒトの成長過程ともよく一致するからである。すなわち、0~14歳は幼・少年期、15~29歳は青年前期、30~45歳は青年後期、45~59歳は中年期、60~74歳は初老期、75歳以上は老年期と区分することができるのである。

(2) 世代マップ¹⁻⁴⁾

縦軸を世代時間(出生世代)、横軸を歴史時間(暦年)とする時間平面の所定の位置に、対象となる事象の数量もしくはその数量の多寡に応じた色彩を配置した疑似地形図を世代マップという。ここでは、1つのセル(マス目)を出生世代として3年間の世代、暦年としては3年間隔で表示している。死亡数が少なければ寒色系で、多ければ暖色系で色分けしている。

セルを横に順に観測することにより特定世代の状況を、白い斜線に沿って観測することにより特定年齢の状況を、またセルを縦に観測することにより、特定時代の死亡の

状況を把握することができる。

図表の右側に茶系が多ければ、今後死亡数が増加することが予測され、逆に青系が多ければ減少することが予測される。

世代マップを利用することにより、従来は単年度型の編集により年次断片として静的な認識を生成するに止まっていた大規模統計データを歴史時間軸と世代時間軸より成る時間平面に展開し、健康と疾病に関する事象を時代、世代、年齢の3種の時間位置で認識することが可能となった。

世代マップはSAGEの基本概念であり、そのデータベースの基本骨格である(図1, 2)。

(3) 死亡率

SAGEでの死亡率は、次のようにして計算される。

$$1 \text{セル内の死亡率} = \frac{1 \text{セル内の期間内死亡数}}{1 \text{セル内の期首人口}}$$

すなわち、個々のセルについて死亡数を期首人口で除したものが、死亡率となる。

(4) 死亡率比

個々のセルについて、基準となる地域の死亡率(原則

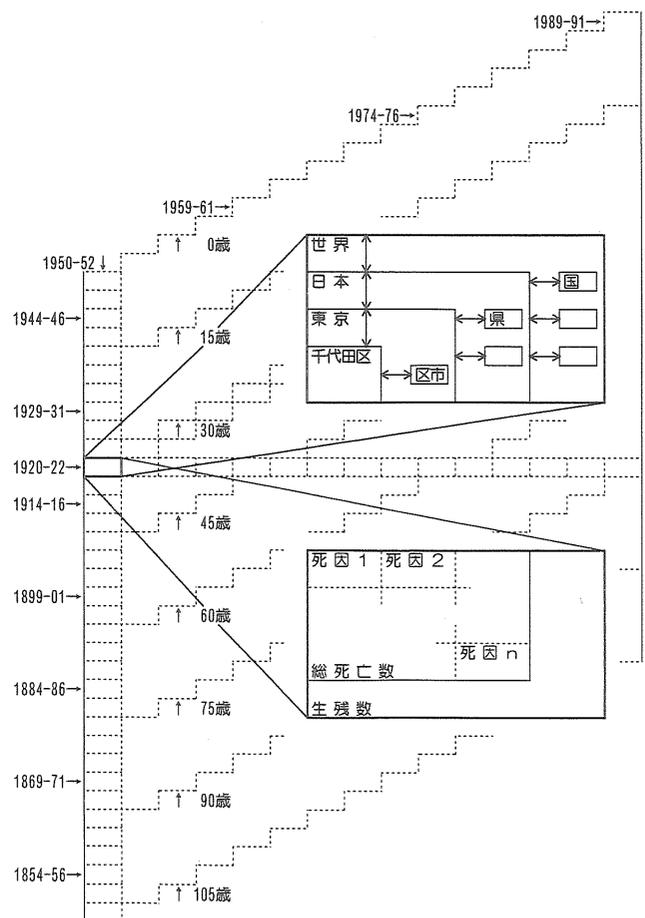


図1 世代マップ概念図

として、全国または全都)を1とした場合の当該地域の死亡率の割合である。当該地域の死亡率÷基準となる地域の死亡率で計算できる。基準となる地域に比して、当該地域の状況が良好であれば1以下の数値をとり、不良ならば1以上となる(図3)。

(5) 死因別死亡率比

特定の死因について複数の地域の死亡率比を配列したものである。日本については全国を基準地域として47都道府県の死亡率比を、また都道府県については県を基準としてその2次医療圏の死亡率比列を観測する(図4)。

(6) 地域別死亡率比

特定の地域について複数の死因の死亡率比列を配列したもので、地域における各種の死因の分布特性を見ることができる(図5)。

各県のグラフの下部にその県の平均死亡率を示した。

平均死亡率比は、全国値で死亡数の80%以上を含む年齢域で得られる死亡率比を平均した値である。基準となる地域に比して、当該地域の状況が良好であれば1以下の数値をとり、不良ならば1以上となる。

(7) 平均死亡率比とその死因・地域行列

死因別死亡率比について平均死亡率比の行を作り、これを複数の死因について配列すれば、死因・地域行列が得られる。47都道府県の主要死因に関する死因・地域行列を図6と7に示す。これによって大規模行政圏における主要死因の地域分布の全体像を容易に概観できる。

2 動向予測

①世代マップを各行(世代)および各列(時代)ごとに切り、②切り取った面の形状を観測・分析し、③疾病動向の予測を行う。

実際には、①横軸に年齢、縦軸に死亡数を取り、②死亡数の世代別死亡年齢分布図を描き、③世代別死亡数が上昇傾向にあるのか、下降傾向にあるのかを観測し、④その情報を基礎に予測を行う。

結 論

SAGEの開発と運用を通して、このデータベースシステムが次のような場で、有効に活用できることが確認できた。

(1) 企画立案支援

地域保健医療計画の適切な策定と効果的な運用には、各種の疾病の疫学的特性の認識に基づく健康事象と疾病事象の把握が不可欠であり、SAGEはそのための有力な手段となり得る。

(2) 調査研究

SAGEの情報資源を強化して、生活環境の安全性を

阻害する要因の社会空間内における分布特性を疾病のそれとの関連において認識することが可能となれば、疾病の発生機序の疫学的な探索と、それに基づく病因の効果的な制御の展望が得られよう。

(3) 研修および普及啓発

SAGEから生産される知識を多彩で柔軟な表現形態をもった情報として提供すれば、健康と安全、病因と疾病に関して地域住民の抱く知的ならびに実用的な関心に明確な根拠をもって答え、安心して健康に関する個人的な欲求の充足に努めることを可能にするであろう。

地域コード

疾病コード

1 北海道	26 京都	1 総死亡
2 青森	27 大阪	2 自殺
3 岩手	28 兵庫	3 自動車事故
4 宮城	29 奈良	4 その他事故
5 秋田	30 和歌山	5 全結核
6 山形	31 鳥取	6 脳血管疾患
7 福島	32 島根	7 虚血性心疾患
8 茨城	33 岡山	8 心不全
9 栃木	34 広島	9 高血圧
10 群馬	35 山口	10 糖尿病
11 埼玉	36 徳島	11 腎疾患
12 千葉	37 香川	12 肝硬変
13 東京	38 愛媛	
14 神奈川	39 高知	13 全癌
15 新潟	40 福岡	14 食道癌
16 富山	41 佐賀	15 胃癌
17 石川	42 長崎	16 直腸癌
18 福井	43 熊本	17 肝癌
19 山梨	44 大分	18 膵癌
20 長野	45 宮崎	19 肺癌
21 岐阜	46 鹿児島	20 白血病
22 静岡	47 沖縄	21 子宮癌
23 愛知		22 乳癌
24 三重		
25 滋賀		

図8 SAGE 地域コードと疾病コード

おわりに

疾病対策に関する行政施策立案を支援するための知識システム(SAGE)を開発した。このシステムを企画、調査研究、研修、普及啓発など、地域保健行政の広範な分野において活用できることが分かった。

地方行政事業の責任と権限は所管する地域に限定される。しかし、健康事象も疾病事象も、またそれに関与する各種の病因も、概して行政区画とは無関係に分布を変化させていく。そうしたいわば疫学的特性の認識に裏付けられた地域特性の把握があって、はじめて効果的な地域保健行政の展開が可能になるものと考えられる。SAGE

の構築と運用がその一助となるものと考えられる。

(本研究は、平成7年度厚生科学研究費補助金の助成を受け、地域保健対策総合研究事業の一環として実施したものである。)

和文要旨

疾病対策に関する行政施策立案を支援するための知識システム(SAGE)を開発した。SAGEは、長期大規模統計データを用いて社会事象の実態、特に疾病の実態を復元する実世界データベースと、内容の記述と表現の形式としての世代マップ機能を持つことを大きな特色とする。地域における生活環境の安全性と地域住民の健康損失の状況を、定式的かつ継続的に観測するシステムで

あるSAGEは、衛生行政を支援する情報システムである。

参考文献

- 1) 池田一夫, 倉科周介: 1993年情報学シンポジウム予稿集, 39-44, 1993.
- 2) 倉科周介, 池田一夫, 平山雄, 西岡久壽彌: 肝臓胆, 29, 197-214, 1994.
- 3) 池田一夫, 倉科周介: 第5回公衆衛生情報研究協議会予稿集, 21-22, 1992.
- 4) 池田一夫, 倉科周介: 第8回公衆衛生情報研究協議会予稿集, 28-29, 1995.

総死亡 日本 女子

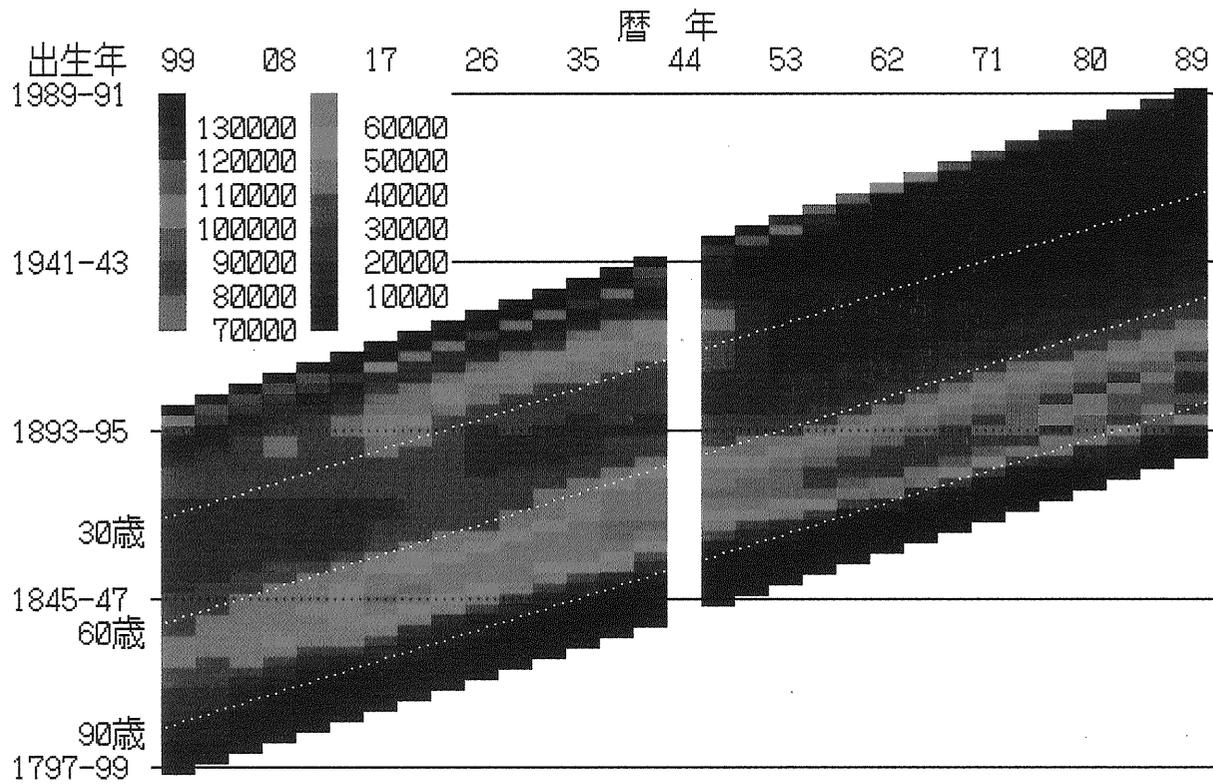


図2 日本女子の総死亡の世代マップ (1899-1991年)

総死亡 男子 死亡率比 (日本/スウェーデン)

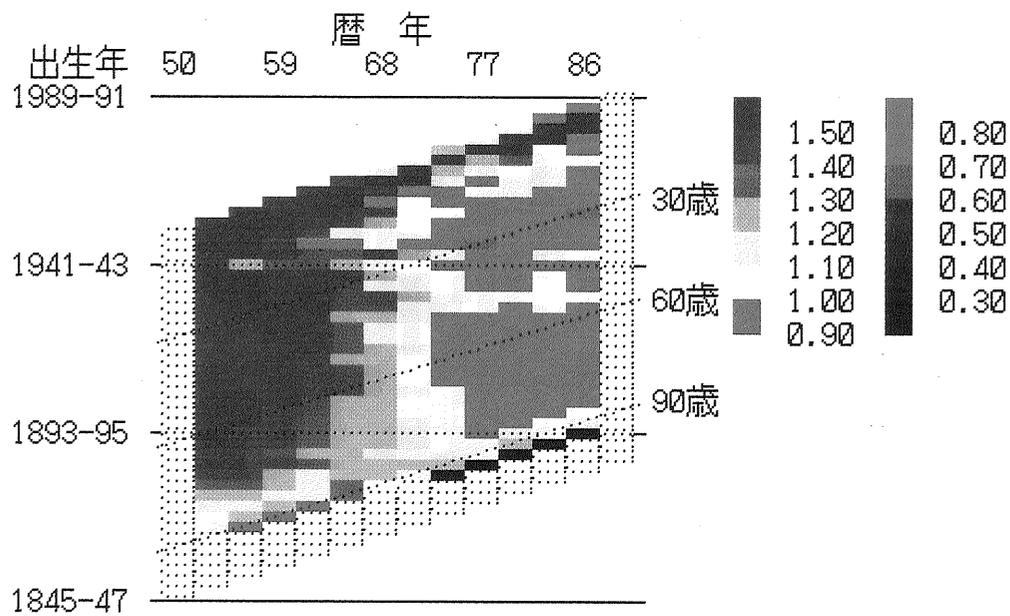


図3 日本とスウェーデンの総死亡の死亡率比 (男子)

自殺 男子 6 歳階級死亡率比 (1989-91)

