d131e

ISSN 0082−4771

CODEN : TRENAF

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

THE TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

47

1996

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

序

昭和21年衛生局が当時の民生局から独立してから今年はちょうど50周年に当たります．また，都立衛生研究所が，６つの試験検査機関を整理統合して発足したのは昭和24年でしたから，それからでも47年たったことになります．この半世紀の間，公衆衛生の課題はさまざまに変化してきています．大きな流れとしては，急性伝染病から成人病へ，環境汚染も急性毒性物質から微量な慢性毒性物質へと変わって来ています．また，もう伝染病は抗生物質さえあれば怖くない，とついこの間まで思っていたのが，ラッサ，エボラ，エイズ，狂牛病，さらに最近はレジオネラ，クリプトスポリジウム，O157などの新興，再興感染症も身近なものとして出現してきました．そのつど，それらへの対応について，当研究所は，衛生行政を科学的・技術的に支援してまいりました．このように目まぐるしく変わる時代の要請に的確に応えてこられたのは，各職員が予見性，先見性をもって先行的な，しかも現実的な研究を行って来たからです．当研究所のように現実の課題に基づいた調査研究こそ現在もっとも求められているものであり，さまざまな研究機関がその在り方を問い直されようとしているのはまさにその点に問題があったからだと感じています．そして，そのことを可能にしたのは，約１ヶ月間にわたる研究調整会議での研究課題の選定，助言，支援もさることながら，日常業務における信頼性の高い検査データと行政ニーズを常に念頭において，都民の健康の将来を考えて調査研究を続けてきた職員の努力に他なりません．

ここにお届けする研究年報第47号はそのような職員の努力の成果の一部です．しかし研究というものは，熱中すればするほど独りよがりになってしまう傾向があります．その方向性を正すためにも関係各位の客観的，建設的なご助言，ご批判を賜ればと切に願う所以です．

平成８年12月

東京都立衛生研究所長　鈴　木　　重　任

目　　次

報文Ⅰ　感染症等に関する調査研究

東京都内のインフルエンザ検索成績（1995年12月～1996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…… 3

RT-PCR法を用いたウイルス性胃腸炎の検査
……佐々木由紀子，太田　建爾，林　志直，関根　整治
平田　一郎，関根　大正，伊藤　武…… 8

多摩地区におけるヒトからの赤痢菌及びサルモネラの検出状況（1980-1995）
……片山佳奈子，吉田　勲，入倉　善久，鈴木　敬子，平田　一郎
山田　澄夫，田村　行弘…… 15

洋生菓子中における *Salmonella* Enteritidis の生残性と増殖に関する検討
……高橋　由美，野口やよい，楠　淳，伊藤　武…… 21

食肉からのサルモネラの検出と分離菌株の血清型（1983～1995年の13年間の成績）
……平井　昭彦，石崎　直人，金子　誠二，仲真　晶子，小久保彌太郎…… 26

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究（第８報）繁用される漢方薬剤の *Anisakis* 型幼虫に対する運動抑制効果および安中散に含まれる殺虫成分の検索
……鈴木　淳，村田以和夫，安田　一郎…… 35

生薬に含まれる抗HIV作用物質の検索（第２報）抗HIV作用のスクリーニングと蛇床子中のクマリン
……安田　一郎，塩田　寛子，浜野　朋子，瀬戸　隆子，佐藤かな子
大西　和夫，渡辺四男也，田部井由紀子，門間　公夫，貞升　健志
森　功次，関根　大正，高野伊知郎，リークオシオン…… 43

２次元NMR-HMQCによる化粧品中の紫外線吸収剤の微量分析
……小田　陽子，森　謙一郎，中村　義昭，大貫奈穂美
鈴木　助治，中村　弘…… 49

家庭用品の衛生化学的研究（第34報）抗菌・防臭等衛生加工表示された家庭用品中のチアベンダゾール（TBZ）の定量
……観　照雄，岩崎由美子，山野辺秀夫，上原　真一，中村　弘…… 53

家庭用品の衛生化学的研究（第35報）抗菌・防臭加工表示された家庭用品中の金属含有量調査
……山野辺秀夫，岩崎由美子，上原　真一，観　照雄，中村　弘…… 57

家庭用品の衛生化学的研究（第36報）コンタクトレンズケア用品中の防腐剤の調査
……岩崎由美子，山野辺秀夫，上原　真一，観　照雄，中村　弘…… 61

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

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魚介類中ジフェニールエーテル系除草剤の定量
……水石　和子，雨宮　　敬，中村　　弘…… 71

干しえびから検出されたオレンジⅡの確認例
……宮川　弘之，堀井　昭三，井草　京子，笹本　剛生
宮崎　奉之，小久保彌太郎…… 75

ウニ加工品及び生ウニのホウ酸及びアルミニウム含有量調査
……天川　映子，荻原　　勉，斉藤　和夫，藤井　　孝，田村　行弘…… 78

国産チーズの衛生学的品質評価（第２報）
……竹葉　和江，梅木富士郎，仲真　晶子，藤沼　賢司，小久保彌太郎…… 82

発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査（第２報）
……井部　明広，上村　　尚，田端　節子，早野　公美
木村祐起子，友松　俊夫…… 90

輸入洋菓子より検出された tert-Butylhydroquinon について
……木村　圭介，嶋村　保洋，中島　和雄，中沢久美子
菊地　洋子，友松　俊夫…… 95

穀類，豆類及びそれらの加工品中のオクラトキシンＡ，オクラトキシンＢ及びシトリニンの分析
……中里　光男，斉藤　和夫，石川ふさ子，藤沼　賢司
守安　貴子，二島太一郎，田村　行弘，友松　俊夫……100

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第13報）―平成７年度―
……観　　公子，冠　　政光，新藤　哲也，真木　俊夫，友松　俊夫……105

東京都多摩地区で検出されたミネラルウォーターの異物の分析結果
……斉藤　和夫，田口　信夫，大石　充男，天川　映子，荻原　　勉
大橋　則雄，山嶋裕季子，諸角　　聖，藤井　　孝，田村　行弘……113

バイオテクノロジー応用食品の安全性について－ヤマメ及びニジマス－
……新藤　哲也，冠　　政光，観　　公子，橋本　秀樹
真木　俊夫，友松　俊夫……127

野菜・果実類中の残留農薬実態調査－平成７年度－
……小林　麻紀，永山　敏廣，橋本　常生，羽石奈穂子
伊藤　正子，田村　康宏，友松　俊夫……135

輸入農産物中の残留農薬実態調査－平成７年度－
……伊藤　正子，永山　敏廣，小林　麻紀，橋本　常生
羽石奈穂子，田村　康宏，友松　俊夫……141

GPC による食品中残留農薬の迅速分析法
……橋本　常生，永山　敏廣，小林　麻紀，羽石奈穂子
伊藤　正子，田村　康宏，友松　俊夫……148

国内産野菜及び野菜漬物中の残留農業
……大橋　則雄，斉藤　和夫，大石　充男，田口　信夫，荻原　　勉
山嶋裕季子，藤井　　孝，二島太一郎，田村　行弘……156

食品用木製器具中のオルトフェニルフェノール，チアベンダゾール及びジフェニルの分析
……山嶋裕季子，田口　信夫，斉藤　和夫，天川　映子，荻原　　勉
大橋　則雄，大石　充男，藤井　　孝，竹内　正博，大西　和夫
二島太一郎，田村　行弘……164

プラスチック製マグカップ等に封入された保冷剤の鑑別法
……渡辺　悠二……169

食品用天然保存料の品質調査
……広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，貞升　友紀，安野　哲子
伊藤　弘一，安田　和男，鈴木　助治……175

食品用天然増粘安定剤の品質調査
……貞升　友紀，広門　雅子，植松　洋子，平田　恵子
伊藤　弘一，安田　和男，鈴木　助治……182

イオンクロマトグラフィーによる食品用縮合リン酸塩中の正リン酸塩の定量
……安野　哲子，船山　恵市，萩原　輝彦，鈴木　助治……189

水耕栽培野菜および四訂日本食品標準成分表未収載野菜の栄養成分について
……横山　知子，高橋　　巖，坂牧　成恵，牛尾　房雄
植田　忠彦，市川　久次……194

東京都多摩地域の健常女性の骨代謝
―運動習慣の有無による尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン濃度およびカルシウム摂取量の比較―
……早藤知恵子，市川　久次，窪山　　泉，中橋　　猛，高橋たか子
山下　三雄，城所　敏英，長野みさ子，鈴木とし子，江島　有紀
大井　　照，簔輪　眞澄，長谷川　明……198

糖尿病治療食の脂質及びその構成脂肪酸
……坂牧　成恵，菊谷　典久，井口　正雄，市川　久次
加藤　芳美，小宮三紀子，菊地　輝雄……202

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

個人頭髪中の元素含有量（第３報）－水銀について－
……江波戸擧秀，小野塚春吉，中村　　弘……209

尿中カドミウムの測定（第１報）―ゼーマン補正式フレームレス原子吸光法による測定法の検討―
……小野塚春吉，長嶋　親治，大西　和夫，中村　　弘……213

都民の血中，尿中鉛量について－1970年代における年次推移と地域差－
……瀬戸　　博，高橋利恵子，長嶋　親治，藤谷　和正
秋山　和幸，溝口　　勲，野牛　　弘……219

ディーゼルエンジン排気ガスの暴露は，ラットの成長板の病理学的変化を起こし，骨量を減少させる
……渡辺　伸枝，池田　眞悟，大澤　誠喜，土屋　悦輝，鈴木　重任……225

ディーゼル排ガス粒子から抽出した酸性分画タール中の変異原物質の検索
……斎藤　育江，瀬戸　　博，狩野　文雄，土屋　悦輝，鈴木　重任……239

ラットの無麻酔下における換気機能と気道反応性検査の試み－ダブルフロープレチスモグラフ法による解析－
……大澤　誠喜，池田　眞悟，渡辺　伸枝，土屋　悦輝，鈴木　孝人
星野　　誠，沈　　在俊，保坂　公夫，森　　憲二……244

ディーゼル排ガス長期暴露ラットの気管支肺胞洗浄液（BALF）細胞分画変動
……大澤　誠喜，池田　眞悟，渡辺　伸枝，土屋　悦輝，鈴木　孝人
星野　　誠，沈　　在俊，保坂　公夫，藤沢　道夫，森　　憲二……248

ヘッドスペースーガスクロマトグラフィー/質量分析法による2-メチルイソボルオネオール及びジェオスミンの定量
……中川　順一，高橋　保雄，竹内　正博……253

酵素反応による水試料からの大腸菌群の検出
……古畑　勝則，矢野　一好……256

首都圏で採取した環境水からのウイルス分離状況（1985－1995年）
……矢野　一好，古畑　勝則，吉田　靖子，林　　志直，新開　敬行……265

平成７年度多摩地域飲用水の水質検査
……五十嵐　剛，矢口久美子，鈴木　俊也，稲葉美佐子，近藤　治美
潮田　　弘，新井　輝義，神　眞知子，楠　くみ子，石上　　武
山田　澄夫，藤井　　孝，田村　行弘……270

パージ・トラップGC-MS法による地下水中揮発性有機化合物の調査
……矢口久美子，鈴木　俊也，五十嵐　剛，近藤　治美
稲葉美佐子，藤井　　孝，田村　行弘……274

公衆浴場における浴用剤使用の浴槽水の衛生学的研究
……押田　裕子，有賀　孝成，栃本　　博，藤井　　孝，田村　行弘……281

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

マウスを用いたピペロニルブトキシドの2世代毒性試験
……田中　豊人，高橋　　省，大石　眞之……291

イマザリルの雄性ラット肝と腎に及ぼす影響
……中川　好男，田山　邦昭……297

石綿繊維の気管内注入時における肺の電子顕微鏡的観察
……福森　信隆，青木　直人，佐々木美枝子……303

天然食品添加物の Ames 試験における変異原性
……藤田　　博，広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，貞升　友紀
安田　和男，青木　直人……309

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３報）
自己免疫疾患マウス（MRL/l）における腎糸球体病変の病理組織学的検査結果
……坂本　義光，長澤　明道，矢野　範男，湯澤　勝廣
青木　直人，佐々木美枝子……314

全胚培養法を用いた当帰芍薬散のマウス胚子に及ぼす影響
……小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，青木　直人，佐々木美枝子……321

漢方方剤六味丸の長期毒性試験
……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……324

報文Ⅵ　公衆衛生情報に関する調査研究

大気汚染保健対策のための都立病院情報収集システムについて
……牧野　国義……339

新たに実施した中性脂肪，HDL-コレステロールおよびγ-グルタミルトランスフェラーゼの精度管理調査の結果
……大石　向江，伊瀬　　郁，蓑輪　佳子，五十嵐英夫……348

1986年-1995年東京都衛生検査所精度管理調査における酵素活性検査結果
……蓑輪　佳子，大石　向江，伊瀬　　郁，小林　千種，五十嵐英夫
五味　邦英，亀井　幸子，皆川　　彰，河野　均也……355

疾病動向システムによる行政支援
……池田　一夫，上村　　尚，竹内　正博，鈴木　重任……362

＜資料＞衛生研究所からの情報提供
……神谷　信行，荻野　周三，池田　一夫，上村　　尚
竹内　正博，佐々木美枝子……369

＜資料＞インターネットで得られる感染症情報
……池田　一夫，上村　　尚……375

著書及び他誌発表……381

学　会　発　表……391

CONTENTS

REPORTS I PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Prevalence of Influenza in Tokyo (Dec. 1995~Feb. 1996)
..... K. Yamazaki, T. Ito, S. Sekine, Y. Hayashi, Y. Sasaki and H. Sekine 3

Diagnosis of Viral Gastroenteritis by Detecting Viral Genomes with the use of Reverse Transcriptase PCR
..... Y. Sasaki, K. Ohta, Y. Hayasi, S. Sekine I. Hirata, H. Sekine and T. Itoh 8

Detection of *Shigella* and *Salmonella* from Human in Tama of Tokyo (1980-1995)
..... K. Katayama, I. Yoshida, Y. Irikura, K. Suzuki, I. Hirata S. Yamada and Y. Tamura 15

Study on the survival and the growth of *Salmonella* Enteritidis in various fresh cakes.
..... Y. Takahashi, Y. Noguchi, J. Kusunoki and T. Itoh 21

Detection and Serotyping of *Salmonella* from Raw Meat from 1983 to 1995 in Tokyo
..... A. Hirai, N. Ishizaki, S. Kaneko, A. Nakama and Y. Kokubo 26

REPORTS II PAPERS ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Effects of Chinese Medicine for Helminth (VIII)
Inhibitory Effects of Chinese Medicine on Movement of *Anisakis simplex* and Mortal Components in Anchu-san
..... J. Suzuki, I. Murata and I. Yasuda 35

Search for Anti-HIV Principle in Crude Drugs. (Ⅱ)
Screening of Anti-HIV Effect and Coumarin as an Anti-HIV Principle from Fruits of *Cnidium monnieri*
..... I. Yasuda, H. Shioda, T. Hamano, T. Seto, K. Satoh, K. Ohnishi Y. Watanabe, Y. Tabei, K. Monma, K. Sadamasu, K. Mori H. Sekine, I. Takano and K. H. Lee 43

Micro Analysis of Ultraviolet Absorbers in Cosmetics by Two Dimension NMR Spectroscopy-HMQC
..... Y. Oda, K. Mori, Y. Nakamura, N. Ohnuki S. Suzuki and H. Nakamura 49

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIV)
Determination of Thiabendazole for Antimicrobial Agent in Textile Products and Household Necessities
..... T. Kan, Y. Iwasaki, H. Yamanobe, S. Uehara and H. Nakamura 53

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXV)
Survey of Metals on Antimicrobial and Deodorant Agents in Household Necessities
..... H. Yamanobe, Y. Iwasaki, S. Uehara, T. Kan and H Nakamura 57

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXVI)
Study of Antiseptic in Cleaning and Soaking Solution for Contact Lenses
..... Y. Iwasaki, H. Yamanobe, S. Uehara, T. Kan and H. Nakamura 61

REPORTS III PAPERS ON FOOD HYGIENE

Determination of Diphenylether Herbicides in Fish and Shellfish by Gas Chromatography with Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry
..... K. Mizuishi, T. Amemiya and H. Nakamura 71

Confirmation of Orange Ⅱ Detected from Dried Shrimps
..... H. Miyakawa, S. Horii, K. Igusa, T. Sasamoto, T. Miyazaki and Y. Kokubo 75

Contents of Boric Acid and Aluminium in Processed and Raw Sea Urchin Eggs
..... E. Amakawa, T. Ogiwara, K. Saito, T. Fujii and Y. Tamura 78

Estimation of Chemical and Microbiological Quality of Domestic Cheese (Ⅱ)
..... K. Takeba, F. Umeki, A. Nakama, K. Fujinuma and Y. Kokubo 82

Contents of Non-Volatile Amines in Fermented Foods (Ⅱ)
..... A. Ibe, H. Kamimura, S. Tabata, K. Hayano, Y. Kimura and T. Tomomatsu 90

Determination of tert-Butylhydroquinon in Imported Biscuit
..... K. Kimura, Y. Shimamura, K. Nakajima, K. Nakazawa, Y. Kikuchi and T. Tomomatsu 95

Determination of Ochratoxin A, Ochratoxin B and Citrinin in Cereals, Beans and their Products
..... M. Nakazato, K. Saito, F. Ishikawa, K. Fujinuma, T. Moriyasu T. Nishima, Y. Tamura and T. Tomomatsu 100

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toixicants in Tokyo (XⅢ) —1995—
..... K. Kan, M. Kammuri, T. Shindou T. Maki and T. Tomomatsu 105

Investigation of Foreign Matter of Mineralwater Determinated in Tama Area, Tokyo
..... K. Saito, N. Taguchi, M. Oishi, E. Amakawa, T. Ogiwara, N. Ohashi Y. Yamajima, S. Morozumi, T. Fujii and Y. Tamura 113

Safety of Foods Produced by Biotechnology -Yamame and Nijimasu-
..... T. Shindo, M. Kanmuri, K. Kan, H. Hashimoto T. Maki and T. Tomomatsu 127

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits — Apr. 1995~Mar. 1996 —
..... M. Kobayashi, T. Nagayama, T. Hashimoto, N. Haneishi M. Ito, Y. Tamura and T. Tomomatsu 135

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops — Apr. 1995. ~Mar. 1996. —
..... M. Ito, T. Nagayama, M. Kobayashi, T. Hashimoto N. Haneishi, Y. Tamura and T. Tomomatsu 141

A Rapid Analytical Method of Pesticide Residues in Food using Gel Permeation Chromatography
..... T. Hashimoto, T. Nagayama, M. Kobayashi, N. Haneishi M. Ito, Y. Tamura and T. Tomomatsu 148

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Pickles
..... N. Ohashi, K. Saito, M. Oishi, N. Taguchi, T. Ogiwara Y. Yamajima, T. Fujii, T. Nishima and Y. Tamura 156

Determination of *o* -Phenylphenol, Thiabendazole and Diphenyl by High Performance Liquid Chromatography and Survey of Their Contents in Commercial Woodenware
..... Y. Yamajima, N. Taguchi, K. Saito, E. Amakawa, T. Ogiwara N. Ohashi, M. Oishi, T. Fujii, M. Takeuchi K. Ohnishi, T. Nishima and Y. Tamura 164

Identification of Enclosed Coolants in Plastic Products by IR Spectroscopy
..... Y. Watanabe 169

Survey on the Quality of Natural Preservative Used in Food Processing
..... M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu, Y. Sadamasu T. Yasuno, K. Ito, K. Yasuda and S. Suzuki 175

Survey on the Quality of Natural Thickening and Stabilizing Agents Used in Food Processing
..... Y. Sadamasu, M. Hirokado, Y. Uematsu, K. Hirata K. Ito, K. Yasuda and S. Suzuki 182

Determination of Orthophosphates in Condensed Phosphates Used as Food Additives by Ion Chromatography
..... T. Yasuno, K. Funayama, T. Hagiwara and S. Suzuki 189

Studies on Nutritional Components in Hydroponic Vegetables and Unmentioned Ones in STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN (Fourth revised edition)
..... T. Yokoyama, I. Takahashi, N. Sakamaki F. Ushio, T. Ueta and H. Ichikawa 194

Bone Metabolism in Women in Tama Area, Tokyo
— Comparison of Urinary Levels of Pyridinoline, Deoxypyridinoline, and Calcium Intake with or without Habit of Physical Activity —
..... C. Hayafuji, H. Ichikawa, I. Kuboyama, T. Nakahashi, T. Takahashi M. Yamasita, T. Kidokoro, M. Nagano, T. Suzuki, Y. Ejima, T. Oi M. Minowa and A. Hasegawa 198

Studies on Fat Contents and Fatty Acids Composition in Foods for Dietary Therapy of Diabetes
..... N. Sakamaki, N. Kikutani, M. Iguchi, H. Ichikawa Y. Katoh, M. Komiya and T. Kikuchi 202

REPORTS IV PAPERS ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Mercury Content in Private Human Hair (Ⅲ)
..... K. Ebato, H. Onozuka and H. Nakamura 209

Determination of Cadmium in Normal Human Urine (Ⅰ)
— Study by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method with Zeeman Background Correction —
..... H. Onozuka, C. Nagashima, K. Ohnishi and H. Nakamura 213

Lead Contents of Blood and Urine Sampled from the Residents in Tokyo Metropolitan Area
— Chronological Changes in the 1970s and Regional Differences —
..... H. Seto, R. Takahashi, C. Nagashima, K. Fujitani K. Akiyama, I. Mizoguchi and H. Yagyuu 219

Inhalation of Diesel Engine Exhaust Causes Pathological Changes of Growth Plates and Decreases Bone Mineral Contents in Rats
..... N. Watanabe, S. Ikeda, M. Ohsawa,Y. Tsuchiya and S. Suzuki 225

Identification of Mutagens in the Acidic Fraction of the Tar Extracted from Diesel Particulate Matter.
..... I. Saito, H. Seto, F. Kanoh Y. Tsuchiya and S. Suzuki 239

Breath-by-breath Measurement of Ventilatory Valuables and Airway
Reactivity in Unanaesthetized Rats by Using Double Flow Plethysmograhy
..... M. Ohsawa, S. Ikeda, N. Watanabe, Y. Tsuchiya
T. Suzuki, M. Hoshino, S. Zaishun, K. Hosaka
and K. Mori 244

Changes of Total Cells and Fractions of Broncho-Alveoar-Lavage-Fluid of Rats Exposed to
Diesel Engine Exhausts for 12 and 24 Months
..... M. Ohsawa, S. Ikeda, N. Watanabe, Y. Tsuchiya, T. Suzuki
M. Hoshino, S. Zaishun, K. Hosaka, M. Fujisawa
and K. Mori 248

Determination of 2-Methylisoborneol and Geosmin by Head Space Gas Chromatography/Mass Spectrometry
..... J. Nakagawa, Y. Takahashi and M. Takeuchi 253

Detection of Coliform Group from Water Samples by Enzyme System
..... K. Furuhata and K. Yano 256

Detection of Enteroviruses from Environmental Water Samples in Tokyo Metropolitan Area (1985-1995)
..... K. Yano, K. Furuhata, Y. Yoshida, Y. Hayashi and T. Shinkai 265

Evaluation of Drinking-Water Quality in Tama District, Tokyo — April 1995～March 1996 —
..... T. Igarashi, K. Yaguchi, T. Suzuki, M. Inaba, H. Kondo, H. Ushioda, T. Arai, M. Jin
K. Kusunoki, T. Ishikami, S. Yamada, T. Fujii and Y. Tamura 270

Survey on the Contamination with Volatile Organic Compounds in Groundwater by Gas Chromatography
— Mass Spectrometry with Purge and Trap Concentrator
..... K. Yaguchi, T. Suzuki, T. Igarashi, H. Kondo, M. Inaba, T. Fujii
and Y. Tamura 274

Survey of Water Quality Associated with Bath Preparations in Public Baths
..... H. Oshida, T. Ariga, H. Tochimoto, T. Fujii and Y. Tamura 281

REPORTS V PAPERS ON TOXICOLOGY

Reproductive and Neurobehavioural Toxicity Study of Piperonyl Butoxide Administered to Mice
..... T. Tanaka, O. Takahashi and S. Oishi 291

Effects of Imazalil on Liver and Kidney in Male F 344 Rats
..... Y. Nakagawa and K. Tayama 297

Electron Microscopic Observations of Asbestos Fibers in the Rat Lung after Intratracheal Instillation
..... N. Fukumori, N. Aoki and M. Sasaki 303

Mutagenicity of Natural Food Additives in the Ames *Salmonella*/Microsome Test
..... H. Fujita, M. Hirokado, K. Hirata, Y. Uematsu, Y. Sadamasu
K. Yasuda and N. Aoki 309

Study on the Effect of Rokumi-gan using Expermental Model Mice for Human Disease (Ⅲ)
Histological Finding in Renal Glomerular Lesions in Autoimmune MRL/1pr Mice
..... Y. Sakamoto, A. Nagasawa, N. Yano
K. Yuzawa, N. Aoki and M. Sasaki 314

Effects of Tokishakuyaku-san on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method
..... A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, N. Aoki and M. Sasaki 321

Toxicity Testing of Rokumi-gan in Rats by Dietary Administration for 30 Months
..... T. Fujii, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, Y. Tada,
N. Fukumori, T. Ikeda, H. Takahashi, Y. Sakamoto and M. Sasaki 324

REPORTS VI PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION

Information Systems Gathered from Metropolitan Hospitals for Health Measures to Air Pollution
..... K. Makino 339

A Report on External Quality Assessment for Triglyceride, HDL-cholesterol and γ-Glutamyltransferase
..... H. Oishi, I. Ise, K. Minowa and H. Igarashi 348

External Quality Control at the Registered Independent Clinical Laboratories in Tokyo for Enzyme Activity Tests from 1986 to 1995
..... K. Minowa, H. Oishi, I. Ise, C. Kobayashi, H. Igarashi, K. Gomi
S. Kamei, A. Minagawa and K. Kawano 355

Public Administration Support System using Structured Database System of Diseases
..... K. Ikeda, H. Kamimura, M. Takeuchi and S. Suzuki 362

<Information>World Wide Web (WWW) Server on tokyo-eiken. go. jp
..... N. Kamiya, S. Ogino, H. Kamimura, M. Takeuchi and M. Sasaki 369

<Information>How to get Information about Infectious Diseases using Internet
..... K. Ikeda and H. Kamimura 375

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 381

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 391

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

医学の進歩や衛生環境の整備によってわが国における赤痢，チフス，ジフテリアなどの伝染病の発生は激減し，制圧されたかに見えた．しかし，エイズなどの性行為感染症，MRSAなどによる院内感染症，弱毒菌による日和見感染症は漸増傾向にあり，細菌性食中毒の発生頻度も鶏卵を原因とするサルモネラ食中毒の急増によりむしろ増加の傾向を見せている．特に本年は，国内において学校給食や仕出し弁当などを原因食とする病原大腸菌O157による極めて大規模な食中毒の多発，飲料水を介した原虫・クリプトスポリジウムによる下痢症の大規模発生がそれぞれ報告され，深刻な社会問題となった．これらの問題については現在活発に試験・研究が行われており，その成果の発表は次巻を待たなければならない．

本章には感染症に関する５編の論文が掲載されている．これらの５編はいずれも疫学調査結果により得られた知見を著したもので，この中にはインフルエンザウイルス，胃腸炎起病性ウイルス，腸管系伝染病菌に関する論文に加え，細菌性食中毒起因菌に関する論文２編が含まれる．

東京都内で1995年12月から1996年２月に発生したインフルエンザ様疾患の集団例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29事例のうち，AH-３型ウイルスによる事例が15集団，AH-１型ウイルスによるものが10集団確認された．また，２集団においてはインフルエンザウイルスは検出されなかったものの，患者血清にAH-１型ならびにAH-３型ウイルスに対する抗体価の有為上昇が認められ，両型による重複感染をうかがわせた．今期分離されたAH-３型ウイルスは発育鶏卵法により分離できたが，ニワトリ赤血球に対する凝集能は昨年同様に低く不安定であった．

胃腸炎起病性ウイルスとして小型球形ウイルス(SRSV)，ロタウイスルス，アデノウイルス40/41などが知られている．これらのウイルスによる感染性胃腸炎は内科及び小児科領域において極めてありふれた疾患であり，簡便で迅速な病原体検索法が求められている．ロタウイスルスやアデノウイルス40/41の検出にはウイルス特異的蛋白を標的とした酵素抗体法が，SRSVの検出にはウイルス遺伝子を標的として逆転写酵素反応とポリメラーゼ連鎖反応を組み合わせた検査法(RT-PCR)がすでに開発されている．今回，多摩地区，世田谷地区及び北関東地区の散発性の急性胃腸炎患者の糞便と嘔吐物を対象にこれらの迅速検査法を用いて原因ウイルスの検索を行った．検査した234例の患者便の68％に当たる160例，嘔吐物18例中の17例においてSRSVに特異的なRT-PCR産物が検出され，1995年10月から12月の間に調査地区でSRSVの流行したことが推察された．この結果から，RT-PCR法がウイルス性胃腸炎の診断に有効であることが示唆された．

腸管感染症の様相は1970年を境として，いわゆる「海外旅行者下痢症」の影響により大きく変化してきた．本論文は1980年から1995年の16年間に多摩地区で実施した保菌者検索事業における赤痢菌，チフス菌及びサルモネラの検査成績をまとめたものである．検査材料の糞便2,049,175件の大部分は食品取扱い業者糞便で，その他赤痢集団発生関係者，一般健康診断，海外渡航者の糞便も含まれている．赤痢菌は230件(0.011％)から検出され，その内訳は海外旅行に由来するもの26件，国内例204件で，国内感染例のうち保菌者として確認されたものは７件，集団由来124件，残り73件は赤痢患者報告後の関係者検便によって検出されたものである．チフス，パラチフスを含むサルモネラの総陽性数は1,121件(0.05％)で，そのうち伝染病菌であるチフス菌は21例，パラチフス菌は1例認められた．また，その他のサルモネラのうち検出頻度の高い血清型は年ごとに変遷がみられ，1993以降は*S.* Enteritidisが１位を占め，近年急増した本菌による食中毒との密接な関連が示唆された．

近年，わが国おいても*Salmonella* Enteritidisに汚染された鶏卵に起因する食中毒が多発している．東京都においても1989～1994年の５年間に汚染鶏卵を使用した洋生菓子が原因で３件の食中毒が発生し，その１例はレアチズ

ケーキ及び加熱加工品の抹茶ケーキによるものであった．そこで，洋菓子を原因とする食中毒の予防対策を講ずる目的で，*S.* Enteritidisを実験的に接種した材料を用いて実際に抹茶ケーキ及びレアチーズケーキを作成し，製造時の加熱条件と製造後の低温保管時における菌の挙動を調べた．その結果，本菌による食中毒の防止には，「中心温度75℃で5分以上加熱すること」，「原材料の卵白は割り置いたものを使用しないこと」，「商品を保存する冷蔵設備の温度は常に10℃以下にする」の措置を講ずる必要のあることが明かとなった．

また，近年のサルモネラ食中毒の急増が鶏卵を主原料とした食品に起因することは前述の通りであるが，食肉が関係した食中毒事件も依然として頻発している．そこで，食肉のサルモネラ汚染実態を明らかにする目的で1983～1995年の13年間にわたって主に都内の食肉処理業者から採取した鶏肉，豚肉及び牛肉2,979検体について調査を実施した．サルモネラは358件(12.0%)から検出され，その内訳は鶏肉280件，豚肉70件，牛肉8件であった．鶏肉からの検出率は年々増加傾向を，豚肉及び牛肉からの検出率は減少傾向を示している．これらの分離株はサルモネラ亜種Ⅰの261株と亜種Ⅱの97株に分けられ，亜種Ⅰは38の血清型に分類された．また，近年サルモネラ食中毒の起因菌として問題となっている*S.* Enteritidisは1995年に鶏肉から初めて検出された．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 3-7, 1996

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1995年12月～1996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. 1995～Feb. 1996)

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

近年におけるインフルエンザの流行では，AH１型ウイルス及びAH３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[1-4]．

例年，東京都においても冬季になるとインフルエンザによる集団かぜが発生し，学級閉鎖等の措置がとられている．

1993～1994年及び1994～1995年の流行期には全国的にAH３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．同時期都内における集団かぜ流行の病因も主にAH３型ウイルスによるものであった[5-6]．

本報では，1995年12月から1996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　1995年12月上旬から1996年２月下旬までの間に，集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小，中学校及び幼稚園の計29集団117名（１集団２～５名）の罹患児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117例について，既報[4]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（１検体につき５～６個）から漿尿液及び羊水を採取し，それぞれに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(－)のもの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赤血球凝集抑制試験(以下ＨＩ試験と略す)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上清を接種し，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ＨＩ試験の２法を行った．

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

ＡＨ１型：A/ 山　形 / 32 /89
A/ 東　京 / 983/95
ＡＨ３型：A/ 北九州 / 159/93
A/ 東　京 / 951/95

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

B 型：B/三 重/1/93

なお，A／東京/983/95及びA／東京/951/95は今冬期，1995年12月上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べ4倍以上に上昇したものを有意上昇とみなした．なお，血清学的試験は本文中に示した，図1並びに図2の検査術式に従って実施した．

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，1995年12月に8集団，1996年1月に16集団，2月に5集団の合計29集団例であった．これら患者材料について，ウイルス分離試験並びに血清学的試験を行い，その病因検索状況を表1に示した．ウイルス分離試験の結果，6集団例(患者29名中10名)からインフルエンザAH1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，AH1型ウイルスによる感染と診断された集団例が4例(1995年12月中旬2集団，1996年1月中旬2集団)認められ，AH1型ウイルスによる事例は合計10集団例が確認された．また，AH3型ウイルスによる事例は合計15集団例で，このうち9集団例(患者32名中16名)からインフルエンザAH3型ウイルスを分離した．この他，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は6例(1995年12月中旬1集団，1996年1月中旬1集団，下旬3集団，2月上旬1集団)認められた．また，1996年1月下旬に搬入された2集団例(患者3名中1名・3名中3名に)ではインフルエンザウイルスは分離されなかったものの血清学的に同一患者の血清中にAH1型並びにAH3型ウイルスに対するHI抗体価の有意上昇が同時に認められ，1992～1993年のインフルエンザ流行期に見られたような(AH3型とB型)[7]重複感染をうかがわせた．なお，今季AH1型ウイルス感染による事例と診断された集団例の中にも同時期にAH3型ウイルスに感染を受けたと推定される患者が複数例存在していたことが認められた．また，1996年2月上旬の2集団例は検索の結果AH3型ウイルス感染による事例と診断されたが，そのうち1事例では患者5名中1名に，AH1型ウイル

マイクロタイター法

被検血清をREDにて
必要量4倍希釈
↓
37℃ Over night
↓
56℃30分非働化
↓
赤血球凝集素の除去 ← 生理食塩水で4回遠心器で洗う (2,000rpm 5分)
各々にモルモット赤血球
(30μl)滴下かく拌
↓
氷中に60分放置
(途中赤血球を再浮遊させる)
↓
赤血球の除去
遠心(3,000rpm 5分)
↓
上清2倍階段希釈
↓
至適抗原滴下(25μl)混和
↓
室温60分放置
↓
0.6%モルモット赤血球浮遊液滴下
(50μl)かく拌，4℃90分静置
↓
判 定

モルモット保存血を必要量
脱脂綿でロ過する
↓

図1．インフルエンザ，パラインフルエンザ血清試験術式

マイクロタイター法

被検血清・陽性血清を GVBS (Gelatin-Veronal 緩衝液) にて8倍希釈
↓
56℃30分非働化
↓
2倍段階希釈
↓
至適抗原滴下 (25μl)混和
↓
5 CH_{50}/50μl調整
補体50μl滴下，混和
↓
湿潤容器に入れ密閉
4℃ Over night
↓
室温30分放置，感作血球 50μl滴下，37℃80分混和
↓
遠心(1,500rpm 5分)
↓
判　定

感作血球液の作成
↓
市販緬羊保存血を必要量脱脂綿でロ過する
↓
遠心(2,500rpm 5分)
GVBS で4回
↓
①1.7%血球浮遊液作成
↓
②1,500倍溶血素液作成
(市販溶血素使用)
↓
①と②を等量混和(充分に)
室温60分放置，4℃ Over night
↓
室温30分放置後使用 ←

図2．インフルエンザ，アデノウイルスＣＦ試験術式

表1．1995～1996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			不明
		AH 1 型	AH 3 型	AH 1 型＋AH 3 型	
1995．12上	4	3	1		
中	4	2(2)	1(1)		1
1996．1中	6	4(2)	2(1)		
下	10	1	7(3)	2(2)	
．2上	2		2(1)		
中	1		1		
下	2		1		1
計	29	10(4)	15(6)	2(2)	2

( ) 内は血清学的試験による確認診断陽性数再掲

ス抗原に対してのみ8倍のＨＩ抗体価の有意上昇を認め，AH 1 型及びAH 3 型ウイルスの混在流行を確認した．しかし，1995年12月中旬の1例及び1996年2月下旬の1例は，病因を明らかにすることができなかった．

以上の結果からインフルエンザウイルスによる事例は29集団例中合計27集団例で，このうちAH 1 型ウイルスによるもの10事例，AH 3 型ウイルスによる集団例は15事例，その他，インフルエンザAH 1 型及びAH 3 型ウイルスの混合感染によるもの2事例であった．

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AH 1 型あるいはAH 3 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/山形/32/89，A/北九州/159/93及び今期分離ウイルス株：A/東京/983/95，A/東京/951/95のいずれかの抗原株に対してのみ4倍から128倍の抗体価の有意上昇が認められた．

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

A／東京／983／95（AH1）

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
急性期	<1*				1	1							2
	2												
	3											1	1
	4										1		1
	5										2	1	3
	6												
	7												
	8												
計					1	1					3	2	7

A／北九州／159／93(AH3)

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
急性期	<1*												
	2									1			1
	3									2			2
	4								1		1	1	3
	5								2	2	1	2	7
	6										1	1	2
	7												
	8												
計									3	5	3	4	15

A／東京／951／95（AH3）

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
急性期	<1*												
	2										1		1
	3										3		3
	4									2	1	3	6
	5											2	2
	6										1	1	2
	7												
	8											1	
計										2	6	7	15

B／三重／1／93

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
急性期	<1*	4											4
	2		1										1
	3			4									4
	4				8								8
	5					2							2
	6						3						3
	7												
	8												
計		4	1	4	8	2	3						22

＊：8×2^{n}（抗体価）　＋：例数

他方，インフルエンザウイルスの分離試験にあたっては，発育鶏卵培養法と細胞継代培養法の２法を行っている．過去，1987～88年の流行期から前期1994～95年の流行期までの発育鶏卵法におけるAH３型ウイルス分離株数は年々低下し，前季の流行期には皆無となった事を前年度に報告したが[6]，今流行期は，同ウイルスによる15事例のうち４事例からそれぞれ１株づつAH３型ウイルスが発育鶏卵法によって分離された．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を用いてきたが，数年前から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不安定なために，その判定には従来から使用してきたニワトリ赤血球からモルモット赤血球に切り替えざるを得なかったことも前年度に報告した．

今流行期のAH３型ウイルスは発育鶏卵法によって分離することはできたが，ニワトリ赤血球に対する凝集能の不安定性は変わることがなかった．これらの特徴から最近の流行ウイルスは，それ以前に流行した同型ウイルスと生物学的性状を多少異にしている可能性が示唆された．

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26,234人，学級閉鎖数は983校，前期の流行期には前者は60,572人，後者では2,316校であり，届出患者数及び学級閉鎖数から流行の規模は前期に比べ小さなものであったことをうかがわせた．

以上のごとく東京都における今冬季の集団かぜは，1995年12月～1996年1月下旬まではインフルエンザAH1型ウイルスとAH3型ウイルスによる混在流行であった．その後，2月下旬までAH3型ウイルスによる単独流行と推測された．しかし，前述した2月上旬の事例に見られたような事から，おそらくAH1型ウイルスも散発的に流行していたことが推察された．なお，今冬季都内においてB型ウイルスによる集団事例は1例も認められなかった．

一方，厚生省の調査によるインフルエンザの初発例は11月下旬，神戸市内の小学校における集団かぜ患者からAH1型ウイルス検出，12月には東京都(集団)並びに高知県(定点)からAH3型ウイルス検出の報告がそれぞれなされた．以後，1996年1月中旬までに，40都道府県でAH1型ウイルスが確認された．

また，AH3型ウイルス検出の報告は定点観測例及び散発例[7]によるもので，集団例ではわずか6都県における事例にとどまった[8]．なお，今期B型ウイルスによる集団事例は1996年2月下旬長崎県の1事例で，その他に1996年1月と3月に大阪市の定点，仙台市の散発例からそれぞれ同ウイルスの分離報告例があった．これらのことから今期B型ウイルスによる流行はなかったものと推察された[7]．

以上のことから，全国的なインフルエンザの流行は1995年12月上旬からAH1型ウイルスによる流行が始まり，それにAH3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186,891人で，前年度(832,486人)の1/4となり，流行の規模は小さなものであったことをうかがわせた[7]．

ちなみに全国でのウイルス分離株数はAH1型3589株，AH3型284株，B型4株の計3877株であった[8]．

文　献

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

2）山崎　清，伊藤忠彦，関根整治，他：東京衛研年報，**42**，1-4，1991

3）山崎　清，伊藤忠彦，関根大正：東京衛研年報，**43**，8-11，1992

4）山崎　清，伊藤忠彦，関根大正：東京衛研年報，**44**，25-28，1993

5）山崎　清，伊藤忠彦，関根大正：東京衛研年報，**45**，19-22，1994

6）山崎　清，伊藤忠彦，関根整治，他：東京衛研年報，**46**，33-36，1995

7）国立予防衛生研究所内WHOインフルエンザ・呼吸器ウイルス協力センター：95/96インフルエンザシーズン流行情報①，⑧

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)，1996

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 8-14, 1996

RT-PCR法を用いたウイルス性胃腸炎の検査

佐々木 由紀子*, 太 田 建 爾***, 林 志 直**, 関 根 整 治*
平 田 一 郎*, 関 根 大 正*, 伊 藤 武***

Diagnosis of Viral Gastroenteritis by Detecting Viral Genomes with the use of Reverse Transcriptase PCR

YUKIKO SASAKI*, KENJI OHTA***, YUKINAO HAYASI**, SEIJI SEKINE*
ICHIROH HIRATA*, HIROMASA SEKINE* and TAKESHI ITOH***

Small round structured viruses (SRSV), rotavirus and adenoviruses type 40 and 41 have been established as causative agents of gastroenteritis. Enzyme Linked immuno sorbent Assay (ELISA) has been used in order to detect the antigens of rotavirus and adenovirus type 40 and 41. An new method, polymerase chain reaction (PCR) following reverse transcription (RT) has been developed to detect of viral genomes of SRSV.

Stool and vomitus samples from patients in sporadic cases of acute gasteroenteritis from the TAMA, SETAGAYA-KU and North-KANTHO regions were tested for viral pathogens. Of 234 stool specimens examined, 160 (68%) gave RT-PCR products specific for SRSVs. And of 18 vomitus specimens from each patients, 17 gave the products.

These results suggest that the RT-PCR is a very efficient method for the diagnosis of the viral acute gastroenteritis and that that there was epidemic infection of SRSV at these regions in the October-December, 1995.

keywords：ウイルス性胃腸炎 Viral gastroenteritis, PCR法 PCR method, 小型球型ウイルス Small round structured virus (SRSV), ロタウイルス Rotavirus, アデノウイルス40／41 Adenovirus 40/41 (AD40/41)

緒　　言

感染性胃腸炎の病因は大きく細菌性とウイルス性に分けられる．このうち，ウイルスに起因する下痢症あるいは胃腸炎については，1945年代の患者便を用いた感染性確認実験[1]，1970年代の電子顕微鏡による直接的検索[2]などにより，ウイルスが感染性胃腸炎を引き起こすことが明らかにされた．

現在までに，ノーウオークウイルス(Norwalk virus：NV)，ロタウイルス，F群アデノウイルス(AD40／41)，アストロウイルス，カリシウイルス，エンテロウイルスなどの小型の球型ウイルスが，腸管に感染して障害を起こすことが確認されている．Table 1に胃腸炎を引き起こすと考えられているウイルスをあげた．

これらのウイルスの検査は，A群ロタウイルスとAD40／41の酵素抗体法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay：ELISA)で抗原検出キットが市販されているだけで，細胞培養や電子顕微鏡の施設を持たない一般の検査室では胃腸炎ウイルスの検査はできないのが実状である．また，従来のウイルス検査法の定法である培養細胞によるウイルス増殖および分離・同定は，多くの胃腸炎ウイルスでは困難で，エンテロウイルスの一部，ロタウイルス，アストロウイルスなどでしか成功していない．

*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３－２－１
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3chome 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

Table 1. Possibled Causative Viruses of Gastroenteritis[13]*
(胃腸炎症状を引き起こす可能性のあるウイルス)

ウイルス	主な症状	診断法**
ロタウイルス(A, B, C)	嘔吐下痢症	ELISA,EM,PCR
アデノウイルス(F群)	嘔吐下痢症	ELISA,EM,PCR
ノーウォークウイルス群	嘔吐下痢症	EM,PCR,
カリシウイルス群	嘔吐下痢症	EM,PCR,
スノーマウンテンウイルス群	嘔吐下痢症	EM,PCR,
アストロウイルス	嘔吐下痢症	EM,PCR,
アデノウイルス(A～E群)	呼吸器症状	Cell,ELISA,PCR
エンテロウイルス	呼吸器症状	HI,Cell,PCR
ライノウイルス	呼吸器症状	ELISA,PCR
インフルエンザウイルス	呼吸器症状	HI,PCR,Cell
パルボウイルス	伝染性紅斑	ELISA,PCR
肝炎ウイルス	肝炎	ELISA,PCR
サイトメガロウイルス	全身症状	ELISA,PCR,Cell
ヒトヘルペスウイルス6.7	突発性発疹	CF,PCR,Cell
ブレダウイルス	下痢症	EM
コロナウイルス	下痢症	EM,PCR
ウシ下痢ウイルス	下痢症	EM,Cell,PCR

*：文献13) より追加して引用
**：ELISA：酵素抗体法、EM：電子顕微鏡観察、PCR：遺伝子増幅法
Cell：培養細胞を用いた分離、HI：血球凝集阻止法、CF：補体結合法

感染性胃腸炎は，内科，小児科領域にとって極めてありふれた疾患であり，簡便で迅速な病原体の検査法が求められている．本稿では，逆転写酵素反応(Reverse Transcriptase Reaction：RT)とポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction：PCR)を組み合わせたRT-PCR法を用いた胃腸炎ウイルスの検査法について検討し，多摩地区，世田谷区ならびに北関東地区における胃腸炎例について調査した結果を報告する．

材料および方法

1．検査対象 多摩地区の感染症サーベイランス定点病院，および都立衛生研究所が定点観測を実施した北関東地区と世田谷地区の2小児科医院を受診した急性胃腸炎患者由来検体を対象とした(Table 2)．なお，多摩地区の場合は細菌性の胃腸炎患者由来検体も含めて対象としたが，北関東地区と世田谷地区の2小児科医院については，ウイルス性疾患が疑われる乳幼児および小児の急性胃腸炎患者の検体のみを対象とした．臨床症状のまとめは，検査依頼票に記載された定点病院の臨床観察をもとに行った．

2．検査材料 ウイルス検査は，胃腸炎患者の糞便にPBS(－)を加えて，10%乳剤液を調製した後，有機溶剤と遠心法で粗精製した画分を用いた(Fig. 1)．嘔吐物は固形物を除いた後，そのまま有機溶剤と遠心法で調製した．

3．RT-PCR法 粗精製画分1 mlからのRNA調製をFig. 1に示した．胃腸炎ウイルスのRNA調製には，SDS，プロテイネースKの他にCTAB (Cetyl-trimetyl-ammonium-bromide：Sigma)を用いた．PCR用のプライマーはTable 3とFig. 2に示した．

RT-PCR法は既報[3]による方法で反応液を調製した．すなわち，SRSVのRT-PCR法は，200 μM-dNTPs(ファルマシア)，0. 15 μM下流プライマー(NV35)，6単位AMV逆転写酵素(東洋紡)，及び40単位RNA分解酵素阻害酵素(東洋紡)を含む逆転写酵素用緩衝液25 μlに，調製したRNAを5 μl加え，42℃，1時間の逆転写反応でcDNAを合成した．次に2単位のTaqポリメラーゼ，0. 15 μM上流プライマーを加え，Jiangらの方法[4]にしたがい，94℃ 1分，55℃ 1分10秒，72℃ 1分30秒のサイクルを40回行い，1段階目のPCR産物(470base pair：470bp)を得た．2段階目のPCR反応は，1段階目のPCR産物3

Table 2. Outline of Specimen

Specimen Source	Target Virus	Method*	Specimen Number		
			TAMA	Two-clinics	total
STOOL	SRSV	PCR	133	101	234
	ROTA AD40/41 ENTERO	ELISA ELISA CULTURE	246	101	347
VOMITUS	SRSV	PCR	−	18	18

*PCR : Polymerase Chain Reaction, ELISA:Enzyme linked immunosorbent assay, CULTURE : Isolation using cultured cell

stool suspension (10%)
↓ Fluorcarbon* extraction
↓ 2,500rpm, 10min. 4℃
↓ 6,000rpm, 30min. 4℃
sup
↓ Polyethylene glycol 6000 (final 8%)
↓ NaCl (final 0.4M)
↓ stand at 4℃, overnight
↓ 12,000rpm, 30min. 4℃
ppt
↓ d-H_2O
↓ Proteinase K digestion, 1hr. 37℃
↓ CTAB (final 5%), NaCl (final 0.4M)
↓ 30min. 56℃
↓ phenol-chloroform extraction
↓ NaOAc (final 0.3M)
↓ Glycogen 1 μl
↓ Isopropanol precipitation
RNA

*Fluorocarbon : 1,2,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane

Fig.1. CTAB Method Used to Extract RNA

μlに，内側の塩基配列を認識するプライマーペアー(NV 3とNV51，あるいはNV81とNV/SM82の2種類)を加え，PCR産物の確認は2％アガロースゲル中で電気泳動後，エチジウムブロマイド染色により行なった．

4．ELISA法 ロタウイルスとF群アデノウイルス(AD40/41)のELISA法による検査は，市販のキット(トーレ・フジバイオニクス)を用いて添付説明書に従って行った．

5．培養細胞によるウイルス分離 エンテロウイルス，アデノウイルス(F群を除く)については，HEp 2細胞，BGM細胞およびRD-18細胞を用いてウイルス分離試験を行った．

結　　果

1．多摩地区検体の調査結果 1995年4月より1996年4月までの，多摩地区の感染症サーベイランス定点病院より依頼された，急性胃腸炎患者の原因ウイルスの検出状況をTable 4に示した．この期間の患者の年齢構成は0

Table 3. Sequences of Primers Used for RT-PCR

Primer name	Target virus	Polarity	Primer Sequence (5′→3′)
NV36	Norwalk-like SRSV	+	ATAAAAGTTGGCATGAACA
NV35	Norwalk-like SRSV	−	CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT
NV3	Norwalk-like SRSV	+	GCACCATATGAGATGGATGT
NV51	Norwalk-like SRSV	−	GTTGACACAATCTCATCATC
NV81	Norwalk-like SRSV	−	ACAATCTCATCATCACCATA
NV82	Norwalk-like SRSV	+	TCATTTTGATGCAGATTA
SM82	Norwalk-like SRSV	+	CCACTATGATGCAGATTA
EV1	Enterrovirus	−	CACCGGATGGCCAATCCA
EV2	Enterrovirus	+	TCCGGCCCCTGAATG
A5	Astrovirus	+	TCACCAATGGAAGGCGGCTT
A6	Astrovirus	−	GGAGTGATTCAAGATCAGGT

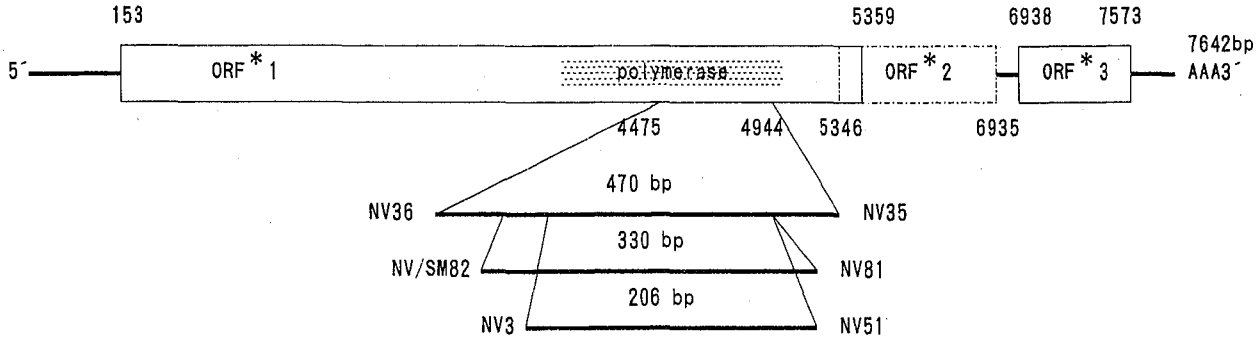


Fig. 2. Schematic Representation of Polymerase Region and Primer Component[8)]
ORF＊：Open Reading Frame

～2歳では52%，3～19歳が17%，20～60歳が26%であった．年齢別にウイルス検出状況をみると(Table 5)，0～2歳では46%にウイルスが検出され，全年齢では35%にウイルスが検出された．

PCR法は，充分な材料が得られた133例のみについて検査した．SRSVのPCR法は，1段階目のPCR反応はNV35とNV36，2段階目のPCR反応はNV81とNV/SM82のプライマーペアーを用いた．検査総数133例の47%に当たる63例がSRSVのRT-PCRで陽性となった．なお，AD40/41とSRSVが同時に検出された例が4例あった．アストロウイルスおよびエンテロウイルスのRT-PCRの結果では陽性例はなかった．

ウイルス検出状況を月別にみると，ロタウイルスは1月から3月にかけて集中していた(59%)．SRSVは11月にもっとも多く検出され(29%)，AD40/41は8月と11月に検出された．

検査依頼票に記載された臨床観察をもとに，各ウイルス別の臨床症状の特徴をTable 6に示した．発熱はロタウイルスとAD40/41に顕著で，特にAD40/41では初発症状として，38℃を越える発熱が観察されていた．下痢は全例に観察されており，嘔吐はロタウイルスにやや多く観察されていた．

2．世田谷地区と北関東地区の検体の調査結果　世田谷地区と北関東地区の2小児科医院については，ウイルス

Table 4．Detection of Viruses from Patients with Gstroenteritis

Sample		SRSV (+)	AD40/41 (+)	ROTA (+)	ENTERO (+)
STOOL	*TAMA Region*	63/133 (47.4%)	4/246 (1.6%)	27/246 (11.0%)	2/246 (0.8%)
	Two Pediatric Clinics	97/101 (96.0%)	3/101 (2.9%)	0/101	0/101
	total	160/234 (68.4%)	7/347 (2.0%)	27/347 (7.8%)	2/347 (0.6%)
VOMITUS	*Two Pediatric Clinics*	17/18 (94.4%)	—	—	—

Table 5．Age Distribution of Gastroenteritis with Virus Detection

Age years	total	SRSV	ROTA	AD40/41	VIRUS(+)
0－2y	127(100%)	40(31%)	22(17%)	4(3%)	59(46%)
3－19y	44(100%)	8(18%)	2(5%)	0(0%)	10(23%)
20－59y	63(100%)	12(19%)	3(5%)	0(0%)	15(24%)
60y－	12(100%)	3(25%)	0(0%)	0(0%)	3(25%)
TOTAL	246(100%)	63(26%)	27(11%)	4(2%)	87(35%)

性が疑われる急性胃腸炎患者由来の検体のウイルス検査を行った．今回はSRSVの検出を主たる目的として，1995年10月より12月までの期間に搬入された急性胃腸炎患者の便および嘔吐物を対象とした．なお，この時期に両医院ではAD40/41が3例検出されたが，ロタウイルスは検出されなかった．

101例の患者便について，SRSVのPCR検査を行った結果，96％に当たる97例においてRT-PCR法でSRSVに特異的な遺伝子が検出された．18例の患者では嘔吐物についてもSRSVのPCR法による検査を実施したところ，17例にSRSVのPCR産物が検出された．プライマーペアーごとの検出感度検討した結果では，2段階目のPCR反応にNV3とNV51のプライマーペアーを用いた方が検出率が高かった(Table 7)．

問診より得られた89例の患者の臨床症状の特徴をみると，嘔吐は全体の81％に，下痢は67％に出現しており，嘔吐が激しいことが窺われた．SRSVによる胃腸炎は激しい嘔吐が特徴的とされるが，今回の結果でも83％の初発症状が嘔吐で，嘔吐持続日数は2日以内が80％であった(文献5で一部はすでに報告した)．

考　察

胃腸炎患者から病原細菌が検出されない場合，ウイルス性の病原体検査が必要となる．特に日本を含む先進国では，細菌性よりもウイルス性の方が胃腸炎を起こす頻度が高いと考えられている．胃腸炎を起こすウイルスには多くのウイルスが挙げられるが，頻度や重症度を考慮すれば，検査が重要なウイルスは小型球型ウイルスとロタウイルス及びF群アデノウイルス(AD40/41)である．

ロタウイルスとAD40/41は，組織培養からの精製抗原，或いは組み換え遺伝子を用いて発現させたウイルス蛋白質に対する抗体が作成され，その抗体を用いたELISA法が普及している．他方，SRSVは細胞培養による増殖が

Table 7. Comparison of Detetion rates among Primer Sets

1stprimer pair / 2nd primer pair	NV35-NV36 / NV81-NV/SM82	NV35-NV36 / NV3-NV51
PCR positive	41(41%)	95(94%)
PCR negative	60(59%)	6(6%)

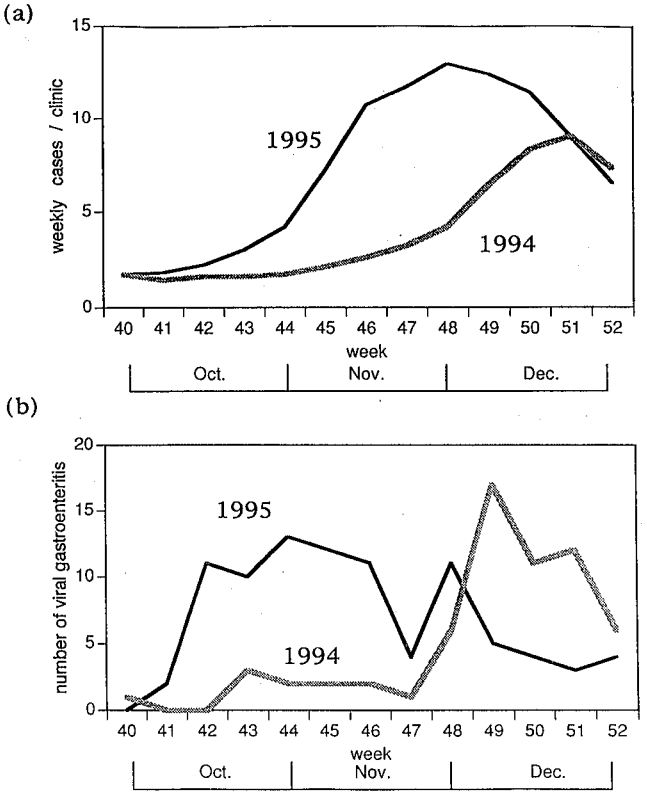


Fig. 3. Incidence of Gastroenterritis Cases in The Last Quarter of 1995 and 1994.
(a)：Weekly cases of gastroenteritis per sentinel clinic (National Epidemiological Surveilance of Infectious Diseases)[5].
(b)：Weekly cases of viral gastroenteritis in the two pediatric clinics.

Table 6. Clincal Characteristics of Patients with Viral Gastroenteritis

Clinical finding	Percent of each clinical finding			
	TAMA Region			*Two Clinics*
	SRSV (n=65)	ROTA (n=27)	AD40/41 (n=6)	SRSV (n=89)
Fever<37℃	38.5	66.7	67.0	—
Diarrhea	100	100	100	67
Vomiting	29	41	—	91
Nausea	20	26	—	—
Abdominal pain	26	19	—	—

困難なために，検査法の開発は遅れていた．1990年にSRSV株の一つであるNorwalk virus (NV)の遺伝子クローニングと塩基配列決定が成功して以来[6]，多くの研究室で，PCR法によるSRSVの検出が報告されるようになった[7]．

今回，我々は，NVゲノムのポリメラーゼ領域の塩基配列が多くのSRSV株間で共通性が高いことより，この領域のプライマーを選択し，さらに検出感度を向上させる目的で，2段階PCR法を採用して．RT-PCR法を検討した．その結果，RT-PCR法によるSRSVの検出率は，Table 4及びTable 5に示したように，68.4%となり，これまでの電子顕微鏡による検出率(49.5%[3])をしのぐ結果となった．

2段階目のプライマーNV81とNV/SM82，或いはNV3とNV51の2種類のペアーについて比較検討したところ，Table 7の結果ではNV3とNV51のペアーの検出率が高かった．しかし，今回は示さなかったが，NV81とNV/SM82のペアーの方が検出率が高くなる場合も我々は経験している．この原因は不明であるが，1段階目のPCR産物がどのような立体構造を取るかによって，2段階目のプライマーの結合程度が異なってくる可能性が考えられる．プライマーにより検出率に差が出たことは，SRSVの検査法として今回選択したプライマーペアーが万全のものではないと考えられ，検出精度を上げるためには他の領域のプライマーを併用するなど，複数のプライマーを検討する必要がある．キャプシド領域を増幅するプライマーペアーを併用している山崎ら[8]及び大津[9]の報告によれば，SRSVの株の違いがプライマーによる検出率の違いを起こすのではないかと推論おり，ウイルス株の塩基配列をもとにした詳細な解明が望まれる．

病原微生物検出情報[5]によると1995年10月から12月の胃腸炎患者報告数は過去の同時期に比べて大きく増加していた(Fig.3-a参照)．しかし，例年と異なり，ロタウイルスは殆ど検出されなかった．多摩地区の感染症サーベイランスの結果も同様の傾向を示しており，同時期のロタウイルスの検出は1件であった．一方，SRSVは多摩地区で11月がピークとなり，北関東地区並びに世田谷地区の2小児科定点医院の結果も，10月第2週から始まり，11月にピークとなり，12月末になるとやや低下する傾向が見られた(Fig.3-b)．

この現象について，病因学的に推測してみると，例年10月に生食用カキの市場が解禁されるが，生食用カキが一般に出回り始める時期と，SRSVによる急性胃腸炎の流行時期が一致することより，まずカキを喫食した成人が感染を受け，次いで，抗体を持たない乳幼児や小児が二次的に感染を受けたのではないかと考えられる．更に，12月末に低下するのは，不顕性感染者が抗体を獲得するなどして，感染経路が遮断されたためとも考えられる．これらの推測は，SRSVによる胃腸炎の流行について更に詳細な調査によって明らかにしていく必要がある．今回の結果では，嘔吐物から高率でSRSVが検出され，嘔吐物を介した感染の可能性も示された．

東京都では毎年10月から12月にかけて，学校や保育園などで，非細菌性の急性胃腸炎の集団発生が多発するが，SRSVが原因と推測されている．SRSVによる急性胃腸炎の感染経路や感染力などについて究明が待たれる．又，生食用カキについては，RT－PCR法によるSRSV遺伝子の検出が報告され始めている[10),11)]が，我々も市販貝類について調査を行い，同様の結果を得ている(結果未発表)．

ウイルス性胃腸炎の診断は，臨床症状から確定するのは困難な場合が多い．一般にウイルス性胃腸炎は症状は激しいが持続せず，殆どの場合，数日以内で治癒する．しかし，小児の急性下痢症患者においては脱水症状を来すことがあるので注意が必要である．佐久間[12]によれば，乳幼児のウイルス性胃腸炎の中で，最も重症な経過をとるのはロタウイルスによるもので，SRSVとロタウイルスを鑑別することは診断上重要となる．

これまでウイルス検査は，ELISA法が開発されたものを除いて，培養細胞による増殖・分離・同定或いは電子顕微鏡による検索など，時間と手間がかかるために検査が一般化されず，病因検索は不十分のままであった．PCR法はSRSVを始めとして多くのウイルスの検査を容易にしており，汎用検査法として普及していくものと考えられる．現段階では，核酸抽出やPCR反応に数段階の反応を必要として煩雑なので，更に簡便なPCR法に改良する必要がある．現在，立体構造に左右されない確実なプライマーの設定や，カリシウイルスなど胃腸炎を引き起こすその他のウイルスのPCRを用いた検査法について検討中である．

謝　辞

今回の検査に当たり，貴重な資料を提供して戴いた多摩地区感染症サーベイランス事業担当医院(藤田医院，桜井医院，宮崎小児科医院，江崎小児クリニック，国立中央診療所，横田小児科医院，宮本医院，野上医院)の各先生方，世田谷区井出小児科医院の井出邦彦先生，及び浦和市手嶋小児科医院の手嶋力男先生に謹んで謝辞を申し上げます．又，多摩支所病理細菌科にはサーベイラ

ンスの資料を提供して戴きました．深謝いたします．

1）Gordon, I., Ingraham, H. S. and Korns, R. F.：*J. Exp. Med.*, **86**. 409-422, 1947.

2）Bishpo, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., et al.：*Lancet*, **2**. 1281-1283, 1973.

3）林　志直：検査と技術，**23**. 33-40, 1995.

4）Jiang, X,. Wang, M., Wang, K. and Estes, M. K.：*Virology*, **195**. 51-61, 1993.

5）国立予防衛生研究所．：病原微生物検出情報 **17**. 21-24, 1996.

6）Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, M. and Estes, M. K.：*Science*, **250**. 1581-1583, 1983.

7）Wang, J. X., Jiang, X., Mdore, P., et al.：*J. Virology*, **68**. 5982-5990, 1994.

8）山崎謙治，大石　功，奥野良信，他．：臨床とウイルス **23**. 251-256, 1995.

9）大津隆一．：病原微生物検出情報 **17**. 33-40, 1996.

10）Scott, F. D., Carmela, G., Kathryn, B. K., et al.：*J. Infectious Diseaes*. **171**. 1497-1503, 1995.

11）Jiang, X., David, C., Jian, H., et al.：*J. General Virology*, **76**. 2739-2747, 1995.

12）佐久間孝久：感性性胃腸炎　特に small round virus の臨床像，第5回日本小児医会生涯教育セミナー講演集，10-13, 1995.

13）牛島廣治：下痢ウイルスの分類，診断，疫学，牛島廣治編，ウイルス性下痢症とその関連疾患，32-97, 1995,新興医学出版社，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 15-20, 1996

多摩地区におけるヒトからの赤痢菌及びサルモネラの検出状況(1980-1995)

片山佳奈子*, 吉田　勲*, 入倉善久*, 鈴木敬子**, 平田一郎***,
山田澄夫*, 田村行弘*

Detection of *Shigella* and *Salmonella* from Human in Tama of Tokyo (1980-1995)

KANAKO KATAYAMA*, ISAO YOSHIDA*, YOSHIHISA IRIKURA*, KEIKO SUZUKI**
ICHIRO HIRATA***, SUMIO YAMADA* and YUKIHIRO TAMURA*

During the period from 1980 through 1995, the detection of *Shigella* and *Salmonella* was carried out on a total of 2,049,175 fecal specimens obtained from food handlers, health inspectors, persons concerned with sporadic or outbreak cases, and overseas travelers in Tama of Tokyo. The detection rate of *Shigella* was 0.011% (230 cases), which represented 204 domestic cases and 26 imported cases. In domestic cases, healthy carriers were 2 cases given by food handlers and 5 in health inspectors, and the remaining 197 cases were from the persons concerned with sporadic or outbreak cases.

Salmonella was detected in 1,121 cases (0.05%), which accounted for 21 cases of *S.*Typhi, 1 of *S.*Paratyphi-A and 1,099 of *Salmonella* spp.. Out of the *S.*Typhi-positive cases, 3 were isolated from 2 food handlers and 1 from healthy inspectors in 1980s, the majority of the remaining cases were obtained from anamnestic persons. *S.*Paratyphi-A was detected from anamnestic persons. Almost all *Salmonella* spp. was isolated from food handlers, while the incidence of the organism decreased from 0.10% in 1980 to 0.03% in 1994 and 1995.

Keywords：赤痢菌*Shigella*, チフス菌*Salmonella* Typhi, パラチフスス菌*Salmonella* Paratyphi A, サルモネラ*Salmonella*, 保菌者carrier

緒　言

わが国の細菌性赤痢や腸チフス・パラチフスの発生は，1960年代後半から1970年代前半にかけて激減するに至った．これには衛生環境や栄養状態の改善，抗生物質療法の普及によるところが大きいといえる．また保健衛生行政における積極的な防疫活動，特に伝染病予防法に基ずく飲食物取扱業者を対象にした夏季腸管系病原菌の保菌者検索も重要な役割を果してきたし，一般飲食店を対象とした勧奨検便や一般健康診断に係わる検便も，保菌者の早期発見による感染源の撲滅に一助となってきた．

東京都におけるこうした保菌者検索事業は，1975年(昭和50年)までは衛生研究所が中心となって実施されており，その後，地方自治法の一部改正による保健所事務事業の移管により，23区は各区が，多摩地方は衛生研究所・多摩支所および保健所が担当することとなり，今日に至っている．

他方，1970年を境として腸管感染症の様相は大きく変化し，とりわけコレラ汚染諸外国に旅行した旅行者に発症する下痢症“いわゆる海外旅行者下痢症”の影響は大きく，コレラ等の腸管系病原菌の持込みに対する監視体制の強化といった新たな問題も起こってきた．

ここでは，1980年から1995年の16年間に多摩地区にお

*東京都立衛生研究所多摩支所 190 東京都立川市柴崎町3－16－25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
***東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科

いて実施した保菌者検索事業における赤痢菌，チフス菌，パラチフス菌およびサルモネラの検出成績について報告し，今後の予防対策事業の資料とする．

材料および方法

1．検査材料および検査機関

検査材料は全てふん便で，1980年から1995年の16年間の総取扱件数は2,049,175件であった．検便の内容は大部分が伝染病予防法にもとずく飲食物取扱業者からのものである．その他集団および散発事例発生時における初発患者確認後の関係者及び一般健康診断に係わる個人からのふん便も含まれた．また，海外旅行者由来ふん便は396件であった．

これらは当所，三鷹保健所，八王子保健所及び東村山保健所あるいは田無保健所において検索に供された．その取扱件数は，三鷹保健所では327,637件（海外旅行者由来16件を含む），八王子保健所397,530件（同14件），東村山保健所80,533（同1件，1980-1985年実施），田無保健所212,902件（1986年より実施），当所1,030,573件（同363件）であった．

2．検査対象病原菌および分離・同定法

検査対象菌は赤痢菌，チフス菌，パラチフス菌及びサルモネラであり，これら病原菌の検索は善養寺ら[1]の方法に準拠して行った．

結　果

1．赤痢菌の年次別検出状況

1980年から1995年にかけて多摩地区において実施した保菌者検索事業における赤痢菌の年次別検出状況をチフス菌・パラチフス菌を含むサルモネラと対比して表1に示した．赤痢菌の延べ陽性数は230件（0.011%）であった．そのうち海外旅行者に由来するものは26件（11.3%），残り204件（88.9%）は国内例であった．

国内感染例のうち，いわゆる保菌者として確認されたのは7件，集団例由来124件，残り73件は赤痢患者報告後の関係者検便によって検出されたものであった．保菌者のうち2例は，1987年の飲食物取扱業者検便により検出された *Shigella flexneri*（血清型variant Y）と *S.boydii*（血清型4）であり，他の5例は健康診断に係わる検便により確認された *S.sonnei*（4例）と *S.flexneri* 3a（1例）であった．

集団発生例とみられた事例は5例あり，そのうち3例は1983年に発生したものであった．10月から12月にかけて武蔵調布市内の保育園と，小学校にまたがって発生した *S.sonnei* による事例では，95名から本菌が検出された．また同年には，東久留米の老人ホームと八王子の小学校において *S.flexneri* 2a（菌検出6件）と *S.sonnei*（菌検出8件）を原因菌とする中規模な集団例が発生している．その他2例は日野市と武蔵調布市の保育園において，1986

Table 1. Detection rate of *Shigella* and *Salmonella* from human in Tama of Tokyo, 1980-1995

Year	No. of subjects tested	*Shigella*		*Salmonella*	
		No. of detected	%	No. of detected	%
1980	107,247(34)	7(1)	0.007	110(9)	0.10
1981	113,083(4)	6	0.005	89(1)	0.08
1982	119,998(-)	8	0.007	81	0.07
1983	131,579(33)	111(2)	0.084	91	0.07
1984	122,882(52)	3(3)	0.002	77	0.06
1985	125,452(30)	8(1)	0.006	66	0.05
1986	130,100(26)	14	0.011	56	0.04
1987	136,654(32)	19(8)	0.014	82	0.06
1988	133,387(30)	17(3)	0.013	57	0.04
1989	130,115(12)	9(4)	0.007	88	0.07
1990	126,783(21)	2	0.002	63	0.05
1991	127,149(33)	4	0.003	57	0.04
1992	128,668(23)	5(1)	0.003	54	0.04
1993	133,329(34)	6	0.005	62	0.05
1994	140,574(17)	5(2)	0.004	39(1)	0.03
1995	142,175(15)	6(1)	0.004	49	0.03
Total	2,049,175(396)	230(26)	0.011	1,121(10)	0.05

( )：Imported case.

Table 2. Serotype of *Shigella* detected

Species/Serotype		No. of cases
S. dysenteriae	2	1(1)
S. flexneri	1b	3
	2a	22(3)
	3a	3
	6	1
	Y	1
S. boydii	1	1(1)
	2	1(1)
	4	1
	12	1(1)
S. sonnei		195(19)
Total		230(26)

( ) : Imported case.

年と1987年に発生したもので，*S.sonnei*が10件および5件検出されたものである．以後今日に至るまで多摩地区では集団例は認められていない．なお，関係者検便陽性者のうち，1980年には家族内感染例とみられる*S.sonnei*が検出されている．

検出赤痢菌の血清型は，表2に示すように230株中195株 (60.9%) は *S.sonnei* であり，次いで *S.flexneri* 30株 (13.0%)，残り5株は*S.boydii* 4株と*S.dysenteriae* 1株であった．検出*S.flexneri*は1b，2a，3a，6およびvariant Yの5血清型に型別され，そのなかでは集団事例の認められた血清型2aが22株と最も多かった．また，*S.boydii*の3株(血清型1，2，12)と*S.dysenteriae*(血清型2)はいずれも海外旅行者から分離されたものであった．

2．チフス，パラチフスを含むサルモネラの検出状況

チフス，パラチフスを含むサルモネラの総陽性数は表1に示したように1,121件(0.05%)，そのうち消化器系伝染病菌であるチフス菌は21例，パラチフスA菌は1例認められた．また海外旅行者由来は11件で，その内訳はチフス菌1件とその他のサルモネラ10件であった．年次別には，1980年に0.10%と最も高い陽性率を示したが，以後減少し，1994年と95年には0.03%に低下した．

1994年海外旅行者の経過者検便より検出された1件を除くチフス菌の国内例20件の検出年は，1980年1件，1982年2件，1983年12件，1986年3件および1987年2件であった(表3)．保菌者は3名で，それらは飲食物取扱業者の検便から1983年と86年に，さらに1986年の健康診断に係わるふん便から検出された．その他17件は経過者あるいは関係者検便により確認されたもので，1983年の12件中11件は前年確認された経過者から検出されたものであった．また，パラチフスA菌1件は1991年の経過者検便における陽性例であった．

Table 3. Detection of *S.* Typhi and *S.* Paratyphi-A in Tama

Year	*S.* Typhi	*S.* Paratyphi-A
1980	1	-
1981	-	-
1982	2	-
1983	12	-
1984	-	-
1985	-	-
1986	3	-
1987	2	-
1988	-	-
1989	-	-
1991	-	1
1992	-	-
1993	-	-
1994	1(1)	-
1995	-	-
Total	21(1)	1

( ) : Imported case.

チフスおよびパラチフスを除くサルモネラ1,099株の血清型をO群別に表4に示した．O群別は11種に型別された．そのうちO7群が最も多く326株(29.5%)，次いでO8群291株(26.3%)，O4群238株(21.5%)，O9群105株(9.4%)，O3/10群67株(6.0%)，O18群36株(3.3%)の順であった．血清型は，O4群では16種，O7群21種，O8群15種，O9群5種，O3/10群11種，O1/3/19群2種，O13群3種，O16，O18およびO39群各1種，計76種に型別された．これら血清型のうち総検出数の多かった血清型は，Lichfield (143株)，Typhimurium (76株)，Hadar およびEnteritidis(各75株)，Infantis(61株)，Braenderup(42株)，ThompsonおよびMontevideo(各41株)，Tennessee(37株)，Cerro(36株)等であり，これらは通年を通して検出された．表5は各年次ごとに検出頻度の高かった上位4位までの血清型をまとめたものである．1位の血清型は1980-81年 Typhimurium，1982-1987年の6年間はLitchfield，1988-89年Hadar，1990-92年は各年変わりEnteritidis, Cerro次いでMontevideo，そして1993-95年は再びEnteritidisへと推移した．

考　察

東京都の健康人における赤痢菌の検出率は年々減少してきており，1959年～1965年までの調査[2]では0.32～0.08%，さらに1966年～1975年では0.06～0.001%と推移

Table 4. Serovars of *Salmonella* isolated from human in Tama area of Tokyo (1980-1995)

O group	Serovar	No.of isolates (%)
O4	S. Typhimurium	76 (6.9)
(n=238)	S. ParatyphiB	34 (3.1)
	S. Agona	33 (3.0)
	S. Stanley	16 (1.5)
	S. Heiderberg	13 (1.2)
	S. Derby	12 (1.1)
	S. schwarzengrund	8
	S. Saintpaul	6
	S. Bredeny	5
	S. Bradfold	4
	S. Fyris	3
	S. Brandenburg	3
	S. Schleisshein	3
	S. Haifa	1
	S. Sandiego	1
	Untypable	19
O7	S. Infantis	61 (5.6)
(n=326)	S. Braenderup	42 (3.8)
	S. Montevideo	41 (3.7)
	S. Thompson	41 (3.7)
	S. Tennessee	37 (3.4)
	S. Bareilly	16 (1.5)
	S. Potsdam	10
	S. Mbandaka	9
	S. Virchow	9
	S. Isangi	9
	S. Othmarschen	7
	S. Livingstone	5
	S. Ohio	3
	S. Bonn	2
	S. Richmond	2
	S. Singapore	2
	S. Kiss	1
	S. Lomita	1
	S. Oranienburg	1
	S. Concord	1
	S. Mikawashima	1
	Untypable	24
O8	S. Litchfield	143 (13.0)
(n=291)	S. Hadar	75 (6.8)
	S. Newport	19 (1.7)
	S. Muenchen	7
	S. Blockley	7
	S. Bovismorbificans	4
	S. Duesseldorf	4
	S. Manhattan	4
	S. Chailey	3
	S. Loanda	2
	S. Narashino	1
	S. Nagoya	1
	S. Kottbus	1
	S. Emek	1
	S. Manchester	1
	Untypable	18
O9	S. Enteritidis	75 (6.8)
(n=105)	S. Panama	20 (1.8)
	S. Javiana	4
	S. Mendoza	2
	S. Jamaica	1
	Untypable	3
O3,10	S. Anatum	19 (1.7)
(n=67)	S. London	11 (1.0)
	S. Orion	8
	S. give	7
	S. Muenster	6
	S. Uganda	4
	S. Amsterdam	3
	S. Amager	2
	S. Meleagridis	2
	S. Weltevreden	1
	S. Zanzibar	1
	Untypable	3
O1,3,19	S. Senftenberg	13 (1.2)
(n=20)	S. Krefeld	3
	Untypable	4
O13	S. Mishmarhaemek	2
(n=4)	S. Havana	1
	S. Putten	1
O6,14	Untypable	1
O16	S. Gaminara	1
(n=2)	Untypable	1
O18	S. Cerro	36 (3.3)
O39	S. Champaign	7
(n=9)	Untypable	2
	Total	1,099

Table 5. Four most common *Salmonella* Serovar in Tama,1980-1995

Year	First	Second	Third	Fourth
1980	*S.* Litchfield (10)	*S.* Typhimurium (9)	*S.* Thompson (9)	*S.* Agona (7)
1981	*S.* typhimurium (10)	*S.* Infantis (9)	*S.* Litchfield (8)	*S.* ParatyphiB (8)
1982	*S.* Litchfield (14)	*S.* Agona (10)	*S.* Infantis (7)	*S.* typhimurium (6)
1983	*S.* Litchfield (12)	*S.* Typhimurium (10)	*S.* Braenderup (7)	*S.* Panama (7)
1984	*S.* Litchfield (14)	*S.* Infantis (8)	*S.* Typhimurium (7)	*S.* Braenderup (7)
1985	*S.* Litchfield (10)	*S.* ParatyphiB (8)	*S.* Infantis (6)	*S.* Tennessee (5)
1986	*S.* Litchfield (10)	*S.* Agona (5)	*S.* Montevideo (4)	*S.* Thompson (4)
1987	*S.* Litchfield (21)	*S.* Braenderup (7)	*S.* ParatyphiB (6)	*S.* Enteritidis (4)
1988	*S.* Hadar (16)	*S.* Litchfield (14)	*S.* typhimurium (5)	*S.* Panama (3)
1989	*S.* Hadar (24)	*S.* Enteritidis (11)	*S.* Litchfield (6)	*S.* Tennessee (4)
1990	*S.* Enteritidis (11)	*S.* Hadar (9)	*S.* Litchfield (9)	*S.* Tennessee (5)
1991	*S.* Cerro (13)	*S.* Typhimurium (7)	*S.* Hadar (6)	*S.* Tennessee (5)
1992	*S.* Montevideo (11)	*S.* Stanley (7)	*S.* Litchfield (4)	*S.* Tennessee (4)
1993	*S.* Enteritidis (13)	*S.* Litchfield (6)	*S.* Hadar (4)	*S.* typhimurium (4)
1994	*S.* Enteritidis (12)	*S.* Litchfield (3)	*S.* Bredeney (3)	*S.* typhimurium (2)
1995	*S.* Enteritidis (8)	*S.* Hadar (6)	*S.* Heiderberg (4)	*S.* Uganda (4)

( ) : Number of isolates.

し，1970年以降は0.001～0.002%となっている[3]．今回の多摩地区の検査成績ではその検出率さらに低くなり，保菌者は7例(0.0003%)のみであった．これら保菌者のうち2例は1987年の飲食物取扱業者の検便により検出されたものであり，それ以外の年では検出されず，これらが汚染源となる可能性はさらに低くなったと言えよう．しかし，残り5例は健康診断に係わる検便由来であり注目された．

わが国において赤痢の集団発生は稀なものとなってきている．過去16年間多摩地区において発生した集団事例は1983年の3例，1986年と1987年の各1例，計5例で，その他の年には認められていない．この5例中4例は保育園あるいは小学校といった低年齢集団での，*S.sonnei*による発生であり，わが国の細菌性赤痢集団例の特徴[4]と同様であった．保菌者および集団例以外の菌陽性者99名の多くは関係者検便により確認され，そのうち26名(26.3%)は海外旅行者由来であった。また，1980年の*S.sonnei*陽性者3名は家族内感染例とみられた．このような細菌性赤痢における海外旅行者の占める比率が高いこと，あるいは家族内感染例の増加傾向は全国調査[4]あるいは東京都の成績[5]でも認められている．

チフス菌及びパラチフスA菌は22件認められたが，3名のチフス保菌者を除き，全てが経過者あるいは関係者検便により確認されたものであった．調査期間中1989年と1993年の冬季に東京都，千葉県，神奈川県など関東一帯でパラチフスと腸チフスの広域的流行があったが[6,7]，多摩地域がその影響を受けたという成績は認められなかった．

わが国の食生活の様相は大きく変化し，特に食肉の消費量の増大は著しいものがある．それとともにサルモネラ腸炎の増加が，公衆衛生の新たな問題として重要視され，その結果1960年代後半から保菌者検索事業のなかに，サルモネラが検査対象菌に加えられるようになった．東京都予防医学協会の1966年～1984年までの調査によれば[8]，児童・生徒からの検出率は0.10～0.28%(平均0.15%)，食品取扱業者では0.03～0.18%(平均0.09%)である．これに対して，今回の調査における多摩地区の本菌の検出率は0.03～0.10%(平均0.05%)であった．両者の検査年度は異なるが，いずれの場合も検出率の減少傾向が観察されている．この様な傾向が今後とも続くのか否かは明かでないが，すくなくとも現時点でも食品取扱業者において相当数のサルモネラ保菌者が存在することは確かである．また検査対象群での保菌率の差は，取り扱われる食品別の業者間の保菌率の比較検討の必要性を示唆するもので，本食中毒の予防対策を考える上で重要であり，今後の検討課題であろう．

検出サルモネラ1,099件は多種多様の血清型を示し，76種に型別された．この様な多彩化傾向は予防協会や山梨県の調査[8,9]でも認められている．輸入食品や輸入飼料増大といった国際交流の著しい進展もその一因であろう．分離された上位4サルモネラ血清型の年次別検討により，多摩地区における主流血清型が*Salmonella* Typhi-

murium (1980-81年), *S*.Litchfield (1982-87年), *S*.Hadar (1988-89年), *S*.Enteritidis (1990-95年) に変化している. 同様な傾向は全国的にも観察されているが[10-12], 特に *S*.Enteritidisについては,本血清型による食中毒が1989年以降急増している事実と考えあわせると極めて興味ある結果であるといえよう. また*S*.Cerroは1991年に高頻度に検出されたが, 同年東京都全体においても同様な結果[13]であり, 多摩地区のみならず都内全域において本菌の汚染があったことを示しているといえよう.

上記のごとく, 保菌者検索事業において赤痢菌, チフス菌あるいはパラチフスA菌を検出する確率は近年極めて低くなったといえよう. またサルモネラが検査対象菌として加えられた結果, *S*.Enteritidisにみられるように食品取扱業者からの本菌検出状況はサルモネラ食中毒の発生と密接な関連があることが示唆されるようになってきている. したがって, 食生活の多様化, 特に動物性食品の摂取増加に伴うサルモネラ腸炎が急増する現在, 本事業におけるサルモネラ検索は本菌食中毒の予防対策の資料として有用であろう. さらに, 食品や飼料の輸入量の増加や海外旅行者の腸管系病原菌の持ち込み等により検査対象菌の範囲も広がるものと推測される. 今後それら病原菌による集団発生の予防のためにも, 本事業を通して病原菌の実態把握と情報提供はますます必要となってくるであろう.

謝　辞

本調査にあたり検査資料を提供していただいた三鷹保健所, 東村山保健所, 田無保健所及び八王子保健所の検査室各員に深謝します.

文　献

1) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山　武, 工藤泰雄, 伊藤武：第4版, 154-191, 1985, 医学書院, 東京.
2) 善養寺浩, 一言　広, 太田建爾, 他：日伝染会誌, 38, 175-179, 1964.
3) 善養寺浩, 太田建爾, 田島光三, 他：東京衛研年報, 27-1, 29-35, 1976.
4) 特集, 赤痢 1991～1993.10：病原微生物検出情報, 15, 1-2, 1994.
5) 山田澄夫, 太田建爾, 尾畑浩魅, 他：感染症誌, 67, 1183-1189, 1993.
6) 特集, 腸チフス・パラチフス 1988.1～1989.4：病原微生物検出情報, 10, 89-90, 1989.
7) 特集, 腸チフス・パラチフス 1992～1993：病原微生物検出情報, 15, 73-74, 1994.
8) 小野川　尊, 寺山　武：第1版, 183-193, 1986, 菜根出版, 東京.
9) 金子通治：感染症誌, 69, 1294-1301, 1995.
10) 特集, サルモネラ：病原微生物検出情報, 9, 125-126,1988.
11) 特集, サルモネラ・エンテリティディス流行 1989～1992.10：病原微生物検出情報, 14, 1-2, 1993.
12) 特集, サルモネラ：病原微生物検出情報, 16, 1-2, 1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 21-25, 1996

洋生菓子中における *Salmonella* Enteritidis の生残性と増殖に関する検討

高橋由美*, 野口やよい*, 楠　淳*, 伊藤　武*

Study on the survival and the growth of *Salmonella* Enteritidis in various fresh cakes.

YUMI TAKAHASHI*, YAYOI NOGUCHI*, JUN KUSUNOKI* and TAKESHI ITOH*

Keywords：サルモネラ　エンテリティディス *Salmonella* Enteritidis, 洋生菓子 fresh cake, 発育 growth, 生残 survival

緒　言

近年，我が国においては欧米諸外国と同様*Salmonella*血清型Enteritidis(以下*S.* Enteritidisと略す)汚染鶏卵が原因であるサルモネラ食中毒が急増している[1]．それらの原因食品の大半は卵を原材料とした卵焼き，とろろ汁，自家製マヨネーズおよび洋生菓子等である．東京都においても1989～1994年の5年間に洋生菓子が原因食品である食中毒が3事例認められ[2]，そのうち1993年6月26日に東京都内で発生した1食中毒事例は抹茶ケーキとレアチーズケーキが原因食品であると特定された事例であった[3]．この食中毒事例では，その詳細な疫学調査から，洋生菓子の製造にサルモネラ汚染鶏卵の使用が疑われ，また抹茶ケーキにおいては，製造工程中に80℃．10分間の加熱工程があるにもかかわらず，サルモネラが死滅するのに十分な加熱が行なわれなかった可能性，さらに製造後の保存方法の不備あるいは調理器具による2次汚染も考えられた．

そこで今回著者らは洋生菓子を原因とするサルモネラ食中毒の予防対策の資料を得るために，食中毒の原因食品であった抹茶ケーキ(ムース)およびレアチーズケーキを自家調製し，この調製過程に*S.* Enteritidisを実験的に接種し，製造工程中の加熱条件と製造後に低温で保存した場合の本菌の挙動を調べた．

材料および方法

供試菌株：食中毒の原因食品の抹茶ケーキから分離され半流動寒天培地に保存した*S.* Enteritidis 93-128株(ファージ型4)を供試した．実験に際しては，保存株をBrain heart infusion培地(Difco)で35℃，2代継代培養したものを接種菌液として使用した．

洋生菓子の材料：サルモネラ陰性の鶏卵(当研究所動物舎産)を使用し，牛乳，抹茶，砂糖，生クリーム，クリームチーズおよびゼラチンは市販のものを使用した．抹茶ケーキとレアチーズケーキおよびカスタードクリーム調整時のこれら材料の配合割合を表1に示した．

抹茶ケーキ(抹茶ムース)の調製法：抹茶ケーキ(抹茶ムース)は，卵黄180 g，牛乳750ml，砂糖240 g，ゼラチン45 g，抹茶30 g を混合し80℃，10分間加熱し約1,200 g の材料①を調製した(図1)．耐熱性試験には，冷却後のこの材料を使用し，保存実験に使用した抹茶ムースは，これと卵白180 g と生クリーム900mlを混合しホイップした材料②を混合した．約2,300 g の抹茶ムースを用いた．

レアチーズケーキの調製法：レアチーズケーキは図2に示したように，始めに卵白180 g と砂糖200gを加え材料③(メレンゲ)を調製する．次にクリームチーズ600 g と牛乳600mlを加熱溶解し，これに80℃10分間加温溶解したゼラチン45 g，水300mlおよびレモンジュース50mlを混合して材料④を調製する．冷却した材料④に先に調製した材料③を加え約1,900 g のレアチーズケーキを調製した．

カスタードクリームの調製法：カスタードクリームは塩津の方法[4]に準じて卵黄180 g，牛乳500ml，小麦粉15 g，

*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

表1．供試した洋生菓子の原材料の配合

原材料	抹茶ムース	レアチーズケーキ	カスタードクリーム
卵黄	7.74% *)		22.22%
牛乳	32.26% *)	30.38%	61.73%
抹茶	1.29% *)		
砂糖	10.32% *)	10.13%	12.35%
ゼラチン	1.94% *)	2.28%	
卵白	7.74% **)	9.11%	
生クリーム	38.71% **)		
レモン汁		2.53%	
クリームチーズ		30.38%	
水		15.19%	
小麦粉			1.85%
コーンスターチ			1.85%
リキュール	痕跡**)		

*)＝抹茶ムース材料①，**)＝抹茶ムース材料②

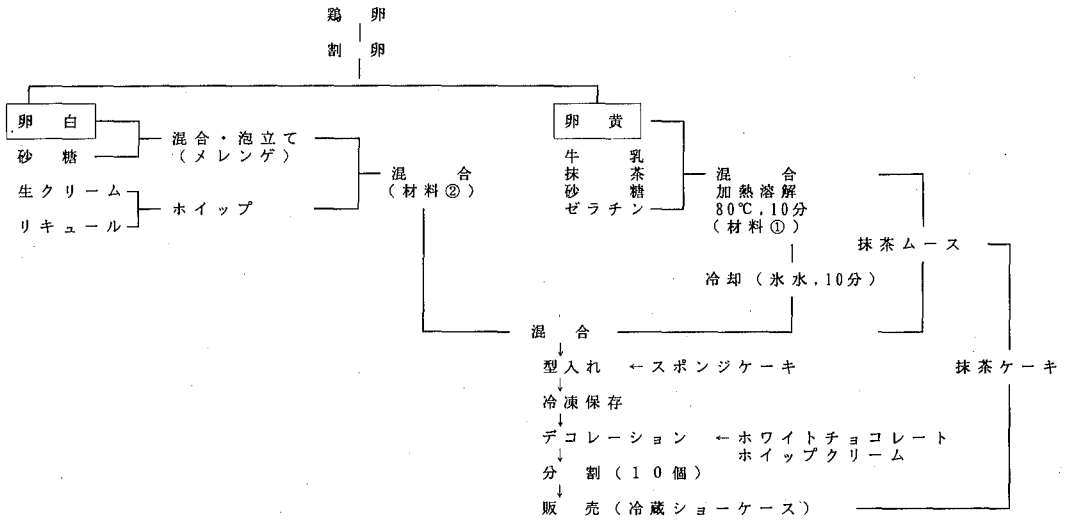


図1．抹茶ケーキの製造工程

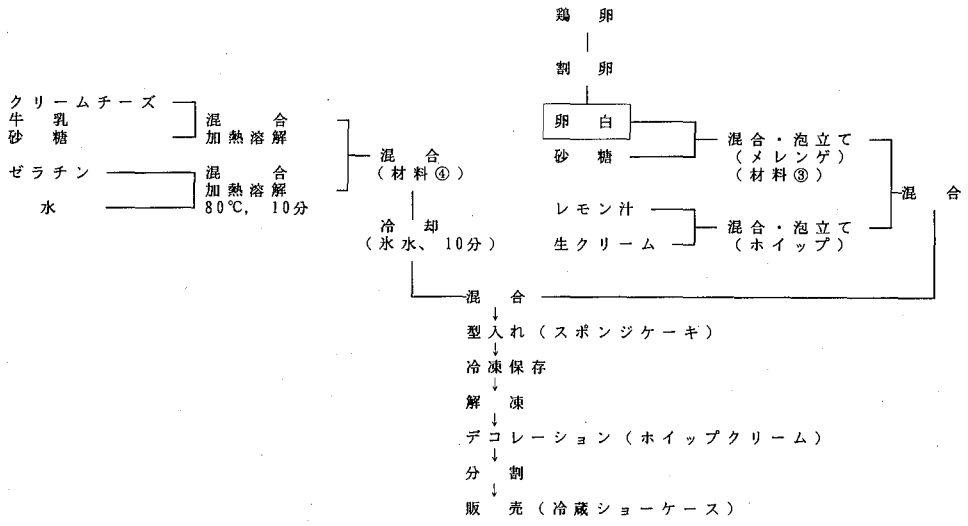


図2．レアチーズケーキの製造工程

砂糖100 g，コーンスターチ15 g を混ぜながら沸騰直前まで加熱し，さらにクリーム状になるまで加熱を続けて調製した．

菌数の測定法[5]：菌数の測定は，各実験における各試料の10段階希釈液を0.1mlずつ，MLCB寒天培地に滴下し，コンラージ棒を用いて寒天平板全体に塗沫後，35℃ 24時間培養し，出現した硫化水素産生性の集落数を算定し，1 gあたりの*S.* Enteritidis菌数を算出した．

D値の算定法[6]：D値の算定は，菌数測定後，それぞれの値を対数に変換する．縦軸を生残菌の対数値，横軸を加熱時間としグラフ用紙に菌数をプロットする．直線性のあるところを用い，以下の公式によりD値を算定した．加熱時間 t_1 における生残菌数を N_1，同じく t_2 における生残菌数を N_2 とすると $D=t_2-t_1/\log N_1-\log N_2$ により求めた．

成　　績

1．抹茶ムースにおける供試菌株の耐熱性試験：抹茶ムースの材料①を約35℃に冷却後，供試菌の1夜培養菌を10^8個/ gになるように添加し良く混合したものを10 gずつプラスチック製チューブに入れ，60℃に設定した恒温水槽に入れ一定時間保持した．対照として同様に処理したリン酸緩衝液を用いた．次いで30秒間隔にサンプルおよび対照を取り出し各時間における菌数を測定した．

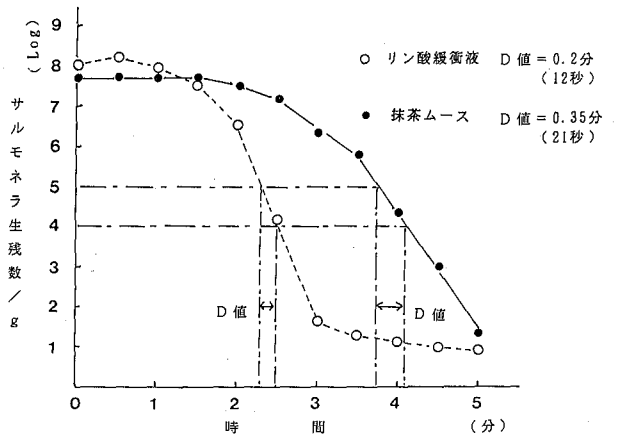


図3．抹茶ムースとリン酸緩衝液中の*S.* Enteritidis のD値

抹茶ムースおよびリン酸緩衝液中での60℃保持における各時間の接種菌量の挙動を図3に示した．抹茶ムースでは，2分30秒頃まで菌が緩やかに減少し，3分30秒以降，菌が直線性に減少した．リン酸緩衝液中では1分30秒頃まで菌が緩やかに減少し，2分～3分の所で菌が直線性に減少した．以降，菌は緩やかに減少していった．これらの成績から，60℃のD値は抹茶ムース中では0.35分，リン酸緩衝液(pH7.2)中では0.20分と算定された．

2．抹茶ムース製造工程中における接種菌の死滅条件および生残性の検討：抹茶ムースを加熱溶解し，冷却後の材料①に供試菌を10^3～10^4個/ gとなるように接種した．その8 mlずつをプラスチック製チューブに分注し，72℃，77℃および80℃に設定した恒温水槽中で一定時間加熱した．抹茶ムース材料の各加熱条件における*S.* Enteritidisの生残性の成績を表2に示した．72℃の加熱の場合(中心温度70.3℃) 4分間以内では，接種菌が生残したが，5分間(中心温度70.9℃)では検出されなかった．また，77℃の場合，3分間30秒(中心温度74.2℃)では，生残したが，4分間(中心温度74.6℃)では検出されなかった．さらに，80℃の場合，2分間30秒(中心温度74.8℃)までは接種菌が生残していたが，3分間(中心温度76.2℃)以上では検出されなかった．

3．各種洋生菓子中の接種菌の消長：抹茶ムース，レアチーズケーキおよびカスタードクリームに，供試菌株の1夜培養菌を10^3個/ gになるように接種し，良く混合したものを10℃および20℃で保存し，経時的に菌数の測定を行った．10℃保存した場合，3種の洋生菓子とも24時間後も，接種菌量の10^3個/ gオーダーを維持し，菌数の増減は認められなかった(図4)．一方，20℃保存の場合，いずれの洋生菓子でも保存8時間後から菌数が増加しはじめ，24時間保存後には，抹茶ムース，レアチーズケーキでは菌数が接種時より4オーダー増加し10^7個/ gに，カスタードクリームでも3オーダー増加し10^6個/ gに達した(図5)．

表2．抹茶ムース中の*S.* Enteritidisの加熱後の生残

加熱温度	時　間（分）									
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
72℃	•	+	•	+	•	+	•	+	•	−
77℃	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
80℃	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−

•：検査せず

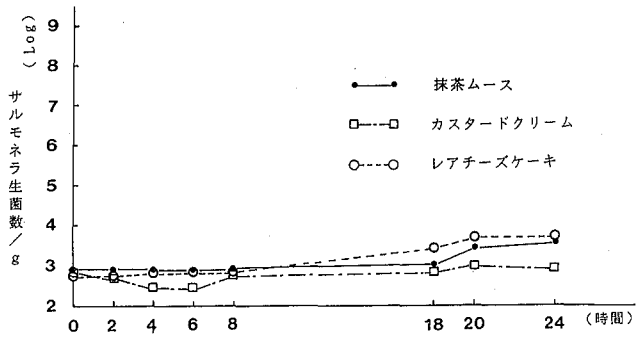


図4．10℃に保存した各種洋生菓子中での*S.* Enteritidis の増殖態度

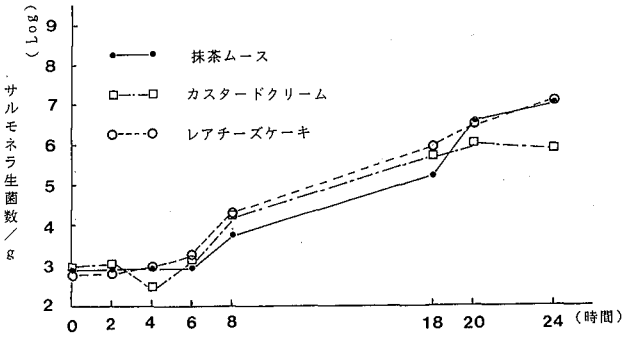


図5．20℃に保存した各種洋生菓子中での*S.* Enteritidis の増殖態度

考　　察

D値とは，ある一定の条件のもとで，最初に存在した菌数を90％死滅させるのに要する時間を分単位であらわしたものである．従って，D値の短い菌ほどその菌の熱抵抗性の弱さを示していると考えられている．今回供試した食中毒由来菌株のD値を60℃で求めた結果，抹茶ムース中で0.35分，リン酸緩衝液(pH7.2)中で0.20分であった．同様に今井らは[7−10]，*S.* Enteritidisファージ型4のリン酸緩衝液中における60℃のD値は約0.40分と報告している．われわれの成績は，今井らの報告した値よりも短いことから，特に耐熱性の高い菌株ではなかったと言えよう．また，抹茶ムース中でのD値の方がリン酸緩衝液中よりも長かった．これは，リン酸緩衝液の熱伝導度の方が抹茶ムースに比較し高いことによるものと推察された．今回検討を行った抹茶ムースおよびレアチーズケーキは製造方法が異なるものの，材料に鶏卵が使用されている．抹茶ムースは卵黄と卵白両方が使用され，卵黄は製造過程中加熱工程があり，卵白には加熱工程がなかった．一方，レアチーズケーキでは卵白のみが使用され，製造過程中で卵白の加熱工程はなかった．抹茶ムースのように加熱工程があるものでは，加熱処理の良否が食品の安全性を大きく左右する．そこで，菌接種抹茶ムースの72℃，77℃および80℃の3段階の温度における加熱実験を行った．供試菌株は中心温度が75℃．4分間以上に保持されていれば死滅することが確認された．したがって，*S.* Enteritidis食中毒事例の原因食品となった抹茶ケーキ(抹茶ムース)は80℃.10分間の温度処理が適切になされていなかった可能性が示唆された．

一方，製造過程に熱処理行程がない場合には，製造後の保存方法が食品衛生上重要である．そこで抹茶ケーキ，レアチーズケーキおよびカスタードクリームに菌を接種して，10℃と20℃における菌数の変化を調べた．今回検討した保存条件のうち10℃では24時間以内では菌の増殖は殆ど認められず初期菌数のままであった．この結果，菌の増殖をおさえるためには少なくとも10℃以下の保存温度を守ることが必要であることを示している．また，20℃における成績は，製造された抹茶ケーキ中に*S.* Enteritidisが生残した場合，保存条件によっては*S.* Enteritidisが増殖し，喫食後に急性胃腸炎を発症させうる菌量に達する可能性を示唆するものであろう．

結　　論

今回の試験成績から，洋生菓子の*S.* Enteritidis食中毒予防対策として以下の点があげられる．

1．鶏卵を使用した材料の加熱は，中心温度が75℃．5分間以上に保持されていること．

2．原料の卵白は未加熱で使用することが多いので特に取り扱いに注意し，割り置いた卵白を使用しないこと．

また，やむおえず使用する場合は，10℃以下に保存したものを用いること．

3．商品を保存する冷蔵庫，ショーケース内の温度を常に10℃以下に保持すること．

文　　献

1）工藤康雄：モダンメディア，**37**(5)，265-277，1991.
2）伊藤　武，楠　淳：月刊フードケミカル5月号，22-27，1995.
3）東京都衛生局生活環境部食品保健課：平成5年 東京都の食中毒概要，96-98，1993，東京.
4）塩津千穂子：きょうの料理7月号，85-88，1995，東京.
5）善養寺浩，坂井千三，寺山　武，他：腸管系病原菌の検査法，第4版，171-191，1985，医学書院，東京.
6）小林寛伊，芦山辰郎，古橋正吉，他：滅菌法・消毒法第3集，第2版，6-9，1976，文光堂，東京.
7）今井忠平，栗原健志：New Food Industry，**34**，

No. 1, 91-95, 1992.
8) 今井忠平, 栗原健志：New Food Industry, **34**, No. 1, 51-56, 1992.
9) 今井忠平, 栗原健志, 梅沢知子：New Food Industry, **35**, No.1, 81-89, 1993.
10) 今井忠平, 武田典子, 安達かをり：New Food Industry, **35**, No.3, 33-43, 1993.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 26-31, 1996

食肉からのサルモネラの検出と分離菌株の血清型 (1983～1995年の13年間の成績)

平井昭彦*, 石崎直人*, 金子誠二*, 仲真晶子*, 小久保彌太郎*

Detection and Serotyping of *Salmonella* from Raw Meat from 1983 to 1995 in Tokyo

AKIHIKO HIRAI*, NAOTO ISHIZAKI*, SEIJI KANEKO*, AKIKO NAKAMA* and YATARO KOKUBO*

Keywords：サルモネラ *Salmonella*, 血清型 serotype, 鶏肉 chicken, 豚肉 pork, 牛肉 beef

緒　　言

わが国におけるサルモネラを原因とする食中毒は1989年以降発生件数及び患者数共に急増し，1992年と1993年では食中毒発生件数が第1位となった[1)2)]．1995年に至り事件数は腸炎ビブリオ食中毒に次いで第２位になったが，患者数は第1位で全食中毒患者数の35％を占めるまでになり，大規模化の様相を示している[3)]．特に，腸炎ビブリオや黄色ブドウ球菌食中毒の発生が減少傾向にある中で，サルモネラ食中毒のみは増加傾向にあり，今や欧米諸国と同様に最も重要な食中毒の１つとなっている．このように，サルモネラ食中毒の発生が急増した主な原因は，鶏卵を主原料とした食品による*S.* Enteritidis食中毒が増加したためであるが，依然として食肉が関係したサルモネラ食中毒の発生も多く，1994年には大阪府で牛肉が関係した*S.* Enteritidisによる患者数が900名を越える大規模な事件が報告されている[4)]．

食肉を汚染するサルモネラの主な汚染源は，と畜場におけると殺解体時のと畜自体の腸管内容物であるが，現在ではそれに加えて更にその後の食肉取り扱い環境全般も重要な汚染源と考えられている[5)]．したがって，東京都におけるサルモネラ食中毒発生予防対策をたてる際の基礎資料として，都内で流通している食肉のサルモネラの汚染状況を常に把握しておくことが重要である．そこでわれわれは都内の食肉処理業で取り扱われる食肉のサルモネラ汚染状況を継続的に調査し，それらの結果を2回にわたって報告してきた[6)7)]．今回は，その後の調査成績を加えた1983～1995年の13年間におけるサルモネラ検出状況と分離菌株の血清型の分布の推移について報告する．

調査材料及び方法

１．調査材料

対象とした食肉は，1983年から1995年までの13年間に主として都内の食肉処理業から採取された鶏肉1,266検体，豚肉1,112検体及び牛肉601検体の計2,979検体である．

２．サルモネラの検出方法

各食肉25ｇを225mlのEEMブイヨン培地(日水製薬)中で，35℃-18時間前増菌培養を行い，その培養液約0.1mlをセレナイト培地(日水製薬)に接種して，35℃-18時間選択増菌培養を行った．1白金耳の増菌培養液をDHL寒天平板培地(日水製薬)に画線塗沫して35℃-18時間選択分離培養を行い，平板上に発育した典型的コロニーを原則として５個以上釣菌してTSI寒天培地(日水製薬)及びLIM半流動培地(日水製薬)に接種して，35℃-18時間確認培養を行った．TSI及びLIMによるスクリーニング検査により，サルモネラと同定された菌株についてはONPGやマロン酸分解能などの各生物化学的試験を行い，亜種分類を実施した．

３．分離菌株の血清型別

分離されたサルモネラ菌株は市販の診断用免疫血清(デンカ生研)を用いてO-抗原及びH-抗原の１相と２相を凝集反応で決定し，Kauffmann-Whiteの抗原構造表に

*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

より血清型別を行った.