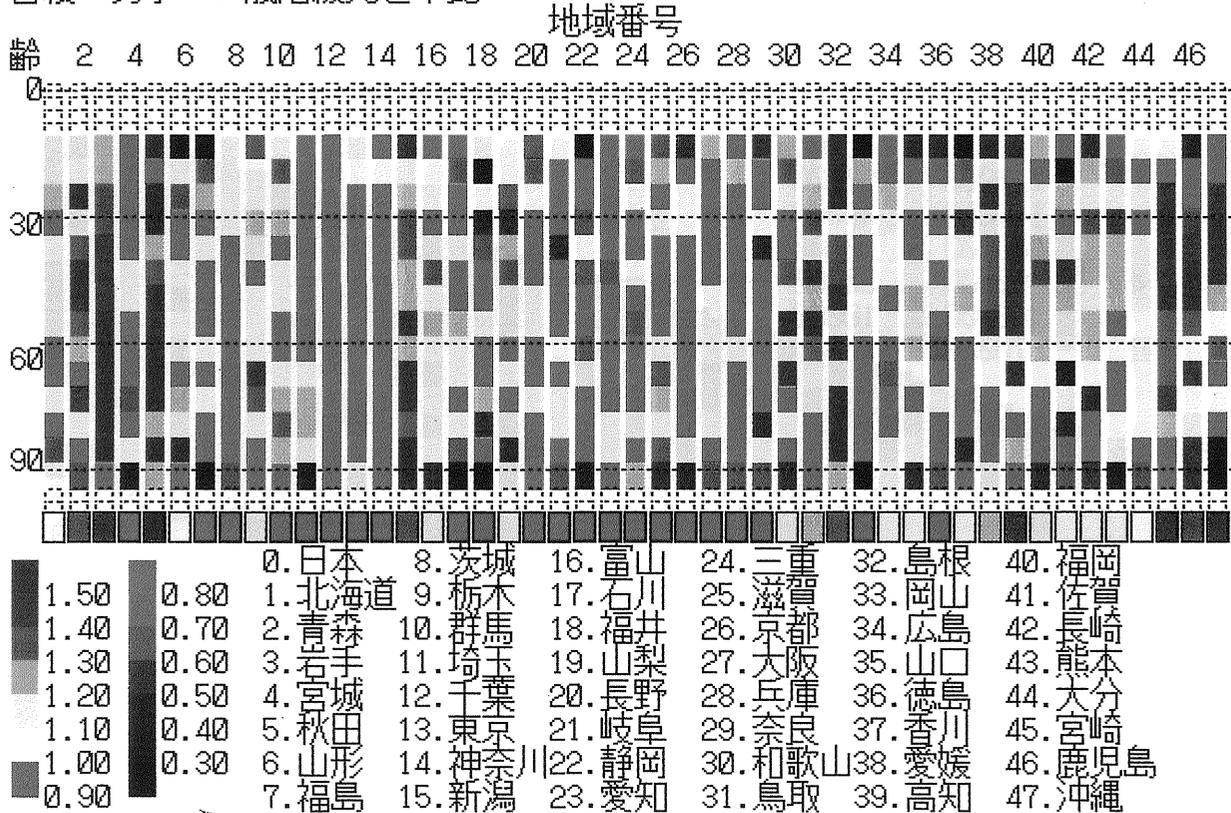


図4 疾病別死亡率比 自殺 男子

東京 男子 6 歳階級 (1989-91)

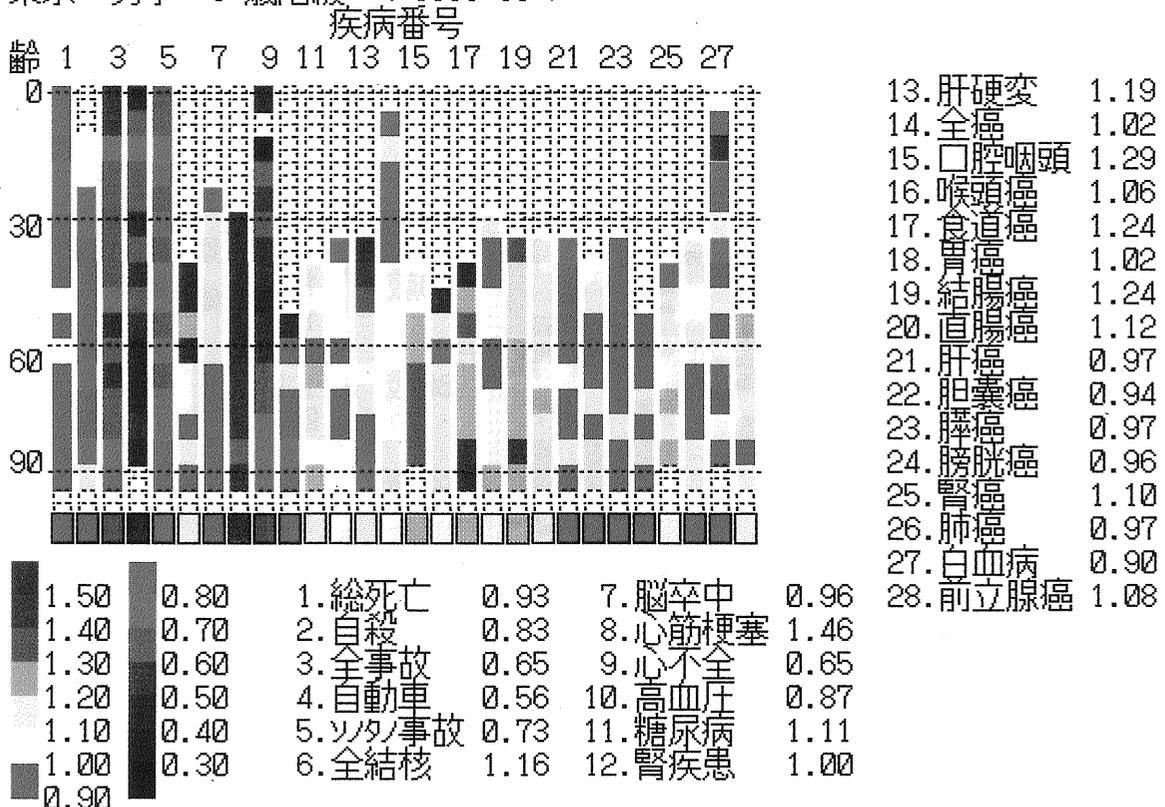


図5 地域別死亡率比 東京都 男子

広域保健情報ネットワークに関する地方衛生研究所の取組の実態と将来 —平成7年1月のアンケート調査の結果から—

佐々木 美枝子*, 池田 一夫**, 神谷 信行**,
荻野 周三**, 竹内 正博**

A Questionnaire Survey on the Broad Net-Work for Public Health Information in All the Japanese Local Laboratories of Public Health

MIEKO SASAKI*, KAZUO IKEDA**, NOBUYUKI KAMIYA**,
SHUZO OGINO** and MASAHIRO TAKEUCHI**

Keywords: 広域保健情報ネットワーク, 地方衛生研究所

緒 言

平成6年12月1日, 厚生省は「地域保健対策の推進に関する基本指針」を告示した。これは地域保健法施行の具体的な方策を示すものである。この基本指針のなかで「情報の収集, 整理及び活用の推進」の項目が設けられており, 保健, 医療, 福祉に関する情報の幅広い収集と, 関係機関及び住民への還元を挙げている。このような背景を踏まえ, 平成6年度厚生科学研究補助金の助成を受け, 地域保健対策総合研究事業の一つとして「広域保健情報ネットワークの構築とその地域保健サービスにおける有効利用に関する研究」を開始した。この研究事業は, 全国7地研, 1保健所, 国立衛生試験所の共同事業であるが, 東京都衛生研究所が分担した「地研が保有する公衆衛生情報の現状とその将来計画」について報告する。この研究事業の開始にあたり, 全国の地方衛生研究所が保健情報に関するどのようなネットワークをすでに保有しているのか, そのネットワークを地域保健サービスに有効利用するためにはどのような手段があるのか, また保健所の側からは何が要求されているのか, 等についてまず調査する必要がある。地研の業務としての「公衆衛生情報の収集・提供」の状況については平成3年度に厚生省が実施した地方衛生研究所実態調査の1項目としてあげられているが, 近年の情報関連機器の著しい発達を基盤にした情報収集の能力の向上と, 情報の提供を求

める市井の世論の動向等を考慮すると, 地研の収集する情報の質も量も, またその利用手段に関しても, ここ数年間に大きな進展があったことが予想された。

地研がその業務を通じて収集しうる公衆衛生情報や, 調査・研究に関する情報交換によって収集する文献情報や研究情報等, 多岐にわたる収集情報の実態を把握し, その広域化, ネットワーク化の方策を探り, かつ地域保健事業のうえで有効利用する手段を検討するために, このアンケート調査を実施した。

調査方法

アンケート調査の実行に関しては, 地研が関与する4つの地域保健対策総合研究事業の主任研究者会議において, そのうちの2つの研究事業, すなわち「健康及び疾病事象に係る包括的サーベイランスのデータ基盤確立に関する研究」(データベースと略す)と, 「広域保健情報ネットワークの構築とその地域保健サービスにおける有効利用に関する研究」(ネットワークと略す)は共同でアンケートを作成することが決定した。2研究班はその後の合同班会議においてアンケート祖案を検討し, 各分担研究者および研究協力者の意見をいれたアンケート調査表を作成し, 平成7年1月に調査を開始した。ネットワーク研究班の年次計画として, 平成6年度は各研究機関における現状調査を基本とし, 地域保健サービスにおけるその有効利用方法を検討してゆくこととした。また,

*東京都立衛生研究所毒性部 169 東京都新宿区百人町3-24-1

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

**東京都立衛生研究所環境保健部

この調査の結果、すでに地域保健サービスに利用されているネットワークのいくつかを選び、その広域利用の方法を具体的に検討した。

なお、ネットワークに関するアンケートの要旨は巻末に参考資料として掲載した。

調査結果

地方衛生研究所全国協議会に属する全国73の地研にアンケートを送付し、71地研から回答が寄せられた。

保健情報ネットワークを既に利用している地研は29で、都道府県の地研が23、指定都市の地研が6であった。これをネットワークの対象事項と利用範囲を軸にして分類したものを表1に示す。

保健情報ネットワークを既に保有する29地研に関しては、半数近くが複数のネットワークを保有し、情報収集と還元利用している。これらの保健情報ネットワークの利用範囲は、所内のみ、あるいは地研・保健所間のみのネットワークはむしろ少なく、大多数が地研・保健所・行政間の情報交換の手段として使用されている。この傾向は都道府県地研において特に顕著である。保健情報ネットワークの対象としては厚生省により既に WISH や WISH-NET のオンラインが敷かれている結核・感染症サーベイランスが圧倒的に多い。また環境庁と環境・公害関係の研究所で稼働している商用ネットワークを利用した環境情報フォーラム、環境情報ネットワークに参加している研究所も多い。これらのネットワークの多くは、収集した情報を解析して行政や保健所を通じて還元されており、花粉飛散情報のようにTVや新聞等のマスメディアを介して広域的な利用が図られているものもある。しかしながら、その所属する行政の単位を越えた範囲での利用はまだ少なく、上記の環境関係の情報、東北6県の食中毒情報を地研、保健所、行政、大学で共有している東北食中毒情報ネットワーク、地研近畿支部におけるエンテロウイルス検出情報の共有などが、保健情報の広域利用の将来性を示している。

また今回のアンケート調査で、感染症・食中毒・食品や飲料水などの情報を総合的に取り上げているネットワークがあり、これはネットワーク構築の将来計画(表2)ではより明確になっている。

保健情報ネットワークに関しては、ネットワーク化が既に為されているもの、具体的な将来計画が立てられているものの背景として、各地研においてデータベース化されている保健情報の存在を無視できない。データベースに関するアンケート調査結果の一部を表3に示した。感染症情報、食中毒情報、花粉を含む環境関連情報、食

表1 地方衛生研究所ですでに利用している保健情報ネットワーク

すでに利用している保健情報ネットワークの有無と対象事項、利用範囲								
	なし	あり	対象事項	利用範囲				
都道府県	23	23		①	②	③	④	⑤
			感染症	2	1	12	4	
			食中毒					1
			食品			1		
			環境衛生	2		2	4	1
			疾病予測			1		
			花粉				2	
			総合情報		1	2		
			その他	2		5		2
都市指定	5	6		①	②	③	④	⑤
			感染症	1		1	1	
			食中毒	1				
			食品	1		1	1	
			環境衛生					2
			疾病予測					
			総合情報			1		
			その他				1	4
政令市	12	0						
特別区	2	0						

- 注1) 保健情報ネットワークの有無の欄の数字は地研の数をしめす。
- 注2) 対象事項欄の数字はネットワーク数をしめす。複数の欄にダブって集計したネットワークもいくつかある。
- 注3) 対象事項欄の「総合情報」は、複数の対象事項を扱うネットワークをここに分類した。例えば、感染症、食中毒、食品や飲料水などの情報を総合的に取り上げているネットワークを示す。
- 注4) 対象事項の、「その他」欄の主なもの(数字はネットワーク数) :
 - 図書室情報・文献検索(3),
 - 保健衛生情報・保健衛生サービス等(5)
 - 環境情報フォーラム&ネットワーク(5)
 - 栄養調査・指導、がん情報・がん登録等、試験管理 PGM, 等
- 注5) 利用範囲の分類(①②③④⑤)は次の通りである。
 - ① 所内でのみ利用
 - ② 地研・保健所間で情報交換
 - ③ 地研・保健所・行政間で情報交換
 - ④ 研究所間で情報交換(主として地研間の情報交換)
 - ⑤ その他(国立研究所、大学、等との情報交換)

品関連情報、人口動態統計情報等、地域保健事業に係わる多岐にわたる情報がデータベース化されており、磁気テープや書類による情報収集を含めれば大多数の地研が何らかの形で保健情報の収集に関与していることが明らかである。これらのデータベースの多くは、広域利用を

表2 地方衛生研究所で構築が計画されている保健情報ネットワーク

構築を計画している保健情報ネットワークの有無と対象事項と利用範囲							
	あり	対象事項	利用範囲				
都道府県	8		①	②	③	④	⑤
		感染症 2	1	1			
		食中毒 1			1		
		食品 1			1		
		飲料水 1	1				
		環境衛生					
		疾病予測 2			2		
		花粉					
		総合情報 3			3		
		その他					
都市指定	5		①	②	③	④	⑤
		感染症 3			1	1	1
		食中毒					
		食品 2			1	1	
		環境衛生					2
		疾病予測					
		総合情報 1			1		
		その他 1					1
政令市	0						
特別区	0						

- 注1) 保健情報ネットワークの有無の欄の数字は地研の数をしめす。
 注2) 対象事項欄の数字はネットワーク数をしめす。複数の欄にダブって集計したネットワークもいくつかある。
 注3) 対象事項欄の「総合情報」は、複数の対象事項を扱うネットワークを示す。例えば、感染症、食中毒、食品や飲料水などの情報を総合的に取れ上げているネットワーク。地域保健対策ネットワークが多い。
 注4) 利用範囲の分類(①②③④⑤)は次の通りである。
 ① 所内でのみ利用
 ② 地研・保健所間で情報交換
 ③ 地研・保健所・行政間で情報交換
 ④ 研究所間で情報交換(主として地研間の情報交換)
 ⑤ その他(国立研究所, 大学, 等との情報交換)

目的としてネットワーク化される可能性が大である。

考 察

今回のアンケート調査により地研が保有し、既に利用しているネットワークの実態が明らかになった。その多くが、各地研が所属する地方自治体のなかでは情報の分析や還元が実行されている、あるいは具体的な利用計画がなされていることをアンケート調査結果は示している。また、表1, 2に示したように、保健情報ネットワークの保有および将来計画に関しては、都道府県および指定

表3 地方衛生研究所における保健情報データベースの保有状況

保健情報データベースの対象事項別保有状況(数字は地研数)					
データベースの対象事項	保有分類	都道府県	指定都市	政令市	特別区
感染症サーベイランス情報	A	21	8	6	2
	B	20	3	1	
	C	3			
	D	2	1	3	
食中毒関連情報	A	6	2	3	1
	B	19	6	2	1
	C	9	1	1	
	D	10	2	4	
環境情報(大気花粉、水等)	A	18	5	1	
	B	14	3	3	1
	C	5	1	1	1
	D	7	1	4	
食品関連情報	A	3	4	1	1
	B	18	5	2	1
	C	11	1	3	
	D	13	2	3	
人口動態統計情報	A	18	5	3	1
	B	8	1	1	
	C	4			
	D	10	5	5	1

- 注) 保有分類 A: データベースを所で保有するか、自治体の他の部局で保有している。
 B: データベースにはなっていないが、磁気テープや書類として保有。
 C: データベース化を計画、あるいは検討中。
 D: データベース構築の計画はない。

都市地研と、政令市および特別区地研との間に明らかな差違が認められた。都道府県と指定都市地研では、すでに保有するネットワークに関しても、将来構築予定のネットワークに関しても、多くの地研が保健情報ネットワークを利用していること、およびネットワーク構築に関する具体的計画がある点で同様の傾向が認められたのに対して、政令市や特別区地研ではそのような取り組みは全く認められなかった。これには予算や人的条件など外的な要因も存在すると思われるが、各々の地研に求められるものが異なっていることが最大の要因であると思われる。地域保健法の具体的実施にあたっては、このような地域的要因を考慮し、各研究機関が地域の要望を具体的に受けとめることが必要であろうと思われる。

保健情報の広域化に関しては、5地研がすでに保有しているネットワークの広域化の準備をすすめている。広

域化の手段としては、インターネットあるいは WISH-NET 等を利用した広域化を図るべきであるとの意見が多かったが、一方で個人情報の機密保持をどうするか、行政の縦割りシステムが広域化の障害になるのでは、との疑問もある。しかしながら、地域行政の単位のなかでの保健情報のオンライン化は回答のあったほとんど全ての地研が地域保健サービスのために必要であることを認めている。さらに、感染症や食中毒の情報をリアルタイムに知ることの重要性や、国際化に伴う輸入食品等の安全性を確保するための残留農薬や食品添加物に関する国際的な情報収集の必要性も強調されている。

厚生省は食品事故に即応するための厚生省・都道府県・指定都市間のオンライン情報網の構築を計画しており、これはすでに試験運用の段階に達している。また化学物質情報に関しても、国内外で情報を共有しようという動きが国立衛生試験所化学物質情報部を中心にして積極的に進められている。このような情勢を踏まえて、地域保健サービスにおける各々の立場にたった情報の広域化を計画する必要がある、このアンケート調査はその方向性を示唆していると思われる。

結 論

保健情報の広域化とその地域保健サービスにおける有効利用の方策を探るため、第1段階として地研の保有する保健情報ネットワークの現状と将来計画についてアンケート調査を行った。地方衛生研究所全国協議会に属する全国73地研中71地研から回答が寄せられた。この調査の集計結果から、保健情報ネットワーク広域化の手段とその問題点を論じた。調査は、各行政の単位では保健情報の広域化、オンライン化はすでに多くの都道府県や指定都市で進められていること、国内における広域化も少数ではあるが実行段階に入っているもののあることを示している。今後の研究課題としては、既に地域保健サービスにおける利用を目的として広域化の準備がなされているいくつかのネットワークを選び、その運用に伴う問題点を地研、保健所あるいは行政の各々の立場から浮きだしにすることと、ネットワーク構築の具体的手段をソフト、ハード両面から検討してゆくことが第2段階として必要である。

付 記

(この研究は、平成6年度厚生科学研究費補助金の助成をうけ、地域保健対策総合研究事業の一環として実施したものである。)

1-6 上記ネットワークの広域化の可能性：特に地域保健サービスにおける有効利用の具体策

上記のネットワークをさらに広域化する計画はありますか？

この場合、地域保健サービスに利用するために、具体的にとりうる方法は？

(これまでの経験等から、具体的な方策をお持ちでしたらお示してください。

2 広域保健情報ネットワークの将来性について**2-1 地域保健サービスに要求される情報ネットワークとは？**

将来どのようなネットワークが必要となるとお考えですか？ 必要とされる事項について、あるいはハード、ソフト両面の必要装備について、アイデアをお持ちでしたらお示してください。

3 保健所－研究所－行政をつなぐネットワーク（広域保健情報ネットワークと仮称）の構築に関する具体的方策（ハード及びソフト）について

(注：「広域保健情報ネットワーク（仮称）」とは、保健所、地方衛生研究所、国立研究所、大学、行政機関、財団等保健衛生に関わる情報を有する組織・機関からの情報を有機的に統合・整理し、有効利用するためのネットワークと定義することとします。将来はこれに国際的な情報ネットワークも組み込むことを想定しています。)

3-1 『広域保健情報ネットワーク』と国際間ネットワーク、省際研究機関ネットワーク、厚生科学研究機関ネットワーク等との連携について

このようなネットワークシステムの必要性、具体的な利用手段、その構築に必要なハードおよびソフト等についての構想を示してください。

第2 つぎに結核感染症サーベイランス関係のデータベースについておたずねします

第3 食中毒関係のデータベースについておたずねします。

第4 大気、花粉、水などの環境関係のデータベースについておたずねします。

第5 食品関係のデータベースについておたずねします。

第6 人口動態統計関係のデータベースについておたずねします。

第7 貴研究所にある第2から第6の他の健康及び疾病事象に係わるデータベースについておたずねします。

注) 問2以下、データベースに関する設問の詳細は省略した。

<資料>

地域保健サービスへのインターネットの活用

神谷 信行*, 荻野 周三*, 池田 一夫*,
竹内 正博*, 佐々木 美枝子**

Public Health Information on Internet

NOBUYUKI KAMIYA*, SHUZO OGINO**,
MASAHIRO TAKEUCHI* and MIEKO SASAKI**

Keywords : 公衆衛生情報 public health information, インターネット Internet, パーソナルコンピュータ personal computer

緒 言

国際交流の加速にともない、今日の地域社会の生活には地域性と国際性がさまざまな密度で交錯しており、地域における健康と疾病の状況もこれに大きく影響を受けつつある。このような状況に対処するため情報の広域かつ多面的な利用を通じて地域保健サービスを支援する情報システムの構築が必要である。

感染症、食品、食中毒、化学物質、環境に関するさまざまな保健情報の集積がネットワークを利用して実施あるいは計画されている。しかし、これらの情報収集は端末から中枢への流れが主流であり、情報提供者である端末組織での利用は未だ十分とはいえない。地域保健サービスの充実を図るためには、これに関係する試験研究機関や行政機関が保健情報を共有することが必要である。また、国内外の情報を迅速に入手することにより、保健衛生における「事故」や「事例」の原因究明の迅速化にもつながるものと思われる。さらに、現在の研究活動は1つの組織体内部だけでは完結しない例も増えており、広く外部組織との情報を交換しつつ、研究を進めていくことが求められている。多くの研究者と意見を交換することでよりよいアイデアを構築し、その結果、研究内容の質を高めることも可能となる。

近年、インターネットと呼ばれる国際的なネットワークが急速に普及し、国立衛生試験所、国立予防衛生研究所や国立公衆衛生院等、衛生研究所と関係の深い国立試験研究機関への導入も進んでいる。衛生研究所間や国立

試験研究機関あるいは地域保健サービスの拠点となる保健所との情報ネットワークの構築について、インターネットの利用の可能性と問題点について検討した。

システムの概要

1. 衛生研究所のネットワーク

衛生研究所におけるネットワークの概要を図1に示した。1, 2, 3号館および仮庁舎にイーサネットを敷設し、ネットワークオペレーションシステム(NOS)に、NetWare 3.12Jを使用してLANを構築した。プロトコールにはIPX/SPXとともに、インターネットへの接続をも考慮してTCP/IPを使用している。

約60台の端末がこのネットワークに接続され、これらの端末は各研究科の全研究室、もしくは主な研究室、あるいは機器室、動物飼育室、図書室や事務室に設置されている。

現在工事中の新庁舎竣工後には、全ての研究室、実験室、機器室、動物飼育室、図書室等で端末の設置が可能となる。

2. インターネットへの接続

インターネットは、商用パソコン通信サービス(BBS)のように組織が管理するホストコンピュータに対してパーソナルコンピュータ(パソコン)ユーザが接続する形態のものではなく、LAN(Local Area Network)やWAN(Wide Area Network)などの複数のコンピュータネットワーク同士を通信回線で相互に接続したネットワークの集合体で、世界各国の研究所や組織、学校などを結んだ、

*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

**東京都立衛生研究所毒性部

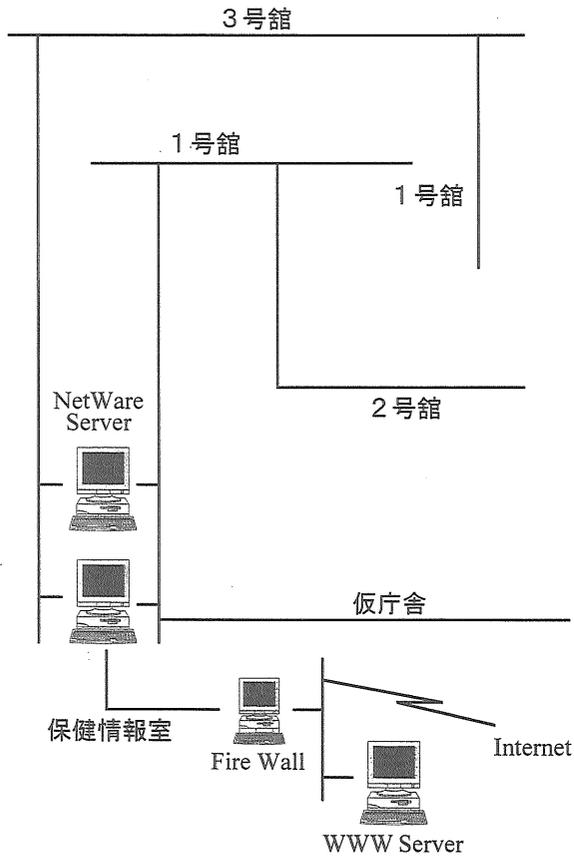


図1. 衛生研究所のネットワーク

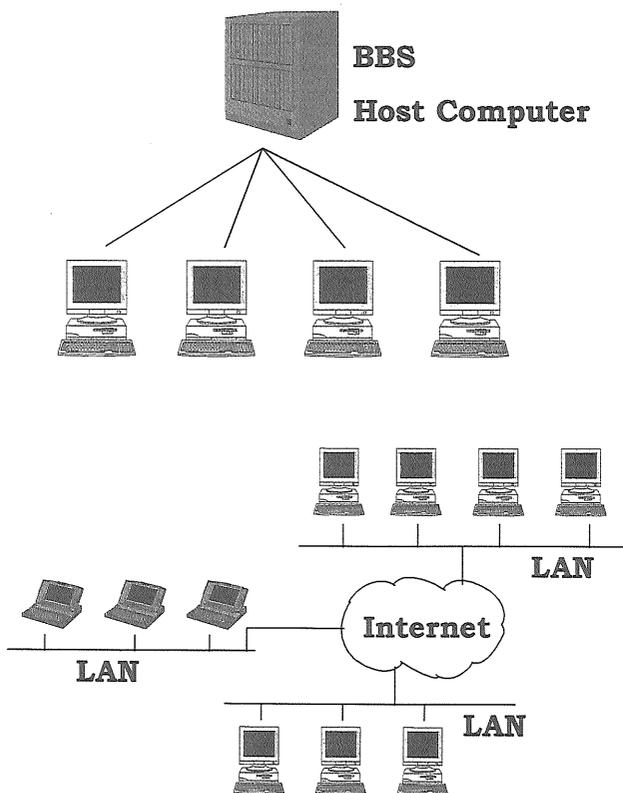


図2. BBS とインターネット

世界規模の巨大なコンピュータネットワークである。1960年代、アメリカ合衆国防総省が中心になって始めた ARPA net が母体となっている。当初は大学などの研究、教育機関のネットワークのみを接続してきたが、1991年から商用利用が認められて本格化し、現在さまざまな政府機関、地方公共団体、大学、研究機関、企業などのネットワークが接続され、この規模は拡大し続けている。図2はBBSとインターネットの比較を示した。

3. 接続方法と機種

インターネットへの接続は、通常は接続サービスを行っている民間接続会社(プロバイダ)に依頼するのが基本であるが、衛生研究所のような試験研究機関では、SINETやGDBnetなどの学術ネットワークへ接続することも可能である。東京都立衛生研究所では、GDBnetに接続することにより、インターネットへの接続が可能となった。インターネットへ接続されると同時に、既に接続している機関、組織全てと接続されたことになる。

保健所からの接続は、本庁の関係部局や衛生研究所がインターネットに接続されれば、そこで公衆回線などで接続することにより可能となる。

端末となる機種はワークステーションもしくはパーソナルコンピュータが利用でき、OSとしてUNIX、Windows、OS/2およびMacOSが利用可能である。電子メールを交換するためのメールサーバや、情報提供を行うUNIXを搭載したワークステーションの使用が一般的であるがパソコンをプラットフォームとしたPC UNIX、MacやWindows NTでも可能である。

インターネットの有効利用及び問題点の検討

1. 電子情報によるコミュニケーションの円滑、迅速化

電子メールは、あるコンピュータのユーザが別のコンピュータのユーザに対してメッセージを送る仕組みであり、インターネットにおけるコミュニケーションのための基本機能となっている。

通常の郵便と異なる最大の特徴は、相手に届くまでの時間が短いことがあげられる。送信されたメールは、ほぼ数分から数10分のうちに相手に配送される。このため、郵便では不可能なリアルタイムに近いメッセージの交換が可能となる。また、電子メールでは電話と異なり、相手がある場にいる必要はなく、世界各国のインターネット上のユーザと時差を気にすることなくメッセージを交換することが可能である。さらに、同時に複数のユーザにメッセージを送ることもでき、グループのコミュニケーションのツールとして利用することもできる。

ニュースグループと呼ばれる特定のテーマで意見交換

を行う電子会議室を開くことができる。ここでは研究の成果や考察、調査資料の解釈などについて、所属する組織外の多くの関係者とディスカッションをすることができる。

2. 情報収集と資料作成

telnet や ftp という機能を使い、現在使用しているコンピュータを介して、離れた場所にある別のコンピュータを操作したり、2つのコンピュータの間でファイルを転送したりすることができる。この機能を使うことによって、遠く離れたスタッフが共同でデータベースやドキュメントの作成を行うことができる。図書情報のデータベースである Uncover は、telnet を使って利用することができる。さらに、インターネットでは次に述べるように、情報発信を行っている www (world wide web) サーバから Mosaic と呼ばれる検索ソフトを用いて、必要とするさまざまな情報を収集することができる。衛生研究所では業務に関連する多くの WWW サーバからの情報の収集を行っている。図3に示したように、WHO の WWW サーバでは最近アフリカで猛威を奮ったエボラ出血熱に関する情報をはじめ、ニュースレターや報道発表など多くの情報を提供している。CDC では、毎週刊行される MMWR が、WWW サーバで公開されている。



The World Health Organization World-Wide Web Server

Welcome to the home page of the World Health Organization's experimental World-Wide Web Information Server (located at Geneva in Switzerland; [imagemap](#)) on the Internet. (read the [Guide to Using the Internet](#) if not familiar with the Internet. [Web FAQ](#) and [Web & Mosaic: User's Guide](#). [Multi-language Mosaic](#), [Inet Connectivity Table](#), and [Inet Network Service Providers Around the World](#) are also available.)