結　果

1．サルモネラの検出状況

サルモネラは13年間を通して，2,979検体中358検体(12.0%)から検出された．肉の種類別では表1に示したように，鶏肉からの検出数が280検体(22.1%)と最も多く，次いで豚肉から70検体(6.3%)，牛肉から8検体(1.3%)であった.

これらのサルモネラ検出率の年次推移を図1に示した．全体としてサルモネラの検出率は1983年には4.4%であったがその後年々増加する傾向を示し，1994年には23.1%に達した．これを肉の種類別にみると,鶏肉は6.2～58.6%，豚肉では0.9～18.2%，更に牛肉では0～8.3%の範囲の検出率であった.

2．分離菌株の生物型及び血清型

分離されたサルモネラ358株の生物型及び血清型の内訳を肉の種類別に表2に示した．生物型は358株中261株(72.9%)がサルモネラ亜種Ⅰ，残りの97株(27.1%)がサルモネラ亜種Ⅱに分類された.

このうちサルモネラ亜種Ⅰの261株はさらに7種のO群血清型に分類された．最も多かったのはO4群に属する血清型株で126株，次いでO8群73株，O7群35株，O3,10群16株，O9群7株，O1,3,19群3株及びO13群1株であった．またサルモネラ亜種Ⅱの97株はいずれもO4群であった.

これらはH-抗原との組合わせにより，サルモネラ亜種Ⅰは38の血清型に分類され，*S.* Typhimuriumが最も多く，次いで*S.* Hadar，*S.* Agona，*S.* Infantis，*S.* Derby及び*S.* Blockleyの順であった．また型別不能株が5株あった．サルモネラ亜種Ⅱの97株は全て同じ血清型に型別され，4：b：-のSofiaであった.

これらの血清型を食肉の種類別に見ると，鶏肉分離株は31種類の血清型に型別され，*S.* Typhimurium，*S.* Hadar，*S.* Infantis，*S.* Blockleyが多く，豚肉分離株は18種類の血清型に型別され，*S.* Typhimurium，*S.* Derbyが多く，また牛肉分離株は4種類の血清型に型別され，*S.* Typhimuriumが多く分離された．一方，サルモネラ亜種Ⅱの血清型Sofiaはいずれも鶏肉由来株であった.

1983年から1995年の間に分離されたサルモネラの血清型分布を表3に示した．1983～1986年までは10種類以下，それ以降わずかながら血清型の種類の増加が認められた．型別されたすべての血清型中最も分離株数の多かったの

表1　鶏肉，豚肉及び牛肉におけるサルモネラの検出状況

検体名	検体数	検出数	(%)
鶏　肉	1,266	280	(22.1)
豚　肉	1,112	70	(6.3)
牛　肉	601	8	(1.3)
合　計	2,979	358	(12.0)

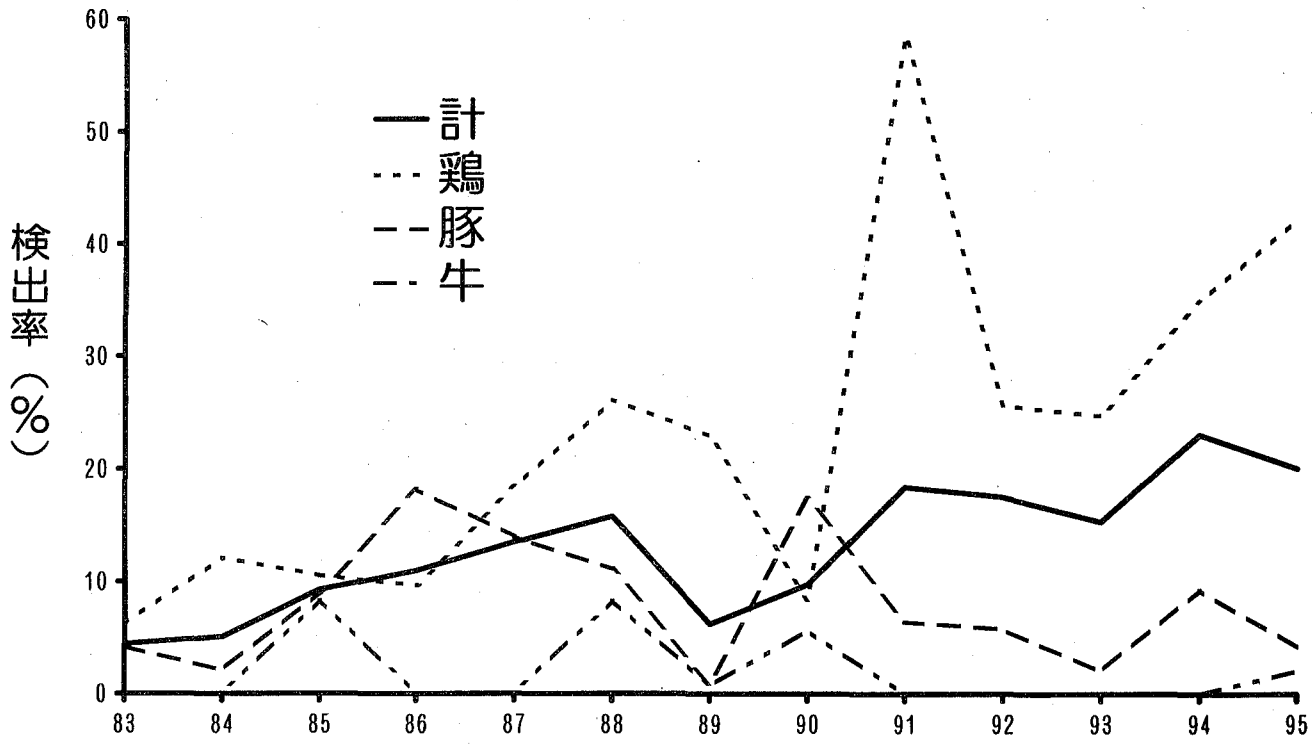


図1　1983～1995年における食肉からのサルモネラの検出状況

表2　食肉の種類別分離菌株の血清型分布

血清型		鶏肉	豚肉	牛肉	合計
サルモネラ亜種Ⅰ					
4	*S.* Typhimurium	43	13	3	59
4	*S.* Agona	9	8	2	19
4	*S.* Derby	2	13	1	16
4	*S.* Schwarzengrund	8	1		9
4	*S.* Brandenburg	1	4		5
4	*S.* Heidelberg		4		4
4	*S.* Bredeney	3			3
4	*S.* Chester	2			2
4	*S.* Paratyphi B	2			2
4	*S.* Rissen		2		2
4	*S.* Essen	1			1
4	*S.* Massenya	1			1
4	*S.* Sandiego	1			1
7	*S.* Infantis	16	3		19
7	*S.* Montevideo	4			4
7	*S.* Bareilly	3			3
7	*S.* Livingstone	1	1		2
7	*S.* Ohio	2			2
7	*S.* Thompson	1	1		2
7	*S.* Braenderup	1			1
7	*S.* Isangi	1			1
8	*S.* Hadar	42	5		47
8	*S.* Blockley	14			14
8	*S.* Newport	5			5
8	*S.* Manhattan	2	1		3
8	*S.* Chailey	2			2
8	*S.* Kentucky	1			1
9	*S.* Eenteritidis	6			6
9	*S.* Panama		1		1
3,10	*S.* Give	1	4		5
3,10	*S.* Anatum		3		3
3,10	*S.* London		2		2
3,10	*S.* Muenster	2			2
3,10	*S.* Weltevreden		1	1	2
3,10	*S.* Vejle		1		1
1,3,19	*S.* Senftenberg	2			2
1,3,19	*S.* Krefeld	1			1
13	*S.* Havana	1			1
4：l,e,n：-			1		1
4：d：-		1			1
7：b：-				1	1
8：en：-		1			1
3,10：l：-			1		1
サルモネラ亜種Ⅱ					
4	(*S.* Sofia)	97			97

表3　1983年から1995年の間に食肉から分離されたサルモネラの血清型分布

血清型／年	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
サルモネラ亜種Ⅰ													
S. Typhimurium	5	4	6	3	5	4	3	2	4	9	6	3	5
S. Hadar					1	6	8	3	5	5	2	8	9
S. Agona	1			1	1	1	2	6	1	1		2	3
S. Infantis	2		1		1		1	1	2	2	1	2	6
S. Derby	1		2				3	5	1	1	1	1	1
S. blockley							2	2		1	2	4	3
S. Schwarzengrund					4	2				2	1		
S. Enteritidis													6
S. Brandenburg				2	1						1		1
S. Give	1	2			1		1						
S. Newport						1	2						2
S. Heidelberg			3									1	
S. Montevideo								1	1			1	1
S. Anatum					1				1	1			
S. Bareilly	1				2								
S. Bredeney					1		1					1	
S. Manhattan	1		1			1							
S. Chailey											2		
S. Chester								1		1			
S. Livingstone			1										1
S. London				1						1			
S. Muenster											2		
S. Ohio										1		1	
S. Paratyphi B									2				
S. Rissen			1					1					
S. Senftenberg										1	1		
S. Thompson						1			1				
S. Weltevreden												1	1
S. Braenderup					1								
S. Essen										1			
S. Havana												1	
S. Isangi									1				
S. Kentucky											1		
S. Krefeld											1		
S. Massenya									1				
S. Panama			1										
S. Sandiego							1						
S. Vejle						1							
型別不能	1				1		1	1	1				
サルモネラ亜種Ⅱ													
(*S.* Sofia)		5	2	2	8	2	6	8	26	13	6	16	3
血清型の種類	7	3	9	5	12	9	11	10	12	14	13	14	14

は，各食肉で最も高頻度に分離されたS. Typhimuriumで，調査した13年間毎年分離された．毎年分離される傾向はS. Agona，S. Infantis及びS. Derbyにも認められた．また，2番目に分離数の多かったS. Hadarは1987年以降に毎年分離された．同様の傾向はS. Blockleyで認められ，1989年以降ほぼ毎年分離された．また，S. Enteritidisが1995年に初めて鶏肉から分離された．

考　察

サルモネラ食中毒予防対策上の基礎資料を得るために，1983年以来13年間にわたって都内の食肉処理業で取り扱われる食肉について，サルモネラ汚染状況を継続的に調査した．その結果，サルモネラの検出率が年々増加する傾向を認めた．この主な理由は，鶏肉における検出率が，1983年には6.2%であったが，その後年により多少変動はあるものの増加を続け，1995年には42.2%に達しているというように，主に鶏肉からの検出率の増加によるものであった．鶏肉については，その安全性を確保するために1992年から食鳥検査制度が施行されたが，今回の結果からはサルモネラ汚染に関する限り検査制度導入の効果は認められなかった．一方，豚肉及び牛肉のサルモネラ検出率を，1983～1990年の80年代と1991～1995年の90年代に分けてそれぞれ比較すると，豚肉では80年代は9.9%，90年代は5.6%であり，牛肉も80年代が2.9%，90年代は0.4%と減少傾向にあった．このことは，と畜場における衛生管理の向上が反映された結果ではないかと考えられた．今後更に，食肉の種類に関係なく，米国を始め欧米先進諸国で採用されつつある新しい衛生管理法のHACCP(Hazard Analysis Critical Control Point：危害分析重要管理点)システムの導入など，サルモネラ汚染防止対策法の積極的な検討が必要と思われる．

同様の調査は島根県でもなされているが[8]，サルモネラ汚染率は鶏肉で35.0%，豚肉で17.5%，牛肉で9.1%と，われわれの成績よりいずれの食肉においても高い値であった．また諸外国における鶏肉のサルモネラ検出率は英国で53.3%[9]，米国では43%[10]と報告されており，高い傾向を示している．これに対して，今回の調査で最も検出率の低かった牛肉は，都内のと畜場における調査でも，牛盲腸内容物[11]及び牛枝肉[12]のいずれからもサルモネラが検出されていないことから，一般的に牛肉のサルモネラ汚染率は低いものと考えられた．

わが国のサルモネラ食中毒事件で高頻度に認められる血清型はS. Enteritidis，S. Typhimurium，S. Thompson及びS. Hadarなどであり[13]，同様の傾向は東京都においても認められている[14]．このうちS. Typhimuriumは今回の調査ではいずれの食肉からも最も多く検出されていた．またS. Hadarは，1987年に初めて分離されて以来毎年分離されるようになり，これはわが国のサルモネラ食中毒患者からのS. Hadar分離の傾向[15]と一致していた．この他食中毒事例から分離頻度の高い血清型が食肉からも高頻度に分離されており，食肉のサルモネラ汚染がサルモネラ食中毒の発生と密接に関係していることを物語っていた．しかしながら1989年よりサルモネラ食中毒において最も多く分離されているS. Enteritidisは，われわれの調査では1995年に入り鶏肉から初めて検出された．従来S. Enteritidis食中毒の主な原因食品は卵及びその加工品[16]と報告されていたが，英国の例にみるようにS. Enteritidisの汚染率がブロイラーで高いとの報告もあり[9]，わが国でも従来産卵鶏に多く分布していたS. Enteritidisが肉用鶏にも拡散してきた可能性が示唆された．

今回の調査に於いてもみられるように，食肉から分離される血清型が年々多彩になる傾向がみられたが，これはサルモネラ食中毒起因菌の血清型の多彩化と類似するものであった．このことはサルモネラ食中毒の感染源として食肉が重要であることを血清型の分布及び推移の面からも示唆するものであり，今後も食肉のサルモネラ汚染状況を監視していく必要があろう．

要　約

1983年～1995年の13年間にわたって主に都内の食肉処理業者から採取された鶏肉，豚肉及び牛肉計2,979検体のサルモネラ汚染実態を調査した．その結果，358件(12.0%)からサルモネラが検出され，このうち，鶏肉280件(22.1%)，豚肉70件(6.3%)，牛肉8件(1.3%)であった．これらからの分離株はサルモネラ亜種Ⅰの261株と亜種Ⅱの97株に分けられ，更に亜種Ⅰは38の血清型に分類され，血清型の種類が年々多彩になる傾向が認められた．亜種Ⅰでは，S. Typhimuriumが最も多く，次いでS. Hadar，S. Agona，S. Infantisの順であった．また，S. Enteritidisが1995年に鶏肉から初めて分離された．

文　献

1）厚生省生活衛生局食品保健課：平成4年食中毒発生状況，食品衛生研究，**43**(7)，106-132，1993
2）厚生省生活衛生局食品保健課：平成5年食中毒発生状況，食品衛生研究，**44**(7)，74-100，1994
3）厚生省生活衛生局食品保健課：平成7年食中毒発生状況，食品衛生研究，**46**(8)，69-98，1996
4）丸山　努：食品衛生研究，**46**(8)，31-41，1996
5）品川邦凡，小沼博隆：食品衛生研究，**42**(10)，27-54，1992

6) 金子誠二，小久保彌太郎，丸山　努：東京衛研年報，**40**，16-21，1989
7) 石崎直人，金子誠二，伊藤　武，他：東京衛研年報，**44**，101-104，1993
8) FUKUSHIMA, H, HOSHINA, K, NAKAMURA, R, et al, Zentralbl-Bakteriol-Mikrobiol-Hyg-B, **184** (1), 60-70, 1987
9) BARROW, P. A.：Proceeding of international symposium on Salmonella and salmonellosis. Le Minor, L. et al., 141-161, 1992
10) BOKANYI, R. P. Jr, STEPHENS, J. F., FOSTER, D. N., Poult-Sci, **69**(4), 592-598, 1990
11) 宮尾陽子，島崎秀雄，向島　雄，他：東京都衛生局学会誌，**85**，144-145，1990
12) 竹重都子，増田千佳，平井昭彦，他：東京都衛生局学会誌，**88**，232-233，1992
13) 国立予防衛生研究所，厚生省保健医療局エイズ結核感染症課：病原微生物検出情報，**16**(1)，1-2，1995
14) 東京都衛生局生活環境部：東京都の食中毒概要，16-17，1995
15) 工藤泰雄：モダンメディア，**37**(5)，265-277，1991
16) 小沼博隆，品川邦汎，熊谷　進：モダンメディア，**41**(6)，18-32，1995

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6編の報告が掲載されている，このうち漢方薬及び生薬に関するものが2編，医薬部外品及び化粧品に関するものが1編，家庭用品に関するものが3編である．

寄生虫のアニサキス幼虫に運動抑制や殺虫効果を有する化合物を検索する目的で漢方薬，生薬及び香辛料の浸出液を調査研究してきた．今回はアトピー性皮膚炎(6薬剤)，糖尿病(4)，高血圧症(5)，気管支喘息(5)，肝炎・肝疾患(8)，消化器性疾患(7)に汎用される漢方方剤35薬剤を対象に検討した結果，安中散方剤の組成生薬である桂皮，良姜からそれぞれ殺線虫効果の強いけい皮アルコール(3-フェニル-2-プロペン-1-オール)と1,7-ジフェニル-4-ヘプテン-3-オンを単離し，化学構造を明らかにした，今後，更に寄生虫に対する漢方薬の調査を進めてゆく必要が認められた．

わが国で用いられている19種類の生薬，薬用植物の抗エイズウイルス(HIV)作用を調べた．その結果，蛇床子(オカゼリ果実)，樺木皮(シラカバ樹皮)，木通(アケビおよびミツバアケビの樹皮)に作用があることを見出した．今回は，特に抗HIV作用のある蛇床子の浸出液から作用成分を分離したところ，imperatorinとosthol のクマリン誘導体を単離した．これらは共に，細胞変性効果を発現する最低濃度は微量であったが，細胞毒性の強いことが判明した．今後，更に，より強い抗HIV作用を示すクマリン誘導体の開発が重要である．

化粧品や医薬部外品は薬事法で配合成分の品質，濃度等が規制されている．こらの配合成分は公定分析法が設定されていないため，今回は，核磁気共鳴(NMR)法を用いる分析法を検討している．高度で精密な2次元NMR法を用いたところ，感度の向上及び測定時間の短縮を達成することができた．この方法を，紫外線をカットする目的で配合される紫外線吸収剤の分析に応用したところ，0.01%濃度まで定性・定量分析が可能となり，市販化粧品に充分利用できることを報告している．

家庭用品による健康被害や事故などの諸問題に対応するために，家庭用品に配合される成分の検索と使用の実態を調査研究してきた．最近，衣類，文房具や家庭雑貨に抗菌素材を使った製品が増えているので，今回は，抗菌・防臭等衛生加工表示された製品に用いられる加工成分について調査を行っている．有機系抗菌剤であるチアベンダゾール(TBZ)の使用実態を調査するため，高速液体クロマトグラフィーによるTBZの分析法が検討され，この方法を用いて市販衛生加工靴下，下着等の27種類，262製品についてTBZの調査を行った．その結果，寝具，ボデイ用タオル等の11製品からTBZが検出され，これらの製品がTBZで衛生加工されていることを明らかにしている．

一般に，抗菌剤としては，クレゾール，逆性石ケンやTBZなど有機系薬剤が使用されているが，近年，重金属の金属イオンを使った無機系が開発されている．そこで，繊維用無機金属系抗菌・防臭加工薬剤の使用実態の調査を行っている．その方法は製品を分解後，高周波プラズマ発光分析(ICP)法を用いて銀，亜鉛，銅及びアルミニウムを測定する方法である．調査の結果，抗菌ゼオライトが使用されていると判定した製品は全体の約56%であり，繊維製品や雑貨品まで家庭用品に幅広く利用されていることがわかった．これらの結果から，今まで報告されていない貴重なデータを得ている．

家庭用品であるコンタクトレンズ用ケア用品の有機系防腐剤の使用実態を調査している．平成元年，レンズ保存液に角膜炎を招く恐れのあるアメーバが繁殖していることが報道され，品質になんらかの問題が認められたので，内容成分の一つである防腐剤を調査した．その結果、パラオキシ安息香酸メチル及びプロピル，ソルビン酸，安息香酸，クロルヘキシジン，ホルムアルデヒドが検出され，これらを配合したケア用品は全体の約6割であった．今回の調査したケア用品ではデヒドロ酢酸，イソプロピルメチルフェノール，サリチル酸，チアベンダゾール，イマザリル，塩化ベンザルコニウム，塩化ベンゼトニウム及びチメロサール等の防腐剤は検出されなかったと報告している．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 35-42, 1996

寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究(第8報*)
繁用される漢方薬剤の*Anisakis* I 型幼虫に対する運動抑制効果および安中散に含まれる殺虫成分の検索

鈴木　淳**, 村田以和夫**, 安田一郎***

Effects of Chinese Medicine for Helminth(VIII*)
Inhibitory Effects of Chinese Medicine on Movement of *Anisakis simplex* and Mortal Components in Anchu-san

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

About 2,000 cases of gastroenteritis in a year coursed by *Anisakis simplex* larvae have been reported in Japan in the last five years. However, there are no effective methods for the treatment of Anisakiasis without surgery.

In this report, 35 kinds of Chinese medicines applied for the treatment of atopic dermatics, hypertonia, liver disorder, diabetes, bronchial asthma and digestive disorder were tested on whether they have any effect on *Anisakis simplex*. The difference between the active principles of oriental pharmaceutical powder and that of oriental pharmaceutical docoction was found to have an impact upon larvicidal effects.

As a result of bioassays, the oriental pharmaceutical powder, Anchu-san-ka-bukuryo, has an effect on *Anisakis* larvae. And the bioassay directed for fractionation from the blume of *Cinnamomum cassia*, one of the crude drugs composed of Anchu-san-ka-bukuryo , has led to the discovery of phenylpropanoid, cinnamic alcohol (3).

Similarly, from the rhizome of *Alpinia officinarum*, diarylheptanoid of 1 , 7 -diphenyl- 4 -hepten- 3 -one (4), a larvicidal compound, was discovered. 100% Minimum lethal concentration (MLC) of compounds **3** and **4** were 0.94mM and 0.12mM, respectively. In addition, compound **4** was one of the most effective agent against the larvae.

Keywords：漢方方剤 Chinese medicine, 生薬 crude drugs, アニサキス *Anisakis simplex*, 運動抑制効果 inhibitory effect on movement, 安中散 Anchu-san, 散剤 oriental pharmaceutical powder, エキス剤 oriental pharmaceutical docoction, 殺線虫物質 larvicidal compound, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒　言

アニサキス症はその宿主である海産魚類やイカなどを生食することによりヒトに感染する．これらの幼虫は人体内で胃や腸などに穿入し，胃腸炎などの症状を引き起こす．現在までのところ外科手術と胃内視鏡による上記幼虫の摘出以外に，アニサキス症に対する積極的な治療法は確立されていないが，これまでにわが国でみられたアニサキス亜科幼線虫よる症例の累計は22,000例で1990～1993年の症例数は2,000例を越えると報告(石倉ら[1] 1994)されている．著者ら[2~9]は1988年以降，アニサキ

＊第7報，東京衛研年報，**45**，35-41，1994.

＊＊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

＊＊＊理化学部医薬品研究科

ス症の化学療法剤による治療と予防の可能性を探求する目的で，約210種の生薬と30種の香辛料のスクリーニングテストを行ってきた．さらに，それらに含有される有効化合物を単離し，本症治療の可能性を検討してきた．また同様に，動物用駆虫薬3種及び香辛料由来の殺虫成分の最小致死濃度についても報告[9]した．

今回，受診患者の多い上位5疾患のアトピー性皮膚炎，糖尿病，高血圧症，気管支喘息，肝炎・肝疾患に対し東洋医学外来で繁用される漢方方剤28薬剤並びに消化器系疾患に対して用いられている漢方方剤7薬剤のアニサキスに対する運動抑制効果について検討した．前者の28薬剤は東京都薬務部が推進している東洋医学事業で研究対象に指定された処方であり，後者の7薬剤には既に著者らによりその一部に運動抑制効果の認められた薬剤が含まれる．

今回はこれら漢方方剤35薬剤のアニサキス幼虫に対する殺虫効果を検討すると同時に，強い運動抑制効果の認められた薬剤については，その薬剤成分中の有効物質の単離を試み，既に報告[4]しているシンナムアルデヒド(1)及びアネトール(2)以外に2種の成分を得たので報告する．また，安中散の散剤とエキス顆粒剤における含有成分の違いと特有な成分も明らかにした．

材料および方法

1，*Anisakis* Ⅰ型幼虫

スケトウダラの肝臓表面に被嚢している *Anisakis* Ⅰ型幼虫を採取し，試験管内で活発なS字運動をするものだけを選び実験に用いた．

2，被検漢方方剤

Table 1に示した肝炎・肝疾患，アトピー性皮膚炎，糖尿病，高血圧症および気管支喘息の治療に用いられている漢方エキス顆粒剤28薬剤(ツムラ製)と，Table 2に示した消化器系疾患に用いる安中散，五苓散，四逆散，平胃散，柴苓散および胃苓散の各エキス顆粒剤6薬剤(ツムラ製)と生薬粉末よりなる安中散加茯苓(太田胃散製)の計7種，合計35種の漢方薬剤を用いた．

3，被検液の調製

35薬剤の成人1日投与量(3包)を各40mlの0.4%NaCl水を加え，室温で1時間振とう抽出後，3,000rpmで遠心し上澄液20mlをそれぞれ被検液母液とし，さらに，母液の1/5，1/25濃度液を0.4%NaCl水で調製した．

単離した各化合物の被検液の500 μg/mlとその2～16倍の希釈濃度で調製した．また，水不溶性物質(分画)については，ポリエチレングリコール600を加え，水可溶性物質(分画)についてはそのまま溶解して被検液とした．

4，*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果の判定法

上記各被検液をそれぞれ20mlをガラスシャーレに分注し，*Anisakis* Ⅰ型幼虫を10虫体ずつ各被検液に投入後，20℃のフラン器に収納し，1時間，3時間，24時間後に本虫体の運動性および生存状態について観察した．運動性の評価は既報[2]に準じ，以下に示す基準により判定した．また，対照として0.4%NaCl水における本虫体の運動性および生存状態について観察した．

判定基準は(−)：運動停止(死滅)，(＋)：ピンセットで直接刺激を与えるとわずかに運動する，(＋＋)：シャーレに弱い刺激を与えると自発的固有運動(巻き込み運動)を示す，(＋＋＋)：刺激を与えなくても活発なS字状運動を示すものとした．

5，HPLC試料溶液の調製

安中散エキス顆粒剤(ツムラ製)および安中散加茯苓(太田胃散製)のそれぞれ1日投与量(3包分)を水20mlとエーテル20mlで3回浸透抽出し，エーテル層を合わせ，溶媒留去後メタノール10mlに溶かした．それらの一部を0.45 μmのフィルターで濾過しHPLC試料溶液とした．安中散および安中散加茯苓の組成生薬である桂皮，良姜，延胡索，牡蛎，茴香，甘草，縮砂および茯苓は，それぞれ粉末0.5 gをメタノール40，20，20mlで振とう抽出し，遠心分離後上澄液を合わせメタノールで正確に100mlとした．そして，それらの一部を0.45 μmのフィルターに通しHPLC用試料溶液とした．

6，HPLCによる分析

HPLC装置は島津製作所製LC-9Aシステムを用い，カラムはTSK gel ODS-80TM(4.6mmI.D.×150mm，5 μm，東ソー製)を使用し，移動層は水・アセトニトリル混液でアセトニトリルの濃度を40分間にわたり10%から90%に順次直線的に上昇させた．カラム温度は40℃，流量は1.0ml/分とし，検出は紫外部254nmの波長で行った．

実験結果および考察

1，漢方方剤の*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果の検討

現在，肝炎・肝疾患，アトピー性皮膚炎，糖尿病，高血圧症および気管支喘息に対し有効とされる漢方薬剤のアニサキスの運動性に及ぼす影響をTable 1に示し，消化器系の疾患に主に用いる漢方薬剤の結果をTable 2にまとめた．

成人1日服用量に対し24時間後に濃度依存的に運動抑制効果の表れた薬剤はTable 1の結果から肝炎・肝疾患に用いられる茵蔯蒿湯，加味逍遥散そして十全大補湯の各エキス顆粒剤であった．十全大補湯はアトピー性皮膚

Table 1 Effects of Chinese Medicines Applied to Atopic Dermatics, Hypetronia. Liver Disorder, Diabetes and Bronchial Asthma, on *Anisakis simplex*

Application	Chinese Medicines	Concentration (daily dose/ml)	n*2	Degree larvae movement*1 after											
				1 hr.				3 hr.				24 hr.			
				+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
Liver disorder	Inchinko-to (茵蔯蒿湯)	1d.d.*3/40ml	10	10				4	6				2	8	
		1d.d./200ml	10	9	1			3	7				9	1	
		1d.d./1000ml	10	8	2			4	6			1	9		
	Kamishoyo-san (加味逍遥散)	1d.d./40ml	10	5	5			3	7				2	8	
		1d.d./200ml	10	6	4			2	8				10		
		1d.d./1000ml	10	5	5			4	6			4	6		
	Juzendaiho-to*4 (十全大補湯)	1d.d./40ml	10		10				10				2	8	
		1d.d./200ml	10	3	7			3	7				10		
		1d.d./1000ml	10	4	6			3	7			1	9		
	Saikokeishi-to (紫故桂枝湯)	1d.d./40ml	10	4	6			4	6			2	8		
		1d.d./200ml	10	6	4			6	4			3	7		
		1d.d./1000ml	10	5	5			6	4			2	8		
	Rikkunshi-to (六君子湯)	1d.d./40ml	10		10			5	5				10		
		1d.d./200ml	10	3	7			3	7			2	8		
		1d.d./1000ml	10	4	6			5	5			1	9		
	Keishibukuryo-gan (桂枝茯苓丸)	1d.d./40ml	10	6	4			4	6				10		
		1d.d./200ml	10	8	2			5	5			1	9		
		1d.d./1000ml	10	8	2			10				2	8		
	Shosaiko-to*5 (小柴胡湯)	1d.d./40ml	10	6	4			3	7				10		
		1d.d./200ml	10	6	4			5	5			3	7		
		1d.d./1000ml	10	8	2			6	4			4	6		
	Hochuekki-to (補中益気湯)	1d.d./40ml	10	3	7			3	7				10		
		1d.d./200ml	10	8	2			4	6			1	9		
		1d.d./1000ml	10	5	5			7	3				10		
Atopic dermatics	Shohu-san (消風散)	1d.d./40ml	10	3	7			7	3				10		
		1d.d./200ml	10	5	5			7	3				10		
		1d.d./1000ml	10	6	4			8	2			3	7		
	Orengedoku-to*6 (黄連解毒湯)	1d.d./40ml	10	8	2			8	2			3	7		
		1d.d./200ml	10	10				5	5			3	7		
		1d.d./1000ml	10	8	2			5	5				10		
	Jumihaidoku-to (十味敗毒湯)	1d.d./40ml	10		10			1	9				10		
		1d.d./200ml	10	4	6			8	2			6	4		
		1d.d./1000ml	10	6	4			7	3			5	5		
	Unseiin (温清飲)	1d.d./40ml	10	4	6			3	7				10		
		1d.d./200ml	10	10				8	2			3	7		
		1d.d./1000ml	10	9	1			7	3			2	8		
	Dizusoippo (治頭瘡一方)	1d.d./40ml	10	3	7			3	7				10		
		1d.d./200ml	10	6	4			5	5				10		
		1d.d./1000ml	10	5	5			5	5			2	8		
	Tokiinshi (当婦飲子)	1d.d./40ml	10	2	8			5	5				10		
		1d.d./200ml	10	8	2			7	3			3	7		
		1d.d./1000ml	10	9	1			8	2			2	8		
	Control	0.4% NaClaq.	10	6	4			2	8				10		

Application	Chinese Medicines	Concentration (daily dose/ml)	n*2	Degree larvae movement*1 after											
				1 hr.				3 hr.				24 hr.			
				+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
Hypertonia	Choto-san (釣藤散)	1d.d.*3/40ml	10	10				10					10		
		1d.d./200ml	10	9	1			10				2	8		
		1d.d./1000ml	10	9	1			9	1			1	9		
	Shitimotukoka-to (七物降下湯)	1d.d./40ml	10		10				10				10		
		1d.d./200ml	10	1	9			6	4			2	8		
		1d.d./1000ml	10	6	4			6	4			2	8		
	Sanosyasin-to (三黄瀉心湯)	1d.d./40ml	10	4	6			5	5				10		
		1d.d./200ml	10	4	6			4	6				10		
		1d.d./1000ml	10	4	6			5	5				10		
	Daisaiko-to (大紫胡湯)	1d.d./40ml	10	4	6			6	4				10		
		1d.d./200ml	10	7	3			7	3			2	8		
		1d.d./1000ml	10	8	2			4	6				10		
	Saiko-ka-ryukotuborei-to (紫胡加竜骨牡蛎湯)	0.5d.d./40ml	10	8	2			7	3			2	8		
		0.5d.d./200ml	10	7	3			8	2			1	8	1	
		0.5d.d./1000ml	10	7	3			8	2			4	6		
Diabetes	Hachimijiogan (八味地黄丸)	1d.d./40ml	10	9	1			7	3				9	1	
		1d.d./200ml	10	5	5			7	3			1	9		
		1d.d./1000ml	10	6	4			4	6			1	9		
	Goshajinki-gan (牛車腎気丸)	1d.d./40ml	10	5	5			4	6			1	9		
		1d.d./200ml	10	5	5			4	6			2	8		
		1d.d./1000ml	10	7	3			6	4			2	8		
	Rokumigan (六味丸)	1d.d./40ml	10	3	7			2	8				10		
		1d.d./200ml	10	4	6			4	6			1	9		
		1d.d./1000ml	10	4	6			6	4				10		
	Seishinrenshi-in (清心蓮子飲)	1d.d./40ml	10	3	7			5	5				10		
		1d.d./200ml	10	3	7			5	5				10		
		1d.d./1000ml	10	4	6			7	3			4	6		
Bronchial asthma	Saiboku-to (紫朴湯)	0.5d.d./40ml	10	6	4			8	2				10		
		0.5d.d./200ml	10	6	4			9	1				10		
		0.5d.d./1000ml	10	5	5			7	3				10		
	Shoseiryu-to (小青竜湯)	1d.d./40ml	10	2	8			6	4				10		
		1d.d./200ml	10	4	6			3	7			3	7		
		1d.d./1000ml	10	4	6			2	8			1	9		
	Makyokanseki-to (麻杏甘石湯)	1d.d./40ml	10	7	3			7	3			1	9		
		1d.d./200ml	10	3	7			7	3			3	7		
		1d.d./1000ml	10	5	5			7	3			2	8		
	Shinpi-to (神秘湯)	1d.d./40ml	10	4	6			2	8				10		
		1d.d./200ml	10	6	4			3	7				10		
		1d.d./1000ml	10	3	7			2	8				10		
	Ryokankyomi-shinginin-to (苓甘姜味辛夏仁湯)	1d.d./40ml	10	4	6			5	5			2	8		
		1d.d./200ml	10	8	2			10				2	8		
		1d.d./1000ml	10	10				10				4	6		

Note) * 1 : +++ ; Movement as S-shape strongly ++ ; Movement as coil moderately + ; A little movement by stimulus
− ; Death
Note) * 2 : No. of Samples tested Note) * 3 : d. d. ; daily dose
Note) * 4 : Apply to atopic dermatics, too. Note) * 5 : Apply to atopic and bronchial asthma, too.
Note) * 6 : Apply to hypertonia, too.

Table 2 Effects of Chinese Medicines for Digestive Disorder on *Anisakis simplex*

Chinese Medicines	Concentration (daily dose/ml)	n*2	Degree larvae movement*1 after											
			1 hr.				3 hr.				24 hr.			
			+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
Anchu-san-ka-bukuryo (安中散加茯苓)	1d.d.*3/40ml	10	1	9				10						10
	1d.d./200ml	10	6	4			6	4				10		
	1d.d./1000ml	10	5	5			5	5			3	7		
Anchu-san (安中散)	1d.d./40ml	10	3	7			3	7			4	6		
	1d.d./200ml	10	6	4			5	5			3	7		
	1d.d./1000ml	10	4	6			7	3			3	7		
Heii-san (平胃散)	1d.d./40ml	10		10			3	7					10	
	1d.d./200ml	10	5	5			6				1	9		
	1d.d./1000ml	10	5	5			6	4			3	7		
Gorei-san (五苓散)	1d.d./40ml	10	3	7			3	7				10		
	1d.d./200ml	10	4	6			3	7			3	7		
	1d.d./1000ml	10	4	6			5	5			6	4		
Shigyaku-san (西逆散)	1d.d./40ml	10	5	5			6	4			3	7		
	1d.d./200ml	10	8	2			7	3			4	6		
	1d.d./1000ml	10	10				9	1			7	3		
Sairei-to (紫苓湯)	0.5d.d./40ml	10	6	4			5	5				10		
	0.5d.d./200ml	10	7	3			8	2			3	7		
	0.5d.d./1000ml	10	9	1			8	2			3	7		
Irei-to (胃苓湯)	1d.d./40ml	10	2	8			3	7				10		
	1d.d./200ml	10	7	3			8	2			3	7		
	1d.d./1000ml	10	4	6			6	4			4	6		
Control	0.4%NaCl aq.	10	6	4			2	8				10		

Note)* 1 ：+++ ; Movement as S-shape strongly ++ ; Movement as coil moderately ＋ ; A little movement by stimulus
− ; Death

Note)* 2 ：No. of Samples tested Note)* 3 ：d. d. ; daily dose

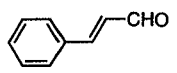
炎にも有効として用いられる漢方薬剤である．これらの原料生薬は茵蔯蒿湯ではサイシン，インチンコウ，ダイオウ，加味逍遥散ではサイコ，シャクヤク，ソウジュツ，トウキ，ブクリョウ，サイシン，ボタンピ，カンゾウ，ショウキョウ，ハッカ，十全大補湯ではオウギ，ケイヒ，ジオウ，シャクヤク，センキュウ，ソウジュツ，トウキ，ニンジン，ブクリョウ，カンゾウとなっており，その原料に共通性は乏しい．

一方，Table 2に示したように散剤である安中散加茯苓には，運動抑制効果を越える強い殺虫効果が認められ，平胃散エキス顆粒剤には運動抑制効果が認められた．これらの原料生薬は安中散加茯苓ではケイヒ，エンゴサク，ボレイ，ウイキョウ，カンゾウ，リョウキョウ，シュクシャ，ブクリョウ，平胃散ではソウジュツ，コウボク，チンピ，タイソウ，カンゾウ，ショウキョウから成り，他剤に比べこれらには芳香性の富む生薬が多く配合されていることが殺虫効果の差に影響を及ぼすものと思われる．

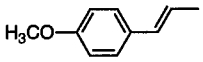
2，殺虫効果を示す活性成分の化学構造

安中散加茯苓に含まれる殺虫成分として既にFig. 1に示したケイヒアルデヒド(1)及びアネトール(2)が明らかにされている．今回新たに検索したところ，ケイヒのヘキサン抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフを用いヘキサン－酢酸エチル(4：1→2：1)で溶出し単離した結果，HPLC上ピーク3 (Fig. 2)と一致する無色結晶ケイヒアルコール(3)を得た．**3**のNMRスペクトルデータは以下の通りで，**3**は直接標品とHPLCのピークおよびスペクトルデータを比較することにより，その化学構造を明らかにした．

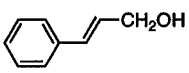
3：^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 7.38 (2 H, d, J=7. 3 Hz),



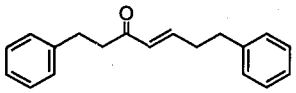
cinnamic aldhyde (1)



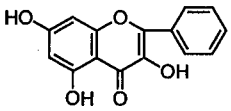
anethole (2)



cinnamic alcohol (3)



1,7-diphenyl-4-hepten-3-one (4)



galangin (5)

Fig. 1 The Natural Compounds Isolated from Anchu-san-ka-bukuryo

7.32 (2 H, dd, J=7. 3 Hz), 7.24 (1 H, dd, J=7.3Hz), 6.61 (1 H, d, J=15.8Hz), 6.35 (1 H, dt, J=15.8, 5.5Hz), 4.30 (2 H, d, J=4.9Hz), 1.78 (1 H, bs)

また，同様にリョウキョウから，そのヘキサン分画をシリカゲルカラムクロマトグラフを用いヘキサン－酢酸エチル(10：1→4：1)で溶出し単離した結果，HPLC上ピーク4 (Fig. 2)と一致する無色油状物質，1,7-diphenyl-4-hepten-3-one(4)を得た．**4**のNMR及びMSスペクトルデータは以下の通りで，そのスペクトルデータからジアリルヘプタノイドと推定し，その文献値[10]と比較することにより1，7-diphenyl-4-hepten-3-one(4)に誤りのないことを確認した．(Fig. 1)

4：^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ 199.41, 146.26, 141.62, 140.6, 130.65, 128.46, 128.43, 126.19, 126.02, 41.66, 34.36, 34.10, 30.03, MS m/z(%)：264(M+, 11.2), 172(7.4), 159(81.9), 131(17.8), 105(20.8), 91(100), 77(8.4), 65(17.3)

Anisakis I型幼虫の運動性に及ぼす影響についての検討結果とすでに明らかな活性成分1および2の本虫に対する運動性に及ぼす影響についての結果をTable 3に示した．

この結果から，ケイヒから単離したケイヒアルコールの最小致死濃度(MLC)は0.93mMであり，ウイキョウ由

Table 3 Effects of the Compounds Isolated from Oriental Pharmaceutical Powder "Anchu-san-ka-bukuryo" on *Anisakis simplex*

Chinese Medicines	Concentration (μg/ml)	n*2	Degree Iarvae movement*1after											
			1 hr.				3 hr.				24hr.			
			+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
cinnamic aldehyde (1)	500 μg/ml	10			4	6				10				10
	250 μg/ml	10		1	9				3	7				10
	125 μg/ml	10			10				10					10
	62.5 μg/ml	10	3	6	1		2	8						10
	31.25 μg/ml	10	5	5			3	7					10	
anethole (2)	500 μg/ml	10				10				10				10
	250 μg/ml	10				10				10				10
	125 μg/ml	10			10				10					10
	62.5 μg/ml	10		1	9			5	5			2	8	
cinnamic alcohol (3)	500 μg/ml	10	1	9				5	5					10
	250 μg/ml	10	3	7			7	3						10
	125 μg/ml	10	4	6			3	7						10
	62.5 μg/ml	10	4	6			7	3					6	4
1,7-dipheny 1-4-hepten-3-one (4)	500 μg/ml	10	9	1					7	3				10
	250 μg/ml	10	9	1				1	7	2				10
	125 μg/ml	10	8	2					10					10
	62.5 μg/ml	10	8	2					10					10
	31.25 μg/ml	10	6	4					10					10
	15.63 μg/ml	10	1	9					10				6	4
Control	0.4%NaClaq.	10	6	4			2	8				10		

Note) * 1 : +++ ; Movement as S-shape strongly ++ ; Movement as coil moderately + ; A little movement by stimulus
− ; Death

Note) * 2 : No. of Samples tested

来のアネトールのMLC(0.84mM)とほぼ等しいことが判明した．また，ジアリルヘプタノイドである4は最小致死濃度(MLC)が0.12mMと既に著者ら[9]が報告している香辛料のウコンより単離した(+)-*ar*-turmeroneのMLC(0.12mM)と等しく，最も強い殺虫成分であることが明らかとなった．

3，安中散エキス顆粒剤および散剤のHPLCによる検討

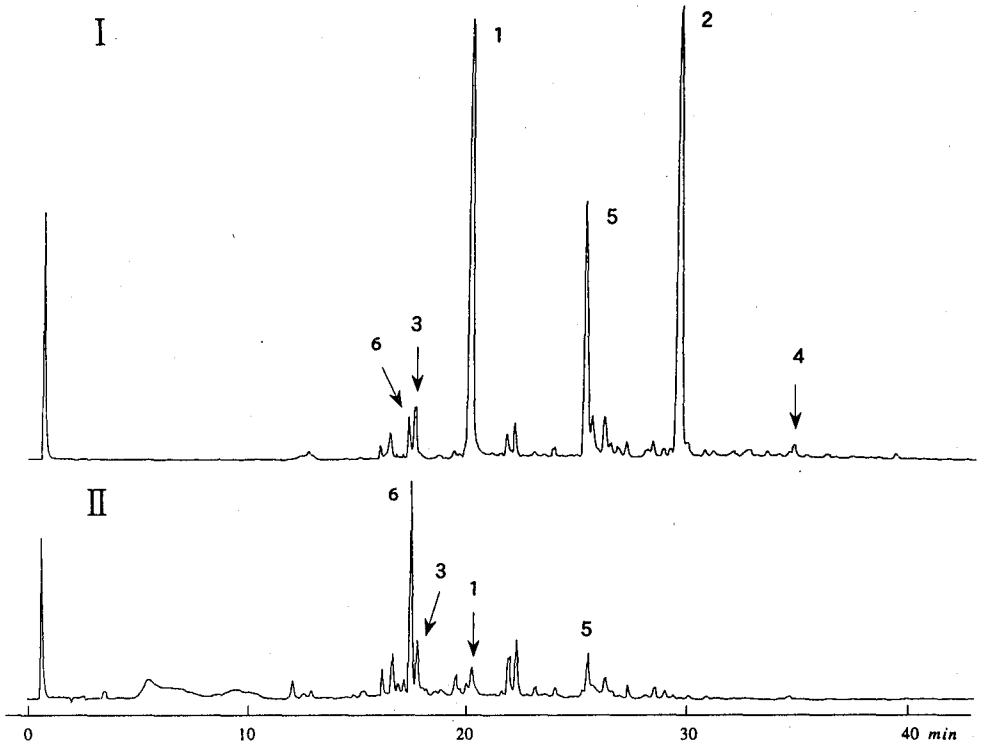
安中散のエキス顆粒剤と散剤で運動抑制効果に違いが生じることからエキス顆粒剤である安中散と散剤である安中散加茯苓のエーテル可溶画分について成分の比較検討を行った．両者を明瞭に識別できるHPLCでの分析結果をFig．2に示した．

Fig．2から明らかのように散剤(Ⅰ)では，大きなピークとして化合物**1**，**2**を中心に**3**，**5**，**6**が表れ，**4**も小さなピークとして確認することができる．一方，エキス顆粒剤(Ⅱ)では化合物**6**を主成分として**1**，**3**，**5**を検出することができた．しかし**1**，**5**の含量は極めて低いことが判明し，**2**及び**4**は確認することができないことが明らかになった．HPLC上ピーク5は良姜のクロロホルム分画をシリカゲルカラムクロマトグラフを用いクロロホルム－メタノール(20：1→10：1)で溶出し単離し，Fig．1に示した黄色結晶物質ガランギン(5)を得た．また，本物質の同定はNMRの文献値と比較により行った．

5の*Anisakis* Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果の検討した結果，殺虫性は認められなかった．すなわち，*Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動性に強い影響を与える化合物**2**，**4**が含まれず，さらに**1**，**3**の含量が低いことが安中散エキス顆粒剤に運動抑制効果が出現しない理由であると考えられる．そして今回の実験から*Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動抑制効果と殺虫成分の含量は相関性の高いものと推察された．本虫の運動抑制効果と殺虫成分の含量の相関性を他の漢方方剤についても検討し，さらに殺虫性の高い成分の発見につなげていきたい．

ま と め

スケトウダラより採取した*Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動性および生存時間に及ぼす影響について漢方方剤35薬剤を検討した．その結果，肝炎・肝疾患に用いられる茵蔯蒿湯，加味逍遥散そして十全大補湯の各エキス顆粒剤，消化器系疾患に用いる平胃散に運動抑制効果を持つものが



Fig．2 HPLC Chromatograms of the Ether Fraction of Oriental Pharmaceutical Powder "Anchu-san-ka-bukuryo" (Ⅰ) and Oriental Pharmaceutical Docoction "Anchu-san" (Ⅱ)

1：cinnamic aldehyde，**2**：anethole，**3**：cinnamic alcohol，**4**：1,7-diphenyl-4-hepten-3-one，**5**：galangin，**6**：unknown

Column：TSK gel ODS-80T_M (4.6mm I．D．×150mm，μm，TOSO)，mobile phase：acetonitrile-water (1：9)→40min．liner gradient→acetonitrile-water (9：1)，detection：UV 254nm，flow rate：1ml/min，column temperature：40℃，injection volume：10μl，attenuation：1；2^{10}mV，Ⅱ；2^{9}mV

認められた．安中散については散剤では強い運動抑制効果(殺虫効果)を認めたもののエキス顆粒剤では効果が表れなかった．そこで，殺虫効果が認められた散剤について生物活性試験を併用しながら成分検索を行い，今回新たにケイヒ由来のケイヒアルコール(3)，リョウキョウ由来のジアリルヘプタノイド**4**を単離し，その化学構造を明らかにした．HPLC分析により安中散のエキス顆粒剤と散剤の成分含量の比較を行ったところ，これらの活性成分物質の含量にかなりの違いのあることが判明した．したがって，*Anisakis* Ⅰ型幼虫の運動抑制効果と殺虫成分の含量は相関性の高いものと推察された．

文　献

1）石倉　肇，菊池浩吉，佐藤昇志，他：寄生虫学雑誌，**43**，1，(補)，46-47，1994

2）村田以和夫，宮沢貞夫，安田一郎，他：東京衛研年報，**39**，15-18，1988

3）村田以和夫，宮沢貞夫，安田一郎，他：東京衛研年報，**39**，19-23，1988

4）安田一郎，高野伊知郎，濱野朋子，他：東京衛研年報，**39**，24-27，1988

5）村田以和夫，宮沢貞夫，安田一郎，他：東京衛研年報，**40**，46-52，1989

6）安田一郎，高野伊知郎，濱野朋子，他：東京衛研年報，**40**，46-52，1989

7）村田以和夫：寄生虫学雑誌，**40**，1，(補)，131，1991

8）村田以和夫，安田一郎：東京衛研年報，**43**，33-38，1992

9）鈴木　淳，村田以和夫，安田一郎：東京衛研年報，**45**，35-41，1994

10）H.Itokawa，M.Morita，S.Mihashi：*Chem. Pharm. Bull.*，**29**，2383-2385，1981

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 43-48, 1996

生薬に含まれる抗HIV作用物質の検索(第2報*)
抗HIV作用のスクリーニングと蛇床子中のクマリン

安田　一郎*2, 塩田　寛子*2, 浜野　朋子*2, 瀬戸　隆子*2, 佐藤かな子*2,
大西　和夫*2, 渡辺四男也*2, 田部井由紀子*3, 門間　公夫*3, 貞升　健志*3,
森　　功次*3, 関根　大正*3, 高野伊知郎*4, リークオシオン*5

Search for Anti-HIV Principle in Crude Drugs (II*)
Screening of Anti-HIV Effect and Coumarin as an Anti-HIV Principle from Fruits of *Cnidium monnieri*

ICHIRO YASUDA*2, HIROKO SHIODA*2, TOMOKO HAMANO*2, TAKAKO SETO*2,
KANAKO SATOH*2, KAZUO OHNISHI*2, YOHYA WATANABE*2, YUKIKO TABEI*3,
KIMIO MONMA*3, KENJI SADAMASU*3, KOHJI MORI*3, HIROMASA SEKINE*3,
ICHIRO TAKANO*4 and KUO-HSIUNG LEE*5

Examination was made of the anti-HIV effects of 19 crude drugs and medicinal plants *in vitro*. The MeOH extracts of the fruits of *Cnidium monnieri* (L.) Cusson (*Umbelliferae*), the bark of *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* (Miq.) Hara (*Betulaceae*), the bark of *Akebia quinata* (Thunb.) Decaisne (*Lardizabalaceae*) and the bark of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. (*Lardizabalaceae*) were found to express anti-HIV activity.

Initial bioactivity-guided solvent fractionation of the MeOH extract of the fruits of *Cnidium monnieri* with *n*-hexane, $CHCl_3$, acetone and MeOH by celite column chromatography yielded an anti-HIV active *n*-hexane fraction. By repeated bioassay-directed chromatography of the fraction on silica gel, coumarin **1** and **2** were isolated.

The structures of **1** and **2** were assigned as imperatorin and osthol based on comparisons of physical and spectral data with those of authentic samples. The minimum anti-cytopathogenic effective doses for six days were as follows (μg/ml); **1**: 62.5, **2**: 31.3, and the minimum cytotoxic doses for six days (μg/ml); **1**: 500, **2**: 31.3. The therapeutic index values were found to be 8 and 1. The HPLC analytical results showed that the contents of **1** were 0.78% and 15% in the fruits and the MeOH extract.

Keywords: 抗HIV anti-HIV, 生薬 crude drug, 薬用植物 medicinal plant, 作用物質 principle, 単離 isolation, 蛇床子 fruits of *Cnidium monnieri*, クマリン coumarin, インペラトリン imperatorin, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

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の治療薬および感染者の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

＊第1報，東京衛研年報，**46**，53-57，1995.

*2 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
*2 The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
*3 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
*4 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科
*5 ノースカロライナ大学チャペルヒル校

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，造血機能の抑制や膵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]．これまで，著者らは，より細胞毒性が低くかつ有効性のある薬剤を開発することを目的に，作用の緩和な生薬について抗HIV作用物質の検索を進めてきた[4,5]．

前報[6]で，滋養強壮薬の原料として用いられる生薬を中心に，抗HIV作用を調べたところ，巴戟(ソウキョウ)に強い作用を認め，その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gleditsia saponin Cを単離し，報告した．一方，山崎ら[7-9]は約200種の生薬の水抽出物および熱水抽出物についてのスクリーニングを実施し，外用剤として用いられることの多い紫根に強い抗HIV作用が現れること，また，主に分子量約1,300の物質からなる画分に作用物質が存在することを報告している．

今回，著者らは皮膚科領域で外用剤として用いられる生薬および古くから民間で伝承されている薬用植物19種について抗HIV作用のスクリーニングを実施した．その結果，白癬菌感染症に対して用いられる蛇床子(オカゼリ果実)[10]をはじめ，利尿作用の強い木通(アケビおよびミツバアケビの樹皮)[11]，抗菌作用が強く，去痰作用があるといわれている樺木皮(シラカバ樹皮)[12]に，HIV感染による細胞障害を抑制する作用があることを見出した．そして，蛇床子について作用成分の検索を行い，クマリン誘導体であるimperatorin(1)を明らかにするとともに，同じクマリン誘導体であり，1より細胞毒性が高いosthol(2)を同時に単離した．さらに，1の含量と抗HIV作用との関係について若干の考察を加えたので合わせて報告する．

実験の部

1．実験材料およびスクリーニング用試料の調製

実験材料とした生薬，薬用植物の基原植物，使用部位をTable 1に示した．これらは根部4種，樹皮4種，葉部4種，果実2種，根茎2種など計19種である．植物は1995年8月長野県茅野市採集品および東京都薬用植物園栽培品，生薬は東京市場品を用いた．

植物は室内で乾燥した後，切断し，粉末とした．生薬はそのまま粉末とした．これらはそれぞれ約50 g を量り，10倍量のメタノールを加え室温で一昼夜放置し抽出した．抽出液はろ過後溶媒を減圧留去し，残留するメタノール抽出物をスクリーニング用試料とした．

2．抗HIV作用の判定

抗HIV作用の判定はマイクロプレート法[2,13]に従った．MT-4細胞はHIV-1に対して高い感受性を持ち，HIV感染後3-5日で細胞変性効果(Cytopathogenic Effect；以下CPEと略す)が出現し，ほとんどの細胞が死滅する．

Table 1．Crude Drugs and Medicinal Plants Assayed

No	Crude drugs and Medicinal plants (Japanese name)	Plant names	Parts
1	CNIDII MONNIERI FRUCTUS (蛇床子)	*Cnidium monnieri*	Fruit
2	BETULI CORTEX (樺木皮)	*Betula platyphylla* var. *japonica*	Bark
3	AKEBIAE CAULIS (木通)	*Akebia quinata*	Bark
4	AKEBIAE CAULIS (木通)	*Akebia trifoliata*	Bark
5	POLYGALAE RADIX (遠志)	*Polygala tenuifolia*	Bark
6	CLEMATIDIS RADIX (威霊仙)	*Clematis chinensis*	Root
7	ZIZYPHI SPINOSI SEMEN (酸棗仁)	*Zizyphus jujuba*	Seed
8	PRUNELLAE SPICA (夏枯草)	*Prunella vulgaris*	Spike
9	UVAE URSI FOLIUM (ウワウルシ)	*Arctostaphylos uva ursi*	Leaf
10	PEUCEDANI RADIX (前胡)	*Peucedanum praeruptorum*	Root
11	KAKI CALYX (柿蒂)	*Diospyros kaki*	Calyx
12	ERIOBOTRYAE FOLIUM (枇杷葉)	*Eriobotrya japonica*	Leaf
13	QUERCUSI FOLIUM (白樫)	*Quercus myrsinaefolia*	Leaf
14	QUERCUSI FOLIUM (裏白樫)	*Quercus salicina*	Leaf
15	SENEGAE RADIX (セネガ)	*Polygala senega* var. *latifolia*	Root
16	PLATYCODI RADIX (桔梗)	*Platycodon grandiflorum*	Root
17	CORNI FRUCTUS (山茱萸)	*Cornus officinalis*	Fruit
18	PANACIS JAPONICI RHIZOMA (竹節人参)	*Panax japonicum*	Rhizoma
19	GINSENG RADIX (人参)	*Panax ginseng*	Rhizoma

このことから本法は，顕微鏡下の観察によりCPEの発現が，添加試料により抑制されるか否かを判定するものである．

著者らはMT-4細胞に100$TCID_{50}$/mlのHIV-1ウイルスを37℃で1時間吸着させ，10%仔牛血清を加えたRPM11640培養液で細胞懸濁液を調製し，メタノールに溶かした試料をこれに加え，37℃で，3日間培養した．その後，プレートから1/5～1/3の細胞を，試料を加えた新しい培養液に移しかえ，さらに3日間培養した．判定は感染後6日目に行った．対照にはAZTと同様，非感染細胞および試料無添加細胞を用いた．作用の評価は試料が細胞毒性を示す最低濃度を，HIV感染によるCPE発現の抑制がみられる最低濃度で割った値である治療指数(Therapeutic Index，以下TIと略す)値として表した．

3．蛇床子のメタノール抽出物から抗HIV作用成分の単離

抗HIV作用成分の単離には，果実の形態からオカゼリの果実と鑑別される[10]中国貴州省産の蛇床子を用いた．粉末とした後，その1.5kgにメタノール5lを加え，室温で2日間放置し抽出した．本操作を3回繰り返して，抽出液を合し，溶媒を減圧留去したところ，残留するメタノール抽出物を122g得た(Fig. 1)．これをセライト200gに添加してよく吸着させ，カラムに充てんした後，ヘキサン，クロロホルム，アセトン，メタノール各3lで順次溶出した．各溶出液は，溶媒を減圧留去し，ヘキサン画分，クロロホルム画分，アセトン画分およびメタノール画分とした．

ヘキサン画分からの**1**および**2**の精製はFig. 2に従って実施した．すなわち，ヘキサン画分15.0gをヘキサン20mlに溶かし，シリカゲル150gを充てんしたカラムに付加した．溶出溶媒はヘキサン-酢酸エチル混液を用い，ヘキサン-酢酸エチル混液(1：2)溶出画分(Fr. 6)はさらに溶媒を減圧留去した後，シリカゲルカラムにかけ，

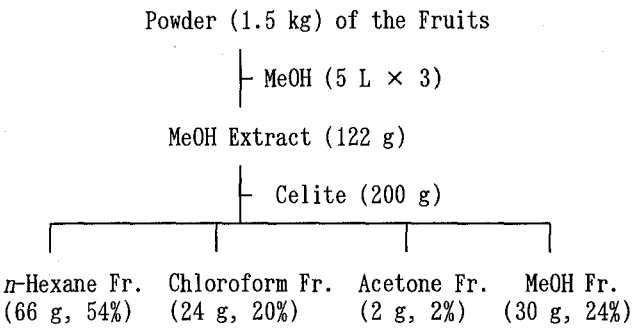


Fig. 1．Flow Diagram of Extraction and Fractionation of Fruits of *Cnidium monnieri*

クロロホルム-メタノール混液(50：1)より化合物**1** 240mgを単離した．また，ヘキサン-酢酸エチル混液(10：4)溶出画分(Fr. 4)の溶媒を減圧留去し，化合物**2** 800mgを単離した．

1および**2**の物理定数，スペクトルデータは以下のとおりである．

1：mp. 102℃ (EtOH)，UV λ_{max} nm：301, 249, 219，IR ν_{max} cm^{-1}：1722, 1587, 1402, 1150, 877，^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ：1.60 (6H, s)，4.89 (2H, d, J=7.2Hz)，5.49 (1H, m)，6.24 (1H, dd, J=4.1, 9.6Hz)，6.69 (1H, m)，7.24 (1H, m)，7.58 (1H, d, J=2.3Hz)，7.65 (1H, d, J=9.6Hz)，^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ：18.02, 25.72, 70.07, 106.66, 113.13, 114.56, 116.42, 119.72, 125.81, 131.57, 139.63, 143.74, 144.30, 146.54, 148.53, 160.46，MS (m/z)：270 (M^+)．

2：mp. 83℃ (Ether)，UVλ_{max}nm：322, 258，^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ：1.67 (3H, s)，1.84 (3H, s)，3.53 (2H, d, J=7.3Hz)，3.92 (3H, s)，5.23 (1H, m)，6.23 (1H, d, J=9.8Hz)，6.84 (1H, d, J=8.6Hz)，7.29 (1H, d, J=8.6Hz)，7.62 (1H, d, J=9.8Hz)，^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ：17.89, 21.86, 25.75, 55.99, 107.29, 112.90, 117.86, 121.06, 126.17, 132.61, 143.76, 152.72, 160.14, 161.39，MS (m/z)：244 (M^+)．

4．Imperatorin (1) の定量

1の定量はSagaraらの方法[14]に準じて，HPLCで行った．

HPLC試料溶液の調製：蛇床子は粉末とし，その約0.2gを精密に量り，メタノール30mlで振とう抽出を3回繰り返した．遠心分離して得られた上澄液を合わせ，

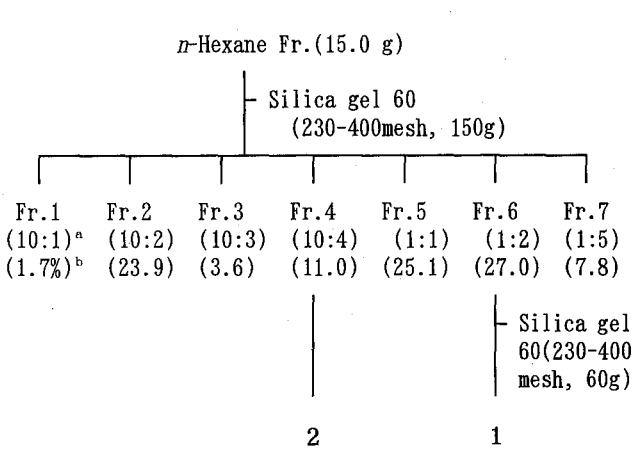


Fig. 2．Flow Diagram of Isolation of **1** and **2** from the *n*-Hexane Fraction
a：Eluted solvent, made of *n*-hexane/ethyl acetate mixture
b：Yield, on the basis of *n*-Hexane Fr.

メタノールで正確に100mlとした．この一部を0.45 μmのフィルターに通し，HPLC試料溶液とした．

メタノール抽出物は約20mgを精密に量り，メタノールに溶かして正確に100mlとした．この一部を0.45 μmのフィルターに通し，HPLC試料溶液とした．

HPLC条件：カラムは TSKgel ODS-80T_M(4.6 mm I.D. ×150 mm, 5 μm, 東ソー製)を用い，移動相はアセトニトリル-水混液(1：1)を使用した．カラム温度は40℃，流速は1.0ml/分，試料溶液を10 μl注入し，UV 280 nmで検出した．

1のピーク高さから求めた検量線は良好な直線性を示し，回帰直線および相関係数は以下のとおりであった．

$$y=5.77\times10^5x+1.11\times10^2 \quad (r=0.9999)$$

y：ピーク高さ

x：注入量(μg)

結果および考察

1．生薬および薬用植物メタノール抽出物の抗HIV作用

柿蒂，裏白樫，枇杷葉など19種類の生薬，薬用植物のメタノール抽出物について，500 μg/ml以下の各濃度で抗HIV作用を調べた．Table 2に示すように蛇床子，樺木皮，木通は62.5 μg/ml，遠志は125 μg/ml，威霊仙は250 μg/mlで抗HIV作用が現れた．他は，CPE発現抑制と細胞毒性が同程度か，あるいは細胞毒性の方が強く出現し，TI値が1以下であった．

夏枯草は，山崎らの報告[7]によれば抗HIV作用を示すとされているが，今回の実験結果ではTI値が1であり，有効と判定されるものではなかった．山崎らの抗HIV作用の判定は，著者らとは異なる水抽出物について行っており，それが評価の違いとなったものと考えている．

2．蛇床子より作用成分の単離と構造解析

最も強く抗HIV作用を示した実験材料のうち蛇床子のメタノール抽出物について成分検索を行った．Fig. 1に示すようにヘキサン，クロロホルム，アセトンおよびメタノール画分に分け，抗HIV作用の評価を行ったところ，ヘキサン画分：62.5 μg/ml (TI=4)，クロロホルム画分：250 μg/ml (TI=2)，アセトン画分：250 μg/ml (TI=2)およびメタノール画分：500 μg/ml (TI=1)の結果を得，ヘキサン画分に強い作用が認められた．

そこで，ヘキサン画分を，ヘキサン-酢酸エチル混液

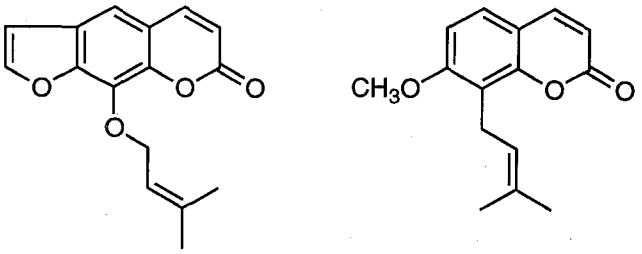
Table 2. Anti-HIV Activities, Cytotoxicities and Therapeutic Index of MeOH Extracts of 19 Crude Drugs and Medicinal Plants

No	Crude drugs and medicinal plants (Japanese name)	Yield of extract (%)	ED[a] (μg/ml)	CD[b] (μg/ml)	TI[c]
1	CNIDII MONNIERI FRUCTUS (蛇床子)	4.8	62.5	250	4.0
2	BETULI CORTEX (樺木皮)	18.1	62.5	125	2.0
3	AKEBIAE CAULIS (木通)	11.1	62.5	125	2.0
4	AKEBIAE CAULIS (木通)	12.4	62.5	125	2.0
5	POLYGALAE RADIX (遠志)	31.6	125	250	2.0
6	CLEMATIDIS RADIX (威霊仙)	16.6	250	>500	>2.0
7	ZIZYPHI SPINOSI SEMEN (酸棗仁)	11.8	62.5	62.5	1.0
8	PRUNELLAE SPICA (夏枯草)	2.6	62.5	62.5	1.0
9	UVAE URSI FOLIUM (ウワウルシ)	40.9	62.5	62.5	1.0
10	PEUCEDANI RADIX (前胡)	26.4	62.5	62.5	1.0
11	KAKI CALYX (柿蒂)	9.8	62.5	62.5	1.0
12	ERIOBOTRYAE FOLIUM (枇杷葉)	18.8	125	125	1.0
13	QUERCUSI FOLIUM (白樫)	16.0	125	125	1.0
14	QUERCUSI FOLIUM (裏白樫)	15.0	125	125	1.0
15	SENEGAE RADIX (セネガ)	34.3	125	62.5	0.5
16	PLATYCODI RADIX (桔梗)	16.6	250	250	1.0
17	CORNI FRUCTUS (山茱萸)	50.5	500	>500	>1.0
18	PANACIS JAPONICI RHIZOMA (竹節人参)	24.0	500	250	0.5
19	GINSENG RADIX (人参)	11.1	500	250	0.5

a：Minimum effective dose, based on the inhibition of HIV-1-induced cytopathogenicity in MT-4 cells

b：Minimum cytotoxic dose, based on the reduction of the viability of MT-4 cells

c：Therapeutic index, CD/ED



imperatorin (1) osthol (2)

Fig. 3. Chemical Structures of Imperatorin (1) and Osthol (2)

を溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った(Fig. 2). 酢酸エチル濃度を段階的に上げながら溶出させ，作用を調べたところ，ヘキサン-酢酸エチル混液(1：2)溶出画分に作用が集中した．さらに本画分をシリカゲルカラムにかけ，クロロホルム-メタノール混液(50：1)から，作用成分である化合物1を単離した．

1は融点102℃の無色針状結晶で，MSから分子量270であることが明らかとなった．301,249nmにUVの極大吸収を持ち，種々の機器データからクマリン誘導体であることが推定された．また，^{13}C-NMRから12本のオレフィン炭素，2本のメチル炭素，1本のカルボニル炭素，1本のメチレン炭素の存在が確認されたことから，Fig. 3に示すimperatorin[15,16]が示唆された．そこで本物質の物理定数およびスペクトルデータを直接標品と比較し，imperatorin (1) であることを確認した．本物質は，62.5 μg /mlでCPEの発現を抑え，500 μg /ml以上で細胞毒性が出現し，TI値は8であった(Table 3). 今回コントロールとして用いたAZTに比較すると，細胞毒性は1/2程度低いものの，CPE発現抑制濃度は約1,000倍高いものであり，AZTに比較すると1の作用は非常に小さいと思われる．

Table 3. HIV Inhibitory Effects for Imperatorin (1), Osthol (2) and AZT

Compound	ED(μg /ml)[a]	CD(μg /ml)[b]	TI[c]
1	62.5	500	8
2	31.3	31.3	1
AZT	0.0668>	267	>4,000

a : Minimum effective dose, based on the inhibition of HIV-1-induced cytopathogenicity in MT-4 cells
b : Minimum cytotoxic dose, based on the reduction of the viability of MT-4 cells
c : Therapeutic index, CD/ED

また，2は1の類似化合物で，融点83℃の無色プリズム状結晶で，MSから分子量は244であり，NMRなどの各種スペクトルデータからosthol[17]であると推定された．そして，直接標品との比較によりosthol (2) と同定した．本物質は，31.3 μg /mlでCPEの発現を抑えるが，細胞毒性も同程度に高いものであった．

3. Imperatorin (1) 含量と作用発現

HPLC分析 (Fig. 4) の結果，蛇床子に含まれる1は0.78%であり，メタノール抽出物中には15%含有していることが明らかとなった．メタノール抽出物中に含まれる作用物質が1のみであるとすれば，1のCPE発現抑制濃度は，メタノール抽出物の最低CPE発現抑制濃度62.5 μg /mlより低濃度になると考えられるが，細胞毒性値は精製するに従い上昇したものの，1の最低CPE発現抑制濃度は62.5 μg /mlと，メタノール抽出物と同程度の値を示した．すなわち，本抽出物に含まれる作用物質は1のみではないと考えられる．

1と同じクマリン誘導体である2は抗白癬菌作用物質として報告[10]され，蛇床子中に比較的多く含まれる成分であるが，細胞毒性が高いため抗HIV作用物質とはい

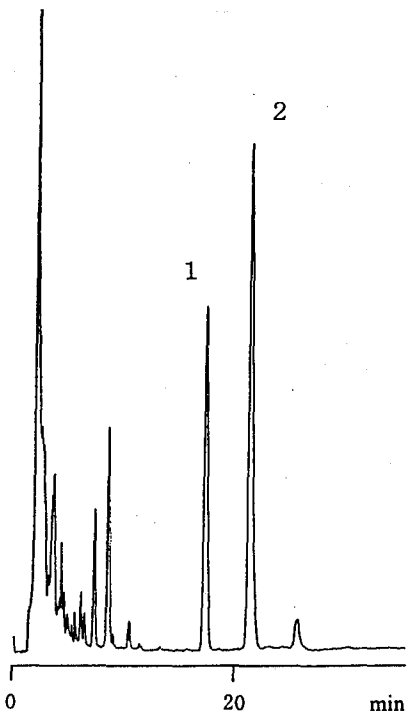


Fig. 4. HPLC Chromatogram of Fruits of *Cnidium monnieri*
1 : imperatorin
2 : osthol
Column: TSKgel ODS-80TM (4.6mm I.D.×150mm, 5 μm), Mobile phase : acetonitrile-water (1：1), Flow rate : 1.0ml/min, Colum temperature : 40℃, Detection : UV 280 nm.

えない．しかし，種々の物質を含む抽出物中では，毒性の低い物質と共存して，TI値が大きい作用を示すことも十分考えられる．

今回，クマリン誘導体の一部に抗HIV作用があることを明らかにしたが，今後，より強い作用を示すクマリン誘導体の検索，ならびに細胞毒性を低下させるための分子構造上の化学修飾について，さらに検討したいと考えている．

ま と め

19種類の生薬および薬用植物のメタノール抽出物について *in vitro* で抗HIV作用を調べたところ，蛇床子(オカゼリ果実)，樺木皮(シラカバ樹皮)，木通(アケビおよびミツバアケビの樹皮)に作用があることを見出した．そこで，蛇床子から作用成分の単離を行い，細胞毒性が高く，TI値が1である**2**とともに，CPE発現抑制濃度が62.5 μg/mlで，TI値が8である抗HIV作用成分**1**を単離した．蛇床子メタノール抽出物中の**1**の含量をHPLCで測定したところ，15%含有していることが明らかとなった．抽出物中の含量と抽出物の作用濃度を考慮すると，**1**以外の作用成分の存在が示唆された．

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) Konoshima, T., Yasuda, I., Lee, K. H., et al：*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **4**, 1323-1326, 1994.
5) Konoshima, T., Yasuda, I., Lee, K. H., et al：*J. Natural Products*, **58**, 1372-1377, 1995.
6) 安田一郎，浜野朋子，塩田寛子，他：東京衛研年報，**46**，53-57，1995.
7) 山崎勝弘，大竹 徹，森 治代，他：薬誌，**113**，818-824，1993.
8) 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.
9) 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.
10) 本多義昭，田端 守，馬場きみ江，他：生薬，**38**，221-226，1984.
11) 日本薬局方解説書編集委員会編：第十三改正日本薬局方解説書，D-1058-D-1060，1996，廣川書店，東京.
12) 江蘇新医学院編：中薬大辞典下冊，1784-1786，1977，上海科学技術出版，上海.
13) Sekine, H., Ohonuki, N., Okuyama, T., et al：*Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1580-1584, 1995.
14) Sagara, K., Oshima, T., Sakamoto, S., et al：J. Chromatogr., **388**, 448-454, 1987.
15) Harkar, S., Razdan, T. K., Waight, E. S.,：*Phytochemistry*, **23**, 419-426, 1984.
16) Grande, M., Aguado, M. T., Mancheno, B., et al：*Phytochemistry*, **25**, 505-507, 1986.
17) Kumar, R., Banerjee, S. K., Handa, K. L.,：*Planta Medica*, **30**, 291-294, 1976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 49-52, 1996

2次元NMR-HMQCによる化粧品中の紫外線吸収剤の微量分析

小田陽子*, 森　謙一郎*, 中村義昭*, 大貫奈穂美*,
鈴木助治**, 中村　弘*

Micro Analysis of Ultraviolet Absorbers in Cosmetics by Two Dimension NMR Spectroscopy-HMQC

YOKO ODA*, KEN'ICHIRO MORI*, YOSHIAKI NAKAMURA*, NAHOMI OHNUKI*,
SUKEJI SUZUKI** and HIROSHI NAKAMURA*

The method for a microanalysis by ultraviolet (UV) absorbers in cosmetics by two dimension NMR (2 D-NMR) was presented. Using this method, ^{1}H observed Heteronuclear 2 D-NMR-Heteronuclear Multi-Quantum Coherence (HMQC), a higher elevation of this sensitivity and a higher reduction of the measurement time were achieved, than that of Heteronuclear Correlation (HETCOR) in measurement. The analytical procedure consists of the direct method for the samples containing more than 0.8% of UV absorbers and the concentration method for less than 0.8% of UV absorbers were applied.

The data obtained by HMQC measurement were printed out after chart range adjusted, turned over, rotated in a left 90-degree arc, and laid on top of a HETCOR map, and analyzed by fingerprint identification. The condition of HMQC were as follows; data point, 512 (^{1}H) × 128 (^{13}C); integration repeat, 64 times; measurement time, 180 min.

The relative integral intensity in their ^{1}H-NMR signals was used for the quantitative analysis using pyrazine as an internal standard.

This method was useful for analysis of UV absorbers and about 4 times sensitivity was obtained by the proposed method compared with HETCOR.

Keywords：2次元 NMR two dimension NMR, Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence HMQC, 紫外線吸収剤 ultraviolet absorber, 化粧品 cosmetics, フィンガープリント fingerprint

緒　言

著者らは近年技術革新の著しい2次元NMR(2D-NMR)を用いて医薬部外品，化粧品等に含有される成分の効率的分析法を検討している．NMRからは有機構造に関する多種多様な情報が得られ，またそのスペクトルは物理学的定数に基づいた値であることから，NMRを化粧品の分析法に導入することにより，他の分析法に比較して，より確実性の高い定性あるいは定量分析が可能であると期待される．また2D-NMRはコンピューター技術の革新により，誰にでも簡便に利用することが可能になってきた[1]．著者らは前報[2]において，異種核2D-相関NMR (Heteronuclear Correration 2-Dimension NMR；HETCOR) を簡便で明解なフィンガープリント法として用い，多種の有機化合物成分の同時定性分析に利用する手法，及び ^{1}H-NMRスペクトルにおける積分値を利用した定量分析法について報告した．今回は感度の向上および分析時間の短縮を目的として，天然物化学等で微量物質の測定に汎用されるインバース測定[3]を検討し，Heteronuclear

*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

Multiple-Quantum Coherence (HMQC)[4,5]のフィンガープリント法の適用について検討した.

分析試料としては化粧品の成分である紫外線吸収剤を検討した. ここ数年紫外線A(UVA)の皮膚に対する浸透力や酸化的傷害の影響が注目されており[6], UVA防御用紫外線吸収剤の開発が活発に行われている. 一方, 紫外線吸収剤は皮膚障害性の危険性があるため, 化粧品種別許可基準によってそれぞれの配合量及び総配合量上限が定められている[7]. また, 最近, 紫外線吸収剤の長期使用による慢性毒性が示唆されている[8]. したがって, 薬事衛生上の観点から化粧品中紫外線吸収剤の簡易分析法開発は, 必要かつ重要であると思われる.

実験方法

1. 装置

NMR装置：Alpha 500型スペクトロメーター (^{1}H-NMR ; 500 MHz, ^{13}C-NMR ; 125 MHz) (日本電子製).

2. 試薬

ピラジン重クロロホルム：99.8%クロロホルム-d_1(メルク社製)にテトラメチルシラン(メルク社製)0.5%及び内標準物質としてピラジン(和光純薬製)1.0%を混合した.

標準物質(紫外線吸収剤5種)：2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (HMB), 2,4-dihydroxybenzophenone (DHB), 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EMC), 2-ethyl-hexyl *p*-dimethylamino benzoate (EDB) 及び 4-*tert*- butyl-4'-methoxy-dibenzoylmethane (BMD) (以上, 和光純薬製).

3. 分析操作

1)直接法：紫外線吸収剤を0.8%以上含有する化粧品については, 試料100-300mg (個々の紫外線吸収剤として0.8mg以上)を5 ml共栓試験管にとり, 飽和塩化ナトリウム溶液2 ml, ピラジン重クロロホルム 1 mlを加えて10分間振とう, 3,000rpm, 10分間遠心分離した. 重クロロホルム層を分取し, NMR 試料管(内径5 mm)に採取して, HMQCを測定した. 試料について得られた2D-NMRチャートを標準として用いた紫外線吸収剤のHETCORスペクトルに重ね合わせ, フィンガープリント法によって定性分析を行った.

また1次元^{1}H-NMRチャートより, よく単離したピークの内標準物質ピラジンのピークに対する比積分値をもとめ, 比積分値表[2]より定量分析を行った.

2)濃縮法：紫外線吸収剤含量が0.8%未満の試料については, 試料5 -20 g (個々の紫外線吸収剤として0.8mg以上)を200mlの分液ロートにとり, 飽和塩化ナトリウム溶液80mlを加え, クロロホルム30mlで3回抽出して, クロロホルム層を濃縮乾固した. 少量のクロロホルムで濃縮物を分散, 溶解し, ピペットで重量既知の50ml丸底フラスコに洗い込むことで塩化ナトリウムを除去した. 次いでこれを濃縮乾固後, さらに真空ポンプで約10分間吸引してクロロホルムを完全に除去し, 重量を測定した. ここに得た濃縮物100-300mgを小試験管にとり, ピラジン重クロロホルム0.5-1.0mlを添加して同様にNMRを測定した. 定性定量分析ともに直接法と同様にフィンガープリント法及び比積分値表により行った.

4. HMQC測定条件

測定は絶対値表示法で行った.

データサイズ：512 (^{13}C) × 128 (^{1}H) ポイント, 積算回数：64回, 測定時間：180分

結果および考察

1. インバース測定法の選択

プロトン観測インバース測定2D-NMRとしてHMQC, Heteronuclear Single-Quantum Coherence (HSQC) 及び Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC) の3法につきフィンガープリントの適応を検討した. その結果HMBC は J_{C-H}値によりロングレンジカップリングの相関ピーク強度が変化するため, パラメータを変えて何度か測定する必要があり, 測定完了に長時間を要した. またHSQC, HMBCは位相検波法であるため, 位相補正処理を行う必要があるが, この操作は煩雑で高度の熟練技術を要した. そこで簡便で明解なフィンガープリント法の作成を目的とする本法にはHSQC, HMBCは不適当であると判断した. これらの結果より比較的操作が簡単なHMQCを本インバース法とすることにした.

HMQCの具体的操作法と測定時間を前報[2]で報告したHETCORと比較してTable 1に示した. その結果測定操作中HMQCの手動操作に要する時間は約7.4分であり, 一方HETCORでは約1.0分で, 簡便性は後者が前者より優れた結果を示した. したがって高濃度の紫外線吸収剤を含有する試料分析の場合には, 測定の簡便さの見地からHETCORを用いた方が明らかに有利であった. しかし, Fig. 1に紫外線吸収剤EMCを含有するヘアーローションを直接法でHMQC測定を行ったチャートを示したが, 微量の紫外線吸収剤を含む試料の場合には^{13}C-NMR観測であるHETCORに比較して, プロトン観測であるHMQCによる測定法が有利であった. すなわちHMQCの検出感度は, 5種の紫外線吸収剤でいずれも試料中約0.8%であった. HETCORによる方法では検出限界は約3.3%であり[2], HMQCはHETCORの4倍の感度が得られること

Table 1. The Operation Time of 2D-NMR Methods

Operation		Method HMQC	Method HETCOR
		min	min
Preparation	1D-NMR Measurement	18*	18*
	2D-NMR Parameter	2	0.1*
Measurement	2D-NMR	150*	190*
Data Analysis	Zero Filing	0.2	0.2*
	Digital Filtering	1	0.2*
	Fourie Transform	0.2	0.2*
	Threshold Correct	1	1
	T1 Noise Suppression	3	-
	2D Plot	3*	3*
Total Time		178.4	212.7
Manual Operation Time		7.4	1.0

*：Auto Measurement time

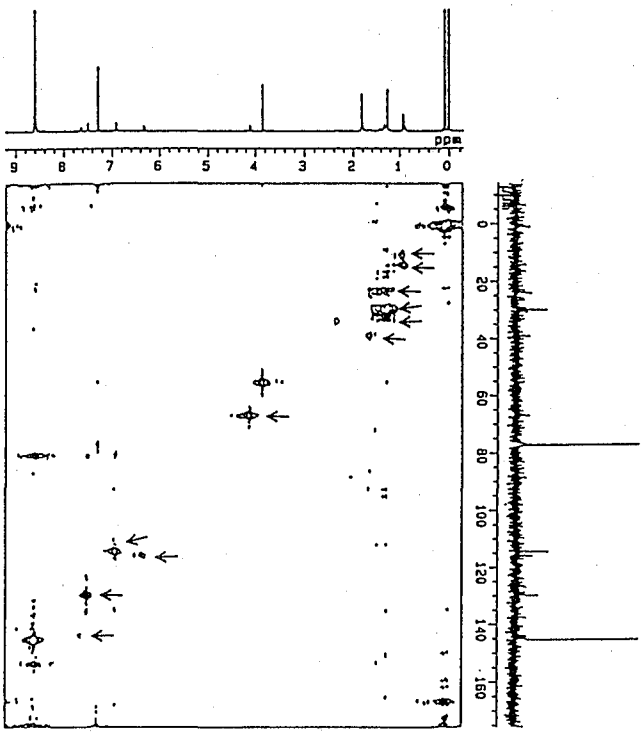
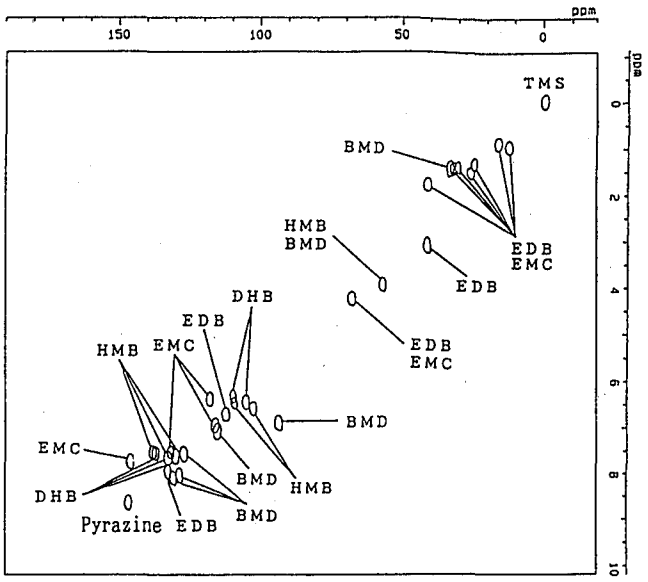


Fig. 1. HMQC Spectrum of a Hair Lotion Containing EMC

が判明した．また，試料の濃度を倍にすると測定時間は半分に短縮できることが判明した．以上の結果より本法のフィンガープリント分析の条件下における直接法による限界検出値を0.8%とすることができた．

3．標準マップの作成

本2D-NMRのフィンガープリント分析では検出感度はHMQCが優れるが，操作性はHETCORが適しているのでHMQCとHETCORの長所を生かした分析法の作成を試みた．すなわちHMQCをHETCORの微量定性分析法として，HETCORマップ(Fig. 2)によりHMQCをフィンガープリ



HMB : 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone
DHB : 2,4-dihydroxybenzophenone
EMC : 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate
EDB : 2-ethylhexyl *p*-dimethylamino benzoate
BMD : 4-*tert*-butyl-4'-methoxy-dibenzoylmethane

Fig. 2. HETCOR Map of Five UV-Absorbers

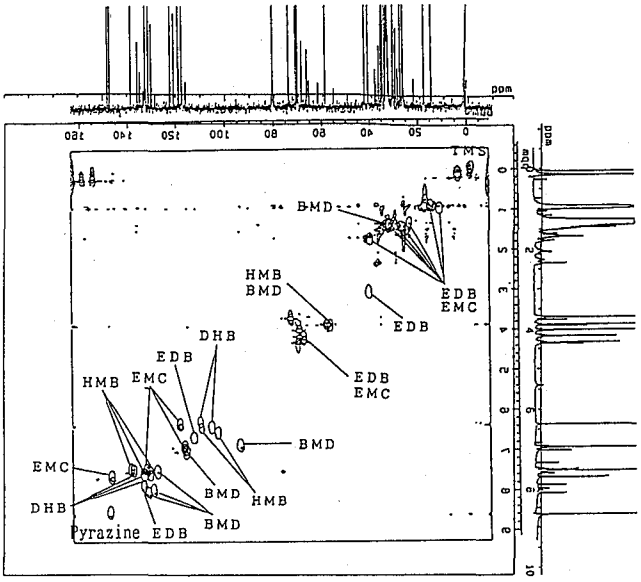


Fig. 3. HMQC Spectrum Laid on Top of HETCOR Map of a Skin Cream

ントとして利用することのできる手法を検討した．

HETCORではf 2 側(サンプル側)が^{13}C-NMR，f 1 側(観測側)が^{1}H-NMRであるのに対し，HMQCなどのインバース測定ではf 2 側が^{1}H-NMR，f 1 側が^{13}C-NMRである．そこでHMQCから得たチャートをプロットする際に，チャートのXYレンジを統一した．すなわちレンジを^{1}H-NMRでは10ppm=11cmとし，^{13}C-NMRでは150ppm=9.9cm

としてチャートをプロットした．次にこのHMQCチャートを裏返し，90度左回転させる．次いで前報[2]で作成したHETCORの標準マップと重ね合わせ，ライトボックス上で透かして見ることにより，HMQCとHETCORを同一レンジで比較することができた(Fig. 3)．

このことでHMQCとHETCORを同一のフィンガープリント法として，各々の利点を生かした分析法を作成することができた．

5．定量分析における添加回収実験

本法の定量分析操作については前報[2]同様であるが，定量分析に用いるピークの単離の確認をHMQCで行う場合，HETCORの検出限界以下での定量操作の影響を検討した．市販クリームに5種の紫外線吸収剤を1％及び0.1％となるように添加し，それぞれ直接法及び濃縮法で^{1}H-NMRを測定し回収率を求めた．その結果をTable 2に示したがいずれも良好な結果を得た．

6．市販化粧品への適用

平成7年4月から10月までに東京都内で購入した市販化粧品9種について，本法により分析を行った．その結果をTable 3に示したが良好に本法を適応することができた．類似する部分構造を持つ化合物では，互いに一部の相関ピークが重複したが，支障なく定性分析することができた．

通常の測定では濃縮法を用いることが基本であるが，サンスクリーン剤など高濃度紫外線吸収剤を含有する試料については，より簡便な直接法を用いて分析した．HMQCを利用することにより検出感度が向上し，少ない試料でも測定が可能になった．このことより，本法は化粧品や医薬部外品などの多成分分析に適用が可能で，この分野における製剤分析に広く応用可能であると思われる．

Table 2. Recoveries of UV Absorbers added to Cosmetics Sample

UV Absorber[1]	Added (%)	Ana.Meth.	Found (%)	Recovery (%)	C.V. (%)
HMB	1.0	D[2]	1.03	103	2.4
HMB	0.10	C[3]	0.096	96.0	3.2
EMC	1.0	D	1.02	102	2.2
EMC	0.10	C	0.100	100	3.5
BMD	1.0	D	0.966	96.6	4.3
BMD	0.10	C	0.0993	99.3	3.1
EDB	1.0	D	1.01	101	2.5
EDB	0.10	C	0.0967	96.7	4.0
DHB	1.0	D	1.03	103	2.6
DHB	0.10	C	0.117	117	2.7

n=5

1) UV Absorbers are the same as that of Fig.1.
2) Direct Method
3) Concentration Method

Table 3. Analytical Results of UV-Absorbers in Commercial Cosmetics

Sample	UV-Absorber (% w/w)	Analytical Method
1 sun-screening cream	EMC:6.7, BMD:0.086	C[1]
2 sun-screening cream	EMC:4.2, HMB:4.4 EDB:4.1	D[2]
3 sun-screening cream	EMC:13	D
4 sun-screening cream	EMC:7.1, BMD:0.46	C
5 sun-screening cream	EDB:3.8, HMB:2.1 EMC:1.9, BMD:1.0	D
6 skin lotion	HMB:1.2, EDB:0.50	C
7 skin lotion	EMC:2.5, HMB:0.70	C
8 hair lotion	HMB:1.0	D
9 nail enamel	DHB:0.22	C

1) Concentration Method
2) Direct Method

結　論

5種類の紫外線吸収剤について2D-NMRのHMQCを利用することによりHETCORの4倍の高感度を得ることができた．HMQCで得たチャートをHETCORの標準マップを利用してフィンガープリント分析とすることにより，HETCORの簡便性とHMQCの微量分析を併せた効率的分析法とすることができた．検出範囲は直接法で試料中0.8-100w/w％，濃縮法で0.01-100w/w％であり，広範な分析濃度域を有する分析法を設定することができた．

文　献

1) 光井武夫：新化粧品学，276-277，1993，南山堂，東京
2) 森　謙一郎，伊藤弘一，鈴木助治，他．：衛生化学，**42**，60-66，1996
3) 内海博明：'91分析機器ユーザーズミーティング資料-^{1}H観測異種核相関NMRの利用，1991，日本電子，東京
4) L. Muller：*J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4481-4484, 1979
5) 日本化学会編，実験化学講座5，第4版，36，丸善，東京
6) 市橋正光：フレグランスジャーナル，**24**，11-20，1996.
7) 厚生省薬務局審査課監修：化粧品種別許可基準1994，薬事日報社，東京
8) A. V. Calogero：*Cosmetic & Toiletries*, **111**, 30, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 53-56, 1996

家庭用品の衛生化学的研究（第34報*）
抗菌・防臭等衛生加工表示された家庭用品中のチアベンダゾール(TBZ)の定量

観　照雄**, 岩崎由美子**, 山野辺秀夫**,
上原真一**, 中村　弘**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIV*)
Determination of Thiabendazole for Antimicrobial Agent in Textile Products and Household Necessities

TERUO KAN**, YUMIKO IWASAKI**,
HIDEO YAMANOBE**, SHIN-ICHI UEHARA**,
and HIROSHI NAKAMURA**

Keywords：チアベンダゾール thiabendazole, 定量分析 determination, 液体クロマトグラフィー HPLC, ケイ光光度検出器 fluoressence detector, 繊維製品 textile products, 抗菌剤 antimicrobial agent, 家庭用品 household necessities

緒　言

防菌・防臭を目的として衛生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]に基づき有機スズ化合物であるトリフェニルスズ及びトリブチルスズ化合物と有機水銀化合物の２種の化合物が衣料用衛生加工剤として現在使用規制されている.

著者等は第16報[2]においてチアベンダゾール(以下TBZ と略す)は繊維製品の衛生加工剤として使用されている事を報告したが, その後も抗菌ブームがつづき, 衣料品類はもちろん, 文房具, 家庭用雑貨, 玩具や楽器まで, 抗菌剤等を使った製品があると報道されている[3].

今回は, これらの製品へのTBZの使用は低濃度であると考え, 高感度高精度分析を目的として中里等[4]が報告したケイ光光度検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる方法を検討し, 分析法を確立した. その方法を用いて市販品において, 抗菌素材を用い防菌・防臭加工あるいは衛生加工された製品について測定を行い, TBZ の使用実態を調査したので報告する.

実験方法

1．試料　平成５年から７年に東京都内小売店より購入した家庭用品27種262検体を試料とした（表１).

2．試薬　1) TBZ標準品：チアベンダゾール標準品(残留農薬試験用, 和光純薬)を用いた. 本品についてガスクロマトグラフフィ-質量分析(GC-MS)法によりTBZであることを確認した. 2) TBZ標準溶液：TBZ 100mgを正確に量り取り, メタノ-ルに溶かして正確に100mlとする. この液をさらにメタノールで希釈し1mlあたりTBZを10.0 μg 含有する溶液を標準溶液とした. 3) チモール溶液：チモール(特級,和光純薬)100mgを正確に量り取り, メタノールに溶かして正確に100mlとする. 4) 内部標準溶液：チモール溶液2.0mlを取り, メタノールで正確に100mlとした. 5) 検量線用TBZ標準溶液：TBZ標準溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0mlにそれぞれ別々にチモール溶液2.0mlを加えてからメタノールで正確に100mlとする. 別に, チモール溶液2.0mlをメタノールで100mlとしブランクとした. 6) その他の試薬：和光純薬製の高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた.

3．装置　①高速液体クロマトグラフ JASCO GULLIVER, インテリジェント ケイ光検出器821-FP型装置付(日本分光工業K.K製). ②ガスクロマトグラフィー質量分析計 70-S(VG社製).