Information:

- [Ebola Virus Outbreak](#) ☛
- [World Health Day: Global Polio Eradication](#)
- [World No-Tobacco Day](#)
- [Press Releases and Newsletters](#) from WHO
- WHO's Major Programmes
- [International Travel and Health](#) - Vaccination Requirements and Health Advice
- [WHO Statistical Information System \(WHOSIS\)](#)
- [WHO Publications and Library](#)
- [WHO E-mail Address Directories](#) and [Vacancy Notices](#)
- [WHO Gopher Server](#)
- World-Wide Web index servers
 - [The Web Virtual Library](#) and its [Biosciences](#) section
 - [Web Search Engines: Web Worm, NIKOS, and InfoSeek](#)
 - [Directory of Web servers by geographic locations and World Map](#)
 - [EINet Galaxy, Yahoo, and Nova-Links](#)
 - [Best of the Web '94 Awards and Internet 1996 World Exposition](#)
 - [Commercial Sites, CommerceNet, and GoldSiteEurope](#)
- Health-related Web servers
 - [United Nations related Web and Gopher servers](#)
 - [IM-EUROPE](#), and other selected [Web & Gopher servers](#)
 - [USENET FAQs](#) and [USENET News](#)
 - [Currency Exchange Rate](#) and [Local Times Around the World](#)
 - [Bookstores & Publishing](#) and [World News & Times](#)

For further inquiry, please contact webmaster@who.ch, by clicking [here](#) to send an e-mail message.

図3. 世界保健機構 (WHO) の WWW サーバ

<http://www.nihs.go.jp/>



National Institute of Health Sciences

Welcome to the NIHS home page.

[About NIHS](#) ☛

[Division of Chem-Bio Informatics \(DCBI\)](#) ☛

[Library](#) ☛

[ICRB CELLBANK](#) ☛

[NIHS HOUSEHOLD PRODUCT HUB](#) ☛

[Experimental Stations for Medicinal Plants](#) ☛

[NIHS Chemical Safety Information Hub](#) ☛

[Global Information Network on Chemicals \(GINC\)](#) ☛

☐ [Useful Information Sources on Chemical Safety \(GINC\)](#)

[Drug Information \(DRUG INFO GUIDE\)](#) ☛

- ☐ [Japanese](#) ☛
- ☐ [English](#)

[Others Information Sites](#)

- ☐ [National Public Health Network](#)
- ☐ [Administration](#)
- ☐ [University](#)
- ☐ [Institute](#)
- ☐ [Other Organizations](#)
- ☐ [Biological Database Search](#)
- ☐ [Biology](#)
- ☐ [Chemistry](#)

図4. 国立衛生試験所の WWW サーバ

また、図4に示すように、国立衛生試験所では化学物質の安全性に関する情報を、学術情報センターでは学会発表、学術論文、学術雑誌目次速報、目録所在情報等のデータベースの提供を WWW サーバで行っている。その他、FDA、NIH や JICST など多くの組織、研究機関が WWW サーバを設置して情報の提供を行っている。

3. 研究機関(行政機関)からの情報提供

インターネットではさまざまな形態で情報を発信することができる。各組織が発行する、事業概要、研究報告や衛生統計をはじめ、感染症、食中毒、化学物質安全性情報など多くの情報が提供可能である。これらの情報を広くかつ迅速に公開することは、研究所や保健所など、それぞれの組織に対する関心を高め、信頼感の向上を図ることになる。

衛生研究所でも食品添加物の変異原性試験の成績や苦情食品の事例などの情報。倉科らが開発した SAGE システム¹⁻⁴⁾等を積極的に提供したいと考えている(図5)。また、地方衛生研究所の研究テーマを公開することより、

<http://www.tokyo-eiken.go.jp/index-j.html>

東京都立衛生研究所

東京都立衛生研究所へようこそ



都民のくらしと健康を守ることが私たちの使命です

● [English version is here.](#)

● 現在試験運用期間中です。

提供情報：

- [東京都立衛生研究所について](#)
- [図書室蔵書目録情報](#)
- [SAGE \(疾病動向予測システム\)について](#)
- [地方衛生研究所の情報](#)
- [関連サーバ情報](#)

本情報の著作権は原則として、東京都立衛生研究所に属します。

169 東京都新宿区百人町3-24-1
電話 03-3363-3231
FAX 03-3368-4060

info@tokyo-eiken.go.jp

このサーバに関してご意見などがございましたら [ここ](#) をクリックしてください。

図5. 東京都立衛生研究所のWWWサーバ

各研究所間の連携をより一層深めることが可能となる。

情報を提供するためには、ftp や WWW サーバを構築し、インターネット上のユーザにその情報を公開する。WWW サーバで公開された情報は Gopher や Mosaic, Netscape などの WWW ブラウザと呼ばれる検索システムを用いて簡単に検索することができる。図3～5は Netscape で情報収集を行った画面である。Gopher はテキストが基本の検索システムで、どのような端末でも使用することができる。

Mosaic や Netscape はテキスト以外に音声、画像、動画などを扱うことが可能で、誰でも比較的簡単に情報を入力できる、現在主流となっているシステムである。

4. 問題点

インターネットにはいくつかの危険事項が存在する。盗聴、システムへの侵入、情報破壊などがその主なものである。ネットワーク上の情報を盗聴されることにより、電子メールの内容やパスワードを知られることになる。特にパスワードを盗聴されると、システムに容易に侵入することができるため、場合によってはデータの改ざんや破壊にまで進むことになる。また、ウィルスを常駐さ

せられた場合は、多くのコンピュータで影響を受けることになる。

このような危険を避けるために、いくつかの方策が検討されている。盗聴を防ぐためには電子メールやパスワードを暗号化するシステムの開発が進んでおり、また、システムへの侵入を防ぐために、Firewall (防火壁) と呼ばれる侵入防止システムの設置が効果を一定の効果を上げている。ウィルスについては検索および駆除システムが提供されている。これらの手段を講じることにより、危険のほとんどは回避することができる。

考 察

地域保健サービスの一層の充実のために、広域保健情報ネットワークの構築が要望されている。この情報ネットワークとしてのインターネットの利用は、ネットワーク構築の方法の1つとして位置づけることができる。

各試験研究機関や行政機関などを従来の概念で、専用の回線で接続することは、ホストコンピュータの設置や、回線の維持にかかる経費の点からも困難であるが、インターネットでは、可能なところから接続することより、段階的にネットワークを質的あるいは量的の両面で拡充できる利点がある。そのうえ、データベースなど情報の作成の際には、複数の機関で共同して作業をすることができ、より迅速なサービスの提供も可能となる。また、情報発信に、インターネットを利用することは地域的にも、人的にもより広範囲に情報を提供できる。

衛生研究所でのインターネットの利用は今後、一層増加するものと思われる。国内外の多くの組織、機関からの情報収集はもとより、研究テーマや研究成果のほか、微生物や食品などの検査情報や食中毒、苦情食品に関するもの、衛生局が公表する各種の公衆衛生に関する統計など、多くの情報を提供することにより、より質の高い検査、研究の体制を築くことが可能となる。

しかし、インターネットは世界規模で接続された巨大なネットワークであり、利用規則もないため、その利用にあたっては利用者のモラルによっているのが実状である。そのため、情報の盗聴やシステムの侵入など、安全面でいくつかの問題点を抱えている。これらのことから、情報を保護するための対策を実施することは、非常に重要であり、かつ、できうる対策は確実に実施されなければならない。

結 論

衛生研究所などの試験研究機関や、その他の行政機関からの情報提供、研究所間や保健所との情報交換、情報共有にインターネットが果たす役割は、たいへん大きい

ものがあると思われ、インターネットへ接続するための基盤整備が早急になされることが望まれる。インターネット利用したこれらのシステムは、新たに求められる地域保健サービスの充実にも有効に機能するものと思われる。ただし、情報を保護するため、より一層、強固なセキュリティ対策が重要である。

付記 本研究は、平成6年度厚生省科学研究費補助金の助成を受け、地域保健対策総合研究事業の一環として実施したものである。

文 献

- 1) 池田一夫, 倉科周介: 1993年情報学シンポジウム予稿集, 39-44, 1993.
- 2) 倉科周介, 池田一夫, 平山雄, 西岡久壽矢彌: 肝臓胆, 29, 197-214, 1994.
- 3) 池田一夫, 倉科周介: 第5回公衆衛生情報研究協議会予稿集, 21-22, 1992.
- 4) 池田一夫, 倉科周介: 第8回公衆衛生情報研究協議会予稿集, 28-29, 1995.

著書及び他誌発表

PAPERS ON OTHER PUBLICATIONS

(1994.4—1995.3)

著 書

工藤 泰雄, 大橋 誠: **食中毒**, 重松 逸造, 小張 一峰, 金子 義徳, 今川 八東, 山崎 修道, 上原すず子, 竹内 勤 編, 伝染病予防必携, 第4版補訂版, 135-147, 1994, 日本公衆衛生協会, 東京.

工藤 泰雄, 大橋 誠: **大腸菌性下痢**, 重松 逸造, 小張 一峰, 金子 義徳, 今川 八東, 山崎 修道, 上原すず子, 竹内 勤 編, 伝染病予防必携, 第4版補訂版, 199-202, 1994, 日本公衆衛生協会, 東京.

Kudoh, Y., Kai, A., Obata, H., Kusunoki, J., Monma, C., Shingaki, M., Yanagawa, Y., Yamada, S., Matsushita, S., Itoh, T. and Ohta, K. : **Epidemiological surveys on verotoxin-producing *Escherichia coli* infections in Japan**, M.A. Karmali and A.G. Goglio eds. Recent Advances in Verotoxin-producing *Escherichia coli* Infections, 53-56, 1994, Elsevier Science, Amsterdam.

伊藤 武: **カンピロバクター**, 栗飯原景昭ら監修, 総合食品安全辞典, 940-952, 1994, 産業調査会, 東京.

小久保彌太郎: **衛生指標細菌票**, 栗飯原景昭ら監修, 食品総合安全事典. 896-906, 1994, 産業調査会, 東京.

小久保彌太郎: **食肉の生産**, 栗飯原景昭ら監修, 食品総合安全事典, 175-189, 1994, 産業調査会, 東京.

吉川 翠, 狩野 文雄: **ダニ・カビ退治法**, 主婦と生活社, 1994, 東京.

吉川 翠他: **家屋害虫事典**, 日本家屋害虫学会編, 井上書院, 1995, 東京.

吉川 翠他: **くらしの豆知識**, '95年版, 国民生活セ

ンター, 1994.

Itoh, T., Hirata, I., Shingaki, M., Takahashi, S., Masubuchi, N. and Saito, S. : **Animal model of *Helicobacter* a non-human primate model of *Helicobacter pylori***, Proceedings of symposium on *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer, 7-17, 1994, Tokyo Kambikyoin Foundation, Tokyo.

伊藤 武: **サルモネラの検出法**, 春田三佐夫, 森地敏樹編, 食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術, 210-226, 1995, 工業技術会, 東京.

小久保彌太郎: **大腸菌群, 大腸菌及びリステリアの簡易迅速検査法**, 春田三佐夫, 森地 敏樹 編, 食品微生物検査の簡易・迅速・自動化最新技術, 227-244, 1995, 工業技術会, 東京.

飯田 孝, 赤沢 智宏, 井上明宏他 (共著) : **役に立つ免疫実験法**, 第2版, 講談社.

植田 忠彦: **ビタミンEの定量法**, 五十嵐 脩, 島崎弘幸 編著, 生物化学実験法34, 過酸化脂質・フリーラジカル実験法, 65-74, 1995, 学会出版センター, 東京.

池田 一夫, 神谷 信行: **はやわかり Visual Basic**, 1995, 共立出版株式会社, 東京.

田口 幸夫, 池田 一夫, 金子 令子, 他: **みんなで考える飲み水のはなし**, 1995, 技報堂出版株式会社, 東京.

渡辺真利代, 原田 健一, 藤木 博太: **アオコーその出現と毒素一**, 1994, 東京大学出版会, 東京.

高橋 保雄：新しい排出基準とその分析法 (5.2.7トリハロメタン, 5.2.8トリハロメタン生成能), 539-572, 1994, 環境化学研究会, 茨城.

甲斐 明美：腸管出血性大腸菌O157:H7による下痢症について, 腸管出血性大腸菌の検出と同定, 食品衛生学雑誌, 35, 425-426, 1994.

他誌発表論文

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.

松下 秀, 山田 澄夫, 工藤 泰雄：海外旅行者下痢症由来の新血清型 *Shigella boydii*, 感染症学雑誌, 68, 973-976, 1994.

宮原美知子, 藤原 理恵, 三瀬 勝利, 島田 俊雄, 松下 秀, 工藤 泰雄, 石渡 尚子, 谷村 顕雄：腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の制限酵素の特徴, 食品衛生学雑誌, 35, 605-609, 1994.

福山 正文, 今川 八東, 原 元宣, 田淵 清, 伊藤 武, 尾畑 浩魅, 甲斐 明美：健康な家畜における Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の汚染状況, 特にヤギからの本邦初分離について, 感染症学雑誌, 68, 508-512, 1994.

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ベロ毒素産生性大腸菌の調査, 日本獣医師会雑誌, 47, 288-292, 1994.

中澤 宗生, 甲斐 明美：日本のウシ由来ベロ毒素産生性大腸菌の性状, 感染症学雑誌, 68, 1437-1439, 1994.

新垣 正夫, 甲斐 明美, 柳川 義勢, 伊藤 武：Campylobacter 属菌種および類似菌の Helicobacter 属菌種間の鑑別性状としてのアリアルスルファターゼ試験およびピラジニアミダーゼ試験の検討, 日本食品微生物学会雑誌, 11, 185-188, 1994.

Wada, S., Matsuda, M., Kikuchi, M., Kodama, T., Takei, I., Ogawa, S., Takahashi, S., Singaki, M. and Itoh, T. : Genome DNA analysis and genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori*, Cytobios, 80, 109-116, 1994.

Fukuyama, M., Kamimura, T., Itoh, T., Kohzaki, K., Kurata, M., Hara, M., Tabuchi, K. and Nagai, Y. : Phenotypic characteristics of motile *Aeromonas* isolated from natural environments, Bull. Azabu Uni. Vet. Med., 14, 1-8, 1994.

Suzuki, M., Miura, S., Mori, M., Kai, A., Suzuki, H., Fukumura, D., Suematsu, M. and Tsuchiya, M. : Rebamipide, a novel antiulcer agent, attenuates *Helicobacter pylori* induced gastric mucosal cell injury associated with neutrophil derived oxidants, Gut, 35, 1375-1378, 1994.

高橋 正樹, 斎藤 香彦, 太田 建爾, 工藤 泰雄：Guillain-Barre 症候群患者における抗 *Campylobacter jejuni* 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.

Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Yoshino, H., Tai, T., Handa, S. and Miyatake, T. : Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from pa-

tients with Fisher's syndrome, *Ann. Neurol.*, **36**, 791-793, 1994.

Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Tai, T., Miyatake, T. and Handa, S. : Penner's serotype 4 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolysaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1a epitope, *Infect. Immun.*, **62**, 2101-2103, 1994.

海田 賢一, 結城 伸泰, 高橋 正樹, 鎌倉 恵子, 永田 直一 : *Campylobacter jejuni* (PEN19 : LIO7型) が分離され, HLA-B52抗原を有した Guillain-Barre 症候群の 1 例, *臨床神経学*, **34**, 733-735, 1994.

津田 尚美, 根来 清, 森松 光紀, 斎藤 香彦, 結城 伸泰 : 抗 GalNAc-GD1a 抗体を認めた *Campylobacter jejuni* 腸炎後 Guillain-Barre 症候群, *臨床神経学*, **35**, 208-210, 1995.