4．液体クロマトグラフ測定条件　カラム：TSKgel ODS-80T$_S$ 4.6mm i.d.×15cm粒径5 μm(東ソー社製), 温度：40℃, 移動相：アセトニトリル-メタノール-水(40

---

*第33報, 東京衛研年報, **46**, 90-93, 1996.

**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

：25：35)混液1000mlにドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 1.45 g を溶かしたのち，リン酸でpHを2.3-2.5に調整した．流速：0.8ml/分，検出器：ケイ光光度検出器，励起波長(Ex)285nm，ケイ光波長(Em)325nm，注入量：2 μl，TBZは約5分にピークを検出する様にした．

5．ガスクロマトグラフィー質量分析測定条件：カラム；J&W社製ヒューズドシリカキャピラリーDB-17膜厚0.25 μm0.32mmi.d.×30m，温度60℃(2分)-270℃(8℃/分)，キャリアガス；ヘリウム1 ml/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，70eV，温度280℃．

6．試験溶液の調製 繊維製品は細切し，その約1.0 g を，その他の家庭用品はよく混ぜた後，その約1.0 g を精秤し200mlナス型フラスコに入れ，メタノール150mlを加えてから還流冷却器をつけた後，80℃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，少量のメタノー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は50℃で減圧濃縮する．残査に0.05N硫酸50mlを加え良くふりまぜた後，300ml分液漏斗にうつす．再度0.05N硫酸50mlを加え同様に操作する．5N水酸化ナトリウム5 ml，酢酸エチル75mlを加えて5分間よくふりまぜたのち，酢酸エチル層を得る．水層には酢酸エチル75mlを加えて同様に再度抽出する．合わせた酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで脱水してから50℃以下で減圧濃縮して残査を得る．この残査に内部標準溶液5.0mlを加えて溶解し．これをHPLC用試験溶液とした．

7．HPLC法による定性，定量 定性 TBZ 0.3 μg /mlを含む検量線用TBZ標準溶液2 μlをとり，操作条件に従ってHPLCを行い，このクロマトグラムから，TBZと内部標準物質のピークの保持時間を測定し，TBZの内部標準物質との相対保持時間を求める．HPLC用試験溶液2 μlをとり同様にHPLCを行い，ピークの相対保持時間を求め，TBZ標準溶液のそれと比較して同定を行う．また，TBZが検出された試料についてはGC-MS法を用いて確認した．

定量 HPLC用試験溶液2 μlをとり，定性の場合と同様にHPLCを行いTBZ及び内部標準物質のピーク面積を求め，内部標準物質に対するTBZの面積比を検量線用TBZ標準溶液から求めた検量線から，試料中の含有量を算出した．

実験結果及び考察

1．繊維製品等からのTBZ溶出法の検討 TBZはベンズイミダゾール系殺菌剤であるので低濃度の処理加工で繊維や皮革製品等抗菌・防臭加工が施せる添加剤であると考えられる．そこで，加工製品からTBZを溶出するために，極性溶媒であるアセトニトリル，アセトン，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．TBZを検出した布団カバー(綿100%)1 g を採り，80℃の水浴中でこれらの溶媒を用いて1時間，還流溶出した．それぞれの溶出液のTBZをHPLC法により測定した．メタノール溶出が最も溶出率が高く，これを100%としたとき，エタノールは90%，アセトンは34%，アセトニトリルは33%であつた．次に，メタノール溶出に必要な還流時間を検討した．試料を30分，1時間，2時間，3時間還流溶出し，溶出液中のTBZ濃度を比較したところ，30分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．溶媒抽出法の検討 試料抽出液からTBZの抽出法を検討した．試料抽出液中には家庭用品添加剤である繊維加工剤，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．これらの成分がTBZの分析への障害になる可能性があるので溶媒抽出の抽出率を検討した．

はじめに，溶媒抽出法は中里等[4]の方法に従つた．すなわちTBZ 20 μg を300ml分液ロートに取り，これに0.05N硫酸100mlと5N水酸化ナトリウム5 ml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，エチルエーテル85.1%，ジクロロメタン84.5%，n-ヘキサン82.1%，クロロホルム74.2%，酢酸エチル96.0%，の抽出率であつたので酢酸エチルで抽出することとした．

3．添加回収率：ガーゼ及び時計バンド用皮革の各細切試料，洗浄剤，ワックス，接着剤はがし，接着剤にTBZの20 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TBZを分析し添加回収率を求めた．その結果，ガーゼで97.9%，98.2%，98.0%，皮革で86.3%，92.2%，91.2%洗浄剤で95.0%，ワックスで93.0%，接着剤はがしで88.8%，接着剤で94.0%の回収率であり，その範囲は86.3～98.2%であった．

なお，定量限界はガーゼ，接着剤等で0.1 μg /g であった．

4．TBZ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TBZの保持時間及びそのマススペクトルを標準TBZ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に標準TBZのマススペクトルを示す．

5．市販製品の分析結果 本法を抗菌・防臭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に示し

た．靴下(表1のNo.01)16検体，下着(No.02)19検体はいずれも抗菌加工処理と製品に表示されているが，TBZを抗菌剤に使用しているものはなかった．寝具(No.03)についてはシーツ，布団カバーなどの22検体を調査した．このうち，青色掛け布団カバーとレンガ色で羽毛/羊毛/ふとん兼用カバーの2検体は抗菌防臭加工表示がある製品で，TBZを203 μg/g と234 μg/g を検出した．いずれも綿100%と品質表示されていた．青色掛け布団カバーのクロマトグラムを図2に示した．

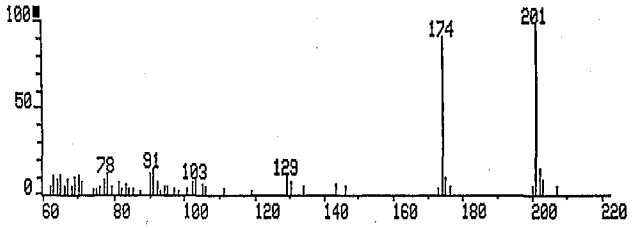


図1．標準チアベンダゾールのマススペクトル
GC-MS 測定条件　装置；VG-70S カラム；DB-17 (0.32mm×30m) 温度60-270℃ (8℃/分) キャリヤガス；He 1 ml/分　注入；1 μl スプリットレスモード　マスレンジ；600-60/1秒　イオン源；電子衝撃型，温度280℃

寝具(No.04)の枕11検体，抗菌歯ブラシ(No.05) 7検体，マスク(No.06) 6検体からTBZは検出されなかった．ボディ用タオル(No.07)3検体，ボディ用ブラシ(No.08) 3検体，ボディ用スポンジ(No.09) 2検体はいずれの製品もTBZを検出した．特に，ボデイ用ブラシは炊事用スポンジの様な三層タイプのものでこのウレタン二層から3,700 μg/g と他に比べて多量のTBZを検出したが，軽石の様になった硬い部分からはTBZは検出しなかった．この様にボディ用ブラシに多量のTBZによる抗菌加工処理の必要性は疑問である．

便座カバー(No.10)からカーテン(No.24)，コンタクトケア製品の保存液(No.26)，床敷物(No.27)の17種167検体ではどの家庭用品からもTBZを検出しなかった．内藤[5]は，塗料，皮革時計バンドに防腐を目的に使用され

表1．市販製品中のチアベンダゾール(TBZ)の測定結果

家庭用品	検査品目数	検出数	測定値，μg/g
01 靴　下	16	0	
02 下　着	19	0	
03 寝　具	22	2	203，234
04 寝具(枕)	11	0	
05 抗菌歯ブラシ	7	0	
06 マスク	6	0	
07 ボディ用タオル	3	3	0.09，0.22，13.0
08 ボディ用ブラシ	3	3	1.4，15.8，1580
09 ボディ用スポンジ	2	2	14.7，3700
10 便座カバー	10	0	
11 皮革時計バンド	31	0	
12 時計バンド皮革	18	0	
13 家庭用塗料	2	0	
14 家庭用洗浄剤	18	0	
15 ワックス	5	0	
16 接着剤	8	0	
17 接着剤はがし	3	0	
18 靴クリーム	5	0	
19 錆取り剤	7	0	
20 錆止め剤	1	0	
21 壁　紙	17	0	
22 壁紙・襖紙	4	0	
23 襖　紙	3	0	
24 カーテン	10	0	
25 バスカーテン	6	1	306
26 コンタクトケア用品(保存液)	20	0	
27 床敷物	5	0	
合　計	262	11	0.09～3700

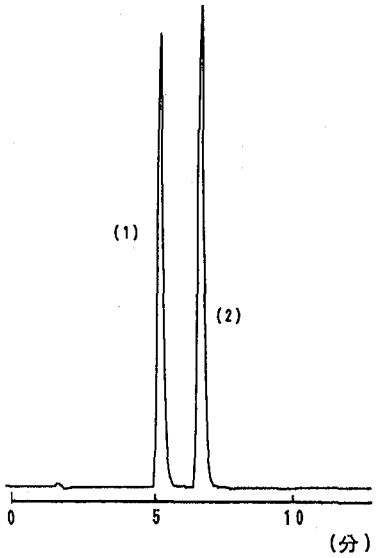


図２．寝具（布団カバー）の高速液体クロマトグラム
(1) チアベンダゾール（TBZ）
(2) 内部標準物質（チモール）
HPLC 測定条件：日本分光，ガリバーシリーズ，カラム ODS-80Ts，5 μm，4.6mm×15cm（東ソー社製），40度，移動相0.01Mドデシル硫酸ナトルウムを含むアセトニトリルーメタノールー水（40：25：35 pH2.4），流量0.8ml/分，ケイ光検出器，励起波長285nm，ケイ光325nm

ていると報告しているが，今回の試料ではこの様なことはなかった．バスカーテン(No.25) 6 検体うちE.V.A (Ethylene-vinyl acetate copolymer)素材で淡黄色のバスカーテン１検体から306 μg / g 検出した．この製品は難燃防カビと表示されていた．

ま と め

衛生加工表示のある家庭用品中の抗菌剤チアベンダゾール(TBZ)のHPLC法による分析法を検討し，市販製品の実態調査を行った．分析法は，ODSカラムを用い，移動相としてアセトニトリルーメタノールー水(40：25：35)(ドデシル硫酸ナトリウム1.45 g /lを含む)を，検出器にケイ光光度検出器を，試験溶液は酢酸エチル溶媒抽出を用いる前処理操作が有効であった．TBZの回収率はガーゼ，皮革，洗浄剤，接着剤などに添加した試料で86.3%～98.2%であった．本法はTBZの簡易かつ迅速な定量法として後の分析結果からも市販衛生加工表示の家庭用品の分析に十分適用できた．

市販衛生加工表示家庭用品27種262検体を本法で分析した．寝具２検体から203,234 μg / g，ボディ用タオル，ボディ用ブラシ，ボディ用スポンジ，バスカーテンなどの9検体から0.09～3,700 μg / g TBZを検出した．特に，3,700 μg / g 検出したボディ用スポンジ，1,580 μg / g を検出したボディ用ブラシがあり，この様に多量のTBZによる抗菌加工処理の必要性は疑問に思われる．その他251製品からTBZは検出されなかった．

文 献

1）有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律：昭和48年10月12日法律112号.
2）雨宮敬，酒井正美，池田一夫他：衛研年報，**36**，123-128，1985.
3）1995.8.23，毎日新聞，12版.
4）中里光男，只野敬子，小川仁志他：衛生化学，**41**，392-397，1995.
5）内藤ひろ史：中毒百科，306-308，1991，K.K.南江堂，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 57-60, 1996

家庭用品の衛生化学的研究（第35報*）
抗菌・防臭加工表示された家庭用品中の金属含有量調査

山野辺 秀 夫**, 岩 崎 由美子**, 上 原 真 一**,
観 照 雄**, 中 村 弘**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXV*)
Survey of Metals on Antimicrobial and Deodorant Agents in Household Necessities

HIDEO YAMANOBE**, YUMIKO IWASAKI**,
SHIN-ICHI UEHARA**, TERUO KAN**,
and HIROSHI NAKAMURA**

Keywords：抗菌防臭剤 antimicrobial and deodorant agents, 高周波誘導結合プラズマ発光分析ICP-AES, 金属 metals, ゼオライトzeolite, 銀silver, 亜鉛zinc, 銅copper, アルミニウムaluminum

緒　　言

快適な生活の追求が社会的に受け入れられ，衣類や居住環境にも清潔感，快適性が求められている．このような清潔，快適指向は「抗菌防臭」加工を施した商品を増加させる傾向にある．

家庭用品を対象にした「抗菌防臭」加工は，直接肌に接する衣類等の繊維製品，歯ブラシ等のプラスチック製品の差別化をはかり商品の付加価値を高めることを目的としている．加工用薬剤には，衛生効果が大きく，人体の生理機能に影響を与えず，繊維に固着し，洗濯後にも効果を示すことが求められている．一方，抗菌防臭加工剤には金属の抗菌効果を利用したものとして抗菌ゼオライトに代表される金属系のもの，有機シリコン第4級アンモニウム塩など金属を含まない有機系のものがある[1,2,3]．しかし，これら薬剤の具体的な使用実態については，個々の製品によって異なり明確ではない．そこで著者らは，金属系薬剤の使用実態を明かにする目的で家庭用品(繊維製品，プラスチック製品)中の金属含有量を測定した．また，検出した金属から使用されている薬剤の推定を試みた．家庭用品中の金属元素の調査にはこれまでも報告があるが[4,5]，今回検討した金属は抗菌作用を有するといわれ無機系抗菌防臭剤の key 元素である銀(Ag)，亜鉛(Zn)，銅(Cu)及びゼオライトの構成元素であるアルミニウム(Al)の4元素である[1,2,3]．また，分析は試料を湿式分解後，高周波誘導結合プラズマ発光分析(ICP-AES)で行った．

実　　験

1．試料

平成7年1月から3月に東京都内で購入した，抗菌防臭加工と表示された家庭用品のうち繊維製品として，靴下(10検体)，下着(14検体)，タオル(4検体)，枕の表生地(4検体)，シーツ(3検体)，布団カバー(6検体)，マスク(6検体)，便座カバー(10検体)，プラスチック製品として，歯ブラシ(6検体)の柄及びブラシ部分(計12検体)，ボディブラシのブラシ部分(3検体)の計10品目，72検体を試料とした．

2．試薬

硫酸及び硝酸：いずれも有害金属測定用試薬(和光純薬工業製)を用いた．

Ag, Zn, Cu, Al 標準試薬：原子吸光分析用試薬(1000 μg/g)(和光純薬工業製)を用いた．

3．装置

ICP-AES はサーモジャーレルアッシュ社製ポリスキャン61ESS 型を使用した．測定条件は表1に示した．

---

*第34報，東京衛研年報，**47**, 53-56, 1996.

**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

表1．ＩＣＰの操作条件

高周波出力（W）	1150
トーチガス流量（1／min）	高速流量
補助ガス流量（1／min）	1.0
観察位置（mm）	15
ネブライザーガス圧力（psi）	30
ポンプ回転数（RPM）	100
ポンプチューブの種類	タイゴン
測定波長（nm）	
Zn 213.8　Cu 324.7　Ag 328.0　Al 308.2	

4．試験方法

a）標準溶液の調製：Ag，Zn，Cu，Al標準試薬各1mlを正確にとり混合した後，0.1N硝酸を加えて正確に100mlとした．

b）試験溶液の調製：試料を細切し，その0.5ｇを精密にとり，ケルダールフラスコに入れ，25%硫酸0.25mlを加え，試料が暗褐色になるまでおだやかに加熱した．冷後，硝酸1～2mlを加え濃縮液が淡黄色透明または残渣が白色になるまで穏やかに加熱分解を行った．必要ならばさらに硝酸1～2mlを加え同様の操作を繰り返した．分解終了後，内容液は0.1N硝酸で10mlとし試験溶液とした．残渣がある場合は遠心分離を行い上澄液を試験溶液とした．標準溶液，試験溶液についてICP-AESを行い試料中のAg，Zn，Cu，Alの量を求めた．

結果及び考察

測定結果を表2に示した．各試料に含まれる元素を比較すると，Alはほぼ共通して検出されたが，Ag，Zn，Cuの存在にはバラつきが見られた．試料の元素組成を比較すると，Al及びAg，Zn，Cuのいずれかあるいは複数を含むもの（以上Ａグループ），Alのみのもの（Ｂグループ），４元素いずれも含まないもの（Ｃグループ）の

表2．抗菌加工等された製品中のＩＣＰ測定による金属含有量（μｇ／ｇ）

試料名	グループ[1]	No.	Ag	Zn	Cu	Al
靴下		1	35	478	50	835
		2	43	365	—[2]	110
	A	3	36	28	—	158
		4	49	—	99	284
		5	26	—	—	28
		6	29	—	—	22
	B	7	—	—	—	121
		8	—	—	—	19
	C	9	—	—	—	—
		10	—	—	—	—
下着		1	22	1045	—	65
		2	106	—	867	63
		3	—	70	—	44
	A	4	—	2248	—	50
		5	—	611	—	51
		6	—	20	—	48
		7	—	—	—	45
		8	—	—	—	53
	B	9	—	—	—	44
		10	—	—	—	43
		11	—	—	—	55
		12	—	—	—	59
		13	—	—	—	30
	C	14	—	—	—	—
タオル		1	88	—	83	226
	A	2	99	—	37	202
		3	50	—	—	84
	B	4	—	—	—	52
枕（表生地）	A	1	38	—	19	34
		2	—	—	—	23
	B	3	—	—	—	72
		4	—	—	—	53

（つづく）

表2．つづき

試料名	グループ[1]	No.	Ag	Zn	Cu	Al
シーツ	A	1	22	—	2286	63
	B	2	—	—	—	49
		3	—	—	—	49
布団カバー	A	1	24	—	—	44
		2	—	82	—	19
		3	—	—	—	59
	B	4	—	—	—	63
		5	—	—	—	50
		6	—	—	—	38
マスク		1	75	123	—	393
		2	29	5040	—	1847
	A	3	38	4792	—	49
		4	24	—	4691	65
		5	—	—	1366	56
	B	6	—	—	—	67
便座カバー		1	21	2361	—	44
		2	39	—	—	40
	A	3	24	—	—	38
		4	27	—	—	39
		5	25	—	—	39
		6	20	—	—	38
		7	—	—	—	29
	B	8	—	—	—	31
		9	—	—	—	35
		10	—	—	—	37
歯ブラシ	A ブラシ	1	26	141	—	26
	A 柄		127	111	27	552
	A ブラシ	2	—	4544	—	20
	A 柄		—	177	—	136
	B ブラシ	3	—	—	—	25
	A 柄		—	43	—	112
	A ブラシ	4	—	5087	—	40
	B 柄		—	—	—	140
	B ブラシ	5	—	—	—	20
	B 柄		—	67	—	210
	A ブラシ	6	—	—	—	—
	C 柄		—	29	—	279
ボディブラシ	A ブラシ	1	—	159	—	56
	ブラシ	2	—	65	—	29
	B ブラシ	3	—	—	—	34

1）A：Ag，Zn，Cu 及び Al を検出する，B：Al を検出する，C：いずれも検出しない．
2）ー：検出しない．

3グループに大別することができた．そして各グループに属する試料数は，Aでは40検体と全体(72検体)の過半数(56%)を占め，Bが28検体(39%)とこれに続いた．一方，Cに属するものは4検体(5%)とわずかであった．

次にA，B，Cグループについての金属の分析結果から，抗菌防臭加工剤の使用の有無及び種類の推定を行った．まずAグループについては，無機系抗菌防臭剤の代表の抗菌ゼオライトの使用が考えられる．抗菌ゼオライトは担体であるゼオライト(一般式 $xM_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot ySiO_2 \cdot zH_2O$)の，金属(M)部分に Ag，Zn，Cu を置換させたもので，3者いずれかの金属を保持させた単一型もの及び Ag-Cu，Ag-Zn，Ag-Cu-Zn など複数金属を保持させた複合型のものが実用化されている[2]．したがって本グループに属する試料は，前述のように Al を共通に含みさらに Ag，Zn，Cu のいずれか，あるいは複数を含有する抗菌ゼオライトによる抗菌防臭加工が施されているものと推定された．

また，Aグループの中で，繊維製品については，Ag

を含むものは24検体であったが，Zn を含むものは13検体，Cu を含むものは９検体と抗菌作用の強い Ag が多く使用されていることが分かった．この結果は，繊維製品には無機抗菌剤に Ag が使用されること[3]を裏づけるものである．Ag を検出した試料のうち Ag-Cu-Zn の３者を含むものは１検体，Ag-Zn は７検体，Ag-Cuは７検体，Ag のみのものは９検体あり，Ag 単独あるいは２元素の複合型と思われるものが多かった．一方，プラスチック製品のうち歯ブラシの１検体ではブラシから Ag，Zn を，柄から Ag，Zn，Cu を検出したが，他のものからは Zn のみを検出し，繊維製品類と比べ含有している抗菌金属の種類に違いが見られた．

Al のみを検出したＢグループの試料は，無機系抗菌防臭剤の使用が示唆された．繊維の消臭剤にはアルミニウム化合物が利用されているが[6]，由来化合物の同定には至らなかった．Ag，Zn，Cu，Al いずれの元素も検出しないＣグループは，有機系抗菌剤が使用されている可能性も考えられる．

次に，すべての試料中の各金属含有量を比べると Ag は20～127 μg／g（平均44 μg／g，相対標準偏差 C.V. 66%），Zn は20～5087 μg／g（平均1204 μg／g，C.V. 149%），Cu は19～4691 μg／g（平均953 μg／g，C.V. 151%），Al は19～1847 μg／g（平均117 μg／g，C.V. 212%）と Ag は比較的低濃度でバラツキも少ないのに対し，Zn，Cu はバラツキが大きくかなり高濃度のものも多く見られた．また，Al は低濃度のものが多いがマスクの２のように濃度の高いものもあった．通常，各金属の抗菌効果は Ag＞Cu＞Zn の順と言われている[2]が，微生物によりその効果は異なるという報告もある[7]ことから，目的の効果を期待するためには，それぞれの金属について適切な使用量があるものと考えられる．今回の調査では Ag については含有量のバラツキが少なく適切な使用がなされているものと推定されるが，Cu と Zn については含有量の高いものもあり，必要以上に使用されていることも考えられる．したがって金属使用量と抗菌効果との兼ね合いについても今後検討する必要がある．

ま と め

「抗菌加工」と表示されている家庭用品（繊維製品，プラスチック製品）について Ag，Zn，Cu，Al を指標として金属系抗菌防臭加工剤の有無を検討した．その結果，抗菌ゼオライト処理が施されていると推定されるものは全体の56%を占め，その使用実態はきわめて広いことが示唆された．このうち繊維製品は Ag を主体に Zn，Cu が共存する例が多かった．一方，プラスチック製品では Ag を検出したものは歯ブラシの１検体（ブラシ，柄）と少なく，他は Zn を多く含んでいた．また全試料（72検体）で Al のみを検出した試料は28検体（39%），いずれの金属も検出しないものは４検体（５%）で，後２者についてはどのような抗菌防臭加工処理が施されているかについては明らかではなかった．

含有金属から使用されている抗菌防臭剤を同定することは困難なことであり，今回も推定の域を出ず，不明のものも多数あった．しかし，多くの家庭用品に金属が含まれていることは調査からも明らかであることから同定法の開発などさらに検討の必要があると考える．

文　献

1）中島照夫：加工技術，**31**，182-190，1996.
2）萩原善次：抗菌防臭，弓削治監修，101-121，1989，株式会社　繊維社，大阪.
3）高麗寛紀：人にやさしい繊維と加工，65-80，1995，株式会社　繊維社，大阪.
4）中島晴信，松永一郎，宮野直子，他：第29回全国衛生化学技術協議会年会講演集　金沢　160-161，1992.
5）仲村智子，藤田忠雄，岡本章良，他：第30回全国衛生化学技術協議会年会講演集　熊本　172-173，1993.
6）桧垣誠吾：人にやさしい繊維と加工，235-236，1995，株式会社　繊維社，大阪.
7）高山正彦，杉本浩子，内田理恵，山内理恵子，丹野憲二：防菌防黴，**22**，531-536，1994.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 61-65, 1996

家庭用品の衛生化学的研究(第36報*)
コンタクトレンズケア用品中の防腐剤の調査

岩崎 由美子**, 山野辺 秀夫**, 上原 真一**,
観 照雄**, 中村 弘**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXVI*)
Study of Antiseptic in Cleaning and Soaking Solution for Contact Lenses

YUMIKO IWASAKI**, HIDEO YAMANOBE**, SHIN-ICHI UEHARA**,
TERUO KAN** and HIROSHI NAKAMURA**

Keywords：防腐剤 antiseptic, コンタクトレンズ contact lenses, 洗浄液 cleaning solution, 保存液 soaking solution, 家庭用品 household necessities

緒　言

コンタクトレンズケア用品(洗浄剤, 保存剤, 洗浄保存剤等, 以下ケア用品)は, コンタクトレンズの洗浄, 保存を目的に使用され, コンタクトレンズの種類により, ハード用, ソフト用, 酸素透過性ハード用など多種類が市販されている.

日本コンタクトレンズ協会は, 会員が製造または販売するケア用品の安全性を確保するとともに品質の向上を図る目的で, 平成3年10月「コンタクトレンズ用洗浄剤, 保存剤, 洗浄保存剤等に関する安全衛生自主基準」を作成し, 平成5年, 同7年の改訂を経て, 施行している[1].

著者らは, ケア用品の防腐剤の使用実態を把握する目的で市販の洗浄剤, 保存剤及び洗浄保存剤の防腐剤について調査したので報告する.

今回検討した防腐剤は, 医薬品, 医薬部外品, 食品及び化粧品などに使用されているパラオキシ安息香酸エステル類6種(PB-エステル), デヒドロ酢酸(DHA), ソルビン酸(SoA), 安息香酸(BA), イソプロピルメチルフェノール(IMP), サリチル酸(SA), チアベンダゾール(TBZ), イマザリル, トリクロサン, 塩化ベンザルコニウム(BzAC), 塩化ベンゼトニウム(BzEC), クロルヘキシジン, ホルムアルデヒド及びチメロサールの19種である.

実験方法

1．試料　平成7年1月から10月に東京都内小売店より購入したケア用品40検体(洗浄剤17検体, 保存剤17検体, 洗浄保存剤6検体)を試料とした.

2．試薬及び標準溶液

試薬　パラオキシ安息香酸メチルエステル(PB-Me), エチルエステル(PB-Et), プロピルエステル(PB-Pr), イソプロピルエステル(PB-iso-Pr), ブチルエステル(PB-Bu), イソブチルエステル(PB-iso-Bu), DHA, SoA, BA, SA, ホルムアルデヒド液(以上和光純薬試薬特級). IMP(東京化成1級). TBZ, イマザリル(以上和光純薬残留農薬試験用). BzAC(花王石鹸). BzEC(三信化学). 塩酸クロルヘキシジン(住友化学). トリクロサン(加商). 原子吸光分析用水銀標準液(和光純薬).

標準溶液　1)PB-エステル標準溶液：PB-Me, PB-Et, PB-Pr, PB-iso-Pr, PB-Bu及びPB-iso-Bu各100mgを精密にはかり, エタノールで100mlとする. この液をエタノールで希釈し1.0～10.0 μg/mlの標準溶液を調製した. 2)DHA, SoA, BA, IMP及びSA標準溶液：DHA, SoA, BA, IMP及びSA各100mgを精密にはかり, エタノールで100mlとする. この液をエタノールで希釈し1.0～10.0 μg/mlの標準溶液を調製した. 3)BzAC, BzEC及びイマザリル標準溶液：BzAC, BzEC及びイマザリル各100mgを精密にはかり, メタノールで100mlとする. こ

---

*第35報, 東京衛研年報, **47**, 57-60, 1996.

**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

の液をメタノールで希釈し1.0～10.0 μg/mlの標準溶液を調製した．4)クロルヘキシジン標準溶液：塩酸クロルヘキシジン100mgを精密にはかり，メタノール・水(1：1)で100mlとする．この液をメタノールで希釈し10.0～50.0 μg/mlの標準溶液を調製した．5)TBZ標準溶液：TBZ100mgを精密にはかり，メタノールで100mlとする．この液をメタノールで希釈し1.0～10.0 μg/mlの標準溶液を調製した．6)トリクロサン標準溶液：トリクロサン100mgを精密にはかり，メタノールで100mlとする．この液をメタノールで希釈し1.0～10.0 μg/mlの標準溶液を調製した．7)ホルムアルデヒド標準溶液：ホルムアルデヒド液から家庭用品規制法施行規則ホルムアルデヒドの項に従い4.0，0.8，0.4 μg/mlの標準溶液を調製した[2]．8)水銀標準溶液：1000 μg/ml水銀標準液から家庭用品規制法施行規則有機水銀化合物の項に従い1 μg/mlの標準溶液を調製した[2]．

3．装置　高速液体クロマトグラフ(HPLC)：ガリバーシリーズPU-980型ポンプ，UV-780型UV/VIS検出器，821-FP型蛍光検出器(以上日本分光製)，ガスクロマトグラフ(GC)：GC-14A型(島津製作所製)，分光光度計：U-300型(日立製作所製)，水銀分析装置：マーキュリーSP型(日本インスツルメント製)，ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)：VG-70S型(VG社製)．

4．測定条件　1)HPLC測定条件Ⅰ：衛生試験法香粧品試験法の防腐剤(パラオキシ安息香酸エステル)の条件による[3]．HPLC測定条件Ⅱ：衛生試験法香粧品試験法の防腐剤(ソルビン酸，安息香酸，サリチル酸，デヒドロ酢酸)の条件による[3]．HPLC測定条件Ⅲ：カラム，TSKgel-80T_M 5 μm×15cm(東ソー製)；移動相，0.05Mリン酸二水素ナトリウム・アセトニトリル・メタノール＝10：7：3(0.001M塩化セチルトリメチルアンモニウム含有)pH5.2；流速，1.3ml/min；検出，UV215nm；カラム温度，40℃．HPLC測定条件Ⅳ：カラム，CAPCELL PAK-C18 4.6 μm×25cm(資生堂製)；移動相，0.05Mリン酸二水素カリウム(pH2.5)・アセトニトリル＝2：3(0.01Mドデシル硫酸ナトリウム含有)；流速，1.2ml/min；検出，UV260nm；カラム温度，40℃．HPLC測定条件Ⅴ：衛生試験法食品添加物試験法(チアベンダゾール)の条件による[3]．2)GC測定条件：カラム，フューズドシリカメガボアカラムDB-17 0.53mmi.d.×長さ30m×膜厚1.0 μm(J&W社製)；カラム温度，220℃；キャリヤーガス(窒素)，20ml/min；検出器，電子捕獲型検出器；検出器温度，300℃；注入温度，280℃．3)GC-MS測定条件：カラム，DB-17 0.32mmi.d.×長さ30m×膜厚0.1 μm(J&W社製)；カラム温度，60－270℃(8℃/min)；キャリヤーガス(He)，1ml/min；注入，1 μl スプリットレスモード；マスレンジ，600-60/sec；イオン源，電子衝撃型；イオン源温度，280℃．4)MS-FAB測定条件：不活性ガス，Xe；マスレンジ，600-60/10sec；イオン源，FAB(Fast Atom Bombardment)；マトリックス，グリセリンまたはチオグリセロール．

5．試料溶液の調製　試料2.0 gを精秤し，メタノールで溶解し正確に20mlとして試料溶液とした．不溶物がある場合は0.5 μmのメンブランフィルターでろ過するか，3500rpmで10分間遠心分離し，そのろ液または上澄液を試料溶液とした．

6．防腐剤の定性・定量　各防腐剤は次に示す方法で定量した．検出した物質については，さらにGC-MS，MS-FABまたは各項目に記載した方法で確認を行った．

1)PB-エステル類：試料溶液10 μlを測定条件ⅠのHPLCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．

2)DHA，SoA，BA，IMP及びSA：試料溶液10 μlを測定条件ⅡのHPLCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．

3)BzAC，BzEC及びイマザリル：試料溶液10 μlを測定条件ⅢのHPLCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．

4)クロルヘキシジン：試料溶液20 μlを測定条件ⅣのHPLCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．クロルヘキシジンはさらにMS-FABで確認した．

5)TBZ：試料溶液10 μlを測定条件ⅤのHPLCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．

6)トリクロサン：試料溶液をメタノールで10倍に希釈しGC用試料溶液とした．その液2 μlをGCに注入し，標準溶液のピーク面積から作成した検量線により定量した．

7)ホルムアルデヒド：試料1.0 gを精秤し，水で正確に20mlにし試料溶液とする．試料溶液5.0mlを正確に取り，家庭用品規制法施行規則ホルムアルデヒドの接着剤の試験に準じアセチルアセトン法で吸光度測定した．0.4 μg/ml以上発色したものについては，ジメドン分解による確認を行った[2]．

8)水銀：石英ボートに顆粒状活性アルミナを薄く広げ，試料0.2mlを加えて，その上に顆粒状活性アルミナを薄く広げ，さらに炭酸ナトリウム－水酸化カルシウム

(1：1)の混合粉末を加えて，家庭用品規制法施行規則有機水銀化合物のフレームレス原子吸光法加熱気化－金アマルガム法に準じて試験した[2]．

結果及び考察

ケア用品は自主基準の菌数限度試験に「製品1ml当たり生菌数が100個を超えないこと」とあるように厳密な管理のもとに製造されているが，ケア用品開封後の二次汚染，さらにコンタクトレンズに残った脂肪，タンパク質を栄養源とする細菌の繁殖が懸念される．そのためケア用品には，細菌の繁殖の防止のために防腐剤が添加されていると考えられる．

今回検討した40検体中7検体に「防腐剤」，「保存剤」または具体的な防腐剤の名称の表示が記載されていた．

市販ケア用品40検体の分析結果を表1に示す．1)PB-エステル類：PB-エステル類はハード用洗浄剤1検体，酸素透過性ハード用洗浄剤1検体及び酸素透過性ハード用洗浄剤保存剤1検体にメチルとプロピルエステルが配合されていた．PB-エステル類は2種が併用されることが多く，特にメチルとプロピルエステルの組み合わせは抗菌力が増強されるといわれている[4]．2)DHA，SoA，BA，IMP及びSA：SoAは10検体(洗浄剤2検体，洗浄保存剤2検体，保存剤6検体)から0.018～0.091%の濃度で検出され，化粧品などの常用濃度(0.1～0.2%)以下であった[4]．BAは3検体より検出したが，そのうち2検体は0.01%以下と一般的な添加量(0.05～0.1%)からみて低濃度であった[5]．DHA，IMP及びSAについては検出されなかった．3)TBZ，イマザリル及びトリクロサン：TBZ及びイマザリルは食品添加物として，かんきつ類の防かび剤して使用され，イマザリルは平成4年食品添加物に指定された[3]．TBZ及びトリクロサンは衣料品の抗菌防臭加工に用いられている[6,7]．著者らは前報でTBZを家庭用品中から検出したことを報告した[7]．ケア用品についてもTBZの配合を予想したが今回の40検体からは検出されなかった．イマザリル及びトリクロサンも同様に検出されなかった．4)BzAC，BzEC：BzAC，BzECは陽イオン界面活性剤で，殺菌消毒剤として日本薬局方に収載されているが，40検体のいずれからも検出されなかった．5)クロルヘキシジン：クロルヘキシジンのグルコン酸塩は殺菌消毒剤として日本薬局方に収載され，皮膚の消毒及び滅菌器具の保存に適用されている．保存剤4検体からクロルヘキシジン0.001～0.005%が検出された．クロルヘキシジンが配合されていた試料は，24，25番のハード用保存剤と28，33番の酸素透過性ハード用保存剤で，ソフトレンズ用ケア用品には配合されていなかった．これは，グルコン酸クロルヘキシジンがソフトコンタクトレンズ材のポリハイドロキシーエチルメタクリレートと親和性が高いためソフトレンズ用ケア用品には適当でないためと思われる[4]．6)ホルムアルデヒド：輸入の化粧品からホルムアルデヒドが検出されることがあるので，輸入品からの検出を予想し検査を行った．その結果，洗浄剤（うち輸入品2検体）より0.002，0.014，0.015%のホルムアルデヒドを検出した．ホルムアルデヒドは抗原性が高く，アレルギー性皮膚障害の原因となるため，「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，下着等の繊維製品，かつら等の接着剤については「75ppm以下」の基準が設定されている．洗浄剤はコンタクトレンズ使用後に脂質，タンパク質，その他の汚れを除去するのために用いられるが，充分に水洗して，ホルムアルデヒドを除く必要がある．このようなホルムアルデヒドをコンタクトレンズ用洗浄剤に使用することは好ましいこととは思われない．7)チメロサール：チメロサールは第8改正日本薬局方まで収載され，外用殺菌剤に配合されていたが，有機水銀の環境汚染や中枢神経傷害など安全性の面から医薬品には配合されなくなっている[8]．ケア用品への使用を家庭用品規制法施行規則有機水銀化合物の項に準じで検査した結果，水銀は検出されかった．したがって，チメロサールの添加はないものと思われる．

以上，上記19種の防腐剤について調査した結果，PB-MeとPB-Prの組み合わせが3検体，SoAが10検体，BAが3検体，クロルヘキシジンが4検体，ホルムアルデヒドが3検体から検出された．その他の防腐剤については使用が認められなかった．

また，40検体中，17検体からは防腐剤は不検出で，そのうち1検体は「保存剤」の表示があるにもかかわらず不検出であったことから，今回検討した防腐剤以外のものが添加されている可能性もあると考えられる．

ま と め

市販コンタクトレンズ用ケア用品40検体の防腐剤の使用状況を調査した．その結果，PB-MeとPB-Prの併用は3検体，SoAは10検体，BAは3検体，クロルヘキシジンは4検体，ホルムアルデヒドは3検体で認められた．DHA，IMP，SA，TBZ，イマザリル，トリクロサン，BzAC，BzEC及びチメロサールはいずれからも検出されなかった．

表1．ケア用品中の防腐剤の分析結果

No. 試料	防腐剤の表示	結果(W/W%)
洗浄剤		
1ハード用(酵素)	—*	—**
2ハード用	保存剤	PB-メチル 0.078 PB-プロピル 0.012
3ハード用	—	—
4ハード用	—	—
5ハード用	—	—
6ハード用(研磨剤入)	—	ホルムアルデヒド 0.015
7 O_2ハード用	保存剤	PB-メチル 0.069 PB-プロピル 0.011
8 O_2ハード用	—	ホルムアルデヒド 0.002
9 O_2ハード用(酵素)	—	—
10 O_2ハード用	—	ホルムアルデヒド 0.014
11 O_2ハード用(酵素)	—	—
12 O_2ハード用	—	—
13ソフト用	保存剤	—
14ソフト用	—	ソルビン酸 0.018
15ソフト用	—	ソルビン酸 0.232
16ソフト用	—	安息香酸 0.404
17ソフト用	—	—
洗浄保存剤		
18ハード用	—	—
19 O_2ハード用	—	ソルビン酸 0.075
20 O_2ハード用	パラオキシ安息香酸エステル	PB-メチル 0.071 PB-プロピル 0.021
21 O_2ハード用	—	安息香酸 0.007
22 O_2ハード用	—	—
23 O_2ハード用非水ソフト用	—	ソルビン酸 0.088
保存剤		
24ハード用	グルコン酸クロルヘキシジン	クロルヘキシジン 0.002
25ハード用	—	クロルヘキシジン 0.005
26 O_2ハード用非水ソフト用	防腐剤	ソルビン酸 0.060
27 O_2ハード用	—	ソルビン酸 0.036
28 O_2ハード用	防腐剤	クロルヘキシジン 0.003
29 O_2ハード用	—	—
30 O_2ハード用	—	—
31 O_2ハード用	—	安息香酸 0.006
32 O_2ハード用	—	—
33 O_2ハード用	—	クロルヘキシジン 0.001
34 O_2ハード用	—	ソルビン酸 0.071
35 O_2ハード用(酵素)	—	ソルビン酸 0.055
36ソフト用	—	ソルビン酸 0.091
37ソフト用	—	—
38ソフト用	—	—
39ソフト用	—	—
40ソフト用	—	ソルビン酸 0.087

—*：防腐剤の表示なし
—**：19種の防腐剤を検出しない
PB-メチル：パラオキシ安息香酸メチル
PB-プロピル：パラオキシ安息香酸プロピル
O_2ハード用：酸素透過性ハード用

文　献

1）コンタクトレンズ用洗浄剤，保存剤，洗浄保存剤等に関する安全自主基準(改正第3版)：平成7年9月20日　日本コンタクトレンズ協会
2）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
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，890-893，1990，金原出版，東京.
4）一番ヶ瀬尚，上釜兼人，小田切優樹：医薬品の開発，第12巻，301-309，1990，廣川書店，東京.
5）日本公定書協会監修：第12改正日本薬局方解説書，C115-C118，1991，廣川書店，東京.
6）雨宮　敬，酒井正美，森謙一郎，他：東京衛研年報，**35**，133-137，1984.
7）観　照雄，岩崎由美子，山野辺秀夫，他：東京衛研年報，**47**，53-56，1996.
8）日本公定書協会監修：第8改正日本薬局方解説書，C114-C117，1971，廣川書店，東京.

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22編の報告が掲載されている．これらのうち，魚介類中の除草剤に関するもの，魚介類加工品中の合成着色料に関するもの，ウニ及びその加工品中のホウ酸及びアルミニウムに関するもの，国産チーズの衛生学的品質評価に関するもの，ワイン，納豆など発酵食品中の不揮発性アミンに関するもの，食用油脂等の酸化防止剤*tert*-ブチルヒドロキノンに関するもの，穀類，豆類及び加工品中のマイコトキシンに関するもの，化学性食中毒事例に関するもの，ミネラルウォーターの異物に関するもの，バイオ食品の安全性評価に関するものがそれぞれ１編，農産物中の残留農薬に関するものが４編，食品の器具・容器に関するものが２編，食品添加物の品質調査に関するものが３編及び糖尿病治療食や運動とカルシウム摂取量など栄養学的な調査に関するものが３編である．

魚介類中のジフェニルエーテル系除草剤について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高感度分析法を検討した．東京湾産スズキ等を対象としてクロルニトロフェン，ニトロフェン，クロメトキシルの調査を行ったところ，これらの除草剤は低濃度であったが，0.1～６ppbの範囲で検出された．

不許可合成着色料であるオレンジⅡが疑われる輸入干しえびについて確認試験を行った．試料よりアンモニア含有エタノールで抽出後，NH_2カートリッジで精製，TLCにより分析したところ，オレンジⅡ及びクロセインオレンジに一致した．HPLC分析により保持時間及び吸収スペクトルが一致したことからオレンジⅡと同定した．19検体中９検体からオレンジⅡが検出され，いずれもベトナム産であった．

生ウニ及びウニ加工品中のホウ酸及びアルミニウムを調査した．生及び殻付きウニ中のホウ酸及びアルミニウムのバックグラウンド値を調べた．粒ウニ13試料中4試料，練りウニ５試料中２試料から高濃度のホウ酸が検出され，ホウ酸が添加された可能性を示した．市販生ウニ10試料及びウニ加工品20試料中10試料から，いずれもバックグラウンド値より高濃度のアルミニウムが検出され，明礬が使用されたものと考えられた．

国産チーズの衛生学的品質評価を行った．理化学的試験としてpH，水分，チラミン，保存料等の項目，細菌学的試験として大腸菌，サルモネラ，セレウス菌等の項目を検査した．その結果，理化学的試験では特に食品衛生上問題となるものはなかったが，細菌学的試験では若干の検体より大腸菌，黄色ブドウ球菌が，また全検体の15%よりセレウス菌が検出された．

白ワイン，ビール，納豆等の発酵食品中の不揮発性アミンを調査した．白ワインはプトレシン，フェネチルアミン，ビールは輸入品及び国産品共にチラミン，プトレシン，納豆はスペルミジンが多く検出された．またひきわり豆納豆よりチラミンが平均9.5μg／g検出されたが，丸大豆納豆では全く検出されなかった．原料大豆と製品を調査した結果，いずれもチラミンを検出しないことから，ひきわり豆納豆中のチラミンは原料に由来するのではなく，使用した納豆菌のアミン生産能の違いに起因することが示唆された．

食用油脂等の酸化防止剤である*tert*-ブチルヒドロキノンは，我が国では食品への使用が認められていない．そのため輸入食品から検出される場合が多い．今回，フォトダイオードアレイ検出器付HPLC分析法を検討した．この方法によりビスケットやクラッカー等の輸入洋菓子から*tert*-ブチルヒドロキノンが2.4～20μg／g検出された．

穀類，豆類及びそれらの加工品中のオクラトキシンA，B及びシトリニンのHPLC分析法を検討した．試料をpH２以下に調整，酢酸エチルで抽出，液ー液分配によりクリーンアップした後，これらのマイコトキシンを蛍光検出器付HPLCにより測定した．各試料からの添加回収率は67.7%以上であり，検出限界はオクラトキシンAが1.0μg／kg，オクラトキシンB，シトリニンが2.0μg／kgであった．

平成７年度に起きた化学性食中毒のうち，ハシリドコロの誤食によるもの１件，フグ中毒事例５件，ヒスタミンによる有症苦情事例１件，重金属溶出による有症苦情事例２件，清涼飲料水の劣化などによる有症苦情事例２件，学校給食の異物混入事例１件及び動物性異物混入による有症苦情例2件の計14事例を取り上げ，事例の概要，原因物質の検索について報告した．

ニュージーランド産，緊急監視及び苦情品ミネラルウオーター合計80検体の異物について調査した．ニュージーランド産4検体及び国内産２検体より真菌の菌糸塊が検出された．容器，キャップの裏蓋の一部が削り落ちたもの，合成樹脂製の製造機器の一部が落下したと考えられるもの，鉱物性異物などの混入したものがイタリア産２検体，フランス産１検体及びスイス産１検体より検出された．

バイオテクノロジーの技術により生産されたヤマメ，ニジマスの安全性を調べるため，動物実験，変異原性試験，D型アミノ酸分析及び２次元電気泳動を行った．バイオテクノロジー生産の３倍体の動物実験及び変異原性試験は２倍体と同様の結果であった．14種類のD型アミノ酸分析結果及び２次元電気泳動パターンにおいても３倍体と２倍体の間に有意な差は認められなかった．

平成７年度に都内で販売された野菜，果実類30検体の残留農薬実態を調査した．有機リン系殺虫剤11種，有機塩素系農薬では殺虫剤１種，殺菌剤３種及びカーバメート剤２種が検出され，この中で食用菊から検出されたメソミルは残留基準を超えていた．無・減農薬栽培作物20検体を調査したところ，ミニトマト，トマトからプロシオンが，レタスからオキサミルが，ピーマンからメソミルが検出された．

平成７年度に都内に入荷した輸入農産物68種240作物の残留農薬実態を調査した．有機リン系殺虫剤８種，有機塩素系農薬(殺虫剤２種，殺菌剤１種) ３種，カーバメート系農薬(殺虫剤４種，除草剤1種) ５種及びその他の農薬２種が検出された．農薬の検出率は地域による差が小さくなる傾向が認められ，有機塩素系殺虫剤はアジア産のみから検出された．

食品中の残留農薬の分析法は，農薬数や検体数が多いため，検体の迅速処理など効率的な分析法の開発が求められている．今回は*N*-メチルカーバメイト系農薬を対象として抽出・精製にケイソウ土の固相抽出，GPC，ミニカラムを用いる方法を検討した．その結果，前処理操作の簡便化，多数の検体の同時処理が可能となった．本法は食品中の残留農薬のスクリーニング法として有用である．

平成６，７年度に多摩地区で流通していた野菜類14種77作物及び漬物加工品８種40検体について残留農薬実態を調査した．野菜類からは有機塩素系農薬５種及び有機リン系農薬７種が検出された．これらのうちプロシミドンがきゅうりの14作物中10作物から高頻度に検出された．他方，漬物加工品からも有機塩素系農薬３種及び有機リン系農薬４種が検出された．これらの調査結果から，いずれも残留基準値及び登録保留基準値を超えるものは認められなかった．

食品の器具・容器包装は食品衛生法で規格基準が定められている．しかし，割り箸等の木製器具に関しては特別な規格は見られず，今まで監視の対象外であった．今回，抗菌・防かび剤処理の可能性のある割り箸等について，防かび剤オルトフェニルフェノール，チアベンダゾール及びジフェニルの調査を行った．その結果，木製割り箸及び巻きすよりオルトフェニルフェノールが検出された．

最近，マグカップに封入された保冷剤を容器のひび割れから飲み物と共に誤飲する事例が発生し，食品衛生上問題になった．そこで，プラスチック製マグカップ及びジョッキに封入された保冷剤の鑑別法を検討し，実用的な方法を開発した．調査の結果，保冷剤としてエチレングリコール，ポリビニルアルコールなどが使用されていた．

天然添加物は平成８年４月に既存添加物名簿に収載されたが，未だ公的規格は整備されていない．今回，市販のしらこたん白，ペクチン分解物など４品目の天然保存料及びアラビアゴム，カラギーナンなど13品目の天然増

粘安定剤について国際規格や国内自主規格に準拠して規格試験を実施し，品質調査を行った．その結果，一部に規格に適合しないものがみられ，また試験法の適用上にも問題点が認められた．

合成添加物である縮合リン酸塩は，食品加工において変色防止剤，結着剤，pH調整剤など多様な用途を有する．現行規格では正リン酸塩の混在を規制しているが，定性試験のため混在量を把握することができない．今回，イオンクロマトグラフィーによる簡易定量法を検討し，市販製品を調査した結果，正リン酸塩の混在が認められた．

水耕栽培野菜(ほうれんそう，こまつな，しゅんぎく)と四訂成分表の未収載野菜(モロヘイヤ，カイワレダイコン)中のビタミン及び無機成分について調査した．水耕栽培野菜中の鉄，ナトリウムは四訂成分表値と比較して低含量であった．モロヘイヤはほうれんそう，こまつなと比較してカロチン，ビタミンB_1，B_2，カルシウム，リン，銅が高く，ナトリウムが低かった．また，カイワレダイコンは四訂成分表のだいこん，まびき菜よりビタミンB_1，リン以外は低かった．

骨粗しょう症の調査のため，運動習慣の有無により41才から70才までの女性283名について尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン，食事からのカルシウム摂取量，骨密度，体格を比較した．その結果，運動習慣群と非運動習慣群の間に尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン，カルシウム摂取量，骨密度に有意差は認められなかった．

市販の糖尿病治療食中の脂肪含有量及び脂肪酸組成を調査した．脂肪総量は1食当たり8.7～14.5 g であり，その含有量は表示値とほぼ一致した．脂肪酸の主成分はパルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸及びリノール酸であり，飽和脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の比は0.87～4.70であった．また飽和脂肪酸に対する多価不飽和脂肪酸の比は0.7～1.9であった．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 71-74, 1996

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魚介類中ジフェニールエーテル系除草剤の定量

水石和子*, 雨宮　敬*, 中村　弘*

Determination of Diphenylether Herbicides in Fish and Shellfish by Gas Chromatography with Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry

KAZUKO MIZUISHI*, TAKASHI AMEMIYA* and HIROSHI NAKAMURA*

A method is described for the determination of diphenylether herbicides (chloronitrophen : CNP, nitrofen : NIP and chlomethoxynil : X-52) in fish and shellfish by gas chromatography with negative ion chemical ionization mass spectrometry (NCI-MS). After the herbicides were extracted with organicsolvents and cleaned up, they were separated using capillary GC column (DB-1, 15 m×0.25 mm, 0.25 μm film thickness) and determined by NCI-MS.

The advantages of NCI-MS determination were its sensitivity and selectivity. The detection limits studies of CNP, NIP and X-52 in spiked fish sample showed 0.05ng per gram of sample. These herbicides were detected at 0.1-6ppb in fish and shellfish.

Keywords：負イオン化学イオン化質量分析 negative ion chemical ionization mass spectrometry, ジフェニールエーテル系除草剤 diphenylether herbicide, CNP (chloronitrofen), NIP (nitrofen), X-52 (chlomethoxynil), 魚介類 fish and shellfish

緒　言

ジフェニールエーテル系除草剤は初期雑草の防除に強い効果を示す除草剤として水田に広範に用いられてきた．その結果，河川水系への流出・汚染，さらに海水汚染が生じ，これらの水系汚染に起因する水道水汚染や魚介類汚染が問題として注目された[1-2]．我が国では，ジフェニールエーテル系除草剤としてはクロルニトロフェン(CNP)，ニトロフェン(NIP)及びクロメトキシニル(X-52)が用いられてきた．これらのうちNIPは1982年に登録が失効している．CNPは，近年その使用量と胆のうガン死亡率との関連性が指摘され問題となった[3-5]．その結果，CNPについての残留農薬安全性評価の見直しが検討され，平成6年には厚生省が『CNPに関してガンとの因果関係の有無が明らかになるまでの間は予防的な観点も取り入れ，一日摂取許容量を設定しないことが妥当と考える』との評価結果を出している[6]．その後関連製造者からはCNPを有効成分とする農薬(CNP剤)の製造及び販売を自粛するとの報告があり，さらに農林水産省は各都道府県に，使用者等関係者に適正使用の徹底化に指導通達を行っている(平成6年3月)．このような状況下で，CNPなどジフェニールエーテル系農薬による魚介類汚染の軽減が期待され，今後CNPが使用されなければ新たな魚介類汚染は生じないと考えられる．通達を受け，ジフェニールエーテル系農薬の残留状況の把握を目的とし，平成6年における東京湾産スズキ及び東京都中央市場搬入魚介類についてこれらの除草剤の調査を行った．今回は，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(GC-NCI-MS)によるジフェニールエーテル系農薬の超高感度分析法を検討し，本残留調査に適用して良好な結果を得たので報告する．

実験の部

1）**試薬**：NIP，CNP及びX-52は和光純薬工業(株)製農薬標準品を用いた．その他の試薬は全て特級を用いた．

2）**フロリジールカラム**：活栓付きガラスカラム(1 cm

*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

i.d.×30cm)の下層に130℃で12時間活性化したフロリジールPR 5 g，上層に無水硫酸ナトリウム2 gをヘキサンに懸濁し積層させたものを使用した．

3）装置：GC-MSはHewlett Packard社製ガスクロマトグラフHP5890シリーズⅡにVG社製質量分析計(MS, TRIO-1)を接続した装置を使用した．

4）分析条件：GC-NCI-MS条件をTable 1に示した．

5）試料：平成6年(1994年)7月－10月に東京湾で捕獲したスズキ10検体及び東京都中央市場で購入した(5月－10月)魚介類17検体について調査した．

6）試料の調製：魚介類の可食部をホモジナイズし試料とした．試料を約2g正確に遠心管に採取，アセトン20mlを加え3分間ホモジナイズ後遠心分離してアセトン相を分取した．さらにアセトン20mlで抽出し，有機相を合わせ，揮散防止のためノナン0.5mlを加えてから約5 mlに濃縮した．10%NaCl水溶液30mlを分液ロートに入れ，濃縮液を加えた．濃縮液について，ヘキサン：ジエチルエーテル(6：4)50mlを用いて2回抽出した．抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後ノナン0.5mlを加えてから，約5 mlに減圧濃縮した．分液ロートにヘキサン5 mlついで濃縮液を入れ，ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで2回抽出した．抽出液にノナン0.3mlを加え，1 ml以下に減圧濃縮した．残留物にヘキサン5 mlを加えてから，フロリジールカラムクロマトグラフィーでクリーンアップを行った．すなわち，ヘキサン45mlで洗浄後，ヘキサン：ジエチルエーテル(6：4)70mlで溶出した．濃縮液にノナン0.3mlを加え，1 ml以下に濃縮した．濃縮液を酢酸エチルで2 ml定容とし試験溶液とした．試料の前処理法をFig. 1に示す．

Table 1. GC-MS Conditions

Column	J&W DB-5, 15m × 0.25mm i.d., 0.25 μm film thickness
Sample	1 μl
Injection	splitless
Initial temp.	45℃
Programing temp.	15℃
Final oven temp.	260℃
Injection temp.	220℃
Carrier gas	He
He head pressure	70kPa
GC/MS interface temp.	230℃
Electron energy (CI)	70eV
Ionizer temp.	200℃
CI reagent gas	isobutane

結　果

1）NIP，CNPとX-52のGC-NCI-MS

Table 1のGC条件で分離し負イオン化学イオン化質量分析で得たクロマトグラム(TIC)をFig. 2に示した．Fig. 3に各化合物のマススペクトルを示した．それぞれの特徴的なフラグメントイオンm/z 283(NIP)，m/z 251(CNP)，m/z 262(X－52)を選び，選択イオンモニタリング(SIM)で測定して得たクロマトグラムをFig. 4に示した．

2）検量線と検出限界

NIP，CNPとX-52のNCI-MSによる検量線をFig. 5に

Fish Sample 2g
↓ Acetone 20ml, ×2
↓ Homoginize
↓ Centrifuge
Acetone layer
↓ Concentrate to ca.5ml
↓ 10%NaCl 30ml
↓ Extract with Hexane:Ethylether (6:4) 50ml,×2
Hexane-Ethylether layer
↓ Concentrate to ca.5ml
↓ Hexane 5ml
Hexane layer
↓ Extract with Acetonitril saturated with Hexane 30ml,×2
Acetonitril layer
↓ Concentrate to less than 1ml
↓ Add Hexane 5ml
Hexane layer
↓ Florisil column chromatography
↓ 1) Hexane 50ml
↓ 2) Hexane:Ethylether (6:4) 70ml
Hexane:Ethylether (6:4) layer
↓ Concentrate to 2ml
GC-NCI-MS

Figure 1. Sample Preparation Procedure

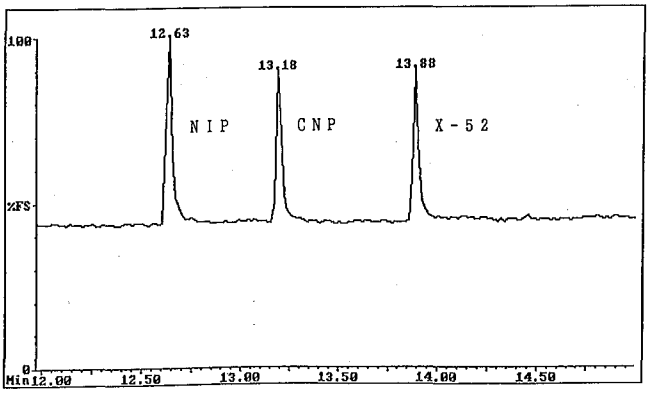


Figure 2. Total ion chromatogram (TIC) of NIP, CNP and X-52 (Negative ion chemical ionization, NCI mode)

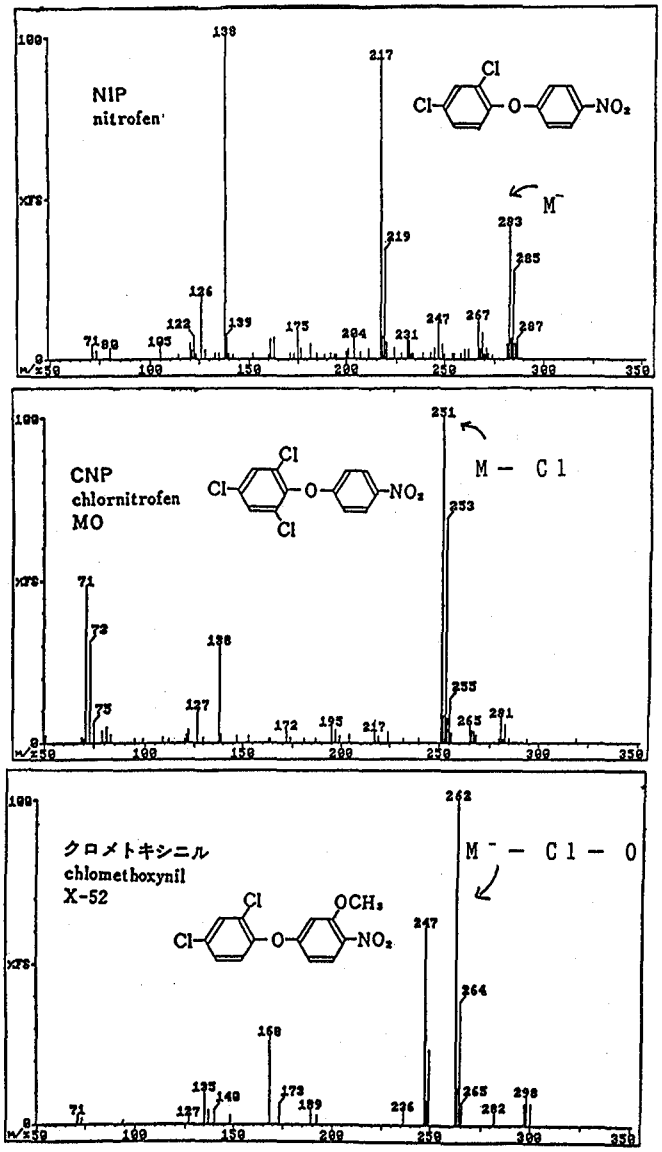


Figure 3. NCI-MS spectram of NIP, CNP and X-52

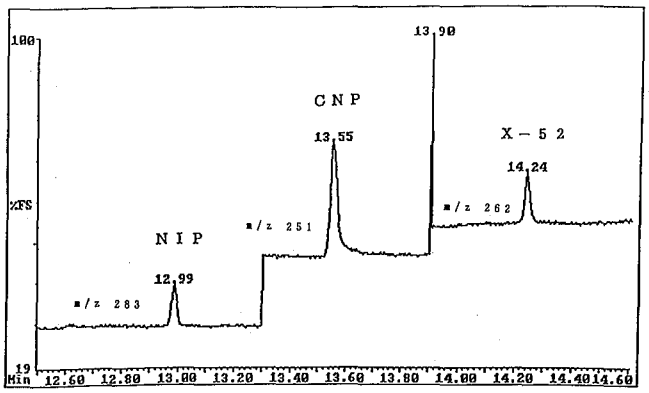


Figure 4. Selective ion monitoring chromatogram (SIM) of NIP, CNP and X-52 (Negative ion chemical ionization, NCI mode)

示す．1）は全イオン検出(TIC)の検量線，2）は選択イオンモニタリング(SIM)で得た検量線である．各化合物ともにそれぞれ5-100pg及び0.1-2pgの範囲で良好な直線性を示し，検出限界は3pg及び0.05pgであった．

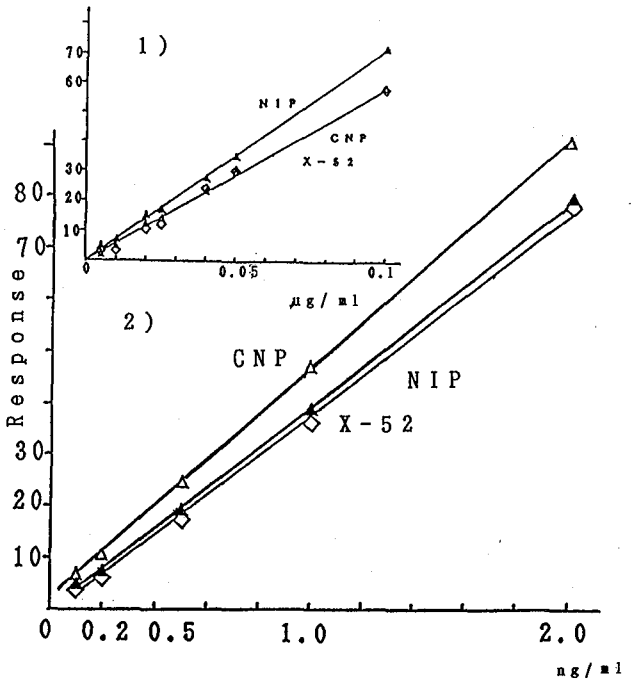


Figure 5. Calibration curves 1) TIC, 2) SIM

3）フロリジールカラムクロマトグラフィーにおける溶出

フロリジールカラムクロマトグラフィーでのNIP, CNPとX-52の溶出率をTable 2に示す．溶出液ヘキサンージエチルエーテル(9：1)ではX-52の回収率が悪く，ジエチルエーテルの割合を増大させるにつれ改善がみられた．ヘキサンージエチルエーテル(6：4)70mlによりNIP，CNP及びX-52の全てが92%以上の溶出率を得た．

4）魚試料からの抽出

スズキ試料についてのNIP，CNPとX-52の添加回収実験(試料2 gに0.05 μg を添加)の結果は，Table 3に示すようにいずれも平均82%以上の回収率であった．

5）実際試料についての測定結果

東京湾産スズキ(1994年に捕獲)10件，及び市販魚介類17種の測定結果をTable 4及びTable 5に示す．東京湾産スズキ7検体からそれぞれの化合物が0.1-6.0ppbの範囲で検出された．最高はX-52の6 ppbであった．他の魚類についてのCNP検出値は0.1-4ppbの範囲で，いず

Table 2. Rate of elution of NIP, CNP and X-52 in Florisil Column Chromatography

elute solvent (70ml)	rate of elution：% NIP	CNP	X-52
Hexane	0	0	0
Hexane：diethylether (9：1)	94	92	15
〃 (8：2)	92	98	18
〃 (6：4)	96	102	92

Table 3. Recoveries of NIP. CNP and X-52 from fortified Fish Samles (Sea bass)

Sample	Recoveries (%)		
	NIP	CNP	X-52
1	86	84	82
2	96	98	96
3	84	88	82
4	88	88	88
5	90	94	84

Herbicides were added to each 2 g sample at 0.05 μg.

Table 4. Content of NIP, CNP and X-52 in Sea-bass (Lataolabrax japonicus) *

Fish	NIP	CNP	X-52 (ppb)
no. 1	1.0	3.0	6.0
2	1.0	1.0	4.0
3	—	—	2.0
4	0.6	—	
5	0.6	0.1	—
6	0.6	—	—
7	0.5	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—

— : not detected
* : collected from Tokyo Bay in 1994

れも本分析法によって検出可能であった.

結　論

GC-NCI-MSを用いジフェニールエーテル系除草剤3種, CNP, NIP及びX-52の高感度分析を行った. NCI-MS法は検出限界が0.05pgの微量レベルであり, 環境試料についての有力な高感度及び高選択的な分析法であることを示した.

本法で, 平成6年度に東京湾で捕獲したスズキ10件についてCNP, NIPとX-52を, 及び東京中央市場で購入した魚介類17種についてCNPを測定した. 分析結果は, スズキにおいてX-52の6 ppbが最高値で, 低レベルの汚染であった. 1980年代の検出値(20－300ppbレベル)に比べ[7,8], 魚介類汚染への改善は顕著であった. 平成6年度にCNP剤使用規制に関する通達が都道府県知事に出されており, またX-52は製造業者が平成7年度から製造を中止するとの意向を示していることから, 今後, これらのジフェニールエーテル系除草剤による汚染は減少すると考える.

Table 5. Content of CNP in fish and shellfish *

	CNP (ppb)
Ainame (greenling, *Hexagrammos otakii*)	0.1
Aji (horse-mackerel, *Trachurus trauchurus*)	—
Agemaki (*Sinonovacula constrica*)	—
Hamachi (yellow tail, *Siriola quinqueradiata*)	—
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	—
Hotategai (*Patinopecten yessoensis*)	—
Isaki (gunt, *Parapristipoma trilimeatum*)	—
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonicus*)	—
Kanpachi (*Seriola dumerili*)	—
Kuromutu (*Scombrops gilberti*)	0.2
Maiwashi (sardin, *Sardinos melanosticta*)	4.0
Madai (sea bream, *Chrysophrys*)	—
Makogarei (marbled sole, *Limandan yokohamae*)	—
Masaba (mackerel, *Pneumophrus japonicus*)	0.5
Suzuki (sea-bass, *Lataolabrax japonicus*)	—
Takabe (*Labracogllosa argentiventris*)	—
Tatiuo (hair tail, *Trichiurus lepturus*)	0.6

— : not detected
* : The fish and shellfish were carried into the Tokyo Central Market in 1994.

(本調査は衛生局環境衛生部獣医衛生課と協力して実施したものである)
(本研究の概要は43回日本分析化学会1994年10月及び1995年第32回全国衛生化学技術協議会年会で発表した)

文　献

1) 山岸達典, 秋山和幸, 金子誠二, 他：東京衛研年報, **30**-1, 123-126, 1979
2) 山岸達典, 秋山和幸, 金子誠二, 他：東京衛研年報, **30**-1, 127-132, 1979
3) 平成4年度対がん10ヵ年総合戦略プロジェクト研究報告書, 112-115, 1994
4) 山本正治：医学のあゆみ, **166**, 839-840, 1993
5) Yamamoto, M. et al. : Acta Medica et Biologica (Niigata), **41** : 127-138, 1993
6) 農林水産省通知：6農蚕第1095号, 平成6年3月7日
7) 宮城県保険衛生センター報告, **1**, 51-54, 1983
8) 全国公害研会誌, **8**, 2, 90-92, 1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 75-77, 1996

干しえびから検出されたオレンジⅡの確認例

宮川弘之*, 堀井昭三*, 井草京子*,
笹本剛生*, 宮崎奉之*,
小久保彌太郎*,

Confirmation of Orange II Detected from Dried Shrimps

HIROYUKI MIYAKAWA*, SHOZO HORII*, KYOKO IGUSA*,
TAKEO SASAMOTO*, TOMOYUKI MIYAZAKI*
and YATARO KOKUBO*,

Keywords：干しえび dried shrimp, オレンジⅡ orange Ⅱ, オレンジⅠ orange Ⅰ, クロセインオレンジ crocein orange, 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

はじめに

近年，食品の輸入増加に伴い，わが国で許可されていない添加物を使用した食品が流通することがしばしばある．不許可添加物の中には毒性の高いものがあるため，消費者保護という立場から，このような添加物を使用した輸入食品を迅速かつ確実に発見し，市場から排除する必要がある．

平成6年12月から平成7年3月にかけて，不許可色素のオレンジⅡ（O-Ⅱ，4-[(2-hydroxy-1-naphthalenyl) azo]-Benzenesulfonic acid monosodium salt, C.I.15510)の使用が疑われる輸入干しえびの検査を特別区から依頼された．タール色素のO-Ⅱは，オレンジⅠ（O-Ⅰ，4-[(4-hydroxy-1-naphthalenyl) azo] -Benzenesulfonic acid monosodium salt, C.I.14600)およびクロセインオレンジ(CR-O, 6-hydroxy-5-(phenylazo)-2-Naphthalenesulfonic acid monosodium salt, C.I.15970, 別名オレンジRN)と類似構造であるため性状が似ており，これら色素との判別が必要になる．しかし，これまで食品中のO-ⅡとO-Ⅰ,CR-Oを完全に分離し，確認する効果的な分析法が確立されていないところから，われわれは試料調製法を検討するとともに，薄層クロマトグラフィー(TLC)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用することによりO-Ⅱを確実に同定確認することができたので報告する．

実験方法

1．試料

O-Ⅱの使用による着色料使用基準違反の疑いがあるとして当研究科に搬入された市販輸入干しえび19検体．

2．試薬

色素標準溶液：O-Ⅰ，O-Ⅱは和光純薬工業(株)製orangeⅠ，orangeⅡ．CR-Oは東京化成工業(株)製crocein orange Gで，いずれも水-メタノール(1：1)で溶解し，TLC用には100ppm，HPLC用には10ppmの濃度として用いた．

固相抽出用カートリッジ：Waters社製Sep-Pak NH_2 カートリッジカラムは使用直前に水5mlを通過させて用いた．

TLCプレート：メルク社製シリカゲル60（20cm×20cm，層厚0.25mm）

TLC展開溶媒：酢酸エチル-メタノール-28%アンモニア水(3.3：1：1)

その他の試薬は，市販の試薬特級品を用いた．

3．装置

高速液体クロマトグラフ：インジェクターはレオダイン7125，ポンプは(株)島津製作所製LC-6AD型，検出器は同社製SPD-M6A型フォトダイオードアレイ検出器，データー処理装置は同社製M6PAC ver2.1を内蔵したNEC PC-9801RA型パーソナルコンピューターを用いた．

*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

4．HPLC測定条件

カラム：(株)ケムコ製 Nucleosil 5C18 4.6mm i.d.×250mm

移動相：0.005Mリン酸緩衝液(pH7.0)-テトラヒドロフラン(THF)(75：25)に，0.005Mの濃度になるように臭化テトラ-n-ブチルアンモニウム(TBABr)を加えた．

流速：0.5ml/min

カラム温度：40℃

注入量：10 μl

検出波長：400～600nm

5．試験溶液の調製

石川ら[1]による食品中のタール色素の一斉分析法に準じて行った．すなわち，図1に示したように，細切した試料約20 g に，1％アンモニア含有50%エタノール約200mlを加え，超音波水槽中で約10分間抽出した．静置後，上清を採取してエタノールを温浴中で揮散させた後，同量の水を加えた．この溶液を1N酢酸によりpH 6～7に調整後，3,000rpm 10分間遠心後ろ過したものをSep-Pak NH_2に負荷，水10ml，メタノール10mlで順次洗浄，1％アンモニア含有50%エタノール8 mlで溶出した．溶出液を減圧下濃縮乾固し，50%メタノール2 mlを加え，溶解，ろ過したものを試験溶液とした．

試料約20 g

↓

1％アンモニア含有50％エタノール約200ml
超音波水槽中で約10分間抽出

上　清

↓

温浴中でエタノールを揮散
同量の水を加える
酢酸によりpH 6～7に調整
3,000rpm 10分間遠心分離
ろ過

ろ　液

↓

Sep-Pak NH_2に負荷
水10mlで洗浄
メタノール10mlで洗浄
1％アンモニア含有50％エタノール8 mlで溶出

溶出液

↓

濃縮乾固
50％メタノール2 mlで溶解

試験溶液

図1．試験溶液の調整法

結果及び考察

1．試験溶液の調製

試料19検体を実験方法で述べた方法により処理した．

石川ら[1]は，Sep-Pak NH_2に負荷する前に，pHを3～4へ調整しているが，干しえびは高タンパク質であるため，このpHでは溶液中のタンパク質が沈澱し，そこに色素が吸着された．そこでpHを6～7へ調整したところ，タンパク質の沈澱が抑えられ，Sep-Pak NH_2への吸着も良好であったので，この条件を採用した．

2．TLCによる3種類の色素の判別

O-Ⅰ,O-Ⅱ,CR-Oの3種類の色素及び試料溶液をTLCへ供した結果，表1に示したRf値と色調が得られた．

試料14検体から，O-Ⅱ及びCR-Oと同一のスポットが得られた．これらのスポットはオレンジ色を呈し，Rf値も同じであったのに対し，O-Ⅰは朱色を呈し，Rf値も他の三者と異なる値を示した．この結果，これらの試料中にO-ⅡまたはCR-Oのいずれかが含まれることが推定されたが，O-ⅡとCR-Oの相違は判別できなかった．この二つの色素を明確に同定できるTLCの条件は衛生試験法・注解[2]にも見当たらないため，さらにHPLCによる同定を試みた．

3．HPLCによるO-ⅡとCR-Oの判別

石川ら[1]の方法に基づき，イオンペア試薬として水酸化テトラブチルアンモニウム(TBA)を用い，TBA溶液とアセトニトリルとでグラジェント溶出を行なったが，O-ⅡとCR-Oの分離はできなかった．また，この二つの色素は，吸収スペクトルも非常に似ているため，判別が困難であった．

O-ⅡとCR-OのHPLCによる分離については，大戸ら[3]，植松ら[4]等による報告があるが，大戸[3]らの方法は，O-ⅡとCR-Oの保持時間が極めて近く，判別が困難であると思われた．これに対して，植松ら[4]は，THFを含む移

表1．各色素と試料のTLCにおけるRf値及び色調

	Rf値	色　調
O-Ⅰ	0.35	朱　色
O-Ⅱ	0.53	オレンジ
CR-O	0.53	オレンジ
試料[a)]	0.53	オレンジ

[a)] スポットが得られた14検体

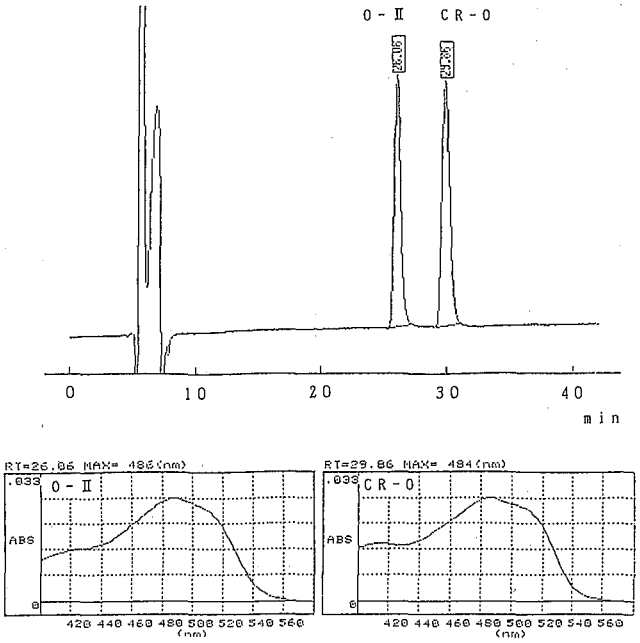


図2．O-ⅡとCR-Oのクロマトグラムと吸収スペクトル

動相にイオンペア試薬TBABrを添加して，黄色5号中に含まれるO-ⅡとCR-Oを良好に分離しているため，今回この方法を用いることにした．図2に，O-ⅡとCR-Oの標準品の486nmにおけるクロマトグラムと，各ピークにおける吸収スペクトルを示した．O-Ⅱの保持時間は約26分，CR-Oの保持時間は約30分であり，これら2種類の色素を完全に分離することができた．両者の吸収スペクトルは，吸収極大が約485nmで，非常に相似していた．

TLCによりO-Ⅱの使用が疑われた14検体の試験溶液をHPLCに供したところ，いずれも図3に示したようなクロマトグラムおよび吸収スペクトルが認められ，保持時間，吸収スペクトルとも図2で示したO-Ⅱと一致したことから，検体に含まれる色素をO-Ⅱと同定した．

なお，O-Ⅱが検出された14検体のうち，原産国が判明したものは9検体で，すべてベトナム産であった．

ま と め

O-Ⅱの使用が疑われる輸入干しえび19検体をSep-Pak NH_2を用いて精製し，TLCへ供したところ，14検体からO-ⅡあるいはCR-Oと思われるスポットが得られた．そ

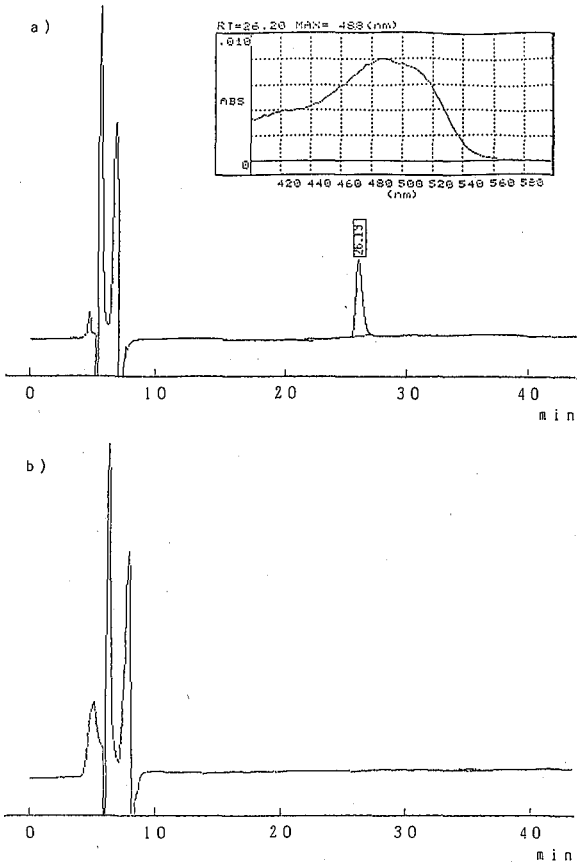


図3．試料のクロマトグラムと吸収スペクトル
a）O-Ⅱが検出された試料，b）O-Ⅱが検出されなかった試料

れらをTBABr，THFを含む移動相を用いてHPLCで分析したところ，全検体とも保持時間，スペクトルがO-Ⅱと一致したため，O-Ⅱと同定した．これら干しえびのうち，9検体がベトナム産であった．

文 献

1）石川ふさ子，斉藤和夫，中里光男，他：東京衛研年報，**41**，101-107，1990
2）日本薬学会編：衛生試験法・注解，540-545，1990，金原出版株式会社，東京
3）大戸幹也，松永明信，山本敦，他：富山衛研年報，**13**，134-140，1990
4）植松洋子，広門雅子，中島和雄，他：東京衛研年報，**39**，151-155，1988

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 78-81, 1996

ウニ加工品及び生ウニのホウ酸及びアルミニウム含有量調査

天川映子*, 荻原勉*, 斉藤和夫*,
藤井孝*, 田村行弘*,

Contents of Boric Acid and Aluminium in Processed and Raw Sea Urchin Eggs

EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*, KAZUO SAITO*,
TAKASHI FUJII* and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：ホウ酸 boric acid, アルミニウム aluminium, みょうばん aluminium potassium sulfate, ウニ加工品 processed sea urchin eggs, 生ウニ raw sea urchin eggs

まえがき

平成8年3月に，都内で中国産の原料用ウニ塩蔵品(塩ウニ)から2.8～13 g/kgのホウ酸が検出され，問題になった．また，塩ウニを水切りしてびん詰にしアルコールを加えて作られる粒ウニから0.68～1.7 g/kg，塩ウニにアルコールや調味料を加え練って作られる練ウニ[1]から2.2 g～7.0 g/kgのホウ酸が検出された．

ホウ酸は，食品衛生法の寒天の成分規格で，ホウ酸として，1 g/kg以下の含有が認められているが，食品への添加は認められていない．一方，ホウ酸は植物や海藻類に広く分布しており[2]，海藻を餌にするウニは，当然のことながらホウ酸を含有すると考えられる．従って，検出されたホウ酸が，天然由来か添加されたものかを判断する必要がある．しかし，ウニ及びウニ加工品に関するホウ酸の含有量調査の報告は，現在のところ，ほとんどなく，バックグランド値が不明である．

そこで，著者らは，ホウ酸のバックグランド値を把握すると共に，その使用実態を明かにすることを目的に生ウニ及びウニ加工品について，ホウ酸含有量を調査することにした．

また，アルミニウム化合物であるみようばんには，収斂作用があるため，身くずれの防止を目的に生ウニに使用されている実態がある[3,4]．しかし，ウニ加工品については，みようばんの使用実態を明らかにした報告はない．アルミニウムが，アルツハイマー型老年痴呆症に関係しているとの報告[5,6]があり，その毒性も問題になっている．そこで，アルミニウム含有量について同時に調査したので，その結果も併せて報告する．

実験方法

1．試料

ウニ加工品として，平成8年3月から5月の間に多摩地区の小売店で市販されていた粒ウニ13試料（塩ウニまたはウニ含有率80～100%），練ウニ5試料（同じく75～80%），ウニを使用したパスタ用ソース2試料（同じく20%）の合計20試料を調査した．また，バックグランド値を把握するために，生ウニ（むき身）10試料と伊豆半島の川奈で採取した殻付きウニ5試料について分析した．

2．ホウ酸の分析法

辻らの報告したプロトン化クルクミン発色法[7]に従った．なお，分光光度計は島津製作所(株)製UV-1600型を使用した．

3．アルミニウムの分析法

常法に従い，フレーム原子吸光光度法で測定した[8]．

1）試薬

アルミニウム標準溶液は，和光純薬工業(株)製標準液1000ppm溶液を，適宜希釈して使用した．

塩酸は市販の原子吸光分析用を，水は精製水を用いた．

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

2）装置

原子吸光光度計は，パーキンエルマー(株)製3300型(重水素ランプによるバックグランド補正機能付き)に，同社製ホロカソードランプを装着して使用した．

3）試験溶液の調製

試料2.0gを磁製るつぼに秤取後，常法[9]に従って500℃の電気炉で一夜灰化後，灰分を少量の水で潤した後，塩酸1mlを加えホットプレート上で蒸発乾固した．次に残さを塩酸1mlに溶解後，水で10mlにして試験溶液とした．

4）フレーム原子吸光光度法による測定

常法に従い，309.3nmを測定波長とし，重水素ランプによるバックグランド補正下で分析した．別に調製した標準溶液より作成した検量線を使用し，得られた吸光度からそれぞれの濃度を算出した．

結果と考察

1．添加回収率

1）ホウ酸

食品中のホウ酸の分析法としては，試料をアルカリ性で灰化した後，クルクミンで発色する方法[10]や高速液体クロマトグラフィーによる方法[11]などがあるが，これらの方法は操作が繁雑で時間がかかる．

辻らの報告したプロトン化クルクミン発色法は，ホウ酸を2-エチル-1,3-ヘキサンジオールを用いて，試料から直接，キレート抽出するため灰化の必要がなく短時間で分析できる利点がある．そこで，ウニ加工品に辻らの方法が適用できるか否かを知るために，粒ウニ10gに，1g当たり100μg及び200μgのホウ酸を添加し回収率を求めたところ，表1に示した通り，それぞれ，回収率は92.4%，95.3%，変動係数(CV)は1.37～3.58%と満足できる結果であったので，この方法を用いることにした．

2）アルミニウム

アルミニウムは，器具や試薬による汚染が少なく，手間のかからない乾式灰化法により試料を灰化した後，フレーム原子吸光光度法により分析した．重水素ランプによるバックグランド補正下で，共存物の影響を受けることなく測定できた．表1に示したように試料1g当たり，アルミニウム50μg及び100μgを添加した場合，それぞれ，101.0%,101.9%,のアルミニウムが回収され，CVは0.86～5.32%と良好であった．

表1　粒ウニでの添加回収率

測定項目	添加量 (μg/g)	検出量 (μg/g)	回収率 (%)	CV (%)
ホウ酸	0.0	67.5		3.58
	100.0	157.8	92.4	3.35
	200.0	260.8	95.3	1.37
アルミニウム	0.0	8.7		5.32
	50.0	59.2	101.0	1.02
	100.0	110.6	101.9	0.86

n＝3

2．調査結果

1）ウニのホウ酸及びアルミニウムのバックグランド調査

ウニのバックグランド値を把握するため，ホウ酸については生ウニ3試料を，アルミニウムについては生ウニ10試料と殻付きウニ5試料を調査し，その結果を表2に示した．

生ウニ3試料から，13.6～17.6μg/gのホウ酸が検出された．ホウ素は，土壌や海水に含まれており，植物の必須元素である．ウニは，コンブ，ワカメ，カジメ，アオサなどの海藻の繁茂した岩礁域に，これらを餌として棲息している[12,13]ことから，この数値が，餌の海藻に由来したウニにおけるホウ酸のバックグランド値と考えられる．

アルミニウムについては，まず，生ウニ3試料を調査したところ，90.0,115.5,169.8μg/gが検出された．そこで，さらに，生ウニ7試料を測定した結果，147.6, 151.8, 157.2, 168.0, 169.5, 206.0及び218.8μg/gであり，今回，調査した生ウニ10試料のアルミニウム含有量は，いずれも90.0～218.8μg/gと高い値であった．また，これらの結果は高畑ら[4]が，輸入生ウニのアルミニウム含有量調査で明かにした73～140ppmとも類似していた．

このような高い検出値から市販の生ウニには，すでにアルミニウム化合物が添加されていると考えられる．従って，これらを分析しても，ウニにおけるアルミニウムのバックグランド値を把握出来ないので，伊豆半島で

表2　生ウニ及び殻付きウニのホウ酸及びアルミニウム含有量

試料	n	測定項目	含有量 (μg/g)
生ウニ	3	ホウ酸	17.6, 17.6, 13.6
	10	アルミニウム	218.8, 206.0, 169.8, 169.5, 168.0, 157.2, 151.8, 147.6, 115.5, 90.0
殻付きウニ	5	アルミニウム	10.0, 7.0, 6.0, 4.0, 2.0

検出限界；ホウ酸<2.5μg/g，アルミニウム<1.0μg/g

採取した殻付きウニについて，可食部である生殖巣を摘出したものを試料として，そのアルミニウム含有量を調査した．

表2に示したように，殻付きウニ5試料から，2.0～10.0 μg/g のアルミニウムが検出された．棲息する地域あるいは成育期間などにより，ウニのアルミニウム含有量に差があることも考えられるが，今回得られた数値がウニにおけるアルミニウムのバックグランド値と考えてもよいであろう．

添加されたアルミニウム化合物は，収斂作用があり，身くずれの防止効果が期待される硫酸アルミニウムカリウム(みようばん)が推定される．むき身のウニは外見上の新鮮さが，即，商品価値につながるため，身くずれの防止にみょうばんが使われているものと考えられる．

食品衛生法での使用基準によると，みようばんは，生鮮食品とみそには添加出来ないが，他の加工食品に対する使用制限はない．みようばんは，身近なところでは漬物，焼き菓子の膨張剤[14]などに使われており，使用した際はその旨を表示する必要がある．しかし，今回調査した試料については，多量のアルミニウムが検出されたにもかかわらず，みようばんが使われている旨の表示はなかった．

2）ウニ加工品の調査

粒ウニ13試料，練ウニ5試料，ウニを原料としたパスタ用ソース2試料の計20試料のウニ加工品についての分析結果を表3に示した．

(1) 粒ウニ

ホウ酸は12.5～786.0 μg/g の範囲で，13試料のいずれからも検出された．生ウニでの含有量が13.6～17.6 μg/g であることから，これらの粒ウニのうち，786.0と733.3 μg/g を検出した2試料については，ホウ酸が添加されたものと推定される．その他のものは12.5～22.7 μg/g であり，生ウニの含有量とほとんど一致したことから，ホウ酸は添加されていないものと考えられる．ウニの可食部は生殖巣であり，市場ではむき身で売られるため，鮮度が落ちると身くずれし徐々に液化してゆき，商品価値が下がる．また，4月～9月の暖かい季節には腸炎ビブリオ，ナグビブリオなどに汚染されやすい[15]．このため，防腐剤としてホウ酸が使われたものであろう．

表3 ウニ加工品のホウ酸及びアルミニウム含有量

粒ウニ	13	ホウ酸	786.0, 733.3, 22.7, 22.1, 20.7, 18.5, 17.6, 16.4, 16.0, 15.7, 15.2, 15.2, 12.5
	13	アルミニウム	340.7, 135.7, 135.2, 60.7, 49.3, 49.1, 22.5, 8.0, 7.8, 5.1, 2.7, 2.5, 2.5
練ウニ	5	ホウ酸	83.2, 73.8, 17.6, 13.9, 12.6
	5	アルミニウム	51.6, 45.1, 14.0, 9.6, 9.8
パスタ用ソース	2	ホウ酸	5.4, ND
	2	アルミニウム	63.1, 56.8

検出限界；ホウ酸＜2.5 μg/g，アルミニウム＜1.0 μg/g

アルミニウムは，2.5～340.7 μg/g の範囲でいずれの試料からも検出された．殻付きウニのアルミニウム含有量が，2.0～10.0 μg/g であることから，これらの粒ウニのうち，100 μg/g 以上を検出した3試料には明らかにみようばんが添加されたものと推定される．また，49.1～60.7 μg/g を検出した3試料についても，みようばんが添加された可能性がある．従って，13試料中6試料に，みようばんが添加された可能性があり，高頻度でみようばんが粒ウニに使われていると考えられる．

(2) 練ウニ

練ウニ5試料からホウ酸12.6～83.2 μg/g が検出された．粒ウニに見られるような高濃度のホウ酸は検出されなかった．

ウニの可食部は生殖巣のみであるため，一個体からは少量しか得られない．従って，加工品あるいは生ウニとして市場に流通しているものは，産地や捕獲された期日の異なるものが混合されて，一つの商品として扱われている．73.8及び83.2 μg/g を検出した2試料については，原料の一部にホウ酸を添加したものが混合されたため，ホウ酸が希釈され，粒ウニに比べて低濃度で検出されたものと推定される．

アルミニウムは，9.6～51.6 μg/g が5試料から検出された．45.1及び51.6 μg/g を検出した2試料は，上述したホウ酸と同様に，みようばんが使用されたものと考えられる．

(3) パスタ用ソース

ウニ含有率20%のパスタ用ソース2試料から，ホウ酸ND，5.4 μg/g，アルミニウム56.8，63.1 μg/g が検出された．

ウニは，棘皮動物のウニ類に属す動物の総称であるが，わが国で食用にされるのは，主にムラサキウニ，バフンウニ，エゾバフンウニ，キタムラサキウニなどである．

食用とされる部位は，メチオニン，グリシン，アラニン，グルタミン酸などのアミノ酸やイノシン酸，グアニル酸などを多く含み，独特の旨味と甘味をもつ生殖巣[12]である．

生食用や原料用ウニは，そのほとんどがチリ，アメリカ，カナダ，中国及び韓国などから輸入されており，最近のグルメブームとあいまって，輸入量は増加傾向にある[16～18]．

ウニ加工品及び生ウニで検出された，高濃度のホウ酸やみようばんと考えられるアルミニウム化合物は，ウニが捕獲された現地で添加された可能性が大きい．現在，食品の国際的な流通が進行する中で，現地での生産の実態が，非常にわかりにくい状況にある．従って，今後ともウニ加工品及び生ウニについて，ホウ酸及びみようばんの使用実態調査を継続して行う必要がある．

まとめ

ウニ加工品及び生ウニについて，ホウ酸及びアルミニウム含有量を調査した結果，以下のことが明らかになった．

1．ホウ酸

1）生ウニにおけるホウ酸のバックグランド値を知ることを目的に生ウニ3試料を分析したところ，13.6～17.6 μg/g であった．

2）粒ウニ13試料中2試料から733.3及び786.0 μg/g の高濃度のホウ酸が検出された．また，練ウニ5試料中2試料から73.8及び83.2 μg/g が検出され，ウニ加工品20試料中4試料にホウ酸が添加された可能性がある．

2．アルミニウム

1）ウニのアルミニウムのバックグランド値を把握するために殻付きウニ5試料の生殖巣について，アルミニウム含有量を測定したところ，2.0～10.0 μg/g であった．

2）市販の生ウニ(むき身)10試料から90.0～218.8 μg/g のアルミニウムが検出された．これらには，いずれもみようばんが添加された可能性がある．

3）ウニ加工品20試料中10試料から，みようばんを添加したと考えられる量のアルミニウムが検出された．すなわち，粒ウニ13試料中6試料に49.1～340.7 μg/g，練ウニ5試料中2試料に45.1，51.6 μg/g，パスタ用ソース2試料に56.8，63.1 μg/g のアルミニウムがそれぞれ検出された．

謝辞 本調査を行うに際し，試料の入手にご協力頂いた第8，第9及び第10班の食品機動監視班の方々，立川及び武蔵調布保健所の食品衛生監視員の方々に深く感謝致します．

文献

1）桜井芳人編：総合食品事典，84，1994，同文書院，東京
2）日本化学会編：微量元素，430～432，1975，丸善，東京
3）米沢慶明，宮下 努，大内精三，他：食品衛生研究，**34**，557～562，1984
4）高畑寿太郎，加藤由美，大金由夫，他：仙台市衛生試験所報，**16**，262～266，1986
5）Kraus，A.S.，Forbes，W.F.：Canadian Journal of Public Health，**83**，97～100，1992
6）Marcus，D.L.，Wong，S.，Freedman，M.L.：Journal of Nutrition for the Elderly，**12**，55～61，1992
7）辻 澄子，小川俊次郎，柴田 正，他：食衛誌，**30**，14～18，1989
8）日本薬学会編：衛生試験法注解，3～4，1990，金原出版，東京
9）同上：266～267，同上
10）同上：590～592，同上
11）落合節子，小川仁志，鈴木次郎，他：東京衛研年報，**36**，180～184，1985
12）芦澤正和，梶浦一郎，平 宏和他監修：食品図鑑，180～181，1995，女子栄養大学出版部，東京
13）辻調理師専門学校監修：料理材料大図鑑マルシェ，531，1995，講談社，東京
14）石館守三，谷村顕雄監修：第五版食品添加物公定書解説書，D-999，1987，廣川書店，東京
15）高橋泰二：臨床栄養，**68**，275～283，1986
16）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室，厚生省輸入食品衛生監視員協議会編集：輸入食品1991，30～35，1992，日本食品衛生協会，東京
17）同上：輸入食品1992，30～35，1993，同上
18）同上：輸入食品1993，32～37，1995，同上

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 82-89, 1996

国産チーズの衛生学的品質評価(第2報*)

竹葉和江**, 梅木富士郎**, 仲真晶子**, 藤沼賢司**,
小久保彌太郎**

Estimation of Chemical and Microbiological Quality of Domestic Cheese(II*)

KAZUE TAKEBA**, FUJIO UMEKI**, AKIKO NAKAMA**,
KENJI FUJINUMA** and YATARO KOKUBO**

Domestic cheeses were examined in order to estimate their chemical and microbiological quality. The items examined were pH, sodium chloride content, water content, volatile basic nitrogen (VBN), tyramine, preservatives, coliform, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria*. spp. 455 samples of cheeses which were marketed in Tokyo were inspected.

The range of pH, sodium chloride, water content and VBN of the cheeses examined were 4.2～7.9, 0.1～4.3%, 1.6～78.7% and 1～700 mg/100 g, respectively. Tyramine was detected in 49 of 176 cheese samples at levels of 4～2354 μg/g. Dehydroacetic acid and sorbic acid were used in 19 of 23 cottage cheeses and one of 21 cream cheeses, respectively. The detected levels of these preservatives were within the standards for use.

Of 102 camembert cheeses, 25 were colifroms positive, and 3 of the coliform positives contained *E. coli* at levels between 11×10 and 24×10/g. Of 13 mozzarella cheeses, 2 contained *S. aureus* at levels between 10×10 and 21×10^2/g. *B. cereus* was detected in various types of cheeses at levels between 10×10 and 13×10^5/g. No *Salmonella* and *Listeria* spp. were detected in all the cheese samples examined.

Keywords：国産チーズ domestic cheese, 水素イオン濃度 pH, 水分 water content, 塩分 sodium chloride content, 揮発性塩基窒素 volatile basic nitrogen (VBN), チラミン tyramine, 保存料 preservatives, 成分規格 compositional standards, 品質評価 quality assurance, 細菌汚染 bacterial contamination

緒　論

近年，日本人の食生活は，でんぷん質を中心とする食事内容から，動物性蛋白質を多く摂取する欧米型に次第に変化してきており[1]，中でも乳・乳製品の摂取量が肉類及び魚介類に比べて顕著に増えている．特にチーズ消費量の伸びは著しく，この20年間で約3倍に増加し，1995年にはチーズ総消費量は20.5万トンとなっている[2]．チーズ総消費量のうち国産チーズの占める割合は，約15%となっており，その割合は年々増加している．

わが国における，乳・乳製品の衛生学的品質評価は，主として「乳等省令」による成分規格に基づいて行われている．しかし，この省令によると，プロセスチーズについては成分規格が設定されているが，ナチュラルチーズに関しては何の規格も設定されていない．著者らは，国産ナチュラルチーズの生産量が急増し始めた1985～88年に，その衛生学的品質を把握する目的で，国産チーズ[3]及び輸入チーズ[4]について調査を行い，それらの結果を報告した．その後，国内のチーズ製造工場は全国的に分布するようになり，また，国内で製造されているチーズの種類も以前に比べて著しく多様化してきている．

今回は，1992年以降の都内で流通している国産ナチュラルチーズの衛生学的品質を把握するために理化学的お

---

*第1報，東京衛研年報，**41**，95-100，1990.

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

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

よび細菌学的試験を実施したのでそれらの成績を報告する.

試験方法

1. 試料

試料は, 1992～1994年の3年間に東京都内で販売されていた国産ナチュラルチーズ455検体である. ただし, これらのチーズはTable 1に示したように, 製品別, 製造工場別にみると66種類から構成されている.

2. 試験項目

理化学的項目はpH, 水分, 塩分, 揮発性塩基窒素(VBN), チラミン, 保存料を, 細菌学的項目は大腸菌群, 大腸菌, サルモネラ, 黄色ブドウ球菌, セレウス菌及びリステリア属菌を設定した.

3. 試験方法

3－1. 理化学的試験

pH, 水分, VBN及び保存料の試験は衛生試験法・注解[5]または乳製品試験法・注解[6]に準拠して行った. 塩分はIDFの方法[7]に, チラミンは著者らが開発した方法[8]に準拠して行った.

3－2. 細菌学的試験

大腸菌群, 大腸菌, サルモネラ, 黄色ブドウ球菌及びセレウス菌の試験は食品衛生検査指針[9]に, リステリア属菌の試験は厚生省が通知した方法[10]に準拠して行った.

結　果

1. pH

供試チーズのpHを種類別にTable 2に示した. pHの範囲は4.2～7.9で, フレッシュタイプチーズは4.2～6.8, 半硬質及び硬質タイプチーズは5.1～5.9といずれも弱酸性領域にあった. これに対して, 白カビ熟成タイプのカマンベールチーズのpHは5.9～7.9, 青カビ熟成タイプのブルーチーズは5.3～7.3で, 弱酸性から弱アルカリ性の領域にあり, これらのタイプでは熟成が進んでいるもの程アルカリ性を示した.

2. 塩分

供試チーズの塩分含量を種類別にTable 3に示した. 塩分含量の範囲は0.1～4.3%で, 最も含量が低かったのはフロマージュ・モンターニュ, 最も含量が高かったのは粉チーズであった. また, ブルーチーズの平均値は3.1%と粉チーズの平均値と同じように高かった.