Yuki, N., Handa, S., Tai, T., Takahashi, M., Saito, K., Tsujino, Y. and Taki, T. : Ganglioside-like epitopes of lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* (PEN 19) in three isolates from patients with Guillain-Barre syndrome, *J. Neuro. Sci.* **130**, 112-116, 1995.

松下 秀, 山田 澄夫, 関口 恭子, 太田 建爾, 工藤 泰雄 : 近年分離された *Shigella flexneri* 4 について, *感染症学雑誌*, **69**, 280-283, 1995.

柴田 泰史, 木村 昭夫, 福山 真弓, 五十嵐英夫 : 広範囲熱傷患者血清中の Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) 抗体価の検討, *感染症学雑誌*, **68**, 792-793, 1994.

Todome, Y., Ohkuni, H., Mizuse, M., Okibayashi, F.,

Ohtani, N., Suzuki, H., Chun, Song., Igarashi, H., Harada, K., Sakurai, S. and Kotani, S. : Superantigenic exotoxin production by isolates of *Staphylococcus aureus* from the Kawasaki syndrome patients and age-matched control children, *Journal of Medical Microbiology*, **42**, 91-95, 1995.

Utawaga, E., Nishizawa, S., Sekine, S., Hayashi, Y., Ishihara, Y. and Oishi, I. : Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Japan, *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 1841-1845, 1994.

奥本千代美, 吉田 勲, 西島 基弘 : 検知管法によるめっき廃水中のシアン測定に対する共存物質の影響, *工業用水*, **433**, 30-38, 1994.

上原 真一, 野尻 宗子, 高橋美佐子, 渡辺四男也 : プレカラム誘導体化・高速液体クロマトグラフィーによる製剤中のタウリン, L-グルタミン, ビタミンU, L-アスパラギン酸の定量, *薬学雑誌*, **114**, 697-703, 1994.

鎌田 国広, 高橋美佐子, 寺島 潔, 西島 基弘 : Liquid chromatographic determination of carnitine by precolumm derivatization with pyrene-1-carbonyl cyanide., *J. Chromatography A.* **667**, 113-118, 1994.

木嶋 敬二, 鈴木 助治, 山越 葉子, 中村 弘, 小嶋 茂雄 : 高速液体クロマトグラフィーによる香粧品中の塩酸ピリドキシン, アスコルビン酸及びその誘導体の分析法, *日本香粧品科学会誌*, **18**, 53-59, 1994.

上原 真一 : キラルなキャピラリー GC カラムによる光学異性体分析, *ファルマシア*, **30**(11), 1287-1288, 1994.

中村 弘, 大貫奈穂美, 貞升 健志, 関根 大正,

田中 次郎, 岡田 嘉仁, 奥山 徹: 海藻水抽出物の抗エイズウイルス (HIV) 活性, *Natural Medicines*, 48 (3), 173-179, 1994.

Fukushima, H., Gomyoda, M., Kaneko, S., Tsubokura, M., Takeda, N., Hongo, T. and Shubin, F. N-L. : **Restriction Endonuclease Analysis of Virulence Plasmids for Molecular Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* Infections**, *Journal of Clinical Microbiology* 32(5), 1410-1413, 1994.

斎藤 雅明, 山口美佳子, 豊川 康延, 大友 良光, 金子 誠二, 丸山 務: 青森県弘前地区における *Yersinia enterocolitica* 血清型 O: 8 菌感染症 (1984~1991), *感染症学雑誌*, 68 (8), 960-965, 1994.

Takeba, K., Itoh, T., Matsumoto, H. and Nakazawa, H. : **Determination of Dephosphate Bromofenofos in Milk by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**, *Journal of A.O.A.C. International*, 77 (4), 904-908, 1994.

竹重 都子, 飯田 孝, 高木 裕, 栗原 重成, 小川 純一, 天生 孝, 丸山 務: と畜場における枝肉の *Listeria monocytogenes* 汚染要因, *日本獣医師会雑誌*, 48 (2), 131-135, 1995.

加藤 行男, 河野 一義, 東久 保靖, 飯田 孝, 神崎 政子, 石橋 正彦, 金内 長司: 東京都区内のビルに生息するネズミにおける *Listeria* 属菌の保有状況, *日本獣医師会雑誌*, 47, 349-352, 1994.

中里 光男, 斉藤 和夫, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 石川ふさ子, 藤沼 賢司, 守安 貴子, 二島 太郎, 田村 行弘: 固相抽出法を用いた食品中の不揮発性腐敗アミンの分析法, *衛生化学*, 40, 2, 203-209, 1994.

Ushiyama, H., Oguri, A., Totsuka, Y., Itoh, H., Sugimura, T., M. J. A. and Wakabayashi, K. : **Norharman and harman in human urine**, *Proc. Japan Acad.*, 71, 1, 57-60, 1995.

Nukaya, H., Koyota, S., Jinno, F., Ishida, H., Wakabayashi, K., Kurosaka, R., Kim, In-Soo., Yamaizumi, Z., Ushiyama, H., Sugimura, T., Nagano, M. and Tsuji, K. : **Structural determination of a new mutagenic heterocyclic amine, 2-amino-1,7,9-trimethylimidazo [4,5-g] quinoxaline (7,9-DiMeIgQx), present in beef extract**, *Carcinogenesis*, 15, 6, 1151-1154, 1994.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 森野 雅世, 伊藤 正子, 田村 行弘: 農産物中の N-メチルカーバメイト系農薬分析法, *食品衛生学雑誌*, 35, 5, 470-478, 1994.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 田村 行弘: 国内産農産物中の農薬残留実態, *食品衛生学雑誌*, 35, 6, 652-660, 1994.

真木 俊夫: 東京都内で発生した化学性食中毒事例, *都薬雑誌*, 16, 7, 31-37, 1994.

新藤 哲也, 廣瀬理恵子, 宮尾 茂雄, 宮村 茜: アルコールを利用した佃煮, 惣菜類の保存性向上, *New Food Industry*, 36, 6, 27-32, 1994.

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による食品香料中の残留溶剤の分析, *食品衛生学雑誌*, 35, 645-651, 1994.

平田 恵子, 広門 雅子, 植松 洋子, 中島 和雄, 風間 成孔: 食品製造用プロテアーゼ及びパパイイン製剤のタンパク消化力測定法の検討, *食品衛生学雑誌*, 35,

380-384, 1994.

早藤知恵子, 友松 俊夫: 骨粗鬆症予防指導への生体試料成績の活用について, 東京都衛生局学会誌, 93, 174-175, 1994.

山下 三雄, 高橋たか子, 渡辺 泰男, 宮脇 貞栄, 石川香代子, 金子 靖子, 井元 四夫, 小菅 和子, 窪山 泉, 石田 雅巳, 早藤知恵子, 友松 俊夫: 骨粗鬆症に影響する因子について, 東京都衛生局学会誌, 92, 316-317, 1994.

Bani, M. H., Narbonne, J. F., Fukuhara, M., Ushio, F. and Robertson, L. W. : **Differential modulation of hepatic cytochrome P-450 enzymes in rat and Syrian hamster by 4'-trifluoromethyl-2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl**, J. Biochem. Toxicology, 9, 241-248, 1994.

Nitta-Kiyose, C., Hayashi, K., Ueda, T. and Igarashi, O. : **Distribution of α - Toc Stereoisomers in Rats**, Biosci. Biotech. Biochem. 58, 2000-2003, 1994.

平原 文子, 植田 忠彦, 五十嵐 脩, 門倉 芳江: モデル献立から分析法と計算法により求めた日本人の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) 摂取量およびビタミンE / PUFA 比, ビタミン, 69, 25-32, 1995.

Seto H., Koike H. and Sasano H. : **Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position in the thiosulfate hydrogen peroxide reaction system. Evidence of hydroxy radical generation in the system**, Chem. Lett., 993-996, 1994.

Seto H., Ohkubo, T., Koike, H., Saito, M. and Sasano, H. : **Significant formation of 8-hydroxydeoxyguanosine through interaction of diesel particulate matter with deoxyguanosine**, Bull. Environ. Contam. Toxicol.,

53, 789-795, 1994.

大山 謙一: 大気汚染ガス ($\text{NO}_2 \cdot \text{SO}_2$) と大気浮遊粉じんによる複合生体影響に関する研究 (第3報), 京都環境科学研究所年報, 235-243, 1994.

Sawai, J. and Kanou, F. : **Mutagenicity test of ceramic powder which have growth inhibitory effects on bacteria**, Journal of Chemical Engineering of Japan, 28, 352-354, 1995.

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(6), 家屋害虫, 16(1), 29-37, 1994.

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(7), 家屋害虫, 16(2), 71-82, 1994.

前田 健, 姉小路公久, 吉川 翠: **IDK-61 α S** の実験的ダニ皮膚炎に対するボランティア試験および臨床試験成績, 薬事と治療, 23(2), 281-291, 1995.

金台 東, 本多 裕之, 白神 直弘, 矢野 一好, 海野 肇: 活性汚泥に移行したポリオウイルスの誘出条件について, 水環境学会誌, 17, 509-516, 1994.

土屋 悦輝: 水中チウラムの高速液体クロマトグラフ法による分析, 工業用水, 433(10), 15-21, 1994.

高橋 保雄, 森田 昌敏: 消毒 (塩素処理) 副生成物における汚染について, 環境化学研究会, 4(2), 285-315, 1994.

Tsuchiya, Y. : **Chlorination by-products of 4,4'-methylene dianiline (MDA) and their mutagenicity**, Water Sci. Tech, 30(10), 153-159, 1994.

渡辺真利代, 渡辺 真之: **アオコを作る藍藻とその毒素**, 月刊「水」6月号, 24-29, 1994.

Watanabe, M., H.-D. Park. and Watanabe, M. : **Compositions of Microcystis species and heptapeptide toxins**, Verh. Internat. Verein. Limnol, **25**, 2221-2229, 1994.

古畑 勝則, 高柳 保, 団野 直子, 岡田 誠之, 紀谷 文樹: **給湯水におけるレジオネラ汚染とその対策**, 日本公衆衛生雑誌, **41**(11), 1073-1083, 1994.

高柳 保, 古畑 勝則: **給湯水質の実態調査**, 空気調和・衛生工学, **69**(1), 21-27, 1995.

Nakagawa, Y., Yaguchi, K. and Suzuki, T. : **Comparative cytotoxicity between butylated hydroxytoluene and its methylcarbamate derivative, terbucarb, on isolated rat hepatocytes**, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **52**, 511-515, 1994.

Nakagawa, Y., Nakajima, K., Moore, G. and Moldeus, P. : **On the mechanisms of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole and its metabolites-induced cytotoxicities in isolated rat hepatocytes**, European J. Pharmacol., **270**, 341-348, 1994.

Nakagawa, Y. and Tayama, S. : **Cytotoxicity of propyl gallate and related compounds in rat hepatocytes**, Arch. Toxicol., **69**, 2204-2208, 1995.

Oishi, S. : **Prevention of di(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B₁₂ derivative adenosylcobalamin**, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **26**, 497-503, 1994.

Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T. and Yoneyama, M. : **Piperonyl butoxide induces hepatocellular carcinoma in male CD-1 mice**, Arch. Toxicol., **68**, 467-469, 1994.

Takahashi, O. : **Haemorrhagic toxicity of a large dose of alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherols, ubiquinone, beta-carotene, retinol acetate and L-ascorbic acid in the rat**, Food and Chemical Toxicology, **33**, 121-128, 1995.

Takahashi, O., Oishi, S. and Watanabe, M. F. : **Defective blood coagulation is not causative of hepatic haemorrhage induced by microcystin-LR**, Pharmacology and Toxicology, **76**, 250-254, 1995.

Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O. and Oishi, S. : **Developmental toxicity evaluation of piperonyl butoxide in CD-1 mice**, Toxicology Letters, **71**, 123-129, 1994.

Tanaka, T. : **Reproductive and neurobehavioral effects of Allura Red AC administered to mice in the diet**, Toxicology, **92**, 169-177, 1994.

Tanaka, T. : **Reproductive and neurobehavioral effects of cochineal administered to mice in the diet**, Toxicology and Industrial Health, **11**, 1-12, 1995.

Tayama, S. and Nakagawa, Y. : **Effects of scavengers of active oxygen species on cell damage caused in CHO-K1 cells by phenylhydroquinone, an o-phenylphenol metabolites**, Mutation Research, **324**, 121-131, 1994.

深野 駿一, 市川 久次, 遠山 千春, 平野靖史朗: **3-chlorodibenzofuran の体内動態に関する生理学的シ**

ミュレーションモデルによる解析, 日本衛生学雑誌, 49 (1), 162, 1994.

鈴木 信夫, 鈴木 英子: 培養ヒト細胞 RSa における K-ras codon 12 突然変異のサッカリンナトリウムによる誘発-ペリルアルデヒドの変異原性との比較, 変異原性試験, 3(3), 155-160, 1994.

Aoki, N., Maruki, M., Miyazaki, H. and Tange, T. : Differing kinase activity of the c-yes and c-src gene proteins in TPA-induced megakaryocytic differentiation of T-33 and K562 cell lines, Res Exp Med 195, 39-47, 1995.

Shimada, H., Noda, K., Mori, M., Aoki, N., Tajima, M. and Kato, K. : Papovavirus detection by electron microscopy in the brain of an elderly patient without overt progressive multifocal leukoencephalopathy, Virchows Archiv, 424, 569-572, 1994.

Mitani, S., Oka, T., Aoki, N., Hojo, I., Ota, U. and Mori, S. : Rearrangement of bcl-2 is detectable in Hodgkin's disease by polymerase chain reaction, Jpn J Cancer Res, 85, 1229-1232, 1994.

Tayama, K. and Shisa, H. : Development of pigmented scales on rat skin : relation to age, sex, strain, and hormonal effect, Laboratory Animal Science, 44, 240-244, 1994.

Tada, Y., Fujitani, T. and Yoneyama, M. : Thiabendazole (TBZ) nephrotoxicity and recovery in ICR adult mice, Toxicology, 94, 41-55, 1994.

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, 小久保彌太郎, 丸山 務: 食肉中における *Listeria monocytogenes*

の熱抵抗性, 日本食品微生物学会雑誌, 11(1), 51-54, 1994.

神 真知子, 楠 くみ子, 池島 伸至, 新井 輝義, 入倉 善久, 鈴木 敬子, 平田 一郎, 小久保彌太郎, 丸山 務: スモークサーモンにおける *Listeria monocytogenes* の汚染状況および低温保存時の挙動, 日本食品微生物学会雑誌, 11(2), 107-111, 1994.

大石 充男, 竹内 正博, 大西 和夫, 中沢 裕之: 固相抽出-HPLC を用いた食品中グリチルリチン酸の分析, クロマトグラフィー, 15, 141-146, 1994.

Oishi, M., Onishi, K., Kano, I., Nakazawa, H. and Tanabe, S. : Capillary Gas Chromatographic Determination of Thiabendazole in Citrus and Apple Juices, J. AOAC International, 77, 1293-1296, 1994.

鈴木 俊也, 矢口久美子, 大西 和夫, 山岸 達典: 大量試料注入用キャピラリーガスクロマトグラフを用いた地下水中リン酸トリエステルの分析, Journal of AOAC International, 77, 1647-1651, 1994.