Table 1. List of Analysed Domestic cheeses

Type	Cheese	No. of item	Location of cheese factories										
			Shimane	Nagano	Yamanashi	Niigata	Shizuoka	Kanagawa	Gunma	Tochigi	Miyagi	Iwate	Hokkaido
Fresh	Cottage	5		1				1	2			1	
	Cream	8		1							1	1	5
	Mozzarella	2			1								1
	Fromage montagne	1		1									
	Fromage blanc	2		1	1								
	Neufchatel	1										1	
	Creamy spread	1										1	
White mould ripened	Camembert	15	1	1	1	1	1			3		1	6
Blue mould ripened	Blue	3		1	1								1
Semi-hard/Hard	Gouda	14	2	1	1		1		1	1	1	1	5
	Cheddar	1											1
	Smoked	2	1										1
	Mixed/Shredded	2								1		1	1
	Dried (Powder)	6	1					1		1		3	
Whey	Whey	1									1		
Miscellaneous	Camembert＋Blue	1			1								
	Camembert＋Gouda	1											1
		66	5	7	6	1	2	2	3	6	2	10	22

Table 2. pH of Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	pH of cheese	
			Range	Average±SD
Fresh	Cottage	23	4.5~5.6	5.0±0.3
	Cream	21	4.5~5.8	5.1±0.4
	Fromage montagne	3	4.3	4.3
	Fromage blanc	5	4.2~6.8	6.1±1.1
	Neufchatel	4	4.6~4.8	4.7±0.1
	Creamy spread	3	5.0~5.1	5.1±0.1
White mould ripened	Camembert	39	5.9~7.9	6.9±0.5
Blue mould ripened	Blue	7	5.3~7.3	6.4±0.7
Semi-hard/Hard	Gouda	37	5.1~5.9	5.6±0.2
	Cheddar	5	5.3~5.6	5.5±0.1
	Smoked	3	5.5~5.8	5.7±0.1
	Mixed/Shredded	4	5.4~5.6	5.5±0.1
	Dried (Powder)	12	5.3~5.7	5.5±0.1
Whey	Brown	1	5.9	5.9
Miscellaneous	Camembert+Blue	2	6.9~7.4	7.2
	Camembert+Gouda	2	7.0~7.3	7.2
		176		

Table 3. Sodium Chloride Content of Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	Sodium chloride (%) of cheese	
			Range	Average±SD
Fresh	Cottage	23	0.7~1.9	1.1±0.3
	Cream	21	0.2~1.2	0.7±0.2
	Mozzarella	5	0.3~1.6	0.5±0.3
	Fromage montagne	3	0.1~0.2	0.2±0.1
	Fromage blanc	5	0.1~0.5	0.2±0.2
	Neufchatel	4	0.6~0.7	0.6±0.1
	Creamy spread	3	0.6	0.6
White mould ripened	Camembert	39	0.7~2.1	1.5±0.7
Blue mould ripened	Blue	7	1.9~3.9	3.1±0.4
Semi-hard/Hard	Gouda	37	0.1~2.8	1.6±0.5
	Cheddar	5	1.7~2.0	1.8±0.1
	Smoked	3	2.1~2.3	2.2±0.1
	Mixed/Shredded	4	1.4~1.6	1.5±0.1
	Dried (Powder)	12	2.0~4.3	3.1±0.7
Whey	Brown	1	1.2	1.2
Miscellaneous	Camembert+Blue	2	1.8~2.0	2.0
	Camembert+Gouda	2	1.5	1.5
		176		

3．水分

供試チーズの水分含量を種類別にTable 4 に示した．水分含量の範囲は1.6～78.7%で，これをタイプ別に見ると，フレッシュタイプチーズは42.0～78.7%，白カビタイプチーズは41.8～55.9%，青カビタイプチーズは37.4～51.3%，半硬質及び硬質タイプチーズは31.9～48.1%，粉チーズは1.6～14.5%であった．

4．揮発性塩基窒素(VBN)

供試チーズのVBN値を種類別にTable 5 に示した．VBN値の範囲は1～700mg/100 g で，これをタイプ別に

Table 4. Water Content of Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	Water content (%) of cheese	
			Range	Average±SD
Fresh	Cottage	23	71.9～78.7	76.6±1.5
	Cream	21	46.3～62.3	56.0±3.9
	Mozzarella	5	42.0～54.5	49.0±4.1
	Fromage montagne	3	74.7～76.1	75.7±0.4
	Fromage blanc	5	55.2～66.5	60.4±4.3
	Neufchatel	4	59.7～62.7	61.5±0.9
	Creamy spread	3	46.4～50.0	48.2±1.8
White mould ripened	Camembert	39	41.8～55.9	50.0±3.8
Blue mould ripened	Blue	7	37.4～51.3	42.9±5.4
Semi-hard/Hard	Gouda	37	31.9～48.1	39.6±4.0
	Cheddar	5	33.2～35.7	34.8±0.5
	Smoked	3	35.4～42.7	39.0±3.6
	Mixed/Shredded	4	36.6～37.9	37.1±0.4
	Dried (Powder)	12	1.6～14.5	9.6±4.6
Whey	Brown	1	25.9	25.9
Miscellaneous	Camembert＋Blue	2	47.3～49.3	48.3
	Camembert＋Gouda	2	43.1～43.5	43.3
		176		

Table 5. Volatile Basic Nitrogen (VBN) of Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	VBN (mg/100 g) of cheese	
			Range	Average±SD
Fresh	Cottage	23	1～17	4±4
	Cream	21	1～17	6±5
	Mozzarella	5	1～10	3±4
	Fromage montagne	3	3～25	18±8
	Fromage blanc	5	1～7	3±3
	Neufchatel	4	1～8	6±2
	Creamy spread	3	7～62	7
White mould ripened	Camembert	39	1～700	221±163
Blue mould ripened	Blue	7	69～409	237±108
Semi-hard/Hard	Gouda	37	1～102	24±22
	Cheddar	5	4～32	21±11
	Smoked	3	1～8	5±4
	Mixed/Shredded	4	2～35	21±10
	Dried (Powder)	12	8～185	88±58
Whey	Brown	1	21	—
Miscellaneous	Camembert＋Blue	2	350～351	351
	Camembert＋Gouda	2	104～113	109
		176		

みるとフレッシュタイプチーズは1～25mg/100 g，白カビ及び青カビタイプチーズは1～700mg/100 g，半硬質及び硬質タイプチーズは1～185mg/100 gであった．

5．チラミン

供試チーズのチラミン含量を種類別にTable 6に示した．チラミンが検出されたチーズは176検体中49検体(28%)であり，その含量の範囲は4～2354 μg/gであった．これをタイプ別に見るとフレッシュタイプ，半硬質及び硬質タイプチーズでは低い値であった．これに対して，白カビ熟成タイプ及び青カビ熟成タイプチーズでは高い傾向があり，それぞれに1000 μg/g以上のチーズが1検体づつ認められた．

6．保存料

供試チーズの保存料を種類別にTable 7に示した．安息香酸，パラオキシ安息香酸エステル類，サリチル酸はいずれも検出されなかったが，デヒドロ酢酸(DHA)が，カッテージチーズ23検体中19検体(82.6%)に検出され，平均値は0.16 g/kgであった．また，クリームチーズ21検体中1検体(4.8%)にソルビン酸(SOA)が0.07 g/kgの濃度で検出された．

7．細菌学的試験成績

供試チーズ455検体の細菌学的試験結果を種類別にTable 8に示した．大腸菌群及び大腸菌が，カマンベールチーズから，黄色ブドウ球菌がモッツァレラチーズから，セレウス菌は各種タイプのチーズからそれぞれ検出された．これらの内訳をみると，大腸菌群はカマンベールチーズ102検体中25検体(24.5%)が陽性で，それらの菌数は20～12×10^6/gの範囲であった．これらの陽性検体中3検体(2.9%)から大腸菌が検出され，それらの菌数は11×10～24×10/gの範囲であった．黄色ブドウ球菌は，モッツァレラチーズ13検体中2検体(15.4%)に検出され，それらの菌数は10×10及び21×10^2/gであった．また，セレウス菌は，455検体中69検体(15.2%)の各種タイプのチーズから20×10～13×10^5/gの範囲で検出され，最も菌数の多かったチーズは，フロマージュ・ブランであった．なお，サルモネラ及びリステリア属菌は，いずれのチーズからも検出されなかった．

考　察

ナチュラルチーズのpHは，製造開始当初は乳酸発酵により酸性になるが，熟成及び保存が進むに従って上昇し，最終的にはチーズの種類により特有のpH領域を示すようになる．フレッシュタイプや半硬質及び硬質タイプのチーズでは弱酸性～中性域であるが，カビ熟成タイプのチーズでは中性～弱アルカリ域である．そのため，スターター及び熟成に使用した以外の微生物が発育し易い条件となり，衛生上の問題が生じる恐れがある．今回

Table 6. Tyramine Content of Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample		Tyramine(μg/g) of cheese	
		Analysed	Detected	Range	Average
Fresh	Cottage	23	3	ND*～5	4
	Cream	21	3	ND～4	3
	Mozzarella	5	4	ND～169	45
	Fromage montagne	3	1	ND～2	—
	Fromage blanc	5	1	ND～4	—
	Neufchatel	4	0	ND	—
	Creamy spread	3	0	ND	—
White mould ripened	Camembert	39	15	ND～1613	125
Blue mould ripened	Blue	7	4	ND～2354	759
Semi-hard/Hard	Gouda	37	17	ND～622	119
	Cheddar	5	5	4～45	18
	Smoked	3	0	ND	—
	Mixed/Shredded	4	4	46～525	271
	Dried (Powder)	12	6	ND～350	144
Whey	Brown	1	1	33	—
Miscellaneous	Camembert＋Blue	2	2	19～1771	895
	Camembert＋Gouda	2	0	ND	—
		176	49		

＊ND：not detected

Table 7. Detection of Preservatives in Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	No. of positive sample				
			BA*1	DHA*2	PHBA*3	SOA*4	SA*5
Fresh	Cottage	23	0	19*6	0	0	0
	Cream	21	0	0	0	1*7	0
	Mozzarella	5	0	0	0	0	0
	Fromage montagne	3	0	0	0	0	0
	Fromage blanc	5	0	0	0	0	0
	Neufchatel	4	0	0	0	0	0
	Creamy spread	3	0	0	0	0	0
White mould ripened	Camembert	39	0	0	0	0	0
Blue mould ripened	Blue	7	0	0	0	0	0
Semi-hard/Hard	Gouda	37	0	0	0	0	0
	Cheddar	5	0	0	0	0	0
	Smoked	3	0	0	0	0	0
	Mixed/Shredded	4	0	0	0	0	0
	Dried (Powder)	12	0	0	0	0	0
Whey	Brown	1	0	0	0	0	0
Miscellaneous	Camembert+Blue	2	0	0	0	0	0
	Camembert+Gouda	2	0	0	0	0	0
		176	0	19	0	1	0

*1 BA : Benzoic acid, *2 DHA : Dehydroacetic acid, *3 PHBA : p-Hydroxybenzoic acid esters, *4 SOA : Sorbic acid
*5 SA : Salicylic acid, *6 Range (g/kg) : 0.08~0.22, Average±SD : 0.16±0.03, *7 0.07 g/kg

Table 8. Bacterial Contaminations in Domestic Cheese

Type	Cheese	No. of sample	No. of positive sample					
			Coliform	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus cereus*	*Salmonella*	*Listeria* spp.
Fresh	Cottage	48	0	0	0	4(20×10~60×10)	0	0
	Cream	55	0	0	0	8(10×10~18×10^2)	0	0
	Mozzarella	13	0	0	2(10×10,21×10^2)	3(60×10~80×10)	0	0
	Fromage montag	9	0	0	0	0	0	0
	Fromage blanc	13	0	0	0	4(98×10^2~13×10^5)	0	0
	Creamy spread	8	0	0	0	2(50×10)	0	0
	Neufchatel	13	0	0	0	2(16×10^2,44×10^2)	0	0
White mould ripened	Camembert	102	25(20~12×10^6)*	3(11×10~24×10)	0	18(10×10~42×10^2)	0	0
Blue mould ripened	Blue	23	0	0	0	5(10×10~30×10)	0	0
Semi-hard/Hard	Gouda	101	0	0	0	15(10×10~70×10)	0	0
	Cheddar	10	0	0	0	0	0	0
	Smoked	6	0	0	0	0	0	0
	Mi×ed/Shredded	8	0	0	0	0	0	0
	Dried (Powder)	27	0	0	0	3(10×10~30×10)	0	0
Whey	Brown	5	0	0	0	0	0	0
Miscellaneous	Camembert+Blue	7	0	0	0	5(50×10~70×10)	0	0
	Camembert+Goud	7	0	0	0	0	0	0
		455	25	3	2	69	0	0

*( ) : Bacterial counts/g

の調査結果でも，pHが中性域のカマンベールチーズのみから大腸菌群，大腸菌が検出され，このようなタイプのチーズの製造，取扱い，保存には特に衛生的な注意が必要であることが示唆された．

チーズの加塩は，風味上の問題だけでなく異常発酵の抑制，ホエー排出，カードの収縮促進，熟成の調節，最終製品の水分調節等の重要な目的を有している．わが国では，健康上の理由から食品中の塩分については特に関心が高く，食品全般に低塩化の方向にあり，全般的に輸入チーズ[4]と比べ塩分含量はやや低い傾向がみられた．しかし，ブルーチーズの塩分はこれまでの調査成績[3,4]と同様に熟成微生物の塩分要求性が高いために他のタイプのチーズと比べて高かった．

チーズの水分は，汚染微生物の繁殖の重要な因子となり，また，多様なチーズを整理し分類する上で必要な試験項目である．チーズの分類法には種々の方式があるが，チーズの水分含量(硬さ)と熟成微生物の種類を組み合わせた方式が最も一般的であり，本調査でもこの方式で分類した．

チーズのVBN値に関しては報告例が少なく，わが国では著者らの調査結果のみであるが[3,4]，国際的にもチーズの熟成度を判定する方法は種々検討されており，VBN値は，その指標の一つとなるのではないかと考えられる．今回の調査ではフレッシュタイプチーズは25mg/100 g 以下，半硬質及び硬質タイプは102mg/100 g 以下と低く，カビ熟成タイプのチーズは700mg/100 g と高い値を示すものも見られた．このように各種タイプのチーズのVBN値にかなりの幅があり，未熟なものや極度に熟成の過ぎたものあるいは異常発酵したチーズの判定の指標とするには今後更にデータの蓄積が必要であろう．

チラミンはチーズの熟成及び保存中にチロシンから，生成されるアミンであり，一度に多量摂取すると血圧上昇等の生理作用を呈することが知られている．通常，健常者ではチラミンは体内のモノアミン酸化酵素(MAO)により分解されるが，抗結核剤や抗鬱剤の中にはMAOの作用を阻害するものがあることから，これらの薬剤とチラミンを同時に摂取すると，著しい血圧上昇をもたらし，ヨーロッパ諸国ではその事故例も報告されている[11,12]．しかし，今回調査した国産チーズでは，チラミンの検出率は28%と低く，その含有量においても相対的に低かったことから，日本人の食生活でチーズを一度に多量摂取することが少ないこと考えあわせると，特に注意する必要は無いと思われる．

チーズの保存料については，カッテージチーズの82.6%に平均0.16 g /kgのDHAが使用されていたが，いずれも使用基準値の0.50 g /kg以内であった．DHAは，カビ，酵母に対して効果の高い保存料であり，水分含量の高いカッテージチーズにこれらによる事故を防ぐために使用されたものと考える．また，SOAがクリームチーズに1検体検出されたが0.07 g /kgと低いレベルで，使用基準値3.0 g /kgの1/43の値であった．このクリームチーズを製造した同一工場の他のロットの製品からはSOAが検出されなかったことから，SOAはキャリオーバーの可能性もあると考えられる．なお，乳・乳製品中には自然由来の安息香酸が微量存在していることが知られており[13,14]，外国産チーズの中には，その含有量が100～400mg/kgのレベルになるものもあると報告されている[15,16]．前回の調査結果[3]で，国産チーズの安息香酸含有量は0.002～0.022 g /kgと極めて微量であることが認められたので，今回の調査では0.05 g /kg以下のものについては検出しないとした．

今回の細菌学的試験の成績を前回の調査結果[3]と比較すると，汚染指標菌である大腸菌群は前回はほとんどのタイプのチーズから検出されたのに対して今回はカマンベールのみであったことは，チーズの製造過程における衛生管理の改善が進んだ結果と考えられる．しかし，前回検出されなかった黄色ブドウ球菌がモッツァレラチーズ5検体中2検体に検出されたことは，さらに，衛生管理の徹底が必要であることを示していた．また，セレウス菌は，前回の陽性率の21%より若干低い15%であったが，チーズのタイプに関係なく検出された．本菌は，自然界に広く分布し[17]生乳を汚染する頻度も高く，しかも芽胞形成菌であることから熱抵抗性も高いために製品中に残存する機会が多いのではないかと考えられる．しかし，チーズを原因食品とするセレウス菌食中毒は諸外国でも報告されていないことから，セレウス菌をチーズから完全に除菌する必要はないと思われる．なお，欧米で乳・乳製品による集団感染事例[18,19]の原因菌として報告されたリステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌やサルモネラは，前回と同様にすべて陰性であった．

要　約

国産チーズを対象にpH，塩分，水分，VBN，チラミン，保存料，大腸菌群，大腸菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌，セレウス菌及びリステリア属菌の各項目について試験を行った．

理化学的項目では，特に食品衛生上問題となるようなものはなかった．細菌学的項目では，大腸菌群が455検

体中25検体から検出され，このうち3検体から大腸菌が検出された．セレウス菌は69検体，黄色ブドウ球菌は2検体検出された．サルモネラ及びリステリア属菌は，いずれのチーズからも検出されなかった．

謝辞 試料収集にあたり協力いただきました食品環境指導センターの方々に深謝致します．

文 献

1）厚生省保健医療局保健増進栄養課編：国民栄養の現状，1993.
2）農林水産省畜産局牛乳乳製品課：チーズの需給動向，1995.
3）竹葉和江，梅木富士郎，村上文子，他：東京衛研年報，**41**，95-100，1990.
4）竹葉和江，梅木富士郎，村上文子，他：東京衛研年報，**42**，102-111，1991.
5）日本薬学会編：衛生試験法・注解1980版，1980，金原出版，東京.
6）日本薬学会編：乳製品試験法・注解，1984，金原出版，東京.
7）日本国際酪農連盟：国際連合FAO/WHO乳及び乳製品基本法並びに関連規格・検査法，1980.
8）竹葉和江，村上文子，松本昌雄，他：食衛誌，**31**，137-143，1990.
9）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針微生物編1990，日本食品衛生協会，東京.
10）厚生省乳肉衛生課：衛乳169号，1993.
11）Asatoor, A. M., Levi, A. J. and Miline, M. D.：*Lancet*, ii, 733-734, 1963.
12）Blackwell, B.：*Lancet*, ii, 849-851, 1963.
13）西本孝男，上田雅彦，田植栄：食衛誌，**10**，410-413，1963.
14）栗崎純一，笹子謙治，津郷友吉，他：食衛誌，**14**，25-30，1973.
15）日本国際酪農連盟：昭和55年度牛乳・乳製品の規格成分分析検討事業報告書，資料第42号，1980.
16）慶田雅洋：食品衛生研究，**31**，291-300，1981.
17）坂崎利一編：食水系感染症と細菌性食中毒，317-320，1991年，中央法規出版，東京.
18）Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonard, K. L. et al.：*New Engl. J. Med.*, **312**, 404-407, 1985.
19）Linnam, M. J., Mascola, L., Lou, X. D. et al.：*New Engl. J. Med.* **319**, 823-828, 1988.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 90-94, 1996

発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査(第2報*)

井部明広**, 上村　尚***, 田端節子**,
早野公美**, 木村祐起子**, 友松俊夫**

Contents of Non-Volatile Amines in Fermented Foods(II*)

AKIHIRO IBE**, HISASHI KAMIMURA***, SETSUKO TABATA**,
KUMI HAYANO**, YUKIKO KIMURA**
and TOSHIO TOMOMATSU**

The contents of 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 which comprised white wines, beers and fermented soybeans (Natto) were surveyed by HPLC with dansyl derivatives. In the survey of the white wines, many samples were found to contain two non-volatile amines Phm and Put. The levels of concentration of these amines were 0.6 and 2.3 μg / g respectively. In the beers, the highest levels were 4.5 μg Tym/ g on average. In the Natto, the highest levels were 77.8 μg Spd/ g on average. Most of Natto was found not to contain Tym, Him and Phm. But some Natto was found to contain Tym at 9.5 μg / g on average.

The determination of these amines in the fermented soybeans and cooked soybeans for starting materials purposes in the research of their origine was studied. Tym, Him and Phm did not exist in the cooked soybeans, it is assumed that Tym is produced by microorganisms during fermentation.

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, 白ワイン white wine, ビール beer, 納豆 fermented soy beans

緒　言

著者らはこれまで発酵食品中の不揮発性アミン類(以下アミン類と略す)の含有実態とその成因について調査し報告してきた. 前報[1)]では市販の発酵食品のうち赤ワイン, 味噌, 醤油, 中国酒及び納豆についてチラミン(Tym), ヒスタミン(Him), フェネチルアミン(Phm), プトレシン(Put), カダベリン(Cad), スペルミジン(Spd)及びスペルミン(Spm)の7種のアミン類の含有量調査を行い, いずれの試料からもアミン類を検出し, 特にTym の含有量が他のアミン類に比較して高いことを明らかにした. さらに醤油製造所において製造工程中のアミン類の消長を調査し報告した.

本報では引き続き白ワイン, ビール及び納豆についてアミン類の含有量調査を行ったので報告する. また, 納豆中のアミン類の含有原因を知る目的で都内の納豆製造所において原料及び製品を採取し, さらに納豆を冷蔵保存した時のアミン類の含有量の増減についても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7年1月から8年2月東京都内で市販さ

---

*第1報, 東京衛研年報, **46**, 102-107, 1995.

**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環境保健部

れていたフランス産白ワイン34銘柄34検体，輸入ビール53銘柄53検体，国産ビール5社15銘柄15検体，納豆32検体(丸大豆を原料とした納豆24社24検体，ひきわり大豆を原料とした納豆８社８検体)，都内の納豆製造業Ａ社及びＢ社において採取した原料６検体及び製品24検体を用いた．

２．試薬　前報[2]に従った．

３．試験溶液の調製及びダンシル誘導体化　前報[1,2]に従った．

４．高速液体クロマトグラフィーの測定条件　前報[1]に従った．

５．ＴＬＣによる確認　衛生試験法[3]に従った．

６．納豆の製造方法　水洗した大豆を８～12時間水で浸漬後圧力釜で30分蒸煮し，納豆菌を添加した後販売形態容器に充填し40℃，20時間発酵させた．一晩冷却したものを製品とした．

結果と考察

１．市販品の実態調査

１）白ワイン

市販のフランス産白ワインについて，各アミン類含有量を調査した結果をTable１に示した．

検出率，含有量共に高かったアミンはPutで，すべての試料から検出され，その平均値は2.3μg/gであった．次いで検出率が高かったのはPhmで73.5%，次いでTymの41.2%であった．その他のアミンはHimを除いて検出率，含有量とも低かった．しかしHimは検出率は5.9%と低かったにもかかわらず，検出されたものの平均値は2.7μg/gと他のどのアミンよりも平均値では高かった．前報[1]で調査した同じフランス産の赤ワインと比べると白ワインの各アミンの検出率及び含有量は総じて低く，他のアミンに比較して高い含有量を示すTym，Him，Putにおいてもおよそ1/2量であった．この傾向は既報[4]の結果と一致し，アミン類においては赤ワインの方が白ワインよりも一般に高い値を示すことが今回の調査でも確認できた．この違いは赤ワインと白ワインの原料成分の違いによることも考えられるが，発酵に関与する微生物の種類の違いによる影響が大きいと考える．

２）ビール

市販の輸入ビール及び国産ビールの各アミン類含有量を調査した結果をTable２に示した．

輸入品53検体中98%以上の検出率でTym，Put，Cadが検出され，次いでSpdの検出率が86.8%，Spm49.1%，Him20.1%であり，また，Phmは全く検出されなかった．含有量はTym，Putが他のアミンに比較して高く，平均

Table 1. Contents of Non-Volitile Amines in White Wines

(μg/g)

	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Range	ND-10.1	ND-3.2	ND-1.4	0.5-18.9	ND-0.2	ND-0.9	ND
Average of positive	1.9	2.7	0.6	2.3	0.2	0.4	ND
Ratio of positive (%)	41.2	5.9	73.5	100	5.9	0.4	0
ND <	0.5	1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

ND : Not detected. n=34 produce of France

Table 2. Contents of Non-Volatile Amines in Imported and Domestic Beer

(μg/g)

	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Imported (53 samples)							
Range	ND-56.8	ND-9.0	ND	1.8-12.9	ND-45.9	ND-1.5	ND-18.9
Average of positive	4.5	2.3	ND	4.3	2.8	0.4	0.2
Ratio of positive (%)	98.1	20.1	0	100	98.1	86.8	49.1
Domestic (15 samples)							
Range	0.8-1.6	ND	ND	2.9-6.6	0.2-25.5	ND-0.6	ND-0.1
Average of positive	1.1	ND	ND	4.4	2.0	0.3	0.1
Ratio of positive (%)	100	0	0	100	100	73.3	13.3
ND <	0.5	1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1

ND : Not detected.

値はそれぞれ4.5，4.3 μg/g であった．Him では検出率は低いながらその含有量の平均値は2.3 μg/g とCadの2.8 μg/g と同程度であった．また，特に生産国の違いによる含有量の差は認められなかった．

国産ビールでは輸入品とほぼ同様の含有傾向を示し，Tym，Put，Cad がすべてから検出され，次いでSpd が検出率73.3%，Spm が13.3%であったがHim，Phm，は全く検出されなかった．含有量は輸入ビールでは比較的高かったTym が国産ビールでは平均値1.1 μg/g と輸入品に比べ低い値を示したが，検出された他のアミン類の含有量はほぼ同程度であった．また，今回調査した15検体中14検体が大手メーカー品で，残りの1検体がいわゆる地ビールといわれる小規模製造業によるものであった．これらの間で特にCad の含有量に大きな差が認められ，地ビールのCad 含有量は最高値である25.5 μg/g 検出された．これに対し大手国産ビールのCad 含有量はすべて0.2～0.5 μg/g (平均値0.3 μg/g)の範囲であった．同様に輸入品でもCad の場合10 μg/g を超える高い値を示したのは3検体のみでその他のほとんどは1 μg/g 以下であり，それらの平均値は0.7 μg/g であった．このことは同じビールでも製法あるいは原料の違いによりアミン含有量に差が現れることが示唆された．また，国産ビールにはいわゆる黒ビールが3検体含まれていたが，アミンの種類，含有量ともに一般のビールと差は認められなかった．

ビールと白ワインとその含有量を比較すると全体的に同程度か，若干ビールの方が高めの値を示した．飲用に供する量はビールの方が多いことから[5]，アミン類の摂取量も多くなり飲用量には注意を要する．

3）納豆

昨年度に引き続き，市販の丸大豆を原料として発酵した納豆(以下丸大豆納豆と略す)24検体，ひきわり大豆を原料として発酵した納豆(以下ひきわり納豆と略す)8検体のアミン含有量を調査しTable 3 に示した．

丸大豆納豆ではPut，Spd，Spm がすべての試料から検出され，Cad の検出率は79.2%であり，Tym，Him，Phm は全く検出されなかった．含有量はSpd が最も高く平均値で57.6 μg/g であり，その他Put，Spm，Cad の含有量はSpd の1/5～1/10量であった．今回の調査でもTym がいずれからも検出されなかったことを除いては前報[1]と同じ傾向がみられた．

ひきわり納豆でもHim，Phm は全く検出されず，Spd，Put，Spm，Cad が検出されたが，丸大豆納豆と違ってTym が8検体中2検体から検出され，検出されたものの平均値は9.5 μg/g であった．丸大豆と同様にSpd の含有量が平均値で77.8 μg/g と他のアミンに比べ高く，また検出されたPut，Spm，Cad の含有量も丸大豆納豆より若干高い傾向がみられた．

丸大豆納豆とひきわり納豆では一般にSpd，Put，Cad，Spm の各含有量は平均値でひきわり納豆の方が若干高く，丸大豆納豆では全く検出されなかったTym がひきわり納豆では検出されたことは，原料大豆の形態の違いによる発酵の進み方が違うため，ひきわり納豆の方がアミンを作る可能性が高いことも考えられた．しかし，前報では1検体のデータながらひきわり納豆で1150 μg/g という高濃度のTym が検出され，また，丸大豆納豆でも44.4%の検出率で平均7.4 μg/g 検出されている．今回はひきわり納豆で25%の検出率，平均値で9.5 μg/g と前報の丸大豆納豆と同レベルであったことは，前

Table 3. Contents of Non-Volatile Amines in Natto (Fermented Soybeans)

(μg/g)

	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Whole (24 samples)							
Range	ND	ND	ND	3.9-12.1	ND-8.5	23.5-81.3	3.3-18.9
Average of positive	ND	ND	ND	7.8	4.7	57.6	10.9
Ratio of positive (%)	0	0	0	100	79.2	100	100
Cracked (8 samples)							
Range	ND-11.9	ND	ND	9.4-24.1	ND-9.6	44.3-114	5.4-12.8
Average of positive	9.5	ND	ND	15.2	7.0	77.8	9.7
Ratio of positive (%)	25.0	0	0	100	25.0	100	100
ND<	5	20	2.0	1	1	1	1

ND : Not detected, Whole : normal natto, Cracked : hikiwari natto

報で高濃度Tymが検出された納豆は使用された納豆菌の種類違い,すなわちTymを多く産生する菌をたまたま使用したためとも考えられた.

そこで丸大豆納豆とひきわり納豆を同時に製造している納豆製造所において,原料と製品及び丸大豆とひきわり大豆の差についてアミン含有量を調査したので次に報告する.

2．納豆製造所における調査

1）原料及び製品中のアミン類含有量

納豆製造所A社及びB社におけるそれぞれ3製品(丸大豆2種,ひきわり1種)について,その原料及び製品のアミン含有量をTable 4に示した.

原料の大豆,製品いずれの試料からもTym, Him, Phmは検出されなかった.このことは,納豆中にこれらアミンが存在するとすれば,発酵中微生物によって生成したものと考えられる.その他のアミンPut, Cad, Spd, SpmではSpmを除いて原料と製品の間に差はほとんどなく,発酵製造中にPut, Cad, Spdは生成しないことがわかった.Spmの場合はいずれも製品では低い値を示し,製造中に減少することがわかった.

これらの傾向は丸大豆納豆とひきわり納豆双方において共通し,ひきわり納豆においても原料大豆と製品のアミン含有量に差がないことから,ひきわりという原料大豆の形態がアミン含有量に影響を及ぼさないことがわかった.

納豆の製造法は全国ほぼ同様に行われていると思われ,原料にTymは存在しないこと,形態によるアミン生成の可能性がないことなどから,Tymが検出された納豆では,使用された納豆菌の種類の違いに負うところが大きいと考える.

2）保存中の変化

通常納豆の賞味期限は製造後1週間程度が設定されており,購入後は各家庭冷蔵庫で保管することが多い.そこでこれら製品を4℃の冷蔵庫内に8日間保存したときのアミン含有量を調査し,その結果をTable 5に示した,Tym, Him, Phmは保存後も全く検出されなかった.その他のアミンでは若干増減する傾向がみられたが,いずれもほとんど変化は認められず,市販の製品を購入後冷

Table 4. Contents of Non-Volatile Amines in Natto and Cooked Soybeans

(μg/g)

Sample	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
A manufacturer							
Product① (Whole)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	4.3	5.6	55.0	21.9
Natto	ND	ND	ND	4.3	5.0	58.9	13.1
Product② (Whole)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	9.4	5.4	59.4	16.8
Natto	ND	ND	ND	8.6	4.8	58.2	9.5
Product③ (Cracked)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	8.7	ND	53.7	15.1
Natto	ND	ND	ND	7.8	ND	56.6	9.6
B manufacturer							
Product④ (Whole)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	3.5	4.1	34.6	11.0
Natto	ND	ND	ND	4.0	3.2	48.8	9.2
Product⑤ (Whole)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	10.6	7.4	56.5	16.9
Natto	ND	ND	ND	10.9	6.9	69.3	13.6
Product⑥ (Cracked)							
Cooked Soy beans	ND	ND	ND	10.4	3.3	66.9	23.0
Natto	ND	ND	ND	12.2	3.3	66.1	10.2

Cooked soybeans are raw material of natto.

Table 5. Contents of Non-Volatile Amines in Natto before and after Storage under 4℃ for 8 days

(μg/g)

Sample	Tym	Him	Phm	Put	Cad	Spd	Spm
Product① (Whole)							
Before	ND	ND	ND	4.3	5.0	58.9	13.1
After	ND	ND	ND	4.5	5.3	52.1	12.2
Product② (Whole)							
Before	ND	ND	ND	8.6	4.8	58.2	9.5
After	ND	ND	ND	9.6	4.3	59.3	8.6
Product③ (Cracked)							
Before	ND	ND	ND	7.8	ND	56.6	9.6
After	ND	ND	ND	8.9	ND	54.5	8.9

n=3

蔵庫に少なくとも賞味期間内保管しておけばアミン類の生成等変化はないことがわかった.

ま と め

市販の白ワイン，ビール及び納豆中のアミン含有量を調査した. 今回初めてビール中のアミン含有量を明らかにし，また，納豆中のアミン類の由来を明らかにした. ビールにおいて国産品ではHim は検出されなかったが，輸入品では銘柄によって微量ながらTym，Him が含まれることが判明した. 納豆のうちひきわり納豆からTym が平均値で9.5μg/g 検出されたが，丸大豆納豆からはTym は検出されなかった. また，いずれの納豆からもHim は検出されなかった.

また，都内の納豆製造業2社において製品及び原料について調査したところ，2社ともすべての試料においてTym，Him，Phm は検出されず，製造中原料由来のアミンのうち，Spm が減少することを除いて他のアミン類に変化は認められなかった. 納豆からTym 等原料に存在しないアミン類が検出される要因としては，使用される納豆菌のアミン産生能に負うところが大きいことが示唆された.

本調査は平成7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) 井部明広，上村 尚，田端節子他：東京衛研年報，**46**，102-107(1995).
2) 井部明広，田村行弘，上村 尚，他：衛生化学，**37**，379-386(1991).
3) 日本薬学会編：衛生試験法・注解，289-291，1990，金原出版，東京.
4) A. Ibe, K. Saito, M. Nakazato, et al. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 695-698(1991).
5) 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.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 95-99, 1996

輸入洋菓子より検出されたtert-Butylhydroquinonについて

木村圭介*, 嶋村保洋*, 中島和雄*, 中沢久美子*
菊地洋子*, 友松俊夫*

Determination of tert-Butylhydroquinon in Imported Biscuit

KEISUKE KIMURA*, YASUHIRO SHIMAMURA*, KAZUO NAKAJIMA*, KUMJKO NAKAZAWA*,
YOKO KIKUCHI* and TOSHIO TOMOMATU*

Keywords：tert-ブチルヒドロキノン TBHQ, ブチルヒドロキシアニソール BHA, ジブチルヒドロキシトルエン BHT, 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 photo diodearray detector, ガスクロマトグラフー質量分析計 GC-MS, ビスケット bisucuit

緒　言

tert-Butylhydroquinon (TBHQ) は，フェノール系酸化防止剤であり，米国，韓国，台湾，マレーシア，ブラジル等，数ヶ国で食品添加物として使用が許可されているが，我が国では食品への使用を認めていない[1]．これらの諸外国ではTBHQは主に食用油脂や脂肪を含む食品の酸化防止のために広く用いられている．そのためこれらの国々からの輸入食品中からしばしば検出され，我が国では違反事例の多い食品添加物の一つである[2)~4)]．

当所においても，平成7年6月，10月及び平成8年5月に特別区より，輸入洋菓子からTBHQを検出した旨の連絡があり，当該食品中のTBHQの定量と確認を行う必要が生じた．

TBHQの分析法としては，衛生試験法[1]に，TBHQを含む酸化防止剤の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析法が収載されているが，これは植物油，バター，魚介乾製品及び魚介冷凍品を分析対象品目としており，ビスケット等の菓子類については記載されていない．そこで著者らは，本試験法がビスケット等の洋菓子に適応できるかどうか検討した．さらに，TBHQの確認法として，フォトダイオードアレイ検出器を用いたHPLC及びガスクロマトグラフー質量分析計(GC－MS)を用いた分析も試みたので，それらの結果と当該試料の検査結果とを併せて報告する．

実験方法

1．試　料

1）平成7年6月から10月の間に新宿区四谷保健所及び食品機動監視班から搬入された，市販の米国産洋菓子1社5製品(内訳はクリームサンドビスケット，チョコチップビスケット及びクラッカー，計16検体)

2）平成7年10月に北区赤羽保健所から搬入された市販の南アフリカ産洋菓子1社2製品(チョコチップビスケット，シナモンビスケット，計2検体)．

3）平成8年5月に中央区中央保健所から搬入された市販の米国産洋菓子1社1製品(クリスプ，計2検体)．

2．試　薬

1）標準溶液：和光純薬工業製のブチルヒドロキシアニソール(ＢＨＡ，和光純薬工業製特級)，ジブチルヒドロキシトルエン(ＢＨＴ，和光純薬工業製特級)，及びTBHQ(和光純薬工業製特級)の各々100mgをはかり，アセトニトリル・2－プロパノール・エタノール(2：1：1)混液に溶解し100mlとしたものを標準原液とした．次いで各標準原液10mlを取り，アセトニトリル・2－プロパノール・エタノール(2：1：1)混液に溶解し100mlとしたものを標準溶液とした．本標準溶液1mlは，ＢＨＡ，ＢＨＴ及びTBHQの100 μg を含有する．本標準溶液を適宜希釈し，検量線を作成した．

2）混合溶媒：アセトニトリル・2－プロパノール・エタノール(2：1：1)

*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

3．装　置

1）高速液体クロマトグラフ：島津製作所製高圧グラジェントシステム，LC-10AT 型ポンプ，SPD-M10A フォトダイオードアレイ検出器，CTO-10AC カラムオーブン，SIL-10AXL オートサンプラー，DGU-3A 型デガッサー，パーソナルコンピューター RICOH REFILE300で構成したもの．

2）ガスクロマトグラフー質量分析計：島津製作所製ガスクロマトグラフGC-17A に検出器として質量分析計GCMS-QP5000を接続したもの．

4．試験溶液の調製

粉砕した試料5 gに混合溶媒及び無水硫酸ナトリウム10 gを加え，5分間ホモジナイズした．これを冷凍庫で2時間冷却した後，グラスウールでろ過した．残渣はあらかじめ冷凍庫で冷却した混合溶媒20ml を用いて洗浄し，ろ過した．ろ液を合わせ，1～2 ml に濃縮した後，混合溶媒で全量を5 ml とした．これを0.45 μmのメンブランフィルターでろ過し，HPLC 及びGC－MS の試験溶液とした．

5．分析条件

1）HPLC 条件

カラム：Cosmosil 5C18-AR (4.6mmi. d. ×250㎜ナカライテスク社製)

移動相：A液　アセトニトリル・メタノール(1：1)
B液　5%酢酸溶液

グラジェント条件：移動相Aの割合を15分間で40%から90%まで変化させ，15分間その割合を保持した．

流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

測定波長：280nm

スペクトル測定波長：200～400nm

2）GC－MS 条件

カラム：DB-17 (0.25mmi. d. ×30m J & W Scientific社製)

キャリアーガス：He

カラム流量：1.6ml/min

カラム槽温度：60℃で0.5分間保持した後，230℃まで毎分15℃ずつ昇温し，5分間保持した．

気化室温度：250℃

インターフェース温度：230℃

結果及び考察

1．分析法の検討

ポテトチップやビスケット等の固形食品からの酸化防止剤の抽出は，従来，エーテルあるいはn－ヘキサンで抽出したそれぞれの可溶画分を，n－ヘキサン－アセトニトリル分配等によって精製した後，GC やHPLC で分析していた[5]．しかし平成3年に提示された衛生試験法の追補[1]では，植物油，バター，魚介乾製品及び魚介冷凍品を分析対象品目として，アセトニトリル・2－プロパノール・エタノール(2：1：1)混液を用いて酸化防止剤を抽出し，冷凍処理で油脂分との分離精製を行い分析するという簡便な方法が採用されている．そこで著者らは当該試料からの酸化防止剤の抽出を行うに際し，この分析法が適用できるかどうか検討した．すなわち，試料の大半がビスケット類であるので，その代表として酸化防止剤無添加のクリームサンドビスケット，チョコチップビスケット，クラッカーの各々5 gをホモジナイザーカップに取り，これに実際に検出頻度の高い酸化防止剤の中から，BHA，BHT 及びTBHQ の3種類を選び，各々100 μg / g となるように添加し，以下本試験法に従って添加回収試験を行った．その回収率はBHT で85%以上，BHA 及びTBHQ では90%以上と良好であり，本法はビスケット等の菓子類についても十分適用できるものと思われる．なおHPLC による定量は衛生試験法[1]の分析条件に準じたが，油脂や魚介類と違い，菓子類では配合成分も多く，妨害ピークによる影響が懸念されたが，今回試料として用いた菓子類については妨害ピークの影響もなく，紫外部吸収(UV)検出器で十分定量可能

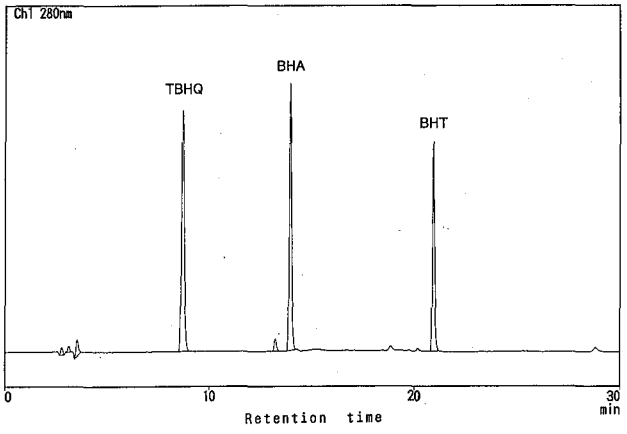


図1．標準溶液のクロマトグラム
HPLC 条件
カラム：Cosmosil 5C18-AR (4.6㎜ i. d. ×250㎜ナカライテスク社製)
移動相：A液　アセトニトリル：メタノール(1：1)，B液　5%酢酸溶液
グラジェント条件：移動相Aの割合を15分間で40%から90%まで変化させ，15分間その割合を保持した．
流速：1 ml/min　　カラム温度：40℃
測定波長：280nm

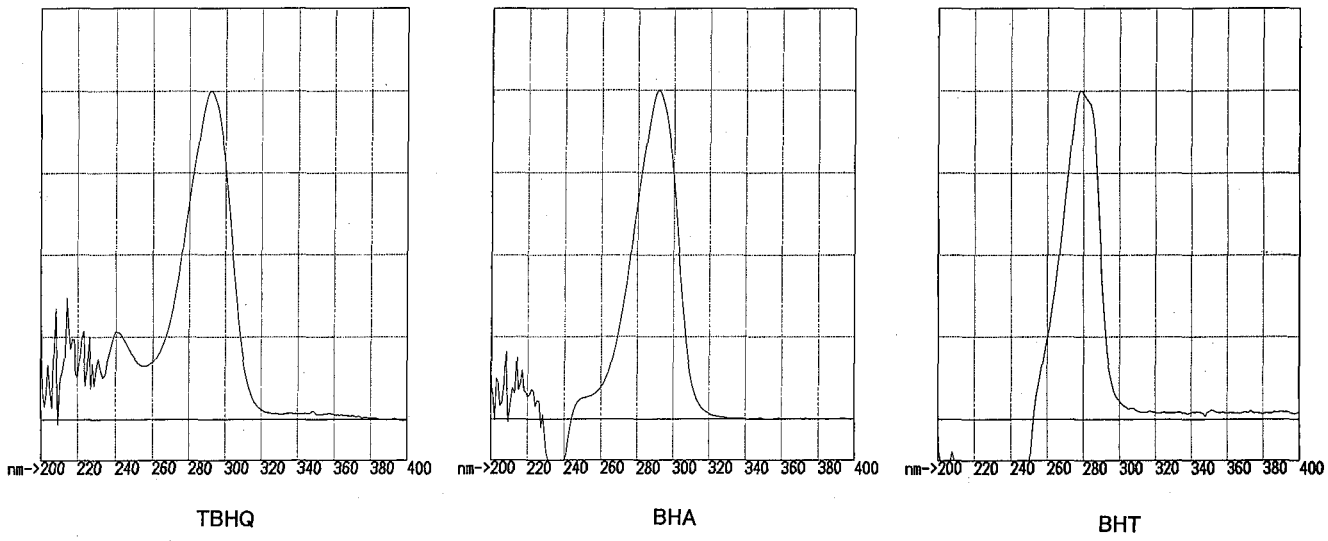


図2．各酸化防止剤の吸収スペクトル

であった．さらに今回は，ピークの同定も同時に行うことを考慮して，検出器は本来用いるＵＶ検出器の代わりに，フォトダイオードアレイ検出器を用いた．図1に標準溶液を分析した際のクロマトグラムを示したが，各酸化防止剤の保持時間は，TBHQ が8.7分，ＢＨＡ14.0分，BHT 21.0分であった．またそれぞれの酸化防止剤の200～400nm における吸収スペクトルを図2に示した．BHA の λ max は292nm，BHT の λ max は279nm と比較的単純なスペクトルであった．一方，TBHQ の λ max は292nm であったが，240nm にも吸収を持つのが特徴であり，TBHQ の確認にフォトダイオードアレイ検出器を用いてスペクトル測定をすることは，極めて有効であると思われた．さらに近年の傾向として，特に輸入品の違反についてはマススペクトルの測定が必須条件となってきていることからMS による確認法も確立しておく必要がある．酸化防止剤のうち，BHA，BHT 及びTBHQ は誘導体化することなくGC に負荷することが出来るので，GC－MS は簡便な確認手段として最も有効であると思われる．そこでGC－MS 条件について検討した．カラムにDB-17を用い，60℃で0.5分間保持した後，230℃まで毎分15℃ずつ昇温し，５分間保持したときのガスクロマトグラムを図3に示した．保持時間はBHT が9.5分，ＢＨＡが10.0分，TBHQ が10.9分であった．TBHQ のマススペクトルを図4に示した．分子イオンピークM/Zは166であり，他に，M/Z：151とM/Z：123の２本の解裂ピークが検出された．

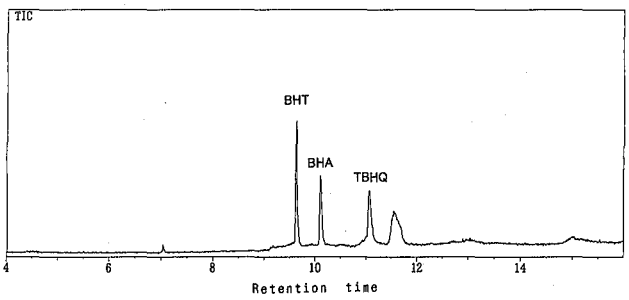


図3．標準溶液のガスクロマトグラム

GC-MS 条件

カラム：DB-17 (0.25mm i. d. ×30m J&W Scientific 社製)

キャリアーガス：He　　カラム流量：1.6mℓ/min

カラム槽温度：60℃で0.5分保持した後，230℃まで18℃/min ずつ昇温し，５分間保持した．

気化室温度：250℃　　インターフェース温度：230℃

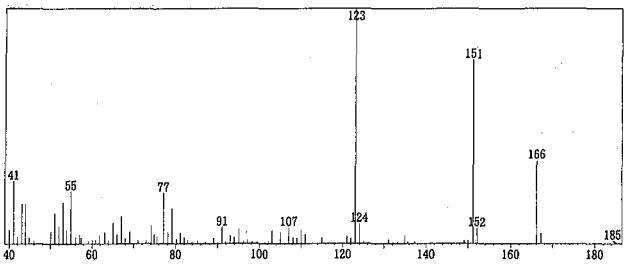


図4．TBHQ のマススペクトル

２．検査結果

特別区の保健所及び食品機動監視班から搬入されたビスケット27検体について検査を実施した．その結果３社24検体からTBHQ を検出した．なお，BHA 及びBHT については，南アフリカ産のビスケット２検体からBHA のみ検出した．その内訳を表1に示した．TBHQ を検出したビスケットは，クリームサンドタイプとチョコチップタイプ及びクリスプタイプであり，クラッカータイプのものからは検出されなかった．図5にA社のクリーム

表１．輸入洋菓子中のTBHQの分析結果

メーカー（原産国）	品　　名	検体数	検出数	検出量（平均）μg/g
A社（米国産）	クリームサンドA	8	8	6.9～20（9.9）
	クリームサンドB	8	8	11～16（14）
	クリームサンドC	2	2	10,11（10.5）
	チョコチップ	2	2	5.7,6.4（6.1）
	クラッカー	3	0	N.D
B社（米国産）	クリスプ	2	2	2.4,3.0（2.7）
C社（南アフリカ産）	チョコチップ	1	1	5.7（BHA 3.9）
	シナモンビスケット	1	1	7.3（BHA 5.6）

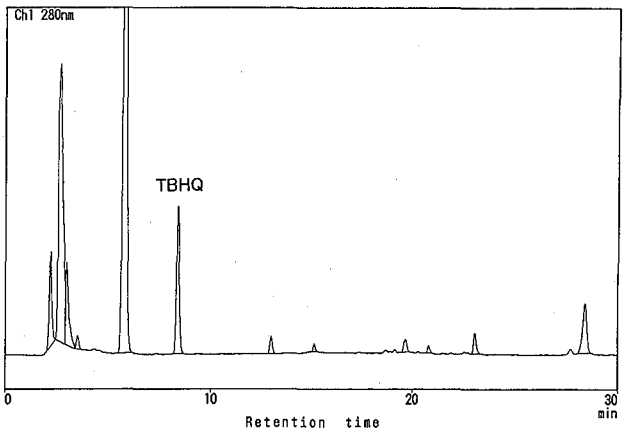


図５．A社のビスケットのクロマトグラム
HPLC条件
カラム：Cosmosil 5C18-AR(4.6mm i.d.×250mmナカライテスク社製)
移動相：A液　アセトニトリル：メタノール(1：1)，B液　5％酢酸溶液
グラジェント条件：移動相Aの割合を15分間で40％から90％まで変化させ，15分間その割合を保持した．
流速：1 mℓ/min　　カラム温度：40℃
測定波長：280nm

サンドビスケットからTBHQを検出した際のHPLCのクロマトグラムを示した．これらA社の試料の中では，特にクリームサンドタイプのものから比較的高い濃度でTBHQが検出されていることから，これがクリームに由来するものか，あるいはビスケットに由来するものかを確認する目的で，ビスケットBについて，ビスケット部分とクリーム部分をわけて定量した．特にビスケット部分はクリームとの接触面にクリームが染み込んでいる可能性もあるので，接触面を２～３mmほど削り取った残りを試料とした．その結果を表２に示した．クリームのTBHQの含有量は36μg/gであり，ビスケットの約3.5倍であった．本試料の原産国であるアメリカでは油脂やショートニングへのTBHQの使用は認められている．

表２．ビスケットの部位別TBHQ含有量

部　　位	含有量（μg/g）
ビスケットのみ	11
クリームのみ	36
ビスケット全体	16

従って検出されたTBHQは，クリームの原料の油脂あるいはショートニングに使用されていたものと考えられるが，ビスケット中からも少量検出されていることから，ビスケットの製造に際し使用された油脂に由来する可能性もある．しかしながら，サンドされているクリームがビスケット表面に染み込んでTBHQが移行した可能性も否定できない．いずれにしても検出されたTBHQの大部分はクリームに由来のものであった．また添加物表示については，当然日本語表示にはTBHQの使用表示はなく，また包装紙の英文の原料及び添加物表示の中にも見当たらなかったことから，検出されたTBHQは原料に由来するキャリーオーバーであったと思われる．

ま と め

①輸入洋菓子３社27検体について検査した結果，24検体からTBHQを検出し，その量は2.4～20μg/gであった．またクリームサンドタイプのものでは，ビスケットよりもクリームのほうがより高濃度のTBHQを含有していた．

②衛生試験法追補[1]で提示された，植物油，バター，魚介乾製品及び魚介冷凍品を分析対象品目とした分析法は，ビスケット等の菓子類にも適用できた．また検出器にフォトダイオードアレイ検出器を用いても，その検出限界は１μg/gであり十分実用的であることがわかった．

③GC－MS条件で示した分析条件を用いることで，

BHA, BHT 及びTBHQ の 3 種類の酸化防止剤を同時に確認することが出来た.

文　献

1）日本薬学会編：衛生試験法・注解, 1531-1535, 1995, 金原出版, 東京

2）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1991, 146-211, 1992, 日本食品衛生協会, 東京

3）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1992, 150-211, 1993, 日本食品衛生協会, 東京

4）厚生省生活衛生局検疫所業務管理室, 厚生省輸入食品衛生監視員協議会編：輸入食品1993, 220-355, 1994, 日本食品衛生協会, 東京

5）Page, B. D., Charbonneau, C. F.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 259-265 (1989)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 100-104, 1996

穀類，豆類及びそれらの加工品中のオクラトキシンA，オクラトキシンB及びシトリニンの分析

中里光男*，斉藤和夫*2，石川ふさ子*3，
藤沼賢司*4，守安貴子*3，二島太一郎*5，
田村行弘*2，友松俊夫*

Determination of Ochratoxin A, Ochratoxin B and Citrinin in Cereals, Beans and their Products

MITSUO NAKAZATO*, KAZUO SAITO*2, FUSAKO ISHIKAWA*3,
KENJI FUJINUMA*4, TAKAKO MORIYASU*3, TAICHIRO NISHIMA*5,
YUKIHIRO TAMURA*2 and TOSHIO TOMOMATSU*

An analytical method for the determination of ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in cereals, beans and their products was described.

The three mycotoxins were simultaneously extracted with ethylacetate at below pH 2 from samples. The extract was cleaned up by a liquid-liquid partition. The mycotoxins were chromatoraphed on a Cosmosil 5C18-AR column with an acetonitrile-0.015*M* oxalic acid (4 : 6) mixture as a mobile phase and detected using a fluorescence detector set at an excitation of 330nm and emission of 490nm.

The recoveries of ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin added to the samples were 77.9～95.5, 81.3～92.9 and 67.7～89.2%, respectively.

The detection limits of ochratoxin A, ochratoxin B and citrinin in the samples were 1.0, 2.0, and 2.0 μg/kg, respectively.

Keywords：オクラトキシン A Ochratoxin A，オクラトキシン B Ochratoxin B，シトリニン Citrinin，マイコトキシン Mycotoxin，高速液体クロマトグラフィー High performance liquid chromatography，穀類 Cereals，豆類 Beans

緒　言

オクラトキシン A (OCT-A)，オクラトキシン B (OCT-B) 及びシトリニン (CIT) は主として *Aspergillus* 及び *Penicillium* 属の数種の糸状菌によって産生される腎毒性マイコトキシンとしてよく知られており，化学構造的には両者ともイソクマリン骨格を有するカルボン酸である[1]．Fig. 1 にこれら 3 種のマイコトキシンの化学構造式を示した．これらトキシンの食品汚染例は比較的多く[2]，特に穀類及び豆類での汚染が最も多い．それらの汚染原因菌は，OCT が検出された場合は主として *A. ochraceus*[3),4)] あるいは *P. viridicatum*[5)-7)] であり，CIT の場合は *P. citrinum*[8),9)] あるいは *P. viridicatum*[5)-7),10)] であることが多い．従って，*P. viridicatum* に汚染されていた場合，OCT と CIT の両者が検出される可能性が高く，汚染実

* 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
*2 東京都立衛生研究所多摩支所
*3 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
*4 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
*5 東京都立衛生研究所環境保健部

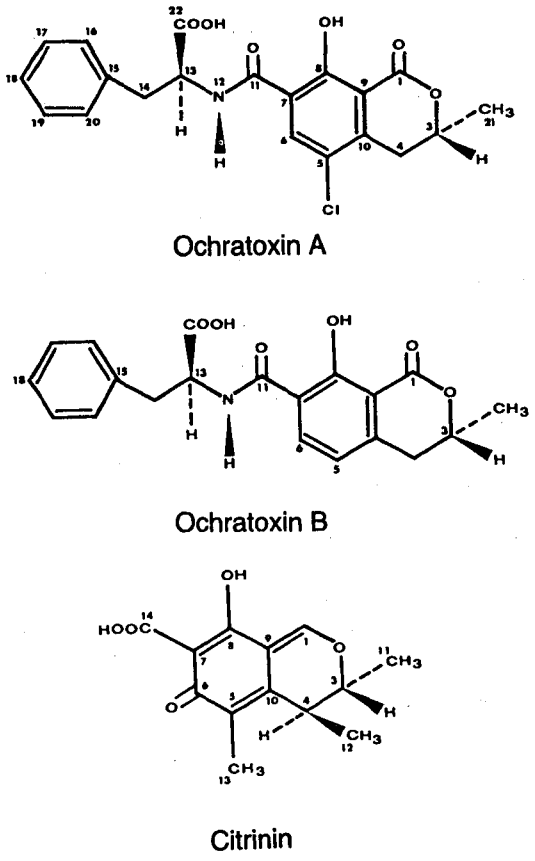


Fig. 1. Structures of OCT-A, OCT-B and CIT

態調査を行う場合には，両者を同時に分析することがより効率的，効果的であると考えられる．

著者らはこれまでにもOCTとCITをそれぞれ別々に分析して実態調査を行ってきたが，今回，分析の効率化をはかるために両者の同時分析法について検討した．その結果について報告する．

実験方法

1．試　料

市販の精白米，押麦，はと麦，とうもろこし粒，小麦粉，そば粉，ライ麦粉，小豆，バター豆，さらし餡を用いた．このうち粉状のものはそのまま，粒状のものは粉砕して粉状にしたものを試料とした．

2．試　薬

1)混合標準溶液：Makor Chemicals社製のCIT及びOCT-A，国立衛生試験所より分与されたOCT-Bの各標準品10mgを各々アセトニトリル100mlに溶解したものを標準原液とし，次いでCIT及びOCT-B標準原液の10ml，OCT-A標準原液の5mlを取り，アセトニトリルで全量を100mlとしたものを混合標準溶液とした．本液1ml中にはCIT及びOCT-Bを10 μg，OCT-Aを5 μg含有する．

本混合標準溶液を適宜希釈し，検量線を作成した．

2)アセトニトリルはHPLC用を用いた．

3)その他の試薬はすべて特級品を用いた．

3．装　置

1)高速液体クロマトグラフ：島津製作所製LC-6AD型ポンプ，同SCL-6B型システムコントローラー，同CTO-6A型カラム恒温槽，同CR-6A型データ処理装置，日本分光工業製820-FP型蛍光検出器及び同851-AS型オートサンプラーにより構成した．

2)ホモジナイザー：日本精機製作所製AM-7型

4．試験溶液の調製

試料25 gをブレンダーカップに取り，これに20%塩化ナトリウム溶液20ml，リン酸1ml及び酢酸エチル100mlを加えて10分間ホモジナイズした後，遠心分離を行い，酢酸エチル層を分液ロートに分取した．さらに，残渣に酢酸エチル50mlを加えて再度ホモジナイズした後，遠心分離を行って酢酸エチル層を分取し，先の酢酸エチル層に合わせた．次いで酢酸エチル層を20%塩化ナトリウム溶液50mlで洗浄した後，2%炭酸水素ナトリウム溶液50mlで2回抽出した．これらの水層を合わせ，20%塩酸でpHを2以下に調整した後，クロロホルム50mlで2回抽出した．クロロホルム層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，ろ紙でろ過し，減圧下で溶媒を留去した．得られた残留物にアセトニトリル1mlを加えて溶解した後，孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ過したものをHPLCの試験溶液とした．

5．HPLC条件

カラム：Cosmosil 5C18-AR (5 μm，4.6mm i. d. × 150mm)，移動相：アセトニトリル－0.015Mシュウ酸(4:6)混液，流速：0.8ml/min，検出：蛍光，励起波長(Ex)330nm，蛍光波長(Em)490nm，カラム温度：40℃，注入量：10～20 μl

結果及び考察

1．抽出条件

CITあるいはOCTを試料から抽出する場合，これらはいずれもカルボン酸であることから一般的にはアルカリで抽出する方法[11),12)]，試料を水で湿潤させて酸性条件下，アセトニトリル[13)]や酢酸エチル[14)]あるいはクロロホルム[15)]等の有機溶剤で抽出する方法が用いられている．そこで，この両者をいくつかの試料を用いて添加回収実験を行い，回収率を比較したところ，アルカリ抽出においてCITの回収率が極めて低いものがあった．このため，本法では酸性条件下，有機溶剤で抽出する方法を採用した．しかし，有機溶剤で抽出する際に，これらのトキシンは酸によるイオン化の抑制が十分でない場合，

試料中のたんぱく質と部分的に結合して，抽出率が低下する[16]，そのため添加する水にはたんぱく質との結合を阻止するために塩化ナトリウム等の塩を添加してイオン強度を高め，さらに，これらトキシンの解離を十分に抑制する必要がある．そのため抽出は強酸性条件下で行うこととした．本法では著者らが従来からCITの分析に用いている方法[14]，すなわち，pH 2以下でCITを酢酸エチルに抽出した後，酸，アルカリによる液－液分配でクリーンアップを行い，試験溶液を調製する方法をCIT及びOCTの同時分析に用いることとした．

2．HPLC条件

OCT及びCITを同時に分析するHPLC条件について検討した．OCT及びCITは共に強酸性物質であるのでイオン抑制法[10),11),13)]あるいはイオン対法[12),17)]によって逆相分配系のカラムを用いて分離するのが一般的である．また，これらのトキシンは強い蛍光を有するので高感度分析を行うために蛍光検出器を用いて分析を行うのが適当である．しかし，CITはテトラブチルアンモニウム等とイオン対とした場合には蛍光がなく[17]，イオン抑制法のみで蛍光を発した[13]，従って，両者を高感度で分析するためにはイオン抑制法が適当であると考えられる．

そこで，移動相条件を設定するにあたり，OCTとCITのpHと蛍光強度との関係について検討した．

まず，シュウ酸及び水酸化ナトリウムを用いてpH1.8～7.0に調整したアセトニトリル－水(4：6)混液にCIT，OCT-A及びOCT-Bを各々10 μg/mlの濃度になるように添加した後，蛍光分光光度計を用いて各蛍光強度を測定した．

結果はFig. 2に示したようにOCT-A及びOCT-BはpH1.8～4.0の間では蛍光強度の変化はほとんどなく，pH 4以下でやや減少する傾向を示した．一方，CITはpH 6～7では全く蛍光はなくpH 5から除々に蛍光を発し，pH2.5前後で最高となり，以後一定の蛍光強度を示すことが分かった．これはCITのイソクマリン骨格に結合しているカルボキシル基が解離している状態では蛍光がなく，イオン化が抑制されると共に蛍光を発することを示している．結果的にはイオン化の抑制と共にCITのイソクマリン環に結合しているカルボキシル基がカルボニルと分子内で水素結合し，6員環を形成するものと推察される．一方，OCTではイソクマリン骨格に結合するカルボキシル基はフェニルアラニンのアミノ基と酸アミド結合をしているためpHの変化による蛍光強度の大きな変化がなかったものと思われる．以上の結果から蛍光検出器で高感度に3種のトキシンを測定するためには

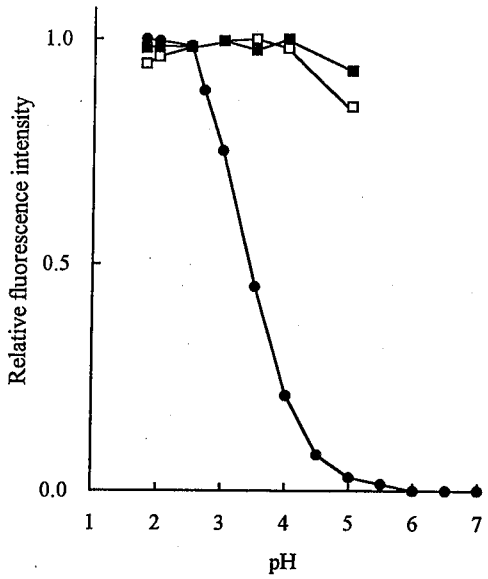


Fig. 2. Influence of pH on Fluorescence Intensities of OCT-A, OCT-B and CIT
■ : OCT-A, □ : OCT-B, ● : CIT
Solvent : acetonitrile-water (4 : 6) mixture adjusted pH to 1.8 from 7.0

移動相のpHを2.5以下に調整する必要があることが分かった．

次に移動相のpHと保持時間の関係について検討した．OCT-A，OCT-B及びCITをイオン抑制法で分析するに際して移動相のpHがCITの感度に大きく影響することは先に述べたとおりだが，3種のトキシンの保持時間及び相互の分離にも大きく影響するものと考えられる．そこで，カラムにCosmosil 5C18-ARを，移動相にシュウ酸と水酸化ナトリウムを用いてpHを1.8～7.0に調整したアセトニトリル－水(4：6)混液を用い，pHと各トキシンの保持時間の関係について検討した．結果をFig. 3に示した．

OCT-AとOCT-Bは移動相のpHが低下するに従って保持能が高まり，pH3.5以下で保持時間は一定となった．従って，OCT-A及びOCT-BはpH3.5以下で完全にイオン化が抑制されるものと推定される．一方，CITについてはpH3.5以上ではOCT-Bよりも溶出時間が早かったが，pH2.5以下ではOCT-Bよりも保持時間が遅くなり，かつ一定の保持時間を示した．従って，3種のトキシンの相互分離，感度の両者を考慮すると移動相のpHは2.5以下が適当であることが分かった．

なお，移動相のpH調整に用いる酸は坪内ら[10]がCITのHPLC分析に際して移動相のpH調整に使用したシュウ酸を用いた．

次に移動相の組成について検討した．移動相としてはシュウ酸でpHを2.2に調整した種々の組成比のアセトニ

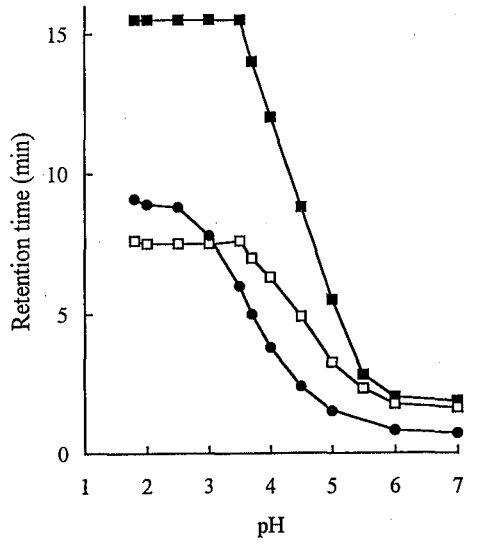


Fig. 3. Influence of pH on Mobile Phase on Retention Times of OCT-A, OCT-B and CIT
■ : OCT-A, □ : OCT-B, ● : CIT
Mobile phase : acetonitrile-water (4 : 6) mixture adjusted pH to 1.8 from 7.0, column : Cosmosil 5 C18-AR (4.6mm i. d. ×150mm).

トリルー水混液，メタノールー水混液，アセトニトリルーメタノールー水混液について検討した．その結果，3種のトキシンの相互分離，試料由来の夾雑ピークとの分離の点でアセトニトリルー水(4:6)混液を用いた場合が最も良好な結果が得られたのでこれを採用した．すなわち，本法の移動相はアセトニトリルと0.015*M* シュウ酸溶液の比を4：6 (pH2.2)としたものを用いることにした．

3種のトキシンの蛍光検出器による検出においては，同時に感度良く検出できる波長を選ぶ必要があり，検討の結果，励起波長は330nm，蛍光波長は490nm に設定することにした．

本法のHPLC 条件で混合標準溶液を分析した時のクロマトグラムをFig. 4 に示した．

3．添加回収実験

精白米，押麦，はと麦，とうもろこし粒，小麦粉，そば粉，ライ麦粉，小豆，バター豆，さらし餡の計10種の食品にOCT-A を0.2 μg / g，OCT-B 及びCIT を0.4 μg / g となるように添加し，本法に従って操作した際の回収率をTable 1 に示した．

回収率はOCT-A で77.9～95.5%，OCT-B で81.3～92.9%，CIT で67.7～89.2%とおおむね良好であった．その際のとうもろこし粒から抽出した抽出物のクロマトグラムを Fig. 5 に示した．なお，今回添加回収実験に使用した試料では3種のトキシンのピーク付近に妨害となるようなピークは全く認められなかった．

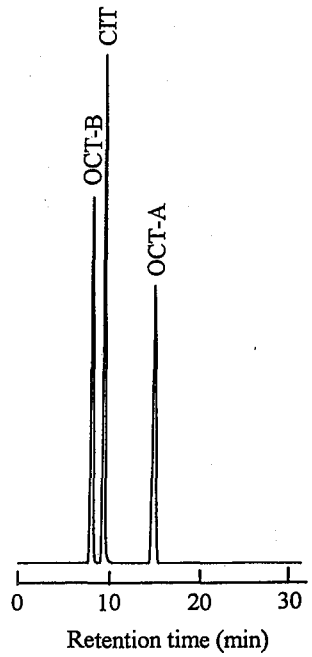


Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of OCT-A, OCT-B and CIT
Operating conditions : column, Cosmosil 5 C18-AR (5 μm, 4.6mm i. d. ×150mm) ; mobile phase, acetonitrile-0.015*M* oxalic acid solution (4 : 6) ; flow rate, 0.8ml/min ; column temp., 40℃ ; detection, fluorescence detector (Ex. 330nm, Em. 490nm).

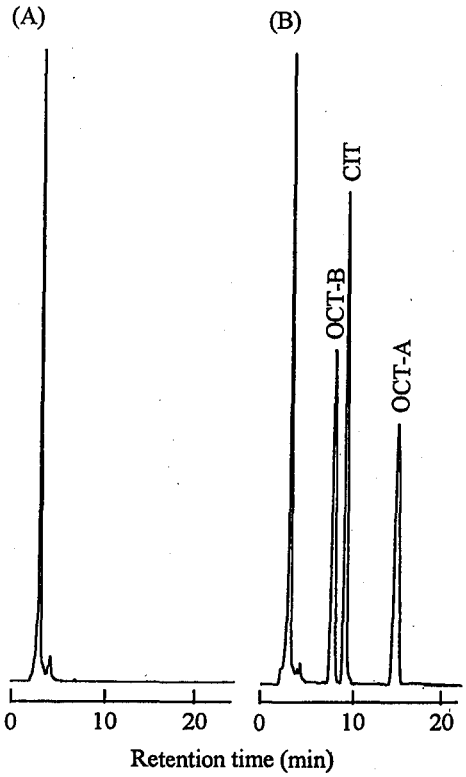


Fig. 5. High Performance Liquid Chromatograms of OCT-A, OCT-B and CIT Added to Corn
(A) : control ; (B) : sample extract spiked with standards
Operating conditions were the same as described in Fig. 4.

Table 1. Recoveries of OCT-A, OCT-B and CIT Added to Samples

Sample	Recovery (%)		
	OCT-A	OCT-B	CIT
Polished rice	88.2±4.6	87.0±4.6	82.7±9.9
Polished barley	86.5±3.9	86.4±2.0	87.4±4.4
Adley	90.9±4.6	88.1±6.0	75.3±5.1
Corn	89.7±3.6	89.5±4.8	86.5±7.8
Wheat flour	95.5±1.6	92.9±2.1	89.2±8.0
Buckwheat flour	93.5±1.8	92.4±3.0	67.8±5.1
Rye flour	89.7±3.8	87.2±2.9	80.5±6.0
Small red bean	77.9±3.9	81.3±4.8	68.3±7.6
Butter bean	78.4±5.3	82.2±3.9	67.7±4.6
Powder bean jam	86.9±3.6	84.9±4.2	83.3±5.4

Samples were spiked with 0.2 μg / g of OCT-A, and 0.4 μg / g of OCT-B and CIT.
Recoveries are mean ± S. D. (n=3)

なお，検出限界はOCT-A で 1 μg /kg，OCT-B 及び CIT で 2 μg /kgであった．

ま と め

HPLC による穀類，豆類及びそれらの加工品中の OCT-A，OCT-B 及びCIT の分析法について検討した．

1．3種のマイコトキシンは試料中からpH 2 以下で酢酸エチルで抽出し，抽出物は液－液分配によってクリーンアップを行った．

2．3種のマイコトキシンのHPLC による分離はカラムにCosmosil 5C18-AR，移動相にアセトニトリル－0.015*M*シュウ酸(4 ： 6)混液を用いて行った．検出はEx.330nm，Em.490nm に設定した蛍光検出器を用いた．

3．OCT-A，OCT-B 及びCIT の標準品を10種の試料に添加したときの回収率はそれぞれ77.9～95.5，81.3～92.9及び67.7～89.2%であった．

4．本法の検出限界はOCT-A で 1 μg /kg，OCT-B 及びCIT で 2 μg /kgであった．

文 献

1) Cole, R. J. and Cox, R. H. : *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, p137-144, p824-825, 1981, Academic Press, New York.

2) 中里光男：マイコトキシン，**18**，6-11，1983.

3) Levi, C. P., Trenk, H. L., Mohr, H. K. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**, 866-870, 1974.

4) 坪内春男，山本勝彦，久田和夫，他：マイコトキシン，**19**，16-21，1984.

5) Scott, P. M., Van Walbeek, W., Kennedy, B., et al. : *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 1103-1109, 1972.

6) Krogh, P., Hald, B., Pedersen, E. J. : *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Section B, **81**, 689-695, 1973.

7) 杉本貞三，南沢正敏，高野和子，他：食衛誌，**18**，176-181，1977.

8) Subrahmanyam, P., Rao, A. S. : *Current Sci.*, **22**, 707-710, 1974.

9) 中里光男，冠 政光，中沢久美子，他：食衛誌，**23**，59-66，1982.

10) 坪内春男，久田和夫，寺田久屋，他：名古屋市衛生研究所報，**31**，77-80，1985.

11) 井部明広，西島基弘，安田和男，他：食衛誌，**25**，334-341，1984.

12) Terada, H., Tsubouchi, H., Yamamoto, K., et al. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 960-964, 1986.

13) Lepom, P. : *J. Chromatogr.*, **355**, 335-339, 1986.

14) 中里光男，冠 政光，中沢久美子，他：食衛誌，**22**，391-396，1981.

15) Zimmerli, B., Dick, R., Baumann, U., : *J. Chromatogr.*, **462**, 406-410, 1989.

16) Uchiyama, S., Saito, Y., Uchiyama, M. : *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **26**, 651-657, 1985.

17) 中川友夫，河村太郎，藤本康雄，他：食衛誌，**23**，297-301，1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 105-112, 1996

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例(第13報*)
—平成7年度—

観　公子**, 冠　政光**, 新藤哲也**,
真木俊夫***, 友松俊夫**

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toixicants in Tokyo (XIII*)
—1995—

KIMIKO KAN**, MASAMITSU KAMMURI**, TETSUYA SHINDOU**
TOSHIO MAKI*** and TOSHIO TOMOMATSU**

Keywords：化学性食中毒 chemical food-poisoning, ハシリドコロ *scopolia japonica*, フグ pufferfish, ヒスタミン histamine, 銅 copper, スズ tin, 異物 alien substances, ペイント paint, ピンホール pinhole

著者らはこれまで都内で発生した化学性食中毒事例を報告してきた[1-5].

今回は平成7年度に発生した化学物質による食中毒等の事例のうち，ハシリドコロの誤食による食中毒1件，フグによる食中毒5件，ヒスタミンによる有症苦情1件，重金属溶出による有症苦情2件，清涼飲料水の劣化等による有症苦情2件，学校給食の異物混入1件及び動物性異物混入による有症苦情2件の合計14件の事例について報告し，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．ハシリドコロの誤食による食中毒

事件の概要　平成7年4月，患者の一人である息子が，友達5人と雲取山に行き，中腹付近で地面に生えていた紫色のタラの芽様若芽を食べられると思い，10株程摘んだ．持ち帰った山菜は3日後の朝，天ぷらにし，母親が1～2個，息子が3～4個喫食した．喫食後約30分から2名とも脱力感，めまい，口渇，酩酊状態及び目の異常を呈し，1名は嘔吐した．息子の受診した医院から所轄の保健所に，有毒植物による食中毒の疑いの届出がされた．息子は症状が重く医院において点滴等医療処置を受けたが，母親は保健所員の勧めにもかかわらず受診しなかった．

①試料　山菜の生の葉1片及び長さ約5cmの山菜の天ぷら2個．

②原因物質の検索　天ぷらは衣を除き，植物の葉柄基部を観察したところ5mm程の茄子の雷に似た幼雷が1つずつ付いていた．

天ぷら残品の植物形態及び中毒症状から山菜はハシリドコロ[6]であると鑑定した．山菜の葉及び天ぷらについてハシリドコロの有毒成分であるアルカロイドについて安田等[7]の方法により抽出し，薄層クロマトグラフィー(TLC)で確認後，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて定量した．[HPLCの分析条件][8]カラム：COSMOSIL 5 C18-MS φ4.6×150mm，移動相：1/15M-NaH_2PO_4 (pH3.5)-メタノール=48：52溶液(15.7mM-ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)含有)，流量：1.0ml/min，波長：210nm．その結果山菜の葉からヒヨスチアミン等170mg/kg及びスコポラミン130mg/kgまた天ぷらからヒヨスチアミン等60mg/kg及びスコポラミン240mg/kgを検出した．

③考察　ハシリドコロは全草に有毒アルカロイドを含有し誤食すると走り回って苦しむ事からこの名が付けられている．春の芽出しや若芽は，外観上有用植物のものと誤認する事や柔らかそうで食用になると誤解し，喫食しての食中毒例が後を絶たない．本例も山菜に対する知識が乏しかったために起きた中毒例と言えよう．山菜採りには植物の有識者と一つ一つ確認しながら採集する事

---

*第12報，東京衛研年報，**46**，115-119，1995

**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

表1．平成7年度に発生した化学性食中毒等の概要

No.	発生年月	発症時間	患者数/喫食者数	原因食品	症状	原因物質
	食中毒					
1	平成7年4月	30分	2/2	山菜の天ぷら	嘔吐，口渇，酩酊，脱力感，めまい，散瞳，物が黄色く見える	ハシリドコロ(スコポラミン，ヒヨスチアミン等)
2	10月	1時間	1/7	フグちり鍋(シマフグ)	痺れ，吐き気，嘔吐，呼吸困難，瞳孔散大	フグ毒(テトロドトキシン等)
3	10月	不明	1/1	フグ味噌汁等(ヒガンフグ)	呼吸困難，瞳孔散大，意識不明，死亡	フグ毒(テトロドトキシン等)
4	11月	1時間～1時間30分	1/5	フグ炊き込み御飯(ショウサイフグ)	痺れ(口唇，舌，喉)，息苦しさ	フグ毒(テトロドトキシン等)
5	平成8年1月	1時間～1時間30分	2/5	フグ味噌汁等(ヒガンフグ)	痺れ(口唇，指先，足，体)，息苦しさ，息切れ，平衡感覚無し	フグ毒(テトロドトキシン等)
6	1月	直後～4時間	1/28	フグちり鍋(マフグ)	嘔吐，痺れ(口唇，手腕，全身)，歩行困難	フグ毒(テトロドトキシン等)
	有症苦情					
7	平成7年6月	1時間～3時間	4/4	黄桃缶詰	苦味，吐き気，腹痛	金属(スズ)
8	9月	直後	1/2	若干しうるめ	痺れ(口唇，舌)，舌の腫れ	ヒスタミン
9	10月	1時間	1/2	冷やし力うどん	嘔吐	異物(ゴキブリ)
10	10月	—	1/?	牛乳	(胃洗浄して症状発現無し)	ペイント？
11	10月	不明	1/1	ぶどう	下痢	異物(ショウジョウバエ)
12	10月	5分	1/2	自家製中華スープ	嘔吐	金属（銅）
13	12月	直後	2/2	果汁入り清涼飲料水(オレンジ)	喉がチクチク，異味	ピンホールによるカビの発生
14	平成8年3月	1時間～2時間	1/2	清涼飲料水(コーヒー)	吐き気，下痢，発熱	ピンホールによる変質

が必要であり，そうでない場合は観察のみで済ませる事を勧めたい．また，本事例では1名が受診しなかったが，生命の危険を考えると，誤食し異状を感じた時は直ちに嘔吐し，医師の診断処置を受ける必要があった．

2．フグによる食中毒事例

事例1．事件の概要　平成7年10月，57才の男性が八丈島の近海でフグを釣り，現地で内臓を除去し大1尾と小7尾の計8尾分の身と肝臓を持ち帰った．それを友人7人で“フグちり”にして喫食した．2時間後から体の痺れ，吐き気，嘔吐症状を呈したため，友人につれられて受診，その後病院にて容態が急変，3時間後には脱力感，視力障害，意識不明，呼吸困難の症状を呈した．硫酸アトロピンの投与及び人工呼吸器にて発症約1日後に意識回復した．患者は発症する直前にフグの肝臓を食べていた．他の5名も肝臓と思われるものを食べていたが発症しなかった．

①試料　患者の血清．

②原因物質の検索　医師からのフグ中毒の通報により，患者の血清について衛生試験法注解[9]に従い検査を行ったがフグ毒は検出されなかった．

③考察　中毒原因は患者の聞き取り調査及び釣り場海域の情報から，シマフグ[10]を釣り，その肝臓を喫食したことによるものと推測された．シマフグの可食部位は筋肉，皮，精巣である．フグの肝臓はテトロドトキシン等のフグ毒を多く含有し，喫食して死につながる食中毒が発生したため食品衛生法で全面的に使用禁止されている．本例で肝臓を喫食し，発症しなかった人もいたが，これはフグ毒が*Vibrio*属や*Pseudomonas*属などのフグ毒産生能を持つ細菌に起源を発する食物連鎖のため[11,12]，肝臓のフグ毒量に個体差があったか，または肝喫食量に多少の差異があったものと推測された．ちなみに，食品衛生法で部位によっては「処理等により人の健康を損なう恐れがない」と認められているサンサイフグの肝臓でもフグ毒が5 MU/g未満～1145MU/g存在し，魚体全てが有毒なため食品衛生法で規制されているドクサバフグの肝臓の5 MU/g～483MU/gと大差ない事も知られている[10,13]．

事例2．事件の概要　平成7年10月夜，40才の男性が自宅にてヒガンフグの身と肝臓を自分で調理し，味噌汁などにして食べ未明から呼吸困難，瞳孔散大等の症状を呈した．意識不明のまま救急車にて入院，治療を受けていたが意識不明の状態が続き，約1か月後肺炎を併発し

て死亡した.

家族の話では家族が寝てから患者は自分でフグを調理し喫食，翌朝5時頃苦しんでいるのを子供が発見し119番した．その時患者は食事を指さして知らせていた.

①試料 ガスコンロ上の鍋に残った味噌汁，台所流し三角コーナー内にあった残飯，食卓上の食器内の食べ残し，食卓上の味噌汁の食べ残し及び食卓上の灰皿の内容物.

②原因物質の検索 患者の症状や現場の状況からフグ毒が疑われたため，フグ毒試験をおこなった．その結果，ガスコンロ上の鍋に残った味噌汁中の身から2.21MU/g，三角コーナー内にあった廃棄物中の加熱した身と骨の混合物から2.65MU/g，同生の生殖器から684MU/g，同生の内臓から201MU/g，同生のフグの皮から142MU/g，食卓上の食器内の食べ残し中の加熱したフグ肉から158MU/g，同加熱した肝臓から255MU/gのフグ毒が検出された．患者の尿及び血清についても検査を行ったがフグ毒は検出されなかった.

また，調理されたこのフグは三角コーナー内にあった廃棄物中の生のフグの皮からヒガンフグと断定された.

③考察 食卓にフグの肉と骨及び肝臓の破片が残っていた事から患者はフグの肝臓を食べた事が推察された.

また，危険を指さして知らせている事からフグ中毒のため，この時すでに症状は進み言語障害が発現していたものと思われる．中毒の早期発見がされていたなら死には至らなかったと思われた.

フグの入手経路や調理法については本人の回復がなかったために解らなかったが，患者は自分で釣ったものを調理して食べ，中毒を起こしたものと推定された.

事例3．事件の概要 平成7年11月，フグの炊き込みご飯を家族5人で食べたところ約1時間後に主婦のみが口唇のピリピリ，舌及び咽頭の痺れ，息苦しさ，ろれつが回らない，舌の奥の筋肉が自由にならない等の症状を呈した.

フグは家人が千葉県沖で釣ったフグを船上で身欠きにしてもらい，家に持ち帰り調理喫食したものであった.

①試料 患者の血液，炊き込みご飯残品，残りの身欠き状態のフグの大，中及び小型の計3種.

②原因物質の検索 喫食状況及び患者の症状からフグ中毒が疑われたため，フグ毒試験をおこなったところ，フグ大から1.11MU/g，中から1.60MU/g，小から2.00MU/g検出された．なお，血清及び炊き込みご飯からフグ毒は検出されなかった．また，身欠きについていた尾の外観，釣り場の生息状況からショウサイフグと推測され，さらに市場検査所で行ったフグ筋肉の等電点電気泳動法による肉種鑑別でショウサイフグと判明した.

③考察 検査の結果，炊き込みご飯からはフグ毒が検出されず，身欠きから1.11～2.00MU/gのフグ毒を検出し，無毒とされる10MU/g未満であったが，主婦が喫食した一部に高濃度の部分があった事も考えられる.

事例4．事件の概要 平成8年1月，男性会社員は釣り仲間3名と千葉県金谷港付近に磯釣りにでかけ黒鯛，アジ及びフグ2尾を釣り上げた．翌日の昼食時，社員食堂の調理場で釣り上げた2尾のフグを調理，筋肉部は水洗いし，筋肉と肝臓以外はそのまま廃棄した.

肝臓は2尾分を湯通し，筋肉部はぶつぎりにし，一緒に味噌汁とした．食前に大きい肝臓(1尾分)は鍋から取り出し廃棄した．残りの小さい肝臓(1尾分)は大，小片の2分割にした．1名はフグの肉3片と肝臓の大1片の入っていた味噌汁を椀に約1/2喫食した．約1時間後から唇，舌及び手指先の痺れさらに足先から足全体に痺れて息苦しくなり，病院にて受診した．さらに息切れ，平行感覚がなくなり，体の感覚麻痺も発現してきた．点滴，下剤の投与等の加療を受け，2日後正常に戻った.

他の1名は肝臓の小1片を喫食，2時間半後口唇の痺れ(口が乾いた感じ)，手指の痺れを呈し受診，胃洗浄，点滴を受けた．その後帰宅できる状態であったが念のため入院，翌日退院した。

当該ふぐについては通称アカメフグ(標準和名ヒガンフグ)で漁師から内臓と身を分け，身を充分に洗えば危険はないと聞き，以前に数回食べた事がある．しかし，アカメフグは筋肉部位以外は食用にできない事を知らなかった.

なお，その他3名は味噌汁や筋肉部を喫食したが肝臓は喫食しなかった.

①試料 加熱済肝臓，加熱済骨付き筋肉，大型フグ及び小型フグの生の生殖器，大型フグ及び小型フグの生残渣(頭部，皮，鰓，鰭及び内臓の1部を含む)，他の魚も含む生の内臓及び重症患者の血液.

②原因物質の検索 喫食状況及び医師からの届出症状から，フグ中毒が推定されフグ毒試験を行った．その結果，加熱済肝臓から310MU/g，大型フグの生の生殖器から882MU/g，小型フグの生の生殖器から783MU/g，大型フグの生残渣から761MU/g，小型フグの生残渣から117MU/g，他の魚も含む生の内臓から12.8MU/gのフグ毒が検出された．なお，加熱済骨付き筋肉及び重症患者の血液からはフグ毒は検出されなかった．また，残渣中に含まれていた2尾の皮からヒガンフグと断定され

た.

③考察 フグ肝臓入り味噌汁にも拘らず5名の内3名は発症しなかったのは湯通しした肝を用いたため汁中のフグ毒量が減少した事及び肝臓を喫食しなかった事によると思われた.

フグの喫食はわが国独特の食習慣であり,本例のように釣り人が生半可な知識で釣り上げたフグを一般の魚種同様に調理し,さらには危険を承知で肝までも喫食しフグ中毒に陥る事も多い.フグ中毒は死亡率も高い事から一般消費者にも行政的に注意を喚起する必要があると思われた.

事例5.事件の概要 平成8年1月,島根県にある親戚から送られてきた魚介類の中に雄と思われるフグ1尾があった.フグを自宅で息子が調理し,白子と思われるもの,筋肉及び皮を“フグのちり鍋”にした.母親が白子と思われるものを口にした直後口唇の痺れを感じた.すぐ吐き出したものの喫食3～4時間後,両手前腕の痺れ等の症状を呈し,119番して受診した.病院で付き添いの息子も歩行困難の症状を呈し,そのまま病院で加療した.

①試料 フグの加熱調理済み生殖器,フグ生残渣,患者2名の血清,尿及び母親から採取した胃液.

②原因物質の検索 当該フグは送り先の島根県地方ではナメタフグと呼んでいることから,皮に毒のあるマフグと推定された.患者の症状及び喫食状況から典型的なフグ中毒であったためフグ中毒の検査をおこなった.その結果,フグの加熱調理済み生殖器から780MU/g,フグ生残渣中のフグ頭部の皮から64MU/g,同頭部の筋肉から37MU/g,同肝臓から1520MU/g,同肝臓以外の内臓から1220MU/gのフグ毒が検出された.
なお血清,尿及び胃液からはいずれもフグ毒は検出されなかった.

③考察 喫食したフグは残渣中の頭部の皮からマフグと断定された.マフグは食品衛生法で無毒とされている部位が筋肉と精巣である.母親が精巣と思って喫食したものは卵巣であり,また調理残渣の中に皮が見あたらないところから皮も喫食したものと推定された.卵巣のフグ毒は780MU/g検出され,フグ毒の最小致死量10,000MU/gを基にして計算すると本品を12g喫食すると生命の危険があった.息子も中毒症状を呈しておりちり鍋中の卵巣や皮,また調理時筋肉に付着したフグ毒が作用したものと推測された.送り先の西日本地域はフグの産地でフグ調理喫食に関しては慣れており一般の魚種と同感覚で送ってきたものと思われた.何れにしても,素人がフグを調理し喫食することは危険であると考えさせられた.

3.ヒスタミンによる有症苦情

事件の概要 平成7年9月,若干しうるめ1パック(5匹入)を購入し,帰宅後直ちに冷蔵庫に保管し,4日後,焼いて妻と2人で喫食した.夫は内臓部を口に含んだところ,口の中が痺れた感じがしたのですぐに口から出した.しかし,舌が斑に赤くなり,ピリピリした.翌朝になっても舌の違和感は残っていた.舌が腫れた以外,体の他の部分に異常はなかった.妻は1匹食べたが異常はなかった.また,この商品を購入した他の客からの苦情はきていない.

①試料 焼いた若干しうるめ残品3匹及び参考品として販売店に残っていた仕入日の同じ若干しうるめ1パック.

②原因物質の検索 喫食食品が青み魚のウルメイワシであり患者の症状からヒスタミン等の腐敗アミンによるものと推測された.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及びHPLCによる定量分析を行った[9].

その結果,残品(焼いたもの)からヒスタミン650mg%,カダベリン33mg%及びチラミン33mg%が検出され,同ロット参考品からヒスタミン210mg%,カダベリン13mg%が検出された.なお,スペルミジン,プトレシン,及び参考品でのチラミンは検出されなかった.

③考察 残品から高濃度のヒスタミンが検出されたことから,ヒスタミンが発症原因物質と断定できた.参考品からもヒスタミンが検出され,また他の不揮発性腐敗アミンも検出されていることから,本品の鮮度がかなり低下していたものと推測された.

本品は冷凍状態で仕入搬入され,-20度で保管後,0度の冷蔵ショーケースに並べて販売されていた.

ヒスタミンはヒスチジンがモルガン菌等の作用により脱炭酸され生成される事が解明されている[9],また,モルガン菌以外でも,保存温度5度でヒスタミン生成能のある菌群が存在するという[14].そのため赤身魚類の管理には充分注意が必要であり,購入後は早期に消費する事が望ましい.その他の腐敗アミン存在下でヒスタミンの最低中毒量は100mg%と言われているが[9],本例の配偶者が異常を認めていなかったように人によりヒスタミンに対する感受性は異なる事がうかがわれた.

4.金属の過量溶出による有症苦情

事例1.事件の概要 平成7年10月,都内在住の主婦が前日の夜調理し,銅製の鍋に入れたまま冷蔵庫に保存

していた中華スープを翌朝8時頃食べたところ5分後に嘔吐した．患者は妊娠5ヶ月であり，心配した夫が保健所に届け出た．なお，夫は当日一口喫食したが異味ですぐ食べるのを止めた．また前日の夜に喫食した時は異常が認められなかった．

①試料 鍋に入ったスープ．

②原因物質の検索 スープは卵，カニ，豆腐及びスープの素でつくられており，外観は青緑色を呈し，金属臭が認められた．また，鍋は銅製で内面の銀色のメッキがスープの浸っていたと思われる所まで剝離し赤銅色を呈していた．

患者の症状，残品の外観及び保存の状況から銅等の金属による中毒が考えられたため，試料を灰化後，衛生試験法に従い金属の分析を行った．

その結果，銅が汁部から160 μg / g，具の部分から280 μg / g 検出された．なお，鉛，亜鉛及びカドミウムは検出されなかった．

③考察 本事例では銅が高濃度に検出された事から，中華スープを銅製の容器に入れたまま長時間放置したため銅が溶出し嘔吐を発現したものと考えられた．

金属製の容器では長時間の放置により多量の金属溶出が起こる[15]．官能面においても金属味等の異常を呈するため，保存にはガラスや陶磁器等の容器に入れ替える事が望ましい．

銅化合物による中毒は悪心，嘔吐及び下痢，胃粘膜の糜爛等の症状を呈するが[16]，本例では喫食後比較的短時間に嘔吐したため銅の消化管における滞留時間が少なく下痢やその他の症状の発現に到らなかったものと思われる．

事例2．事件の概要 平成7年6月，専門学校の学生4名が黄桃の缶詰3缶を購入し喫食したところ，全員が1～2時間後吐き気，腹痛の症状を呈し医師に受診した．共通食は黄桃の缶詰のみであり喫食時苦味があったと訴えていた．

①試料 残品の黄桃3片と残品の入っていた缶．参考品として同ロット及び別ロットの未開封黄桃缶詰3種．調査のための他社黄桃缶詰4種，みかん缶詰2種，クワイ，ライチ及びアスパラガス缶詰各1種．

②原因物質の検索 当該品は缶詰であり，症状及び患者が喫食時に苦味があったと訴えていることから，缶からの金属の溶出が疑われたため，灰化後常法により金属を測定したところスズが320 μg / g 検出された．また，参考品の未開封缶詰3種からも表2に示した通りスズがそれぞれ260 μg / g，300 μg / g 及び340 μg / g 検出され，味覚試験をしたところいずれも金属味を呈していた．なお，銅，鉛，亜鉛及びカドミウムは検出されなかった．

表2．有症原因黄桃缶詰及びその他の缶詰中のスズ含量及びpH

No.	品名	スズ量(μg/g)	pH	原産国	製造日
1	黄桃・シラップづけライト(中毒残品)	320	3.8	中国	940826
2	黄桃・シラップづけライト(参考品)	260	3.9	中国	940826
3	黄桃・シラップづけライト(参考品)	300	3.9	中国	940827
4	黄桃・シラップづけライト(参考品)	340	4.0	中国	940828
5	黄もも・シラップづけ(ヘビー)	56	3.9	不明	940913
6	黄もも・シラップづけ(ヘビー)	69	3.9	アメリカ	940722
7	黄もも・シラップづけ(ヘビー)	54	3.9	不明	940916
8	黄もも・シラップ漬(ライト)	53	3.9	オーストラリア	940307
9	ライチシラップづけヘビー	165	4.0	中国	930704
10	みかんシラップづけライト	62	3.8	中国	941202
11	みかんシラップづけホール	74	3.7	中国	950113
12	クワイ水煮ホール	(−)	5.7	中国	950117
13	アスパラガス水煮ホワイト	(−)	5.5	中国	940530

③考察 中毒症状を考慮して金属を測定した結果，残品と同種参考品からはスズが高濃度に検出されたが，他4社の黄桃缶詰ではスズが53～69 μg / g と当該品に比べ1/3～1/6の低い濃度であった．また，当該品が中国産であった事から，中国産の缶詰クワイ，ライチ，みかん2検体及びアスパラガスのそれぞれについてスズ含量を測定したところ，ライチから165 μg / g，みかんからは62 μg / g，74 μg / g 検出され，クワイ及びアスパラガスからは検出されなかった．なお，当該品及び同参考品の缶の内面は無塗装だった．ちなみにpHを測定したところスズが検出されたものは3.7～4.0で検出されなかったものは5.5，5.7であった．

スズの過量溶出は内面塗装のない缶，低pH，脱気処理不十分及び高NO_3イオン含量等が原因として報告されている[9]．

スズは他の金属に比し毒性が低いと考えられているが，1963年の缶ジュースによると考えられた中毒例では嘔吐，下痢症状を呈しスズが300～400ppm検出されている[17,18]．

他社の黄桃缶詰においては当該品及び同参考品と製造日やpHに大差が無かったにも関わらずスズ溶出の少なかったことから，本例は内面塗装の無い缶を用いたためにスズの過量溶出が生じたものと考えられた．

缶詰の缶は内面塗装する事が望ましく，開缶後はすぐに他の容器に移し換え金属の溶出を防ぐことが必要であ

る.

また，スズは清涼飲料水の成分規格[13]として150ppm以下と規定されているが，他の食品では規制されていない．今後，缶詰食品についても規制値を設定する必要があるものと考える.

5．清涼飲料水の劣化等による有症苦情

事例1．事件の概要 平成8年3月，男性会社員が会社の前に設置してある自動販売機で缶入りコーヒー飲料を購入し，同僚と一緒に飲んだところ本来の味，臭いではなく，異常に気づいた．この時，同僚は2/3位飲んでしまい，1～2時間後，気分が悪くなり腹が動鳴，下痢，発熱(微熱)を呈したため病院で受診した．苦情者は臭味がおかしかったので再度購入した．このコーヒーをコップに開けてみたところ色が黒く，細かい泡がたち，ドロドロしていた.

①試料 患者が喫飲した残品(WB940316)，苦情者の一口喫飲した残品(ロットNo. 不明)，苦情者の再購入残品(NN11 960930)及び参考品(NN11 970112).

②原因物質の検索 官能面において患者の残品(WB 940316)及び苦情者の残品(ロットNo. 不明)は酸敗様変質臭がし，参考品に比べコーヒーの褐色が濃く，褐色沈澱物が認められた.

pHは患者の残品が5.1，苦情者の残品(ロットNo. 不明)が5.2，苦情者の再購入残品(NN11 960930)が6.6及び参考品(NN11 970112)が7.1と異常当該残品は参考品と比較しpHが低かった．さらに，褐色沈澱物の加水分解物ではアミノ酸を認めた.

これらの結果から，苦情品はpH低下によるフェザリング現象を起こした製品であると確認された.

また，患者の残品(WB 940316)の缶低部にコーヒーの乾燥付着物が見られたので缶を洗浄したところ1.0×0.5㎜のピンホールが認められ，鉄含量が参考品の1 μg/g未満に比べ残品は11 μg/gと多く検出された.

③考察 患者の残品及び苦情者の残品はフェザリング現象が生じ官能上に異常を認めていた．この現象は自動販売機で長期加熱することによりpHが下がり蛋白等が凝固する現象である．同種のコーヒーに1N塩酸を滴下しpHと沈澱の関係を試みたところpH 5.6から細かい凝集粒子が生じた.

フェザリング現象では中毒が起こる事は考えにくいが官能の異常から気分の悪くなる事は充分考えられた．また，患者残品は1年前に製造されたもので，更にピンホールが生じていたことは管理上に問題があり，自動販売機で販売される缶コーヒーは温度や商品管理に充分注意を払う必要があるものと考える.

事例2．事件の概要 平成7年12月，自宅食品保管庫に保管してあった缶入り果汁入り清涼飲料をコップに注ぎ，3才の子供が飲んだ．半分ほど飲んだ時，子供が喉が“チクチクする”と言ったので，母親が一口飲んだところおかしな味がしたため残りは捨てた．缶を水で洗い開缶したところ底にカビ様の固形異物が残っていたのでおどろいて保健所に申し出た．なおジュースを振ってコップに注いだ時内容物が出にくかったが，ジュースの外観は異常無かった.

①試料 開缶してある容量250 gの果汁30％オレンジジュース缶及び缶底にあったカビ様残留物.

②原因物質の検索 残留物はおよそ直径5㎝で厚さ1.2㎜のカビ様の塊であり，真菌研究室で調べたところ*Penicillium*属のカビが認められた.

また，かびの発生する原因を検索したところ缶のプルトップ内側のリベット部でメジャーリング側に約2㎜の茶褐色で亀裂した鉄錆び様腐食を認めた.

③考察 チクチクの症状は残品のジュースが残っていなかったため確定はできないが，カビ塊はプルトップ部に生じた亀裂から長期間の保管でカビが侵入繁殖し塊にまで生育したものと推測された.

製造所における調査が行われたが製造工程での異常はなく，亀裂発生の原因は商品の流通，保管過程で積み重ねられた重圧等何らかの衝撃が加わって亀裂が生じたかタブが何らかの原因で少し持ち上がり亀裂が生じたものと推測された.

6．給食牛乳中に異物混入の苦情

事件の概要 平成7年10月，中学校の給食時，某生徒の飲み終わった牛乳瓶の底に白い粘液状の沈澱物が発見された。当該生徒は直ちに病院で胃洗浄及び点滴の医療処置を受け，特に中毒症状は発現しなかった．学校では製造所に苦情を伝え，区衛生部を通し苦情品の検査依頼をした.

①試料 内底部に白色で半流動性の物質を含有している牛乳瓶.

②原因物質の検索 当該品は白色物質が瓶の内壁中程から上部まで霧状に付着し，内底部はドロドロとした粘液状で牛乳とは状態が異なっていた．また，フェノール臭が認められたため，残品のヘキサン抽出液をGC/MSで，確認したところ，フェノールが認められた．また，白色物質の性状は水に懸濁し，エタノール，エーテル及びヘキサンに懸濁しなかった．なお，白色色素は一般的にチタンや亜鉛等の酸化化合物を用いている事から蛍光

表３．牛乳中異物の蛍光Ｘ線分析による元素組成(%)

試　料	元素組成（%） Ti	Si	Ca	Fe	Mg	K	P	Zn	Nb	Zr	As	Sr	W
苦情残品	89	5.8	0.57	1.9	1.4	0.44	0.24	0.29	0.12	0.058	—	—	—
Ａ社絵の具	90	5.9	0.47	1.7	1.6	0.22	0.18	0.056	0.092	0.038	—	0.013	—
Ｂ社絵の具１	82	8.5	8.4	0.058	0.032	0.42	0.067	—	0.26	—	0.020	0.015	0.093
Ｂ社絵の具２	80	1.5	18	0.060	0.038	0.35	0.092	—	0.20	0.012	0.017	0.030	—
C社ポスターカラー	94	4.9	0.037	0.49	—	0.16	0.050	—	0.59	0.016	0.032	—	0.098

Ｘ線分析により元素を測定し，市販の白色絵の具等との組成を比較したところ，表３に示したとおりＡ社のものと類似していた．

③考察　外観，性状及び構成元素割合から苦情品は牛乳に絵の具が混入していたものと推測された．製造所における製造工程，洗瓶工程及び検瓶システム等のチェックを行ったが異常はなく，混入経路については不明であった．

７．動物性異物混入による有症苦情

事例１．事件の概要　平成７年10月，男性苦情者が日本そばやで，喫食した「冷やし力うどん」の中に虫がいるのを発見し，喫食１～２時間後に嘔吐を３回呈した．

①試料　茶褐色で１～２㎜程の虫が付着したうどん．

②原因物質の検索　虫の形態から鑑定して，この虫はチャバネゴキブリの幼虫であった．また，混入時の生死を判定するカタラーゼ試験で陽性を示したため，これは生きていた幼虫が調理後混入したものと推測された．

③考察　チャバネゴキブリの混入が有症の直接原因とは考えにくく，喫食中に混入を発見したためため，気分が悪くなった際に嘔吐の原因を関連ずけてしまったと思われる．嘔吐の原因は不明である．

事例２．事件の概要　平成７年10月，男性苦情者がぶどうを購入し喫食したところ中から幼虫が出てきた．喫食後下痢を２回した．

①試料　体長３～４㎜の白色ウジムシが２匹付着したやや発酵したぶどう(巨峰)．

②原因物質の検索　鑑定の結果，ウジムシはショウジョウバエ科の幼虫であった．

③考察　ショウジョウバエは発酵した果物等を餌としているため本例のように裂果に幼虫が生息している事はよく見かける事であるが，よく洗浄する事により除けるものである．動物性異物混入の事例１と同様，患者の症状とウジムシとの因果関係は無いものと思われた．

以上，平成７年度に当研究室で対応した化学性食中毒等のうち，ハシリドコロの誤食によるもの，フグによるもの，若干しうるめのヒスタミンによるもの，中華スープの銅溶出によるもの，黄桃缶詰のスズ過量溶出によるもの，果汁入りオレンジジュースによるもの，コーヒー飲料によるもの，牛乳中の異物混入によるもの及び動物性異物混入によるものの計14事例を取り上げた．

本年度はフグの素人調理による中毒が多く，死亡例が１件あった．今後も，自ら釣ったフグを安易に調理喫食する人がいるものと考えられる．フグの素人調理は危険であるため，フグやフグ毒に関する知識は営業者だけではなく一般消費者にも普及させる事が必要と考える．

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，**42**，147-151，1991.
２）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.
３）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.
４）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.
５）冠政光，観公子，橋本秀樹，真木俊夫，他：東京衛研年報，**46**，115-119，1995.
６）田中俊弘編：日本薬草全書,497，1995，新日本法規出版、東京、
７）安田和男，西島基弘，斎藤和夫，上村　尚，他：食衛誌，**22**，397，1981.
８）HE LI-YI, ZHANG GUAN-DE, TONG YU-TI, TOSHIYUKI OSHIMA：生薬学雑誌，**44**(3)，162-166，1990.
９）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1990，金原出版株式会社，東京.
10）厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：日本近海産フグの

鑑別と毒性，1-85，1984，中央法規出版，東京.
11) 宮澤啓輔，野口玉雄：新編生物活性天然物質，176，1988，医歯薬出版，東京.
12) 野口玉雄：食衛誌，**29**，283，1988.
13) 厚生省生活衛生局：食品衛生小六法，1999，1996，新日本法規社，東京.
14) 浮島美之：食衛誌，**26**，531，1985.
15) 田村行弘，真木俊夫，観公子，永山敏廣，他：東京衛研年報，**36**，191-198，1985.
16) 内藤裕史：中毒百科，270，1991，南光堂，東京.
17) 食中毒の最近の事例研究：食品衛生研究，**14**(7)，53，1964.
18) 厚生省食品衛生課：食品衛生研究，**16**(9)，85(871)．1966.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 113-125, 1996

東京都多摩地区で検出されたミネラルウォーターの異物の分析結果

斉藤　和夫*，田口　信夫*，大石　充男*，天川　映子*，
荻原　　勉*，大橋　則雄*，山嶋裕季子**，諸角　聖***，
藤井　　孝*，田村　行弘*

Investigation of Foreign Matter of Mineralwater Determinated in Tama Area, Tokyo

KAZUO SAITO*, NOBUO TAGUCHI*, MITSUO OISHI*,
EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*, NORIO OHASHI*,
YUKIKO YAMAJIMA**, SATOSHI MOROZUMI***,
TAKASHI FUJII* and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：ミネラルウォーター mineralwater，苦情食品 consumer-dissatisfied foods，異物 foreign matter，真菌 fungus，炭酸カルシウム calcium carbonate，メタクリル樹脂様物質 similar substance of methacryl resin，ポリエチレン樹脂 polyethylene resin，ニトリルブタジエンゴム nitrile-butadiene rubber

緒　　言

消費者の間に「おいしい水」，「安全な水」を飲みたいという嗜好や若年層世代における食のファッション化により，国内産及び輸入のミネラルウォーターが大量に消費されるようになった[1,2]．これに加えて，平成7年1月17日阪神大震災の発生によって，各家庭でも災害に備えて水を備蓄しようとする気運が高まり，ミネラルウォーターの需要が大幅に増加した．この状況の中で，平成8年9月12日武蔵野市内のスパーマーケットで購入したニュージーランド産ミネラルウォーターに，「もやもやした物が入っているが大丈夫か」という情報が消費者より武蔵野保健所に寄せられた．このため保健所は当該スーパーマーケットより，苦情品と同一の銘柄品を収去し，衛生研究所多摩支所に搬入した．検査の結果，当該の参考品からは異物が検出されなかった．しかし，これと同一銘柄のミネラルウォーターが立川市内及び福生市内の倉庫に大量に保管されていたことから，両倉庫から各々14及び7検体，合計21検体収去され，当支所に搬入された．これらミネラルウォーターの肉眼及び顕微鏡による検査の結果，2検体より異物が検出され，いずれも真菌であることが明らかとなった．消費者から，この銘柄以外のミネラルウォーターにも異物が混入しているとの情報が多摩地区の各保健所を通じて，東京都衛生局に相次いで寄せられた．局はこの状況を重く見て，東京都食品環境指導センター食品機動監視班による，ミネラルウォーターの異物発見のための緊急監視が同年10～11月にかけて行われた．

ミネラルウォーターは，食品衛生法では清涼飲料水として取り扱われ，同法の清涼飲料水成分規格に適合していなければならない．すなわち，混濁，沈殿物のないこと（原材料に由来する動植物の組織成分または着香，着色の目的で使用される添加物に起因するものは除く），ヒ素，鉛，カドミウムが検出されないこと及びスズの含有量は150.0ppmを越えてはならないと規定されている[3]．したがって，今回検出された真菌等の異物が検出されたミネラルウォーターは，食品衛生法第7条2項の規格・基準違反として取り扱われ，我が国においてはこのような製品を販売してはならないことになる．

*東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3－16－25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16-25, Shibazakicho 3 Chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
***東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科

本報告では，武蔵野保健所管内で問題となった銘柄のミネラルウォーターから検出された異物の解明，並びにその後の緊急監視及び多摩地区保健所に持ち込まれた苦情品の市販ミネラルウォーターの検査結果について述べる．

実験方法

1．試料

武蔵野保健所管内で問題となった銘柄22検体，東京都多摩地区において，「異物が入っていた」等の疑いで消費者より同地区内の保健所に届けられたもの6検体及び食品機動監視班が多摩地区の小売り店，清涼飲料水製造工場で収去したもの52検体，合計80検体を検査対象とした．検体としたミネラルウォーターは，無色透明又は淡青色のペット容器(0.5～2L入り)，無色透明または緑色のガラス容器(0.33～0.7L入り)に充填されていた．

2．試薬

1）バレイショ・ブドウ糖寒天(PDA 培地)：栄研化学(株)製粉末培地を用いた．本品3 g を武田薬品工業(株)製クロラムフェニコール100mgと共に精製水1Lに溶解し，121℃15分間滅菌した．これを滅菌シャーレに約20mlずつ分注し平板培地とした．

2）ラクトフェノールコットンブルー液：ラクトフェノール液(石炭酸10 g，乳酸10 g，グリセリン20 g，蒸留水10 g) 50ml にコットンブルー(メチルブルー) 0.025 g を溶解した．

3）塩酸：和光純薬工業(株)製有害金属分析用を用いた．

4）臭化カリウム：メルク社製IR吸収測定用を用いた．

3．装置

実体顕微鏡は(株)オリンパス製PM-10A型，光学顕微鏡は(株)ニコン製OPTIPHOT-2 X2F-31型を使用した．誘導結合プラズマ発光分光分析計(ICP)はサーモジャーレルアッシュ社製POLYSCAN 61ESS 及び原子吸光分光光度計(AAS)は(株)パーキンエルマー社製SIMMA 6000型を使用した．

赤外分光光度計(IR)は(株)日本分光製IR-810型及び赤外顕微鏡フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)は(株)バイオラッドラボラトリーズ社製DIGILAB FTS-60及び(株)日本分光製Janssen MFT-2000を使用した．

4．試料調製及び異物検査

検査は，実験室内で容器内のミネラルウォーターが汚染されないよう，開栓前に目視により異物の有無を観察した．異物を発見し易くするため，まず容器のラベルをはがし，黒及び白のボードをバックに置き，容器の下方よりライトをあて容器を転倒しながら肉眼による観察を行った．ミネラルウォーター中に沈殿物又は浮遊物が検出された場合は，ピペットで細心の注意をはらいながら採取した．また，浮遊物又は沈殿物等が多量にある場合は，遠心分離後に異物を採取した．

採取した異物はその一部から観察用スライドを作製し，実体顕微鏡により検鏡して，細菌，真菌，植物，動物，鉱物又は合成樹脂等に大別した．その後，各異物に適する方法によって確認検査を行った．

今回の異物は，真菌，鉱物，合成樹脂であることが推察されたため，以下のように確認分析した．

真菌であると推察された異物は，PDA 培地に接種し，4～7日間培養した．増殖が認められたものについては，集落の性状を調べると共にその一部をかきとり，スライドグラス上でラクトフェノールコットンブルー液で染色後，胞子形態等の微細構造を検鏡した．

鉱物性であると推察された異物は，塩酸(塩酸0.05 ml に水を加えて100ml とする)に溶解し，ICP 及びAAS により分析した．さらに，異物を減圧下で乾燥後，臭化カリウム錠剤法(KBr 法)によりIR 測定し，さらに炎色反応及び化学反応等による定性試験を行った．

合成樹脂であると推察された異物は，KBr 板又はダイヤモンドセルにはさみIR 測定又はそのまま赤外顕微鏡FTIR で測定し，赤外吸収スペクトルによる鑑別を行った．

結果及び考察

1．異物混入事件の発端となった事例の調査

緒言で述べたような経過をたどり，平成7年9月12日ニュージーランド産のミネラルウォーターであるNATURAL SPRING WATER が福生保健所より7検体，立川保健所より14検体がそれぞれ当支所に搬入された．合計21検体について異物検査を行ったところ，福生保健所からの1検体(表1)及び立川保健所からの1検体(表2)の合計2検体より白色の浮遊物(写真1)が検出された．これら白色の浮遊物を直接検鏡した結果，いずれも真菌であり，前者は褐色の菌糸塊(写真2)，後者は白色の菌糸塊(写真3)であることが確認された．これらを培養したところ，前者は黒色(写真4)，後者は緑色(写真5)のコロニーを形成した．これらコロニーの一部をかきとり，染色，検鏡した結果，前者は *Cladosporium sphaerospermum*(写真6)，後者は*Penicillium* sp.（写真7）と同定された．

これらの真菌が検出された製品は，いずれも食品衛生法第7条2項違反として処理された．

表1．福生市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーター（NATURAL SPRING WATER）の異物検査結果

No.	製造年月日	結果	備考
1	1995.5.15	(−)	
2	1995.5.16	(−)	
3	1995.5.17	白色浮遊物 真菌(*Cladosprium sphaerospermum*)	
4	1995.5.25	(−)	
5	1995.5.26	(−)	
6	1995.5.31	(−)	
7	1995.6.1	(−)	

表2．立川市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーター（NATURAL SPRING WATER）の異物検査結果

No.	製造年月日	結果	備考
1	1995.6.9	(−)	
2	1995.6.10	(−)	
3	1995.6.12	(−)	
4	1995.6.26	(−)	
5	1995.6.27	白色浮遊物 真菌（*Penicillium* sp.）	
6	1995.6.28	(−)	
7	1995.6.29	(−)	
8	1995.6.30	(−)	
9	1995.7.1	(−)	
10	1995.7.3	(−)	
11	1995.7.4	(−)	
12	1995.7.5	(−)	
13	1995.7.6	(−)	
14	1995.7.7	(−)	

2．多摩地区保健所に苦情品として持ち込まれたミネラルウォーターの検査結果

ニュージーランド産ミネラルウォーターに真菌が混入されたとして報道され，消費者の間でミネラルウォーターの異物に対する関心が高まった．その結果，消費者が保有しているミネラルウォーターにも異物が入っているという情報が多摩地区保健所に相次いで寄せられた．これら異物混入ミネラルウォーターは苦情品として各保健所を経由して，当支所に検査のため6検体が搬入された．その内訳は，スイス産1検体，ベルギー産2検体(いずれも同一銘柄品)，国内産3検体(いずれも同一銘柄品)であった．検査の結果，表3に示す通り，スイス産1検体及びベルギー産2検体より白色の浮遊物が検出された．また，国内産のものからも白色及び黒色の浮遊物が検出され，異物混入ミネラルウォーターは輸入品のみにとどまらず，国内品の中にもあることが明らかとなった．これらの検査結果について以下に詳細に報告する．

1）輸入ミネラルウォーター

スイス産の1検体及びベルギー産の2検体中の白色浮遊物は各々遠心分離して集め，塩酸(0.05→100)に溶解しICP(波長317.9nm)及びAASで分析の結果，スイス産のものからはカルシウムが360,000 μg/g (36%)，ベルギー産のものからはそれぞれ380,000 μg/g (38%)が検出された．また，これらの浮遊物は炎色反応で黄赤色，塩酸酸性溶液中でシュウ酸アンモニウム溶液(1+30)を加えた時に白色の沈殿物が生じたため，これらの浮遊物の成分はカルシウムであることが示唆された[4]．また，酢酸(1+3)を加えた時に泡だって溶解した[5]．さらに，IRでKBr法により測定した結果，図1に示したように1450～1410cm^{-1}及び880～860cm^{-1}に吸収が認められたことから，炭酸塩の存在が示唆された[6]．以上の検査結果から，本浮遊物は炭酸カルシウム($CaCO_3$)を主成分とする結晶であることが分かった．本浮遊物は炭酸カルシウムに換算すると各々90及び95%であった．さらに，浮遊物の総重量はベルギー産のもので1本当たり(500ml)各々約2.5，3.6mgであったが，スイス産のものはこの数倍は含まれていたと推察する．スイス産及びベルギー産から検出された浮遊物の顕微鏡写真8及び9に示すように，炭酸カルシウムであっても両者の結晶型は異なっていた．これは結晶の析出する条件によって結晶型が異なることを示唆しており，結晶型の観察のみで結晶成分を同定することは困難であると考える．なお，これらの白色浮遊物が検出されたミネラルウォーターをろ過し，そのろ液のカルシウム含量について分析したところ，ベルギー産の2検体は70及び63mg/L，多量の白色浮遊物が検出されたスイス産から450mg/L検出された．このように市販のミネラルウォーターの中にはかなり高濃度のカルシウムを含む硬度の高いものもあった．本来，炭酸カルシウムは水に難溶性の物質であるが，二酸化炭素を多量に含む水中では，炭酸水素カルシウム($Ca(HCO_3)_2$)となって溶解度は高まる．しかし，保存条件によっては，キャップと容器の間から二酸化炭素がぬけ，炭酸水素カルシウムは水に難溶な炭酸カルシウムとなり白色の結晶として沈殿析出すると考えられる．従って，硬度の高いミネラルウォーターは冷蔵庫中での長期の保存，冷凍保存，温度差のある場所での保存，二酸化炭素の抜け易い容器での保存でこのような沈殿物や浮遊物が生ずるおそ

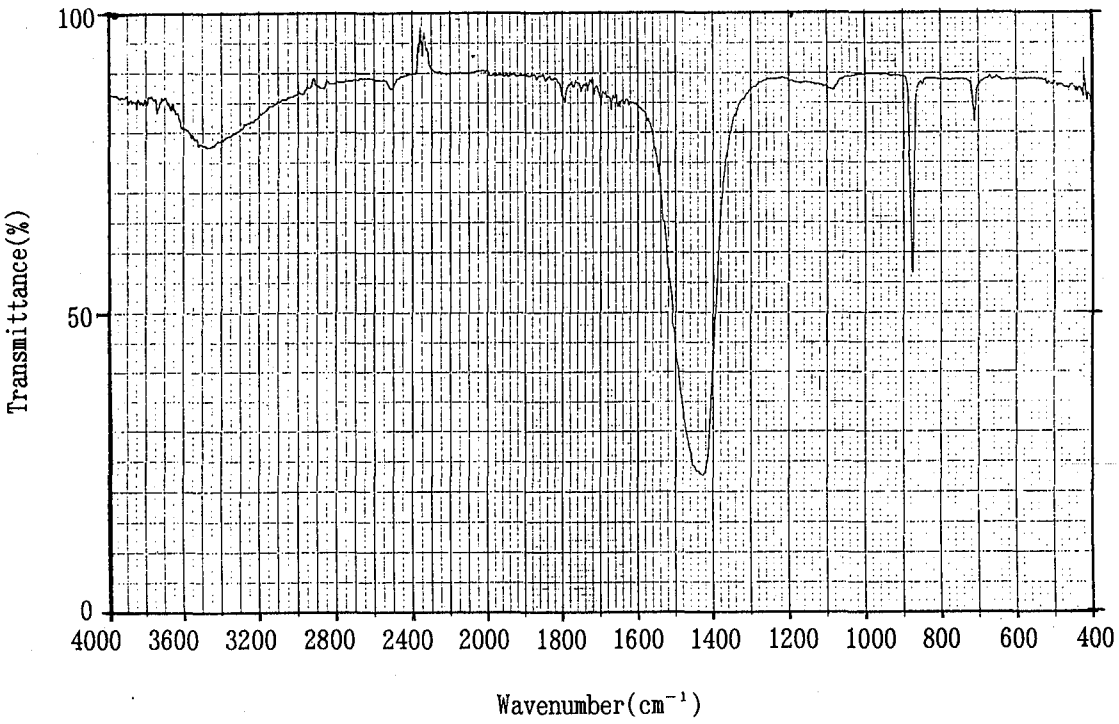


図1．スイス産ミネラルウォーター中から検出された白色浮遊物の赤外吸収スペクトル

れがある．

今回特に多量の浮遊物が検出されたスイス産のミネラルウォーターは，厚生省の見解で食品衛生法第7条2項違反となった．

2）国内産ミネラルウォーター

調布市内の消費者より，平成7年4月に岡山産のミネラルウォーターを72本購入した内の16本に「異物があるが大丈夫か」という情報が寄せられ，その内の2本が武蔵調布保健所より当支所に搬入された．検査の結果，岡山産のミネラルウォーター2本のうちの1本より白色の浮遊物が，もう一方より黒色の浮遊物が検出された．検査の結果，いずれも真菌であり，表3に示したように平成7年1月30日製造のものから黒色及び白色の浮遊物が検出された．黒色浮遊物の菌種は*Cladosporium sphaerospermum*であったが，白色浮遊物については胞子形成が認められなかったため，長期にわたる培養後も菌種を特定できなかった．

なお，平成7年7月11日製造のものが他の保健所から搬入されたが，これからは異物は検出されなかった．

3．多摩地区における市販ミネラルウォーターの調査

国内品及び輸入品のミネラルウォーターから真菌や鉱物性(炭酸カルシウム)の異物が検出されたことから，多摩地区では食品機動監視班多摩3班による緊急監視等が行われ，国内品20銘柄28検体及び輸入品10銘柄16検体，合計30銘柄44検体が収去され当支所に搬入された．

検査の結果は表4に示した通り，国内品28検体全てから異物は検出されなかった．

輸入品ではニュージーランド産のKIWI BLUE 2検体より，白色の浮遊物が検出された．イタリア産のガラス容器入りのS. Bernardo 1検体より白色または淡緑色の不

表3．苦情品（異物）として多摩地区保健所に持ち込まれたミネラルウォーターの異物検査結果

No.	試　料	原産国	製造年月日	結　果	備　考
1	ナチュラルミネラルウォーター(A社)	スイス	1994.3.18	白色浮遊物	炭酸カルシウム
2	ナチュラルミネラルウォーター(B社)	ベルギー	1994.9.9	白色浮遊物	炭酸カルシウム
3	ナチュラルミネラルウォーター(B社)	ベルギー	1994.9.9	白色浮遊物	炭酸カルシウム
4	ミネラルウォーター(C社)	日　本	1995.1.30	白色浮遊物	真菌(菌種不明)
5	ミネラルウォーター(C社)	日　本	1995.1.30	黒色浮遊物	真菌(*Cladosporium sphaerospermum*)
6	ミネラルウォーター(C社)	日　本	1995.7.11	(−)	

表4．市販品の調査

試　料	銘　柄	検体数	検出件数	結　　果		原　産　国
国内品	20	28	0			
輸入品	10	16	5	白色浮遊物	真菌（*Penicillium* sp.）	ニュージーランド
				白色浮遊物	真菌（*Penicillium* sp.）	ニュージーランド
				淡緑色沈殿物	合成樹脂（メタクリル樹脂様）	イタリア
				白色浮遊物	合成樹脂（ポリエチレン樹脂）	イタリア
				黒色沈殿物	合成樹脂（ニトリルブタジエンゴム）	フランス
合　計	30	44	5			

定形な薄片状の沈殿物が数個検出され，これと同一銘柄のペット容器入りのもの1検体からも不定形な白色浮遊物が1個検出された．さらに，フランス産のPerrierから黒色の沈殿物が1個検出された．これらの結果について以下に詳細に報告する．

1）ニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された異物

白色の浮遊物は真菌であり，いずれも*Penicillium* sp.の菌糸塊であった．なお，上述したニュージーランド産のものとは異なった銘柄であった．

2）イタリア産ミネラルウォーターから検出された異物

ガラス容器入りのものから検出された数個の白色又は淡緑色で不定形な薄片状の沈殿物は，最大のものは約2㎜四方であり，アセトン等の有機溶剤に可溶であった．この沈殿物は赤外顕微鏡FTIRにより測定したところ，図2に示した赤外吸収スペクトルが得られ，カルボキシル基の-C=Oに由来する1720cm^{-1}付近及びC-Oに由来する1,100～1,250cm^{-1}付近に吸収が得られ，メタクリル樹脂と非常に類似したスペクトルであった[7]．そこで，アルミニウム製のキャップの表面塗装，内側のパッキン及びラベルをIR測定したところ，キャップの内側のパッキンは赤外吸収スペクトルよりポリエチレン樹脂製であることが分かった[8]．また，アルミニウム製キャップ表面の塗装，ラベルのIRスペクトルは，異物のものと異なっていた．この結果で検出された異物の由来を明らかにすることはできなかった．

ペット容器入りのものから1個検出された不定形な白色浮遊物は，約1㎜四方であった．これをIRで測定した結果，図3に示した赤外吸収スペクトルが得られ，$-CH_2-$に由来する1460，730，720cm^{-1}に吸収が得られ，ポリエチレン樹脂であることが分かった[8]．なお，容器本体およびキャップについてもIR分析したところ，赤

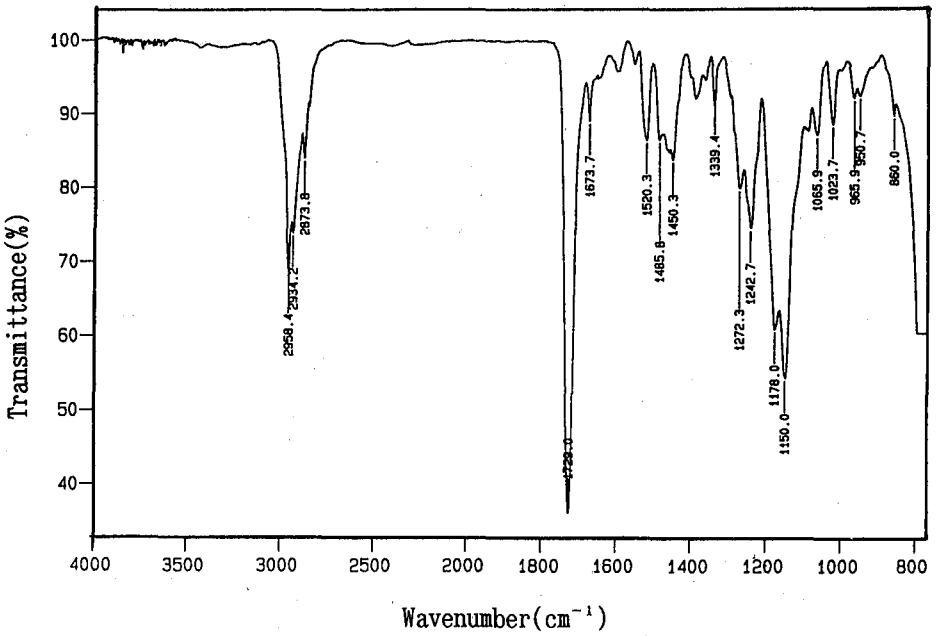


図2．イタリア産ミネラルウォーター（ガラス容器入り）中から検出された沈殿物の赤外吸収スペクトル

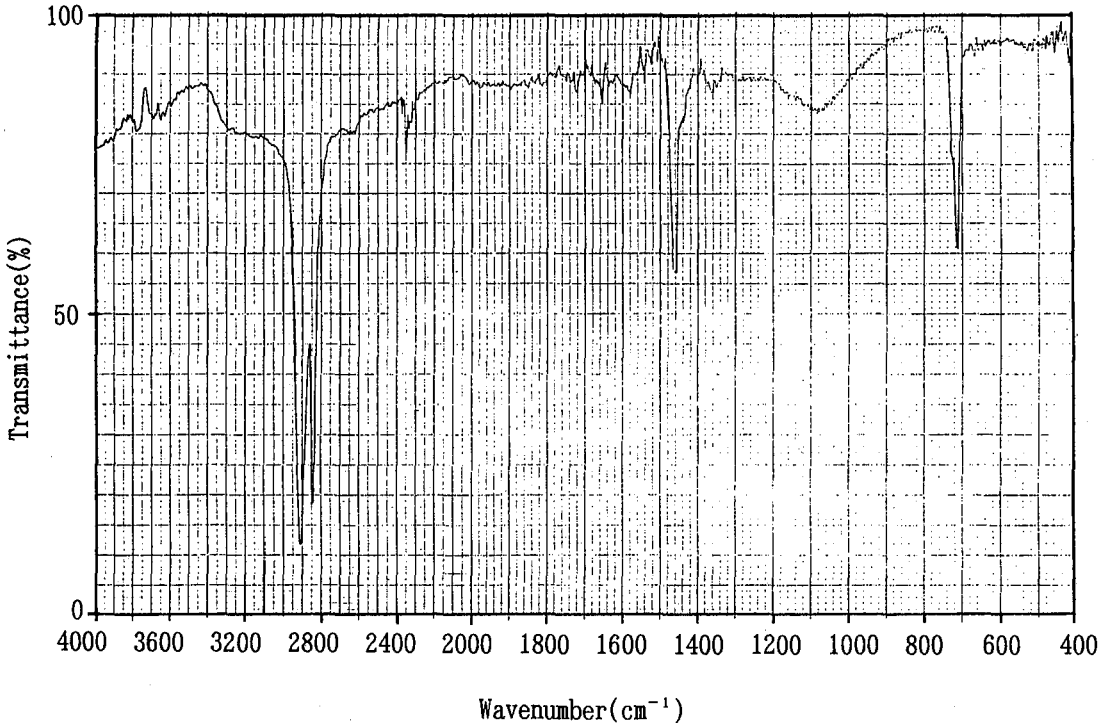


図3．イタリア産ミネラルウォーター（ペット容器入り）中から検出された浮遊物の赤外吸収スペクトル

外吸収スペクトルより各々ポリエチレンテレフタレート[9]，ポリエチレン樹脂[8]であった．したがって，本品中から検出された異物はキャップの一部がミネラルウォーター中に混入したものと考える．

3）フランス産ミネラルウォーターから検出された異物

本品から1個検出された黒色沈殿物の形状は横1.2㎜，縦0.3～0.4㎜の薄片状で，実体顕微鏡による観察で弾力のあるものであった．また，色調が黒いことから光を透過しない材質と考えられたため，ダイヤモンドセルを用いて試料をできるだけ薄く圧延し，赤外顕微鏡FTIRによる測定を行った．しかし，この方法では測定できなかった．そこで，光を透過しない物質の表面を測定するATR (attenuated total reflection) 法を用いた赤外顕微鏡FTIRによる測定を行ったところ，図4に示す赤外吸収スペクトルが得られた．ニトリル基(-CN)に由来する2238nm^{-1}及び赤外吸収スペクトルからニトリルブタジエンゴムであることが分かった[10]．このミネラルウォーターはガラス容器入りであり，キャップ表面の塗

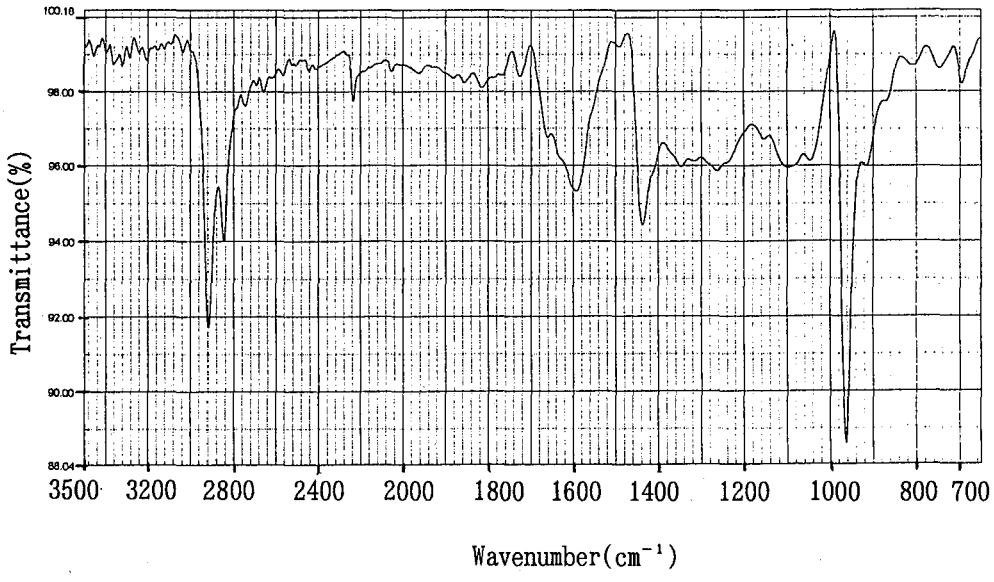


図4．フランス産ミネラルウォーター（ガラス容器入り）中から検出された沈殿物の赤外吸収スペクトル

装及び内側のパッキンの赤外吸収スペクトルと異物のものとは異なっていた．ニトリルブタジエンゴムはホース，パッキング，タイヤチューブ等に広く使用されていることから[11]，ミネラルウォーター製造工程中に使用された機器の一部が脱落して，製品中に混入したことが考えられるが，真の混入経路は不明である．

これらの異物が検出されたものについては，食品衛生法第7条2項の規格基準違反として処理された．

4．多摩地区で製造されたミネラルウォーターの調査

平成7年10月多摩地区にある2カ所の大手清涼飲料水製造工場で製造されたミネラルウォーター各々5及び3検体，合計8検体について異物混入の検査を行った．その結果，いずれからも異物は検出されなかった．今回の調査で真菌が検出されたミネラルウォーターは，メンブランフィルター等のろ過により除菌されたものであったが，これら2工場で製造されたミネラルウォーターは，いずれも容器に封入された後，加熱殺菌されたもであった．したがって，微生物による汚染はほとんどないものと考える．

ま と め

1）武蔵野市内のスーパーマーケットで購入したミネラルウォーターについて，消費者の苦情により調査した在庫品のニュージーランド産2検体，多摩地区保健所に苦情品として持ち込まれた国内産2検体，食品機動監視班による緊急監視で収去された市販ニュージーランド産2検体の合計6検体中に真菌の菌糸塊が存在した．今回，国内品，輸入品を問わず真菌の菌塊が検出されたミネラルウォーターは，いずれも涌き水等をメンブランフィルター等でろ過して容器に封入し，加熱殺菌していないものであった．したがって，真菌が混入した原因は，原料水，容器，製造，保管等に衛生管理上の問題があったと考えられる．特に容器封入時の細菌による汚染を極力抑えなければならないことを，改めて知らしめたと言えよう．

2）容器，キャップの裏蓋の一部が削り落ちたもの，あるいは製造工程中に製造機器の一部が落下したものと考えられる等の合成樹脂類の混入した例が，イタリア産2検体，フランス産1検体の合計3検体より検出された．これらは製品出荷時に厳重な製品チェックがなされていなかったと考えられる．

3）鉱物性の異物として大量の炭酸カルシウムが検出されたスイス産のミネラルウォーターは，原料水にカルシウム含量が高く，これらが保存中の温度変化等により結晶化したものと考えられる．したがって，カルシウム含量が高いミネラルウォーターは冷凍したり，急激な温度変化，長期間の保存等は避けることが必要である．

4）ミネラルウォーターから検出された真菌は，病原性はなく，水等の環境中に常在するもので，摂取してもすぐに健康を損なうものではなかった．また，検出された合成樹脂類は食品の容器等にも使用されているものであり，これらもすぐに健康上問題が起こることはないと考えられる．

文　献

1）サントリー(株)：食の化学，**212**，88-94，1995.
2）藤田正憲：食品と開発，**31**，10-13，1996.
3）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8年度版食品衛生小六法，p192－193，1995，新日本法規出版，東京.
4）石館守三，鈴木郁生，谷村顕雄監修：第六版食品添加物公定書解説書，B-101－102，1992，広川書店，東京.
5）石館守三，鈴木郁生，谷村顕雄監修：同上，D-713－714，1992，広川書店，東京.
6）堀口　博：赤外吸収図説総覧　有機化学の基礎と実際，p168－169，1977，三共出版，東京.
7）藤井正美，山本清史，蔵本幸夫，他：総説食品用プラスチック－その種類，その見分け方－，p183-185，1988，日本食品衛生協会，東京.
8）藤井正美，山本清史，蔵本幸夫，他：同上，p161-163，1988，日本食品衛生協会，東京.
9）藤井正美，山本清史，蔵本幸夫，他：同上，p190-192，1988，日本食品衛生協会，東京.
10）渡辺悠二，金子令子：**46**，147－153東京衛研年報(1995)
11）12394の化学商品，p983-984，1994，化学工業日報社，東京.

写真１．福生市内の倉庫から収去された異物混入ニュージーランド産ミネラルウォーター
矢印：白色浮遊物

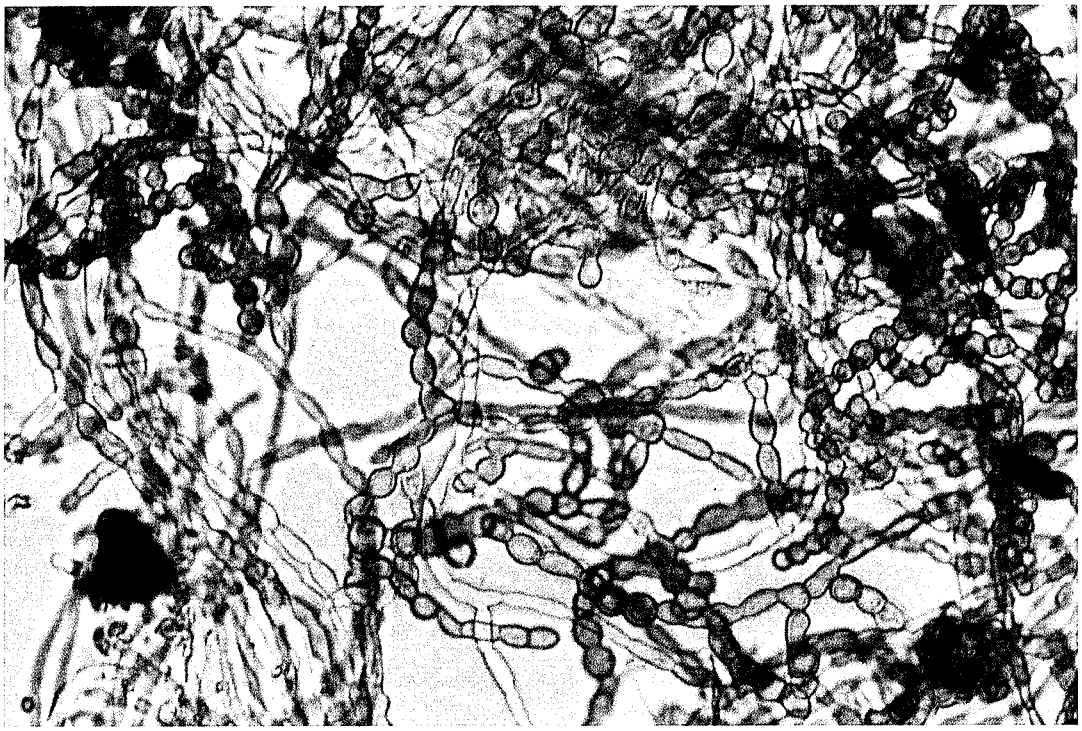


写真２．福生市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Cladosporium sphaerospermum*）の顕微鏡写真（x400）

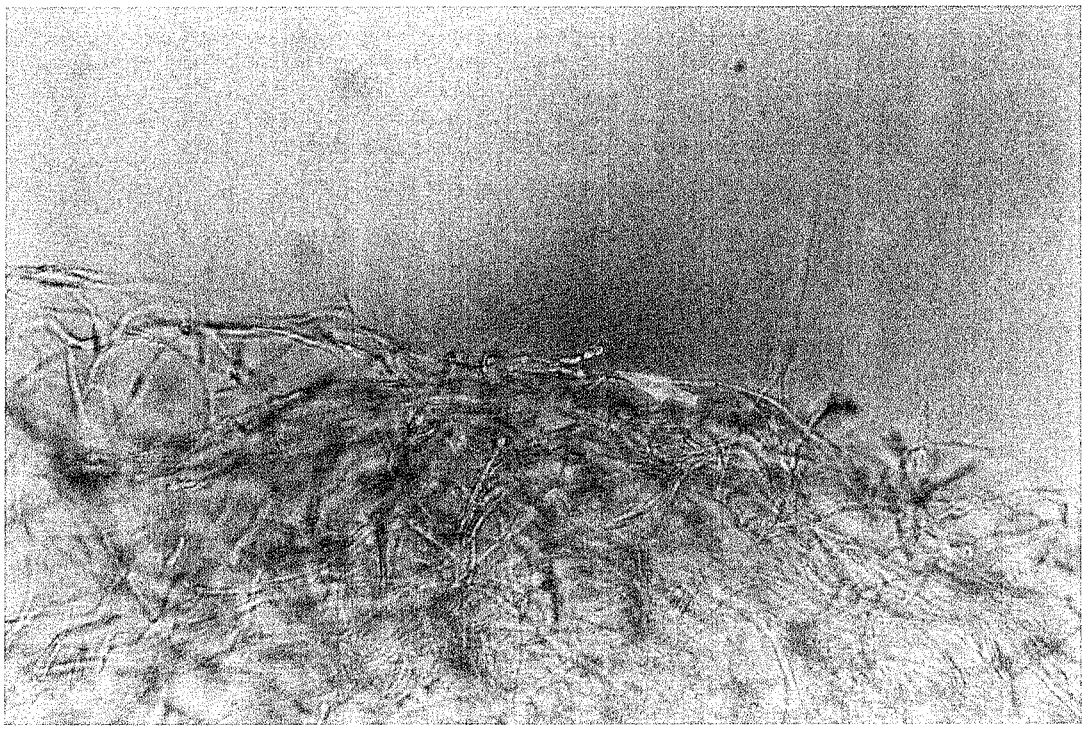


写真３．立川市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Penicillium* sp.）の顕微鏡写真（x400）

写真4．福生市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Cladosporium sphaerospermum*, PDA 培地）

写真5．立川市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Penicillium* sp., PDA 培地）

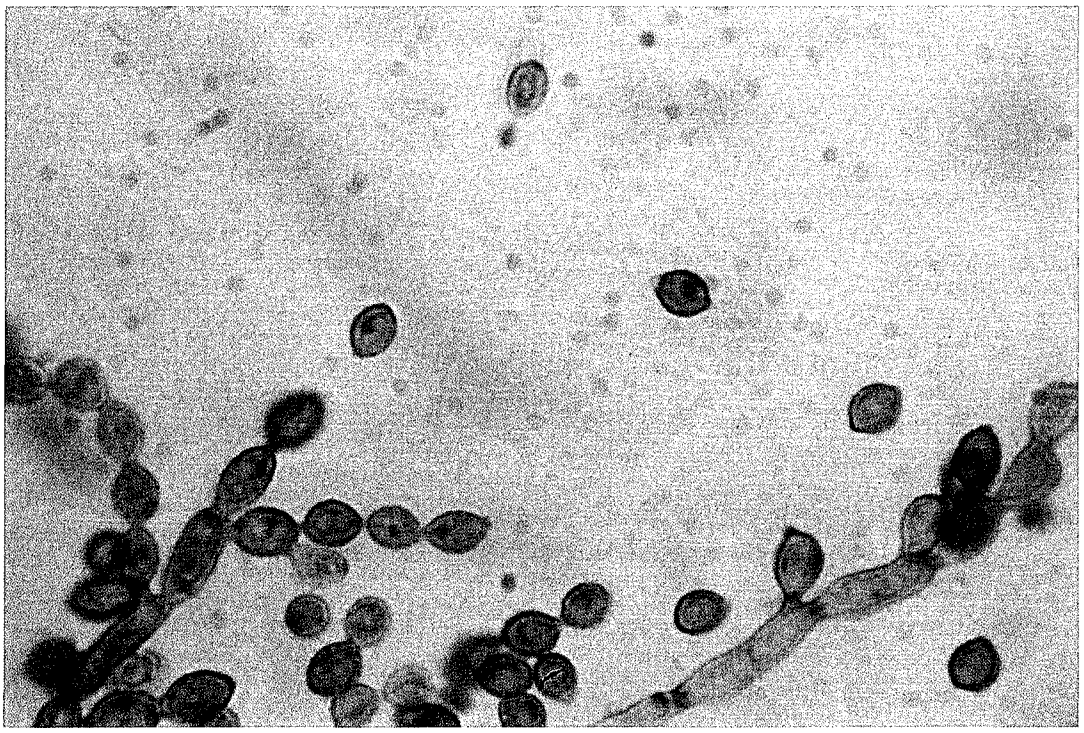


写真６．福生市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Cladosporium sphaerospermum*）の顕微鏡写真（x600，ラクトフェノールコットンブルー液で染色）

写真７．立川市内の倉庫から収去されたニュージーランド産ミネラルウォーターから検出された真菌（*Penicillium* sp.）の顕微鏡写真（x600，ラクトフェノールコットンブルー液で染色）

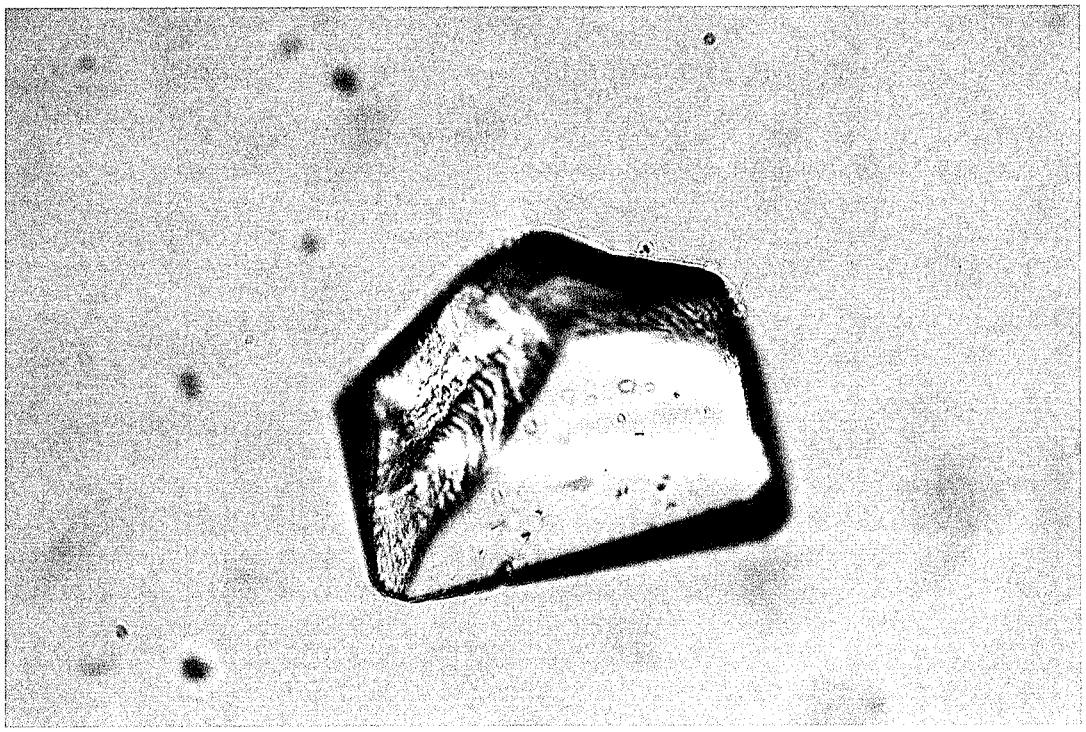


写真８．ベルギー産ミネラルウォーターから検出された白色浮遊物の顕微鏡写真（x400）

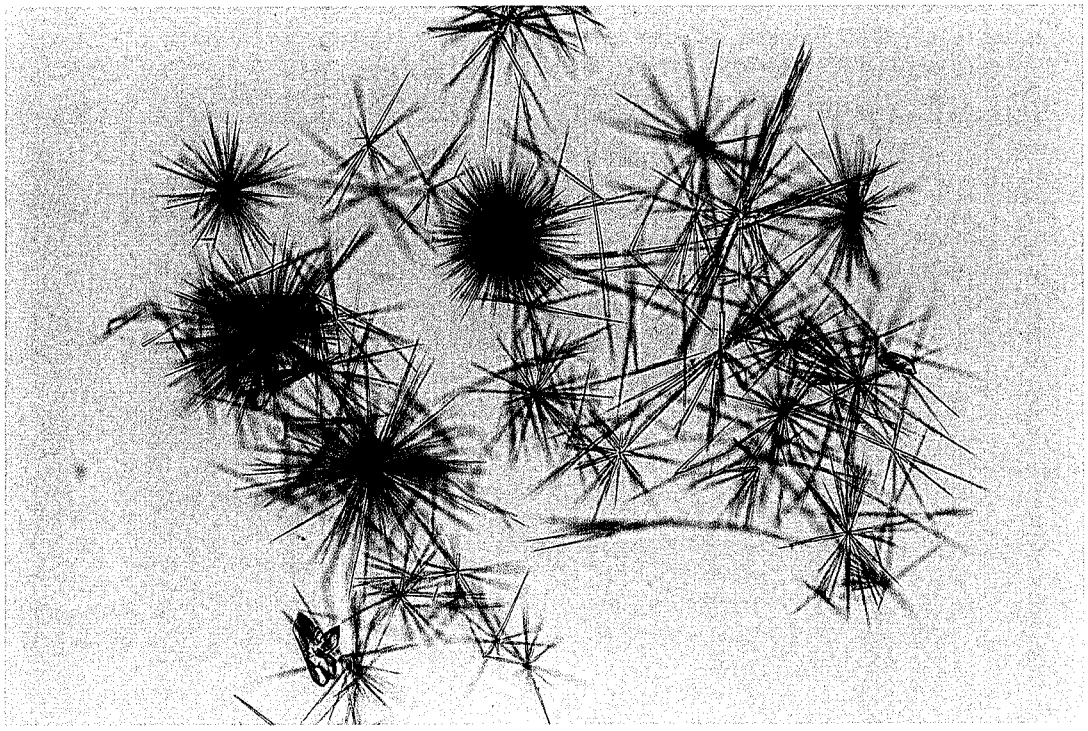


写真９．スイス産ミネラルウォーターから検出された白色浮遊物の顕微鏡写真（x400）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 127-133, 1996

バイオテクノロジー応用食品の安全性について
ーヤマメ及びニジマスー

新藤　哲也*, 冠　政光*, 観　公子*, 橋本　秀樹**,
真木　俊夫***, 友松　俊夫*

Safety of Foods Produced by Biotechnology
-Yamame and Nijimasu-

TETSUYA SHINDO*, MASAMITSU KANMURI*, KIMIKO KAN*, HIDEKI HASHIMOTO**,
TOSHIO MAKI*** and TOSHIO TOMOMATSU*

Animal experiments using mice, mutagenicity tests, D-amino acid analysis and 2D-electrophoresis were carried out to examine the safety of Yamame and Nijimasu produced by biotechnology.

The results of animal experiments and mutagenicity tests indicated that triploid Yamame and Nijimasu produced by biotechnology were the same as those of the common diploid.

And no significant difference between those of the di- and triploid on 14 kinds of D-amino acid content and 2D-electrophoresis patterns was detected.

These results suggested that triploid Yamame and Nijimasu were safe in these tests.

Keywords：バイオテクノロジー食品 biotechnology foods, 三倍体 triploid, ヤマメ *Oncorhynchus masou*, ニジマス *Salmo gairdnerii irideus*, マウス mice, 変異原 mutagen, アミノ酸 amino acid, 電気泳動 electrophoresis

緒　言

近年，バイオテクノロジーの進歩は著しく，食品分野においても魚介類や野菜など様々なバイオテクノロジー応用食品が作り出されている．これに伴い，厚生省から組換えDNA技術応用食品等の安全性評価に関する報告が提出されており[1]，これらの食品の安全性を的確に評価するための方法を確立することが強く求められている．

これらのバイオテクノロジー応用食品の中で魚介類では受精後の極体に温度，圧力及び薬品処理をすることにより，体重約1.5倍の三倍体の大型個体が生産されることが知られている[2]．このバイオテクノロジーを応用して生産された三倍体においては脂質に関する研究[3]，貯蔵性に関する研究[4]及び成長・生残および生殖周期に関する研究[5]等が報告されているが，三倍体を食品の安全性という立場から検討した例はほとんどみられない．

一方，安全性を考える上で毒性試験を行うことは極めて重要であり，一般に急性毒性試験，亜急性毒性試験，慢性毒性試験，生殖試験，変異原性試験及び癌原性試験等がよく用いられる[6]．

また，タンパク質の構成成分であるアミノ酸は天然にはL型が多いが，最近の研究例では同じ水産生物である軟体動物のうちミルクイ及びウバガイ等の斧足類においてD型アミノ酸を多く含むという報告があり[7]，ヒトにおいても老化や病気によりタンパク質中のD型アミノ酸の割合が増加することが知られている[8]，通常の二倍体は生存期間が約2年であるのに対して三倍体は約5年であるため，D型アミノ酸が増加することも考えられる．

そこで，バイオテクノロジーを応用して生産された三倍体と通常の二倍体におけるマウスを用いた急性毒性試験，細菌を用いた復帰変異試験，D型アミノ酸含量の測

*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

定及び電気泳動によるタンパク質の泳動パターンを調べ，両者の間に違いがあるかどうかについて比較検討したので報告する．

実験方法

1．試　料

試料はヤマメ（*Oncorhynchus masou*）及びニジマス（*Salmo gairdnerii irideus*）を用いた．

1）ヤマメ

通常の二倍体及びバイオテクノロジーにより生産された三倍体は，東京都水産試験場より入手した．

二倍体は飼育1年目，飼育2年目の雄及び雌，計8検体を用いた．

三倍体は飼育2年目の雄及び雌，飼育3年目の雌，飼育4年目の雌及び飼育5年目の雌，計9検体を用いた．

2）ニジマス

二倍体及び三倍体ともに山梨県及び長野県の養殖場より入手したものそれぞれ2検体を用いた．

2．試薬及び菌株

1）変異原性

菌株：*Salmonella typhimurium* TA98及びTA100

S9mix：フェノバルビタール，5,6-ベンゾフラボンにより誘導（オリエンタル酵母コーポレーション社製）

最少グルコース寒天培地：テスメディアAN（和光純薬（株）製）

標準変異原物質：4-ニトロキノリン-N-オキシド（4NQO）及び2-アミノアントラセン（2AA）（オリエンタル酵母コーポレーション社製）

2）タンパク質

DNase：DNase Ⅰ（宝酒造（株）製）

RNase：RNase（DNase free）（和光純薬工業（株）製）

染色試薬：2D-銀染色試薬・Ⅱ（第一化学薬品（株）製）

3）アミノ酸

エステル化試薬：20%（v/v）塩化アセチル/1-プロパノール

アシル化試薬：トリフルオロ酢酸無水物・トリフルオロ酢酸エチル（1:1）

アミノ酸標準品：アラニン（Ala），バリン（Val），ロイシン（Leu），イソロイシン（Ile），グルタミン酸（Glu），アスパラギン酸（Asp），リジン（Lys），アルギニン（Arg），セリン（Ser），スレオニン（Thr），フェニルアラニン（Phe），チロシン（Tyr），メチオニン（Met），プロリン（Pro）

3．装　置

等電点電気泳動装置：MILLIPORE社製P/N BS1124

SDS－PAGE電気泳動装置：MILLIPORE社製P/N BS1134

全自動アミノ酸分析装置：日立製作所製L-8500

自動誘導体化装置付ガスクロマトグラフ：（株）島津製作所製DLAA-1

4．動物試験

筋肉部位の均質化試料100 g をメタノールで抽出した後，抽出液中のメタノールを揮散除去した．濃縮液を蒸留水で10ml とした後，体重約20 g のddy系雄のマウスに1 ml（マウス体重1 kg当たり試料500 g 相当量）を経口投与し，24時間観察した[9]．

5．変異原性試験[10]

試料は動物試験に用いたものと同様の抽出液を用いてS9mix を添加した場合及び添加しなかった場合についてプレインキュベーション法[11]により行った．試験溶液0.4 g /plate（最高濃度2 g /plate），標準変異原物質溶液及び溶媒（蒸留水及びDMSO）をそれぞれ100 μl，S9mixまたは0.1M-リン酸ナトリウム緩衝液を0.5ml 及び菌懸濁液0.1ml を混合し，37℃で20分間振とうし，軟寒天2 mlを加えて素早く混合した後，最少グルコース寒天培地に流し込み，37℃で48時間培養し，復帰変異コロニー数を計測した．

6．タンパク質分析

1）タンパク質の抽出

筋肉部位の均質化試料を液体窒素で脱水し，乳鉢で細粒化した後，100℃で5分間加熱変性させた．冷却後，DNase及びRNaseと反応させ，15,000RPM で10分間遠心分離した後，上澄液に50%トリクロロ酢酸を加えてタンパク質を沈澱させ，95%アセトンで洗浄した後，電気泳動用の試料とした．

2）2次元電気泳動[12]

タンパク質をスレッドチューブ（1 mmφ，長さ26cm）に作製した等電点ゲル上に注入し，0.1M-NaOH－0.1Mリン酸をバッファーとして1000V の定電圧で17.5時間等電点電気泳動を行った．泳動後のゲルをSDS により平衡化した後，ゲルをスラブゲル（10%アクリルアミドゲル22cm×23cm）上に接触させ，SDS-PAGE により80W の定電力で4.5時間2次元目の泳動を行った．

3）銀染色

泳動終了後のゲルは銀染色試薬キットの使用法に従って染色を行った．

7．アミノ酸分析

D型アミノ酸の測定値はL型アミノ酸との比率で求め，全アミノ酸含量の測定を別に行った．

1）全アミノ酸含量の測定

試料を凍結乾燥した後，粉砕し，そのうちの10mgをとり，6 N-HCl 10ml を加えて減圧封管下で110℃，24時間加水分解を行い，アミノ酸を抽出した[13]，濃縮後，0.2N-HCl 5 ml に溶解し，メンブランフィルター(0.45 μm)でろ過した後，アミノ酸全自動分析装置により高分離モードで測定を行った．

2）D型アミノ酸の測定

抽出は全アミノ酸含量の測定と同様に行い，自動誘導体化装置付ガスクロマトグラフを用いて以下の条件により測定を行った．

カラム：Chirasil/Val 0.29mm id×20m，カラム温度：65℃～115℃～195℃(2段階昇温)，キャリヤーガス：水素，ガス圧：0.6kg/cm²，注入量：1 μl，注入口温度：210℃，検出器：FID，検出器温度：240℃

8．統計処理

二倍体及び三倍体における全アミノ酸含量の比較を行うため，両者間での平均値の差(t値)及び分散比F値の有意水準5％における両側検定を行った．

結果及び考察

1．動物試験

ヤマメの二倍体8検体及び三倍体9検体とニジマスの二倍体2検体及び三倍体2検体のすべての試料において24時間観察したが，マウスに異常は認められなかった．

一般に動物試験を行う場合，動物にどの程度の濃度を投与するのかということが問題になるが，今回試験に用いた抽出物はマウス体重1kg当たり500 g に相当する量であり，体重50kgのヒトに換算すると25kgのヤマメ及びニジマスの抽出物を摂取したことになる．これは通常の摂取量と比べても10倍を上回る量であり，試験を行うには充分な量であると思われる．

2．変異原性試験

ヤマメの変異原性試験の結果は，サンプル濃度が0.4 g /plate の場合についてTable 1 に示した．

TA98のS9mix を添加したものでは，二倍体のコロニー数は40～90，三倍体は30～60であり，S 9 mix を添加しなかったものでは，二倍体は20～60，三倍体は20～50であった．TA100ではS 9 mix を添加した場合も添加しなかった場合もほぼ同様であり，二倍体のコロニー数は140～190，三倍体は120～200であった．

これらの結果はいずれも溶媒対照群と比較して，3倍を下回っており，サンプル濃度を最高2 g /plate まで増加させたが，用量－反応関係はみられず，三倍体における変異原性は認められなかった．

ニジマスの変異原性試験の結果についてもヤマメの場合とほぼ同傾向であり，三倍体における変異原性は認められなかった．

3．タンパク質分析

タンパク質の2次元電気泳動の分析結果は，ヤマメの二倍体と三倍体の主な泳動パターンについてはそれぞれFig.1,2に，ニジマスの泳動パターンについてはそれぞれFig.3,4に示した．

ヤマメでは二倍体及び三倍体ともに低分子量の酸性側に数個の濃いスポットが検出され，それ以外にも中性付近に多数の薄いスポットが検出された．なお，二倍体8検体及び三倍体9検体のすべての試料においてタンパク質の電気泳動パターンにほとんど差異は認められなかった．

ニジマスでは二倍体及び三倍体ともにヤマメでみられた低分子量の酸性側と高分子量の塩基性側に濃いスポットが検出された．なお，ヤマメ同様に二倍体2検体及び

Table 1. Mutagenicity of di- and triploid Yamame, standard and control
(No. of revertants/plate on 0.4 g /plate)

	TA98		TA100	
	+S9	-S9	+S9	-S9
diploid Yamame	40～60	20～60	140～190	
triploid Yamame	30～60	20～50	120～200	
4NQO		170		510
2AA	1000		790	
distilled water	30～40	10～30	80～130	
DMSO	20～30	20～30	80～110	

三倍体2検体における泳動パターンにほとんど差はみられなかった.

このことは二倍体と三倍体でのタンパク質の構成成分がかなり類似していることが推察される. しかし, 今後このような試験において泳動パターンに違いが認められた場合には, タンパク質の分子量や等電点(pI値)を求め, それらを比較検討する必要があると考える.

4. アミノ酸分析

1) 全アミノ酸含量

ヤマメの全アミノ酸含量をTable 2に示した.

14種のアミノ酸のうち二倍体, 三倍体ともにグルタミン酸が最も多く, 二倍体では平均すると20.3mg/g, 三倍体では22.8mg/gであった. 次いで多かったのは二倍体, 三倍体ともリジン, アスパラギン酸及びロイシンであった.

二倍体と三倍体ではそれぞれややバラツキがあるもののほとんど差はなく, t値及び分散比F値の有意水準5%における両側検定を行った結果, 両者間での有意差は認められなかった.

ニジマスの全アミノ酸含量をTable 3に示した.

Table 2. Amino acid content in di- and triploid Yamame

(mg/g)

	old	sex	Ala	Val	Leu	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Ser	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro
	1year	unknown	9.4	8.2	13.0	7.0	20.3	11.6	14.0	9.3	6.2	7.1	6.6	5.6	5.0	4.7
	〃	〃	7.3	7.7	11.0	6.6	12.0	8.5	13.2	8.1	5.9	6.9	5.9	4.9	4.5	3.5
	2years	Male	10.7	9.3	14.2	8.0	16.6	12.6	16.6	11.0	7.3	8.1	7.5	6.4	6.1	5.9
diploid	〃	〃	8.3	6.5	10.7	5.4	20.9	13.7	12.3	8.0	5.8	6.1	5.4	4.6	4.7	4.9
	〃	Female	9.6	8.4	13.0	7.2	22.0	12.3	14.3	9.8	6.5	7.4	6.4	6.0	5.3	5.0
	〃	〃	9.1	9.1	13.9	7.9	16.5	10.4	15.6	10.3	7.3	8.0	7.2	5.9	5.7	4.7
	〃	〃	10.3	7.9	13.6	7.0	26.4	17.3	16.2	10.0	7.2	7.7	6.8	6.0	5.6	5.7
	〃	〃	10.8	8.1	14.1	7.1	27.6	18.1	16.2	10.7	7.5	8.1	6.8	6.3	5.8	6.2
	2years	Male	10.7	8.7	13.7	7.5	17.5	12.7	16.1	10.6	7.1	7.9	7.1	6.1	5.8	5.6
	〃	〃	9.9	7.9	13.2	6.7	25.8	16.7	15.1	9.9	7.2	7.5	6.5	5.6	5.1	6.2
	〃	Female	9.4	9.5	13.9	8.2	16.6	11.3	15.9	10.2	7.2	8.2	7.3	6.1	5.6	4.9
	〃	〃	11.6	9.7	15.6	8.3	28.5	20.1	18.2	11.3	8.3	8.9	7.9	7.0	6.4	6.7
triploid	〃	〃	10.6	8.9	14.4	7.7	26.2	18.5	17.3	10.4	7.6	8.2	7.5	6.4	6.0	6.1
	3years	〃	11.6	10.5	15.6	9.0	27.0	14.9	18.9	11.9	7.8	8.9	8.4	7.1	6.2	5.9
	4years	〃	10.0	9.0	14.0	7.6	24.0	13.4	15.5	10.0	6.9	7.9	7.0	6.3	5.6	5.4
	5years	〃	8.6	6.6	11.2	6.4	19.0	11.3	13.0	8.7	5.9	6.6	6.0	5.1	4.7	4.6
	〃	〃	11.1	11.5	16.6	10.1	20.4	12.3	19.5	12.5	8.7	10.1	8.3	7.4	6.7	6.1

Table 3. Amino acid content in di- and triploid Nijimasu

(mg/g)

		Ala	Val	Leu	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Ser	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro
diploid	Yamanashi	11.8	9.7	16.4	9.4	23.0	15.2	18.7	12.4	8.3	9.4	8.7	7.5	6.7	6.5
	Nagano	11.3	6.9	15.7	8.8	26.0	15.1	18.0	11.6	7.8	8.9	8.5	7.1	6.4	5.9
triploid	Yamanashi	8.3	8.3	12.0	7.0	17.6	10.9	13.6	8.9	5.9	6.9	6.4	5.4	4.8	4.5
	Nagano	11.6	7.4	16.1	9.5	24.7	15.2	18.5	12.0	7.9	9.1	8.7	7.4	6.5	6.1

ヤマメの場合と同様にグルタミン酸が最も多く，次いでリジン，アスパラギン酸及びロイシンが多かった．

ニジマスでは検体数が少なかったため，統計処理は行わなかったが，二倍体と三倍体ではほとんど差異はみられなかった．

2） D型アミノ酸

ヤマメの全アミノ酸含量に占めるD型アミノ酸の比率をTable 4 に示した．

二倍体及び三倍体ともにD型アミノ酸の比率はほとんどが1％未満であり，10％を超えるものはみられなかった．また，二倍体と三倍体の比率を比較したところ，ほとんど差異は認められなかった．

ニジマスのD型アミノ酸の比率をTable 5 に示した．ヤマメの場合と同様にD型アミノ酸の比率はほとんどが1％未満であり，3％を超えるものはなく，二倍体と三倍体との比率にも差異はほとんどみられなかった．

Table 4. Ratio of D-amino acid in di- and triploid Yamame

(% against each all amino acid)

	old	sex	Ala	Val	Leu	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Ser	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro
	1year	unknown	1*	9	1*	1*	1	5	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	〃	1*	3	1*	1*	1*	2	2	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*
	2years	Male	1	2	1	1*	1*	2	1*	1*	3*	1*	1*	1	1	1*
diploid	〃	〃	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	Female	1*	2	1*	1*	1*	2	2	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	〃	1*	1*	1*	1*	1*	1	1	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	〃	1*	1*	1	1*	2	1*	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	〃	1*	1*	1*	1*	1	2	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	2years	Male	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	〃	1*	1*	1	1*	1*	1*	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	〃	Female	1	1*	1*	1*	1*	1	1*	1*	3*	1*	1	1	1	1*
	〃	〃	1*	1*	1	1*	1	1	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
triploid	〃	〃	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1*	1*
	3years	〃	1*	1*	1*	1*	1*	2	1	1*	3*	1*	2	1*	2	1*
	4years	〃	1*	3	1*	1*	1*	3	3	1*	1*	1*	1*	1*	1*	1*
	5years	〃	1*	6	2	1*	1*	3	1*	1*	1*	1*	5	1*	1*	1*
	〃	〃	1	1	1*	1*	1	2	1*	1*	3*	1*	1*	1	1	1*

*less than 1%

Table 5. Ratio of D-amino acid in di- and triploid Nijimasu

(% against each all amino acid)

		Ala	Val	Leu	Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Ser	Thr	Phe	Tyr	Met	Pro
diploid	Yamanashi	1*	1	1*	1*	1*	1*	1*	1*	3*	1*	1*	1*	1	1*
	Nagano	1	1	1*	1*	1	2	1*	1*	3*	1*	2	1*	2	1*
triploid	Yamanashi	1	1	1*	1*	1	1	1*	1	3*	1*	1	1*	1	1*
	Nagano	2	1	1	1*	1*	1*	1*	1*	3*	1*	1	1	2	1*

*less than 1%

軟体動物におけるD型アミノ酸は筋肉収縮作用等の生理活性を有すると報告されており[7]，構成アミノ酸に占める割合は40～80％であるが，今回試験を行ったヤマメ及びニジマスでの比率は低く，軟体動物と魚類とでは生理的に異なるものと思われる．

また，ヒトでは60年間に歯のエナメル質タンパク中のアスパラギン酸の約８％がD型に変わるといわれているが[14]，ヤマメの三倍体では飼育２年目と飼育５年目との間にD型アミノ酸の増加は認められなかった．

ま と め

バイオテクノロジー応用食品であるヤマメ及びニジマスの三倍体の安全性について評価するため，マウスを用いた急性毒性試験，復帰変異試験，D型アミノ酸の測定及びタンパク質の電気泳動を行い，通常の二倍体と比較検討を行った．

1）試料をddy系雄のマウスに体重１kg当たり試料500 g相当量を経口投与し，24時間観察したところ，ヤマメ及びニジマスのいずれの場合も急性毒性は認められなかった．

2）*Salmonella typhimurium* TA98及びTA100の２種類の菌株を用いて，変異原性試験を行ったところ，ヤマメ及びニジマスのいずれも三倍体における変異原性は認められなかった．

3）抽出したタンパク質の電気泳動を行ったところ，ヤマメ及びニジマスのいずれにおいても二倍体と三倍体の電気泳動パターンにほとんど差異は認められなかった．

4）全アミノ酸含量とD型アミノ酸の比率を測定したところ，ヤマメ及びニジマスの全アミノ酸含量のうち二倍体及び三倍体ともにいずれもグルタミン酸が最も多く，次いでリジン，アスパラギン酸及びロイシンの順であった．D型アミノ酸の比率は二倍体及び三倍体ともにほとんどが１％未満であり，10％を超えるものはみられなかった．また，二倍体と三倍体における比率を比較したところ，ほとんど差異は認められなかった．

以上の結果から，ヤマメ及びニジマスの三倍体の急性毒性及び変異原性は認められず，タンパク質の泳動パターン及びアミノ酸組成も二倍体と類似していることから，三倍体の安全性について危惧を与える結果は得られなかった．

本試験は東京都食品環境指導センターとの協力により行ったものである．また，ヤマメの提供をして頂いた東京都水産試験場関係各位に深謝いたします．

文　献

1）食品衛生研究，**45**(12)，77-96，1995．
2）小林徹：ニジマスの全雌三倍体量産と実用化に向けての特性解明，滋賀県醒井養鱒場．
3）渡辺武彦，杉井麒三郎，斎藤洋昭，岡崎恵美子，山田充阿弥：東海区水産研究所研究報告，No.**126**，49-59，1988．
4）江平重男・丸岡淳：中央水産研究所報告，No.**2**，1-14，1991．
5）小林徹：水産増殖，**40**(1)，57-70，1992．
6）林裕造，大澤仲昭：安全性評価の基礎と実際，1990，地人書館．
7）井口恒夫：JAFAN，**15**，231-238，1996．
8）徳久幸子：女子栄養大学紀要，**25**，5-13，1994．
9）多田治：有害物質の毒性・危険性検査法，1975，講談社．
10）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1990，金原出版．
11）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178-1189，1975．
12）真鍋敬：タンパク質のゲル電気泳動法，1991，廣川書店．
13）科学技術庁資源調査会・資源調査所編：日本食品アミノ酸組成表，1986，大蔵省印刷局．
14）Helfman, P. M., and Bada, J. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 2891(1975)．

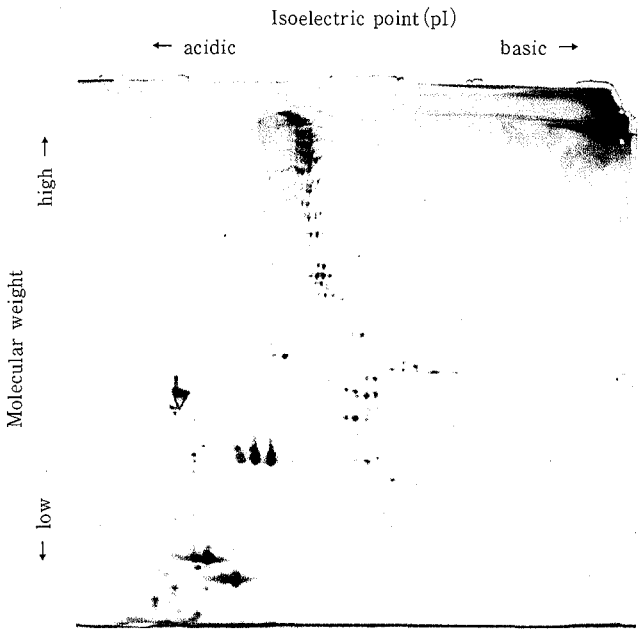


Fig. 1 2D-electrophoresis pattern of diploid Yamame

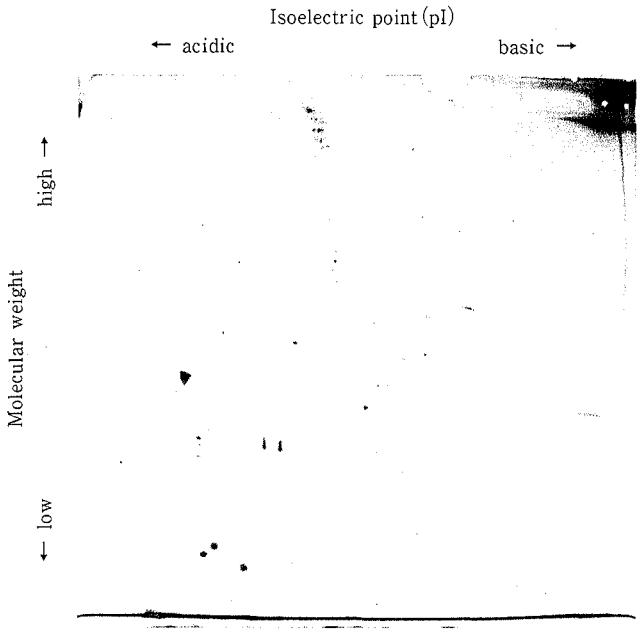


Fig. 2 2D-electrophoresis pattern of triploid Yamame

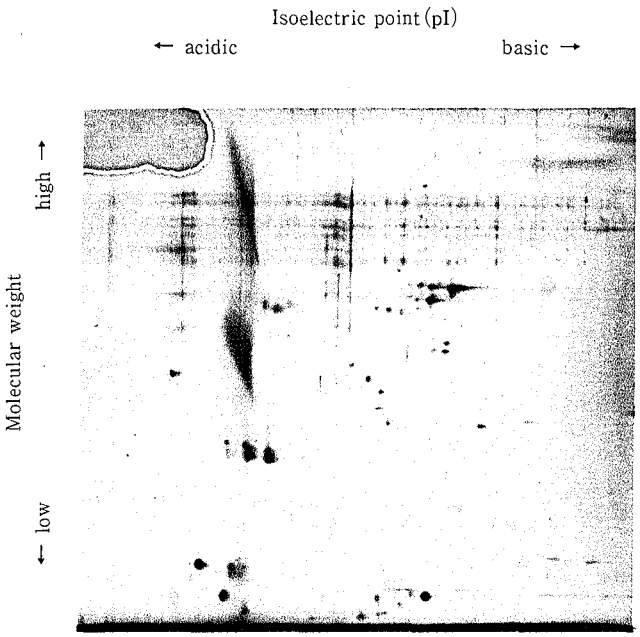


Fig. 3 2D-electrophoresis pattern of diploid Nijimasu

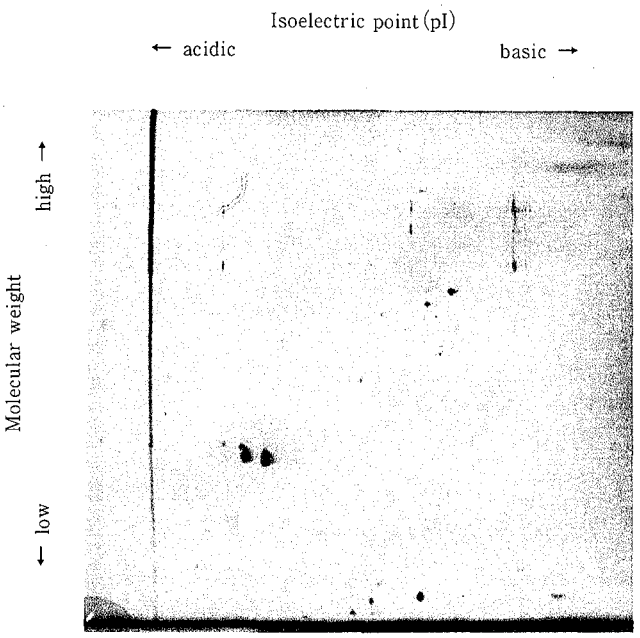


Fig. 4 2D-electrophoresis pattern of triploid Nijimasu

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 135-140, 1996

野菜・果実類中の残留農薬実態調査
— 平成7年度 —

小林　麻紀*, 永山　敏廣*, 橋本　常生*,
羽石奈穂子*, 伊藤　正子*, 田村　康宏*, 友松　俊夫*

Survey of Pesticide Residues in Vegetables and Fruits
-Apr. 1995～Mar. 1996-

MAKI KOBAYASHI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, TSUNEO HASHIMOTO*,
NAHOKO HANEISHI*, MASAKO ITO*, YASUHIRO TAMURA* and TOSHIO TOMOMATSU*

Pesticide residues in 30 kinds of vegetables and fruits and 20 kinds of organic cultivation crops or the like were investigated. In several kinds of crops. residues of 11 kinds of organophosphorus insecticides, 2 kinds of carbamate insecticide, 1 kind of organochlorine insecticide and 3 kinds of organochlorine fungicides were detected. Concentrations of organophosphorus insecticides (DDVP, Diazion, Dimethoate, DMTP, EPN, isoxathion, malathon, MEP, PAP, Prothiofos and sulprofos), carbamate insecticides (methomyl and carbaryl (NAC)) and organochlorine fungicides (iprodione, procymidone and TPN) were 0.01-1.4ppm in 11 kinds of crops, 0.03-0.70 ppm in 6 kinds of crops and 0.01ppm in 1 kind of crop, Tr-2.6ppm in 6 kinds of crops were found, respectively.

The levels of DDVP in chrysanthemum was higher than the tolerance for pesticide residues.

DMTP in chrysanthemum (relish), methomyl in young leaves of chinese cabbage and isoxathion and methomyl in lettuce were higher than the maximum limits in standards for withholding registration.

Residues of organochlorine fungicides (procymidone) and carbamate insecticides (oxamyl and methomyl) in 4 kinds of the like of organic cultivation crops were higher than the maximum limits in standards for withholding registration.

Residues of organochlorine fungicides (procymidone) and carbamate insecticides (oxamyl and methomyl) in 4 kinds of the like of organic cultivation crops were detected. Their concentrations were 0.04-0.21 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[1-15]，今回は平成7年度の残留農薬の調査結果を報告する．

また，近年，消費者の農作物に対する安全性への関心が高く，特に，残留農薬の軽減を求める声も聞かれる．それに対応して，無・減農薬栽培表示の野菜・果実類の市販が増加している[16]．農林水産省は「有機農産物に係わる青果物等特別表示ガイドライン」を1993年4月に設定し，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の方法などを定めた．しかし，これら無・減農薬栽培表示作物中の農薬残留実態はほとんど明らかにされていない．そこで，著者らが過去に調査した一般流通作物(慣行栽培品)のうち農薬の

*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

検出頻度の高い野菜・果実等を選び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

1995年4月から1996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10種30作物について調査した．

(2) 無・減農薬栽培野菜・果実類

1995年4月から1996年3月にかけて東京都内に入荷した野菜・果実など6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，クロルフェンビンホス(CVP-E及び-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，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，トリクロルホン(DEP)，サリチオン，エチルチオメトン(ジスルホトン)，ジクロフェンチオン(ECP)，シアノホス(CYAP)，クロルピリホスメチル，ホルモチオン，プロチオホス，メチダチオン(DMTP)，テトラクロルビンホス(CVMP)，プロパホス，EPBP，エチオン，イソキサチオン，チオメトン，シアノフェンホス(CYP)，ホスメット(PMP)，ピリダフェンチオン，ピリミホスメチル，ジアリホール，エディフェンホス(EDDP)，IBP，スルプロホス　計37種

(2) 有機塩素系農薬：総BHC(α-，β-，γ-及びδ-BHCの総和)，総DDT(*p*，*p*'-DDT，*p*，*p*'-DDE及び*p*，*p*'-DDDの総和)，*o*，*p*'-DDT，ディルドリン，エンドリン，アルドリン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキサイド，ジコホール(ケルセン)，ベンゾエピン(α-及びβ-ベンゾエピン)，クロルベンジレート，キャプタン，カプタホール(ダイホルタン)，クロロタロニル(TPN)，PCNB，プロシミドン，ビンクロゾリン，イプロジオン，クロルニトロフェン(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，ピリミカーブ，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，メトルカルブ(MTMC)　計14種

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

総計81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　Traker™ System

(5) 原子発光検出器：Hewlett Packard 社製 AED HP5921A

4．分析方法

前報[6]に従った．

結果及び考察

1．慣行栽培野菜・果実類

(1) 有機リン系農薬

野菜・果実10種30作物中6種11作物(検出率：37%，以下同様)から11種類の有機リン系殺虫剤を検出した(Table 1)．

残留基準のある農薬では，マラチオン(検出作物名：レタス及び食用菊)，MEP(食用菊)及びDDVP(食用菊)の3種が2種2作物(7%)から検出された．マラチオン及びMEPはいずれも基準値2.0ppm及び0.2ppmの1/20以下の検出量であった．食用菊1検体から検出されたDDVPは残留基準値0.1ppmを超えていた．DDVPは1日摂取許容量(ADI)0.004mg/kg/dayの劇物である．しかし，水洗いにより除去されやすい農薬であることと[17]，揮発性の高い性質のために調理加工時の加熱により消失し，喫食時における残存量は非常に少ないと考えられる．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，イソキサチオン(レタス及びミニトマト)，スルプロホス(ピーマン)及びDMTP(小菊)の3種類が4種4作物(13%)から検出された．

ミニトマトから検出されたイソキサチオン及びピーマンから検出されたスルプロホスは，いずれも基準値の1/13以下であった．しかし，レタスから検出されたイソキサチオンは登録保留基準0.1ppmと同レベルであり，小菊からはDMTPが基準値0.2ppmの7倍検出された．

イソキサチオンは熱にも安定であり，ゆでる・炒める等の調理によっても50%以上が残存する[4]，レタスは通

Table 1. Residues of Organophosphorus[1] Pesticides in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Isoxathion (ppm)	Malathion (ppm)	Others (ppm)
Vegetable					
Carrot [NINJIN]	2	0	—[2]	—	—
Lettuce [RETASU]	6	3	0.12	0.01	0.01(Dimethoate), 0.02(Prothiofos)
Spinach [HORENSO]	1	0	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage [KOMATUNA]	4	1	—	—	0.08(EPN)
Cucumber [KYURI]	1	0	—	—	—
Mini tomato	2	1	0.01	—	—
Pimento [PIMAN]	4	2	—	—	0.04(PAP), 0.37(sulpropfos)
Tomato	1	0	—	—	—
Edible flower					
Chrysanthemum [SYOKUYOGIKU]	4	3	—	0.13	0.43, 0.03(Diazinon), 0.08, 0.75(DDVP), 0.01(MEP)
Chrysanthemum (relish) [KOGIKU]	1	1	0.04	—	1.4(DMTP)
Fruit					
Grape [BUDO]	4	0	—	—	—

1) Insecticides : Chlorpyrifos, CVP, dimethoate, EPN, parathion, parathion-methyl, MEP, MPP, PAP, phosalone, DEP, DDVP diazion, salithion, EPBP, ethylthiometon, ECP, CYAP, formothion, chlorpyrifos-methyl, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos, ethion, isoxathion, thiometon, CYP, pirimiphos-methyl, PMP, pyridaphenthion, dialifol, malathion and Sulprophos are investigated.
Fungicides : EDDP and IBP are investigated.

2) — : not detected

常生食するので，過量の農薬が残留しないよう，その使用にあたっては適正使用基準の遵守が望まれる．

DMTPはADI 0.005mg/kg/day の劇物であるが，水洗いによって除去されやすい[17]．また，検出された小菊は刺身のつま等として添えられるものであり，通常，喫食することは少ないと思われることから，特に問題はないと考える．

ジメトエート(レタス)，プロチオホス(レタス)，EPN(コマツナ)，PAP(ピーマン)及びダイアジノン(食用菊)の残留基準はいずれも設定されていないが，検出量は他の野菜に設定されている基準値の1/100～4/5であった．

(2) 有機塩素系農薬

有機塩素系農薬では5種7作物(23%)から殺虫剤であるヘプタクロル(キュウリ；代謝物ヘプタクロルエポキサイドを検出)と殺菌剤であるイプロジオン(ピーマン及び食用菊)，プロシミドン(ピーマン及び食用菊)及びTPN(レタス，ミニトマト及び食用菊)の4種類が痕跡値～2.6ppm の範囲で検出された．(Table 2)

残留基準及び登録保留基準を超えたものはなかった．

キュウリから検出されたヘプタクロルエポキサイドは土壌由来のものと考えられる．ヘプタクロルエポキサイドやDDT 等の殺虫剤は，土壌中で比較的安定した物質であるため使用されなくなった後20年以上経過してからも，このように検出されることがある．特にキュウリからはドリン系殺虫剤が検出されることも多く[4-7,9,18-25]，引き続き調査していく必要があると考える．

除草剤CNP は，いずれからも検出されなかった．

(3) 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メソミル(レタス，コマツナ及びピーマン)及びNAC(レタス)の2種が，3種6作物(20%)から0.03～0.70ppm の範囲で検出された．

これらのうち，レタス及びコマツナから検出されたメソミルは登録保留基準0.5ppm を超えていた．メソミルはADIが0.01mg/kg の劇物である．水洗いなどによっても若干除去され，また，比較的分解の早い農薬であるた

Table 2. Residues of Organochlorine[1] and Carbamate[2] Pesticides in Crops

Sample	No. of sample	No. of positive	Organochlorine (ppm)				Carbamate (ppm)	
			Fungicides			Insecticide	Insecticides	
			Iprodione	procymidone	TPN	Heptachlor epoxide	Methomyl	NAC
Vegetable								
Carrot	2	0	—[3]	—	—	—	—	—
Lettuce	6	3	—	—	0.12	—	0.27,0.70	0.03
Spinach	1	0	—	—	—	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage	4	1	—	—	—	—	0.17	—
Cucumber	1	1	—	—	—	0.01	—	—
Mini tomato	2	2	—	—	Tr[4], Tr	—	—	—
Pimento	4	3	0.09	0.04	—	—	0.12, 0.13	—
Tomato	1	0	—	—	—	—	—	—
Edible flower								
Chrysanthemum	4	3	1.9,2.6	0.04	Tr, 0.51	—	—	—
Chrysanthemum (relish)	1	0	—	—	—	—	—	—
Fruit								
Grape	4	0	—	—	—	—	—	—

1) Fungicides : Captan, captafol, procymidone, TPN, vinclozolin and iprodione are investigated.
Insecticides : T-BHC (total of α-, β-, γ- and δ-BHC), T-DDT (total of *p, p'*-DDT, *p, p*-DDE and *p, p'*-DDD), *o, p'*-DDT, dieldrin, aldrin, endrin, α-and β-benzoepin, Chlorobenzilate, dicofol, heptachlor and heptachlorepoxide are invstigated.
Herbicides : CNP is investigated.

2) Insecticides : Aldicarb, bendiocarb, diethofencarb, ethiofencarb, NAC, BPMC, methomyl, oxamyl, pirimicarb, MIPC, thiodicarb and MTMC are investigated.
Herbicides : Thiobencarb is investigated.

3) — : not detected

4) Tr : below 0.01 ppm

め，今回の検出レベルでは健康上特に問題はないと考える．しかし，レタスは生食されることが多く，過量のメソミルが残留しないよう留意する必要がある．メソミルは平成2年度以前における調査ではほとんど検出されなかった農薬であるが，平成3年度の調査より毎年度検出されている[12-15]．このように農薬の残留傾向は調査年度により変化することもあり，継続的に残留農薬の動向を把握していく必要がある．

NAC はレタスには基準値が設定されていないが，今回の検出量は他の作物に設定されている0.1ppm の1/3以下であった．

2．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まとめ，Table 3に示した．

複数残留はレタス，ピーマン，コマツナ，食用菊及び小菊の5種8作物(16%)に認められた．

3種類の農薬を同時に検出したものが3作物(10%)あり，特に，食用菊からは有機リン系殺虫剤4種及び有機塩素系殺菌剤2種の計6種類が検出され，多種多様な農薬が使用されていることが明らかになった．

複数残留は，葉菜類であるレタス，コマツナ及び菊花で多くみられた．これら葉や花弁を喫食する作物では，表面積が広く，重なりあっている部分が光や雨に暴露さ

Table 3. Detailes in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	No.	Pestfcide residues (ppm)
Lettuce	1	TPN (0.12)[1], NAC (0.03)
	2	Dimethoate (0.01), Isoxathion (0.12), Methomyl (0.27)
Pimento	1	PAP (0.04), Iprodione (0.09)
	2	Methomyl (0.13), Procymidone (0.04)
Young leaves of chineses cabbage	1	EPN (0.08), Methomyl (1.7)
Chrysanthemum	1	DDVP (0.75), Diazinon (0.03), Malathion (0.13), MEP (0.01), TPN (Tr), Procymidone (0.04)
	2	Diazinon (0.43), Iprodione (1.9), TPN (0.51)
Chrypanthemum (relish)	1	DMTP (1.39), Isoxathion (0.04)

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

れることが少ないため，散布された農薬が付着しやすく，また，分解・消失しにくいと考えられる．

このように、ひとつの作物に多数の農薬が残留することもあるため，流通農作物における農薬残留の実態把握には同時に多数の農薬を検査することが非常に重要であると考える．

3．無・減農薬栽培野菜類

無・減農薬栽培と表示された野菜類6種20作物について調査したところ，4種4作物(20%)から有機塩素系殺菌剤1種及びカーバメイト系殺虫剤2種が検出された(Table 4)．

残留基準の設定されている農薬では，レタスからオキサミルが検出されたが，基準値の1/25であった．

登録保留基準の設定されている農薬では，プロシミドン(ミニトマト及びトマト)及びメソミル(ピーマン)の2種が検出されたが，いずれも基準値の1/2以下であった．

農薬が検出された作物は，販売者独自の無農薬栽培表示のもの3種3作物(レタス，ピーマン及びミニトマト)及び販売者独自の有機栽培表示のもの1作物(トマト)であった．トマトについては，カビの発生により殺菌剤を使用した旨の表示があった．

除草剤CNPは，いずれの作物からも検出されなかった．

無・減農薬栽培表示作物における農薬の検出割合は平成3年度以来15～20%の範囲にあり，一定している[12-15]．この傾向が表示ガイドラインの設定により今後変化するか，引き続き実態を調査検討していく考えである．

ま と め

1995年4月から1996年3月までに都内に入荷した野菜・果実類10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，イソキサチオン，マラチオン，ジ

Table 4. Residues of Pesticides[1] in Organic Cultivation Crops or the like

Sample	No. of Sample	No. of positive	Organochlorine Fungicide	Carbamate	Insecticide
			Procymidone (ppm)	Oxamyl (ppm)	Methomyl (ppm)
Vegetable					
Carrot	3	0	—[2]	—	—
Lettuce	4	1	—	0.04	—
Spinach	1	0	—	—	—
Young leaves of chineses cabbage	1	0	—	—	—
Mini tomato	1	1	0.21	—	—
Pimento	3	1	—	—	0.07
Tomato	1	1	0.05	—	—

1) 67 kinds of insecticides (organophosphorus : 35, organochlorine : 17, carbamate : 12, others : 3), 11 kinds of fungicides (organochlorine : 9, others : 2), 3 kinds of herbicides (organochlorine : 1, carbamate : 2)

2) — : not detected

メトエート等の殺虫剤11種が6種11作物から，0.01～1.4ppm 検出された．このうち食用菊から検出されたDDVP は残留基準を，また，レタスから検出されたイソキサチオン及びつま菊から検出されたDMTP は登録保留基準を超えていた．

有機塩素系農薬では，殺虫剤のヘプタクロルエポキサイド，殺菌剤のイプロジオン，プロシミドン及びTPNが6種7作物から痕跡～2.6ppm の範囲で検出された．

カーバメイト系農薬では，カルバリル及びメソミルが3種6作物から0.03～0.70ppm の範囲で検出された．レタス及びコマツナから検出されたメソミルは登録保留基準を超えていた．

2．農薬の複数残留実態

農薬の複数残留はレタス，ピーマンなど5種8作物に認められた．

3．無・減農薬栽培野菜

有機リン系農薬は検出されなかった．

有機塩素系農薬では，プロシミドンが2種2作物から検出された．

カーバメイト系農薬では，オキサミル及びメソミルが2種2物から0.04ppm～0.07ppm 検出された．

いずれも残留基準及び登録保留基準を超えたものはなかった．

慣行栽培作物で農薬残留基準及び登録保留基準を超えたものがあったが，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．

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，観　公子他：東京衛研年報，**39**，130-138，1988．
9）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**40**，155-162，1989．
10）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**41**，119-124，1990．
11）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**42**，129-133，1991．
12）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**43**，124-129，1992．
13）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**44**，150-154，1993．
14）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**45**，92-97，1994．
15）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**46**，134-139，1995．
16）「信頼できる有機農産物などのひろがりをめざして」－流通指針等－：東京都生活文化局，1996．
17）「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－，229，1989，(社)日本防疫協会，東京．
18）佐藤正幸，長南隆夫，内藤深雪他：道衛研所報，**42**，14-20，1992．
19）一色　徹，鈴木　滋，牛沢　勇：宮城県保健環境センター年報，**4**，66-68，1986．
20）食品部：栃木県衛研所報，**19**，92-93，1988．
21）望月恵美子，山本敬男，深澤喜延：山梨衛公研年報，**35**，10-15，1991．
22）吉田富美男，山浦由郎：長野県公研報告，**12**，48-51　1991．
23）杉山智世子，浅岡公江：静岡市衛生研年報，**2**，92-101，1986．
24）吉田精作，村田　弘，今井雅示：大阪府立公衛研年報食品衛生編，**22**，59-68，1991．
25）食品化学科：鳥取県衛生研究所報，**32**，90-91，1992．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 141-147, 1996

輸入農産物中の残留農薬実態調査
ー平成7年度ー

伊藤　正子*，永山　敏廣*，小林　麻紀*，橋本　常生*，
羽石奈穂子*，田村　康宏*，友松　俊夫*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
- Apr. 1995. ~Mar. 1996. -

MASAKO ITO*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, TSUNEO HASHIMOTO*,
NAHOKO HANEISHI**, YASUHIRO TAMURA* and TOSHIO TOMOMATSU*

Pesticide residues in 246 imported crops were investigated. Residues of eight kinds of organophosphorus insecticides were detected in traces of - 0.41 ppm.

As for organochlorine pesticides, two kinds of insecticides and one kind of fungicide were detected in traces of - 0.02 ppm and 0.02 - 1.0 ppm respectively. Four kinds of carbamate insecticides and one kind of carbamate herbicide were detected in traces of - 0.12 ppm and - 0.22 ppm. In the others, one kind of fungicide and one kind of herbicide were detected at 0.02 - 1.9 ppm and 0.01 - 0.06 ppm generally.

DDVP in malt exceeded the maximum limit in the tolerance for residues in cereals.

As for the rate of detection of pesticides in imported crops, there was a lower decreased difference among American, Asian, European and Oceanic regions apart from the African region.

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一つとなっている．そこで，著者らは昭和57年度より，種々の輸入農産物について農薬の残留実態を調査し報告してきた[5-12]．今回は平成7年度の調査結果を報告する．

実験の部

1．試料

1995年4月から1996年3月にかけて東京都内に入荷した輸入野菜・果実類及びそれらの加工品等68種246作物について調査した．これらの試料の内訳をTable 1に示した．

一部の果実類は可食部及び非可食部を含む全果について分析した．

2．調査農薬名

アメリカ，アジア，アフリカ，オセアニア及びヨーロッパの各地域における残留許容量などから，以下の調査対象農薬を設定した．

(1) 有機リン系農薬：EPN，クロルピリホス，クロルフェンビンホス(CVP-E, -Z)，ジクロルボス(DDVP)，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン(MEP)，フェンチオン(MPP)，フェントエート(PAP)，ホサロン，マラチオン，エディフェンホス(EDDP)，トリクロルホン(DEP)，メチルパラチオン，フェンスルホチオン，エトプロホス，エトリムホス，キナルホス，テルブホス，プロチオホス，チオメトン，ピリミホスメチル，イソフェンホス，エチオン，ジメトン(-O, -S)，テトラクロルビンホス(CVMP)，ホスメッ

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public health
24-1, Hyakunincho 3 Chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

ト(PMP)，メカルバム，メチダチオン(DMTP)，アジンホスメチル，ジオキサチオン，トルクロホスメチル，フェンクロルホス，ブロモホスエチル，クロルピリホスメチル　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(*p*,*p*'-DDT，*p*,*p*'-DDE，及び*p*,*p*'-DDDの総和)，ディルドリン，アルドリン，エンドリン，キャプタン，カプタホール(ダイホルタン)，クロルベンジレート，ジコホール(ケルセン)，イプロジオン，エンドスルファン(-Ⅰ，-Ⅱ；α-，β-ベンゾエピン)，ビンクロゾリン　計 18 種

(3) カーバメイト系農薬：カルバリル(NAC)，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)，フェノブカルブ(BPMC)，メチオカルブ，カルボフラン，クロルプロファム(CIPC)　計 12種

(4) その他の農薬：ビテルタノール，イマザリル，カルベンダゾール(MBC)，2，4-D，ピペロニルブトキシド　計 5種

総計 71種

これらのうち，穀類は有機リン系農薬及びカーバメイト系農薬について，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，2，4-D及びイマザリルは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™ System

(5) 原子発光検出器：Hewlett Packard社製 AED HP5921A

(6) 粉砕器：(有)廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

4．分析方法

平成4年厚生省告示第239号，残留農薬分析法[14]，増補残留農薬分析法[15]及び残留分析法Draft[16]等に準じた．

Table 1. The List of Investigated Imported Crops

	Commodities	
Vegetables	Trevise (4), Brussels sprots [MEKYABETSU][2] (2), Chicory (5), Spinach [HORENSO][2] (1), Bamboo sprout [TAKENOKO] (2), Carrot [NINJIN][2] (1), Horse radish [SEIYOWASABI] (1), Garlic (3), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI][2] (10), Leek [RIKI] (3), Onion [TAMANEGI][2] (4), Salsify [SEIYOGOBO][2] (1), Shallot [ESYAROTTO] (3), Celeriac (3), Ginger (3), Okura (2), Pimento [PIMAN][2] (12), Pumpkin [KABOCYA] (4), Asparagus (9), Baby corn (2), Broccoli[2] (5), Cauliflower[2] (1), Sweet corn[2] (4), Broad bean [SORAMAME][2] (2), Chinese pea [SAYAENDO][2] (3), String pea [SAYAINGEN][2] (4), Green soybean [EDAMAME][2] (3), Green pea[2] (1), Mashed potato (6), Potato[3] (1), Taro [SATOIMO][2] (2)	29 species 106 crops
Citrus[4]	Grapefruit (14), Lemon (6), Lime (5), Orange (4), Sweetie (1)	5 species 30 crops
Others	Apple (2), Avocado[4] (7), Banana[4] (10), Cherry [SAKURANBO] (1), Grape [BUDO] (2), Kiwifruit[4] (8), Litchi[4] (2), Chestnut [MUKIGURI] (1), Mango[4] (4), Melon[4] (3), Papaya[4] (8), Pineapple[4] (5), Pomegrante [ZAKURO][4] (1), Strawberry [ICHIGO] (1)	14 species 55 crops
Beans	Soybean [DAIZU] (4), Small red bean [AZUKI] (2), Coffee bean (3), Baby raima (2), Garbanzo (1)	5 species 12 crops
Mushrooms	Shiitake fungus [SHIITAKE] (3)	1 species 3 crops
Nuts	Almond (2), Peanut (4), Walnut (1), Pistachio (2), Queenland nut (1)	5 species 10 crops
Cereals	Flour [KOMUGIKO] (4), Malt [BAKUGA] (9), Corn [TOMOROKOSHI] (1), Corngrits (3), Corn meal (1), Corn starch (2), Buckwheat [GENSOBA] (5), Buckwheat flour [SOBAKO] (4), Rye flour (1)	9 species 30 crops
		Total 68 species 246 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.

また，これらに分析法が収載されていない農薬については，新しく開発した方法によった[17]．

結果及び考察

1．農薬残留実態

68種246作物中19種49作物（検出率20%，以下同様）から21種の農薬が痕跡から1.9ppmの範囲で検出された．農薬を検出した作物の残留実態について，野菜・果実類はTable 2に，柑橘類はTable 3に，種実類及び穀類はTable 4に示した．

(1) 野菜類

野菜類では，29種106作物中7種13作物（12%）から8種の農薬が痕跡程度から0.22ppmの範囲で検出された（Table 2）．

食品衛生法による残留農薬基準のある農薬ではクロルピリホス（検出作物名：カボチャ），ピリミカーブ（セルリアック），メソミル（ピーマン）及びCIPC（マッシュポテト及び冷凍ポテト）の4種が10作物（9%）から検出された．いずれも基準値の約1/2，1/200，1/5及び1/200以下であった．

環境庁の定めた登録保留基準のある農薬では，ジメトエート（サヤエンドウ）が2作物（2%）から検出された．いずれも基準値の約1/17以下であった．

一方，CIPC（マッシュポテト及び冷凍ポテト）は6作物（6%）から検出され，今回調査したポテト食品（7作物）の約86%から検出された．この農薬は従来，ポテト食品からは高頻度で検出されている[8−10,12]ので，引き続き残留状況の推移を観察していく必要がある．またMIPCは昨年度[13]から調査対象農薬になったが，今回初めてオクラ1作物から検出された．MIPCは日本では主に稲に用いられている殺虫剤で，残留農薬基準は米（玄

Table 2. Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Vegetables						
Chinese Pea	Taiwan	2	2	Dimethoate	0.06	1[1]
				NAC	0.03	
Okura	Thailand	1	1	MEP	0.01	
				MIPC	0.12	
Pumpkin	Mexico	3	1	Chlorpyrifos	0.04	0.1[2]
Celeriac	Belgium	1	1	Pirimicarb	0.01	2.0[2]
Pimento	New Zealand	3	2	Methomyl	0.02, 0.10	0.5[2], 1[3]
Mushed potato[4]	Canada	4	4	CIPC	0.05, 0.15, 0.17, 0.22	50[2], 50[5]
	Belgium	1	1	CIPC	0.18	50[5]
Potato[6]	USA	1	1	CIPC	0.08	50[5]
Fruits						
Kiwifruits (whole)	New Zealand	6	2	Pirimiphos-mehtyl	0.03, 0.04	1.0[2], 2[3]
				Vinclozolin	1.0	20[1], 10[3]
(fresh)	New Zealand	6	1	Vinclozolin	0.02	
Banana (whole)	Philippines	7	2	Chlorpyrifos	Tr[7], 0.02	0.5[2]
Litchi (whole)	Taiwan	1	1	Chlorpyrifos	0.18	
				Parathion	0.13	0.5[3]
Mango (whole)	Philippines	3	1	Endsulfan[8]	Tr	0.5[4], 2[3]

1) standard for withholding resitration
2) tolerance for pesticide residue
3) FAO/WHO tolerance for residues
4) It is dry mushed potato.
5) tolerance in each country
6) It is precooked frozen potato.
7) Tr：below 0.01 ppm
8) the amount of endosulfan-Ⅰ and Ⅱ

米)のみに設けられている．輸入の野菜から検出されたことから，諸外国では野菜などの作物にも適用されていることが示唆された．

今年度は果菜類，根菜類，豆科野菜及びイモ類からは農薬が検出されたが，葉菜類からの検出はなかった．前年度までの葉菜類の検出率も低く[5−13]，輸入野菜のうち葉菜類は，農薬の残留が低い傾向にあると考える．

(2) 果実類(柑橘類を除く)

果実類14種55作物中4種6作物(18%)から5種の農薬が痕跡から1.0ppmの範囲で検出された(Table 2)．

喫食に供さない果皮等の非可食部を含む全果から，比較的多数の農薬が検出された．残留基準のある農薬は，クロルピリホス(バナナの全果)が2作物(4%)から検出された．いずれも基準値の1/25以下であった．

環境庁告示の登録保留基準のある農薬ではビンクロゾリン(キウイフルーツの果肉及び全果)が0.02から1.0ppm及びエンドスルファン(マンゴーの全果)が痕跡程度検出された．いずれも基準値の1/20以下であった．

基準のないものでは，キウイフルーツの全果2作物からピリミホスメチルが0.03及び0.04ppm検出された．またライチの全果1作物から，クロルピリホスが0.18ppm及びパラチオンが0.13ppm検出された．昨年度は検出されなかったが，従来からライチはパラチオンが高頻度で検出されている[5−13]．パラチオンはADIが0.005mg/kg/day[18]であり，日本では特定毒物に指定されている農薬である．今回は喫食に供さない果皮を含んだ全果からのみの検出であり，果肉からは検出されていないこと，また，パラチオンは水洗浄により約5割から7割除去される[19]ことから通常の喫食では，健康上特に問題はないと考える．

一方，一昨年，昨年とバナナから高頻度に検出されたビテルタノールは今年度は検出されなかった．一昨年の検出率89%，昨年67%と検出率は減少していたが，従来バナナには，ビテルタノールのような殺菌剤の使用が多く見られることから[10−13]，今後ともその動向に留意する必要がある．

(3) 柑橘類

5種30作物中5種23作物(77%)から5種の農薬が痕跡

Table 3. Pesticide Residues in Citrus Fruits

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Grapefruits						
(whole)	USA	13	11	Ethion	Tr[1]	2[2], 2[3], 0.3[4]
				NAC	0.02	7[2], 10[3]
				Imazalil	0.02, 0.13, 0.14, 0.19, 0.26, 0.34, 0.44, 0.46, 0.72, 1.9	5[2], 10.0[3], 5.0[5]
	Swaziland	1	1	Imazalil	0.16	
(fresh)	USA	13	2	Imazalil	0.05, 0.07	
Lime (whole)	Mexico	5	1	2,4-D	0.01	2[2], 5[3]
Lemon						
(whole)	USA	6	5	Chlorpyrifos	0.02, 0.02, 0.04	0.3[2], 1.0[3], 0.3[5]
				Imazalil	0.30, 0.36, 0.38, 0.54, 1.4	5[2], 10.0[3], 5.0[5]
				2,4-D	0.04, 0.05, 0.05, 0.05, 0.06	2[2], 5[3]
(fresh)	USA	6	5	Imazalil	0.03, 0.15	
				2,4-D	0.01, 0.01, 0.01, 0.01, 0.02	
Orange						
(whole)	USA	4	4	Chlorpyrifos	0.05, 0.06	0.3[2], 1.0[3], 0.3[5]
				Imazalil	0.02, 0.14, 0.23, 0.55	5[2], 10.0[3], 5.0[5]
(fresh)	USA	4	1	Imazalil	0.02	
Sweetie						
(whole)	Israel	1	1	Chlorpyrifos	0.04	0.3[2], 1.0[3], 0.3[5]

1) Tr : below 0.01 ppm
2) FAO/WHO tolerance for residues
3) maximum residues in each country
4) standard for withholding registration
5) tolerance for pesticide residues

から1.9ppmの範囲で検出された(Table 3).