矢口久美子, 鈴木 俊也, 平田 一郎, 伊藤 武, 濱田 昭: テトラクロロエチレン分解菌 T 株の形態学的, 生理学的及び化学的性状, 衛生化学, 40 (2), 178-184, 1994.

矢口久美子, 鈴木 俊也, 平田 一郎, 伊藤 武, 濱田 昭: Tetrachloroethylene degradation by culture supernatant of the anaerobic bacterium, strain T, 衛生化学, 40(3), 252-258, 1994.

柄本 博: 河川の微量元素汚染指標生物としての水生昆虫ヒゲナガカワトビケラに関する研究-カドミウムと銅-, 水環境学会誌, 17, 11, 737-743, 1994.

総説・解説

甲斐 明美, 工藤 泰雄: 病原大腸菌による食中毒・その実情を探る, 食品衛生, 6, 60-70, 1994.

甲斐 明美: ベロ毒素 (VT 1, VT 2) 検出キット, 検査と技術, 22, 737, 1994.

伊藤 武: 食品媒介感染症の発生要因, 日環感, 9, 23-25, 1994.

伊藤 武: ヘリコバクター・ピロリの細菌学とその病原性, 日医雑誌, 113, 331-335, 1995.

伊藤 武: ヘリコバクター・ピロリ, 治療, 77, 1205-1207, 1995.

伊藤 武: エロモナス属菌による食中毒予防対策の必要性, 日本医事新報, 3700, 134-135, 1995.

工藤 泰雄: ベロ毒素産生性大腸菌 (腸管出血性大腸菌), 救急医学, 19, 13-14, 1995.

甲斐 明美: わが国におけるベロ毒素産生性大腸菌下痢症の最近の動向, 東京都予防医学協会年報, 24, 198-202, 1995.

五十嵐英夫, 柏木 義勝, 遠藤美代子, 奥野 ルミ: 劇症型 A 群レンサ球菌感染症, 臨床と微生物, 21, 638-647, 1994.

五十嵐英夫: 劇症型 A 群レンサ球菌感染症, 臨床検査, 38, 1413-1415, 1994.

大国 壽士, 五十嵐英夫, 大江 健二: あなどれないレンサ球菌感染症, 日本細菌学雑誌, 49, 759-767, 1994.

関根 整治: Small Round Structured Viruses (SRSV) 性胃腸炎, ニューフードインダストリー, 36, 9-14, 1994.

林 志直: ウイルス抗原・抗体検査 便中ロタウイルス抗原, medicina, 31, 554-555, 1994.

林 志直: 急性胃腸炎のウイルス検査, 検査と技術, 23, 33-40, 1995.

小久保彌太郎: HACCP の食肉製品におけるケース・スタディー, 月刊フード・ケミカル, 1994-8, 100-105, 1994.

上村 尚: カビ毒 (マイコトキシン) の分析, モダンメディア, 40, 8, 339-351, 1994.

上村 尚: 米に係わるカビ毒の化学分析, マイコトキシン, 40, 23-28, 1994.

井部 明広: 発酵食品とアミン類, 都薬雑誌, 17, 2, 43-49, 1995.

狩野 文雄: 手洗いとうがい, 保健教材ニュース, 1468, 1995 日本写真新聞社.

沢井 淳, 狩野 文雄: セラミックス粉末の抗菌性 (細菌増殖抑制効果) と食品加工におけるこれからの展開, ジャパンフードサイエンス, 34, 69-72, 1995.

吉川 翠：住まいの環境衛生，ファーマウイーク，7671，10-11，1995.

吉川 翠：天然物による防虫・防ダニ剤開発の可能性，ワープ，8(4)，1-4，1995.

吉川 翠：ダニに影響する生活環境要素とその対策，住と建築，404(4)，12-14，1994.

吉川 翠：今年の虫騒動・ダニ騒動，住まいと健康フォーラムニュース，3，1，1994.

土屋 悦輝：環境水中の農薬類の分析，ぶんせき'94，373-380，1994.

佐々木美枝子：食品の安全を守るために 動物実験が教えてくれるもの，都薬雑誌 vol. 17, No.9, 1995.

大石 充男，北田 善三：食品添加物の分析(その3)一酸化防止剤，月刊フードケミカル，1995-1，118-131，1995.

行政報告

高橋奈穂子，安田 一郎，浜野 朋子，高野伊知郎，瀬戸 隆子，西島 基弘，秋山 和幸：十全大補湯エキスかりゅう剤の理化学的品質評価とその安定性，東洋医学事業研究所報告書，第二期，152-156，1994，東京都衛生局.

木嶋 敬二，小嶋 茂雄，鈴木 助治，西島 靖：化粧品界面活性剤，油脂の規格整備に関する研究，平成5年度厚生科学研究補助金事業実績報告書，1994，厚生省.

木嶋 敬二，鈴木 助治，中村 弘，藤山 喜雄：香粧品の品質確保のための配合成分の相互作用に関する研究，平成5年度厚生科学研究補助金事業実績報告書，1994，厚生省.

木嶋 敬二，鈴木 助治，中村 弘，西島 靖：化粧品原料成分の品質試験法に関する研究，平成5年度厚生科学研究補助金事業実績報告書，1994，厚生省.

植田 忠彦：コプラナー PCB による食品ならびに環境汚染に関する研究 食品中の環境汚染物質のモニタリング，プロジェクト研究報告書Ⅲ，1994，東京都立衛生研究所.

吉川 翠他：東京都消費生活条例第8条に基づく申し出「量に使用される殺虫剤の調査」について(通知)，1995，生活文化局.

岡本 寛：環境試料中の2-ブタノン，4-メチル-2-ペンタノンの定量法，平成6年度化学物質分析法開発調査報告書，1995，環境庁環境安全課.

高橋 保雄：水質分析方法検討試験(排水規制追加項目測定方法確立調査)，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.

高橋 保雄，土屋 悦輝：利水過程における農薬等化学物質の動態及び分解生成物等の評価に関する研究，1994，厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課.

佐藤かな子，長井二三子，牛山 慶子，加納 いつ，安田 一郎，秋山 和幸：蒼朮およびβ-オイデスモールの細胞膜酵素(Na⁺,K⁺-ATPase)に対する作用—生体の反応機構の解析を中心として—，東洋医学事業研究所報告書，157-161，1994，東京都衛生局.

学 会 发 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1994.4—1995.3)

学会発表

松下 秀, 山田 澄夫, 関口 恭子, 工藤 泰雄:
1992年フィリピンで分離された散発下痢症患者由来のサルモネラについて, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

松下 秀, 山田 澄夫, 関口 恭子, 太田 建爾,
工藤 泰雄:近年分離された *Shigella flexneri* 4について, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

関口 恭子, 松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武,
太田 建爾, 工藤 泰雄:コレラ菌を含む8種類の腸管病原菌が検出された輸入集団事例について, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

太田 建爾, 関口 恭子, 松下 秀, 山田 澄夫,
工藤 泰雄:海外旅行者下痢症例から分離された *Shigella sonnei* のコリシン型及び薬剤感受性, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

甲斐 明美, 尾畑 浩魅, 楠 淳, 新垣 正夫,
門間 千枝, 柳川 義勢, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄:1993年に東京都内で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7 による2集団下痢症事例, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 伊藤 武, 太田 建爾,
工藤 泰雄:糞便からの腸管出血性大腸菌 O157:H7 検出法の検討, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

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:食中毒由来 *Salmonella* Enteritidis のファージ型, プラスミドプロファイル, 薬剤感受性とそれらの推移, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

Itoh, T., Yanagawa, Y., Shingaki, M., Masubuchi, N., Takahashi, S. and Saito, S.: **Colonization in stomach of mouse with *Helicobacter heilmanii* like organism from cynomolgus monkey origin**, The 7th International Symposium on Helicobacter pylori and its Diseases (1994, 4).

Masubuchi, N., Takahashi, S., Ninomiya, H., Hoshiya, S., Ishiyama, N., Igarashi, H., Tomii, S., Saito, S., Itoh, T. and Hirata, I.: ***Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma**, The 7th International Symposium on Helicobacter pylori and its Diseases (1994, 4).

楠 淳, 尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 新垣 正夫,
門間 千枝, 柳川 義勢, 橋本 由美, 潮田 弘, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄:鶏および鶏卵由来 *Salmonella* Enteritidis の疫学マーカーによる解析, 第67回日本食品衛生学会(1994, 5).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 伊藤 武, 工藤 泰雄:
腸管出血性大腸菌 O157:H7 検出のための各種簡易・迅速キットの検討, 第67回日本食品衛生学会(1994, 5).

甲斐 明美, 尾畑 浩魅, 山田 澄夫, 伊藤 武,
工藤 泰雄:ラテックス凝集反応法による Vero 毒素産生性大腸菌の同定, 第67回日本食品衛生学会(1994, 5).

藤川 浩, 潮田 弘, 伊藤 武, 太田 建爾:
マイクロ波照射による浮遊細菌の死滅態度, 第67回日本食品衛生学会(1994, 5).

結城 伸泰, 吉野 英, 宮武 正, 瀧 孝雄,
飯田 静夫, 高橋 正樹, 斎藤 香彦, 市川 博雄, 土居あゆみ: Fisher 症候群を惹起する *Campylobacter* のリポ多糖と GQ1b ガングリオシドの分子相同性, 第35回日本神経学会(1994, 5).

市川 博雄, 今泉 満, 福井 俊哉, 杉田幸二郎, 結城 伸泰, 高橋 正樹, 斎藤 香彦: *Campylobacter jejuni* 感染後に発症した Fisher 症候群 (FS): 文献例との対比および免疫学的検討, 第35回日本神経学会 (1994, 5).

Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Tai, T., Handa, S. and Miyatake, T.: **Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome**, Peripheral Nerve Society (1994, 6).

松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: 東京において分離された海外及び国内由来赤痢菌の諸性状, 第71回日本細菌学会関東支部総会 (1994, 6).

甲斐 明美: シンポジウム「最近話題の感染症」ペロ毒素産生性大腸菌下痢症, 第71回日本細菌学会関東支部総会 (1994, 6).

Kudoh, Y., Kai, A., Obata, H., Kusunoki, J., Monma, C., Shingaki, M., Yanagawa, Y., Yamada, S., Matsushita, S., Itoh, T. and Ohta, K.: **Epidemiological surveys on verotoxin-producing *Escherichia coli* infections in Japan**, 2nd International Symposium and Workshop on Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *E.coli* Infections (1994, 6).

Kai, A., Yamada, S., Matsushita, S., Itoh, T. and Kudoh, Y.: **Serological diagnosis of VTEC infections by passive hemagglutination assay**, 2nd International Symposium and Workshop on Verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *E.coli* Infections (1994, 6).

工藤 泰雄: 感染症サーベイランス事業「感染症検査情報オンライン化の評価」, 衛生微生物技術協議会第15回研究会 (1994, 7).

甲斐 明美: シンポジウム「ビブリオおよび病原大腸菌」Vero 毒素産生性大腸菌の生態と分離菌の諸性状, 衛生微生物技術協議会第15回研究会 (1994, 7).

Fukuyama, M., Oonaka, K., Imagawa, Y., Hara, M., Tabuchi, K., Koizumi, I., Itoh, T. and Kai, A.: **Contamination of healthy liverstock with verotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC), the first isolation from goats in Japan**, VIth International Society for Animal Clinical Biochemistry (1994, 8).

Itoh, T., Yanagawa, Y., Shingaki, M., Masubuchi, N., Takahashi, S. and Saito, S.: **Infection of the mouse gastric mucosa with *Helicobacter heilmanii* like organism from cynomolgus monkey origin**, The VIIth Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter pylori (1994, 9).

増渕 尚子, 星谷 聡, 二宮 英彦, 渡辺 一宏, 高木 智匡, 高橋 信一, 齊藤 昌三, 伊藤 武, 柳川 義勢, 新垣 正夫: 胃内らせん菌の分離—マウスを用いた動物感染モデル—, 第36回日本消化器病学会大会 (1994, 10).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 柳川 義勢, 山田 澄夫, 松下 秀, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: **TRH 遺伝子保有腸炎ビブリオによる下痢症とその分離菌の性状**, 第15回日本食品微生物学会 (1994, 11).

工藤 泰雄: 話題の感染症—出血性大腸菌感染症, 国際医療協力シンポジウム (1994, 11).

関口 恭子, 松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: 海外旅行者下痢症からの腸炎ビブリオの検出, 第28回腸炎ビブリオシンポジウム (1994, 11).

尾畑 浩魅, 甲斐 明美, 関口 恭子, 松下 秀, 山田 澄夫, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: 海外旅行者下痢症由来腸炎ビブリオの TRH 遺伝子保有状況, 第28回腸炎ビブリオシンポジウム(1994, 11).

Kai, A., Obata, H., Yamada, S., Matsushita, S., Itoh, T., Ohta, K. and Kudoh, Y. : **Molecular subtyping of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from human and animals in Tokyo**, The 30th joint conference, U.S. -Japan cooperative medical science, program, cholera and related diarrheal diseases panel (1994, 12).

松下 秀, 山田 澄夫, 関口 恭子, 伊藤 武, 太田 建爾, 工藤 泰雄: わが国で分離された新血清型赤痢菌について, 第7回全国地研協議会関東甲信静支部細菌研究部会研究会(1995, 2).

楠 淳, 橋本 由美, 平井 昭彦, 伊藤 武, 沼田 朋子, 森田 豊寿, 村上 康弘, 大川 澄夫: 室内飼育犬が感染源であった乳児のサルモネラ症, 平成6年度日本獣医公衆衛生学会年次総会(1995, 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: パルスフィールド電気泳動法を用いた Vero 毒素産生性大腸菌 O157: H7 感染症の疫学的解析, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

伊藤 武, 柳川 義勢, 新垣 正夫, 工藤 泰雄, 増渕 尚子, 高橋 信一: *Helicobacter heilmannii* like organism のマウス胃内における長期間定着と胃粘膜病変, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

楠 淳, 橋本 由美, 平井 昭彦, 伊藤 武, 甲斐 明美, 柳川 義勢, 太田 建爾, 工藤 泰雄, 中村 明子: 食中毒および食品由来 *Salmonella Enteritidis* の疫学マーカーによる解析, 第119回日本獣医学会

(1995, 3).

楠 淳, 平井 昭彦, 橋本 由美, 伊藤 武, 大田 博昭, 小島理恵子, キンキン トエ: 市販鶏卵における *S. Enteritidis* に対する抗体保有状況, 第119回日本獣医学会(1995, 3).

岩坪 哲哉, 柴田 実, 高野 弘紀: アルカプトン尿症の新生児例 (第二報), 第98回日本小児科学会(1995, 3).

鈴木 淳, 村田以和夫, 安田 一郎: *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「特にウコンから抽出された(+)-ar-turmerone について」, 日本寄生虫学会東日本大会(1994, 10).

熊坂 一成, 山口 恵三, 大石 向江, 蓑輪 佳子, 小林 千種, 工藤 泰雄, 河野 均也: 微生物検査外部精度管理の現状と問題点—第11回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告—, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

遠藤美代子, 奥野 ルミ, 柏木 義勝, 五十嵐英夫: 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 の産生性, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

五十嵐英夫, 横尾 裕: 簡易・迅速な黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別法の開発, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

福山 真弓, 三和 敬史, 柴田 泰史, 木村 昭夫, 五十嵐英夫: 黄色ブドウ球菌感染症患者血清からの TSST-1, 抗 TSST-1 抗体, 抗 SEA~SEC 抗体の検出, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

五十嵐英夫：TSLs患者より分離されたA群レンサ球菌の性状，第3回レンサ球菌談話会(1994, 6).