残留基準のある農薬は，クロルピリホス(レモンの全果，オレンジの全果及びスィーティーの全果)が3種6作物(20%)及びイマザリル(グレープフルーツ，レモン及びオレンジのいずれも全果及び果肉)が3種20作物(67%)から検出された．いずれも基準値の1/5及び1/2以下の検出であった．

イマザリルは平成2年度から調査を開始し，平成3年度からは全果と果肉について調査を行っている．全果の検出率の推移を見ると，平成4年度がやや低かったが，他の年度では大きな変動は見られなかった．また，検出値の平均は，平成7年度が0.47ppmと若干低かったが，他は0.94～1.4ppmとほとんど差はなかった．果肉における検出値の平均は0.05～0.09ppmの間であり，ほとんど同じレベルで推移していた．イマザリルは柑橘類に繁用される農薬であり，果肉からも検出されていることから今後ともその動向を見守っていく必要がある．

イマザリルはADIが0.01mg/kg/dayの殺菌剤であり，諸外国で柑橘類にポストハーベスト使用される農薬で，柑橘類からの検出例も多い[10-13]．柑橘類に残留したイマザリルの一部は果肉からも検出されたが，その割合は約2～7%と低い[20]．また，残留濃度の比較的高い果皮部を大量にかつ継続的に喫食することはほとんどないことから，今回検出された結果は通常の喫食上，特に問題はないと考える．

登録保留基準のある農薬は，エチオン(グレープフルーツの全果)の1種1作物(3%)から痕跡程度検出された．

イマザリルと同様に柑橘類に収穫後使用が認められている2,4-D(ライムの全果及びレモンの全果及び果肉)が，2種6作物(20%)から0.01～0.06ppm(検出値の平均0.03ppm)の範囲で検出された．この検出値は米国及びFAO/WHOの許容量5ppm及び2ppmの1/80及び1/30以下であった．2,4-Dは，イマザリルと同様，検出率及び検出量がその年によって変動する農薬である．このことは産地の天候や農作物自身の出来具合いなどに起因しているものと考えるが，果肉からも検出されているため，引き続き残留状況を把握していく必要がある．

(4) 豆類，キノコ類及び種実類

豆類及びキノコ類からは昨年度と同様に農薬は検出されなかった．

種実類では，5種10作物中2種3作物(30%)から3種の農薬が痕跡から0.02ppmの範囲で検出された(Table 4)．中国産の落花生2作物(20%)から総BHCがともに0.02ppm，イラン産のピスタチオ1作物(10%)からエンドスルファン及びNACが痕跡程度検出された．これらの作物からは平成5，6年度は検出されなかったが，平成4年度まではほぼ毎年，有機塩素系殺虫剤などの農薬が検出されている[8-11]．

種実類には，総BHCの残留農薬基準値が設けられていないが，米や大豆などで0.2ppmと設定され，ADIが0.0125mg/kg/dayの有機塩素系殺虫剤である．日本においては1949年に農薬の登録を受けたが，1966年にBHCのヒトにおける高蓄積性が明らかになり，また牛乳などの食品が汚染されていた結果が得られたことから1971年にその登録が失効された[21]．諸外国でもその使用が規制されているが，土壌残留性が高い農薬であるため，使用されなくなった後15年以上経ても，痕跡程度ながら検出

Table 4. Pesticide Residue in Nuts and Cereals

Crops	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Torelance (ppm)
Nuts						
Peanut	China	2	2	T-BHC[1)]	0.02, 0.02	
Pistachio	Iran	1	1	Endsulfan[2)]	Tr[3)]	
				NAC	Tr	
Cereals						
Malt	New Zealand	1	1	Pirimiphos-methyl	Tr	1.0[4)], 10[5)]
	France	2	2	Malathion	0.03	2.0[4)], 8[5)]
				DDVP	Tr, 0.41	0.2[4)], 2[5)]
	Australia	1	1	MEP	Tr	1.0[4)], 10[5)]

1) the amount of α-, β-, γ-and δ-BHC
2) the amount of endosulfan-Ⅰ and Ⅱ
3) Tr : below 0.01 ppm
4) tolerance for pesticide residue of cereals
5) FAO/WHO tolerance for residues

されているとの報告がある[8,9,11]．しかし，今回の検出量0.02ppmはADI値から，体重50kgのヒトが毎日31kgの落花生を食べ続ける量に匹敵する．通常の喫食をする上では特に問題はないと考えるが，土壌残留性の高い農薬であることから今後しばらくは微量検出される可能性がある．

(5) 穀類

9種30作物中1種4作物(13%)から4種の農薬が，痕跡から0.41ppmの範囲で検出された(Table 4)．

穀類に残留基準のある農薬では，ピリミホスメチル，マラチオン，DDVP及びMEPが調査した麦芽9作物中4作物から検出された(44%)．いずれの農薬も麦芽としての基準は設定されていない．ピリミホスメチル及びMEPは麦芽1作物(3%)ずつから痕跡程度検出され，マラチオンは1作物(3%)から0.03ppm検出された．DDVPは2作物から検出されており，そのうち1作物から穀類に設定されている残留基準値0.2ppmを超えて検出された．DDVPは，ADIが0.004mg/kg/dayの劇物であるが，検出値はFAO/WHOの許容量以下であり，麦芽はそのままの状態で喫食されることは無く，水洗によって67%減少するため[19]，特に問題はないと考える．しかし，類似食品に設定された残留基準を超えての残留は好ましいものではなく，今後ともさらに残留実態の動向を観察する必要がある．

2．地域別による比較

検出農薬の地域的動向を観察することは，使用された農薬の種類だけでなく使用方法を推察するための資料として有用であり，残留状況を把握する上でも有意義であると考える．そこで，輸入農産物の原産国を前報[13]と同様に5地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめ，Table 5に示した．

農薬の検出率は，前年度と同様，アフリカ産が最も高く，次いでオセアニア産，アメリカ産，アジア産及びヨーロッパ産の順であった．しかし，アフリカ産は調査作物数がきわめて少ないので，この検出率からアフリカ産の作物の残留農薬実態の全体を反映しているとは限らない．オセアニア産の検出率が昨年度の31%から24%に減少した．また，昨年度2%の検出率だったヨーロッパ産が，今年度は12%に増加した．これは調査対象作物の違いにより，使用農薬の種類や使用方法が異なったためと考えられる．

各地域ともに，有機リン系殺虫剤の検出される割合が高い．検出率で比較すると，オセアニア産が最も高く25作物中4作物(16%)，次いでアジア産の67作物中7作物(10%)であった．オセアニア産は一昨年，昨年度とも有機リン系殺虫剤の検出率は高く，それぞれ，21作物中4作物(19%)及び26作物中6作物(23%)であった．

一昨年及び昨年には検出されなかった有機塩素系殺虫剤が，アジア産の作物の67作物中4作物(6%)から検出された．過去の調査[5-13]でも，アジア産からの有機塩素系殺虫剤の検出率は高く，使用されなくなってから10年以上経った今でもその土壌中に残留していると考えられる．また，ライチなどその地域のみで生産される特産作物を除いて，検出された農薬の種類は，全体的には地域差が減少する傾向が認められた．これは，農薬の流通が進み，各地域で，それぞれの作物に適した農薬を使用するようになったためと推察される．

ま と め

1995年4月から1996年3月までに都内に入荷した輸入生鮮農産物等68種246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

8種の有機リン系殺虫剤が痕跡～0.41ppmの範囲で検出された．

Table 5. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No. of samples	No. of positive samples							Detected rate(%)
		Organophosphorus	Organochlorine		Carbamate		Others	Total	
		insecticides	insecticides	fungicides	insecticides	herbicides			
America	117	7(2)[1)]	0	0	1(1)	5(1)	25(2)	27(6)	23
Asia	67	7(4)	4(2)	0	3(2)	0	0	11(8)	16
Oceania	25	4(2)	0	1(1)	2(1)	0	0	6(4)	24
Europe	34	3(2)	0	0	1(1)	1(1)	0	4(4)	12
Africa	3	0	0	0	0	0	1(1)	1(1)	33
Total	246	21(8)	4(2)	1(1)	7(4)	6(1)	26(2)	49(19)	20

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

有機塩素系農薬では，2種の殺虫剤が痕跡～0.02ppm及び1種の殺菌剤が0.02～1.0ppmの範囲で検出された．

カーバメイト系農薬では，4種の殺虫剤が痕跡～0.12ppmの範囲で検出され，1種の除草剤が痕跡～0.22ppmの範囲で検出された．

その他の農薬では，1種の殺菌剤が0.01～1.9ppm及び1種の除草剤が0.01～0.06ppmの範囲で検出された．

2．地域別による比較

農薬の検出率は，地域による差が小さくなる傾向が認められた．

有機塩素系殺虫剤はアジア産からのみ検出された．また，検出された農薬の種類は，地域による差が小さくなる傾向が認められた．

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実態－，1990，(社)日本食品衛生協会，東京．

2）1993年度(平成5年)輸入青果物統計資料(バナナ・シトラス・パインその他)，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・パインその他)，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）小林麻紀，永山敏廣，伊藤正子他：東京衛研年報，**46**，127-133，1995．

14）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．

15）後藤真康，加藤誠哉編著：残留農薬分析法，1987，ソフトサイエンス社，東京．

16）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．

17）未発表．

18）富澤長次郎，上路雅子，腰岡政二：最新農薬データブック，281，1989，(株)ソフトサイエンス社，東京

19）「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－，229，1989，(社)日本植物防疫協会，東京．

20）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**，383-392，1995．

21）植村振作，河村　宏，辻万千子他：農薬毒性の事典，136-141，1988，(株)三省堂，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 148-155, 1996

GPCによる食品中残留農薬の迅速分析法

橋本　常生*，永山　敏廣*，小林　麻紀*，羽石奈穂子*
伊藤　正子*，田村　康宏*，友松　俊夫*

A Rapid Analytical Method of Pesticide Residues in Food using Gel Permeation Chromatography

TSUNEO HASHIMOTO*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*,
MAKI KOBAYASHI*, NAHOKO HANEISHI*, MASAKO ITO*,
YASUHIRO TAMURA* and TOSHIO TOMOMATSU*

A rapid analytical method for N-methylcarbamate pesticides in food was described.

A food sample was extracted with acetone. The crude extract was passed through a Chem Elut™ column with ethyl acetate. The extract was cleaned up with the GPC (OPTIMA™) column using ethyl acetate/cyclohexane (1 : 1) as a mobile phase and then with Sep-Pak® Plus Silica or Bond Elut® SAX-PSA column. The sample solution was analyzed by post column reaction HPLC.

Recovery at the 0.2 ppm levels added to brown rice, potato, spinach, orange, apple, cabbage and onion was 60～100%, except ethiofencarb, aldicarb, methiocarb and primicarb (apple, orange).

This analytical method using solid phase extraction and GPC is rapid and convenient for the analysis of N-methylcarbamate pesticides in food.

Keywords：GPC gel permeation chromatography，残留農薬 pesticide residues，N-メチルカーバメイト系農薬 N-methylcarbamate pesticide，固相抽出 solid phase extraction，ポストカラム高速液体クロマトグラフィー post column reaction high performance liquid chromatography

緒　　言

食品衛生法の食品規格では130を超える農作物について，138農薬の残留基準が設定され，今後さらに農薬数は増加する予定である．これら多くの農薬について規格基準の遵守を監視するため，多数の検体が処理可能な迅速分析法による対応が迫られている．

残留農薬の分析法は，一般的に有機溶媒による抽出，液－液分配，脱脂や精製など煩雑な操作が多い．検査対象農薬数の増加に伴い，分析手法の効率化，簡易化が求められている．そこで，今回自動化及び，少量化を目的として，前処理に固相抽出用カラムとgel permeation chromatography (GPC) を使い，N-メチルカーバメイト農薬を対象に検討した．なお，これらの手法の検討は残留農薬迅速分析法開発検討の一環[1]として行った．

GPCはシステムの自動化で操作性が向上し，食品中の残留農薬分析の前処理に応用されている[2-7]．本報では，市販されている数種のGPCカラムを用いて，農薬と油脂成分との分離についても比較検討したので合わせて報告する．

実験方法

1．試料

玄米，じゃがいも，ほうれんそう，オレンジ，りんご，キャベツ及びたまねぎを用いた．

2．試薬

(1) N-メチルカーバメイト系農薬標準品：oxamyl, methomyl, aldicarb, bendiocarb, carbaryl (NAC), ethiofencarb, isoprocarb (MIPC), fenobcarb (BPMC), methiocarb, primicarb 各標準品をメタノールに溶解し適宜希釈して使

*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

用した.

(2) GPC 検討用標準品：fluvalinate, chinomethionat をヘキサン溶液として用いた.

(3) 有機溶媒等：高速液体クロマトグラフィー用または残留農薬分析用を用いた. その他の試薬は特級品を使用した.

(4) 固相抽出カラム：Chem Elut™(容量50ml, varian 社製), Sep-Pak® Plus Silica (以下 Silica と略す, 3 ml/500mg waters 社製), Bond Elut® SAX-PSA は, Bond Elut® SAX (3 ml/500mg, varian 社製) の下に Bond Elut® PSA (3 ml/500mg, varian 社製) を直列につないで使用した(以下SAX-PSA と略す).

(5) GPC カラム：OPTIMA™ (O. I. ANALYTICAL 社製)

3. 装置及び分析条件

(1) N-メチルカーバメイト系農薬の測定[8]

ポストカラム高速液体クロマトグラフ：カーバメイト分析システム(島津製作所社製)

カラム：ODSⅡ 4.6×150mm(島津製作所社製)

移動相：A液 メタノール-水(1：9), B液 メタノール-水(9：1)

グラジエント条件：(A液：B液) 0分(9：1)→10分(9：1)→25分(25：75)→28分(0：100)→30分(0：100)

流速：1.0ml/min, 注入量：40 μl, カラム温度：40°, 励起波長：340nm, 蛍光波長：445nm

(2) pirimicarb の測定

高速液体クロマトグラフ：LC-6AD, RF-535(島津製作所社製)

カラム：cosmosil $5C_{18}$-AR 4.6×250mm(ナカライテスク社製)

移動相：アセトニトリル→水(35：65)

流速：1.0ml/min, 注入量：10 μl, カラム温度：50°, 励起波長：312 nm, 蛍光波長：382 nm

(3) Fluvalinate, Chinomethionat の測定

ガスクロマトグラフ：GC-14A(島津製作所社製)

検出器：FTD, カラム：Silicone OV-101 3 %, 注入口温度：250°, カラム温度：250°, 検出器温度：250°, キャリアー：Heガス(40ml/min)

(4) GPC システム

GPC：AS-2000(ABC Laboratories 社製)

4. 試験溶液の調製法

細切した試料20 g (玄米は粉砕後, 水40mlを加え2時間放置)をアセトン100ml でホモジナイズし, ろ過した後, 残渣をアセトン50ml で洗った. この抽出液及び洗液を合わせ, 約30ml まで減圧濃縮し, 塩化ナトリウム9 g を加えて飽和させて, Chem Elut™に負荷した. 10分間放置後, 酢酸エチル250ml で溶出し, 減圧濃縮した. 濃縮残留物を酢酸エチル-シクロヘキサン(1：1) 5 ml に溶解後, AS-2000に装着し, その2.5ml をGPC に注入した. 酢酸エチル-シクロヘキサン(1：1)によるGPC からの農薬溶出分画液(42.5－120ml)を減圧濃縮し, アセトン4 ml に溶解し, 各2 ml をSilica 又はSAX-PSA ミニカラムで精製した.

(1) Silica ミニカラム

上記のアセトン溶液2 ml の減圧濃縮残留物を, あらかじめ溶出溶媒でコンディショニングしたカラムに50%アセトン-ヘキサン3 mlで負荷し, さらに同じ溶出溶媒15ml で溶出させた.

(2) SAX-PSA ミニカラム

アセトン40ml, 10%アセトン-ヘキサン20ml でカラムをコンディショニングした. 上記のアセトン溶液2 ml にヘキサン18ml を加え, カラムに負荷し, 10%アセトン-ヘキサン10ml で洗い込み, さらに同溶出溶媒40ml で溶出した. また, 次の分画として30%アセトン-ヘキサン50ml で溶出した.

各ミニカラムの溶出液を減圧濃縮し, メタノール1 ml で溶解した. この0.3ml を希塩酸3 ml に加え, 混合した後, 0.45 μm のフィルターに通し, 試験溶液とした.

ただし, pirimicarb については, このメタノール溶液を一定量取り, 濃縮後アセトニトリルに転溶して試験溶液とした.

5. GPC カラムの検討

農薬が溶出する分画の指標標準品としてfluvalinate およびchinomethionat を使い, GPC で10ml ずつ分画し, 濃縮後GC(FTD)で測定した. また, 油脂成分としては, 市販のコーン油を用い, その500又は1000mgを同条件で分画し, 濃縮後, 重量法により残存量を測定した. 検討したカラムの仕様と測定条件をTable 1 に示した.

結果と考察

1. Chem Elut™ による抽出

告示法[9]では, 食品からのN-メチルカーバメイト系農薬の抽出は, ホモジナイズによるアセトン抽出液を濃縮後, ジクロロメタンで液－液分配を行うが, 試料により, エマルジョンを形成するなど, 煩雑な操作となる.

今回使用したChem Elut™ は, ケイソウ土が充填された固相抽出カラムで, 液－液分配に替わる効率的な精製カラムとして開発されたものである. このカラムは操作

Table 1. Operating Conditions of GPC Columns

Column	Gel	Material	Column size	Mobile phase	Flow rate	Injection	Sample load
OPTIMA™ (O・I・Analytical)	Envirobeads™ (Styrene divinylbenzene)	Teflon	14.6mm i. d. ×385mm	EA/CH* (1:1) or EA/CP (7:3)	5.0ml/min	2.5ml	500mg
ENVIROGEL™ (Waters)	Envirogel™ (Styrene divinylbenzene)	Stainless	19mm i. d. ×150mm +19mm i. d. ×300mm	EA/CH (1:1)	5.0ml/min	2.5ml	500mg
Column A	Styrene divinylbenzene	Stainless	20mm i. d. ×300mm	acetone/CH (3:7) or EA/CH (3:7)	5.0ml/min	2.5ml	500mg
Column B	Styrene divinylbenzene	Stainless	20mm i. d. ×300mm	acetone or EA	3.0ml/min	2.5ml	500mg
Glass column (ABC Lab.)	Bio-Beads (Envirobeads™) S-X3 60 g	Glass	25mm i. d. ×700mm	EA/CH (1:1)	5.0ml/min	5.0ml	1000mg

*The abbreviations indicate EA : ethyl acetate, CH : cyclohexane, CP : cyclopentane.
Operating system : AS-2000 (ABC Laboratories)

も簡便で，一度に多数の検体が処理でき，N-メチルカーバメイト系農薬の回収率も75％以上と良好であった (Table 2)．

2．GPC カラムの検討

ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合樹脂を充填したGPC は，分子サイズによる分離を原理としており，シリカゲル等の吸着クロマトグラフィーと異なる精製効果が期待されている．油脂含量の多い試料から農薬の分離に用いられていたが，最近では，一般の試料の前処理にも応用されている[10]，また，GPC の移動相としてはジクロロメタン系溶媒の使用例も多いが，ジクロロメタンは厳しく排水規制されるなど，使用に際して環境への負担が大きいため，本分析では，移動相に酢酸エチル，シクロヘキサン，シクロペンタン，アセトンを使い検討した．

(1) 指標標準品とコーン油との分離

迅速分析検討委員会[1]では，できる限り多くの農薬を対象とした分析法を検討しており，GPC から溶出する農薬を幅広く分取するよう設定している．そのため，溶出の早い農薬としてピレスロイド系のfluvalinate，溶出の遅い農薬にキノキサリン系のchinomethionat を指標として，その溶出範囲を農薬の分画とした．著者らも，同じ指標を用い，コーン油との溶出パターンを観察した (Table 3，Table 4)．早く溶出し始めるfluvalinate とコーン油との分離を特に注目した．OPTIMA™では，酢酸エチル－シクロヘキサンを移動相したとき，酢酸エチル－シクロペンタンの場合に比べ，相対的にコーン油の溶出が早く，fluvalinate との分離はより良好であると考えられる．column A では，移動相の違いによる溶出パターンは大差が見られないが，fluvalinate が90％以上溶出する40～60ml の分画で，コーン油の溶出量も多く，OPTIMA™ やENVIROGEL™ に比べ分離は多少悪かった．column B では酢酸エチルを移動相とした場合，fluvalinate 及びコーン油が最も多く溶出する分画 (50～60ml) が重なり，良好な分離は得られなかった．特にアセトンでは，fluvalinate より遅くコーン油が多量に溶出

Table 2. Recoveries of N-Methylcarbamate Pesticides with Various Columns

Column	Recovery (%) (mean±S. D., n=3)									
	Oxamyl	Material	Aldicarb	Bendiocarb	NAC	Ethiofencarb	MIPC	BPMC	Methiocarb	Pirimicarb
Chem Elut™	80.1±3.2	86.0± 2.8	83.9±4.6	76.1±5.2	84.5±2.4	79.7± 2.9	85.0±2.5	87.1±2.4	81.8±3.0	89.3±1.2
GPC (OPTIMA™) EA : CH (1:1)	98.7±1.0	97.5± 1.4	89.6±5.2	97.8±1.0	98.9±1.2	33.9±21.7	96.4±1.8	104.9±4.7	111.4±7.2	100.7±5.1
Silica	97.7±5.0	101.2± 2.0	102.4±1.1	99.5±0.6	107.9±3.6	106.7± 5.5	99.9±3.2	95.1±5.0	95.2±6.4	96.0±6.5
SAX-PSA										
10% acetone-hexane	—	73.7±15.2	97.5±4.2	92.6±4.8	95.2±6.3	90.1±10.4	97.5±6.1	90.6±6.3	91.6±4.7	92.2±3.1
30% acetone-hexane	93.1±7.7	20.2±18.3	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 3. Elution Patterns of Chinomethionat, Fluvalinate and Corn Oil from Various GPC Columns

Column	Compound	Recovery (%)[1] and Corn oil eluate (mg)[2]												
		20~30	~40	~50	~60	~70	~80	~90	~100	~110	~120	~130	~140	~150(ml)
OPTIMA™	Chinomethionat	-	-	-	-	-	34.3	62.0	3.6	tr**	-			
EA/CH* (1:1)	Fluvalinate	-	1.0	86.9	11.0	1.2	-	-	-	-	-			
	Corn oil	13	354	62	10	7	7	6	6	4	3			
	Chinomethionat	-	-	-	-	-	-	68.2	29.6	2.1	tr			
EA/CP (7:3)	Fluvalinate	-	-	69.9	28.0	2.1	tr	-	-	-	-			
	Corn oil	0	253	173	14	11	6	4	1	1	1			
Envirogel™	Chinomethionat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87.9	10.6	1.4	-
EA/CH (1:1)	Fluvalinate	-	-	-	-	29.3	69.6	1.0	-	-	-	-	-	-
	Corn oil	-	-	1	70	371	18	11	7	5	4	3	3	1
Column A	Chinomethionat	-	-	-	-	-	1.6	78.3	18.2	tr	-			
Aetone/CH (3:7)	Fluvalinate	-	-	31.2	63.4	4.4	-	-	-	-	-			
	Corn oil	-	1	334	103	5	4	4	3	3	2			
	Chinomethionat	-	-	-	-	-	40.4	51.3	5.5	2.8	tr			
EA/CH (3:7)	Fluvalinate	-	-	34.4	62.9	2.7	tr	-	-	-	-			
	Corn oil	-	10	293	137	11	3	2	2	1	1			
Column B	Chinomethionat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	90.1	9.4	-
Acetone	Fluvalinate	-	-	-	-	93.9	6.1	-	-	-	-	-	-	-
	Corn oil	0	0	1	1	6	337	92	13	6	4	5	3	1
	Chinomethionat	-	-	-	-	-	-	0.3	87.7	11.8	1.1	-	-	
EA	Fluvalinate	-	-	-	78.4	20.3	1.3	-	-	-	-	-	-	
	Corn oil	0	0	3	348	114	19	10	7	5	2	1	2	

1) Value means relative recovery.
2) Five hundred milligrams corn oil was injected into a GPC column. Each fraction was evaporated and the residue was weighed.
*The abbreviations were shown in Table 1.
**tr : below 0.1%

Table 4. Elution Patterns of Chinomethionat, luvalinate and Corn Oil from GPC Glass Column

Column	Compound	Recovery (%)[1] and Corn oil eluate (mg)[2]													
		90~100	~110	~120	~130	~140	~150	~160	~170	~180	~190	~200	~210	~220	~230	~240(ml)
Glass column	Chinomethionat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	18.6	57.8	19.6	2.8	-
EA/CH* (1:1)	Fluvalinate	-	-	65.4	33.2	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Corn oil	317	288	168	62	13	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1

1) Value means relative recovery.
2) One thuosand milligrams corn oil was injected into a GPC glass column. Each fraction was evaporated and the residue was weighed.
*The abbreviations were shown in Table 1.

するため分離が不可能であった．ガラスカラムはカラム内容量が大きく，負荷量も大きくできるが，溶出液量が増え，また溶出に要する時間もかかるなど，操作性に問題が残った．

種々のGPC カラムでFluvalinate が50%～100%回収できる分画におけるコーン油残存量をTable 5 に示したが，酢酸エチル－シクロヘキサン（1 ： 1）を移動相としたOPTIMA™ やENVIROGEL™ カラムが，よりコーン油の除去に効果的であった．そこで今回，溶出時間が短く，少ない溶媒使用量で溶出できること，カラム材質がテフロン製であるため，外からゲルの状態が観察できる等の点から，酢酸エチル－シクロヘキサン（1 ： 1）を移動相としたOPTIMA™ カラムを使用することとした．

(2) OPTIMA™ カラムによるN-メチルカーバメイト

Table 5. Recoveries of Chinomethionat, Fluvalinate and Corn Oil Eluate in Various GPC Fraction

Column	Fraction (ml)	Recovery (%) chinomethionat	Recovery (%) fluvalinate	Corn oil eluate[1] (mg)
OPTIMA™ EA/CH (1:1)	40 -120	96.4	93.1	27
	42.5-120	93.9	62.7	20
	45 -120	98.8	50.1	18
OPTIMA™ EA/CP (7:3)	40 -120	99.7	91.2	55
	45 -120	96.6	33.9	27
ENVIROGEL™ EA/CH* (1:1)	70 -150	97.4	91.2	16
	65 -150	100.1	98.3	33
Column A Acetone/CH (3:7)	50 -120	92.2	58.7	32
Column A EA/CH (3:7)	45 -130	99.0	100.7	79
	50 -130	98.9	49.2	37
Column B EA	50 -130	96.0	95.7	229
	55 -130	98.9	90.4	90
Column B Acetone	65 -150	99.1	45.0	237
GPC Glass EA/CH (1:1)	100 -250	91.9	95.5	85

1) Corn oil was injected into GPC glass column (500mg) and another GPC column (250mg).
The abbreviations were shown in Table 1.

系農薬の溶出

酢酸エチル－シクロヘキサン(1：1)を移動相としたとき，N-メチルカーバメイト系農薬は，ほぼ50-90mlの分画に溶出した(Table 6)．N-メチルカーバメイト系農薬のみを対象として分析する場合，本画分の分取により，コーン油などの油脂との分離にも優れ，簡易に分析できた．

一方，有機リン系，有機塩素系及びピレスロイド系農薬など他の種類の農薬も同時に分析することを考慮し，指標のfluvalinateが50%以上回収でき，chinomethionat

Table 6. Elution Patterns of N-Methylcarbamate Pesticides from OPTIMA™ GPC Column

Pesticide	Recovery (%)[1] 30～40	～50	～60	～70	～80	～90	～100	～110 (ml)
Oxamyl	-	-	tr	76.2	23.7	-	-	-
Methomyl	-	-	-	39.3	58.5	2.2	-	-
Aldicarb	-	-	31.5	68.4	tr	-	-	-
Bendiocarb	-	-	43.2	56.7	-	-	-	-
NAC	-	-	24.3	64.8	10.9	-	-	-
Ethiofencarb	-	-	20.0	80.0	-	-	-	-
MIPC	-	-	61.9	31.1	7.0	-	-	-
BPMC	-	-	87.6	12.4	-	-	-	-
Methiocarb	-	-	22.1	77.8	tr	-	-	-
Pirimicarb	-	-	tr	55.0	43.1	1.8	-	-

1) Value means relative recovery.
tr : trace, Mobile phase : ethyl acetate/cyclohexane (1:1)
Conditions : see Table 1.

がおよそ100％回収できる42.5-120ml をGPC からの分取範囲として検討した．この分画での回収率はethiofencarb の34％を除きいずれも90％以上であった(Table 2)．

3．固相抽出ミニカラム

固相抽出を利用したカラムは，使用溶媒の少量化や操作の簡便化が可能なことから残留分析などの精製に利用されている．Sep-Pak® Plus Silica は迅速分析法検討の中で種々の農薬の精製に良好な結果が得られている[1]，N-メチルカーバメイト系農薬についても，Silica より50％アセトン-ヘキサン18ml で溶出し，いずれも95％以上と良好な結果が得られた(Table 2)．

さらに，Luke 法の精製操作で採用されているSAX-PSA ミニカラム[11]の利用を試みた．10％アセトン-ヘキサンの溶出では，oxamyl やmethomyl 等の極性の高い化合物が完全に溶出されなかったため，次いで30％アセトン-ヘキサンでの溶出を行ったところ，N-メチルカーバメイト系農薬は90％以上回収された(Table 2)．

本分析法によるHPLC の典型的なクロマトグラムをFig. 1 及びFig. 2 に示した．今回分析した試料で，オレンジを除いて夾雑物による妨害は認められなかった．オレンジではBPMC, methiocarb のリテンションタイムの付近に妨害ピークが認められたので，永山ら[8]の方法に従いHPLC の測定条件を変えて分析した．

4．添加回収実験

あらかじめ，N-メチルカーバメイト系農薬が検出されないことを確認した試料20 g に，各農薬が0.2ppm となるように添加(10ppm アセトン溶液を0.4ml)し，30分間放置後，本法に従い分析した．本法での添加回収率をTable 7 に示した．ethiofencarb, aldicarb 及びmethiocarb が一部の試料で回収率が低い傾向が見られたが，これは操作中に酸化されてスルホキシド体になった可能性がある[1,8]．また，オレンジ，りんごでprimicarb の回収率が低かったが，これらの酸性試料からのアセトンへの抽出効率が悪いためと考えられる[1]．その他のN-メチルカーバメイト系農薬は60～100％の回収率が得られた．

今回検討した迅速分析法は，操作も簡便で，効率的に多数の検体処理が可能であり，スクリーニング法としても十分活用できるものと考える．

ま と め

食品中の残留農薬の迅速分析法をN-メチルカーバメイト系農薬を用いて検討した．

試料のアセトン抽出液を濃縮後，固相抽出カラムの

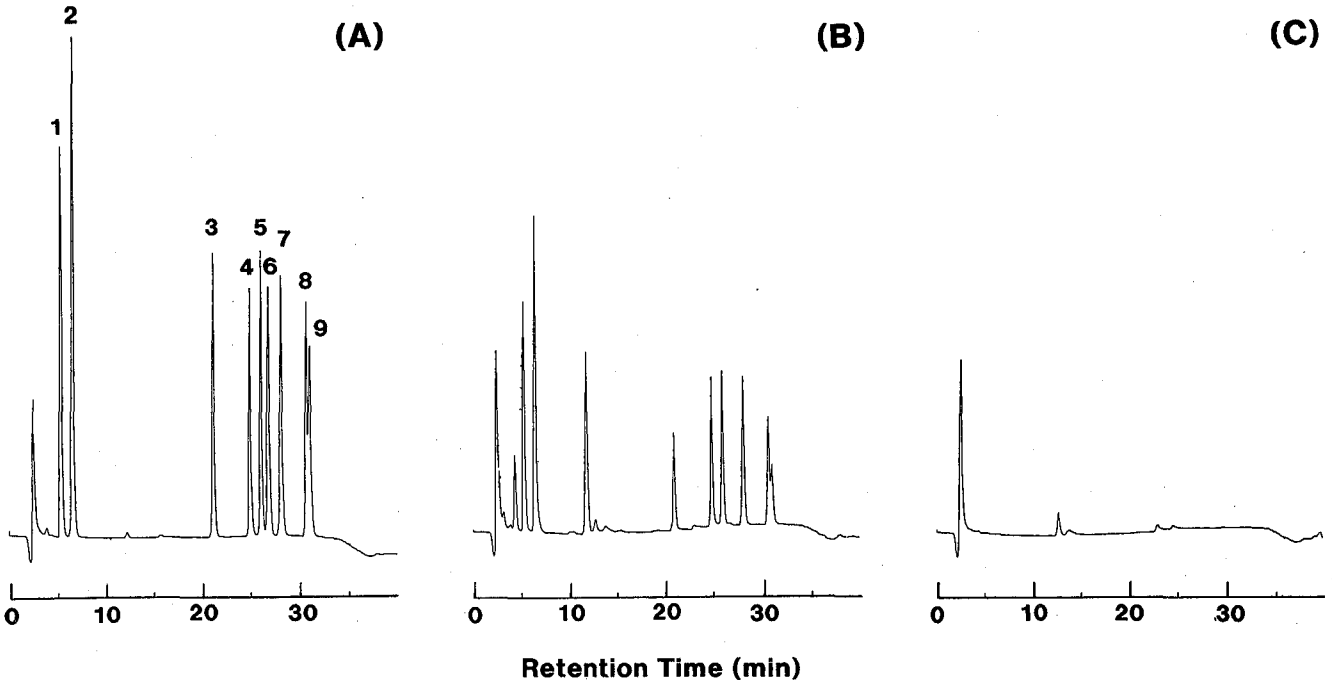


Fig. 1 HPLC chromatograms of N-methylcarbamate pesticides and brown rice extract cleaned up by Sep-Pak® Plus silica after GPC
(A) standard, (B) added to brown rice (0.2ppm), (C) brown rice blank
peaks ; 1 : oxamyl, 2 : methomyl, 3 : aldicarb, 4 : bendiocarb, 5 : NAC, 6 : ethiofencarb, 7 : MIPC, 8 : BPMC, 9 : methiocarb

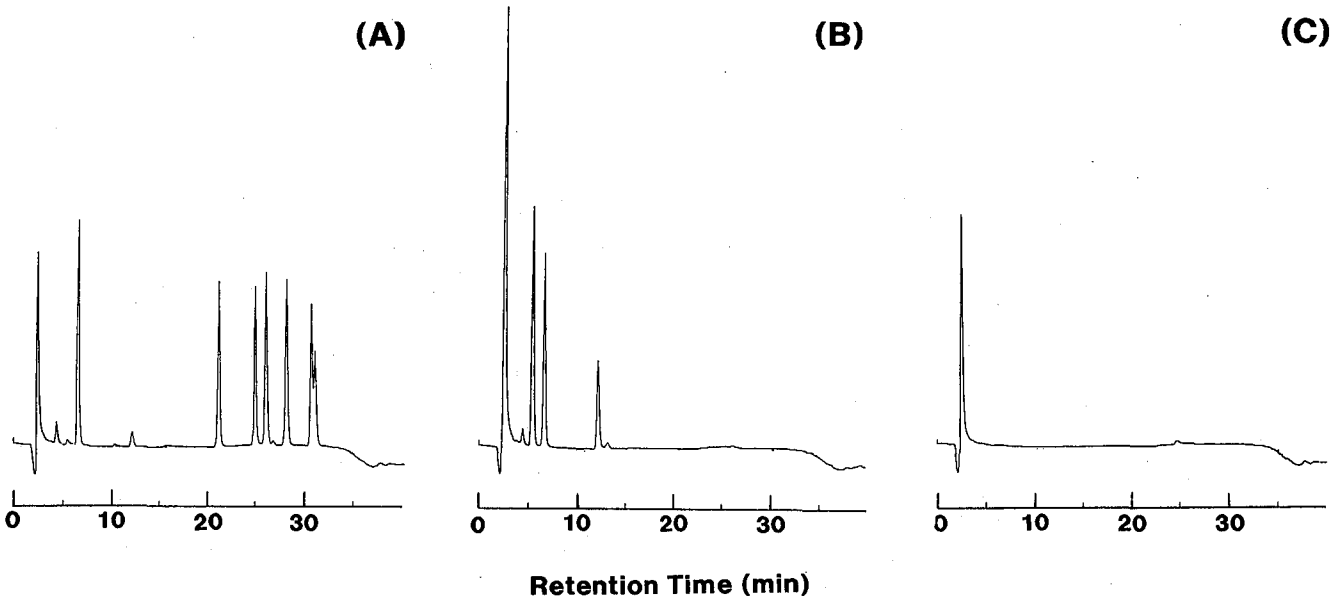


Fig. 2 HPLC chromatograms of brown rice extract cleaned up by Bond Elut® SAX-PSA after GPC added to brown rice (0.2ppm) (A) 10 % acetone-hexane fraction, (B) 30 % acetone-hexane fraction, (C) brown rice blank (10 % acetone-hexane)

Table 7. Recoveries of N-Methylcarbamate Pesticides from spiked Samples

Sample		Recovery (%) (Mean±S. D., n=3, 0.2ppm spiked)									
		Oxamyl	Methomyl	Aldicarb	Bendiocarb	NAC	Ethiofencarb	MIPC	BPMC	Methiocarb	Pirimicarb
Brown rice	SAX-PSA[1]	tr (62.2± 2.7)[2]	47.1±25.5 (66.8± 8.7)	50.7±17.5	65.2± 8.0	62.8± 7.9	14.0±12.3	66.2±10.9	59.6± 5.7	55.1±12.3	89.1±11.8
	Silica	66.1± 8.4	62.6± 5.9	24.3± 0.8	58.8± 3.2	53.5± 1.8	tr	55.8± 1.5	45.5± 1.4	33.1± 3.0	61.4±22.8
Potato	SAX-PSA	tr (87.1± 7.8)	91.6± 2.4 (94.5± 3.0)	56.4± 4.4	94.3± 2.5	95.4± 1.8	2.2± 2.4	88.3± 5.8	81.6± 3.5	83.1± 2.1	87.5± 1.6
	Silica	100.9± 4.8	93.2± 0.4	43.8± 6.1	91.0± 4.3	91.9± 1.9	3.3± 2.9	84.8± 6.6	80.6± 5.6	77.7± 1.5	94.9± 5.7
Spinach	SAX-PSA	0.4± 0.8 (76.5±33.0)	32.0±41.5 (70.0±25.1)	35.9± 1.9	80.5± 4.6	73.1± 8.4	7.6± 6.7	79.6± 5.2	72.5± 6.4	63.0± 1.3	70.5±31.3
	Silica	88.7±12.7	87.6± 2.9	41.2±19.8	83.5± 7.9	77.0± 7.5	4.3± 4.9	83.1± 8.9	79.7± 9.1	63.2± 3.0	68.9± 2.4
Orange	SAX-PSA	ND (48.9±13.4)	41.4±11.7 (64.7±20.8)	71.1±16.6	76.0±11.1	74.8±15.4	38.3± 4.8	71.4±10.2	79.1±10.8	81.0± 6.2	8.6± 3.4
	Silica	49.7±11.3	65.5±6.2	49.9±30.3	77.1± 2.1	74.8± 0.6	10.4± 6.9	69.2± 0.2	70.3± 2.8	66.8± 4.3	5.0± 1.7
Apple	SAX-PSA	1.0± 1.7 (86.4±14.0)	34.2±25.2 (75.5±19.8)	36.4±25.7	78.8± 8.3	74.6± 5.8	2.5± 4.4	83.4±18.7	76.1± 8.9	69.2± 9.2	29.1±24.0
	Silica	83.1± 1.0	79.8±3.0	26.5± 6.8	79.3± 4.6	76.5± 5.0	ND	74.4± 3.3	77.1± 5.0	62.4± 5.8	33.3±20.8
Cabbage	SAX-PSA	tr (92.8± 9.6)	63.2±27.4 (86.8±9.8)	83.2±11.4	81.3± 6.0	82.2± 2.0	24.8± 7.9	80.4± 8.1	73.9± 5.4	73.0± 0.8	93.0± 5.3
	Silica	84.5± 4.3	93.3±15.4	66.9± 8.5	81.8± 5.6	77.0±12.6	26.2± 8.5	80.9± 9.4	77.9±14.2	80.5±12.0	87.0± 5.8
Onion	SAX-PSA	tr (83.8±14.3)	40.3±28.3 (79.6±15.0)	44.5± 4.8	78.1±13.0	78.0±11.7	28.3± 5.2	72.3±16.5	64.5±13.4	64.0±11.2	89.7±18.4
	Silica	81.1±12.1	90.1±20.5	34.4± 3.5	75.6±10.9	75.5±10.1	17.7± 2.7	72.2± 8.5	65.5± 6.4	62.3±12.8	81.7±12.6

1) Values were recoveries of 10% acetone-hexane elution.

2) Values in parentheses indicate the total recovery of 10% acetone-hexane and 30% acetone-hexane elution.

tr : trace, ND : not detected

Chem Elut™ に負荷し，酢酸エチルで抽出した．精製は移動相として酢酸エチルーシクロヘキサン(1：1)を用いたGPC と固相抽出ミニカラムのSep-Pak® Plus Silica 又はBond Elut® SAX-PSA で行った．試験溶液はポストカラムHPLC で分析した．

抽出，精製に固相抽出カラムやGPC を使用することにより，操作の簡便化，多数の検体の迅速な処理が可能となった．GPC カラムには，現在のところOPTIMA™ 及びENVIROGEL™ が酢酸エチルーシクロヘキサン(1：1)を移動相として用いたとき，油脂との分離が比較的優れていた．

本法による添加回収実験では，操作中に酸化されやすいethiofencarb, aldicarb 及びmethiocarb や，りんご，オレンジなど酸性試料からの抽出効率が悪いpirimicarb を除き，60～100％の回収が得られた．

今回検討した迅速分析法は，食品中の残留農薬のスクリーニング法として十分活用できると考える．

文　献

1) 残留農薬簡易分析法開発委員会：食品衛生研究，**45**, 31-49, 1995

2) 斉藤　勲，岡　尚男，高橋弘明　他：愛知衛所報，**31**, 19-23, 1981

3) S. J. Chamberlain：*Analyst* **115**, 1161-1165, 1990

4) 斉藤行雄，山本　敦，水上英一：富山衛研年報，**16**, 210-214, 1993

5) D. M. Holstege, D. L. Scharberg. E. R. Tor *et al* : *J, AOAC Int.*, **77**, 1263-1274, 1994

6) 斉藤　勲，山田貞二，大島晴美　他：日本農薬学会誌，**20**, 109-118, 1995

7) 中村優美子，津村ゆかり，外海泰秀　他：食衛誌，**37**, 151-157, 1996

8) 永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子　他：食衛誌，**35**, 470-478, 1994

9) 厚生省生活衛生局：食品衛生小六法，平成８年度版，467-471

10) 石井康雄，足立教好，谷内純一　他：日本農薬学会誌，**15**, 225-230, 1990

11) 堀　伸二郎：月刊フードケミカル，**4**，30-40, 1996

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 156-163, 1996

国内産野菜及び野菜漬物中の残留農業

大橋則雄*, 斉藤和夫*, 大石充男*,
田口信夫*, 荻原勉*, 山嶋裕季子**,
藤井孝*, 二島太一郎***, 田村行弘*

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Pickles

NORIO OHASHI*, KAZUO SAITO*, MITSUO OHISHI*,
NOBUO TAGUCHI*, TSUTOMU OGIWARA*, YUKIKO YAMAJIMA**,
TAKASHI FUJII**, TAICHIRO NISHIMA*** and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：残留農薬 pesticide residue, 野菜 vegetables, 漬物野菜 pickles, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticides, 有機リン系農薬 organophosphorous pesticides, カルバメート系農薬 carbamate pesticides, 殺虫剤 insecticides, 殺菌剤 fungicides

はじめに

食品衛生法の改正により農薬の残留基準が年々増加する一方，残留基準が設定されていない作物から農薬がしばしば検出される．食品の安全性確保の観点から，農薬の適正な使用を確認するための定期的な残留農薬調査は重要である．

今回，平成6年度及び7年度に多摩地区で流通している国内産野菜の残留農薬調査を行った．また，平成7年度に武蔵野市内の露地売り野菜の残留農薬調査を行ったので，その結果を含めて報告する．

さらに，平成6年度及び7年度に国内産野菜を用いた加工品のうち浅漬けを対象とした残留農薬調査を行った．野菜を材料とした漬物加工品については，残留農薬の分析法[1]は検討されているが，調査報告例[2),3)]は比較的少ない．そこで，その調査結果も報告する．

実験の部

1．試料

平成6年度及び7年度にかけて，東京都多摩地区において流通している国内産野菜14種77作物(露地売り野菜7種15作物を含む)及び漬物加工品8種40検体を試料とした．調査した品名と試料数をTable 1に示す．

2．調査農薬

有機リン系農薬19種，有機塩素系農薬22種及び代謝物1種，カルバメート系農薬5種の計47種を対象とした．その内訳をTable 2に示す．

3．機器

(1)キャピラリーガスクロマトグラフ：ヒューレット・パッカード社製HP5890，検出器ECD及びFPD

(2)ガスクロマトグラフ・質量分析計：Finnigan Mat社製TRACKER^{TM}

4．分析方法

平成4年厚生省告示第239号，残留農薬分析法[4]，増補残留農薬分析法[5]及び残留農薬分析法Draft[6]等に準じた．

結果及び考察

1．国内産野菜

(1) 有機塩素系農薬

平成6年度は，Table 3に示した10種32作物中7種14

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

Table 1. The List of Domestic Vegetables and Pickles Inverstigated

Vegetable	No. of sample			
	Domestic vagetable		Pickles	
	1994.4 -1995.3	1995.4 -1996.3	1994.4 -1995.3	1995.4 -1996.3
Chinese cabbage (Hakusai)	7	6	4	—*
Cucumber (Kyuuri)	6	8	4	7
Cabbage (Kyabetu)	6	8	3	—
Lettuce (Retasu)	5	3	—	—
Tomato	2	4	—	—
Piment (Piman)	1	4	—	—
Turnip (Kabu)	2	—	3	7
Celeriac (Serori)	—	2	—	7
Japanese radish (Daikon)	1	2	3	—
Broccoli	—	3	—	—
Spinach (Hourensou)	—	3	—	—
Komatsuna	—	2	—	—
Oriental pickling melon (Sirouri)	1	—	1	—
Carrot (Ninjin)	1	—	1	—
Total	32	45	19	21

*not investigated

Table 2. The List of Investigated Pesticide

Organophosphorous pesticide	
Insecticide : EPN. Chlorpyrifos. Chlorfenvinphos (CVP-*E*, *Z*), Dichlorvos (DDVP), Dimethoate, Diazinon. Parathion, Fenitrothion (MEP), Fenthion (MPP), Phenthoate (PAP), Phosalone, Malathion. Salithion, Cyanophos (CYAP), Prothiofos, Methidathion (DMTP), Ethion, Thiomethon	19 kinds
Organochlorine pesticide	
Insecticide : α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, *p p'*-DDT, *p p'*-DDE, *p p'*-DDD, *o p'*-DDT, Dieldrin. Endrin, Aldrin, Heptachlor, Heptachorepoxide, Dicofol, α-endosulfan, β-endosulfan, Chlorobenzilate	17 kinds
Fungicide : Captan, Captafol, Chlorothalonil (TPN), Procymidone, Quintozene (PCNB)	5 kinds
Metabolite : Endosulfan sulfate	1 kind
Carbamate pesticide	
Insecticide : Carbaryl (NAC), Isoprocarb (MIPC), Thiobencarb, Fenobucarb (BPMC), Carbofuran	5 kinds
Total	47 kinds

作物から3種の有機塩素系農薬及び1種の代謝物が検出された.

プロシミドンはキュウリの6作物全てから, 0.01ppm未満から0.02ppmの範囲で検出され, トマト, ピーマンの各1作物から0.01ppm未満で検出された. クロロタロニル(TPN)はハクサイ2作物, キュウリ及びレタスの各1作物から0.01ppm未満で検出された. β-エンドサルファンはキュウリから0.01ppm未満, ピーマンから0.20ppm検出された. 同時に, 両作物からエンドサルファンの代謝物であるエンドサルファンサルフェートが検出された. エンドサルファンサルフェートはカブ2作物からも0.01ppm未満で検出された.

平成7年度は, Table 4に示した11種45作物中8種14作物から5種の有機塩素系農薬及び1種の代謝物が検出された.

Table 3. Residues of Organochlorine Pesticides in Domestic Vegetables Collected from 1994.4 to 1995.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine fungicide		Organochlorine insecticide and metabolite	
			Procymidone (ppm)	TPN (ppm)	β-endosulfan (ppm)	Endosulfan sulfate (ppm)
Chinese cabbage	7	2	—[1]	Tr.[2],Tr.	—	—
Cucumber	6	6	0.02,0.02,0.02 0.01,Tr., Tr.	Tr.	Tr.	0.04,Tr.,Tr.
Cabbage	6	0	—	—		—
Lettuce	5	1	—	Tr.	—	—
Turnip (root)	1	1	—	—	—	Tr.
(leaf)	1	1	—	—	—	Tr.
Tomato	2	1	Tr.	—	—	—
Carrot	1	0	—	—	—	—
Japanese radish (root)	1	1	—	—	—	—
Oriental pickling melon	1	0	—	—	—	—
Piment	1	1	Tr.	—	0.20	0.03
Total	32	14	—	—	—	—

1) — : not detected
2) Tr. : below 0.01ppm

Table 4. Residues of Organochlorine Pesticides in Domestic Vegetables Collected from 1995.4 to 1996.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine fungicide			Organochlorine insecticide and metabolite		
			Procymidone (ppm)	TPN (ppm)	PCNB (ppm)	α-endosulfan (ppm)	β-endosulfan (ppm)	Endosulfan sulfate (ppm)
Chinese cabbage	6	2	—[1]	0.21,Tr[2]	—	—	—	—
Cucumber	8	5	0.32,0.07, Tr., Tr.	0.27	—	—	—	—
Cabbage	8	1	Tr.	—	—	Tr.	0.01	Tr.
Lettuce	3	2	0.11	0.07	—	—	—	—
Tomato	4	1	—	0.04	—	—	—	—
Japanese radish (root)	1	0	—	—	—	—	—	—
(leaf)	1	1	—	—	Tr.	—	—	—
Piment	4	0	—	—	—	—	—	—
Broccoli	3	0	—	—	—	—	—	—
Spinach	3	1	—	—	—	—	0.02	0.17
Celeriac	2	1	—	0.13	—	—	—	—
Komatsuna	2	0	—	—	—	—	—	—
Total	45	14	—	—	—	—	—	—

1) — : not detected
2) Tr. : below 0.01ppm

プロシミドンは，キュウリ，キャベツ及びレタスの6作物より，0.01ppm未満から0.32ppmの範囲で検出された．TPNはハクサイ，キュウリ，レタス，トマト及びセロリの6作物から0.01ppm未満から0.27ppmの範囲で検出された．α－エンドサルファン及びβ-エンドサルファンはキャベツ1作物からエンドサルファンサルフェートと共に検出された．

露地売り野菜からは，キントゼン(PCNB)がダイコン1作物から0.01ppm未満で検出された．また，ホウレンソウ1作物からβ-エンドサルファン及びエンドサルファンサルフェートが検出された．

以上，平成6年度及び7年度の調査において検出された有機塩素系農薬は，プロシミドン，TPN，PCNB，α-エンドサルファン，β-エンドサルファンの5農薬で，8種25作物から検出された．また，エンドサルファンの代謝物エンドサルファンサルフェートは5種8作物から検出された．

プロシミドンはキュウリ，トマト，ピーマン，キャベツ，レタスの14作物から検出された．特に，キュウリから14作物中10作物(検出率71%)と高頻度に検出されたが，これら作物中の残留濃度は0.01ppm未満から0.32ppmと低濃度であった．TPNはハクサイ，キュウリ，レタス，トマト，セロリの10作物より0.01ppm未満から0.27ppmの範囲で検出された．プロシミドン及びTPNの検出濃度は，いずれも登録保留基準値を下回り，伊藤らの報告[7]と同様に低濃度であった．

α-エンドサルファン，β-エンドサルファン及び代謝物であるエンドサルファンサルフェートがキャベツ1作物から検出され，β-エンドサルファン及びエンドサルファンサルフェートがキュウリ，ピーマン，ホウレンソウの3作物から検出された．その他，エンドサルファンサルフェートは，キュウリ，カブ(根，葉)の4作物から検出されたが，原体農薬であるエンドサルファンは不検出であった．代謝物のエンドサルファンサルフェートを同時にスクリーニングすることは，エンドサルファンの残留確認に有効な分析方法であることが示唆された．

(2) 有機リン系農薬

平成6年度は，Table 5に示したように10種32作物中5種8作物から5種の有機リン系農薬が0.01ppm未満から0.08ppmの範囲で検出された．検出された有機リン系農薬はジメトエート，ダイアジノン，プロチオホス，フェントエート(PAP)及びEPNで，ハクサイ，キュウリ，キャベツ，トマト及びダイコンから検出された．ハクサイから検出されたプロチホス及びEPNの濃度は，残留基準値(0.1ppm)を下回った．その他は0.01ppm未満であった．

平成7年度は，Table 6に示したように11種45作物中5種7作物から5種の有機リン系農薬が0.01ppm未満か

Table 5. Residues of Organophosphorous Pesticides in Domestic Vegetables Collected from 1994. 10 to 1995.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organophosphorous insecticide				
			Dimethoate (ppm)	Diazinon (ppm)	Prothiofos (ppm)	PAP (ppm)	EPN (ppm)
Chinese cabbage	7	3	—[1)]	Tr.[2)]	0.08	—	0.06, Tr.
Cucumber	6	1	—	—	Tr.	—	—
Cabbage	6	2	Tr.	Tr.	—	—	—
Lettuce	5	0	—	—	—	—	—
Turnip (root) (leaf)	2	0	—	—	—	—	—
Tomato	2	1	—	—	—	Tr.	—
Carrot	1	0	—	—	—	—	—
Japanese radish (root)	1	1	—	Tr.	—	—	—
Oriental pickling melon	1	0	—	—	—	—	—
Piment	1	0	—	—	—	—	—
Total	32	8					

1) —：not detected

2) Tr.：below 0.01ppm

Table 6. Residues of Organophosphorous Pesticides in Domestic Vegetables Collected from 1995.4 to 1996.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organophosphorous insecticide				
			Dimethoate (ppm)	Diazinon (ppm)	Prothiofos (ppm)	DDVP (ppm)	Malathion (ppm)
Chinese cabbage	6	1	0.10	—[1]	—	—	—
Cucumber	8	2	—	—	—	0.07,Tr.[2]	—
Cabbage	8	0	—	—	—	—	—
Lettuce	3	0	—	—	—	—	—
Tomato	4	0	—	—	—	—	—
Japanese radish (root)	1	0	—	—	—	—	—
(leaf)	1	0	—	—	—	—	—
Piment	4	1	—	—	0.50	—	—
Broccoli	3	0	—	—	—	—	—
Spinach	3	1	0.98	—	—	—	—
Celeriac	2	2	—	0.09	—	—	0.10
Komatsuna	2	0	—	—	—	—	—
Total	45	7					

1) —：not detected
2) Tr.：below 0.01ppm

らの0.98ppmの範囲で検出された．検出された有機リン系農薬はジメトエート，ダイアジノン，プロチオホス，ジクロルボス(DDVP)及びマラチオンであった．ジメトエートが検出されたハクサイ及びホウレンソウには残留基準値は設定されていないが，いずれの検出濃度も登録保留基準値(野菜1ppm)を下回った．同様に，ダイアジノンが検出されたセロリにも残留基準は設定されていないが，登録保留基準値(野菜0.1ppm)を下回った．プロチオホスが0.50ppm検出されたピーマンには残留基準値及び登録保留基準値は設定されていないが，検出濃度は，他の野菜に設定されている残留基準値(0.1ppm及び1.0ppm)の5倍及び1/2に相当した．セロリから検出されたマラチオン及びキュウリから検出されたDDVPの検出濃度は，それぞれの残留基準値2.0ppm及び0.2ppmを下回った．

DDVPが検出されたキュウリ2作物及びジメトエートが検出されたホウレンソウは，いずれも露地売りされていたもので，これら野菜についても残留農薬調査の必要性があることが示唆された．

以上，平成6年度及び7年度の調査において有機リン系農薬7農薬が，8種15作物から検出された．

(3) カルバメート系農薬

カルバメート系農薬は全作物から検出されなかった．

2．漬物加工品

平成6年度の調査はTable 7に示すとおり，7種の加工品19検体中3種の加工品7検体から有機塩素系農薬とその代謝物及び有機リン系農薬が検出された．有機塩素系農薬では，プロシミドン，TPN及び代謝物のエンドサルファンサルフェートがキュウリ及びカブの加工品から検出された．有機リン系農薬はジメトエート及びダイアジノンがハクサイ1検体から検出された．

平成7年度はキュウリ，セロリ及びカブの3種の加工品について調査を行った．結果はTable 8に示すように，3種の加工品21検体中3種の加工品11検体から有機塩素系農薬とその代謝物及び有機リン系農薬が検出された．有機塩素系農薬は，プロシミドンがキュウリ5検体より0.01ppm未満から0.09ppmの範囲で検出された．また，TPNはセロリ及びカブの3検体から検出された．カブ加工品1検体よりPCNBが0.07ppm検出された．PCNBには残留基準値が設定されていないが，検出濃度は登録保留基準値(野菜0.08ppm)を下回った．エンドサルファンサルフェートはキュウリ及びカブの2検体から検出された．

以上，平成6年度及び7年度の調査において漬物加工品から，有機塩素系農薬のプロシミドン，TPN及びPCNBの3農薬が3種加工品から検出された．また，エンドサルファンサルフェートは2種加工品から検出され

Table 7. Residues of Organochlorine and Organophosphorous Pesticides in Pickles Collected from 1994.4 to 1995.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine fungicide		Metabolite of organochlorine insecticide	Organophosphorous insecticide	
			Procymidone (ppm)	TPN (ppm)	Endosulfan sulfate (ppm)	Dimethoate (ppm)	Diazinon (ppm)
Chinese cabbage	4	1	—[1]	—	—	0.06	Tr.
Cucumber	4	4	Tr.[2], Tr., Tr., Tr.	Tr., Tr.	Tr.	—	—
Cabbage	3	0	—	—	—	—	—
Turnip (whole)	3	2	—	—	0.02, 0.01	—	—
Carrot	1	0	—	—	—	—	—
Japanese radish (root)	3	0	—	—	—	—	—
Oriental pickling melon	1	0	—	—	—	—	—
Total	19	7					

1) —: not detected
2) Tr.: below 0.01ppm

Table 8. Residues of Organochlorine and Organophosphorous Pesticides in Pickles Collected from 1995.4 to 1996.3

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine fungicide			Metabolite of organochlorine insecticide	Organophosphorous insecticide	
			Procymidone (ppm)	TPN (ppm)	PCNB (ppm)	Endosulfan sulfate (ppm)	PAP (ppm)	Diazinon (ppm)
Cucumber	7	5	0.09, 0.04, 0.03, 0.01, 0.06	—[1]	—	0.05	—	—
Celeriac	7	2	Tr.[2]	0.01	—	—	—	0.02
Turnip (whole)	7	4	—	0.07, Tr.	0.07	0.10	0.07	—
total	21	11						

1) —: not detected
2) Tr.: below 0.01ppm

た．有機リン系農薬は，ジメトエート，ダイアジノン及びPAPが3種加工品から検出された．

プロシミドンは国内産野菜と同様にキュウリ加工品から高頻度に検出され，11検体中9検体(検出率82%)から検出された．残留濃度は0.01ppm未満から0.09ppmの範囲で，いずれも野菜の登録保留基準値(2ppm)の1/20以下であった．TPNはキュウリ，セロリ，カブの5検体，PCNBがカブ1検体から検出された．また，キュウリ，カブの5検体からエンドサルファンサルフェートが検出されたが，国内産野菜と異なりα-，β-エンドサルファンは検出されなかった．

有機リン系農薬はジメトエート，ダイアジノン，PAPがハクサイ，セロリ，カブの3検体からいずれも0.07ppm以下の濃度で検出された．ハクサイから検出されたダイアジノンの濃度は0.01ppm未満で，残留基準値の1/10以下であった．ジメトエートが検出されたハクサイ，ダイアジノンが検出されたセロリ及びPAPが検出されたカブにはいずれも残留基準は設定されていないが，検出濃度はそれぞれの野菜に設定されている登録保留基準値1.0ppm，0.1ppm，0.1ppmを下回った．

漬物加工品の水素イオン濃度を平成6年度の19検体について測定した結果，pH値は4.0から6.1の範囲で平均5.0であった．これらの有機リン系農薬は酸性では比較的安定であり，調味液に浸っていても加水分解の速度は遅いため，漬物加工品中にも残留していたと考える．また，漬物は加工する際に原材料の野菜を洗浄すると考えられるが，加工品中にも農薬の残留が確認された．

また，カルバメート系農薬は国内産野菜と同様に全検体から検出されなかった．

3．複数の農薬を検出した試料

農薬は一つの作物に各種の薬剤を組み合わせて使用されることが多く，今回の調査でも複数の農薬が同時に検出された試料を認めた．その内訳をTable 9に示す．

複数の有機塩素系農薬とその代謝物が検出された国内産野菜は3種6作物，漬物加工品は2種6検体であった．プロシミドン及びTPNが検出された試料は，キュウリ1作物，キュウリ加工品3検体及びセロリの加工品1検体であった．プロシミドン及びエンドサルファンまたはエンドサルファンサルフェートが検出されたのは，キュウリ3作物，ピーマン1作物，キャベツ1作物及びキュウリ加工品2検体であった．

有機塩素系農薬及び有機リン系農薬が同時に検出された試料は，国内産野菜の4種4作物であった．TPN及びEPNがハクサイ，プロシミドン及びプロチオホスがキュウリ，TPN及びマラチオンがセロリ，そしてプロシミドン及びPAPがトマトの各1作物から検出された．

複数の有機リン系農薬はハクサイ1作物からEPN及びプロチオホスが，キュウリ加工品1検体からジメトエート及びダイアジノンが検出された．

以上，国内産野菜では6種10作物，漬物加工品では3種7検体から複数の農薬が同時に検出された．

ま と め

1994年4月から1996年3月の期間に，多摩地区で流通していた国内産野菜及び漬物加工品中の残留農薬を調査した．

1．国内産野菜では，14種77作物中11種33作物から12種の農薬(検出率43％)が検出された．有機塩素系農薬はプロシミドン，TPN，PCNB，α-エンドサルファン，β-エンドサルファンが検出され，有機リン系農薬はジメトエート，ダイアジノン，プロチオホス，PAP，EPN，DDVP，マラチオンが検出された．これら農薬の作物中の残留濃度範囲は0.01ppm未満から0.98ppmであった．特に，プロシミドンはキュウリから14作物中10作物と高頻度に検出された．

Table 9．Organochlorine and Organophosphorous Pesticides in Domestic Vegetables and Pickles

Sample	No.of positive	Organochlorine pesticide and metabolite	Organophosphorous pesticide	
Domestic vegetable				
Chinese cabbage	1	TPN	EPN	
	1		EPN	Prothiofos
Cucumber	1	Procymidone, β-endosulfan, Endosulfan sulfate		
	1	Procymidone, Endosulfan sulfate		
	1	Procymidone, Endosulfan sulfate	Prothiofos	
	1	Procymidone, TPN		
Celeriac	1	TPN	Malathion	
Tomato	1	Procymidone	PAP	
Piment	1	Procymidone, β-endosulfan, Endosulfan sulfate		
Cabbage	1	Procymidone, α-endosulfan, β-endosulfan, Endosulfan sulfate		
Pickles				
Chinese cabbage	1		Dimethoate	Diazinon
Cucumber	3	Procymidone TPN		
	2	Procymidone, Endosulfan sulfate		
Celeriac	1	Procymidone TPN		

このうち露地売り野菜では，7種15作物中3種5作物から4種の農薬が検出された．有機塩素系農薬はPCNB及びβ-エンドサルファンが検出され，有機リン系農薬はジメトエート及びDDVPが検出された．

2．漬物加工品では，8種40作物中4種18作物から7種の農薬が検出された(検出率44%)．有機塩素系農薬のTPN,プロシミドン，PCNB，有機リン系農薬のEPN，ジメトエート，ダイアジノン，フェントエートが検出された．これら農薬の作物中の残留濃度範囲は0.01ppm未満から0.10ppmであった．

3．カルバメート系農薬は全試料から検出されなかった．

4．試料から検出された農薬の残留濃度は，残留農薬基準値及び登録保留基準値を超えなかった．

本調査は東京都衛生局食品環境指導センター多摩支所及び武蔵野保健所と共同で行ったものである。

文　献

1）農林水産消費技術センター調査報告書：**17**，1-17，1993.
2）広島県衛生研究所年報：**30**，45-47，1983.
3）横浜市衛生研究所年報：**24**，35-43，1985.
4）後藤真康，加藤誠哉：“残留農薬分析法”ソフトサイエンス社，1980.
5）後藤真康，加藤誠哉：“増補残留農薬分析法”ソフトサイエンス社，1987.
6）厚生省生活衛生局食品化学課編：“残留農薬分析法Draft”，日本食品衛生協会，1985.
7）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**46**，134-139，1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 164-168, 1996

食品用木製器具中のオルトフェニルフェノール，チアベンダゾール及びジフェニルの分析

山嶋 裕季子*，田口 信夫**，斉藤 和夫**，天川 映子**，
荻原 勉**，大橋 則雄**，大石 充男**，藤井 孝**，
竹内 正博***，大西 和夫***，二島 太一郎***，田村 行弘**

Determination of *o*-Phenylphenol, Thiabendazole and Diphenyl by High Performance Liquid Chromatography and Survey of Their Contents in Commercial Woodenware

YUKIKO YAMAJIMA*, NOBUO TAGUCHI**, KAZUO SAITO**, EIKO AMAKAWA**,
TSUTOMU OGIWARA**, NORIO OHASHI**, MITSUO OHISHI**, TAKASHI FUJII**,
MASAHIRO TAKEUCHI***, KAZUO OHNISHI***, TAICHIRO NISHIMA*** and YUKIHIRO TAMURA**

Keywords：オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, チアベンダゾール thiabendazole, ジフェニル diphenyl, 割り箸 chopsticks, 食品用木製器具 woodenware

緒　言

木，竹といった天然素材は，割り箸，まな板，しゃもじ等，食品に直接触れる器具・容器として古来から長く使用されており，また食品衛生上特別な問題もほとんど生じなかった．そのため食品衛生法の食品・添加物等規格基準においては，木製の器具・容器包装の個別規格は定められていなかった[1)2)]．また，これらについて安全性の検討及び残存する化学物質又は溶出物に関する調査・研究もほとんど行われてこなかった．

一方最近では，清潔志向が高まり，これに伴ってプラスチック製まな板，おむつ，ハンカチなどに抗菌・防かび処理を施した様々な商品が市場に出回っている．天然素材の食品用木製器具も化学物質処理されたものが出回る可能性が考えられた．

著者らは，かびの発生しにくい割り箸が流通販売されているとの情報を得た．早速，割り箸を中心に数種類の食品用木製器具を入手し，保存料，防かび剤等の分析を行った．その結果，割り箸等から防かび剤であるオルトフェニルフェノール(OPP)が検出された．

そこで，割り箸から検出されたOPP，同様に防かび剤として使用される可能性のあるチアベンダゾール(TBZ)及びジフェニル(DP)について分析法の検討を行うと共に，市販の食品用木製器具の調査を行うことにした．

この結果を平成6年5月に発表したところ[3)]，社会的な関心を集め，さらに追跡調査を行うことが求められた．そのため，発表を行った2～3カ月後に，製造国，原材料樹種等を特定できる割り箸28検体を購入し，OPP，TBZ及びDPについて，再度使用実態調査を行った．

本報では，木製品中の3種の防かび剤の分析法の検討及び本法を用いた市販品の使用実態調査結果について報告する．

実験方法

1．試料

1）東京都内で市販又は料理店で使用されている割り箸35検体，楊子・竹串5検体，巻きす2検体及びざる1検体の，合計43検体を平成5年10月に購入した．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, 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
***東京都立衛生研究所

2）東京都内で市販されている，製造国，原材料の樹種及び形状が明らかな割り箸28検体を，平成6年7月末から8月にかけて都内で購入した．

2．試薬

1）OPP，TBZ及びDP混合標準溶液：OPP，TBZは和光純薬工業(株)製の食品添加物試験用を，DPは和光純薬工業(株)製の試薬特級を使用した．各々100mgをメタノール100mlに溶解し，3種防かび剤の混合標準原液とした．本原液1mlは，OPP，TBZ及びDPを各々1000μg含有する．これを適宜メタノールで希釈して使用した．

2）ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)：和光純薬工業(株)製，和光一級

3）メタノール，アセトン，酢酸エチル，*n*-ヘキサン，酢酸，水酸化ナトリウムはいずれも試薬特級を用いた．

4）ミクロフィルター：富士フィルム製FM-45(孔径：0.45μm，素材：トリアセチルセルロース)

3．装置

1）液体クロマトグラフ(HPLC)：日本分光工業(株)製ポンプ(880-PU)，蛍光検出器(820-FP)，(株)島津製作所製データ処理装置(C-R7A)

2）ガスクロマトグラフ(GC)：(株)島津製作所製GC-17A(検出器：FID)，(株)島津製作所製データ処理装置(C-R7A)

3）ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)：GCはHewlett Packard社製5890，質量分析計はVG Instruments社製TRIO-1000

4．分析条件

1）HPLC

カラム：Finepak SIL C18(5μm，4.6mm i.d.×250mm，(株)日本分光工業製)，移動相：メタノール-水(29:11)混液に，最終濃度が0.01Mとなるようにを添加し，リン酸でpHを2.4に調整した．流速：1.0ml/min，注入量：10μl，カラム温度：室温，蛍光検出器：励起波長285nm，蛍光波長325nm

2）GC

カラム：DB-1(0.25μm，0.25mm i.d.×30m，J&W Scientific社製)，注入口温度：220℃，検出器：水素炎イオン化検出器(FID)250℃，カラム温度：40℃(1分)-20℃/分-200℃(10分)の昇温分析，注入量：1μl(スプリットレス注入法)

3）GC/MS

カラム：DB-1(0.25μm，0.25mm i.d.×30m，J&W Scientific社製)，カラム温度：40℃(1分)-20℃/分-180℃(0分)-10℃/分-280℃(10分)の昇温分析，注入量：1μl(スプリットレス注入法)

5．試験溶液の調製法

割り箸，楊子及び竹串：割り箸は1/2膳，楊子・竹串は5～10本及び巻きす・ざるは検体の一部を切り取って秤取し，25ml容共栓付き試験管に収まるように切断して入れ，メタノール20mlを加えて密栓し，手振り型振とう機で30分間振とう抽出した．この溶液をミクロフィルターでろ過し，試験溶液とした．

6．溶出試験

OPPを検出した割り箸について，食品衛生法「器具及び容器包装の規格基準」及び「おもちゃまたはその原材料」の溶出試験における溶出溶液の調製法[4]に準じて試験溶液を調製した．すなわち，試料表面積1㎠あたり2mlの水を浸出用液として，40℃，60℃及び95℃の各温度で30分間溶出を行った．この溶出液をミクロフィルターでろ過し，試験溶液とした．

結果及び考察

1．抽出溶媒及び抽出時間の検討

1）抽出溶媒の検討

OPPが検出された割り箸を用いて，割り箸から防かび剤を抽出するための抽出溶媒の検討を行った．すなわち，OPPが検出された割り箸に，メタノール，アセトン，酢酸エチル，*n*-ヘキサン，水，4%酢酸又は0.05N水酸化ナトリウム溶液の各溶媒20mlを加え，24時間浸漬して抽出した．メタノール，アセトン，酢酸エチル及び*n*-ヘキサン抽出液はGC，その他の抽出液はHPLCで測定した．その結果は図1に示したとおり，OPPはメタノールを用いた場合に最も良く抽出され，アセトン，酢酸エチル，水，4%酢酸及び0.05N水酸化ナトリウム溶液はメタノールで抽出した場合の約12～63%であり，*n*-ヘキサン

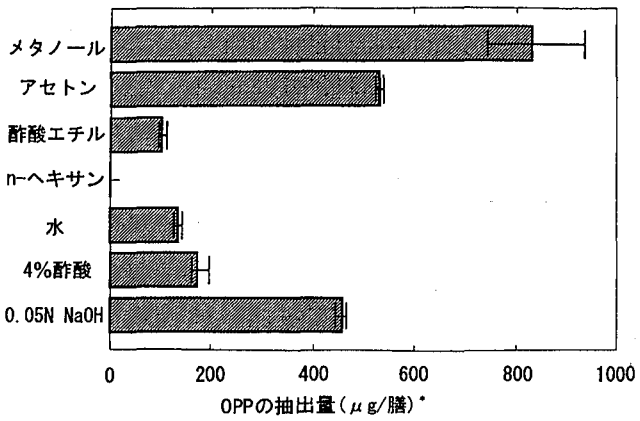


図1．抽出溶媒の検討

*OPPが検出された割り箸1/2膳を，各々の抽出溶媒20mlに24時間浸出した，3回の平均値．

ではほとんど抽出されなかった．そこで，以後の実験ではメタノールを試料抽出用の溶媒として使用することにした．

2）抽出時間の検討及び添加回収実験

抽出溶媒にメタノールを用いた場合，他の防かび剤であるTBZ及びDPも抽出されるか否か，さらに，3種の防かび剤の抽出時間による抽出量についても検討した．すなわち，防かび剤が検出されない割り箸1/2膳に，OPP,TBZ及びDP混合標準溶液を用いて各々100及び1,000 μg塗布し，1日間自然乾燥させた．この防かび剤が添加された割り箸1/2膳を25ml容共栓つき試験管に収まるように切断して入れ，メタノール20mlを加えて①振とう機で30分間振とう，②60分間振とう及び③24時間放置の3種類の方法で抽出した．

その結果，表1に示したとおり抽出時間を30分とした場合の回収率は,TBZが100，1,000 μg添加とも80%以上と最も良好で，次いでOPPの48.1～64.0%，DPは14.1～19.6%であった．また，いずれの防かび剤も，抽出時間に比例して回収率が上昇したが，抽出時間30分以上での回収率の上昇はわずかであった．したっがて，防かび剤の有無を迅速にチェックするために，抽出時間は30分間とした．

DPの回収率は24時間の抽出でも20%前後と低い値であった．この原因はDPを割り箸に塗布，乾燥中に強いDP臭があったことから，DPの相当量がメタノールで抽出する以前に揮散していたと推察する．

2．HPLC移動相の検討及びGC/MSによるOPPの確認

イオン対HPLCによる柑橘類及びバナナ中のTBZ，DP及びOPPの分析条件[5]にしたっがて試験溶液をHPLCで測定したところ，図2の試験溶液1のように竹製及び木製割り箸の一部の試験溶液で，OPP及びTBZの保持時間付近にピークが認められた．そこで柑橘類及びバナナの分析条件の移動相組成のうちアセトニトリルを除き，メタノール-水(29：11)混液に変更したところ，図3の試験溶液1のようにOPP及びTBZのピークと，他のピークは分離し，判別可能となった．

図3の試験溶液2のように，標準混合溶液のOPPの保持時間と完全に一致したピークの認められた試料については，GC/MSによる確認を行った．すなわち，図4に示したようにOPPはトータルイオンクロマトグラムの保持時間10.12分にピークが認められ，マススペクトルの分子イオンピークであるm/z 170及びフラグメントピークm/z 141，115により確認した．

したがって，以後の実験では，移動相としてメタノール-水(29：11)を用いた分析条件で測定を行うことにし

表1．割り箸からの防かび剤の添加回収実験結果

防かび剤*	抽出時間	回収率(%)		
添加量(μg)	(時間)	OPP	TBZ	DP
100	0.5	64.0	82.6	19.6
100	1.0	66.2	84.5	21.5
100	24	72.2	90.5	23.1
1,000	0.5	48.1	85.2	14.1
1,000	1.0	51.2	83.4	16.3
1,000	24	65.2	89.8	22.4

*割り箸1/2膳あたりの各防かび剤塗布量．

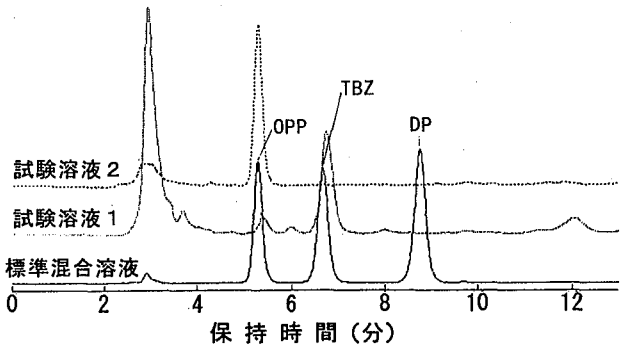


図2．柑橘類検査法のHPLC条件でのクロマトグラム
混合標準溶液：OPP 0.5ppm，TBZ 0.25ppm，DP 5.0ppm
カラム：Finepak SIL C18，移動相：0.01M SDS 含有 アセトニトリル- メタノール- 水(40：25：30)混液 pH2.4(リン酸)，流速：1.0ml/min，検出波長：励起波長 285nm，蛍光波長 325nm，カラム温度：室温，注入量：10 μl
試験溶液1：OPPを検出しなかった竹製割り箸の試験溶液
試験溶液2：OPPを検出した竹製割り箸の試験溶液

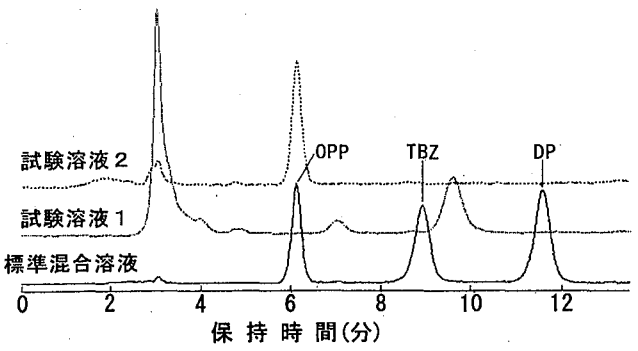


図3．本法のHPLC条件でのクロマトグラム
混合標準溶液：OPP 0.5ppm，TBZ 0.25ppm，DP 5.0ppm
カラム：Finepak SIL C18，移動相：0.01M SDS 含有 メタノール- 水(29：11)混液 pH2.4(リン酸)，流速：1.0ml/min，検出波長：励起波長 285nm，蛍光波長 325nm，カラム温度：室温，注入量：10 μl
試験溶液1：OPPを検出しなかった竹製割り箸の試験溶液
試験溶液2：OPPを検出した竹製割り箸の試験溶液

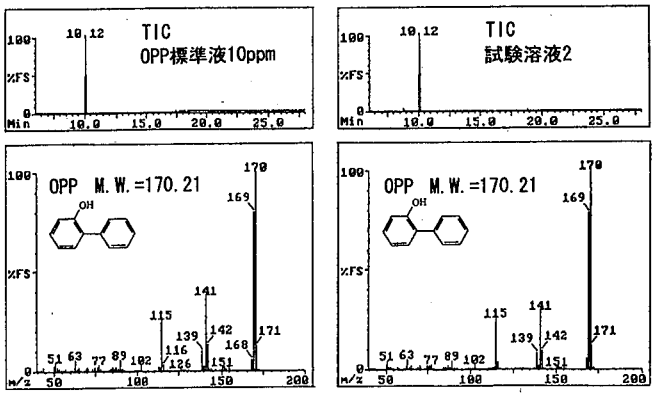


図4．GC/MSによるOPPの確認

GC/MS条件

カラム：DB-1 (30m×0.25mm i.d×0.25 μm J&W Scientific)，カラム温度：40℃（1分）- 20℃/分- 180℃（0分）- 10℃/分- 280℃(10分)，注入量：1 μl（スプレットッス注入法）

た．なお，本法による検出限度は，試験溶液濃度でOPPが0.05，TBZが0.025，そしてDPが0.5 μg/mlであり，割り箸1膳につき各々2.0，1.0，及び20 μgであった．

3．市販品の調査結果

1）平成5年度の調査

本法により割り箸をはじめとする食品用木製器具43検体について，OPP，TBZ及びDPの使用実態調査を行ったところ，表2に示したように竹製割り箸3検体，木製割り箸3検体及び巻きす1検体のあわせて7検体からOPPが検出された．OPPが検出された竹製割り箸3検体のうち2検体は，業務用品を販売する店舗で購入した徳用品で箸袋がないものであり，1検体はスーパーで購入した箸袋入りのものであった．木製割り箸は，いずれも弁当に添付された丁六[6]で，各々店名を印刷した箸袋で全体を密封されていたものであった．また，竹製の巻きす1検体からもわずかにOPPが検出された．

表2．食品用木製器具中の防かび剤の試験結果（平成5年度）*

試料	試料数	OPPを検出した試料数	1試料あたり**のOPP抽出量(μg)
竹製割り箸	20	3	8.4 380 880
木製割り箸	15	3	2.0 5.2 7.6
楊子・竹串	5	0	
巻きす	2	1	7.6
ざる	1	0	
合計	43	7	

* TBZ，DPは，いずれの試料からも検出されなかった．

** 割り箸は1膳，巻きすは1枚あたり．

したがって，食品用木製器具には，防かび剤としてOPPが使用されている実態が明らかとなった．また，割り箸においては，木製に比べてかび易いといわれる竹製のものから高濃度に検出された．なお，いずれの製品からもTBZ及びDPは検出されなかった．

2）平成6年度の調査

平成5年度に調査した結果を公表したところ，この事実は雑誌，新聞，テレビ等の報道機関で取り上げられた．その結果，当支所に各方面からOPPが検出された製品の製造国，原材料の樹種などに対する問い合わせが多数よせられた。しかし，平成5年度に調査した検体は，市販の弁当に添付されたものや食堂などで使用される割り箸も含まれていた．したっがて，ほとんどの検体は製造国，原材料の樹種等の表示が無く，これらを明らかにすることはできなかった．そこで，製造国，原材料の樹種の明らかとなった試料について調査することにした．

製造国，原材料の樹種の明らかな試料，すなわち，表3に示した日本産13検体，中国産9検体，インドネシア産5検体及びチリ産1検体の竹製及び木製の割り箸について調査した．検査の結果，竹製及び木製いずれの割り箸からもOPP，TBZ及びDPは検出されなかった．

平成6年度の調査対象とした割り箸は，先の調査結果公表後約2カ月経ってから購入したものであった．この2カ月間に，OPPが使用された割り箸は市場から速やかに回収されたため，調査した割り箸からは，3種の防かび剤は検出されなかったものと考える．したがって，平成6年度の調査においても，製造国，原材料の樹種の違いによる防かび剤の使用実態を明らかにすることはできなかった．

表3．割り箸の製造国，原材料樹種及び防かび剤の調査結果（平成6年度）

製造国	原材料樹種	試料数	防かび剤検査結果	備考
国内産	竹製	3	ND	(3)
	木製	10	ND	杉(1)，檜(2)，松(1)，エゾ松(3)，樺(3)
中国産	竹製	3	ND	(3)
	木製	6	ND	松(1)，樺(4)，アスペン(1)
インドネシア産	木製	5	ND	松(1)，メルクシ松(4)
チリ	木製	1	ND	メルクシ松(1)
合計		28		

4．割り箸の部位によるOPP量

OPPが検出された割り箸で食品を喫食する際には，食品中にOPPが溶出することが考えられる．特に，表面に残存するものが，溶出し易いと考えられるため，OPPが検出された割り箸の表面又は内側の部分のOPP量の差について検討した．

すなわち，OPPを検出した竹製割り箸1/2膳の表面部分(重量比で13%)を削り取り，残った内側の部分も同様に削って各々をメタノールで30分間振とう抽出して，ミクロフィルターでろ過した溶液をHPLCで分析した．その結果，表面部分のOPP量は120 μg/g，内側部分は21 μg/gであり，表面部分は内側部分の約6倍含まれていたことがわかった．OPPはこの割り箸の表面部分に多く含まれており，食品を喫食する際に，食品中に溶出する可能性が高いことが示唆された．また，この結果からOPPが検出された竹製割り箸の原材料である原木にOPPが使用されたのではなく，箸に成形した後にOPP処理されていたことも明らかになった．

5．溶出試験

竹製割り箸から検出されたOPPは，内側部分に比べて表面部分に多く含まれていたことから，このような割り箸を用いて食品を喫食する場合，食品中にOPPが溶出され易いと考えられる．そこで，実際に食品を喫食する際にOPPがどの程度食品中に溶出するかを想定するために溶出試験を行った．現在，器具・容器包装の規格基準では，木製品，竹製品といった天然素材については，着色料以外の規格が無いため[2]，OPPが検出された割り箸を試料とした溶出試験は，合成樹脂の浸出条件[4]を参考に，浸出用液に水を用いて30分間の条件で行った．結果は図5に示すとおり，OPPは40℃の水でも，メタノールで抽出した場合の約30%，60℃では約50%，95℃では約80%が溶出され，温度の上昇に伴いOPP溶出量は増加した．

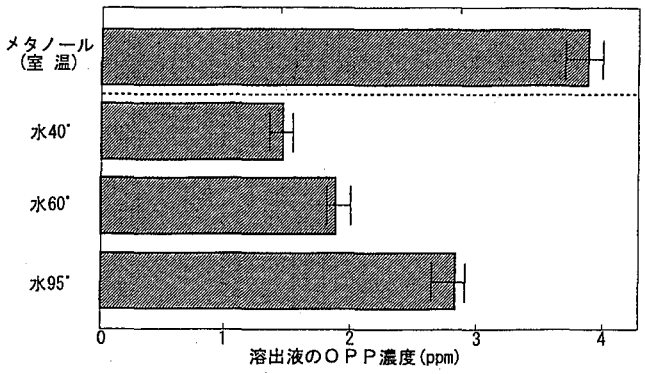


図5．溶出試験*

*試料表面積1 ㎠あたり2 mlの水で30分間浸出した，3回の平均値

以上の結果から，OPPを使用した割り箸を食事に使用した場合，食品中にOPPが溶出して人が摂取する可能性が高いと考えられる．

ま と め

HPLCを用いた，割り箸等食品用木製品からの防かび剤OPP，TBZ及びDPのスクリーニング分析法の検討を行った．抽出溶媒にメタノールを用い，30分間振とう抽出した溶液を，HPLCで分析した．HPLC条件は，カラムにFine-pak SIL C18，移動相は，TBZに対する対イオン試薬としてSDSを含有したメタノール-水(29：11)混液をリン酸でpH2.4に調製したもの，検出には，蛍光検出器を用いた．本法により，割り箸等の木製品は妨害物による影響もなく分析できた．また，割り箸に3種の防かび剤を添加して回収実験を行ったところ，回収率はOPPで50～60%，TBZで80～90%，DPで15～20%であった．

本法により，都内で入手した割り箸等食品用木製品43検体について3種の防かび剤の使用実態調査を行ったところ，竹製割り箸3検体，木製割り箸3検体及び巻きす1検体より，1試料あたり2.0～880 μgのOPPが検出された．さらに，OPPが割り箸に使用されていることが公表された後に，製造国，原材料樹種等が明らかな割り箸28検体を購入して再調査したところ，いずれからもOPP，TBZ及びDPは検出されなかった．OPPが検出された割り箸は，表面部分にOPPが多く残存していたため，この割り箸について水を浸出用液とした溶出試験を行ったところ，メタノール溶出の30～80%が溶出した．

(本研究の概要は日本食品衛生学会第67回学術講演会(平成6年5月13日)で発表した．)

文 献

1）河村葉子，船越かやの，杉田たき子，他：食衛誌，**36**，731-737，1995.
2）厚生省環境衛生局長通知，環食第52号，昭和57年2月27日.
3）山嶋裕季子，田口信夫，竹内正博，他：日本食品衛生学会第67回学術講演会講演要旨集，21，1994.
4）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法　平成8年版，1212，1236-1241，1995，新日本法規出版，東京.
5）中里光男，斎藤和夫，菊地洋子，他：衛生化学，**34**，401-407，1988.
6）一色八郎：箸，22-25，1991，保育社，大阪.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 169-174, 1996

プラスチック製マグカップ等に封入された保冷剤の鑑別法

渡 辺 悠 二*

Identification of Enclosed Coolants in Plastic Products by IR Spectroscopy

YUJI WATANABE*

Keywords：マグカップ mug cup，ジョッキ jug，プラスチック plastic product，保冷剤 coolant，赤外吸収スペクトル法 infrared absorption spectroscopy

はじめに

最近，保冷剤を封入したマグカップ，ジョッキ等のプラスチック製品が市販されている．この製品は二重になっている間隙に保冷剤を封入したもので，長時間冷凍室に入れ使用直前に取り出して使用する．ところが，平成7年6月一般消費者が食品メーカーの景品のマグカップを使用の際異味を感じ，その後下痢症状を見たので，カップを調べたところひび割れを生じていたとして消費者センターに届け出る事例が起きた．このようなプラスチック製品については，食品衛生法に基づく器具・容器包装の規格基準が適用されるが，保冷剤については直接食品に接触しないことから法規制の対象とはなっていない．

そこで，厚生省は平成7年，食品の安全性確保の観点から，これら製品の材質や保冷剤の種類等の実態調査を行っている[1)]．調査の結果を見ると，使用されているプラスチックや保冷剤の種類はおおむね明らかにされたが，食品衛生上これら成分等の確認を行うことは重要であることから，著者はプラスチックの材質および保冷剤の鑑別法の検討を行ったので報告する．

実験の部

1．試料

ジョッキ　：2試料(国産品 1，輸入品 1)

マグカップ：4試料(国産品 1，輸入品 3)

なお，試料はすべて国立衛生試験所の提供品である．

2．装置

日本バイオラッド・ラボラトリーズ(株)製FTS-175型フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)．

3．材質の鑑別

1）試験片の調製　試料の一部を切り取り，クロロホルムを加えて溶解後，液をガラス板上に流し込み，溶媒を揮散させてフィルムを作成しこれを試験片とした(薄膜法)．

2）赤外吸収(以下，IRと略す)スペクトルの測定　得られたフィルムについてIRスペクトル(波長4000～400cm^{-1})を測定する．得られたIRスペクトルをプラスチックの標準IRスペクトルと比較し鑑別を行った．

4．保冷剤の鑑別

1）標準物質(保冷剤)

(1)エチレングリコール(以下EGと略す，以下同じ)

(2)プロピレングリコール(PG)

(3)ジエチレングリコール(DEG)

(4)ポリビニルアルコール(PVA)：重合度500

(5)カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)

(6)メチルセルロース(MC)：メトローズ SM-15，SM-400の2種

(7)カルボキシビニルポリマー(CVP)：ハイビスワコー103，104，105の3種

(8)安息香酸ナトリウム(BA)

なお，標準物質1～5，8は和光純薬製試薬，6，7は国立衛生試験所の提供品である．

2）試料中の保冷剤の採取

試料を破砕して封入されている保冷剤をビーカーに採

*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

取し，液量，粘性の有無等の性状を観察した．

3）保冷剤の前処理およびIRスペクトルの測定

保冷剤約100mlを蒸発皿に取り，水浴上で蒸発乾固する．残査物が粉状固形物の場合，残査物をメノウ鉢にかき取り，赤外用臭化カリウム(KBr)を適当量加えて良く混和後，KBr錠剤(径7 mmφ)を作成し，IRスペクトルを測定した．濃縮中，液が粘性を帯び，表面に膜を張ってきた場合はガラス棒で時々かく拌しながら濃縮する．濃縮後残査物にアセトン約20mlを加えて混和後，デカンテーションを行う．この操作を3回行う．得られたアセトン溶液は再びアセトンおよび水が完全に蒸発するまで濃縮し，得られた残査物をそのまま赤外用試料とする．アセトン不溶分が認められた場合，同様に溶媒が完全に蒸発するまで濃縮し，その残査物を赤外用試料とした．得られた赤外用試料はKBr窓板を用いる薄膜法によりIRスペクトルを測定した．

得られたIRスペクトルを標準IRスペクトルと比較し保冷剤の判別を行った．

結果および考察

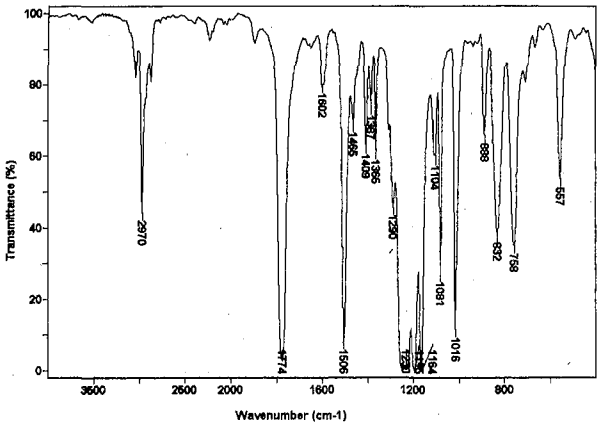
1．試料(プラスチック製マグカップ等)の材質

図1に試料のIRスペクトルを示してある．

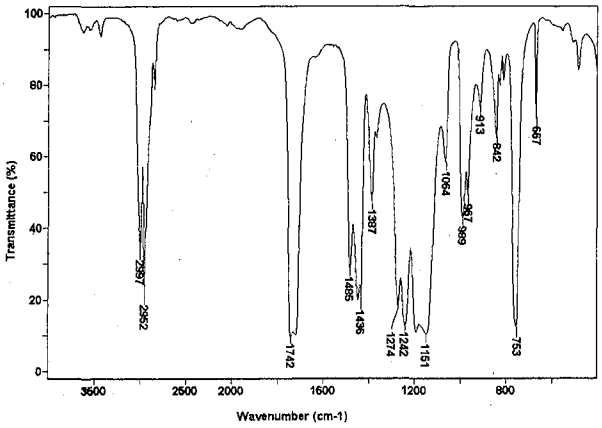
厚生省の調査によると，マグカップ等の保冷剤封入のプラスチック(表示原料樹脂)にはポリカーボネート(PC)およびメタクリル樹脂系(アクリル樹脂を含む)が多く使用され，ポリエチレン，ポリスチレンがわずかに使用されている．

そこで，今回用いた試料における材質表示と鑑別結果を示すと表のようになる．鑑別の結果，胴部(内側)はPC：3試料(No. 1， 3， 4)，メタクリル酸メチル(MMA)-スチレン共重合物(MS)：2試料(No. 2， 6)，ポリメタクリル酸メチル(PMMA)：1試料(No. 5)で，底部(外側)はPC：5試料(No. 1， 2， 3， 4， 6)で，MS：1試料(No. 5)であった．今回の試料で胴部と底部を区別して材質表示のあったものはNo. 6のみで，No. 1， 3， 4の試料ではPC，No. 2と5では単にアクリル樹脂と表示されている．鑑別の結果，後者では胴部と底部で材質が異なっていた．また，アクリル樹脂やエスチレンという表示のものがあるが，アクリル樹脂はアクリル酸，メタクリル酸およびそのエステルを重合した樹脂の総称であり(今回のPMMAやMSを含む)，アクリル樹脂あるいはMSをエスチレンという商品名の材質表示は，法規上(家庭用品品質表示法)正しくなく，正しい表示をしなければならない．なお，MSの組成は1730cm^{-1}(>C=O)と700cm^{-1}(ベンゼン環)の吸光度比から求められる[2]．No. 2および6の胴部に使用されているMSの組成は，試験の結果MMAが主成分でそれぞれ77，75重量%であり，食品衛生法上PMMAの規格の適用を受けることが判明した(No. 5の底部のMSの組成はMMA40%である)．

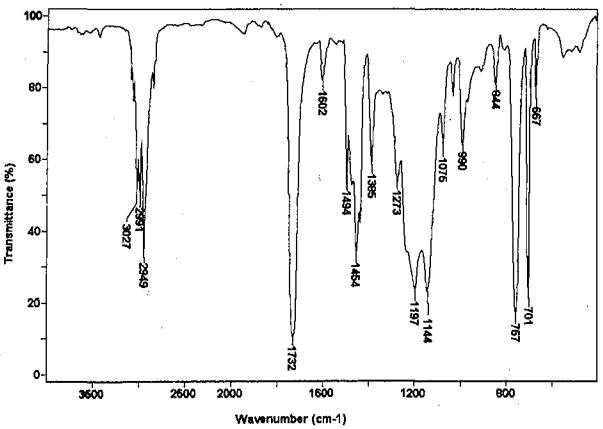
以上のように保冷剤封入のプラスチック製品の材質はIRスペクトルを測定することにより，その鑑別を行うことが可能であった．



ポリカーボネート(PC)



ポリメタクリル酸メチル(PMMA)



メタクリル酸メチル-スチレン共重合物(MS)

図1．保冷剤封入のプラスチックの赤外吸収スペクトル

表　保冷剤封入プラスチック製品の材質および保冷剤の鑑別結果

試料	表示	鑑別結果	
		材質	保冷剤
No.1 ジョッキ（国産品）	ポリカーボネート	胴部：ポリカーボネート 底部：ポリカーボネート	水
No.2 ジョッキ（輸入品）	アクリル樹脂	胴部：メタクリル酸メチルースチレン共重合物 底部：ポリカーボネート	エチレングリコール ポリビニルアルコール
No.3 マグカップ（国産品）	ポリカーボネート	胴部：ポリカーボネート 底部：ポリカーボネート	水
No.4 マグカップ（輸入品）	ポリカーボネート	胴部：ポリカーボネート 底部：ポリカーボネート	エチレングリコール ポリビニルアルコール
No.5 マグカップ（輸入品）	アクリル樹脂	胴部：ポルメタクリル酸メチル 底部：メタクリル酸メチルースチレン共重合物	メチルセルロース 安息香酸ナトリウム
No.6 マグカップ（輸入品）	エスチレンポリカーボネート	胴部：メタクリル酸メチルースチレン共重合物 底部：ポリカーボネート	エチレングリコール ポリビニルアルコール

2．保冷剤の鑑別

1）厚生省の調査によると，保冷剤として使用されている物質は，EG，PG，DEG，BA，CMC-Na，PVA，MCおよびCVPで，製品に封入の際10%以下の水溶液として使用されている．そこで，これらの物質を標準物質としたIRスペクトル法による保冷剤の鑑別法の検討を行った．

KBr錠剤法または薄膜法により測定した標準物質のIRスペクトルを図2に示してある．

2）試料の前処理およびIRスペクトルの測定　保冷剤を濃縮する際，粘性を帯びない試料の場合は水浴上でそのまま完全に蒸発乾固することができるが(粉状固形物)，保冷剤としてPVAが使用されていると，濃縮が進むにつれて液が粘性を帯びて表面に薄い膜を張り，濃縮が進まなくなるので時折膜を寄せて濃縮を促進させる必要があった．この場合濃縮が進んだ段階で，PVAの貧溶媒であるアセトン20mlを添加してPVAを析出後デカンテーションを行い，アセトン可溶分と不溶分に分画した．各分画液はアセトン等が完全に蒸発するまで濃縮し，その残査物についてIRスペクトルを測定した．そのIRスペクトルを図3に示してある．