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の産生性，第3回レンサ球菌談話会(1994, 6).

遠藤美代子，奥野 ルミ，柏木 義勝，五十嵐英夫：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の産生性，第27回レンサ球菌感染症研究会(1994, 6).

五十嵐英夫：劇症型A群レンサ球菌感染症，第71回日本細菌学会関東支部総会(1994, 6).

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性に及ぼす嫌氣的培養条件の影響，第39回ブドウ球菌研究会(1994, 9).

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，齋藤 洋：エンテロトキシンAのスंकスによる嘔吐実験，第39回ブドウ球菌研究会(1994, 9).

大塚 喜人，後藤美江子，遠藤美代子，奥野 ルミ，柏木 義勝，木村 哲，五十嵐英夫，島田 馨：当院におけるMRSAのコアグラマーゼ型別及び毒素産生性と薬剤感受性の疫学的調査，第39回ブドウ球菌研究会(1994, 9).

沢井 淳，沢木 崇，五十嵐英夫，橋本 篤，清水 賢：セラミックス(MgO)粉末スラリーにより引き起こされる大腸菌の損傷，第27回化学工学秋季大会(1994, 9).

相楽 宏治，沢井 淳，五十嵐英夫，橋本 篤，清水 賢：ストレスにより生じた損傷細菌の評価法，第27回化学工学秋季大会(1994, 9).

沢井 淳，五十嵐英夫，橋本 篤，清水 賢：Bacillus芽胞に及ぼすセラミックス粉末スラリーの影響，第27回化学工学秋季大会(1994, 9).

高橋 博美，五十嵐英夫，国眼 孝雄：MRSA腸炎由来黄色ブドウ球菌の毒素産生における嫌氣的培養条件の影響，第27回化学工学秋季大会(1994, 9).

五十嵐英夫：TSST-1及びエンテロトキシンからみたブドウ球菌感染症の考察，第41回日本臨床病理学会総会(1994, 10).

佐藤 圭創，赤池 孝章，菅守 隆，前田 浩，白石 直樹，坂田 哲宣，山田 洋子，宮本 典昭，村上 清子，五十嵐英夫，安藤 正幸：末梢血及び著名な好中球の貪食像を認めた劇症連鎖球菌感染症についての検討，第64回日本感染症学会西日本地方会(1994, 11).

五十嵐英夫：劇症型A群レンサ球菌感染症の疫学，第6回日本臨床微生物学会総会(1995, 1).

大塚 喜人，後藤美江子，遠藤美代子，奥野 ルミ，柏木 義勝，木村 哲，五十嵐英夫，島田 馨：当院におけるMRSAのコアグラマーゼ型別及び毒素産生性と薬剤感受性の疫学的調査，第6回日本臨床微生物学会総会(1995, 1).

Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A. and Shimizu, M.: Antibacterial Characteristics of Ceramics Powder Slurry, 7th European Congress on Biotechnology(1995, 2).

Sagara, K., Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Koku-gann, T. and Shimizu, M. : **Evaluation of Injury in Bacteria by Far-infrared Irradiation**, 7th European Congress on Biotechnology (1995, 2).

松下 健二, 五十嵐英夫, 内山 竹彦, 藤巻わかえ, 大国 壽士, 小谷 尚三, 杉山 明子, 高田春比古 : **Streptococcus mitis** スーパー抗原により活性化されたヒトT細胞は口腔粘膜由来の上皮細胞を傷害する, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

遠藤美代子, 奥野 ルミ, 柏木 義勝, 五十嵐英夫 : **わが国における劇症型A群レンサ球菌感染症**, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

林 志直, 佐々木由紀子, 関根 整治, 手嶋 力男 : **小児の急性胃腸炎からのウイルス検索**, 第68回日本感染症学会総会(1994, 4).

川原 真, 伊藤 忠彦, 坪井 義昌, 柴田伸一郎, 須藤 千春 : **野鼠から分離した Ehrlichia について**, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

吉田 靖子, 矢野 一好, 新開 敬行 : **都民の日本脳炎抗体保有状況の年次推移**, 第29回日本脳炎ウイルス生態学研究会(1994, 6).

吉田 靖子, 矢野 一好, 新開 敬行 : **東京都における日本脳炎の疫学的研究**, 第29回日本脳炎ウイルス生態学研究会(1994, 6).

吉田 靖子, 矢野 一好, 新開 敬行 : **血清疫学からみた日本脳炎の流行予測**, 第9回関東甲信静地区ウイルス研究会(1994, 9).

貞升 健志, 田部井由紀子, 森 功次, 稲葉美佐子,

伊藤 忠彦, 関根 大正 : **東京都における HTLV-I 母子感染の追跡調査**, 第8回 HTLV-I 母児感染研究会(1994, 7).

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, 関根 大正 : **Seroprevalence of HIV in The Tokyo District**, 第10回国際エイズ会議/国際 STD 会議(1994, 8).

田部井由紀子, 貞升 健志, 森 功次, 稲葉美佐子, 関根 大正, 広川 淳, 宮沢 豊 : **Investigating of HIV-1 transmission from mother to child**, 第10回国際エイズ会議/国際 STD 会議(1994, 8).

矢野 一好, 吉田 靖子, 新開 敬行 : **水中ウイルスの塩素による不活化とその妨害要因の検討**, 第9回関東甲信静地区ウイルス研究会(1994, 9).

高橋美佐子, 鎌田 国広, 長嶋真知子, 重岡 捨身, 西島 基弘 : **蛍光検出 HPLC による製剤中のアトロピンの定量**, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

長嶋真知子, 高野伊知郎, 瀬戸隆子, 高橋美佐子, 重岡 捨身, 西島 基弘 : **蛍光 X線分析法による生薬中臭素の迅速定量法**, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

鎌田 国広, 寺島 潔, 西島 基弘 : **4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1, 2, 4-トリアゾールを用いる点眼剤中のコンドロイチン硫酸ナトリウムの分析法**, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

宮武ノリエ, 上原 真一, 西島 基弘 : **サリチル酸フェニルのエタノール・水溶液中での安定性について**, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

野尻 宗子, 上原 真一, 西島 基弘 : **キレート試薬**

ビスムチオールⅡを用いたヒ素試験法の検討, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

羽石奈穂子, 浜野 朋子, 安田 一郎, 西島 基弘, 秋山 和幸: 医薬品安定性試験の漢方製剤への応用, 第27回日本薬剤師会学術大会(1994, 11).

高野伊知郎, 安田 一郎, 西島 基弘, 竹谷 孝一, 糸川 秀治: 屋久島産ガジュツより単離したセスキテルペンラクトンについて, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

安田 一郎, 木島 孝夫, 小塚 睦夫, 李 國雄, 柏田 良樹, Mark. L. Cosentino: 抗 HIV 作用を示すサイカチ果実中のサポニンについて, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

浜野 朋子, 安田 一郎, 羽石奈穂子, 高野伊知郎, 瀬戸 隆子, 西島 基弘, 舘 公子, 冠 政光, 田村 行弘: ベトナム桂皮を中心とした桂皮の品質評価, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

水石 和子, 竹内 正博, 保母 敏行: ガスクロマトグラフィー/負イオン化学イオン化質量分析による環境試料中の有機スズ化合物の定量, 平成6年度日本学術振興会創造機能化学第116委員会研究報告会(1994, 6).

水石 和子, 竹内 正博, 保母 敏行: GC-NCI-MS による環境試料中のジフェニールエーテル系除草剤の定量, 日本分析化学会第43年会(1994, 10).

舘 照雄, 山野辺秀夫, 岸本 清子, 岩崎由美子, 中村 弘: GC-MS 法による家庭用エアゾル製品中の溶剤の分析, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

舘 照雄, 山野辺秀夫, 岸本 清子, 岩崎由美子,

中村 弘: 紫外線吸収剤配合と表示された繊維製品中の有効成分調査, 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第7回理化学部会(1995, 2).

山野辺秀夫, 舘 照雄, 岸本 清子, 岩崎由美子, 中村 弘: ガスクロマトグラフィーによる家庭用品中の有機スズ化合物の分析, 地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第7回理化学部会(1995, 2).

山本 葉子, 光川 篤志, 鈴木 麻実, 山本 毅, 塚田 啓一, 山田 直樹, 木村 豊彦, 山野辺秀夫, 舘 照雄, 中村 弘: 塩素系洗浄剤・漂白剤と酸性洗浄剤の混合による塩素ガス発生試験結果について, 第93回東京都衛生局学会(1994, 10).

大貫奈穂美, 森 謙一郎, 伊藤 弘一, 鈴木 助治, 中村 弘, 木嶋 敬二: 高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中のアラントインの分析法, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

伊藤 弘一, 大貫奈穂美, 森 謙一郎, 鈴木 助治, 中村 弘: 多波長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性タール色素の分析, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

大貫奈穂美, 森 謙一郎, 中村 義昭, 伊藤 弘一, 鈴木 助治, 中村 弘: GC 及び GC/MS による化粧品中の高級アルコール及び高級脂肪酸エステル分析法, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

森 謙一郎, 伊藤 弘一, 鈴木 助治, 中村 弘: 2次元 NMR による化粧品中の紫外線吸収剤の分析, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

江波戸挙秀: 個人頭髪中の金属含有量, 第5回日本微量元素学会(1994, 6).

小久保彌太郎：リステリアと食品衛生，日本大学獣医学会(1994, 7).

小久保彌太郎：これからの食品工場の自主衛生管理方式——食肉製品におけるケース・スタディー，日本食品保全研究会シンポジウム(1994, 11).

牧野 壮一，岡田由美子，丸山 務，金子 誠二，笹川 千尋：仮性結核菌を用いた PRC 法を基礎としたフィンガープリンティング法について，第117回日本獣医学会(1994, 4).

金子 誠二，石崎 直人，伊藤 武，小久保彌太郎，大友 良光，豊川 安延：PCR 法と培養法によるノネズミおよびブタからの病原性エルシニア属菌の検出，第117回日本獣医学会(1994, 4).

金子 誠二，小久保彌太郎，長谷川敦子，大友 良光：*Yersinia enterocolitica* 血清型08菌のリボタイピング，第119回日本獣医学会(1995, 3).

Kaneko, S., Ishizaki, N. and Kokubo, Y. : **Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Pork Using Polymerase Chain Reaction**, 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YERSINIA (1994, 9).

Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Yamaguchi, M., Kaneko, S. and Maruyama, T. : **Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* serovar O:8 infection in Tsugaru-ura in Japan**, 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YERSINIA (1994, 9).

Shiozawa, K., Kubota, T., Sahara, K., Akahane, S., Hattori, H., Nishima, T., Yagi, T., Miyake, S., Takami, H. and Kaneko, S. : **Detection of *Yersinia pseudotuberculosis* DNAs in Paraffin-Embedded Tissues from Dead**

Chimpanzees by Using PCR, 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YERSINIA (1994, 9).

片岡 潤，神保 勝彦，小久保彌太郎，梅津 透：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，第68回日本食品衛生学会(1994, 10).

宮川 弘之，堀井 昭三，小久保彌太郎：高速液体クロマトグラフィーによる鶏肉中のモネンシン，サリノマイシンの同時分析法，平成6年度日本獣医公衆衛生学会年次学会(1995, 2).

Miyazaki, T., Hashimoto, T., Nakajima, T., Kokubo, Y. and Yamagishi, T. : **Long-Term Monitoring and Residue Component Pattern of Chlordanes in Short-necked Clam from Tokyo Bay, Japan**, The 108th Annual AOAC International Meeting and Exposition (1994, 9).

竹葉 和江，伊藤 武，松本 昌雄，中澤 裕之，田辺 信三：電気化学検出高速液体クロマトグラフィーによる牛乳中の肝蛭駆除剤の同時分析，第68回日本食品衛生学会(1994, 10).

Takeba, K., Kokubo, Y., Nakazawa, H. and J. A. Settepani : **The Current Overview of Anthelmintics in Japan and Their Residual Analysis in Foods**, The 108th Annual AOAC International Meeting and Exposition (1994, 9).

仲真 晶子，金子 誠二，飯田 孝，梅木富士郎，小久保彌太郎，伊藤 武，松田 基夫，今井 雪穂，菊池 美加，丸山 務：*Listeria monocytogenes* 血清型 4 b 株染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析，第117回日本獣医学会(1994, 4).

仲真 晶子, 寺尾 通徳, 松田 基夫, 金子 誠二, 飯田 孝, 梅木富士郎, 小久保彌太郎, 伊藤 武, 丸山 務: *Listeria monocytogenes* のゲノムタイピングわが国の臨床由来および食品由来株と欧米の食品媒介リステリア症起因株との比較一, 第119回日本獣医学会(1995, 3).

仲真 晶子, 寺尾 通徳, 松田 基夫, 伊藤 武, 金子 誠二, 梅木富士郎, 丸山 務: 臨床由来 *Listeria monocytogenes* 血清型 4 b 株のパルスフィールドゲル電気泳動法によるゲノムタイピング, 第68回日本細菌学会総会(1995, 3).

吉田 正明, 梅木富士郎, 柏木 義勝, 仲真 晶子, 奥田 勝, 武石 昌敬: *Staphylococcus aureus* のコアグラゼ型による臨床型乳房炎由来株および搾乳環境由来株との比較, 第119回日本獣医学会(1995, 3).

吉田 正明, 梅木富士郎, 柏木 義勝, 仲真 晶子, 武石 昌敬: 乳房炎防除に伴うバルク乳の細菌学的検査, 第118回日本獣医学会(1994, 9).

飯田 孝, 神崎 政子, 小久保彌太郎, 金内 長司, 丸山 務: わが国における薬剤耐性 *Listeria monocytogenes* の分布, 平成6年度日本獣医公衆衛生学会(1995, 2).

力武廉太郎, 水谷 浩志, 川崎 孝, 北村 隆志, 山之内 淳, 花澤 孝悌, 宮尾 陽子, 村上 展通, 飯田 孝, 神崎 政子: 魚介類加工品における *Listeria monocytogenes* の汚染実態調査, 第92回東京都衛生局学会(1994, 5).

横田 啓一, 新井 孝典, 上野 弘志, 村松 康和, 飯田 孝, 森田 千春: 北海道某市内の牛舎における *Listeria monocytogenes* の追跡, 第118回日本獣医学会(1994, 9).

神崎 政子, 飯田 孝, 日吉 真紀, 高島 郁夫, 橋本 信夫, 小久保彌太郎: PCR 法による猫結膜擦過物および直腸内容物からの *Chlamydia psittaci* の検出, 第117回日本獣医学会(1994, 4).

神崎 政子, 飯田 孝, 小久保彌太郎, 日吉 真紀, 高島 郁夫, 橋本 信夫: Nested PCR-RFLP 法による犬, 猫および鳥の糞便からの *Chlamydia psittaci* の検出, 平成6年度日本獣医公衆衛生学会(1995, 2).

神崎 政子, 飯田 孝, 小久保彌太郎, 藤本 姿裕, 伊藤 典彦, 日吉 真紀, 高島 郁夫, 橋本 信夫: Nested PCR-RFLP 法による猫クラミジア感染症の迅速診断について, 第119回日本獣医学会(1995, 3).

上村 尚: 米に係わるカビ毒の化学分析, 第39回マイコトキシン研究会学術講演会(1994, 8).

上村 尚, 早野 公美, 井部 明広, 田端 節子, 嶋田 照江, 田村 行弘: 農産物中の総臭素含有量, 日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994, 10).

早野 公美, 上村 尚, 井部 明広, 田端 節子, 嶋田 照江, 田村 行弘: 臭化メチルくん蒸後の残留総臭素量, 日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994, 10).

早野 公美, 上村 尚, 井部 明広, 田端 節子, 嶋田 照江, 田村 行弘: アルコール飲料中のカルバミン酸エチルの含有実態及び保管中の挙動, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

牛山 博文, 糠谷 東雄, 寺尾 良保, 杉村 隆, 長尾美奈子, 若林 敬二: 加熱食品中の新規ヘテロサイクリックアミン, 7, 9-DiMeIgQx 及び4'-OH-PhIP, の定量, 第53回日本癌学会総会(1994, 10).

橋本 常生, 宮崎 奉之, 笹本 剛生, 小久保彌太郎, 中澤 裕之: **HPLCによる食肉中のサルブタモールの分析法**, 第68回日本食品衛生学会(1994, 10).

羽石奈穂子, 浜野 朋子, 安田 一郎, 西島 基弘, 秋山 和幸: **医薬品安定性試験の漢方製剤への応用**, 第27回日本薬剤師会学術大会(1994, 11).

小林 麻紀, 永山 敏廣, 塩田 寛子, 伊藤 正子, 田村 康宏, 田村 行弘: **高速液体クロマトグラフィーによるバナナ中ピテルタノールの分析法**, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

永山 敏廣: **農産物中の残留農薬実態**, 第18回農薬残留分析研究会(1994, 9).

新藤 哲也, 廣瀬理恵子, 宮尾 茂雄, 宮村 茜: **佃煮の成分組成から水分活性を求めるための数式の検討**, 日本食品科学工学会第42回大会(1995, 3).

植松 洋子, 鳩岡 友紀, 平田 恵子, 広門 雅子, 安田 和男, 風間 成孔: **食品用香料製剤中の残留溶剤の実態調査**, 日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994, 10).

平田 恵子, 広門 雅子, 植松 洋子, 鳩岡 友紀, 安田 和男, 風間 成孔: **クロロフィル色素製剤中のクロロフィル分解物の実態調査**, 第31回全国衛生化学技術協議会年会(1994, 11).

金子 令子, 渡辺 悠二, 風間 成孔: **SBR/IR(NR)ブレンドゴムの材質鑑別**, 日本食品衛生学会第68回学術講演会(1994, 10).

萩原 輝彦, 西島 基弘: **液体クロマトグラフ/大気圧化学イオン化-質量分析計・定量分析用コロナ放電計**

の至適素材, 日本薬学会第115年会(1995, 3).

早藤知恵子, 友松 俊夫, 窪山 泉, 山下 三雄, 高橋たか子, 宮脇 貞栄, 小菅 和子, 中里 千春: **保健所における骨粗鬆症予防教室~第2報:尿中骨代謝マーカー測定の有有用性~**, 第1回骨ドッグ・健診研究会(1995, 3).

山下 三雄, 高橋たか子, 小菅 和子, 渡辺 泰男, 宮脇 貞栄, 近藤美枝子, 石黒 靖士, 金子 靖子, 窪山 泉, 石田 雅巳, 早藤知恵子, 友松 俊夫, 中里 千春: **保健所における骨粗鬆症予防教室 ~第1報:骨塩量に影響する食生活・生活習慣の解析~**, 第1回骨ドッグ・健診研究会(1995, 3).

早藤知恵子, 友松 俊夫: **骨粗鬆症予防指導への生体試料成績の活用について**, 東京都衛生局学会誌, 93, 174-175(1994, 11).

山下 三雄, 高橋たか子, 渡辺 泰男, 宮脇 貞栄, 石川香代子, 金子 靖子, 井元 四夫, 小菅 和子, 窪山 泉, 石田 雅巳, 早藤知恵子, 友松 俊夫: **骨粗鬆症に影響する因子について**, 東京都衛生局学会誌, 92, 316-317(1994, 5).

萩原 輝彦, 植田 忠彦, 市川 久次, 五十嵐 脩: **生体試料中の all-rac- α -tocopherol 立体異性体分析における APCI/LC/MS SIM 法の検討**, 日本ビタミン学会第46回大会(1994, 6).

Ichikawa, H., Ueda, T., Kiyose, C. and Igarashi, O.: **Distribution and Biliary Excretion of Natural and Unnatural α -Tocopherols**, 7th International Society of Free Radical Research(1994, 11).

平原 文子, 植田 忠彦, 五十嵐 脩, 美濃 真, 門倉 芳枝: **モデル献立から分析法と計算法により求めて**

日本人の多価不飽和脂肪酸摂取量およびE/PUFA比,
日本ビタミン学会第46回大会(1994, 6).

清瀬千佳子, 村松 里穂, 植田 忠彦, 五十嵐 脩:
腸管吸収から見た 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46回大会(1994, 6).

村松 里穂, 清瀬千佳子, 春日 美江, 藤原 葉子,
植田 忠彦, 五十嵐 脩: α -トコフェロール立体異性
体識別の細胞培養系における検討, 日本ビタミン学会第
46回大会(1994, 6).

清瀬千佳子, 村松 里穂, 永川 祐三, 植田 忠彦,
五十嵐 脩: All-*rac*- α -トコフェロール投与時におけ
る健常者の血中 α -トコフェロール立体異性体の変動,
日本ビタミン学会第46回大会(1994, 6).

大山 謙一: 大気汚染物質による肺腫瘍発生に関する
研究(第1報) 粒子状物質による肺腫瘍発生について,
第35回大気汚染学会(1994, 11).

大山 謙一: 大気汚染物質による肺腫瘍発生に関する
研究(第2報) ディーゼル排出ガス粉じん抽出物による
肺腫瘍発生と $\text{NO}_2 \cdot \text{SO}_2$ 暴露の影響について, 第35回大
気汚染学会(1994, 11).

狩野 文雄, 篠原 克明: 空中浮遊ウイルスおよび浮
遊細菌の粒径分布に関する基礎的検討, 日本環境感染学
会(1995, 2).

斉藤 育江, 狩野 文雄: 都内幹線道路周辺の大気浮
遊粉塵の変異原性, 第31回全国衛生化学技術協議会年會
(1994, 11).

吉川 翠: 繊維密度とダニの通過量について, 第53
回日本公衆衛生学会(1994, 10).

河田恵美子, 狩野 文雄: セラミック粉末の変異原性,
第27回化学工学会春季大会(1994, 9).

入江 建久, 吉川 翠, 佐藤 泰仁: 布団乾燥機に
よる生ダニ減少効果, 第53回日本公衆衛生学会(1994,
10).

鈴木 武雄, 氏家 昌行, 吉川 翠: 家屋内塵性ダ
ニ類の走査電子顕微鏡写真作成簡易手法の考察, 日本家
屋害虫学会(1995, 2).

牧野 国義: 幹線道路付近の局所大気汚染に及ぼす気
象要素の影響, 第64回日本衛生学会(1994, 4).

牧野 国義: 大気汚染物質のモニタリングに関する一
考察 健康監視モニタリングについて, 第53回日本公衆
衛生学会(1994, 10).

牧野 国義: 大気汚染物質の個人暴露と屋外濃度につ
いて, 第35回大気汚染学会(1994, 11).

Ohkuni, H., Suzuki, T., Kanoh, T., Kanbayasi, M.,
Todome, Y. and Kimura, Y.: **The adjuvant activity of
pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production
in mice**, The XV international congress of allergology
and clinical Immunology(1994, 6).

鈴木 孝人, 池田 真悟, 大沢 誠喜, 石森 真子,
保坂 幸子, 加納 堯子: マウスのIgE抗体産生にお
けるディーゼル粒子中のアジュバント活性物質の検索,
第35回大気汚染学会(1994, 11).

入江 建久, 佐藤 泰仁, 池田 耕一: 布団乾燥機に
よる生ダニの減少効果(第2報) 住居におけるアレルギー
の制御に関する研究(10), 日本建築学会大会(1994,
9).

大久保智子, 瀬戸 博, 笹野 英雄, 鈴木 重任,
小池 盛雄, 中村 恭二, 川原 穰: 肺に蓄積する黒
色粒子とその健康への影響, 第92回衛生局学会(1994,
5).

瀬戸 博, 大久保智子, 大西 和夫, 鈴木 重任:
粉塵試料中のC₆₀フラーレンの分析法, 第35回大気汚染
学会(1994, 11).

大久保智子, 瀬戸 博, 鈴木 孝人, 大沢 誠喜,
池田 真悟, 大西 和夫, 鈴木 重任: 幹線道路周辺住
民の尿中TBAR調査, 第35回大気汚染学会(1995, 11).

金台 東, 白神 直弘, 海野 肇, 矢野 一好:
活性汚泥プロセスにおけるウイルス除去の動的特性, 化
学工学会つくば大会(1994, 7).

細川奈津子, 中川 順一, 高橋 保雄, 土屋 悦輝:
消毒副生成物の系統分析について, 第31回全国衛生化学
技術協議会年会(1994, 11).

高橋 保雄, 笹野 英雄, 森田 昌敏: ある河川水中
のモニタリング物質の検索及び濃度レベル, 第3回環境
化学討論会(1994, 6).

荻野 周三, 池田 一夫, 竹内 正博, 鈴木 重任:
自動車事故による死亡率分布に関する世代マップを用い
た解析, 交通安全と健康に関する第2回日中シンポジウ
ム(1995, 4).

池田 一夫, 倉科 周介: 地域保健サービスにおける
データベースの活用, 公衆衛生情報研究協議会(1995,
2).

土屋 悦輝: エポキシ樹脂塗料硬化剤の塩素処理によ
る化学変化及び変異原性, 第31回全国衛生化学技術協議

会年会(1994, 11).

土屋 悦輝: HPLCによる環境中の農薬分析, 第96
回液体クロマトグラフィー研究懇話会(1994, 5).

Tsuchiya, Y: **Disinfection of drinking water,**
China-Japan Symposium on disinfection and steriliza-
tion (1994, 5).

Tsuchiya, Y.: **Chlorination by-products of 4,4'-**
methylene dianiline (MDA) and their mutagenicity,
Water Quality International '94(1994, 7).

Tsuchiya, Y. and Watanabe, M.F.: **Identification of**
chlorination by-products from the culture of Mic-
rocystis aeruginosa. Fourth international symposium on
off-flavours in the aquatic environment(1994, 10).

渡辺真利代, 土屋 悦輝, 渡辺 真之: **Microcystis**
aeruginosaの発臭物質と毒素, 日本陸水学会(1994, 9).

渡辺真利代, 土屋 悦輝, 渡辺 真之: **Microcystis**
からの臭気物質, 水処理生物学会(1994, 10).

古畑 勝則: 飲料用タンク水の細菌汚染とその対策,
日本防菌防黴学会第21回年次大会(1994, 5).

古畑 勝則, 高柳 保, 金子 岳夫, 木村 興造,
岡田 誠之, 紀谷 文樹: 給湯水の水質に関する研究
(その2) 水質変化に関する基礎的検討, 平成6年度空
気調和・衛生工学会学術講演会(1994, 10).

古畑 勝則, 松本 淳彦, 小池 和子, 福山 正文,
田淵 清, 平石 明: 塩素耐性 **Methylobacterium**
属細菌の分子系統的多様性, 第10回日本微生物生態学会

(1994, 12).

長井二三子, 牛山 慶子, 佐藤かな子, 加納 いつ:
フェニルヒドロキノンによる8-ヒドロキシデオキシグ
アノシンの *in vitro* での生成, 第67回日本生化学会大会
(1994, 9).

牛山 慶子, 長井二三子, 加納 いつ: “六味丸散
剤”に含まれる地黄によるDNA傷害作用, 第53回日本
癌学会総会(1994, 10).

田中 豊人, 藤谷 知子, 高橋 省, 大石 眞之,
米山 允子: ピペロニルブトキシドの毒性, 3. マウス
およびラットの発生毒性, 第21回日本毒科学会学術年会
(1994, 6).

大石 眞之, 米山 允子, 田中 豊人, 藤谷 知子,
高橋 省: ピペロニルブトキシドの毒性, 1. ラット
における慢性毒性, 第21回日本毒科学会学術年会(1994,
6).

高橋 省, 大石 眞之, 米山 允子, 田中 豊人,
藤谷 知子: ピペロニルブトキシドの毒性, 2. マウス
における慢性毒性, 第21回日本毒科学会学術年会(1994,
6)

中川 好男, 中島 和男, Moldeus, P.: ブチルヒドロ
キシアニソールのラット遊離肝細胞における代謝と毒性,
第9回薬物動態学会(1994, 11)

青木 直人, 菊川 昌幸, 森 真由美, 熊川 寿郎,
平井真希子, 堤 久, 有江由依子: 骨髄異形成症候
群および白血病化状態における骨髄組織中のアポトーシ
スの検索, 第84回日本病理学会総会(1995, 3).

田山 邦昭, 志佐 湊: ラット皮膚における褐色鱗

屑の発現: 系統差・性差・年齢差およびホルモン依存性
について, 第41回日本実験動物学会総会(1994, 5).

辻内 陽子, 東丸 貴信, 河野 浩章, 小俣 政男,
内田 康美, 坂本 義光, 青木 直人: ヘパリンの抗凝
固作用機序に関する研究, 日本循環器学会学術集会
(1995, 3).

酒井 亮二, 須貝 正夫, 荒記 俊一, 小嶋 昭江,
青木 直人, 吹野 恵子, 堀 純子, 大森 正英, 横
山 和仁, 玉城 悟: 過去の食品成分摂取量調査標の
作成とその信頼性および妥当性の検討, 第65回日本衛生
学会(1995, 3).

新井 輝義, 神 真知子, 楠 くみ子, 入倉 善久,
鈴木 敬子, 平田 一郎, 二島太一郎: 食品からのサル
モネラ簡易検査用 Equate Salmonella ELISA キット,
OSRT セットおよび Dynabeads Anti-Salmonella キッ
トの実用性について, 日本食品衛生学会第67回学術講演
会(1994, 5).

神 真知子, 潮田 弘, 楠 くみ子, 新井 輝義,
平田 一郎, 入倉 善久, 鈴木 敬子, 吉田 勲, 片
山佳奈子, 諸角 聖, 二島太一郎, 三浦 平吉, 丸岡
正憲: 輸入冷凍エビの病原ビブリオ汚染, 第15回日本食
品微生物学会学術総会(1994, 11).

山嶋裕季子, 田口 信夫, 竹内 正博, 大西 和夫,
二島太一郎, 山岸 善樹, 鈴木 芳信: 割ばし等から検
出した防ばい剤について, 日本食品衛生学会第67回学術
講演会(1994, 5).

鈴木 俊也, 矢口久美子, 近藤 治美, 二島太一郎:
ゴルフ場におけるテルブカルブ及びその分解物の挙動,
第29回日本水環境学会(1995, 3).

栃本 博: 河川の微量元素汚染指標生物としての水

生昆虫ヒゲナガカワトビケラに関する研究 (第5報) —
ニッケルの指標性—, 日本水環境学会 (1995, 3).

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

佐々木 美枝子 (委員長)	西 島 基 弘
小 室 匠	関 根 大 正
山 田 澄 夫	鈴 木 助 治
宮 崎 奉 之	大 西 和 夫
竹 内 正 博	青 木 直 人
諸 角 聖	

1995年12月 発行

規格表 第 2 類
印刷番号 (7) 471
刊行物番号 (H) 24

東京都立衛生研究所研究年報第46号

編 集 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)