なお，上記の操作のフローシートを図4に示してある．

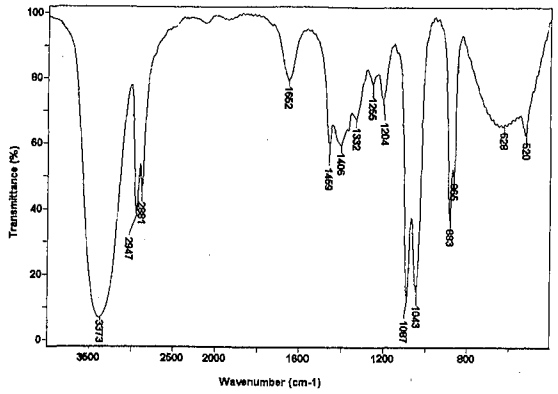
3）保冷剤の鑑別　試料の前処理で，粉状固形物の残査物としてBA，CMC，MCおよびCVPが，粘性濃縮液のうちアセトン可溶物としてEG，PGおよびDEG，アセトン不溶物としてPVAが分画されることから，使用されている保冷剤の推定が可能であった．

得られたIRスペクトルは標準スペクトルと比較することで保冷剤の鑑別が可能となるが，さらに鑑別が容易になる系統的IR鑑別図(図5)を作成した．

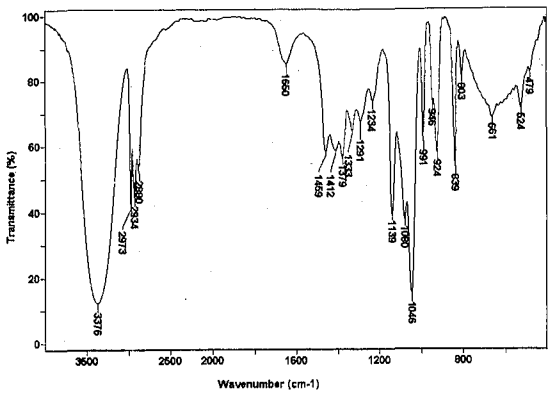
図5中波数の括弧内はピークの幅の形と強さの程度を示し，ピーク幅は鋭い(s)と幅広い(b)に，ピーク強度はスペクトル中最も強いものを(vs)，強いものを(s)，中程度のものを(m)，弱いものを(w)として表している．

スペクトル中水酸基(-OH)による最も強いピーク強度(3400cm^{-1}付近)を示しているものがCMC，PVAとPG，EG，PGのグリコール系で，前者は1095cm^{-1}にも強い吸収を示し，CMCの場合さらに1606cm^{-1}に強い吸収を示すのでPVAとの識別ができる．グリコール系のうちPGは1000～800cm^{-1}に3本の中程度の鋭いピークを示すのでEG，DEGとの識別ができ，またEGの場合883cm^{-1}に鋭く，中程度の強さのピークを示すのでDEGとの識別ができる．3340cm^{-1}付近に最も強いピークを示さないもののうちMCは1100cm^{-1}付近に，CVPは1714ccm^{-1}に最も強いピークを示している．

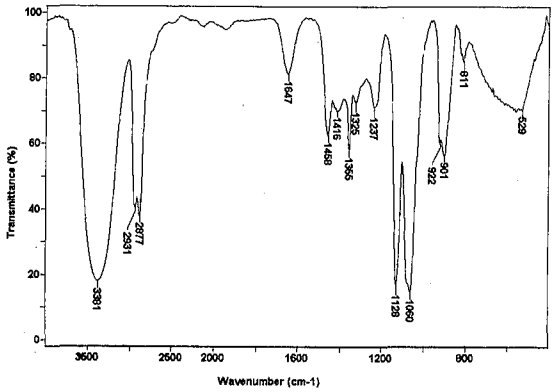
4）試験の結果，試料No.2，4および6では2種類の蒸発残査物が得られ，その性状とIRスペクトル(図3)からEGとPVAが保冷剤として併用されていることが判明した．No.5の場合，蒸発残査物が粉状固形物で，またそのIRスペクトル(図3)はOH基とベンゼン環による吸収を示しているが，カルボニル基による吸収がないことからMCとBAが併用されているものと推測された．No.1と3の場合蒸発残査物はわずかで，そのIRスペクトル(図3)も今回の保冷剤に一致するものはなく，IRスペクトルから無機物と推測され，水の溶質成分である無機物が残査物として認められたものと思われる．なお，



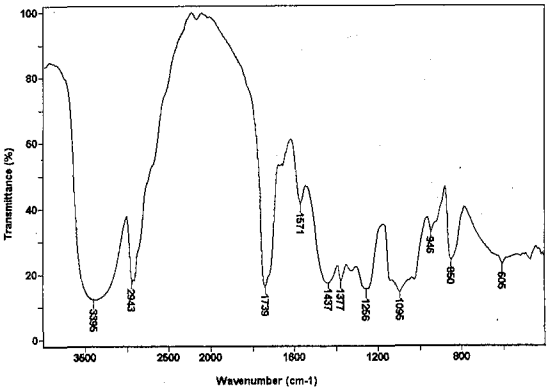
エチレングリコール(EG)



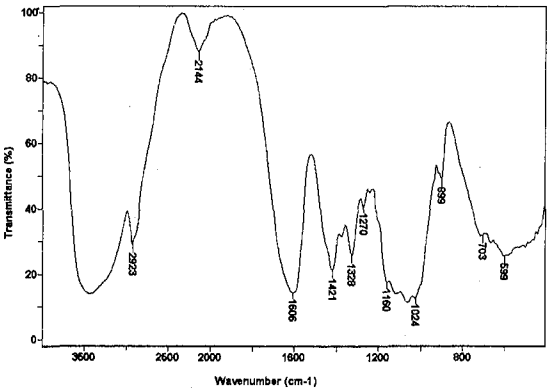
プロピレングリコール(PG)



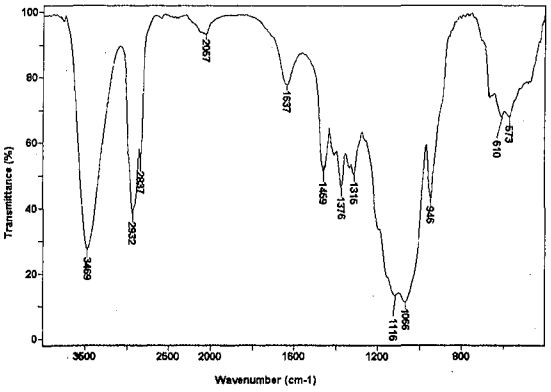
ジエチレングリコール(DEG)



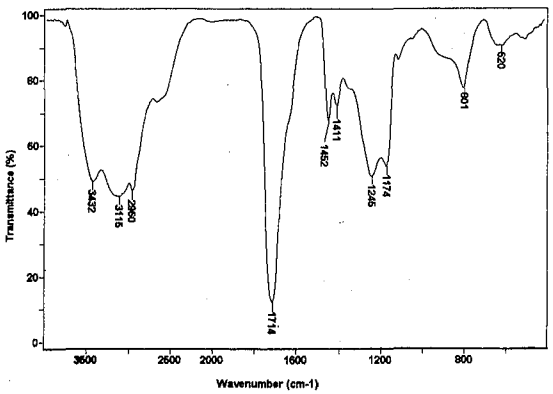
ポリビニルアルコール(PVA-500)



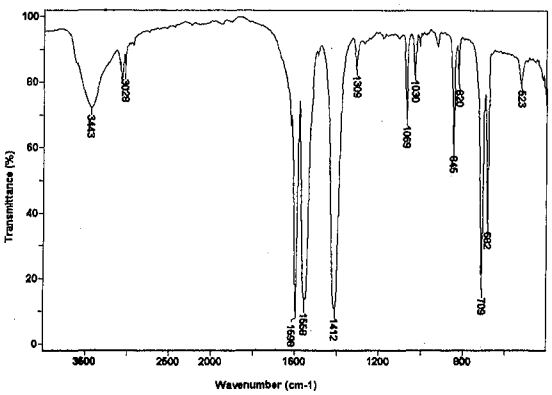
カルボキシメチルセルロース-ナトリウム(CMC-Na)



メチルセルロース(MC)

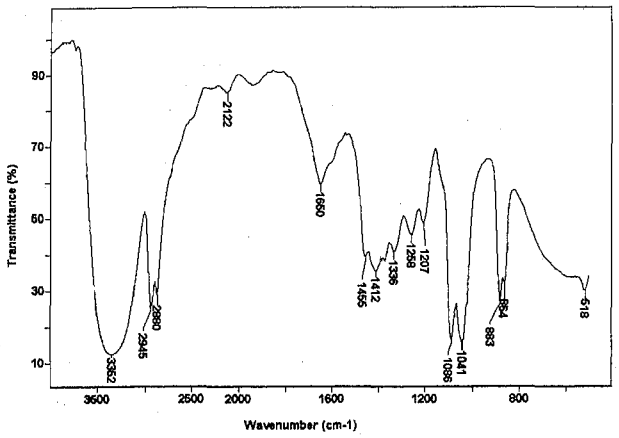


カルボキシビニルポリマー(CVP)

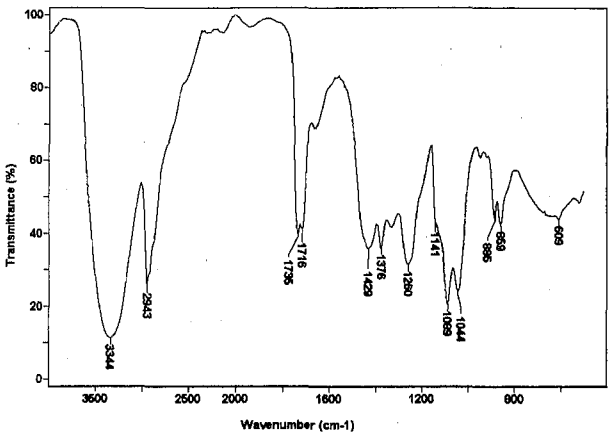


安息香酸ナトリウム(BA-Na)

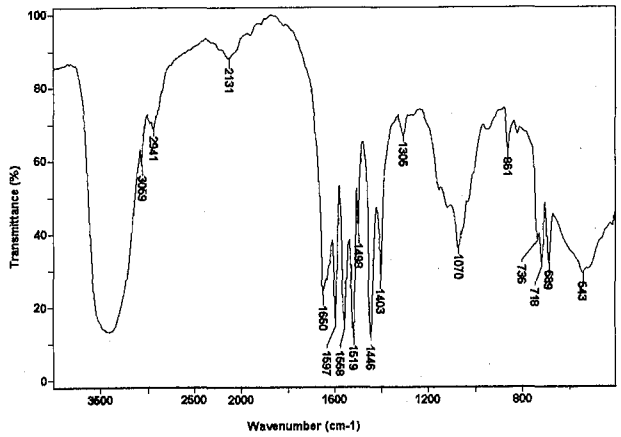
図2．保冷剤の赤外吸収スペクトル



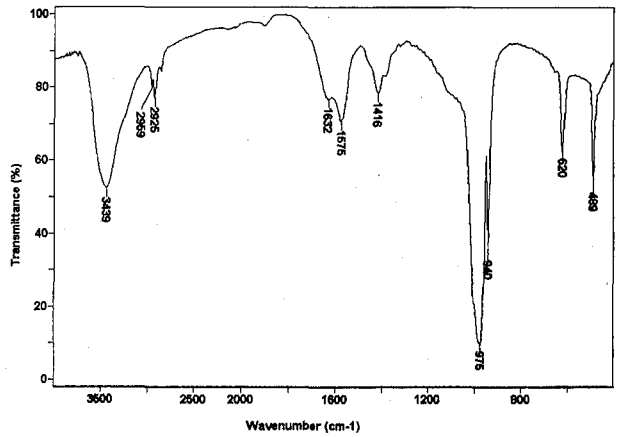
試料2，4，6の残査物1



試料2，4，6の残査物2



試料5の残査物



試料3の残査物

図3．試料(残査物)の赤外吸収スペクトル

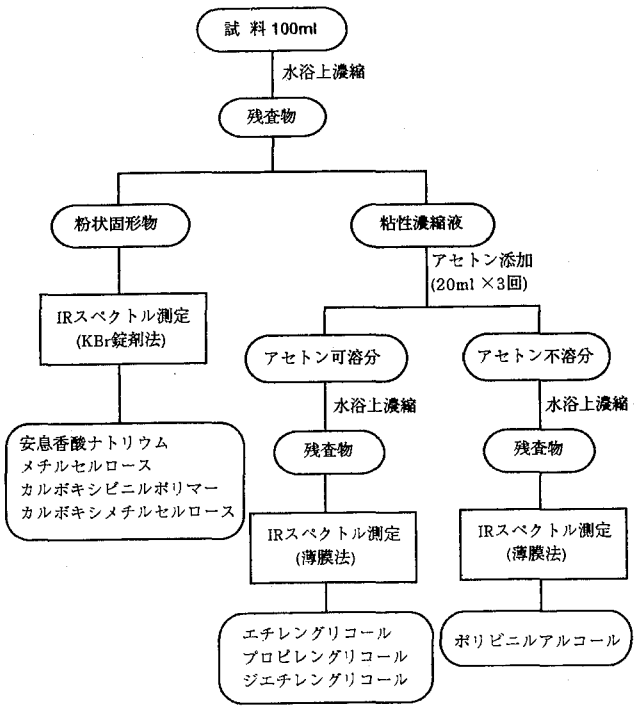


図4．保冷剤の系統的鑑別図

今回の試料のうち保冷剤についてはNo. 4のみ表示されていた(保冷液：水／増粘剤)．

以上の結果，プラスチック製マグカップ等に封入されている保冷剤は蒸発残査物の性状およびそのIRスペクトルから鑑別を行うことが可能であった．

ま と め

1．保冷剤封入のマグカップ，ジョッキ等に使用されているプラスチックはそのIRスペクトルからPC，PMMAまたはMS樹脂が用いられ，MS樹脂の場合MMAの割合が約75%でPMMAの規格が適用されることが判明した．

2．厚生省の調査によると保冷剤に使用されている物質は8種であることから，これらの物質を対象としたIRスペクトル法による鑑別法を検討した．保冷剤を水浴上で蒸発濃縮後，残査物をKBr錠剤法または薄膜法によりIRスペクトルを測定し，標準スペクトルと比較し鑑別を行った．また，IRスペクトルによる系統的鑑別図を作成した．その結果，6試料のうち3試料からEGとPVA，1

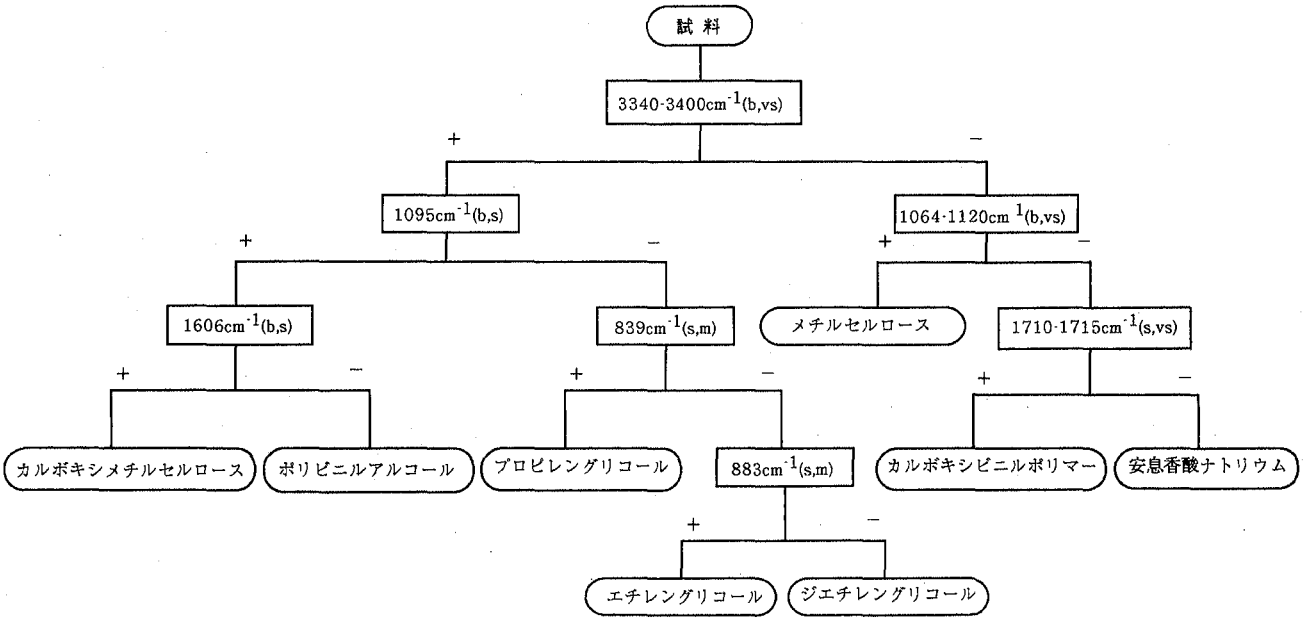


図５．赤外吸収スペクトルによる保冷剤の系統的鑑別図

試料からMCとBAの併用による保冷液の使用が認められたが，２試料では水のみが用いられていた．

謝辞　本研究にあたり試料の提供および助言を頂いた国立衛生試験所　河村葉子氏並びに川崎市衛生研究所　森悦男氏に深謝いたします．

文　献

1）厚生省：平成7年度厚生科学研究費研究報告書「器具・容器包装の健康影響に関する研究」，30-40.

2）日本分析化学会編：高分子分析ハンドブック，274，1990，朝倉書店，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 175-181, 1996

食品用天然保存料の品質調査

広門雅子*, 平田恵子*, 植松洋子*, 貞升友紀*,
安野哲子*, 伊藤弘一*, 安田和男**, 鈴木助治*

Survey on the Quality of Natural Preservative Used in Food Processing

MASAKO HIROKADO*, KEIKO HIRATA*, YOKO UEMATSU*, YUKI SADAMASU*,
TETSUKO YASUNO*, KOICHI ITO*, KAZUO YASUDA** and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：天然保存料 natural preservative, 品質 quality, しらこたん白 milt protein, ε-ポリリジン ε-polylysine, ペクチン分解物 pectin digests, ヒノキチオール hinokitiol, 規格試験 specification test

緒　言

食品への賞味期限表示の導入やＰＬ法(製造物責任法)の施行に伴って，食品の腐敗・変質の防止，日持ちの向上に関心が高まっている．近年，食品の凍結，低温等の保存技術は大幅に進歩したが，これだけでは食品の腐敗を完全に押さえることはできず，消費者の天然志向と相まって，食品への天然保存料の使用が増加している．現在，既存添加物名簿収載品目リスト[1]に10品目(表１)の天然保存料が収載されているが，未だ公的な品質規格の整備がなされておらず，品質の実態も明らかではない．

また昨年５月の食品衛生法改正の際，国会審議の中で，「既存の天然添加物については，速やかに安全性の確認を行い，有害性が実証された場合には，使用禁止など必要な措置をとる」との付帯決議がなされたことで，安全性の確認が緊急課題となっている．

このような情勢のなか平成７年度より，当所にプロジェクト研究「天然添加物の品質に関する研究」が発足し，天然添加物の理化学試験及び安全性試験を開始した．天然保存料についてもAmes試験や小核試験などの安全性試験が開始され，催奇形性試験や亜慢性毒性試験も行われる予定である．そのためこれら安全性評価を行う上でも，天然保存料の主成分や不純物の含量を正確に把握する必要がある．そこで著者らは，天然保存料の品質規格作成の基礎資料とするために，またプロジェクト研究の安全性試験に用いる保存料の品質評価を行うために，市販の食品用天然保存料製品中高純度の製品について主成分及び不純物の含量を分析した．さらに日本食品添加物協会の自主規格(以後自主規格と略す)[2]に収載されている「しらこたん白抽出物」,「ε-ポリリジン」,「ペクチン分解物」及び化粧品原料基準[3]に収載されている「ツヤプリシン(ヒノキチオール)」については，それらの規格値との比較を行い品質調査を実施した．また規格試験の適用に若干の問題点が確認されたので，その結果を報告する．

実験の部

Ⅰ．試料　安全性試験には高純度品を用いることとしたため，日本食品添加物協会を通して天然保存料製造メーカーより純度の高い製品を入手し試料とした．その内訳は，表１に示した．しらこたん白抽出物(以後しらこたん白と略す)２種(A社及びB社製)，ε-ポリリジン(以後ポリリジンと略す)１種，ペクチン分解物１種，ツヤプリシン１種である．なおポリリジン，ペクチン分解物，ツヤプリシンの製造元は一社のみであった．他の植物抽出物４種については，製品自体がないため入手できなかった．

Ⅱ．試薬及び試液

１．塩素イオン標準液は安野らの報告[4,5]に従って調製した．金属標準液は関東化学(株)製原子吸光分析用を用いた．

２．ガラクチュロン酸　関東化学(株)製のα-D-ガラ

*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
**同食品研究科

表1 既存添加物名簿収載品目リスト中の天然保存料

種類	基原・製法	主成分	用途	品質規格
しらこたん白抽出物	サケ、ニシンなどの精巣(白子)中の核酸と結合した塩基性たん白を酸で分解後中和したもの	塩基性蛋白(ポリアルギニンが主成分のプロタミン)	カスタードクリーム、総菜	自主規格*1
ε-ポリリジン	放射菌を培養し、培養ろ液よりイオン交換樹脂に吸着、分離、精製したもの	塩基性蛋白(ポリリジン)	米飯、総菜、ゆでそば	自主規格*1
ペクチン分解物	ミカン、リンゴなど果物の果皮搾粕に含まれるペクチンを酵素(エステラーゼ及びガラクチュロナーゼ)で分解したもの	オリゴガラクチュロン酸(2～7分子)	佃煮、めんつゆ	自主規格*1
ツヤブリシン	ヒノキ科ヒバなどの木部や株根を水蒸気蒸留して得られる油分中に含有される結晶性の物質	ツヤプリシン	包装材にしみ込ませる	化粧品原料基準
エゴノキ抽出物	アンソクコウノキの樹脂よりエタノール又は有機溶媒で抽出したもの	安息香酸	使用実態なし	なし
カワラヨモギ抽出物	カワラヨモギよりエタノールで抽出するか又は水蒸気蒸留して得られたもの	カピリン	使用実態なし	なし
ホオノキ抽出物	ホオノキの樹皮よりエタノールで抽出したもの	マグノロール	使用実態なし	なし
レンギョウ抽出物	レンギョウの果実よりエタノールで抽出したもの	フィリリン	使用実態なし	なし
ウド抽出物	ウドの茎又は葉からエタノールで抽出して得られたもの	マグノロール	使用実態なし	なし
酵素分解ハトムギ抽出物	ハトムギの種子より熱時水で抽出し、酵素分解した後、エタノールで処理したもの		使用実態なし	なし

＊1 日本食品添加物協会編「第二版 化学的合成品以外の食品添加物 自主規格」

クツロン酸一水和物(一級試薬)を標準品として用いた.

3．その他の試液は全て自主規格及び日本食品添加物公定書(以後公定書と略す)中の「試薬・試液等」[6]に従って調製し，試薬は全て市販の特級品を用いた.

Ⅲ．装置

1．マイクロ波湿式灰化装置：CEM社製 MDS-2000型

2．原子吸光光度計：パーキン・エルマー社製 2380型

3．誘導結合プラズマ(ICP)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.

4．自記分光光度計：(株)島津製作所製 UV2200型

5．アミノ酸自動分析装置：日立製作所(株)製 L-8500型

6．自動窒素測定装置：ケルテック社製 1030型

Ⅳ．試験操作法

1．規格試験 1）しらこたん白抽出物，ε-ポリリジン，ペクチン分解物は自主規格(表2,5,6)に従った.

2）ヒノキチオールは化粧品原料基準(表7)に従った.

2．規格以外の試験 1）アルカリ金属及び重金属類の定量 試料約0.50 g を正確に秤取し，硝酸(1→2)を10ml加え，マイクロ波湿式灰化装置で分解後，200ml定容とし，安野らの方法[4,5]に従ってカリウムは原子吸光光度計，他の金属はICP発光分光分析装置を用いて測定した.

2）塩化物の定量 安野らの方法[4]に従った.

3）糖類の定性 試料1 g を水10mlに溶解し，薄層クロマトグラフ法(TLC)で定性を行った．TLCの条件：シリカゲル薄層板 メルク社製 Kieselgel 60，展開溶媒 クロロホルム・メタノール・水(30：23：4)，発色試薬：アニスアルデヒド硫酸試液(アニスアルデヒド0.5ml，エタノール9 ml，濃硫酸0.5ml及び氷酢酸0.1mlの混液)，ブドウ糖及び果糖標準溶液：10mg/ml水溶液

4）遊離アミノ酸 試料1 g を塩酸溶液(1→600)に溶かし，100mlの定容とし，0.45 μmのメンブランフィルターでろ過した後，アミノ酸自動分析装置を用いて分析した．分析条件：カラム日立Ion-Exchange Column ＃2622SC，プレカラム 日立パックドカラム ＃2650L，溶

離液 MCI^{R} BUFFER L-8500-PHキット，検出 ニンヒドリン発色法

5） pH　試料2.5gを蒸留水50mlに溶解し，pHメーターを用いて測定した．

6）乾燥減量及び強熱残留物　公定書中の一般試験法[7]に従った．

7）窒素定量法　公定書中の一般試験法[8]に従って試験溶液を調製し，自動窒素測定装置を用いて分析した．

結果及び考察

Ⅰ．しらこたん白

公定書を作成する際に参考とされる自主規格に基づいて品質試験を実施し，結果を表2に示した．また，しらこたん白は，鮭，鰊などの精巣(白子)中の核酸と結合した塩基性たん白を酸で分解した後，中和して得られるため，不純物として遊離アミノ酸，無機塩(塩化ナトリウムなど)などの残留が考えられる．そこで試料A及びBについてこれら不純物の分析を行い，その結果を表2～4に示した．

1．規格試験

1）定量法　しらこたん白の主成分であるプロタミン含量は試料Aが77.5%，試料Bが52.6%で，両者とも規格(50%以上)に適合していた．しかしこの定量は，プロタミンを他の含窒素夾雑物と分離せず，直接ケルダール法で総窒素を測定するため，遊離アミノ酸などの窒素も同時に定量されることから，高い値が得られている可能性が大きい．そこで試料中の遊離アミノ酸の分析を行ったところ，表3に示すように，いずれもアルギニン，グリシン，グルタミン酸，タウリン，セリン，アラニンなど18種類のアミノ酸が検出された．アミノ酸含量が0.1%以上の総量は試料Aが1.9%(窒素換算値0.35%)，試料Bが6.0%(窒素換算値1.2%)であった．これらの遊離アミノ酸の窒素換算値を差し引き，水分などを考慮してプロタミン含量を再計算すると，試料Aが76.3%，試料Bが48.6%と1.2～4.0%低い値が得られた．今回核酸は測定しなかったが，仮に核酸が含有されているとすると，プロタミン含量はさらに低い値となる可能性もある．

表2　しらこたん白抽出物の品質規格及び試験結果

試験項目	規格値*1	試験結果	
		試料A	試料B
[規格試験]			
定量(含量)	プロタミンとして 50%以上*2	77.5%*2 (76.3%)*3	52.6%*2 (48.6%)*3
純度試験			
溶状	無～淡黄色、微濁	淡黄色、微濁	淡黄色、微濁
重金属	20μg/g以下	20μg/g以下	20μg/g以下
ヒ素	4μg/g以下	4μg/g以下	4μg/g以下
乾燥減量	7.0%以下	5.4%	2.2%
灰分	12.0%以下	11.0%	21.2%
[規格以外の試験]			
無機元素		(%)	(%)
塩素(NaCl換算値)		5.1(8.4)	12(19.8)
ナトリウム		4.2	8.1
カリウム		0.30	0.30
マグネシウム		0.025	0.037
カルシウム		<0.005	0.054
アルミニウム		<0.005	<0.005
鉄		<0.005	<0.005
リン		0.37	0.39
強熱残留物		13%	26%
糖類		検出しない	デキストリン
液性(pH)		12.6*4	8.7*4

＊1　日本食品添加物協会編「第二版　化学的合成品以外の食品添加物　自主規格」
＊2　乾燥物換算したもの
＊3　遊離アミノ酸の窒素量を差し引いて求めた値
＊4　5%水溶液のpH

表3　しらこたん白抽出物中の遊離アミノ酸含量

アミノ酸の種類	アミノ酸含量(%)	
	試料A	試料B
アルギニン	0.5	2.5
グリシン	0.4	0.6
グルタミン酸	0.4	0.4
タウリン	0.3	1.2
セリン	0.1	0.3
アラニン	0.1	0.2
アスパラギン酸	0.1	0.1
リジン	<0.1	0.2
ホスホセリン	<0.1	0.2
トレオニン	<0.1	0.1
イソロイシン	<0.1	0.1
ロイシン	<0.1	0.1
メチオニン	<0.1	<0.1
チロシン	<0.1	<0.1
フェニルアラニン	<0.1	<0.1
オルニチン	<0.1	<0.1
ヒスチジン	<0.1	<0.1
シスチン		<0.1
総アミノ酸*1	1.9	6.0

＊1　0.1%以上検出されたアミノ酸含量の総計

表4　しらこたん白抽出物中の重金属の含量

元素名	試験結果(μg/g)*1	
	試料A	試料B
ニッケル	<10	59
亜鉛	15	<10
鉛	<10	<10
銅	<10	<10
クロム	<10	<10
マンガン	<10	<10
コバルト	<10	<10
カドミウム	<10	<10
バリウム	<10	<10

＊1　鉛は硫化ナトリウム法
その他はICP発光分光法

したがって公的規格を作成する際には，これらの夾雑物を十分考慮に入れ，定量法にはケルダール法に代わるプロタミンに特異的な方法を採用するか，又は夾雑物のアミノ酸など含窒素成分の限度を規定する必要があると考える．

2）純度試験　①重金属試験　自主規格の試験では，試料A，Bともに規格値(20μg/g以下)に適合していた．しかしICP法で鉛，銅，ニッケルなど9元素を個別に定量したところ，表4に示したように試料Bではニッケルが59μg/g検出された．ニッケル触媒を用いて製造される食品添加物のD-ソルビトールの場合，ジメチルグリオキシム法によりニッケルの残留が規制され，その検出限界は2μg/g以下であると報告[9]されている．何故試料Bからニッケルが検出されたかについては現在不明であるが，しらこたん白の製造時に金属容器から移行したとも考えられる．

②灰分　試料A及びBの灰分含量は，11.0及び21.2%(表2)で，試料Bは基準値(12.0%以下)を超えていた．灰分は試料を600℃で灰化した時，生成する金属の酸化物や高温でも揮散しない無機塩類を定量する試験である．無機元素をICPで個別に分析したところ，表2に示すように試料Bよりナトリウム8.1%(NaCl換算値20.6%)が検出された．この試料について塩素イオンを定量したところ，NaClとして19.8%が検出されたことから，灰分の大部分は製造過程で中和操作により生じた塩化ナトリウムであると考えられる．

2．規格以外の試験

1）強熱残留物　本試験は試料に濃硫酸を加え450～550℃の高温で灰化し，試料中に含まれるカリウム，ナトリウム，カルシウムなどの金属類を安定な硫酸塩として定量する試験であり，無機元素の含量を確認するために行う試験である．多くの食品添加物の品質規格に採用されているため，しらこたん白についても適用した結果，試料Aは13%，試料Bは26%であった．ICP法で得られた主な無機元素の分析値(表2)を硫酸塩に換算したところ，試料Aは13.8%(カリウム，ナトリウム，マグネシウムの硫酸塩の合計値)，試料Bは26%(カリウム，ナトリウム，カルシウム，マグネシウムの硫酸塩の合計値)となり，ほぼ強熱残留物の結果と一致した．

2）pH　試料Aはプロタミン含量が77.5%と高く，無機物や遊離アミノ酸などの不純物も試料Bに比べて少なかったので，安全性試験用に適していた．しかし動物に投与する餌のpHは中性に近い必要があるが，しらこたん白は塩基性蛋白質であることから，純度が高いほどアルカリ性が強くなる．そこでpHを測定したところ，試料Aは12.6とやはりアルカリ性が強かった．しかし試料Aを5%添加した餌の水溶液(試料A1.3%に相当する)のpHは8.0で動物実験上問題が無いことが分かり，亜慢性毒性試験に用いることとした．

Ⅱ．ポリリジン　自主規格に基づいて規格試験を行った結果を表5に示した．その結果，定量値が50.3%と低い値であった他は全て規格に適合していた．この製品の定量値が低かったのは，培養ろ液中のポリリジンをイオ

表5　ε-ポリリジンの品質規格及び試験結果

	規格値*1	試験結果
[規格試験]		
定量法(含量)	ε-ポリリジンとして87%以上*2	50.3%*2
純度試験		
重金属	20μg/g以下	20μg/g以下
ヒ素	4μg/g以下	4μg/g以下
乾燥減量	20%以下	5.1%
強熱残留物	1.0%以下	0.05%
[規格以外の試験]		
液性(PH)		9.5*3
遊離アミノ酸		検出しない
糖類		デキストリン

＊1　日本食品添加物協会編「第二版　化学的合成品以外の食品添加物　自主規格」
＊2　乾燥物換算したもの
＊3　5%水溶液のpH

ン交換樹脂で吸着・分離・精製した後，乾燥する際に，デキストリンが加えられポリリジン含量が50%濃度に調製されているためである．製造メーカーは，安定な製品を得るためには，デキストリンで粉末化する必要があり，現在のところ自主規格に合うポリリジン含量の高い製品は製造できていないと述べている．

不純物として考えられる遊離アミノ酸は検出されなかった．また強熱残留物も0.05%以下と低く，無機塩も含まれていないことが分かった．重金属も全て10μg/g以下であった．これらの結果から試料中のポリリジンそのものは，純度が高いものであったと考えられる．

Ⅲ．ペクチン分解物

1．規格試験　自主規格に基づき試験を行った結果を表6に示した．定量値及びpHが規格に適合しなかった．

1）定量法　定量の結果，ガラクチュロン酸として109%(乾燥物換算した値)検出され，規格の上限値90%を超えていた．規格の定量法はカルバゾール硫酸法であり，オリゴガラクチュロン酸(2～7分子)，ガラクチュロン酸，ガラクチュロン酸メチルエステル，オリゴガラクチュロン酸メチルエステル等のウロン酸成分を全てガラクチュロン酸(図1)として測定する方法である．この方法の欠点はウロン酸の種類により呈色度が異なることや中性糖が呈色しプラスの誤差を与えることだと言われている[10]．そこで試料中の糖類を試験したところ，ブドウ糖及び果糖が検出された．定量値が高かったのはこれらの影響とも考えられる．今後ガラクチュロン酸に特異的な方法を検討する必要がある．

表6　ペクチン分解物の品質規格及び試験結果

試験項目	規格値*1	試験結果
[規格試験]		
定量法(含量)	ガラクチュロン酸として50～90%*2	109%*2
純度試験		
溶状	淡黄色、透明	淡黄色、透明
液性(pH)	3.1～3.6*3	2.9*3
重金属	20μg/g以下	20μg/g以下
ヒ素	4μg/g以下	4μg/g以下
乾燥減量	40%以下	39.7%
[規格以外の試験]		
強熱残留物		2.1%
無機元素		(%)
カリウム		0.10
ナトリウム		0.42
カルシウム		0.091
マグネシウム		0.014
アルミニウム		0.089
鉄		0.01
リン		<0.05
塩素		<1.0
糖類		果糖，ブドウ糖
総窒素(蛋白質換算値)		0.48%(約3%)

＊1　日本食品添加物協会編「第二版　化学的合成品以外の食品添加物　自主規格」
＊2　乾燥物換算したもの
＊3　1%水溶液のpH

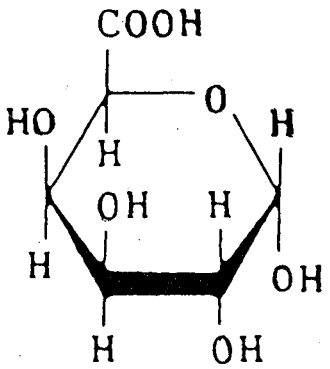


図1　ガラクチュロン酸

2）pH　試料のpHは2.9で規格の下限値3.1をわずかに下回った．原料のペクチンは部分的にメチルエステルを含むポリガラクチュロン酸からなるが，ペクチン分解物は，これを酵素で脱メチル化して製造される．その際遊離のカルボキシル基が多く生成し，pHを下げたのではないかと考える．比較するため図1の100%メチル基がとれたガラクチュロン酸(関東化学一級試薬)は，2.5

と低かった.

2．規格以外の試験

1）無機元素　原料のペクチンには，塩類が粘度調整の目的で添加されることがある[11]ので，カリウム，ナトリウム，カルシウム，アルミニウムなどを測定したところ，表6に示すように6元素が0.014～0.42%検出された．総量で0.72%であった．検出量が少なかったことから，これらは加工時に添加されたのではなく天然由来と考えられる．なお検出された6元素を硫酸塩に換算すると，総量で2.4%となり，強熱残留物の結果の2.1%にほぼ近似していた.

2）糖類　原料のペクチンには，塩類と同様に糖類も物性を調整するために添加されることがある[11]ので，TLC法で分析した結果，ブドウ糖と果糖が検出された．この製品の場合，原料のペクチンにショ糖が添加されていること，また製造の最終段階で酵素を失活させるために120℃で20分間以上加熱されていることが分かっていることから，ショ糖がオリゴガラクチュロン酸酸性下で加熱分解され，ブドウ糖と果糖が生成したのではないかと考えられる.

3）総窒素　ペクチン分解物は，酵素(蛋白質)を用いて製造されることから，その残留の可能性がある．そこでケルダール法で蛋白質量を窒素量として測定したところ，窒素0.48%(蛋白質換算で約3.0%)検出された．窒素含量が少なかったこと及び酵素が最終段階で失活されていること等を考え合わせると，公定規格を作成する際には，純度試験に総窒素量を規定する必要はないものと考える.

Ⅳ．ツヤプリシン　自主規格にはないが，化粧品原料基準に収載されていたので，この規格に基づき試験を行った．その結果を表7に示した．強熱残留物以外は全て限度内であった．強熱残留物の結果は0.1%であり，それほど高い値ではなかったが，基準値が0.05%以下と低く設定されているため適合しなかった．ツヤプリシンは臭いが特殊であることから，化粧品への使用とは異なり，食品へは直接添加されず包装材にしみ込ませて使われるので，強熱残留物の基準値は0.05%より高くてもよいのではないかと考える.

表7　ツヤプリシンの品質規格及び試験結果

試験項目	規格値*1	試験結果
定量法(含量)	ヒノキチオール 98.0～105.0%	99.0%
純度試験		
溶状	透明	透明
重金属	20 μg/g 以下	20 μg/g 以下
ヒ素	2 μg/g 以下	2 μg/g 以下
乾燥減量	0.5%以下	0.05%
強熱残留物	0.05%以下	0.10%
融点	48～52℃	51℃

＊1　化粧品原料基準

要　約

安全性試験に用いる天然保存料の品質を確認するために，高純度の市販製品を対象として，主成分及び不純物の分析を行った．その結果を，しらこたん白，ポリリジン，ペクチンについては自主規格の規格値と比較し，またツヤプリシンについては化粧品原料基準の規格値と比較した.

Ⅰ．しらこたん白

1．試料Aは自主規格の全項目に適合していたが，試料Bは灰分が規格値を超えていた．灰分の大部分は塩化ナトリウムであることが推察された.

2．重金属の規格試験に試料A，Bとも適合していたが，ICP法で各元素を分析したところ，試料B中にはニッケルが59 μg/g 含有されていた.

3．遊離アミノ酸は，試料Aには1.9%，試料Bには6.0%も含有され，これはプロタミンの定量値にプラスの誤差を与えた.

4．試料Aはプロタミン含量が高く，灰分や遊離アミノ酸などの夾雑物も少なく，また餌に添加した場合のpHは8.0で問題ないことが分かり，亜慢性毒性試験に用いることとした.

Ⅱ．ポリリジン

ポリリジン含量は50.3%で，規格値「87%以上」に適合しなかった．定量値以外は全て自主規格に適合した.

Ⅲ．ペクチン分解物

1．定量値は109%で，規格の上限90%を超えていた.

2．pHは規格の下限値よりわずかに低かった.

3．他の成分としてブドウ糖及び果糖が検出された.

Ⅳ．ツヤプリシン

強熱残留物以外は全て化粧品原料基準の限度内であった.

今回，市販製品中高純度の製品を対象としたにもかかわらず，自主規格の一部の項目に適合しない製品があった．また規格試験法中しらこたん白及びペクチン分解物の定量法に適用上問題があることが分かった.

謝辞　天然保存料の入手にご協力頂いた日本添加物協会の石井健二氏並びに試料をご提供頂いた添加物製造各社に深謝いたします.

文　献

1）厚生省生活衛生局長通知：既存添加物名簿収載品目リスト，平成８年５月23日付衛化第56号，1996

2）日本食品添加物協会編：第２版 化学的合成品以外の食品添加物　自主規格，175-177，1993，日本食品添加物協会，東京

3）日本公定書協会編：化粧品原料基準 第二版 注解，854，1984，薬時日報社，東京

4）安野哲子，荻野周三，小関正道：東京衛研年報，**42**，170-175，1991

5）安野哲子，栗原裕子，荻野周三：東京衛研年報，**43**，155-157，1992

6）日本食品添加物協会編：第６版 日本食品添加物公定書，73-119，1992，日本食品添加物協会，東京

7）日本食品添加物協会編：第６版 日本食品添加物公定書，12，16-17，1992，日本食品添加物協会，東京

8）日本食品添加物協会編：第６版 日本食品添加物公定書，38-41，12，1992，日本食品添加物協会，東京

9）石館守三，鈴木郁生，谷村顕雄：第６版 食品添加物公定書解説書，D688，1992，廣川書店，東京

10）ムコ多糖実験法〔Ⅰ〕：化学の領域 増刊96号，94-95，1972，南江堂

11）食品化学新聞社編：天然添加物と新食品素材 '88，64-65，1988，食品化学新聞社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 182-188, 1996

食品用天然増粘安定剤の品質調査

貞升友紀*, 広門雅子*, 植松洋子*, 平田恵子*,
伊藤弘一*, 安田和男**, 鈴木助治*

Survey on the Quality of Natural Thickening and Stabilizing Agents Used in Food Processing

YUKI SADAMASU*, MASAKO HIROKADO*, YOKO UEMATSU*, KEIKO HIRATA*,
KOICHI ITO*, KAZUO YASUDA** and SUKEJI SUZUKI*

The qualities of natural thickening and stabilizing agents were chemically evaluated, in which fify-five samples of 13 kinds of those agents on the market were tested in accordance with the specifications set by FAO/WHO, Food Chemicals Codex (FCC) and the Federation of Japan Food Additives Association.

As a result, 11 samples of 5 kinds of them did not meet one of the three specifications. The details of their inadequacy were as follows: Two carrageenans were inadequate with respect to the ethanol level and loss on drying, and another sample with respect to the sulfate amount; five tragacanth gums were inadequate because dextrin was detected in them, and one of them with respect to sulfated ash; one xanthan gum was inadequate with respect to viscosity, one tamarind gum with respect to loss on drying, and one pectin with respect to nitrogen level.

Moreover, for such volatile acid in karaya gum, starch in tamarind gum and agar in tragacanth gum, the test methods in the specifications were found to be difficult to apply for some of the particular samples tested.

Keywords：天然増粘安定剤 natural thickening and stabilizing agents, カラギーナン carrageenan, トラガントガム tragacanth gum, キサンタンガム xanthan gum, タマリンドガム tamarind gum, ペクチン pectin, 規格 specification

緒　　言

天然増粘安定剤は，ゼリー，ハム，ソース，アイスクリーム等の加工食品の製造にゲル化剤，増粘剤，安定剤，離水防止剤として使用される食品添加物である．国内需要量は年間1万トンに及び，最近では食物繊維としての用途も開発され，天然志向，健康志向への食生活の変化に伴って，その利用はますます増加の傾向にある[1)]．

平成8年4月に告示された既存添加物名簿(厚生省告示120号)にはアラビアガム，カラギーナン，グァーガム，キサンタンガム，ペクチンなど52品目が天然増粘安定剤として収載されている．これらは，現在，厚生省を中心に安全性の確認が進められているが，未だ食品添加物としての公的な品質規格が定められておらず，また，その実態調査を行った報告も少なく，品質に関しても不明な点が多いのが現状である．

そこで，著者らは天然添加物の品質に関する研究の一環として市販の食品用天然増粘安定剤を入手し，国際規格のFAO/WHO規格[2)-7)]，米国規格のFood Chemicals Codex(FCC)規格[8)]及び日本食品添加物協会の自主規格[9)]に基づいて試験を行い，品質や試験法上の問題について若干の知見を得たので報告する．

実 験 の 部

Ⅰ．試料：日本食品添加物協会に依頼して販売メーカーより入手した天然増粘安定剤13品目55検体を試料とした．

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**同食品研究科

その内訳はFig. 1に示した.

Ⅱ. 試薬

1. カルシウム(Ca), マグネシウム(Mg), ナトリウム(Na)及びカリウム(K)1,000 μg/ml溶液：和光純薬(株)製, 原子吸光用　2. ヨウ素試液A[9]：ヨウ素14 gを量り, ヨウ化カリウム溶液(2→5)100mlを加えて溶かし, 塩酸(1→4)1 ml及び水を加えて1,000mlとする. 3. ヨウ素試液B[10]：ヨウ素317mgをヨウ化カリウム溶液(1→4)4 mlに加えて溶解後, 水で200mlとする. この液10mlに25%塩酸25mlを加え, 水で500mlとする. 4. その他の試薬はすべて市販の試薬特級品を用いた.

Ⅲ. 装置

1. 窒素自動測定装置：ケルテック社製1030型　2. ガスクロマトグラフ(GC)：ヒューレットパッカード社製HP5890シリーズⅡ(FID検出器付)　3. B H型回転粘度計：東機産業(株)製　4. 旋光度計：日本分光(株)製DIP-181型　5. 高速液体クロマトグラフ(HPLC)：日本分光(株)製(ポンプ：880-SC型, 検出器：UV-970型, システムコントローラー：802-SC型, オートサンプラー：851-AS型, カラムオーブン：865-CO型)　6. 誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析装置：サーモジャーレルアッシュ社製61ESS型　7. マイクロ波湿式灰化装置：CEM社製MDS-2000型

Ⅳ. 試験法

1. 規格試験：FAO/WHO規格[2)-7)], FCC規格[8]及び自主規格[9]に基づいて実施した. なお, 1つの試験項目に対し, それぞれの規格が定める試験の条件が異なる場合は, 最も厳しい条件に従った. また, 前述の3つの規格の基準値を全て含む範囲を本調査における規格基準とし, 今回行った試験項目, 試験条件及び基準を併せてTable 1に示した.

2. エタノール, メタノール及びイソプロパノール：試料1.0 gを採取し, 水でキサンタンガムは200ml, カラギーナン及びファーセレランは400ml, カロブビーンガム及びペクチンは1,000ml定容とし, GCに3 μl注入した.

[GC測定条件] ①定量用カラム：ジーエルサイエンス(株)社製Unisole 10T 0.1%, Gaskuropack 54, 60-80 mesh, 3.2mmi.d.×3m, カラム温度：100℃(15min)→(2 ℃/min)→150℃(30min), 注入口及び検出器温度：180℃, キャリヤーガス：He 20ml/min　②確認用カラム：ジーエルサイエンス(株)社製 PEG-1000, 25%Uniport R, 60-80 mesh, 3.2mm i.d.×3 m, カラム温度：60℃, 注入口及び検出器温度：180℃, キャリヤーガス：He 20ml/min[11], 標準溶液：エタノール, メタノール及びイソプロパノールをそれぞれ1.0 g採取し, 水で50ml定容とした

3. 重金属及び鉛：第6版食品添加物公定書[12]に記載されている重金属試験法の第2法に従って測定した. 試料量は2.0 gとした.

4. ヒ素：第6版食品添加物公定書[12]に記載されているヒ素試験法の第3法, 装置Aに従って測定した. 試料量は1.0 gとした.

5. アルギン酸及びキサンタンガムの定量：第5版食品添加物公定書[13]中の「アルギン酸ナトリウム」定量法に従った. 試料量は0.5 gとした.

6. カラヤガムの揮発性酸：A法) FAO/WHO規格[6]に記載されている試験法に従って測定した. すなわち, 試料1.0 gに蒸留水100mlとリン酸5 mlを加えてガムが膨脹するまで放置した後, 水蒸気蒸留を行って留液800mlを採取し, これを0.1N水酸化ナトリウム溶液でフェノールフタレイン試液を用いて滴定を行い, 滴定値を酢酸として換算する.

B法)試料1.0 gを蒸留水約100mlに溶解した後, アセトニトリル50～100mlで糊料分を沈殿させ, ろ過後, ろ液を蒸留水で200ml定容とし, HPLCで試験した.

[HPLC測定条件] カラム：KC-811(Shodex Ionpak 4.6mm φ×250mm), カラム温度：40℃, 移動相：0.05%リン酸溶液, 流速：0.5ml/min, 検出波長：210nm, 注入量：10 μl, 標準溶液：0.25mg/ml無水酢酸ナトリウム溶液

7. 糖類：試料1 gを水10mlに溶解し, 薄層クロマトグラフ法(TLC)で試験した. スポット量は5 μlとした.

[TLC条件] シリカゲル薄層板：Merck社製 Kieselgel 60, 展開溶媒：クロロホルム-メタノール-水＝30：23：4, 発色試薬：アニスアルデヒド硫酸試薬(アニスアルデヒド-エタノール-濃硫酸-酢酸＝1：18：1：0.2), 標準溶液：ブドウ糖, ショ糖, 乳糖, 果糖及び麦芽糖をそれぞれ10mg/mlの濃度に調製した.

8. アルカリ金属類：試料0.5 gに濃硝酸(1→2)を10ml加え, マイクロ波湿式灰化装置で分解後, 200ml定容とし, ICP発光分光分析装置で分析した. 標準溶液はCa及びMgについては1,000 μg/ml溶液0.5mlに濃硝酸(1→2)を2.5ml加え, 50ml定容とした. Na及びKについては1,000 μg/ml溶液5 mlに濃硝酸(1→2)を2.5ml加え, 50ml定容とした.

[ICP条件] 高周波出力：1,150W, 検液導入速度：100RPM, ネブライザー圧：30PSI, プラズマ観測高さ

：15mm，分析線：カルシウム317.9nm，マグネシウム279.0nm，ナトリウム588.9nm，カリウム766.4nm

結果及び考察

今回検討した天然増粘安定剤は一般によく使用されているものであり，Fig. 1に示すように樹液多糖類のアラビアガム，カラヤガム，トラガントガム，ガディガム，海草抽出物のカラギーナン，アルギン酸，ファーセレラン，種子多糖類のカロブビーンガム，グァーガム，タマリンドガム，タラガム，発酵多糖類のキサンタンガム，果実多糖類のペクチンの計13品目である．これらの品質規格試験を，Table 1に示すFAO/WHO規格[2)-7)]，FCC規格[8)]及び自主規格[9)]に準拠して行ったところ，品目に

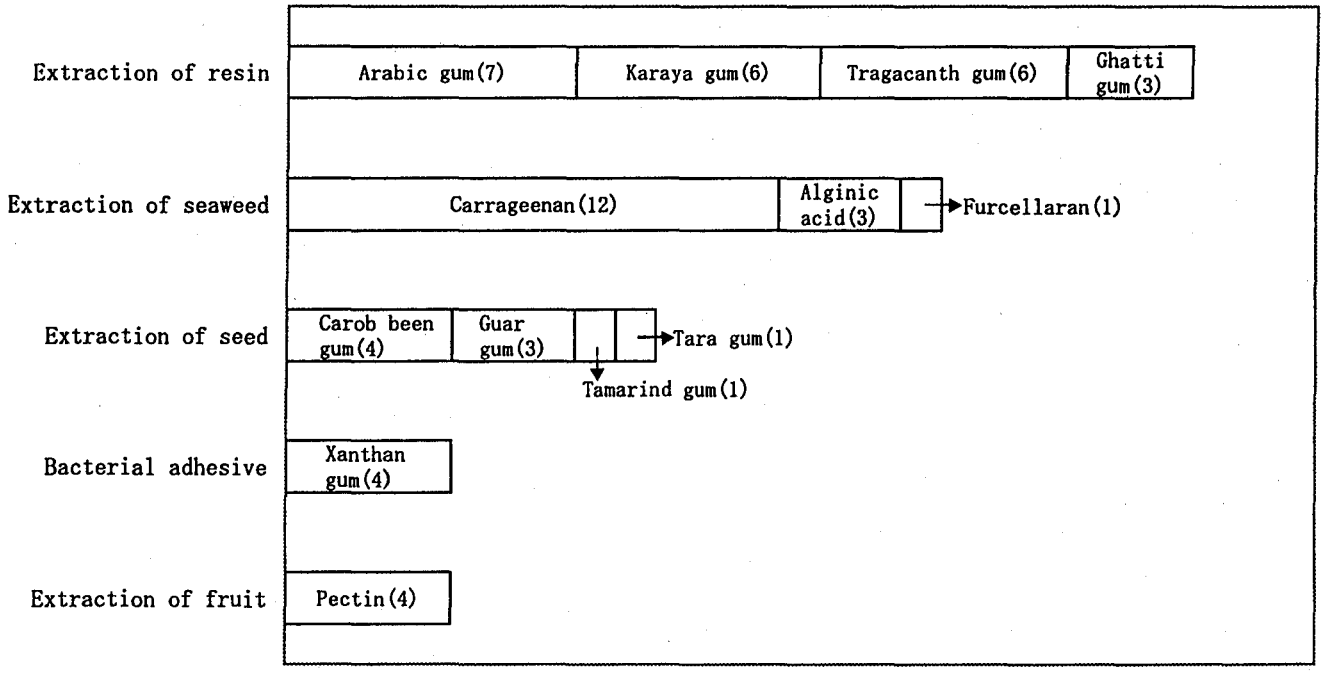


Fig. 1. Natural Thickening and Stabilizing Agents Used in the Present Study
( ) : number of sample

Table 1. Specifications of Natural Thickening and Stabilizing Agents in the Present Study

Thickening and stabilizing agents	Loss on drying(%)	Ash(%)			Galacturonic acid(%)	Nitrogen (%)	Protein (%)	Acid-insoluble matter(%)	Starch	Dextrin	Ethanol (%)	Methanol (%)	Isopropanol (%)
		Total	Acid insoluble	Sulfated									
Arabic gum	<17.0*** 105℃·6h	<4*	<0.5*			0.27-0.39*		<1** HCl	(-)[1]*	(-)[1]*			
Karaya gum	<20* 105℃·5h	<8*	<1*					<3* H_2SO_4	(-)[1]*	(-)[1]*			
Tragacanth gum	<16* 105℃·5h	<4.0***	<0.5*	<4*				<2* H_2SO_4		(-)[1]*			
Ghatti gum	<14* 105℃·5h	<6*	<1.75*										
Carrageenan	<12*** 105℃·5h	<40***	<1*					<2* HCl			<0.1*	<0.1*	<0.1*
Alginic acid	<15* 105℃·4h	<4*		<14.0***									
Furcellaran	<12*** 105℃·5h	<40***	<1*					<2* HCl			<0.1*	<0.1*	<0.1*
Carob bean gum	<15** 105℃·5h	<1.2*					<8**	<7.0*** H2SO4	(-)[1]*		<1*		<1*
Guar gum	<15* 105℃·5h	<1.5*					<10*	<7* H2SO4	(-)[1]*				
Tamarind gum	<7.0*** 105℃·3h	<5.0***					<3.0***		(-)[1]***				
Tara gum	<15** 105℃·5h	<1.5**					<3.5**	<2** H2SO4	(-)[1]**				
Xanthan gum	<15*** 105℃·5h	<16*				<1.5*							<500mg/kg*
Pectin	<12*** 105℃·5h	<10**	<1*		>65*	<2.5*			(-)[1]***		<1*	<1*	<1*

Table 1. Continued

Thickening and stabilizing agents	Viscosity (cps)	Sulfate (%)	Heavy metals (μg/g)	Lead (μg/g)	Copper (μg/g)	Zinc (μg/g)	Arsenic (μg/g)	other tests
Arabic gum			<20	<10			<1	Tannin-bearing gums (-)[1]*, Specific rotation (-26°~-34°)*
Karaya gum	1%·25℃[2]**		<20	<10			<1	Foreign gums (-)[1]**, Volatile acid (<10%)*
Tragacanth gum	>250** 1%·25℃		<20	<10			<1	Acasia and other soluble gums (-)[1]*, Karaya gum (-)[1]*, Agar (-)[1]*
Ghatti gum	5%·75℃[2]**		<20	<10			<1	Insoluble matter (<1.0%)**
Carrageenan	>5* 1.5%·75℃	15~40*	<20	<10			<1	Solubility in water (-)[1]**
Alginic acid			<20	<10			<1	Sodium hydroxide insoluble matter (<1%)*, Assay (91.0~104.5%)*
Furcellaran	>5* 1.5%·75℃	8~40***	<20	<10			<1	
Carob bean gum			<20	<10			<1	Galactomannans (>73.0%)**
Guar gum			<20	<10			<1	Borate (-)[1]*, Galactomannans (>66.0%)**
Tamarind gum			<20	<10			<1	Ether soluble matter (<1.0%)***
Tara gum			<20	<10			<1	
Xanthan gum	1.02~1.45**		<20	<10			<1	Pyrubic acid (>1.5%)*, Assay (91.0~117.0%)**
Pectin			<20	<10	<50*	<25*	<1	Sulfur dioxide (<50 μg/g)*, Degree of amidation (<40;LEP)[3]**, Degree of esterification (>50;HEP, <50;LEP)[3]**, Sodium methyl sulfate (<0.1%)**

*:FAO/WHO, **:Food Chemicals Codex (FCC), ***:the Federation of Japan Food Additives Association (FFAA)

1) passed test

2) not less than the minimum or within the range claimed by the vendor

3) HEP ; high-ester pectin, LEP ; low-ester pectin

よっては一部の試験法で適用が困難な場合があったので，以下に検討を行った．

Ⅰ．試験法の検討

1．カラヤガムの揮発性酸

FAO/WHO規格[6]の揮発性酸試験（A法）は，試料をリン酸酸性で水蒸気蒸留を行ったのち，遊離の酢酸を測定する方法であり，基準値は10%以下と定められている．しかし，今回試験を行った6検体は，13~16%とすべて基準値を超える結果が得られた．そのため，この試験法について検討したところ，遊離酢酸だけでなく，水蒸気蒸留の操作中にリン酸による加水分解が起こり，カラヤガムから酢酸が生成してプラスの誤差を与えたのではないかと考えた．そこで，カラヤガム中の遊離酢酸の分析の際，蒸留操作を行わず，直接B法で調製した試料溶液をHPLCで分析したところ，酢酸に相当するピークは観察されなかった．次に，この試料に10%の無水酢酸ナトリウムを添加し同様に分析したところ，酢酸のピークが認められた．一方，同一試料についてリン酸酸性で蒸留操作を行い，これをHPLCで分析したところ，酢酸に相当するピークが観察された．以上の結果から，規格の試験法では，蒸留操作中リン酸による脱アセチル化が起こり，測定値にプラスの誤差を与えてしまうことが分かった．なお，B法で試験した6検体は全て基準値以下であった．今後，更に回収率も含めた試験法の検討を行う必要があると考える．

2．タマリンドガム中の澱粉

自主規格[9]におけるタマリンドガムの澱粉試験法は，1%試料溶液にヨウ素試液を加えてよく振り混ぜたとき，青色を呈さないこととされている．今回1検体について試験を行なったところ，ヨウ素試液添加後の混和方法により，青色を呈色したり，全く呈色しなかったり，あるいはヨウ素試液の呈色の中に青色の粒子が混在したり，結果が異なる場合があることが分かった．しかし，試料にバレイショデンプンを1%添加して同様に試験した場合，混和方法の違いに関わらず青色を呈することが分かった．また，ヨウ素デンプン反応はデンプンだけでなく，ポリビニルアルコールやセルロース等でも類似反応が起こることが知られていることから[14]，自主規格[9]の方法ではヨウ素試液Aのヨウ素濃度が高すぎるために，タマリンドガムとヨウ素が疑似反応を起こしているのではないかと考えた．そこで，ヨウ素濃度が低く，塩酸で感度を高めた国税庁法[10]におけるヨウ素試液Bを用いて検討を行なった．1%試料溶液及び対照として1%溶性デンプン（メルク社製，特級品）溶液にヨウ素試液Bを

加えて，振り混ぜたときの呈色を観察した．その結果，対照は青色の呈色を示したが，試料溶液は呈色が見られなかった．

以上のことから，自主規格[9]による方法では類似反応により青色を示したことが判明し，検体は規格に適合していたことが分かった．また，国税庁法[10]は1%澱粉の混在を判別することが可能であり，実用上，十分使用できる方法であることが分かった．

3．トラガントガム中の寒天

FAO/WHO規格[4]におけるトラガントガム中の寒天試験法は，0.5%試料溶液に塩酸を加え，30分水浴で加熱後，3.65%塩化バリウム溶液を滴下したとき，浮遊物を認めないこととされている．しかし，この方法では寒天中の硫酸基に塩化バリウムが反応して生成した硫酸バリウムであるのか，試料がゲル化して浮遊しているのか，判別が困難な場合があった．今後，ICP発光分光分析法等を利用して硫酸基を検出する方法等，他の判別試験を検討する必要があると考える．

また，本調査における各試験を行う際に，天然増粘安定剤の性質上，試料溶液の調製時に溶解が困難な場合があったため，規格試験を正確に行うには，長時間の放置，加温あるいは攪拌操作上の工夫等試料を完全に溶解することが必要であり，規格設定の際には溶解方法を具体的に記載する必要があると思われる．

Ⅱ．規格試験の結果

今回試験した天然増粘安定剤55検体はほぼTable 1で示した規格に適合していたが，適合しなかった検体の結果をTable 2に示した．

1．トラガントガム

6検体について試験したところ，Table 2に示すようにデキストリンの試験でFAO/WHO規格[4]の基準に適合しないものが5検体あった．この試験は，原料由来の残留デキストリンまたは粘度調整のため添加されるデキストリンを規定しているものと考えられるが，今回適合しなかった検体について原因を特定することはできなかった．

また，強熱残留物の試験でFAO/WHO規格[4]（基準値4%以下）を超えるものが1検体（5%）認められた．

2．カラギーナン

12検体について試験したところ，Table 2に示すように残留エタノール試験でFAO/WHO規格[4]（基準値0.1%以下）を超えたものが2検体あった．エタノールはカラギーナンを原料より分離・精製する際に使用されるもの[15]で，この規格はその残留量を規定しているものである．今回，基準を超えた2検体は0.3%及び0.5%と基準値をわずかに上回ったが，他の検体はいずれも0.1%以下の低い値であった．

また，カラギーナンの純度は構造中の硫酸基含量で規定されているが，1検体が14%とFAO/WHO規格[4]及び自主規格[9]の基準値（15%）を下回った．この検体からはショ糖が検出されていることからも，カラギーナンの純度が低いことに由来すると考えられる．

なお，乾燥減量の試験で基準値（12%以下）をわずかに超えているものが2検体（ともに13%）あった．

3．キサンタンガム

4検体について試験を行ったところ，Table 2に示すように粘度試験で1検体がFCC規格[8]の基準範囲（1.02

Table 2. Analytical Results of Natural Thickening and Stabilizing Agents

Thickening and stabilizing agent	Test[1]	Number of sample[2]	Analytical value[3]	Specification		
				FAO/WHO	FCC	FFAA
Tragacanth gum	Ash (sulfated)[4]	1/6	5%	<4%		
	Dexstrin	5/6	Detected	Not detected		
Carrageenan	Loss on drynig	2/12	13%, 13%	<12%	<12%	<12.0%
	Ethanol	2/12	0.3%, 0.5%	<0.1%		
	Sulfate	1/12	14%	15-40%	18-40%	15-40%
Tamarind gum	Loss on drying	1/1	7.1%			<7.0%
Xanthan gum	Viscosity	1/4	0.99		1.02-1.45	
Pectin	Nitrogen	1/4	3.6%	<2.5%		

1) the test out of specification
2) the number of sample out of specification/total number of sample
3) the analytical value of sample out of specification
4) residue on ignition

～1.45)の下限を下回っていた(測定値：0.99)．FCC規格[8]におけるキサンタンガムの粘度は，「試料1％と塩化カリウム1％を蒸留水に分散し，2時間攪拌後，B型回転粘度計を用いて，試料溶液が23.9℃のときの粘度(V1)と65.6℃のときの粘度(V2)を測定し，V1/V2が1.02～1.45の範囲にあること」と記載されている．キサンタンガムは塩化カリウムや塩化ナトリウム等の中性塩が存在すると，粘度の耐熱性が向上し，高温時でも粘度の低下がおこらない性質がある[15]ことから，この試験では1％塩化カリウム添加時の温度に対する粘度の安定性を試験しているものと考えられる．したがって，前述の基準範囲の下限を下回った検体は，粘度の熱安定性が非常に強いものと考えられる．しかし，V2測定時に温度が低下し，糊化を起こして粘性が高くなったことも考えられるため，今後，更に高精度の機器を用いて検討する必要があると考えている．

4．タマリンドガム

1検体について試験したところ，Table 2に示すように乾燥減量の試験で基準値(7.0%以下)をわずかに超えていた(7.1%)．

5．ペクチン

4検体について試験を行ったが，Table 2に示すように窒素の試験でFAO/WHO規格[3](基準値2.5%以下)を超えているものが1検体(3.6%)あった．ペクチンは果実・野菜などの植物に含まれる粘液質の細胞組織成分であり，セルロースや蛋白質と結合した形で存在している[16]ことから，この検体には原料に由来する蛋白質が基準を超えて残留していると考えられる．

なお，重金属，鉛及びヒ素についても，全検体でそれぞれ20μg/g，10μg/g及び1μg/g以下であった．

Ⅲ．糖類及びアルカリ金属類

どの規格にも設定はされていないが，糖類及びアルカリ金属類が粘度の調整剤として添加されることがあり[15]，試料の純度にも影響を与えるため，それぞれ分析を行い，その結果をTable 3に示した．

全検体について糖類の分析を行ったところ，糖類が検出された天然増粘安定剤はTable 3に示すように，カラギーナン，ファーセレラン，カロブビーンガム，グァーガム，タマリンドガム及びペクチンの7品目20検体で，全検体の約40%であった．ショ糖を検出する検体が15検体と最も多く，ついでブドウ糖は4検体から検出された．ファーセレランからはショ糖とブドウ糖が検出された．検出限界はいずれの糖においても1％であった．

また，アルカリ金属類については，粘度との相関をみるため，粘度の試験が設定されているカラヤガム，トラガントガム，カラギーナン，ファーセレラン及びキサンタンガムの5品目29検体について，Ca，Mg，Na及びKの含量を測定した．Table 3に示すようにアルカリ金属類は品目によって異なっており，カラヤガム及びトラガントガムからはそれぞれCa 1.4～1.8%及び1.1～1.3%，カラギーナンからはCa 0.2～4.1%，Na 0.2～4.2%，K 0.9～12.4%，ファーセレラン及びキサンタンガムからはそれぞれNa 1.5%及び0.8～3.0%，K 12.2%及び0.8～3.2%が検出された．なお，Ca，Mg，Na及びKの含量と粘度との間に相関は認められなかった．

結　論

市販の食品用天然増粘安定剤13品目55検体について，FAO/WHO規格[2)-7)]，FCC規格[8]及び自主規格[9]の3つの規格に基づいて試験し，品質調査を行った．その結果，トラガントガム，カラギーナン等延べ5品目14検体がデ

Table 3. Analytical Results of Alkali Metal and Saccharide in Natural Thickening and Stabilizing Agents

Thickening and stabilizing agent	Number of sample	Contents of alkali metal[1)]				Number of sample detected saccharide	
		Ca(%)	Na(%)	Mg(%)	K(%)	Saccharose	Glucose
Karaya gum	6	1.4-1.8		0.4	0.8-1.1		
Tragacanth gum	6	1.1-1.3		0.1	0.1-0.2		
Carrageenan	12	0.2-4.1	0.2-4.2	0.1-0.4	0.9-12.4	6	1
Furcellaran	1	0.7	1.5	0.1	12.2	1	1
Carob been gum	4					4	
Guar gum	3					3	
Tamarind gum	1						1
Xanthan gum	4	0.1	0.8-3.0	0.1	0.8-3.2		
Pectin	4					2	2

1) alkali metal and alkaline earth metal

キストリン，残留エタノール等いずれかの規格基準に適合しなかった．また，カラヤガムの揮発性酸，タマリンドガム中の澱粉やトラガントガム中の寒天のように，規格試験の中には試験法の改良を行うべき点が認められた．更に，糖類は全検体の約40%から検出された．

今回の調査結果から明らかなように，天然増粘安定剤は試験法の改良を含めて品質評価の面からも公的な品質規格の作成が急務であり，今後の課題である．

謝辞：本調査を実施するにあたり検体収集にご協力いただいた日本食品添加物協会に深謝致します．

(本研究の概要は日本食品化学学会第1回学術大会1995年7月に発表した.)

文　献

1) 健康産業新聞社編：食品と開発，**30**(7)，49-52，1995.

2) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **4**, 1978, FAO of The United Nations, Rome

3) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **31/2**, 1984, FAO of The United Nations, Rome

4) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **34**, 1986, FAO of The United Nations, Rome

5) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **37**, 1986, FAO of The United Nations, Rome

6) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **38**, 1988, FAO of The United Nations, Rome

7) Joint FAO/WHO expert committee of food additives ; Specifications for identity and purity of certain food additives：*FAO Food and Nutrition Paper,* **49**, 1990, FAO of The United Nations, Rome

8) Committee on codex specifications：*Food Chemicals Codex*, 3rd. ed., 1981, National Academy Press, Washington, D. C.

9) 日本食品添加物協会編：第2版化学的合成品以外の食品添加物自主規格，179-199，1993，日本食品添加物協会，東京

19) 注解編集委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解，218-221，1993，(財)日本醸造協会，東京

11) 植松洋子，広門雅子，平田恵子，他：食衛誌，34，232-238，1993.

12) 日本食品添加物協会編：第6版食品添加物公定書，23-61，1992，日本食品添加物協会，東京

13) 日本食品添加物協会編：第5版食品添加物公定書，135-136，1986，日本食品添加物協会，東京

14) 二国二郎：デンプンハンドブック，98-105，1966，東京

15) 食品化学新聞社編：天然添加物と新食品素材 '88，41-67，1988，食品化学新聞社，東京

16) 左右田徳朗，江上不二夫：多糖類化学，243-265，1955，共立出版，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 189-193, 1996

イオンクロマトグラフィーによる食品用縮合リン酸塩中の正リン酸塩の定量

安野哲子*, 船山惠市*, 萩原輝彦*,
鈴木助治*

Determination of Orthophosphates in Condensed Phosphates Used as Food Additives by Ion Chromatography

TETSUKO YASUNO*, KEIICHI FUNAYAMA*, TERUHIKO HAGIWARA*
and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：食品添加物 food additive, 縮合リン酸塩 condensed phosphate, ピロリン酸塩 pyrophosphate, ポリリン酸塩 polyphosphate, メタリン酸塩 metaphosphate, 正リン酸塩 orthophosphate, イオンクロマトグラフィー ion chromatography

緒　言

縮合リン酸塩は多彩な物理化学的性質を有するため，食品添加物として，結着剤，変色防止剤，pH調整剤，分散剤など，いろいろな用途で広く食品加工に用いられている[1,2]．現在，わが国で食品添加物として許可されている縮合リン酸塩は11品目[1]であるが，それぞれ食品衛生法によって規格が定められており，これに基づいて市販品の品質検査を行っている．

規格では，縮合リン酸塩に対して未反応原料等に由来する正リン酸塩の混在を規制している．この正リン酸塩はリン酸一水素塩とリン酸二水素塩からなり，それらの混在量を検査するための純度試験(硝酸銀法)[1]では，試料に硝酸銀を反応させても，生成した正リン酸銀による著しい黄色を呈してはならないと規定している．

しかし，実際には試料の微粉末化や，混在する正リン酸塩が一水素塩であるか二水素塩であるかによって検出限界が大きく異なり，特に二水素塩を含有する場合は相当多量に混在していても呈色を示さないという問題がみられる．

そこで，今回縮合リン酸塩中の正リン酸塩をイオンクロマトグラフィーにより定量する方法を検討したところ良好な結果を得た．また，硝酸銀法についても検討し，若干の知見を得たのであわせて報告する．

実　験

1．試薬　試薬は和光純薬工業製品を用いた．[炭酸ナトリウム(無水)，炭酸水素ナトリウム，ホスフィン酸ナトリウム一水和物，硝酸銀，リン酸水素二ナトリウム(無水)：JIS特級品．亜リン酸二ナトリウム五水和物，リン酸二水素ナトリウム(無水)：和光特級品．1M硫酸：容量分析用．リン酸イオン標準液：PO_4^{3-} 1,000mg/l] 分析法検討用縮合リン酸塩は和光純薬工業製品，関東化学製品，ナカライテスク製品を用いた．縮合リン酸塩の品名，重合度，品位については表1に示す．水はMILLIPORE社製のMILLI-Q Laboで精製した超純水を用いた．

2．装置及び測定条件　pHメータ：堀場製作所製F-8$_{DP}$，イオンクロマトグラフ：DIONEX社製4000i，分離カラム：IonPac AS4A 4×250mm，ガードカラム：IonPac AG4A 4×50mm，溶離液：1.7mM炭酸ナトリウム・1.8mM炭酸水素ナトリウム溶液，流速：1.5ml/min，サプレッサー：AMMS-Ⅱ，再生液：0.025N硫酸，検出器：電気伝導度検出器，感度：30 μS，注入量：50 μl．

3．分析法　試料約50mgを精密に量り，水を加えて溶かし正確に100mlとした．これを試料溶液とし，イオンクロマトグラフィーにより測定した．ピーク面積法によって正リン酸イオン(PO_4^{3-})濃度を定量し，この正リン酸イオン量を正リン酸塩量とした．標準溶液はリン酸イオ

*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．分析法検討用縮合リン酸塩

No.	品　名[a)]	重合度	品　位	製造元
1	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	2	JIS特級	W[b)]
2	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	2	自社一級	W
3	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	2	自社一級	K[c)]
4	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	2	自社一級	N[d)]
5	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	2	自社一級	K
6	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	2	化学用	N
7	ピロリン酸二水素二ナトリウム	2	自社一級	N
8	ピロリン酸四カリウム	2	自社一級	W
9	ピロリン酸四カリウム	2	自社特級	K
10	ピロリン酸四カリウム	2	自社一級	K
11	ピロリン酸四カリウム	2	自社一級	N
12	ポリリン酸ナトリウム	3	化学用	W
13	ポリリン酸ナトリウム	3	自社一級	K
14	ポリリン酸ナトリウム	3	化学用	N
15	ポリリン酸ナトリウム	4	化学用	N
16	ポリリン酸カリウム	3	化学用	N
17	メタリン酸ナトリウム	不明	自社一級	W
18	メタリン酸ナトリウム	＞3	自社特級	K
19	メタリン酸ナトリウム	＞3	自社一級	K
20	メタリン酸ナトリウム	＞3	自社特級	N
21	メタリン酸ナトリウム	＞3	自社一級	N
22	メタリン酸ナトリウム	＞3	化学用	N
23	メタリン酸ナトリウム	6	化学用	W
24	メタリン酸ナトリウム	6	自社特級	K
25	メタリン酸ナトリウム	6	自社一級	K
26	メタリン酸ナトリウム	6	自社特級	N
27	メタリン酸ナトリウム	6	自社一級	N
28	メタリン酸カリウム	不明	化学用	W
29	メタリン酸カリウム	不明	自社一級	K
30	メタリン酸カリウム	不明	化学用	N

a)：食品添加物の命名法に従った.
b)：和光純薬工業
c)：関東化学
d)：ナカライテスク

ン標準液を水で希釈して，1.0～5.0 μg/mlの範囲で調製した.

結果及び考察

縮合リン酸塩11品目について，それぞれの品名と正リン酸塩の規制の有無を表2に示す．正リン酸塩の規制がある9品目のうち，最も繁用されているナトリウム塩及びカリウム塩の8品目について検討を行った.

表2．縮合リン酸塩の品目と正リン酸塩の規制の有無

No.	品　名	正リン酸塩規制*
1	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	有り
2	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	有り
3	ピロリン酸二水素二ナトリウム	有り
4	ピロリン酸四カリウム	有り
5	ポリリン酸ナトリウム	有り
6	ポリリン酸カリウム	有り
7	メタリン酸ナトリウム	有り
8	メタリン酸カリウム	有り
9	ピロリン酸二水素カルシウム	有り
10	ピロリン酸第一鉄	無し
11	ピロリン酸第二鉄	無し

＊硝酸銀法において正リン酸銀の著しい黄色を呈してはならないと規制されている.

1．硝酸銀法の検出限界　縮合リン酸塩中の正リン酸塩の公定試験法(硝酸銀法)[1]は以下のとおりである.

「本品の粉末1.0gを量り，硝酸銀溶液(1→50)2～3滴を加えるとき，著しい黄色を呈さない.」

これは次式に示すように，銀イオンとリン酸一水素イオンが反応して生成する黄色の正リン酸銀を検出する方法である[3].

$$3Ag^+ + HPO_4^{2-} \rightleftarrows Ag_3PO_4 + H^+$$

この方法は，規格値のように限度値は特に設定されていないが，検出限界は約0.2%で，著しい黄色を呈するのは正リン酸塩の混在量が0.3%以上のときである[1]．しかし，表1の試薬に硝酸銀法を適用したところ，イオンクロマトグラフィーで0.22～23%の正リン酸塩を検出した25種(表3)のうち，著しい黄色を呈したのは7.1%以上の3種(No.7，16，29)のみであった．残りはすべて硝酸銀法では黄色を呈さなかった.

硝酸銀法で検出されない理由の一つにリン酸二水素塩の存在が考えられる．縮合リン酸塩の製造原料又は中間生成物の正リン酸塩には一水素塩と二水素塩がある[1]．二水素塩は弱酸性であり，前述の反応式が酸性で逆行することから，一水素塩とは反応量が異なって，検出感度が悪くなると推察される．そこで，更に表1の試薬のうち，イオンクロマトグラフィーの結果(表3)から正リン酸塩の検出量が少なかったNo.6ピロリン酸四ナトリウム(無水)，No.14ポリリン酸ナトリウム，No.22メタリン酸ナトリウムを用い，それぞれ一水素塩［リン酸水素二ナトリウム(無水)］を添加した群及び二水素塩［リン酸二水素ナトリウム(無水)］を添加した群を調製して硝

酸銀法による反応のちがいを比較した．添加量は正リン酸イオンとして4.0%とした．その結果，No.6，14，22のいずれも一水素塩では呈色反応は陽性，二水素塩では陰性であった．

また，硝酸銀法で著しい黄色を呈する試料でも，より微細な粉末にすると反応が陰性になることがある．吸湿などにより試料の表面が分解してできた正リン酸塩が，更に微粉末にすることによって試料に混合され，逆に表面に現れた縮合リン酸塩と硝酸銀の反応が優位に進行するのではないかと考えている．硝酸銀は正リン酸塩だけでなく縮合リン酸塩とも反応して白色の沈澱を生成する[1,3]．

このように硝酸銀法では，硝酸銀と一水素塩，二水素塩，縮合リン酸塩との反応が微妙に影響しあうため，製造原料の異なる種々の縮合リン酸塩を硝酸銀法だけで一様に規制するのは困難であると考える．なお，硝酸銀との反応を正リン酸塩の検出に応用している例は日本工業規格の二りん酸ナトリウム十水和物［ピロリン酸四ナトリウム(結晶)］[4]にみられるが，この製造原料は一水素塩のみである[1]．また，JECFA規格やFCC規格では正リン酸塩に関する規定そのものがない[5]．

そこで，次にイオンクロマトグラフィーによる正リン酸塩の定量法及び実試料への適用性について検討を行った．

2．イオンクロマトグラフィーによる定量法の検討

1）測定条件　カラム，溶離液等の測定条件は，塩素イオン，正リン酸イオン，硫酸イオンなどの陰イオンの分離分析によく用いられる測定条件[6]を適用した．この条件で溶出されるリン酸イオンは正リン酸イオンのほか，次亜リン酸イオン及び亜リン酸イオンがある．これらのリン酸イオンの混液のクロマトグラムを図1に示す．ホスフィン酸ナトリウム一水和物，亜リン酸二ナトリウム五水和物，リン酸イオン標準液を用い，次亜リン酸イオン，亜リン酸イオン，正リン酸イオンとして10 μg/mlとなるように混液を調製した．図1に示すように3種のイオンの分離は良好で，正リン酸イオンの保持時間は7.5分であった．なお，縮合リン酸イオンはこの測定条件では溶出されない．

2）検量線と繰り返し精度　正リン酸イオン濃度が0.0，1.0，2.0，3.0，4.0，5.0 μg/mlの標準溶液を用い，ピーク面積により検量線を作成した．その結果，相関係数0.9999の良好な直線関係が得られた．また，2.0 μg/mlの標準溶液を10回繰り返して測定し，ピーク面積(平均値533)の変動係数を求めたところ，1.3%という良好な結果が得られた．なお，検出限界は試料溶液中で約0.05 μg/mlであった．

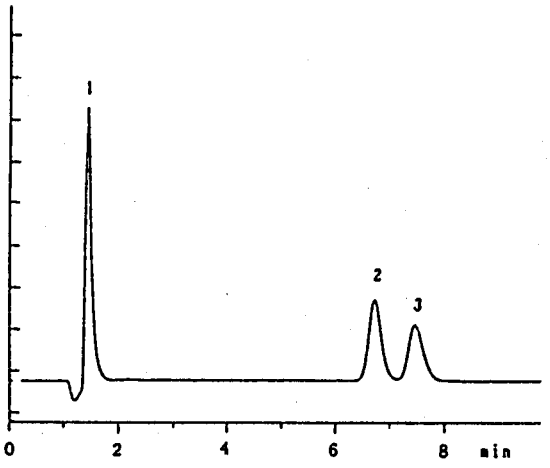


図1．リン酸イオンのクロマトグラム
1：次亜リン酸イオン(PO_2^{3-})
2：亜リン酸イオン(PO_3^{3-})
3：正リン酸イオン(PO_4^{3-})

3）正リン酸塩量に及ぼす縮合リン酸塩の加水分解の影響　温度や液性などの条件にもよるが，縮合リン酸塩は水溶液中で経時的に正リン酸塩にまで分解される[1]．そこで，表1の試薬を用い，実験の部3．分析法に従って試料溶液を調製後，放置時間が正リン酸塩の定量値に影響を及ぼすかどうか検討した．試料の溶解直後(30分以内)，3時間及び24時間放置したときの正リン酸塩の定量結果を表3に示す．また，溶解直後の試料溶液のpHも表3に示す．なお，実験は室温で行い，pHはpHメータを用いて測定した．表3に示すように正リン酸塩の定量値は，溶解直後を100とすると，3時間後は100.0～104.5でほとんど変化せず，24時間後でも95.7～110.7と変化は少ない．したがって，試料溶液調製当日に分析すれば縮合リン酸塩の加水分解の影響についてはほとんど考慮しなくてよいことがわかった．また，試料溶液のpHは4.2～10.0であったが，本法ではこのpH域は縮合リン酸塩の加水分解を促進する要因とはならなかった．

4）食品添加物中の正リン酸塩量　平成3～7年度に入手した検体を試料として，イオンクロマトグラフィーにより正リン酸塩を定量した．試料は，ピロリン酸四ナトリウム(無水)3種，メタリン酸ナトリウム4種，正リン酸塩の規制がある2～4品目の縮合リン酸塩から成る製剤18種の計25種である．表4に定量結果と試料溶液のpHを示す．食品添加物の縮合リン酸塩中の正リン酸塩量はND～1.9%で，25種中18種が0.3%以上であった．また，試料については硝酸銀法でも検査を行ったが，結果は25種ともすべて陰性であった．

表3．正リン酸塩量に及ぼす縮合リン酸塩の加水分解の影響

No.	品名	pH	溶解直後 PO_4^{3-}%[a)]	3時間後 PO_4^{3-}%[a)]		24時間後 PO_4^{3-}%[a)]	
1	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	10.0	ND[b)]	ND[b)]		ND[b)]	
2	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	10.0	ND	ND		ND	
3	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	10.0	0.35	0.35	(100.0)[c)]	0.34	(97.1)[d)]
4	ピロリン酸四ナトリウム(結晶)	10.0	ND	ND		ND	
5	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	10.0	0.32	0.32	(100.0)	0.32	(100.0)
6	ピロリン酸四ナトリウム(無水)	10.0	ND	ND		ND	
7	ピロリン酸二水素二ナトリウム	5.0	23	23	(100.0)	22	(95.7)
8	ピロリン酸四カリウム	10.0	0.46	0.46	(100.0)	0.47	(102.2)
9	ピロリン酸四カリウム	10.0	0.50	0.50	(100.0)	0.50	(100.0)
10	ピロリン酸四カリウム	10.0	0.42	0.42	(100.0)	0.43	(102.4)
11	ピロリン酸四カリウム	10.0	0.35	0.35	(100.0)	0.35	(100.0)
12	ポリリン酸ナトリウム	9.9	0.27	0.27	(100.0)	0.26	(96.3)
13	ポリリン酸ナトリウム	9.7	0.22	0.23	(104.5)	0.23	(104.5)
14	ポリリン酸ナトリウム	9.8	ND	ND		ND	
15	ポリリン酸ナトリウム	9.2	0.34	0.35	(102.9)	0.36	(105.9)
16	ポリリン酸カリウム	9.3	7.1	7.1	(100.0)	7.0	(98.6)
17	メタリン酸ナトリウム	7.2	0.74	0.74	(100.0)	0.77	(104.1)
18	メタリン酸ナトリウム	6.9	1.4	1.4	(100.0)	1.4	(100.0)
19	メタリン酸ナトリウム	7.2	0.78	0.81	(103.8)	0.84	(107.7)
20	メタリン酸ナトリウム	6.7	1.6	1.6	(100.0)	1.6	(100.0)
21	メタリン酸ナトリウム	7.4	0.78	0.80	(102.6)	0.80	(102.6)
22	メタリン酸ナトリウム	7.0	0.28	0.29	(103.6)	0.31	(110.7)
23	メタリン酸ナトリウム	7.4	0.72	0.73	(101.4)	0.76	(105.6)
24	メタリン酸ナトリウム	7.2	0.71	0.71	(100.0)	0.75	(105.6)
25	メタリン酸ナトリウム	7.2	0.54	0.54	(100.0)	0.58	(107.4)
26	メタリン酸ナトリウム	6.8	0.91	0.91	(100.0)	0.94	(103.3)
27	メタリン酸ナトリウム	7.1	0.39	0.39	(100.0)	0.41	(105.1)
28	メタリン酸カリウム	4.4	2.5	2.5	(100.0)	2.6	(104.0)
29	メタリン酸カリウム	4.2	8.7	8.7	(100.0)	8.7	(100.0)
30	メタリン酸カリウム	4.5	3.4	3.4	(100.0)	3.3	(97.1)

a)：イオンクロマトグラフィーによる定量値
b)：<0.20%
c)：( )内＝(3時間後／溶解直後)×100
d)：( )内＝(24時間後／溶解直後)×100

まとめ

縮合リン酸塩の食品添加物規格では，未反応原料などに由来する正リン酸塩の混在を規制している．

しかし，公定法である硝酸銀法[1)]は，正リン酸塩量が検出限界の0.2%以上でも呈色を示さない場合がある．検討の結果，このことは混在する正リン酸塩が一水素塩であるか二水素塩であるかによって，硝酸銀との反応量が大きく異なることに起因することがわかった．しかも，試料を微細な粉末にすると，呈色結果に負の影響を与えた．硝酸銀法は実試料に適用したとき，正リン酸塩が多量に存在しても検出できないという欠点が認められ，適正な試験法に改善する必要がある．

そこで，イオンクロマトグラフィーにより正リン酸塩を定量する方法を検討したところ，精度よく定量でき，

表4．イオンクロマトグラフィーによる
食品添加物中の正リン酸塩の定量結果

No.	種　　類	pH	PO_4^{3-}%
1	ピロリン酸	10.0	ND*
2	四ナトリウム(無水)	10.0	ND
3		10.0	ND
4		6.6	0.33
5	メタリン酸ナトリウム	7.3	0.35
6		7.4	0.20
7		7.3	ND
8	製剤A	9.6	0.42
9	製剤B	9.6	0.48
10	製剤C	9.7	0.42
11	製剤D	8.9	0.42
12	製剤E	7.4	0.34
13	製剤F	9.6	0.50
14	製剤G	9.6	0.49
15	製剤H	9.6	0.54
16	製剤I	9.6	0.68
17	製剤J	9.0	0.24
18	製剤K	9.5	0.66
19	製剤L	9.9	0.40
20	製剤M	9.9	0.26
21	製剤N	9.5	0.65
22	製剤O	9.7	0.28
23	製剤P	9.3	1.9
24	製剤Q	9.5	0.71
25	製剤R	9.8	0.21

*＜0.20%

良好な結果が得られた．更に，食品添加物の縮合リン酸塩25種に本法を適用した結果，正リン酸塩の混在量はND～1.9%であることがわかり，縮合リン酸塩及びその製剤中の混在量を把握することができた．

文　　献

1）石館守三，鈴木郁生，谷村顕雄監修：第六版食品添加物公定書解説書，1992，廣川書店，東京．
2）大本美彌子：栄養と健康のライフサイエンス，1，72-80，1996．
3）高木誠司：新訂定性分析化学・中巻，第19版，8，1966，南江堂，東京．
4）JIS K 8785，1992，日本規格協会，東京．
5）食品添加物国際規格対比集，1996，日本食品添加物協会，東京．
6）DIONEX Application Report，AR003BE-0005，日本ダイオネクス，大阪．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 194-197, 1996

水耕栽培野菜および四訂日本食品標準成分表未収載野菜の栄養成分について

横山知子*, 高橋　巖**, 坂牧成恵*, 牛尾房雄*,
植田忠彦*, 市川久次*

Studies on Nutritional Components in Hydroponic Vegetables and Unmentioned Ones in STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN (Fourth revised edition)

TOMOKO YOKOYAMA*, IWAO TAKAHASHI**, NARUE SAKAMAKI*,
FUSAO USHIO*, TADAHIKO UETA* and HISATSUGU ICHIKAWA*

Keywords：野菜 vegetables, 水耕栽培 hydroponics, 栄養成分 nutritional components

はじめに

近年，食生活の多様化，栽培・流通技術の発展により，水耕栽培野菜や輸入野菜が新たに市場に出回っている．

しかし，これらの野菜には，栽培方法等の違いから栄養成分に変化が考えられるものや，四訂日本食品標準成分表[1]（以下，四訂成分表と略す）未収載のものがある．

そこで，今回，都内小売店より水耕栽培野菜（ほうれんそう，こまつな，しゅんぎく）と四訂成分表未収載野菜（モロヘイヤ，カイワレダイコン）を購入し，各種ビタミン，無機質についての分析調査を行った．

実験方法

1．試料

平成6年12月から平成7年8月にかけて東京都内の小売店において購入したものを用いた．

水耕栽培野菜は，ほうれんそう5検体，こまつな1検体，しゅんぎく1検体，モロヘイヤとカイワレダイコンは，各々5検体を試料とした．

また，比較のために従来の栽培方法により生産されたほうれんそう，こまつな，しゅんぎくについても分析を行った．なお，こまつなは平成5年10月に東京都農業試験場で収穫されたものである．試料の生産地及び購入時期については表1に示すとおりである．

2．分析方法

試料は水洗し，可食部を細切し凍結乾燥した後，粉砕・均一化したものを分析に供した．なお，ビタミンC，カロチンについては，生試料を直接分析に供した．

水分：凍結乾燥法，カロチン：高速液体クロマトグラフィー法[2]，ビタミンB_1：チオクローム蛍光法[3]，ビタミンB_2：ルミフラビン蛍光法[4]，ビタミンC：ヒドラジン・高速液体クロマトグラフィー法[5]，無機質：高周波誘導結合プラズマ発光分析法[6]により各々分析した．

結果及び考察

表2にビタミン類及び無機質の分析結果を示した．

1．水耕栽培ほうれんそうについて

(1) ビタミン類

水耕栽培ほうれんそうのビタミン類については，ビタミンCの分析値が2～38mg/100g，ビタミンB_2が0.11～0.16mg/100gであり，それぞれ四訂成分表収載の従来の方法により栽培されたほうれんそうの値の3～58%および48～70%と低含量であった．今回比較のために分析した従来の栽培方法（以下，慣行法という）のものと比べても低い値であった．カロチン，ビタミンB_1は，個体差があるものの平均2800μg/100g，0.11mg/100gであり四訂成分表値とほぼ同程度であった．

(2) 無機質

水耕栽培ほうれんそうの無機質は，鉄の分析値が0.4～0.7mg/100g，ナトリウムが2～4mg/100g，銅が53～95μg/100gで，四訂成分表の鉄の値の11～19%，ナトリウム値の10～19%，日本食品無機質成分表[7]（以下，無機質成分表と略す）の銅の値の29～53%と低含量であり，慣行法のものと比べても低い値であった．亜鉛の分析値は210～970μg/100gで，無機質成分表の亜鉛の値

*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 cyome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**同乳肉衛生研究科

表1 試料

品名		生産地	購入時期
ほうれんそう(水耕栽培) A		東京都*1	平成7年1月
ほうれんそう(水耕栽培) B		千葉県	平成7年8月
ほうれんそう(水耕栽培) C		東京都*1	平成7年8月
ほうれんそう(水耕栽培) D		千葉県	平成7年8月
ほうれんそう(水耕栽培) E		静岡県	平成7年8月
ほうれんそう(慣行)		群馬県	平成6年12月
こまつな(水耕栽培)		東京都*1	平成7年1月
こまつな(慣行)		東京都*2	平成5年10月*3
しゅんぎく(水耕栽培)		東京都*1	平成7年1月
しゅんぎく(慣行)		千葉県	平成7年1月
モロヘイヤ	A	沖縄県	平成6年12月
モロヘイヤ	B	山梨県	平成7年8月
モロヘイヤ	C	愛知県*1	平成7年8月
モロヘイヤ	D	静岡県	平成7年8月
モロヘイヤ	E	岩手県	平成7年8月
カイワレダイコン	A	――――*4	平成6年12月
カイワレダイコン	B	岐阜県	平成7年8月
カイワレダイコン	C	静岡県	平成7年8月
カイワレダイコン	D	埼玉県	平成7年8月
カイワレダイコン	E	千葉県	平成7年8月

＊1：販売者所在地
＊2：東京都農業試験場
＊3：収穫時期
＊4：生産地特定できず

の27～126%であり，ばらつきが大きかった．

河野は，8品種のほうれんそうを水耕栽培し，その地上部に含まれる無機質10元素について分析し，乾物重量当たりの含有量を比較している．その結果，品種間差異のみられなかったのはカリウムだけで，他の9元素については品種間差異がみられた．また，水耕栽培したほうれんそうはカリウムとリンの含有量が多く，鉄は少ないのが特徴と報告している[8]．

河野及び我々の結果から，水耕栽培ほうれんそうの鉄の含有量は品種や培養液の違い，栽培環境の影響により固体間の差異はあるものの四訂成分表値と比較し低い傾向にある．我々が日常，食している野菜の中で四訂成分表の鉄の値が最も高いのはほうれんそうであるが，今回の調査結果によれば，水耕栽培ほうれんそうは鉄の供給源としては期待できない．

2．水耕栽培こまつな及びしゅんぎくについて

水耕栽培こまつな及びしゅんぎくについては，ビタミンB_1，ビタミンB_2，ビタミンCが四訂成分表値より若干低い値であり，慣行法のものと比較しても同じかやや低い値であった．また，無機質についてはカルシウム，鉄，亜鉛，銅が四訂成分表値及び慣行法のものと比較し低い含量であった．ナトリウムは四訂成分表値より低含量であった．しかし，各々1試料の分析であるため，ばらつきの範囲内であるか不明である．

3．モロヘイヤについて

(1) ビタミン類

モロヘイヤは四訂成分表未収載野菜であるが，代表的な緑黄色野菜であるほうれんそう，こまつなの四訂成分表値に比べて，ビタミンではカロチン6,400～9,200 μg/100 g，ビタミンB_1 0.17～0.22mg/100 g，ビタミンB_2 0.44～0.68mg/100 gと高含量であった．ビタミンCの分析値は31～110mg/100 gでばらつきがあった．荻原らの緑黄色野菜の鮮度とビタミンCの消失率についての報告によると，室温(26～28℃)で24時間放置後のビタミンCの消失率は，モロヘイヤは最も高く67～68%である[9]．今回のビタミンCの分析値のばらつきは鮮度による影響も考えられる．

(2) 無機質

無機質ではカルシウム260～310mg/100 g，リン88～100mg/100 g，銅220～360 μg/100 gとほうれんそうやこまつなの四訂成分表値と比較し高含量で，ナトリウムは2～3 mg/100 gで低含量であった．

中山らは，高知県南国市産のハウス栽培及び露地栽培のモロヘイヤの無機質含有量の測定を行っているが，露地栽培のモロヘイヤ(n＝60，平均値)は，カルシウム338.6，リン97.39，鉄2.039，ナトリウム26.68，カリウム542.3，マグネシウム69.13，亜鉛0.652，銅0.267mg%と報告している[10]．今回の分析結果はナトリウムを除きこれと近似した値であった．

平成5年国民栄養調査成績[11]によると野菜からのビタミンA，ビタミンB_1，ビタミンB_2，カルシウムの摂取比率はそれぞれ51.9%，12.3%，11.9%，18.5%となっている．今回の結果から，モロヘイヤはこれらの栄養素の供給源として期待できる野菜の一つであると考えられる．

4．カイワレダイコンについて

カイワレダイコンについては，類似の野菜であるだいこん・まびき菜の四訂成分表値と比較すると，ビタミンではビタミンB_1を除いて低い含量であった．無機質ではリンの分析値は四訂成分表のまびき菜と同程度であったが，カルシウム，鉄，ナトリウム，カリウムはいずれもまびき菜より低い値であった．門間ら[12]の報告(n＝13，

表2 ビタミン類および無機質の分析結果

食品名	水分 %	ビタミン カロチン μg	A効力 IU	B_1 mg	B_2 mg	C mg	無機質 Ca mg	P mg	Fe mg	Na mg	K mg	Mg mg	Zn μg	Cu μg
ほうれんそう(水耕栽培) A	92.3	3,800	2,100	0.09	0.16	38	27	79	0.7	3	830	59	210	53
ほうれんそう(水耕栽培) B	93.9	2,600	1,400	0.13	0.14	2	27	58	0.6	2	850	65	810	68
ほうれんそう(水耕栽培) C	94.1	2,700	1,500	0.12	0.15	4	36	66	0.5	4	720	73	600	64
ほうれんそう(水耕栽培) D	94.6	2,300	1,300	0.10	0.12	11	32	40	0.4	3	680	56	420	66
ほうれんそう(水耕栽培) E	93.8	2,700	1,500	0.11	0.11	7	41	65	0.5	4	810	84	970	95
ほうれんそう(慣行)	87.1	4,400	2,400	0.12	0.23	81	43	90	1.6	19	880	98	1200	110
四訂成分表値・無機質成分表値	90.4	3,100	1,700	0.13	0.23	65	55	60	3.7	21	740	70	770	180
こまつな(水耕栽培)	93.5	3,800	2,100	0.06	0.14	46	140	45	0.5	7	560	27	140	31
こまつな(慣行)	92.3	3,500	2,000	0.06	0.14	71	180	46	1.0	4	470	33	280	50
四訂成分表値・無機質成分表値	91.9	3,300	1,800	0.09	0.22	75	290	55	3.0	32	420	16	320	75
しゅんぎく(水耕栽培)	94.9	2,600	1,400	0.04	0.10	12	42	34	0.4	9	590	13	110	42
しゅんぎく(慣行)	92.3	4,000	2,200	0.12	0.17	26	100	46	1.2	92	400	27	850	150
四訂成分表値・無機質成分表値	91.9	3,400	1,900	0.09	0.21	21	90	47	1.9	50	610	26	180	100
モロヘイヤ A	86.2	6,400	3,600	0.17	0.44	47	310	100	1.3	2	500	41	450	220
〃 B	81.6	9,200	5,100	0.22	0.68	110	270	88	2.0	2	730	72	660	360
〃 C	85.0	7,400	4,100	0.18	0.47	31	310	99	1.4	3	590	67	580	330
〃 D	86.2	7,300	4,100	0.19	0.56	39	260	99	1.7	3	590	67	440	300
〃 E	85.4	7,500	4,200	0.20	0.45	62	260	100	1.6	3	620	69	440	300
カイワレダイコン A	92.5	1,500	830	0.16	0.16	55	44	78	0.5	7	110	42	400	38
〃 B	93.8	1,400	780	0.11	0.13	43	53	97	0.5	3	160	33	280	34
〃 C	94.8	1,000	560	0.10	0.11	36	32	56	0.5	2	120	25	210	28
〃 D	94.2	1,300	720	0.11	0.13	34	36	76	0.4	5	99	36	310	36
〃 E	93.5	940	520	0.10	0.11	35	36	73	0.6	8	130	30	300	48
まびき菜(四訂成分表値)	93.1	1,700	940	0.08	0.25	70	140	65	1.2	10	420			
カイワレダイコン(無機質成分表値)												26	220	41

可食部100 g 当たり

平均値)によるとカイワレダイコンの無機質含量はカルシウム49，リン64，鉄0.5，ナトリウム6，カリウム131mg/100 g であり，今回の結果は，この報告と近似した値であった．

まとめ

本調査では，水耕栽培のほうれんそう，こまつな，しゅんぎくについて，四訂成分表掲載のものとは栄養成分特性が異なることが示された．また，モロヘイヤとカイワレダイコンのビタミンと無機質含量が明らかになった．特にモロヘイヤはカロチン，ビタミンB_1，ビタミンB_2，カルシウムの供給源として期待できる野菜であることが明らかになった．

実際に摂取する食品の栄養成分値が四訂成分表値や無機質成分表値とかけ離れていたり，栄養成分値が未掲載であると，正確な栄養摂取量を把握できず，食生活の栄養学的評価を行うことが困難である．五訂日本食品標準成分表の作成作業も開始されていること等をも考慮し，今後も引き続き，水耕栽培野菜やバイオテクノロジーを応用した野菜，新野菜，輸入野菜などの栄養成分を明らかにしていく必要がある．

文献

1) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，

1982, 大蔵省印刷局, 東京.
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 347-349, 1990, 金原出版, 東京.
3) 同上, 356-359, 同上.
4) 同上, 362-363, 同上.
5) 小高　要, 稲垣節子, 氏家　隆, 他：ビタミン, **59**, 451-455, 1985.
6) 日本薬学会編：衛生試験法注解, 17-32, 1990, 金原出版, 東京.
7) 科学技術庁資源調査会編：日本食品無機質成分表, 1991, 大蔵省印刷局, 東京.
8) 河野吉久：電力中央研究所報告, U89013, 1989.
9) 荻原和夫, 箱山年子：長野県短期大学紀要, **45**, 15-20, 1990.
10) 中山美津子, 桑原豊子, 中山喜代子：高知学園短期大学紀要, **21**, 551-564, 1990.
11) 厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：平成7年版国民栄養の現状(平成5年国民栄養調査成績), 1995, 第一出版, 東京.
12) 門間公夫, 菊谷典久, 井口正雄：第38回日本栄養改善学会講演集(下巻), 558-559, 1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 198-201, 1996

東京都多摩地域の健常女性の骨代謝
—運動習慣の有無による尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン濃度およびカルシウム摂取量の比較—

早藤 知恵子*, 市川 久次*, 窪山 泉*2, 中橋 猛*3, 高橋 たか子*3,
山下 三雄*4, 城所 敏英*5, 長野 みさ子*6, 鈴木 とし子*6, 江島 有紀*6,
大井 照*7, 簑輪 眞澄*8, 長谷川 明*9

Bone Metabolism in Normal Women in Tama Area, Tokyo
—Comparison of Urinary Levels of Pyridinoline, Deoxypyridinoline, and Calcium Intake with or without Habit of Physical Activity—

CHIEKO HAYAFUJI*, HISATSUGU ICHIKAWA*, IZUMI KUBOYAMA*2, TAKESHI NAKAHASHI*3,
TAKAKO TAKAHASHI*3, MITSUO YAMASITA*4, TOSHIHIDE KIDOKORO*5, MISAKO NAGANO*6,
TOSHIKO SUZUKI*6, YUKI EJIMA*6, TERU OI*7, MASUMI MINOWA*8
and AKIRA HASEGAWA*9

The Osteoporosis Prevention Program was conducted at some Health Centers in the Tama area, Tokyo. Urinary levels of pyridinoline, deoxypyridinoline, and calcium intake were compared with or without physical activity. Urine samples were collected from 283 women between the ages of 41 and 70 years. The optical density of the second metacarpus was examined by computed X-ray densitometory method. Urinary levels of pyridinoline, deoxypyridinoline were assayed by pyrilinks kit and pyrilinks-D-kit; Metra Biosystems Inc.. Other parameters were assayed by automatic analyzer Hitachi 7150. Research of diet was carried out by an investigating individual.

Levels of pyridinoline, deoxypyridinoline and calcium intake in groups of physical activity (PA) were generally higher than those in groups of non-physical activity (non-PA). Levels of pyridinoline in the Group of PA (age 46-50) and (age 66-70) were higher than those in the group of non-PA. Levels of deoxypyridinolinein the group of PA (age 46-50) and (age 51-55) were higher than those in the group of non-PA. The amount of calcium intake in the group of PA (age 41-45) and (age 61-65) were higher than those in the group of non-PA. The peak age in both groups were in the fifties. Although they were not statistically significantly different, it was suggested that the bone resorption in the group (age 46-55) of PA was high. Pyridinoline and deoxypyridinoline are useful markers for the prevention of osteoporosis.

Keywords：骨粗鬆症予防 prevent of osteoporosis，健常女性 normal women，尿中ピリジノリン urinary excretion of pyridinoline，尿中デオキシピリジノリン urinary excretion of deoxypyridinoline，運動習慣 habit of physical exercise，カルシウム摂取量 calcium intake，閉経 post-menopause，CXD 法 computed X-ray densitometory method

* 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
*2 東京都立川保健所
*3 東京都八王子市保健所
*4 東京都島しょ保健所八丈出張所
*5 東京都医療福祉部エイズ対策室
*6 東京都五日市保健所
*7 東京都大田区大森保健所
*8 国立公衆衛生院疫学部
*9 日本大学薬学部

はじめに

長寿時代を迎え，病に伏せること無く健康な老後を送りたいというのは多くの人々の願いであり，保健所における骨粗鬆症予防教室や運動教室等の成人病予防のための事業は参加者も多く，栄養，運動，休養が成人病予防に重要であることもよく知られている．骨粗鬆症の予防および早期診断の一助として，本研究では，骨吸収マーカーの尿中ピリジノリン及びデオキシピリジノリンの濃度と食事からのカルシウムの摂取量について運動習慣の有無と比較し，食事や生活の改善に動機付けの一つとしてこれら尿中骨代謝マーカーが活用出来るかを検討した．

方　法

1．対象者　平成6・7年度に東京都多摩地域の保健所で実施した骨粗鬆症予防事業の参加者の内41歳から70歳までの健常女性283名を対象とした．対象者は，運動習慣群(週2回あるいは週2時間以上継続して運動している者)と非運動習慣群(継続的に運動しない，あるいは週2回及び週2時間未満の者)の2群について各々5歳ごとに計12グループに分けた．

2．検討項目　尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン濃度，食事からのカルシウム摂取量，体格指数BMI(Body Mass Index)，及び生理の有無について検討した．

3．尿の分析方法　尿は起床後一番目に採取したものを用い，分析まで−20℃に保存した．ピリジノリン，デオキシピリジノリンはメトラ社のピリリンクスDキットにより測定し，尿中クレアチニンの測定値にて補正した．クレアチニンは日立7150形生化学自動分析計により測定した．分析試薬は第一化学社製を使用した．

4．骨密度　骨密度は第二中手指骨の骨量をCXD法(帝人ボナライザー)により測定した．

5．カルシウム摂取量　食事からのカルシウム摂取量は2日間あるいは3日間の食事記録を，科学技術庁四訂日本食品標準成分表により計算した．

結　果

1．運動習慣　現在，運動習慣があるものは対象者の内66.4%で，その内82.2%は青少年期に運動習慣がなかった．青少年期に運動の習慣があったのは19.2%であった．

2．運動習慣と尿中デオキシピリジノリン濃度の関係　運動習慣群では46歳から55歳の2群で尿中デオキシピリジノリン濃度が非運動習慣群より高く，56歳から60歳の群では逆に低値であった(表1)．どの年代でも運動習慣の有無による有意差は認められなかった．

3．運動習慣と尿中ピリジノリン濃度の関係　尿中ピリジノリン濃度は46歳から50歳と66歳から70歳で運動習慣群の方が非運動習慣群より高値であった．運動習慣の有無による有意差は認められなかった．ピリジノリンとデオキシピリジノリンはよく($y=0.140x+0.830$　$r=0.678$)相関していた．

4．運動習慣と骨密度　50歳以下の運動習慣群は，非運動習慣群より高骨密度であるが，50歳以上60歳では逆に低値であった．両群間に有意差は認められなかった．

5．運動習慣と食事からのカルシウム摂取量　食事からのカルシウム摂取量については271名の内84.5%から回答を得た．その結果をもとに運動習慣と比較すると，46歳から50歳の群を除いて，運動習慣群の方が多く摂取していたが，有意差は認められなかった(表2)．カルシ

Table 1. Comparison of Urinary Levels of Pyridinoline, Deoxypyridinoline, Bone Mineral Content and Body Mass Index, between Habit of physical Activity and not Habit

Age	Physical Activity(−)					Physical Activity(+)				
	Pyridinoline nmol/mmol	Deoxypyridinoline nmol/mmol	ΣGS/D	BMI	N	Pyridinoline nmol/mmol	Deoxypyridinoline nmol/mmol	ΣGS/D	BMI	N
41～45	20.0±1.2	2.9±0.39	2.67±0.07	22.2±0.5	6	19.5±1.0	3.4±0.22	2.85±0.06	21.8±0.3	12
46～50	19.9±1.6	3.2±0.23	2.62±0.07	20.9±0.7	14	22.9±1.6	3.9±0.29	2.70±0.05	22.1±0.5	28
51～55	22.2±1.4	3.6±0.15	2.66±0.05	21.6±0.7	21	23.4±1.1	4.2±0.26	2.56±0.04	21.9±0.5	39
56～60	23.1±1.8	4.3±0.44	2.38±0.06	21.6±0.7	21	23.2±0.9	3.9±0.23	2.30±0.04	22.1±0.4	41
61～65	22.3±1.3	3.8±0.19	2.24±0.07	22.1±1.0	18	24.0±1.0	4.1±0.21	2.25±0.03	22.2±0.5	55
66～70	23.5±1.6	4.6±0.68	2.15±0.06	23.9±0.9	10	28.1±3.0	4.8±0.43	2.08±0.05	22.7±0.5	18

Physical Activity(−)：<twice & 2H/W　Pyridinoline：Pyridinoline/CRN　Σ GS/D: mmAl (Bone Mineral Content)
Physical Activity(+)：≧twice or 2H/W　Deoxypyridinoline：Deoxypyridinoline/CRN　BMI：Body Mass Index (Weight/Height/Height)
Mean±SEM　N：Numbers of Volunteers

Table 2. Comparison of Calcium Intake from Diet-between Habit of physical Activity and not Habit

Age	Physical Activity (−)		Physical Activity (+)	
	Ca Intake (mg/day)	N	Ca Intake (mg/day)	N
41～45	551±159	3	754±68	18
46～50	717± 49	12	667±28	23
51～55	708± 58	17	768±43	29
56～60	758± 78	17	837±45	31
61～65	591± 59	14	672±35	40
66～70	636± 90	10	707±61	15

Physical Activity (−) : <twice & 2H/W Mean±SEM
Physical Activity (+) : ≧twice or 2H/W

ウム摂取量は運動習慣の有無に関わらず両群とも56から60歳で頂値を認めた．41歳から70歳の非運動習慣群のカルシウム摂取量の平均は682.7mg/day，運動習慣群の平均は735mg/dayであった．両群間で有意差は認められなかった．

6．閉経前後(46歳から55歳)の運動習慣と尿中デオキシピリジノリン濃度 46歳から55歳の群でデオキシピリジノリンの濃度を閉経前後の運動習慣で比較すると，両者で運動習慣群は高値であったが，有意差は認められなかった(表3)．運動習慣の有無により骨密度，体格，年齢に差を認めなかった．

考　察

骨代謝回転を反映する尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリンについては，日照時間など環境の異なる山村と漁村の二地域で比較すると低骨密度の山村の方が漁村より高値であったこと[1]，癌性高カルシウム血症，上皮小体機能亢進症の者では尿中および血中デオキシピリジノリン含量が健常人に比べ，非常に高値を呈する[2]ことなどが報告されている．

今回，健常人の尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリン，骨密度，閉経，食事からのカルシウム摂取量の関係について検討したが，どの年代でも運動習慣群は食事からのカルシウム摂取量が非運動習慣群より多く，ライフスタイルも良好な者が多く見受けられた．運動習慣と骨密度を比較すると50歳以下では運動習慣群は非運動習慣群よりカルシウム摂取量も高く，骨密度も高いが，50歳以上では運動習慣群は非運動習慣群よりカルシウム摂取量が高く，骨密度は低値であった．このように骨密度は50歳以下では現在の，50歳以上では過去のライフスタイルが反映されていると推察された．46歳から55歳の運動習慣群でデオキシピリジノリンの濃度が非運動習慣群より高値を示したが，有意差は認められなかった．両群のデオキシピリジノリンの濃度差には，運動習慣による骨代謝の亢進，非運動習慣による骨吸収の亢進が含まれており明確な有意差を求めることができなかったと推察される．今後更に分析を行い検討を重ねてゆくつもりである．

ま と め

問診調査の結果より50歳代以上の運動習慣群は，青少年期に非運動習慣群に属し比較的偏食の者が多く見うけられ，現在の非運動習慣群より低骨密度であった．このように東京都多摩地域の本事業参加者のハイリスクと自覚している者は，習慣的に運動をしている者が多く，カルシウムの摂取量調査から食事を改善していることが明らかになった．

尿中ピリジノリン，デオキシピリジノリンの測定により現在の骨代謝の様子が推察され，これら骨代謝回転の様子は数年後の骨の状況を予測することができると言わ

Table 3. Comparison of Urinary Levels of Pyridinoline, Deoxypyridinoline, Bone Mineral Content and Body Mass Index, between Habit of physical Activity and not Habit, in Pre-, Post-menopause

Physical Activity		Pyridinoline nmol/mmol	Deoxypyridinoline nmol/mmol	ΣGS/D mmAl	BMI	Age years	N
Pre-menopause	(−)	20.9±2.1	3.23±0.26	2.67±0.03	22.5±1.1	48.8±0.6	12
	(+)	22.8±1.3	3.90±0.28	2.71±0.04	22.2±0.4	49.6±0.4	31
Post-menopause	(−)	21.5±1.2	3.59±0.15	2.64±0.06	20.9±0.5	52.0±0.5	24
	(+)	23.6±1.2	4.19±0.27	2.53±0.04	21.8±0.6	52.3±0.4	34

Physical Activity (−) : <twice & 2H/W
Physical Activity (+) : ≧twice or 2H/W
Mean±SEM
Pyridinoline : Pyridinoline/CRN
Deoxypyridinoline : Deoxypyridinoline/CRN
BMI : Body Mass Index
N : Numbers of Volunteers

れている[3]. 本調査では運動習慣による尿中の骨吸収マーカーの濃度に有意差は認められなかったが, 各自にあらかじめ望ましいライフスタイルのための情報を提供することが出来, 予防事業に有用であった.

(この研究は平成5年度当所奨励研究「骨粗鬆症の生化学的検討」の一部をまとめたものである.)

(この報告の一部は第55回日本公衆衛生学会総会(1996年10月)で発表した.)

文 献

1) 吉村典子, 橋本勉, 森岡聖次, 他：*Osteoporosis Japan*, **4**, 119-122, 1996

2) Hata, K., Miura, M., Fukumoto, S., Matsumoto, T.,：*Clinica Chimica Acta*, **235**, 221-227, 1995

3) Fledelius, C., Riis, BJ., Overgaard, K. et al：*Calcif Tissue Int*, **54**, 381-384, 1994

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 202-206, 1996

糖尿病治療食の脂質及びその構成脂肪酸

坂牧成恵*, 菊谷典久*, 井口正雄*, 市川久次*,
加藤芳美**, 小宮三紀子***, 菊地輝雄***

Studies on Fat Contents and Fatty Acids Composition in Foods for Dietary Therapy of Diabetes

NARUE SAKAMAKI*, NORIHISA KIKUTANI*, MASAO IGUCHI*, HISATSUGU ICHIKAWA*,
YOSHIMI KATOH**, MIKIKO KOMIYA*** and TERUO KIKUCHI***

The content of fat and fatty acids composition in the foods for diabetics were analyzed. Twelve kinds of ready-to-serve foods purchased from a department store in the Tokyo metropolitan area were examined.

The total content of fat in the samples varied from 8.7 to 14.5 g per serving size. The results showed that there were no notable differences between the analyzed values and the calculated values indicated on the labels with a few exceptions.

In most diets, the main components of fatty acids consist of palmitic ($C_{16:0}$), stearic ($C_{18:0}$), oleic ($C_{18:1}$) and linoleic ($C_{18:2}$) acids.

The ratios of unsaturated to saturated fatty acids (U/S ratios) were 0.87-4.70, and those of poly-unsaturated to saturated fatty acids (P/S ratios) were 0.7-1.9, respectively.

Keywords：特別用途食品 food for special dietary use, 糖尿病 diabetes, 食事療法 dietary therapy, 脂肪酸組成 fatty acid composition, 脂質含量 fat content

緒　言

高齢化に伴い，成人病の患者が増加の傾向にある．なかでも，糖質代謝が異常となる糖尿病は，網膜症，腎症，神経障害及び動脈硬化症など，重篤な合併症を引き起こす．糖尿病の治療においては，食事療法が重要な役割を果たしている．この食事療法は，適正なエネルギー量とバランスの良い栄養素の摂取が基本であるとされている．また，糖尿病での心血管障害の合併が大きな問題となってきている[1)]ことから，血糖値のコントロールとともに，動脈硬化を防ぐ食事内容が重要となっている．高脂血症予防のため，飽和脂肪の多い食品をひかえめにし，摂取する脂肪の量を把握するとともに，その質に留意する必要がある．

近年，特別用途食品として，糖尿病食調整用組合わせ食品が厚生省において許可され，市販されるようになってきている．

そこで，著者らは，これら食品の脂質の評価を行うために，市販の糖尿病食調製用組合わせ食品の脂質及びその構成脂肪酸について分析を行い，若干の知見を得たので報告する．

試料および実験方法

1．試料

市販品の糖尿病食調製用組合わせ食品12セットを試料とした．これらは，調理済みの食品であり，そのまま，あるいは加温するだけで，副食として食用に供することができる．各セットは，3品目（1セットのみ2品目）の献立から構成されており，1セットで一食分の副食となっている．

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科 169 東京都新宿区百人町3-24-1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**東京都立松沢病院
***東京都衛生局健康推進部健康推進課

それぞれの献立ごとに，ミキサーで均一のペースト状とした後，凍結乾燥したものを分析に供した．

2．分析方法

①脂質含量：ソックスレー法[2]により分析を行った．

②構成脂肪酸：Folch法[3]により脂質を抽出した．脂質の一部をとり，三フッ化ホウ素－メタノール法[4]により脂肪酸メチルエステルを調製し，ガスクロマトグラフィー(ＧＣ)により分析を行った．ＧＣの分析は次の条件で行った．

ガスクロマトグラフ：ヒューレットパッカード社製5890，検出器：水素炎イオン化検出器(FID)，カラム：J&W Scientific社製 DB-23 内径0.25㎜ 長さ30m 膜厚0.25μm，カラム温度：60℃(2 min)→10℃/min→190℃(1 min)→1℃/min→200℃(20min)，検出器温度：270℃，注入口温度：245℃，キャリアガス：ヘリウム，積分計：ヒューレットパッカード社製HP3396シリーズⅡ

3．試薬

脂肪酸同定用標準メチルエステル，内部標準用脂肪酸メチルは，シグマ社製及びNU-CHEK PREP, INC. 製の標準品を用いた．その他の試薬は，和光純薬製ガスクロマトグラフ用及び試薬特級品を用いた．

実験結果及び考察

脂質含量の分析結果を表１に示した．また比較のため，１セットあたりの表示値を併記した．脂質含量は，１セットあたり8.7ｇ～14.5ｇ(表示値9.5ｇ～17.1ｇ)であった．「魚の梅煮セット」，「肉のごぼう巻きセット」は，表示に比べ約30％低い値であったが，他のセットは，概ね表示と同値であった．

脂肪酸類の分析結果を表２に示した．それぞれの献立において，優位を占める構成脂肪酸と，その献立数をみると，リノール酸($C_{18:2}$)は21献立(35献立中)であり，次いでオレイン酸($C_{18:1}$)は７献立(同)であった．パルミチン酸($C_{16:0}$)は35献立中３献立で，リノレン酸($C_{18:3}$)は同２献立で高比率を示した．また，ドコセン酸($C_{22:1}$)及びドコサヘキサエン酸(DHA，$C_{22:6}$)が高比率を示したものが，それぞれ１献立であった．多くの献立において，リノール酸が高値を示したのは，調理の際に植物油が用いられたためと考えられる．

エイコサペンタエン酸(EPA，$C_{20:5}$)は，血小板凝集を抑制し，抗血栓作用を有することで注目されている．EPAは，「魚の煮付」，「魚の梅煮」，「魚の酒蒸し」，「魚の甘煮」等で高値を示した．EPAと同系列のn-３系多価不飽和脂肪酸であり，同様に，その生理作用が注目されているドコサヘキサエン酸(DHA，$C_{22:6}$)は，「魚の煮付」，

表１．糖尿病治療食の脂質含量

献立	内容量	脂質含量 実測値	脂質含量 表示値
	(ｇ)	(ｇ)	(ｇ)
ハンバーグセット	352.3	13.6	14.4
ハンバーグ	138.4	7.6	
スープ	155.0	5.9	
椎茸と筍のソテー	58.9	0.1	
魚の煮付セット	382.1	11.6	11.7
魚の煮付	109.5	1.1	
五目豆	79.2	2.3	
豚汁	193.4	8.2	
魚の西京煮セット	217.3	8.7	9.5
魚の西京煮	97.2	5.4	
肉と牛蒡の甘酢和え	66.7	3.1	
金時豆	53.4	0.2	
肉のしょうが煮セット	308.0	9.4	11.9
肉のしょうが煮	59.2	2.3	
筑前煮	103.1	5.6	
つみれ汁	145.7	1.5	
おでんセット	352.9	12.0	11.6
おでん	272.3	9.0	
肉とひじきと大豆の煮物	80.6	3.0	
カレーセット	336.7	10.6	9.9
カレー	179.8	8.0	
ポークビーンズ	110.4	0.6	
コーンのバターソテー	46.5	2.0	
肉のすき焼き風セット	327.8	12.8	14.4
肉のすき焼き風	134.9	8.4	
大根と厚揚げの煮物	135.2	2.4	
切り昆布の酢の物	57.7	2.0	
魚の梅煮セット	308.2	9.7	14.4
魚の梅煮	120.1	6.3	
肉じゃが	124.4	3.2	
こんにゃくの味噌和え	63.7	0.2	
魚の甘煮セット	419.2	12.3	15.8
魚の甘煮	111.7	9.2	
ふきの土佐煮	72.7	0.1	
けんちん汁	234.8	3.0	
魚の酒蒸しセット	328.2	13.7	14.3
魚の酒蒸し(タレ付)	100.1	4.4	
肉と野菜の煮物	146.6	4.3	
ひじきと大豆の煮物	81.5	5.0	
肉の南部煮セット	398.3	14.5	15.2
肉の南部煮	89.4	8.8	
野菜のカレー風	126.7	5.2	
大根みそ汁	182.2	0.5	
肉のごぼう巻きセット	344.3	11.5	17.1
肉のごぼう巻き	89.2	5.9	
野菜のごま和え	73.8	3.4	
豆腐みそ汁	181.3	2.2	

表２．糖尿病治療食の構成脂肪酸

献立	脂肪酸												
	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	20:4	20:5	22:1	22:6	その他
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
ハンバーグセット													
ハンバーグ	2.0	23.8	2.6	16.1	38.3	10.0	0.7	0.6	0.3	0.1	0.0	0.2	5.3
スープ	2.0	27.5	2.0	11.1	40.3	9.1	0.6	0.7	0.2	0.3	0.0	0.8	5.4
椎茸と筍のソテー	0.4	18.5	0.4	1.3	7.2	65.3	3.8	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	2.5
魚の煮付セット													
魚の煮付	2.2	18.3	4.1	13.3	3.1	0.1	0.5	4.7	1.4	9.8	0.7	22.1	19.7
五目豆	0.1	11.9	0.0	2.9	29.3	47.1	6.8	0.2	0.1	0.4	0.0	0.0	1.2
豚汁	0.7	14.4	1.0	8.6	23.4	38.7	1.0	0.5	0.3	0.2	0.0	0.2	11.0
魚の西京煮セット													
魚の西京煮	2.3	19.9	3.6	7.1	17.8	26.6	0.9	0.5	1.1	2.0	0.1	2.9	15.2
肉と牛蒡の甘酢和え	0.4	15.0	2.7	5.0	26.8	44.8	1.1	0.3	0.5	0.3	0.1	0.1	2.9
金時豆	0.4	14.1	0.0	1.2	11.9	23.1	45.2	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	3.4
肉のしょうが煮セット													
肉のしょうが煮	0.8	16.5	1.4	14.3	18.6	36.7	0.5	0.6	0.5	0.2	0.0	0.2	9.7
筑前煮	0.3	12.2	1.9	3.9	19.6	56.8	0.8	0.3	0.6	0.4	0.0	0.4	2.8
つみれ汁	0.9	15.8	1.7	5.6	43.2	15.2	3.7	0.9	1.2	2.0	0.3	4.4	5.1
おでんセット													
おでん	0.3	15.4	1.0	8.5	15.2	33.2	3.9	0.1	0.8	0.4	0.1	1.0	20.1
肉とひじきと大豆の煮物	0.2	12.9	1.3	4.7	21.4	12.7	33.3	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	11.9
カレーセット													
カレー	4.6	26.0	3.2	23.0	25.4	8.9	0.9	0.3	0.5	0.2	0.0	0.3	6.7
ポークビーンズ	0.8	19.6	2.5	7.8	27.6	20.4	16.0	0.5	0.7	0.4	0.0	0.1	3.6
コーンのバターソテー	6.2	23.9	1.5	8.5	28.3	21.1	2.0	0.2	0.1	0.2	0.0	0.0	8.0
肉のすき焼き風セット													
肉のすき焼き風	1.5	15.1	1.2	8.8	23.2	45.6	0.0	0.3	0.4	0.2	0.0	0.0	3.7
大根と厚揚げの煮物	0.0	11.5	0.0	5.4	22.5	50.3	7.3	0.3	0.0	0.4	0.2	0.0	2.1
切り昆布の酢の物	0.0	12.0	0.0	2.9	23.2	50.1	8.9	0.2	0.1	0.4	0.0	0.0	2.2
魚の梅煮セット													
魚の梅煮	5.2	23.7	6.5	6.2	18.9	1.3	0.8	0.9	2.6	9.1	0.5	14.1	10.2
肉じゃが	0.5	12.2	0.9	5.4	21.0	57.0	1.2	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.7
こんにゃくの味噌和え	0.2	11.1	0.3	4.5	29.5	45.6	6.9	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	1.3
魚の甘煮セット													
魚の甘煮	7.7	12.5	3.6	1.2	13.4	1.1	0.7	15.4	0.2	3.8	24.5	5.0	10.9
ふきの土佐煮	2.2	23.9	2.8	9.1	14.2	11.6	4.6	0.5	1.9	2.9	0.1	14.5	11.7
けんちん汁	0.5	20.8	4.5	6.6	31.2	28.7	3.0	0.3	1.0	0.2	0.0	0.2	3.0
魚の酒蒸しセット													
魚の酒蒸し(タレ付)	3.3	15.6	4.4	3.7	19.4	1.0	0.6	3.9	0.4	6.8	6.2	18.8	15.9
肉と野菜の煮物	0.0	10.7	1.2	3.6	16.6	66.6	0.6	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.4
ひじきと大豆の煮物	0.0	10.3	0.2	3.6	22.1	58.3	4.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
肉の南部煮セット													
肉の南部煮	0.0	14.4	2.7	5.8	32.7	42.0	0.7	0.0	0.8	0.0	0.0	0.5	0.4
野菜のカレー風	0.1	9.3	0.5	2.7	20.9	58.3	4.3	0.2	0.0	0.3	0.0	0.0	3.4
大根みそ汁	0.1	11.7	0.5	4.1	19.2	50.3	9.9	0.2	0.1	0.6	0.0	0.0	3.3
肉のごぼう巻きセット													
肉のごぼう巻き	1.7	17.1	2.3	10.2	28.6	31.3	2.1	0.2	0.3	0.4	0.0	0.0	5.8
野菜のごま和え	0.1	9.1	0.5	4.6	28.0	51.8	2.6	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	2.9
豆腐みそ汁	0.1	11.6	0.1	5.4	21.2	50.5	7.6	0.0	0.1	0.4	0.1	0.0	2.9

「魚の酒蒸し」,「ふきの土佐煮」,「魚の梅煮」等で高い値を示した．DHAが「ふきの土佐煮」で高い比率を示したのは，材料中のかつおぶしに由来するものと推察される．「魚の甘煮」では，他の献立と比較して，ドコセン酸($C_{22:1}$)の占める比率が高かった．この献立には，ニシンが使われており，そのドコセン酸($C_{22:1}$)含量[5]が高値であることから，材料に由来する脂肪酸と考えられる．「金時豆」及び「肉とひじきと大豆の煮物」では，リノレン酸($C_{18:3}$)が高い構成比であった．リノレン酸は油脂類や豆類に多く含まれており[6]，リノレン酸が高値だったものは，大豆あるいはみそ，厚揚げなどの大豆製品に由来するものと考えられる．その他の脂肪酸が占める比率が高い献立については，未同定の脂肪酸が比較的多く検出されたものである．いずれも，材料中の魚に由来する高級脂肪酸であろう．

脂肪酸には，飽和(S)，一価不飽和(M)及び多価不飽和(P)があり，それぞれ生理作用が異なるといわれている．脂質の栄養評価をする際，摂取する脂質中のこれら脂肪酸比率が重要となってくる．表3には，一食あたりの構成脂肪酸比率を示した．「ハンバーグセット」及び「カレーセット」は，飽和脂肪酸が高く（1セットあたり各5.7g，5.4g），多価不飽和脂肪酸が低いため，飽和脂肪酸に対する多価不飽和脂肪酸の比率(P/S)が低くなり，両者ともP/Sは約0.3であった．糖尿病患者においては，飽和脂肪酸はコレステロールと共に，高脂血症予防の観点から，摂取をひかえたほうがよいとされている[7]．これら以外のセットでは，飽和脂肪酸含量は1セットあたり2.0g～3.0gであり，P/Sは概ね0.7～1.9程度であった．P/Sが2.0より高かったのは，「肉の南部煮セット」(3.0)，「魚の酒蒸しセット」(2.7)，「肉のしょうが煮セット」(2.3)，「肉のすき焼き風セット」(2.2)であった．一価不飽和脂肪酸含量は，1セットあたり「魚の甘煮セット」で6.5g，「ハンバーグセット」で5.7g，他は2.2g～4.3gであった．多価不飽和脂肪酸含量については，1セットあたり「肉の南部煮セット」で7.4g，「魚の酒蒸しセット」で7.3g，他のセットで1.6g～6.5gであった．多価不飽和脂肪酸は，過酸化物を生成し，健康障害を引き起こすおそれがあり[8]，その生成を抑制するためには，ビタミンE，ビタミンC，カロテンなどの抗酸化作用を有するビタミンをあわせて摂取することが推奨されている．ビタミンCについては，既に菊谷ら[9]が同種の食品の分析を行い，その含量の低いことを報告し，生鮮野菜や果実等でその不足を補うよう注意を促している．

表3．構成脂肪酸比率

献立	脂肪酸比率 S	M	P
ハンバーグセット	1	1	0.28
ハンバーグ	1	0.97	0.27
スープ	1	1.04	0.27
椎茸と筍のソテー	1	0.37	3.30
魚の煮付セット	1	1.05	1.83
魚の煮付	1	0.35	0.97
五目豆	1	1.94	3.58
豚汁	1	1.03	1.69
魚の西京煮セット	1	0.94	1.43
魚の西京煮	1	0.76	1.07
肉と牛蒡の甘酢和え	1	1.44	2.25
金時豆	1	0.74	4.31
肉のしょうが煮セット	1	1.18	2.26
肉のしょうが煮	1	0.64	1.20
筑前煮	1	1.30	3.50
つみれ汁	1	1.98	1.14
おでんセット	1	0.79	1.79
おでん	1	0.66	1.60
肉とひじきと大豆の煮物	1	1.28	2.59
カレーセット	1	0.58	0.29
カレー	1	0.53	0.20
ポークビーンズ	1	1.06	1.31
コーンのバターソテー	1	0.76	0.58
肉のすき焼き風セット	1	1.07	2.24
肉のすき焼き風	1	0.96	1.79
大根と厚揚げの煮物	1	1.33	3.36
切り昆布の酢の物	1	1.54	3.91
魚の梅煮セット	1	0.81	1.22
魚の梅煮	1	0.70	0.72
肉じゃが	1	1.20	3.17
こんにゃくの味噌和え	1	1.84	3.25
魚の甘煮セット	1	2.18	0.70
魚の甘煮	1	2.60	0.50
ふきの土佐煮	1	0.46	0.92
けんちん汁	1	1.27	1.17
魚の酒蒸しセット	1	1.27	2.70
魚の酒蒸し(タレ付)	1	1.12	0.91
肉と野菜の煮物	1	1.22	4.62
ひじきと大豆の煮物	1	1.58	4.44
肉の南部煮セット	1	1.73	2.97
肉の南部煮	1	1.75	2.18
野菜のカレー風	1	1.74	5.03
大根みそ汁	1	1.21	3.72
肉のごぼう巻きセット	1	1.25	1.95
肉のごぼう巻き	1	1.05	1.14
野菜のごま和え	1	2.01	3.82
豆腐みそ汁	1	1.22	3.35

S：飽和脂肪酸
M：一価不飽和脂肪酸
P：多価不飽和脂肪酸

以上，糖尿病治療食の構成脂肪酸について検討したが，成人病予防においては，P/Sは1～1.5が望ましいとされており[10]，今回分析した食品は，概ね，この指標の範囲内であった．最近の米国糖尿病学会の勧告[11]によると，食事療法は，患者の病態に合わせた，きめ細かい食事管理が必要であるとしている．エネルギー摂取については，従来の脂肪エネルギー比率のみでなく，糖質からのエネルギー比率も考慮するよう，勧告内容が変わってきている．今回，我々は，糖質について検討していないので，この点を含め，今後検討すべき課題としたい．

ま と め

糖尿病治療食について分析した結果，1セットあたりの脂質含量は，9.4～14.5 g であり，分析値は表示値と，概ね一致した．構成脂肪酸については，P/Sは，ほとんどのセットで，0.7～1.9であり，脂肪酸の望ましい摂取比率とされる，1～1.5に近い値であった．

文 献

1）横山淳一：臨床栄養，**87**，14，1995.
2）日本薬学会編：衛生試験法注解，323-324，1990，金原出版，東京.
3）Folch, J., Less, M.and Sloane-Stanley, G.A. : *J.Biol. Chem.*, **226**, 497,1957.
4）日本油化学協会制定：基準油脂分析試験法，2.4.20. 2-77，財団法人日本油化学協会，東京.
5）日本水産油脂協会編：魚介類の脂肪酸組成表，178-181，1989，光琳，東京.
6）科学技術庁資源調査会編：日本食品脂溶性成分表，40-57，1989，大蔵省印刷局，東京.
7）日本糖尿病学会編：糖尿病食事療法のための食品交換表第5版，3，1993，文光堂，東京.
8）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：第5次改定日本人の栄養所要量，1995，第一出版，東京.
9）菊谷典久，門間公夫，井口正雄他：東京衛研年報，**45**，123-125，1994.
10）科学技術庁資源調査会編：日本食品脂溶性成分表，166，1989，大蔵省印刷局，東京.
11）American Diabetes Association : Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus : *Diabetes Care*, **17**, 511-522，1994.

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13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６編，環境変化，汚染が都民の健康に与える影響に関して４編，測定，分析法等の開発，改良を行った成果が３編掲載されている．

頭髪中の元素含有量から得られる情報は金属代謝異常，栄養障害等の診断の一助として利用されている．今回，頭髪試料２例を用いて１年間及び５年間の水銀量を測定した．含有量の平均は10．５μg／g及び4．９μg／gであり，45-50歳の5年間の水銀量は減少傾向を示し，個人の体質などに影響されず暴露量を反映していると推定している．

尿中のカドミウムの測定にフレームレス原子吸光を用い，試料に干渉抑制剤を添加し，プラットホームグラファイトチューブを使用する簡易な方法を考案した．カドミウムの使用量が増加している今日，生体試料分析への応用が期待される成果である．

1970年「牛込柳町鉛公害事件」が発生してから1980年迄の10年間，局が実施した健康診断時に測定した5，000名以上の血中及び尿中の鉛濃度をまとめた報告である．調査終了後時が経過しているが，自動車用ガソリンへの鉛添加規制(1972) 以前の状況とその後の変化を知る上で貴重な資料である．

ディーゼル排ガスの長期暴露による骨代謝への影響を雌雄のラットを用いて検討している．その結果，ディーゼル排ガスの長期暴露は肺機能の低下等による局所の血流の阻害を起こし，細胞間物質を破壊し，成熟後の骨量の維持に必要な軟骨細胞の退行性変化を招き，骨量の減少を起こすことが推測された．また，骨代謝の変化には排気ガス中のガス状成分の寄与が高いと述べている．

ディーゼル排ガス粒子中には種々の変異原物質が含まれ，肺がん発生との関連が指摘されている．そこで，排ガス粒子から抽出したタール分の酸性分画の変異原物質の分離・同定を行った．その結果，芳香族カルボン酸，芳香族ジカルボン酸，フェノール類及びケトン類がマススペクトルライブラリー検索によって同定されている．

実験動物の呼吸機能を測定する試験において，無麻酔下で実施する方法は有用であるが，筆者らはダブルフロープレチスモグラフ法を小動物用に改良し，多くの動物が扱えること，同一動物により繰り返し試験出来ることなどの利点をあげ，更に無麻酔下でより鋭敏に生理機能を観察できる本法の有用性を論じている．

ディーゼル排ガス暴露がラットにおいて感染防御機能や免疫機能へどの様に作用するかを気管支肺胞洗浄液を用いて観察した．細胞数は対象群に比べて著明な増加を示した．これは何らかの障害に対する反応と考えられることから，末梢気道や細胞領域における炎症や免疫防禦機能を担う遊走細胞の観察や研究が一層重要であると述べている．

水道水源の富栄養化に伴い原水中に異臭味を発生する物質が含まれる様になってきた．カビ臭の原因物質として，２-メチルイソボルネオールとジオスミンが確認されているが，これらの分析法としてパージトラップGC/MS法が採用されているが，ルーチン分析用としてヘッドスペースGC/MS法を検討し，管理項目の目標値の１/10まで測定できる良好な分析法を確立した．

最近酵素反応を応用した混釈培養可能な大腸菌群検出用寒天培地が考案され，市販されている．これらを用いて各水試料から大腸菌群の検出を行い，デソオキシレート培地での成績と比較したところいずれも良好な成績が得られ，水の細菌検査に広く利用できると評価している．

首都圏における環境水の腸管系ウイルス汚染の実態を把握する目的で，1985年から1995年にかけて採取した環境水のウイルス分離試験の結果を述べている．しかし，現行の試験方法では，水中に混入しているウイルスを定

量することが困難であるので，今回の調査で検出されたウイルスが直ちにヒトに対して健康被害をもたらすかどうかについては断定出来ない．更に調査を継続して環境水のウイルス汚染実態を詳細に究明したのちに結論を出す必要があると述べている．

衛研多摩支所に搬入された水道水，井戸水の定期試験項目について集計・解析を行っている．水道水の水質基準適合率は97%と良好であったが，井戸水は55%と低く，細菌によるものと硝酸性窒素と亜硝酸性窒素の基準違反が主であった．硝酸性窒素，亜硝酸性窒素は30m以下の浅井戸において違反が多かったと述べている．

多摩地域の浅井戸及び深井戸の揮発性有機化合物の汚染調査を実施している．両井戸共にテトラクロロエチレン，トリクロロエチレン，1，1，1-トリクロロエタン等が高濃度に検出されており，低濃度ではあるがクロロホルム，1，1-ジクロロエタン，フロン113等が検出されたと報告し，汚染の原因についても言及している．

公衆浴場での浴用剤の使用実態と水質に与える影響を調査し，水質管理上の問題点と水質評価の新たな指標について検討した．その結果，ヒト由来の汚染指標として尿素の有用性を論じている．また，微生物学的安全性を確保するためには遊離残留塩素0．1mg/L以上を維持すべきであると述べている．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 209-212, 1996

個人頭髪中の元素含有量(第3報*)
—水銀について—

江波戸 舉 秀**, 小野塚 春 吉**, 中 村 弘**

Mercury Content in Private Human Hair(Ⅲ*)

KIYOHIDE EBATO**, HARUKITI ONOZUKA** and HIROSHI NAKAMURA**

At a stated period of each month, human private hair samples were cut from the scalp in the nape or occipital regions of males for 1 or 5 years.

Hair samples were rinsed in water and acetone, then, dried at 80℃. Mercury (Hg) in hair samples was analyzed by heating-vaporization-gold-amalgamation method.

The results were follows:

1) The mean content of Hg in Hair was 10.5 μg/g and 4.91 μg/g.

2) For the content by month of Hg for 5 years, the maximum value was 11.3 μg/g, about 1.2 times higher compared with the minimum value which was 9.67 μg/g. however it did not show a definite pattern and the seasonal index showed approximately a constant value.

3) The Hg content for 5 years (45-50 years) showed a drop in Hg value trends.

4) It was estimated that Hg in human private hair has no effect on personal constitution, and it was reflected in the human exposure.

Keywords：頭髪, 毛髪 Hair, 水銀 Mercury

緒 言

頭髪は血液, 尿等と同様にヒトが暴露した物質の最終排泄器官である. したがって, 頭髪中の元素含有量から得られる情報は, 1950年代には犯罪化学, 1960年代には環境汚染及び労働災害や労働衛生等の諸分野で利用されるようになった[1,2]. 最近は原子吸光分析法, 高周波誘導結合プラズマ発光分析法等各種分析機器の発達により, 高感度多元素同時分析が可能となり, 金属代謝異常・栄養障害等の診断の一助として医学, 臨床分野でも頭髪分析が利用されてきている[3,4].

このように頭髪分析の有用性が定着しつつあることを踏まえて, 著者らは定期的に採取した同一個人の5年間の頭髪を用い, 月別に鉄(Fe), バリウム(Ba), マグネシウム(Mg)等8元素の含有量, 季節変動等を調査した.

その結果, Fe, Ba, Mgについては頭髪の採取時期により含有量が2倍以上変化すること, また, リンを除いたFe, Ba, Mg, カルシウム, クロム, 銅, 亜鉛については採取時期により一定の変動パターンを示すことを明きらかにした[5,6].

そこで今回は, 水俣病を惹起する等重大な環境汚染源となった水銀(Hg)について, 頭髪中含有量を測定し含有量の季節変動および加齢の影響を検討し, 若干の知見を得たので報告する.

実験の部

1. 試料

頭髪試料は健康な男子2名(HS-1及びHS-2)から毎月, 一定時期に前報[5]に準じて, えりもとから後頭部にかけてはさみで採取した. HS-1については, 平成2年4月から平成7年3月(年齢45−50才)までの5年間に合計60試料採取した. HS-2については, 平成7年4月から平

---

*第2報, 東京衛研年報, **45**, 129-132, 1994.

**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

成8年3月(年齢51－52才)までの1年間に合計12試料採取した.

2．試薬

Hg標準液：1，000ppm原子吸光分析用標準液(和光純薬)をL-システイン(和光純薬)0.001%溶液で適宜希釈した.

水銀分析用添加剤：炭酸ナトリウムと水酸化カルシウムの等量混合物(添加剤M，日本インスツルメント)及び活性アルミナ(添加剤B，日本インスツルメント)を用いた．添加剤B及びMは，800℃で60分以上加熱後，室温で放冷して用いた.

3．装置

水銀分析装置：リガクマーキュリーSP型(日本インスツルメント)を用いた.

4．測定方法及び条件

頭髪の洗浄方法：前報[5]に準じて，1%中性洗剤で5分間振とう後水道水で洗浄し，以後，国際原子力機関(IAEA)が提唱しているマニュアルに従った．すなわち頭髪約1.0 g にアセトン50ml，水50mlを用い，アセトン→水→水→水→アセトンの順に各10分間スターラーで攪拌して洗浄し，80℃で3時間乾燥後，Hg測定用試料とした.

試料採取：800℃の電気炉内で空焼した試料ボートに，添加剤B約0.5 g を均一の厚さになるように採り，この上に頭髪試料1－2 mgを採取した．試料ボートの風袋を差し引いて頭髪採取量を求めた後，添加剤B，Mの順に頭髪試料が隠れるように積層した.

Hg測定：前報[7]に準じ，Hg分析計添付操作書の標準測定条件に従い，LOW MODE，4分(400℃)，6分(700℃)で加熱気化し，金アマルガム法により2回繰り返し測定を行い平均値を測定値とした.

結　　果

1．頭髪の年度間元素含有量

HS-1の5年間の年度別及びHS-2の1年間の頭髪中Hg含有量の範囲，平均値及び標準偏差をTable 1に示す.

HS-1の5年間のHg平均値10.5 μg /g は，HS-2の1年間の平均値4.91 μg /g に対してほぼ2倍の高値であった．頭髪中の水銀含有量は，特別の暴露が無い限り食生活の嗜好を反映しており，特に日本人の場合は魚介類の摂取量と関連している．HS-1については日常の食生活において，肉類より魚介類を多食する傾向があり，国民栄養調査による日本人の魚類摂取量より多いことが本人より申告された．HS-1のHg年間平均値10.5 μg /g は，職業的に水銀アマルガムを取り扱う歯科医師及び歯科医療従事者について調査した高橋らの結果[8]11.3 μg /g にほぼ近似しており，HS-1に職業的被爆が無い(本人申告)ことから考えると，この値は一般的母集団の中ではかなり高レベルに位置すると言える.

Table 1. Contents of Mercury in Hair by Year

Year	N	Range	Mean±SD
HS-1 1	12	8.63-12.5	10.5 ±1.16
2	12	9.10-16.9	12.3 ±1.97
3	12	8.57-12.0	10.5 ±0.89
4	12	7.72-12.0	9.84±1.53
5	12	7.21-12.5	9.69±1.81
Total	60	7.21-16.9	10.5 ±1.91
HS-2 1	12	4.13- 6.78	4.91±0.77

HS：Hair Sample, unit：μg /g

ところで，水俣病に係わる頭髪中Hg濃度のWHOガイドラインは，発症危険値を50 μg /g，許容値を6.0 μg /g と規定している．中川[9]が行った調査では，55名の一般人被検者のうち，5名がWHOの頭髪中Hgの許容値6.0 μg /g を超える結果が得られている．このように，日本人の頭髪中Hg濃度の約10%はWHOの許容値を超えているが，水俣病を疑わせる臨床所見は全くない．これは魚介類を多食する日本人の特徴であるといえる．今回の調査でもHS-1についてはこの許容値を超えているが，魚介類から摂取される天然由来の水銀はセレンなどの作用によって無毒化されていることが分かっているので，許容値6.0 μg /g を越えているとしても，特に問題のある値とは考えられない.

HS-2のHg年間平均値4.91 μg /g は一般的な日本人の平均値とされる2－6 μg /g の範囲に含まれ，既報のA.IMAHORIら[10]の5.23 μg /g，M.Kamakura[11]の5.10 μg /g，吉村[12]の3.71 μg /g，中川[9]の3.441 μg /g，佐谷戸ら[13]の4.83 μg /g 等はこの範囲であった．なお，HS-2については魚介類に対する嗜好は少なく，野菜，肉類，穀類等バランスのとれた食事を摂取していることが申告されている.

2．頭髪の月別元素含有量

HS-1の5年間の月別Hg含有量，範囲，平均値，標準偏差及び季節指数，また，HS-2の1年間の月別Hg含有量をTable 2に示した．季節指数とは，季節変動(月別変動)を年平均100として表したもので，連環比率法(パーソンズ法)により計算した．HS-1の月別Hg含有量の範囲は9.67 μg /g から11.3 μg /g で約1.2倍のばらつきであり，季節指数は最小値90.8，最大値116.2で前

Table 2. Contents of Mercury in Hair by Month

Month	HS-1 Year 1	2	3	4	5	Range	Mean±SD	SI	HS2 Year 1
1	9.81	12.0	9.67	12.0	11.0	9.67-12.0	10.9 ±1.14	98.0	4.22
2	9.02	9.1	12.0	9.07	9.49	9.02-12.0	9.74±1.28	83.6	6.78
3	9.50	10.8	9.31	11.7	10.6	9.31-11.7	10.4 ±0.99	93.3	5.54
4	8.63	11.4	9.8	7.72	12.2	7.72-12.2	9.95±1.86	90.8	4.72
5	10.2	16.9	11.2	8.38	9.25	8.38-16.9	11.2 ±3.36	103.6	4.43
6	11.0	16.3	9.96	8.04	11.1	8.04-16.3	11.3 ±3.06	99.8	4.69
7	11.6	10.5	9.71	9.03	12.5	9.03-12.5	10.7 ±1.40	105.1	4.22
8	11.1	12.6	9.58	10.1	9.04	9.04-12.6	10.5 ±1.41	103.5	4.13
9	11.0	13.9	8.57	10.2	8.19	8.19-13.9	10.4 ±2.29	102.4	5.40
10	12.5	13.9	9.80	11.9	8.33	8.33-13.9	11.3 ±2.22	116.2	4.59
11	11.5	13.1	9.83	11.0	7.24	7.24-13.1	10.5 ±2.18	107.3	5.46
12	9.87	11.8	10.5	8.99	7.21	7.21-11.8	9.67±1.72	96.5	4.72

SI：Seasonal Index, unit：μg/g

報[5,6]のFe，Ba，Mg等の元素と比較して大きな変動はなかった．フリードマン検定(自由度11　$p<0.05$，x^2値=19.67)を行ったところ，試料のx^2値は6.654を示し，HS-1の月別Hg含有量に統計的変動は認められなかった．

以上の結果から，Hg含有量の月別変動は少ないと結論できる．したがって，頭髪中Hgは体質や生理的条件に左右されることなく，被検者の食餌等からの暴露量を反映する元素と考えることが可能であり，Hg環境汚染の指標として有効であると言える．

HS-2の月別Hg含有量は最小値4.13 μg/g，最大値6.78 μg/gで1.6倍の開きがあった．HS-2の季節指数は例数が少ないため計算できなかった．

3．加齢による頭髪中Hg含有量の変動

HS-1の頭髪中のHg含有量は，2年目(46才時)において増加したものの，その後は減少傾向が認められ，全体として減少傾向が求められた．この減少傾向を統計的に検討するためノンパラメトリック法のフリードマン検定(自由度4　$p<0.05$，x^2値=9.488)を行ったところ，試料のx^2値は13.65を示し統計的に減少傾向が確認された．

加齢による頭髪のHg含有量の変化について，佐藤[14]及び吉村[12]は加齢とともに増加する，また，中川[9]は30-50歳前後で最大になるが，その後，年齢とともに減少するとしている．しかし，矢沢ら[15]は，男子健常者60代，70代，80代のHg含有量はそれぞれ5.1 μg/g，6.9 μg/g，4.1 μg/g，また，男子老人ホーム入所者60代，70代，80代のHg含有量はそれぞれ5.5 μg/g，5.4 μg/g，5.5 μg/gであり，年齢による増減傾向はみられないと報告している．このように加齢による頭髪Hg含有量の蓄積傾向については結論が必ずしも一致しない．

年齢45-50歳までの5年間の同一個人について行った今回の調査では，Hg含有量が減少傾向を示したが，加齢と蓄積を明らかにするためには，同一被験者を長期間調査する方法と，年代の異なる多数の被験者を調査する方法のいづれについても更に詳しい調査が必要であろう．

ま と め

毎月，定期的に採取した頭髪試料(1または5年間)の2例(男子)について，金アマルガム法によりHg含有量を測定し，次の結果を得た．

1) Hg含有量の平均値は10.5 μg/g及び4.91 μg/gであった．
2) 5年間の月別Hg含有量の最小値と最高値は9.67 μg/g，11.3 μg/gで約1.2倍の差があった．しかし，一定のパターンを示すような変動は見られず，季節指数もほぼ一定であった．
3) 45-50歳の5年間の頭髪中Hg含有量は減少傾向を示した．
4) 頭髪中Hg含有量は個人の体質等に影響されず，Hgの暴露量を反映していると推定された．

文　献

1) 寺岡久之，小林純：日衛誌，**32**，574-587，1977.
2) 今堀　彰：臨床検査MOOK，**22**，192-201，1985.
3) 近藤　賢：毛髪分析，基礎編，1981，サンロード，

東京.

4) 小林一成，池田研二，小坂憲司他：精神医学，**28**，519-524，1986.

5) 江波戸舉秀，中村　弘：東京衛研年報，**44**，195-198，1993.

6) 江波戸舉秀，中村　弘：東京衛研年報，**45**，129-132，1994.

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

8) 高橋泰子，辻　キヨ，岡野真治：衛生化学，**22**，296-302，1976.

9) 中川良三：千葉大環科研報告，**18**，54-57，1993.

10) A. IMAHORI, I. FUKUSHIMA, Y. YANAGIDA., etal,：*J. Radioanal. Chem.*, **52**, 167-180, 1979.

11) M. Kamakura：*Jpn. J. Hyg.*, **38**, 823-838, 1983.

12) 吉村昌雄：人体汚染，第1版，98-108，1993，金原出版，東京.

13) 佐谷戸安好，中室克彦，外村正治他：衛生試験所報告，**90**，113-116，1972.

14) 佐藤　彰：頭髪は語る，第1版，29-30，1996，金原出版，東京.

15) 矢沢篤子，佐藤洋子，河村太郎：横浜衛研年報，**30**，117-120，1991.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 213-218, 1996

尿中カドミウムの測定(第1報)
—ゼーマン補正式フレームレス原子吸光法による測定法の検討—

小野塚 春 吉*, 長 嶋 親 治**, 大 西 和 夫***, 中 村 弘*

Determination of Cadmium in Normal Human Urine (I)
—Study by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method with Zeeman Background Correction—

HARUKICHI ONOZUKA*, CHIKAHARU NAGASHIMA**, KAZUO OHNISHI*** and HIROSHI NAKAMURA*

Keywords：カドミウム cadmium, 尿中カドミウム cadmium in urine, 尿 urine, フレームレス原子吸光法 flameless atomic absorption spectrometry, ゼーマン補正 zeeman background correction, バックグランド補正 background correction

緒 言

カドミウムは，ニッケルーカドミウム電池，顔料，合金など国内において年間6,615トン(1995)消費[1]されており，水銀，鉛などとともに有害性を持つ重金属類として環境保健上最も注意が必要な物質である[2]．近年，携帯用電気器具の普及により，ニッケルーカドミウム電池の使用が急増し，これらに伴いカドミウムの消費量も顕著に増加(1984年2,033 t，1989年5,115 t，1994年6,615 t)[1,6,7]している．一方，カドミウムはイタイイタイ病の原因物質[3]として広く知られているとともに，高血圧，生殖線障害との関連が示唆されており，動物実験では発がん作用が認められている[4]．国際がん研究機関(IARC)による発がん性評価は，グループ1(ヒトに対して発がん性をもつ)にランクされている[5]．このような背景において，カドミウムによる暴露量の実態把握が重要になってきており，ヒトへの暴露指標の一つとして広く用いられている尿中カドミウムの簡便な測定法の確立が必要になっている．

尿中カドミウムは濃度が低いことに加え，有機物並びにナトリウム，カリウムなど無機成分による干渉の影響が大きいため，測定しにくい対象の一つとされており，従来は尿試料を湿式分解後ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)などのキレート剤を用いて金属錯体を形成させ，これをメチルイソブチルケトン(MIBK)などの有機溶媒によって抽出し，フレーム式原子吸光法で測定する方法が一般的であった．

しかし最近では，高感度分析法の一つであるフレームレス原子吸光法が用いられるようになってきている[8~10]．フレームレス原子吸光法で塩濃度の高い尿試料を分析する場合，いかに干渉を抑制するかが重要であり，炭素炉にプラットフォームを装着[11]する工夫や，干渉抑制剤の検討などが行われている[12]．

ここでは，フレームレス原子吸光法による尿中カドミウムの簡便な定量法を確立することを目的に，標準添加法を用いて検討したマトリックスによる干渉やシグナルの形状，及び酸分解尿と未処理尿の分析結果について報告する．また，標準添加試料を配付して行った他機関との共同実験結果についても併せて報告する．

実験方法

1 試薬

カドミウム(Cd)標準原液は，和光純薬製原子吸光分析用Cd標準液1000 μg/mlを使用した．

尿試料分解用の硝酸(HNO_3)，過酸化水素水(H_2O_2)，硫酸(H_2SO_4)及び過塩素酸($HClO_4$)は和光純薬または関東化学製の有害金属測定用若しくは原子吸光分析用試薬を用いた．

*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
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**同環境保健部環境衛生研究科
***同理化学部医薬品研究科

尿試料あるいは標準溶液の希釈には，硝酸と高純度精製水を2：98の容量比で混合したもの(以下硝酸(2+98))を用いた．

2 尿試料

一般生活者から採取した尿試料(随時尿)を，ポリエチレン容器に入れ冷凍保存した．使用時に室温で解凍し，振り混ぜ沈澱物を分散させた後必要量を分取した．

なお，尿試料を酸分解処理したものを酸分解尿，酸分解せずにそのまま使用したものを無処理尿とした．

3 装 置

原子吸光分光光度計はパーキンエルマー社製，モデル5000，原子化装置はパーキンエルマー社製，モデルHGA500を使用した．

4 試料調製及び測定条件

尿試料2 mlを10ml共栓付三角フラスコに分取し，硝酸1 mlを加え，ホットプレート上で約150℃に加熱し，乾固しないように注意しながら分解した．有機物の分解が不十分で茶褐色を呈している場合は，さらに硝酸を数滴加え加熱分解を繰り返した．必要により過酸化水素水を数滴加え分解を促進した．有機物の分解が完了したら，乾固直前で加熱を止め，硝酸(2+98)溶液2 mlを加え，更に数分加熱し固形物を再溶解し試料溶液とした．

表1 測定条件

測定元素：カドミウム(Cd)
測定波長：228.8nm
ランプ電流：8mA
スリット幅：0.7nm
BG補正：ゼーマン
グラファイトチューブ：プラットフォーム
マトリックス修飾剤：$Pd(NO_3)_2$と$Mg(NO_3)_2$の混合液
標準注入量：尿試料 10μl+マトリックス修飾剤 5 μl
注入方法：手動(電動式マイクロピペット)
シグナル処理：ピーク高さ(吸光度)

温度プログラム

Step	Temp (℃)	Ramp (s)	Hold (s)	Internal FlorGas(Ar) (ml/min)
1(乾 燥)	130	40	10	250
2(乾 燥)	300	20	10	250
3(灰 化)	650	10	20	250
4(原子化)	2100	1	5	10
5(洗 浄)	2500	1	2	250
6	20	5	5	250

試料量は溶解試料を分解に用いた容器とともに秤量し，容器の重量を差し引き，この重量差を分析供与試料量とした．

測定条件は，干渉を抑制するため効果があるといわれている，プラットフォーム型グラファイトチューブを使用し，干渉抑制剤として硝酸パラジウムと硝酸マグネシウムの混合液を用いた．また，原子化のステップはランプモードを用いた．これらの条件を設定し，温度プログラムの条件を種々変化させ，最適と思われる表1の条件を選択した．

なお，尿の酸分解に使用した10ml共栓付の三角フラスコは，試料溶液の保存容器もかねているので，分解操作後の所要時間が短縮でき，しかもコンタミネーションの機会を少なくする利点があった．

5 検量線の作成

Cd標準原液を，硝酸(2+98)溶液を用いて希釈し，Cd濃度0.5，1.0，2.0，3.0，4.0n g /mlの標準溶液を調製した．この標準溶液を用いて検量線を作成した．

結果及び考察

1 検量線及び感度

標準溶液を用いて作成した検量線を図1に，グラ

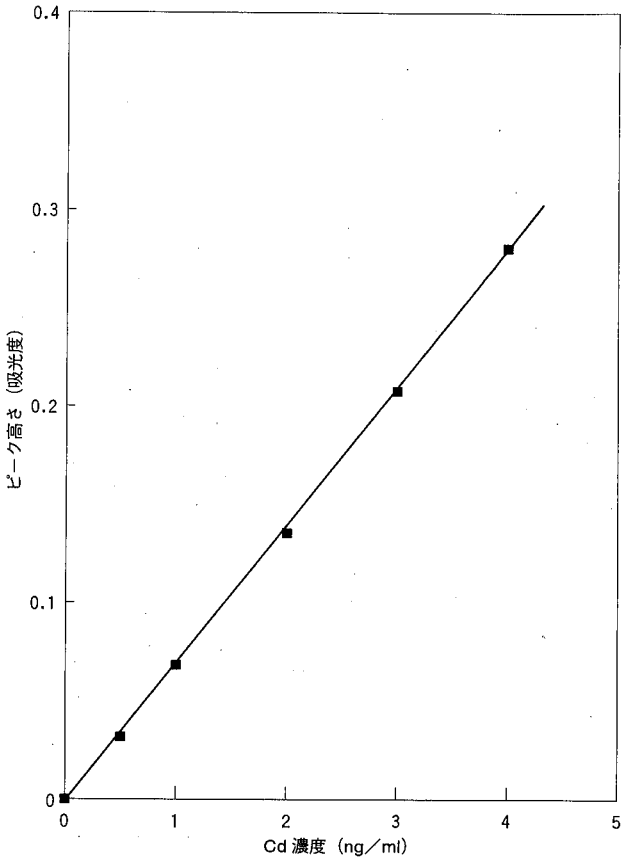


図1 カドミウムの検量線の例
硝酸(2+98)溶液

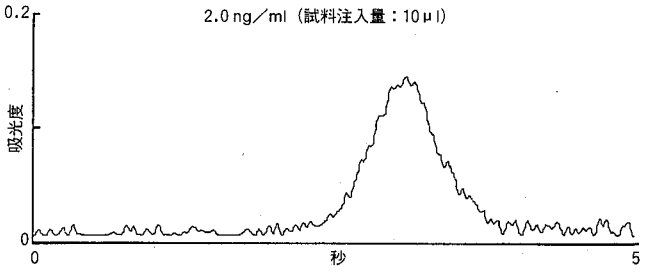


図2　カドミウム標準溶液による吸光シグナル

フィック表示した吸光シグナル(ピーク)を図2に示す．検量線は通常想定される尿中カドミウム濃度の範囲(4 ng/ml以下)において良好な直線性を示した．また，グラフィック吸光シグナルは，横軸が時間(5秒)で，縦軸が吸光度(フルスケール0.2)であり，標準溶液の場合，ほぼ左右対称の形状を示した．図2から求めた検出限界はS/N=2において，0.2ng/mlであった．

2　標準添加法による干渉の検討

尿試料No. 1 (男子学童，混合尿)，No. 2 (50歳代男性，混合尿)，No. 3 (49歳，男性尿)を酸分解し，分取量と同じ容量までメスアップした．それぞれの尿試料について，分解尿1 mlに，Cd濃度0.0，0.5，1.0，2.5ng/mlの標準溶液1 mlを加えた系列を調製した後，Cdを測定した．測定結果を図3に示す．

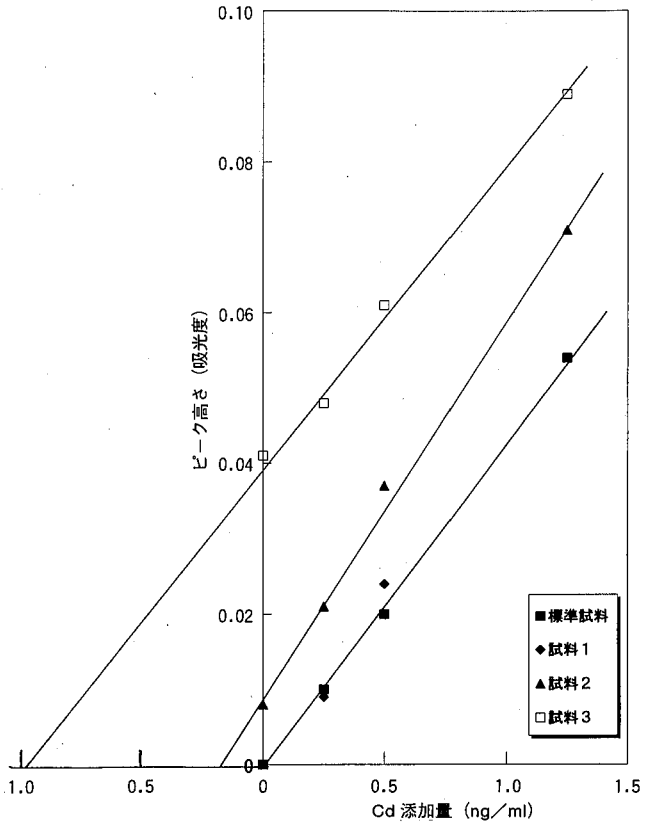


図3　標準添加法による干渉の検討
(酸分解尿)

標準溶液による検量線に対して，No. 1 (学童尿)は，検量線とほぼ同一線上に乗っており，干渉は認められない．試料No. 2 (50歳代混合尿)は，やや傾きが大きく正の干渉を受けており，標準添加法による測定値は0.18ng/ml，絶対検量線法による測定値は0.19ng/mlであった．逆に試料No. 3 (49歳単独尿)は，やや傾きが小さく負の干渉を受けけており，標準添加法による測定値は1.01ng/ml，絶対検量線法による測定値は0.97ng/mlであった．

試料No. 2，試料No. 3ともわずかな干渉を受けているが，その度合いは小さく，干渉成分によるバックグラウンドは，ゼーマン式の補正方法によってかなり良く補正されているものと考えられる．

個々の尿試料により，干渉の具合が若干異なると推測されるので，標準添加法によって定量することがより適切と思われるが，絶対検量線法によっても良い精度で定量が可能と考えられる．

3　希釈効果

酸分解尿及び無処理尿それぞれについて，希釈しないもの(無希釈尿)，2倍希釈したもの(2倍希釈尿)，4倍希釈したもの(4倍希釈尿)を調製し測定した．

酸分解尿については，試料注入量を10μlの場合と，20μlの場合について測定し，無処理尿については，10μlの場合のみ測定した．

結果を表2 (酸分解尿)，表3 (無処理尿)に示した．無処理尿の1例(No.13)を除き，無希釈尿は希釈尿に比較していずれも低い値を示した．

低い値を示す原因は，無希釈尿のシグナル(ピーク)の形状が標準溶液のピークの形状(ほぼ左右対称の形状，図1参照)と異なり，全般的にブロードになることや，また試料によってはピークが二山型を示すためであるためと考えられる．

ピークの形状がブロードになった例として試料No. 7 (図4)，二山型になった例として試料No.14 (図5)のチャートを示した．いずれも，無処理尿のピーク高さと2倍希釈尿のピーク高さはほとんど同じで，強度の負の干渉を受けていることがわかる．

今回の実験で用いたシグナル処理ソフトでは，ピークの面積計算ができないため，ピーク高さ(最高吸光度)から濃度を求めた．しかし，希釈を行ってもピークの形状は必ずしも標準溶液によるピークの形状と同一とはならないため，シグナル処理の方法としては，面積計算による処理がより適切と考えられる．

表2　希釈効果(酸分解尿)

試料番号	希釈倍率	注入量 μl	測定濃度 ng/ml	試料濃度補正係数	試料濃度 ng/ml	濃度比 (%)
4	1	20	0.97	1	0.97	62
	1	10	0.82	2	1.63	104
	2	20	0.83	2	1.65	105
	2	10	0.39	4	1.58	100
5	1	20	1.38	1	1.38	90
	1	10	0.76	2	1.52	99
	2	20	0.63	2	1.27	82
	2	10	0.38	4	1.54	100
6	1	20	1.69	1	1.69	75
	1	10	0.98	2	1.96	88
	2	20	0.95	2	1.90	85
	2	10	0.56	4	2.24	100
7	1	20	2.23	1	2.23	56
	1	10	1.59	2	3.17	79
	2	20	1.72	2	3.44	86
	2	10	1.00	4	4.00	100
	4	20	1.01	4	4.04	101
	4	10	0.58	8	4.62	115

(注) 濃度比は，2倍希釈10 μl注入を基準とし，%表示とした.

表3　希釈効果(無処理尿)

試料番号	希釈倍率	注入量 μl	測定濃度 ng/ml	試料濃度補正係数	試料濃度 ng/ml	濃度比 (%)
8	1	10	1.60	1	1.60	73
	2	10	1.09	2	2.18	100
	4	10	0.62	4	2.48	114
9	1	10	1.55	1	1.55	70
	2	10	1.10	2	2.20	100
	4	10	0.49	4	1.97	89
10	1	10	1.81	1	1.81	79
	2	10	1.15	2	2.31	100
	4	10	0.56	4	2.26	98
11	1	10	2.23	1	2.23	60
	2	10	1.86	2	3.73	100
	4	10	0.93	4	3.72	100
12	1	10	1.92	1	1.92	72
	2	10	1.33	2	2.67	100
	4	10	0.83	4	3.31	124
13	1	10	3.00	1	3.00	126
	2	10	1.19	2	2.39	100
	4	10	0.48	4	1.90	80

(注) 濃度比は，2倍希釈10 μl注入を基準とし，%表示とした.

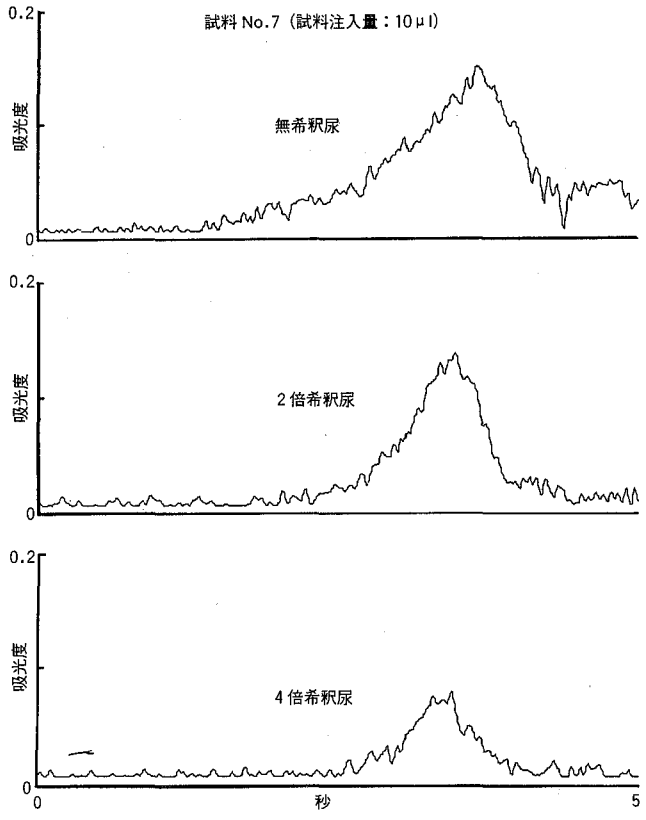


図4　酸分解尿の吸光シグナル(ブロードの例)

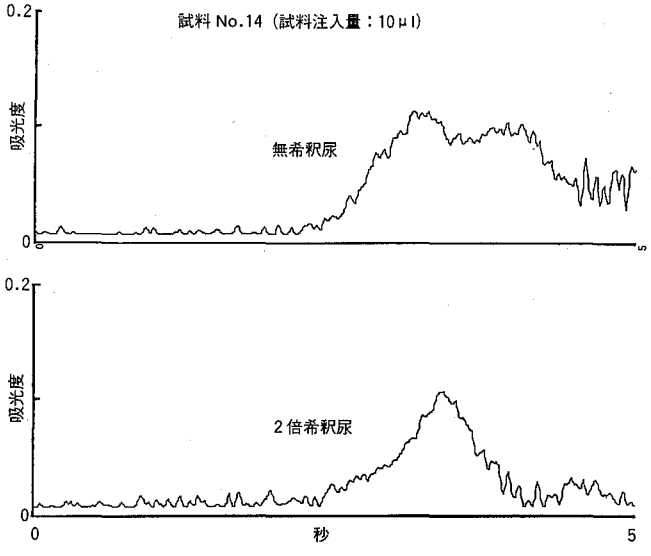


図5　酸分解尿の吸光シグナル(二山型の例)

干渉を除くためには，溶液を希釈した方が一般的に有利であるが，尿試料の多くはCd濃度1 ng/ml以下であり，感度との関係であまり希釈をすることができない．そのため，実用的には2倍希釈，10 μl注入が適当と考えられる．無希釈尿のCd濃度が概ね2 ng/mlを超えるもの

については，4倍希釈により定量することがより適切である．

4 酸分解尿と無処理尿の分析値の比較

酸分解尿と無処理尿の分析値を比較するため，16検体の尿試料についてCd濃度を測定した．希釈倍率は酸分解尿，無処理尿とも2倍とした．分析値の散布図を図6に示す．

低濃度域において分析値にバラツキが認められるが，全体としては良い一致が得られた．回帰分析の結果は，相関係数が0.985，傾きが1.01，y切片が-0.10であった．このことから，湿式分解を行わず，未処理のまま直接定量することも可能と考えられる．

5 DDTC-MIBK溶媒抽出法との比較

尿試料200mlを300mlケルダールフラスコに取り，硝酸と硫酸の混酸により加熱分解した．また，分解を促進させるため少量の過塩素酸及び過酸化水素水を使用した．

分解液のpHを8.5に調整し，これに1％ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)溶液5mlを加え，さらにメチルイソブチルケトン(MIBK) 4mlを加えて抽出した．DDTC-MIBK抽出により得られた抽出液をフレーム原子吸光法(varian AA-400，D_2補正)で測定した．また，溶媒抽出法と同じ尿試料を酸分解し，これを2倍希釈してフレームレス原子吸光法で測定した．両法の比較

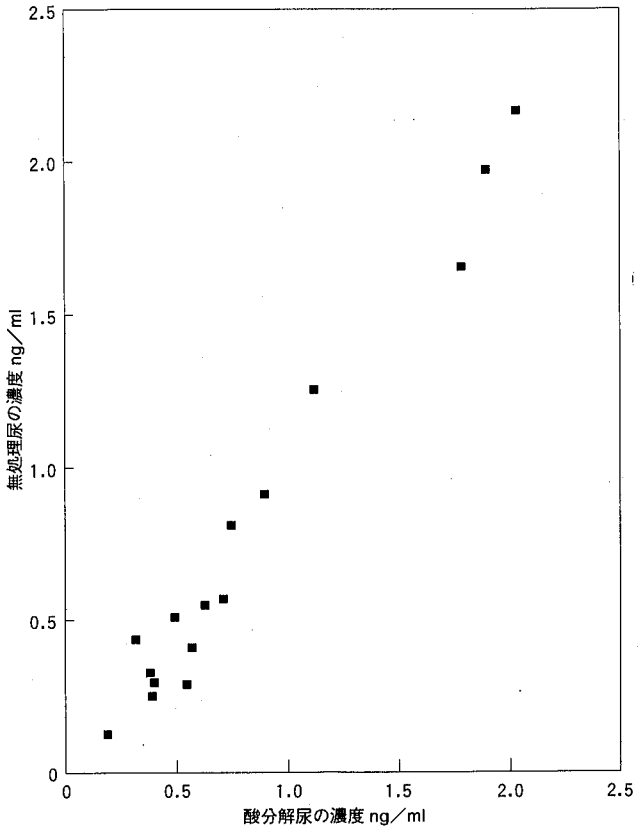


図6 分解尿と無処理尿の分析値の比較

表4 溶媒抽出法との比較

ng/ml

試料番号	フレーム法(溶媒抽出法)	フレームレス法(酸分解尿)
15	0.48	0.39
16	0.58	0.65
17	0.56	0.57
18	0.28	0.38
19	0.62	0.40

結果を表4に示した．

試料濃度が低濃度域であったため，全体の比較は困難であるが，比較的良い一致といえる．

6 複数機関による分析値の比較

尿試料No.20(52歳，男性尿)の酸分解尿と無処理尿を用いた．酸分解によって減少した液量は，硝酸(2+98)溶液を用いて補充し，含有Cd濃度が分解前と等しくなるようにした．このように調製した酸分解尿1mlに対して，0.0，0.5，1.0，2.0，4.0ng/ml濃度のCd標準溶液1mlを加え，標準添加2倍希釈尿を調製した．無処理尿についても同様に，標準添加2倍希釈尿を調製した．

これらの標準添加尿試料を，当所を含めて4カ所の機関で分析しその値を比較した．分析を依頼するにあたり，対象試料が尿試料であることは知らせたが，Cdの添加量については知らせずに依頼した．測定条件は，それぞれの分析担当者に一任した．Cd標準溶液は，当所で準備し，各機関とも同一のものを使用した．

無希釈尿と2倍希釈尿については，2倍希釈尿の値が無希釈尿の1/2になるのが最も望ましく，表5に示したように当所を除く他の3機関の値は，ほぼ1/2となった．これに対し，当所の無希釈尿の値は強度の負の干渉を受けている．標準添加2倍希釈尿については，4機関で若干のバラツキは見られるが，比較的良く一致している．

まとめ

ヒトの酸分解尿と無処理尿について，ゼーマン補正フレームレス原子吸光法による定量法を検討した．

酸分解尿及び無処理尿とも，干渉抑制剤，プラットホームグラファイトチューブを使用し，ランプモードで原子化することにより，干渉をほぼ除去できることが分かった．また，尿試料を希釈せずに分析すると，負の干渉が大きくなるため，希釈が必要である．感度との関係で実用的には，2倍に希釈し，10μlを注入することが適当である．

謝辞 本研究にあたり尿試料を提供された方々に感謝します．また，複数機関による分析値の比較にあたり，ご

表5　同一試料の分析値の比較

ng/ml

試料	試料の種類	Cd添加等	A (衛研)	B	C	D
20- 1	酸分解尿	無希釈尿	0.49	1.02	0.71	0.99
20- 2	酸分解尿	No.1を2倍希釈	0.35	0.58	0.32	0.54
20- 3	酸分解尿	Cd 0.25ng/ml添加	0.70	1.14	0.60	0.97
20- 4	酸分解尿	Cd 0.5ng/ml添加	0.82	1.16	0.74	0.90
20- 5	酸分解尿	Cd 1.0ng/ml添加	1.24	1.91	1.15	1.56
20- 6	酸分解尿	Cd 2.0ng/ml添加	2.24	3.22	1.95	2.63
20- 7	無処理尿	無希釈尿	0.54	0.88	0.64	1.20
20- 8	無処理尿	No.7を2倍希釈	0.49	0.49	0.28	0.63
20- 9	無処理尿	Cd 0.25ng/ml添加	0.61	0.79	0.48	0.82
20-10	無処理尿	Cd 0.5ng/ml添加	0.89	1.11	0.69	1.15
20-11	無処理尿	Cd 1.0ng/ml添加	1.38	1.70	1.13	1.53
20-12	無処理尿	Cd 2.0ng/ml添加	2.40	2.99	1.92	2.47
測定条件	バックグラウンド補正の方法		ゼーマン	ゼーマン	ゼーマン	ゼーマン
	化学修飾剤使用の有無		使用	使用せず	使用	使用
	グラファイトチューブのタイプ		プラットフォーム	プラットフォーム	プラットフォーム	プラットフォーム
	尿試料の注入量		10μl	10μl	10μl	10μl
	シグナル処理モード		ピーク高さ	ピーク高さ	ピーク面積	ピーク面積

(注)「酸分解尿」と「無処理尿」は同一の尿試料である.
検量用標準溶液は，各機関とも同一のものを用いた.
Cdの添加は，無希釈尿に標準溶液を1：1の割合で加えた.

協力いたゞいた関係各位に深謝します.

(本研究の一部は，日本環境学会第22回研究発表会1996年7月で発表した.)

文　献

1) 金属鉱山会，日本鉱業協会：鉱山，**48**(7)，95-99，1995.
2) H.A.シュレーダー：重金属汚染，磯野直秀訳，1976，日本経済新聞社，東京.
3) 厚生省：富山県におけるイタイイタイ病に関する厚生省の見解，昭和43年5月8日，1968.
4) 和田攻：金属とヒト，246-258，1985，朝倉書店，東京.
5) IARC：*IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, LIST OF IARC EVALUATIONS,* 1995, IARC, LYON, FRANCE.
6) 金属鉱山会，日本鉱業協会：鉱山，1989年2.3月号，142-146，1989.
7) 金属鉱山会，日本鉱業協会：鉱山，1991年8月号，102-106，1991.
8) 清水得夫，四条好雄，酒井　馨：分析化学，**30**，770-774，1981.
9) 城戸照彦，釣谷伊希子，本多隆文，他：金医大誌，**9**，70-75，1984.
10) 本多隆文，釣谷伊希子，石崎昌夫，他：金医大誌，**14**，337-347，1989.
11) E. J. Hinderberger, M. L. Kaiser and S. R. Koirtyohann：*atomic spectroscopy,* **2**(1), 1-7, 1981.
12) 細田加那江，大前和幸，小野寺みつ子，他：産業医学，**36**，102-103，1994.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 219-224, 1996

都民の血中，尿中鉛量について
ー1970年代における年次推移と地域差ー

瀬戸　博*，高橋利恵子**，長嶋親治*，藤谷和正***，
秋山和幸**，溝口　勲**，野牛　弘**

Lead Contents of Blood and Urine Sampled from the Residents in Tokyo Metropolitan Area
- Chronological Changes in the 1970s and Regional Differences -

HIROSHI SETO*, RIEKO TAKAHASHI**, CHIKAHARU NAGASHIMA*, KAZUMASA FUJITANI*, KAZUYUKI AKIYAMA**, ISAO MIZOGUCHI** and HIROSHI YAGYUU**

In May 1970, the incident called "The lead pollution at Ushigome-yanagicho" occurred in the central Tokyo area. The Bureau of public Health, Tokyo Metopolitan Government carried out the screening for the detection of a case of lead poisoning among the residents of the metropolitan area. It was reported that the number of examined residents was over two thousand, but neither a symptomatic nor an asymptomatic lead poisoning case was revealed.

The surveillance of health effects of lead pollution was continued until 1980. The sampling was expanded from kindergartners to senior high school students as well as adults, and from urban to suburban residents. The total of samples reached five thousand. The results of blood lead concentrations were presented separately for each region, mean levels being higher for urban (downtown commercal and industrial areas) than for suburban (Tama residential area) residents for both sexes and all age groups considered. Sexual difference of the lead concentrations was apparent as men had significantly higher levels when the data were classified by regions. Age was not strongly correlated with blood or urinary lead for both sexes. The chronological changes of lead contents of blood and urine in the 1970 s were observed as decreasing curves. It is suggested that the change from leaded to unleaded gasoline is one of the major causes of the blood and urinary lead declines.

Keywords：血中鉛 blood lead，尿中鉛 urinary lead，鉛中毒 lead poisoning，大気汚染 air pollution，加鉛ガソリン leaded gasoline，地域汚染 regional pollution

緒　言

1970年5月，東京都新宿区牛込柳町において，民間団体の実施した集団健康診断により，多数の住民が鉛中毒と診断された，いわゆる「牛込柳町鉛公害事件」が発生した．都衛生局は都民の要望により，都内各地において鉛害健診を希望者について実施した．受診者は延2000名以上にも達したが各種の鉛中毒臨床検査にもかかわらず1名の鉛中毒患者も発見されず[1)]，幸い深刻な事態ではないことが判明した．

この事件を契機に自動車ガソリンへのアルキル鉛の添加が規制(1971年)されるようになり，更には無鉛化(レギュラーガソリン，1975年)に至った．都衛生局はその後も引き続いて鉛汚染による健康影響の監視を1980年まで行った．

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科 169 東京都新宿区百人町3－24－1
*The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
**元東京都立衛生研究所環境保健部
***東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

本調査報告は，この全期間の健康診断に際して測定された都民の血中及び尿中鉛濃度について，年次推移，性差，地域差及び年齢の影響などについてまとめたものである．

通常，人体中の鉛測定は，対象が低濃度である上に器具や周辺環境等からの様々な汚染を受けやすく，検出感度や分析精度の点において多くの問題を含むものである．本調査では，一貫して原子吸光法が採用され，器具の脱鉛操作，精度管理も行われているところから，検出感度及び分析精度は現在の水準からみても通用するものと考えられる．調査終了後，やや時が経過しているが，自動車用ガソリンへの鉛添加の規制以前の状況とその後の変化を知る上で貴重な資料と考え報告する次第である．

材料及び方法

標本 1970年から1974年の5年間は特別区及び青梅，小金井，武蔵野，三鷹，調布，八王子の各市の幅広い年齢層を対象とした．1975年から1980年は都心の商工業地(葛飾区，江東区，江戸川区，荒川区)と多摩地区の住宅地(日野市，立川市，国立市，杉並区)の幼児から学齢の児童を主対象(1979年は成人も含む)として検体を採取した．

試薬 硝酸，硫酸，塩酸，過塩素酸，アンモニア水(NH_3-25%)：和光純薬工業製有害金属測定用試薬．鉛標準液(Pb-1000ppm)，クエン酸アンモニウム，アンモニウムピロリジンジチオカルバメイト(APDC)，メチルイソブチルケトン(MIBK)：和光純薬工業製原子吸光分析用試薬．ジチゾン，トリトンX-100：和光純薬工業製特級．トリエタノールアミン：同仁化学製．

装置 原子吸光分析計：パーキンエルマー社製 303及び403型．ホローカソードランプ：浜松テレビ(株)製．

測定条件 測定波長：2833 Å．燃焼ガス：空気 23.2 l/min，アセチレン4.2 l/min．

分析方法

A. 酸分解法：血液(10ml)はヘパリン添加試験管に，尿(100ml)はポリエチレン製ボトルに採取した．試料をケルダールフラスコに移し，15mlの硝酸，2 mlの硫酸及び2 mlの過塩素酸を加え，加熱分解した．この溶液を分液ロートに移し，5 mlの30%クエン酸アンモニウム，10%トリエタノールアミン混合液を加え，アンモニア水または塩酸でpHを9.7-10.0にした．2 mlの0.2%ジチゾン-MIBKを加えた後，10分間振とうした．有機層を試験管に移し原子吸光用検液とした．

B. ヘッセル法[2]：血液(3 - 5 ml)をヘパリン加試験管にとり，1 mlの5 %トリトンX-100と5 %APDC混合液を加えて1分間混合した．次に，水飽和MIBKを2 ml加え，10分間激しく振とうした．遠心分離(2700rpm，10分)後，有機層を原子吸光用検液とした．

なお，以上の操作に先立ち，試験管，ポリエチレンボトル，ケルダールフラスコは使用前に硝酸槽でのsoakingまたは，沸騰硝酸で数回洗浄し脱鉛を行った．

精度管理 血液に鉛濃度が15 μg /dlになるように酢酸鉛溶液を添加し，精度管理用試料を調製した．測定試料20検体毎に精度管理用試料を2検体投入し，検体処理を行った後，X-R管理図による精度管理を行った．

統計的検定 平均値の差はt検定により，相関の有意性の検定は無相関の検定により行った．標本は対数正規型分布を示したが，大数を扱うので検定誤差は少ないと考え，特に対数変換は行わなかった．

結　果

1．年齢の影響

都衛生局がまとめた1970年に採取した血液中の鉛濃度測定結果をTable 1 に示した．標本は男女別に，かつ年齢層別に区分した．性別に全標本の平均値と各年齢層の平均値との差を「母平均との差の検定」により検定したところ，男性の55-59歳層と女性の75-79歳層でのみ有意な差が認められた．しかし，大部分の年齢層では有意差がなく，しかも，一定の傾向も認められないことから年

Table 1. Effect of age on Lead content of blood (1970).

Age class	Male	Female
0-9	12.0±4.9(13)	10.0±3.8(13)
10-14	9.8±3.7(5)	9.3±4.7(9)
15-19	12.4±7.4(22)	8.2±5.5(10)
20-24	13.9±6.1(55)	10.4±4.8(37)
25-29	14.5±7.0(76)	9.2±4.8(49)
30-34	13.4±5.2(92)	10.0±5.9(93)
35-39	14.4±6.1(98)	10.5±6.0(109)
40-44	13.4±7.2(102)	11.0±6.3(85)
45-49	14.4±6.6(99)	10.9±5.9(120)
50-54	14.3±6.9(77)	10.9±5.1(100)
55-59	12.2±6.4(79) *	9.9±4.4(74)
60-64	14.0±6.5(81)	9.9±4.9(69)
65-69	13.1±6.2(55)	9.8±4.7(44)
70-74	15.0±9.8(35)	10.6±5.3(21)
75-79	11.9±3.4(16)	18.3±13.3(3) *
80-	11.0±2.8(2)	—
Total	13.7±6.6(907)	10.4±5.5(836)

Data are expressed as mean±S. D. (n). Unit：μg /100 g.
*；Different with significance ($P < 0.05$) from the whole sample.

齢(加齢)が血中鉛濃度に及ぼす影響は少ないものと推定された.

2. 地域差

1975年から1979年までの5年間について,男性の血中鉛濃度の地域差を各学校の学年層別に検討したのがTable 2である.表中データの上段は都心商工業地,下段は多摩住宅地の住民の血中鉛濃度を表し,両者の平均値に有意な差がある場合,*印を表示した.1978年の一部を除けば大部分の組み合わせで,都心商工業地の住民の血中鉛濃度の方が有意に高いという結果が得られた.

Table 2. Regional difference in average lead contents of male blood sampled from various grades in schools.

(unit : μg/100 g)

Grade in school	1975	1976	1977	1978	1979
kinder					8.4±2.0(48)]** 6.5±1.6(56)]
Elementary(2)			7.1±1.5(42)]* 6.3±1.6(47)]	6.4±1.7(37) 7.3±2.7(16)	
Elementary(5)				6.4±1.8(31) 5.9±1.8(23)	
Elementary(5,6)		12.5±3.1(30)]** 7.8±1.9(37)]			
J.high(1,2,3)	9.8±2.9(78)]** 7.9±2.4(84)]				
J.high(2)				8.4±2.4(35)]** 6.2±1.5(50)]	
S.high(1,2,3)		8.3±2.3(64)	7.5±2.5(48) ** 5.6±1.4(79)		
Adult					9.3±2.3(53)]** 6.2±1.8(53)]

*,** ; Significant level of the difference between the means by t-test ($P<0.05$ or 0.01).
The data are expressed as mean±S. D.(n).
Upper ; downtown area. Lower; regidential area.

Table 3. Regional difference in average lead contents of female blood sampled from various grades in schools.

(unit : μg/100 g)

Grade in school	1975	1976	1977	1978	1979
kinder					7.5±1.7(56)]** 5.8±1.2(53)]
Elementary(2)			6.4±1.6(39) 6.1±1.5(32)	7.7±3.1(34) 6.7±0.8(16)	
Elementary(5)				6.5±2.0(32) 5.7±0.9(14)	
Elementary(5,6)		9.1±3.0(30)]** 6.7±1.4(35)]			
J.high(1,2,3)	8.1±2.4(74)]** 5.1±1.8(67)]				
J.high(2)				5.4±1.6(35) 4.9±1.0(50)	
S.high(1,2,3)		5.6±1.9(63)	5.6±1.9(50)]** 4.3±1.5(68)]		
Adult					6.7±2.1(41)]** 4.8±2.0(29)]

*,** ; Significant level of the difference between the means by t-test ($P<0.05$ or 0.01).
The data are expressed as mean±S. D.(n).
Upper ; downtown area. Lower ; regidential area.

同様に女性についてもTable 3に示すように多くの組み合わせ(9分の5)で都心商工業地の住民の血中鉛濃度の方が有意に高い結果が得られた．したがって，性別にかかわりなく，幼稚園児から成人の広い各年齢層にわたって地域間に有意差が認められたことになる．

3．性差

Table 2と3のデータを入れ替えて地域別に血中鉛濃度の男女差を検定した．その結果，都心商工業地では1978年の小学5年生の組み合わせを除いて，すべての組み合わせで男性の方が有意に高かった．多摩住宅地では1977年と1978年の小学2年生及び1978年の小学5年生の組み合わせ以外で男性の方が有意に高かった．

4．血中鉛濃度と尿中鉛濃度の相関

1975年から1980年までの全検体(男女)の血中鉛濃度と尿中鉛濃度の相関係数(r)を計算した結果をTable 4に示した．相関係数は年度によりやや変動があるが，概ね0.37-0.55の間で正の相関が認められた($P<0.01$，全体$r=0.482$)．

5．年次推移

1970年から1980年までの都民の血中鉛濃度の推移をTable 5及びFig. 1に示した．データは各年度の全検体(男女比はほぼ1：1)の平均値及び標準偏差で表した．サンプリング計画の異なる1974年までと1975年以後に分けて，それぞれの期間内の変化を検定すると有意($P<0.01$)であった．血中鉛濃度(y)と西暦年(x)の直線関係式は

1970-1974年　$y= -0.77x + 1528$

1975-1980年　$y= -0.40x + 803$

同様に，尿中鉛濃度(y)と西暦年(x)の直線関係式は

1970-1974年　$y= -0.83x + 1644$

1975-1980年　$y= -0.46x + 908$

で勾配はともに負で後半6年間の方が前半5年間に比べて約50%と緩やかであった．

考　察

鉛は古くから人類に使用されてきた金属の一つで，グリーンランドの永久氷中の年代別鉛含量の測定によって，産業の発展とともに増加していること，またアルキル鉛がアンチノッキング剤に使用されるようになってから急増したことはよく知られている[3]．

血液中の鉛量は，吸収と各組織からの排泄または体内への再分布量の総和で，鉛暴露の良い指標とされている．最初に，年齢の影響をみたが男女ともに明確な年齢依存

Table 4. The correlation coefficients between lead concentrations of blood and urine.

Year	1975	1976	1977	1978	1979	1980	Total
Coefficient	0.369	0.454	0.408	0.378	0.504	0.549	0.482
Number of samples	219	239	402	369	129	333	1763
Significance	**	**	**	**	**	**	**

**；Significant level ($P<0.01$).

Table 5. Chronological change of lead concentrations of blood sampled from residents in Tokyo.

unit：(μg/100 g blood)

Year	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	Total
n	790	808	834	194	256	303	262	405	373	395	392	5012
age	2-83	6-89	18-77	11-80	6-77	12-15	10-18	7-18	7-14	5-60	6-18	2-89
Mean	10.9	9.7	10.1	8.0	7.9	7.9	8.0	6.0	6.4	7.0	5.6	8.5
S.D.	5.9	5.3	4.2	3.2	4.2	2.8	3.1	2.0	2.1	2.2	2.0	4.5

Table 6. Chronological change of lead concentrations of urine sampled from residents in Tokyo.

unit：(μg/l urine)

Year	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	Total
n	700	733	163	165	194	293	260	411	384	381	375	4059
age	2-83	6-89	18-77	11-80	6-77	12-15	10-18	7-18	7-14	5-60	6-18	2-89
Mean	9.9	7.7	7.1	5.6	6.8	4.9	6.3	3.8	3.8	3.8	3.2	6.1
S.D.	7.3	6.7	4.8	3.4	5.1	2.6	4.2	2.7	2.4	2.7	2.4	5.4

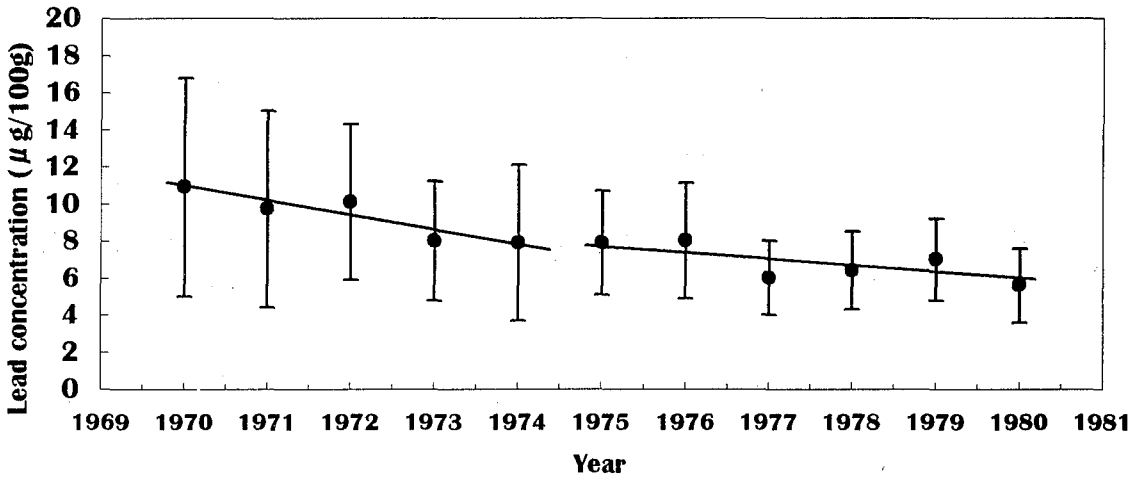


Fig 1. Chronological change of lead concentrations of blood sampled from residents in Tokyo.

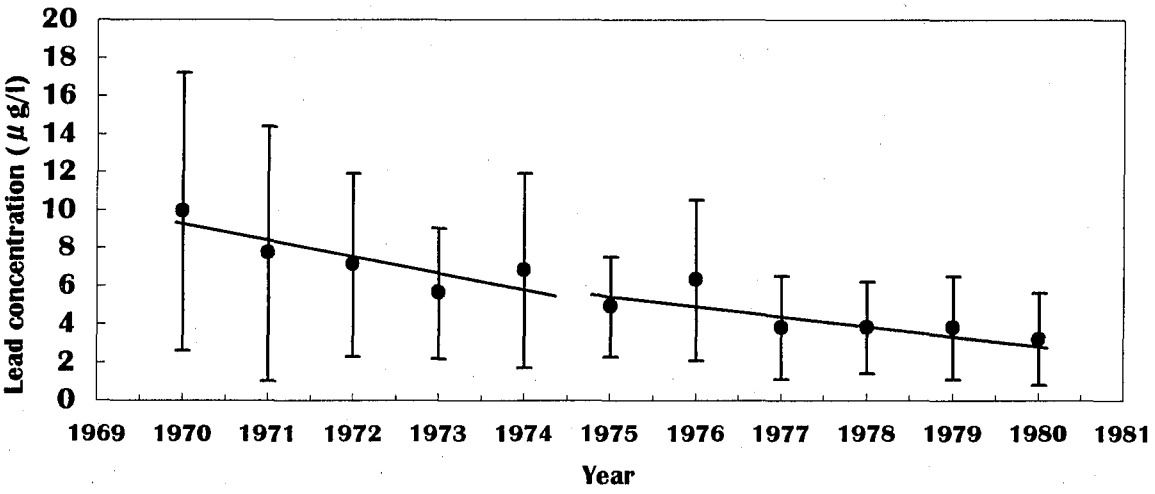


Fig 2. Chronological change of lead concentrations of urine sampled from residents in Tokyo.

性は観察されなかった(Table 1). しかし, この表では性別に分けたのみで地域やその他の交絡因子の存在を考慮していない問題点が残る. 血中鉛濃度が年齢と関連しているとの報告例もあるが, 大きな標本でようやく認められるような極わずかの差である[4].

次に, 住んでいる地域によって血中鉛量に影響があるかどうかを検討した. 喫煙の影響をあまり受けないと考えられる学齢期の児童生徒を対象にして年毎に, 性別にみたところ都心部の商工業地の児童の血中鉛濃度の方が多摩住宅地のそれよりも有意に高いケースが多く地域的な汚染の影響が推定された. 鉛汚染の指標生物として優れているとされるハトの血中鉛濃度も都心部で高く, 多摩地区で低い[5]という結果が得られている. しかし, 汚染度が低いと考えられてきた多摩地区といえども都市化が急速に進み, 非汚染地区としての対照地区にはならなくなったとの指摘もある[6].

尿中鉛濃度も鉛暴露の指標の一つだが, これを裏付けるようにTable 4に示すような相関係数0.48程度ではあるが血中鉛との有意な相関が得られている. 今回, 供した試料はスポット尿のため変動が大きいが, クレアチニン補正ができればさらに相関係数が増加するものと考えられる.

最後に, 年次推移について検討したが, データには交絡因子である性別, 地域, 年齢の影響もすべて含まれていることに留意する必要がある. これらのうち, 年齢の影響はほとんどないことは既に述べた. また男女の比率は各年齢層, 地域ごとにほぼ1：1であるので影響は相殺されると考えてよいであろう. しかし, 地域についてはサンプリング計画が1974年までと1975年以後では異なるため, サンプリング地域に偏りが生じ, 厳密には対象とする母集団が11年間一貫しているとは言えない. そこで, 最初の5年間と後半の6年間を分けて, それぞれの

期間内の変化を検定したところ，血中・尿中鉛濃度ともに有意な減衰傾向を認めた．サンプリング計画が異なっているにもかかわらず，1974年から1975年の鉛濃度にギャップはほとんどなく，両者は同じ母集団と仮定しても問題はない．一般に，薬物の生体内での減衰は指数関数で近似されることから，今回得られた様に最初は急激に，時が経過するにつれて徐々に減衰していくものと推察された．

1979年は5-60歳の幅広い年齢層からサンプリングしているので，これを健常都民の代表値とすると，血中鉛濃度の平均値は7.0 μg/100 gとなり，1970年の値からみると10年間で約36%減少したことになる．

観察期間内に東京の大気中鉛濃度が激減した[7]ことから，これが血中鉛濃度に影響を及ぼしたことが推定される．スイスやイタリアで自動車用ガソリンへの鉛添加の規制によって血中鉛濃度が低下したという報告[4,8]があることから，東京においても同様の規制効果によって大気中の鉛濃度が低下し，その結果，都民の血中鉛濃度が低下した可能性がある．しかし，野牛らは都民の血中鉛濃度に地域差を認め，これと自動車密度との間に相関はなかったとし，むしろ工場その他との関連を示唆している[9]．また，アメリカ合衆国での1976年から1980年の血中鉛濃度の低下(30-40%)の原因について，Annestら[10]はガソリンへの減鉛と相関するとしたが，一方，ArnetzとNicolich[11]は大気中の鉛濃度やガソリン販売量よりも社会経済関連因子やライフスタイルの特徴が重要だと述べている．血中鉛濃度は大気の他に水，食物，たばこ，アルコール飲料中の鉛によっても影響を受ける[3]．幼児では異食症による鉛中毒の例もある[3]．また，居住地付近の事業所や職業の種類によっても暴露の機会が増加する[3]．今回の調査ではこのような点については明確ではなく，都民の血中・尿中鉛濃度の低下原因を特定するには至らなかった．しかし，呼吸器からの鉛吸収は，全体の約3分の1程度[3]でかなり多いことを考慮すれば，1970年代の大気中鉛濃度の急激な低下は，都民の血中・尿中鉛濃度の低下をもたらしたと推察され，その第一の原因として自動車用ガソリンへの鉛添加の規制が進んだためと考えるのが妥当であろう．

今後の課題としては，汚染域の広域化に注目しながら，デイーゼル排気ガスなどを含めた総合的な大気汚染による健康影響の監視体制の確立が必要であろう．

結　論

1970年から1980年まで5,000名以上の都民の血中及び尿中鉛濃度を測定した．その結果，住んでいる地域によって血中鉛濃度は異なり，都心商工業地区の方が多摩住宅地区に比べて有意に高かった．また，性別では男性の方が女性よりも血中鉛濃度が高かった．男女とも年齢の血中鉛濃度への影響はほとんどなかった．尿中鉛濃度は血中鉛濃度と相関した(r=0.482)．1970年代に都民の血中及び尿中鉛濃度は減少した．その原因の一つとして1971年及び1975年の自動車用ガソリンへのアルキル鉛の添加の規制の影響が推定されたが，原因を特定するには至らなかった．

本調査研究は，公害検診(鉛)の一環として衛生局医療福祉部公害保健課(現 環境公害保健課)と協力して実施したものである．

文　献

1) 野牛　弘，橋爪六郎，秋山和幸，他：東京衛研年報，**22**，187-192，1970.
2) Hessel, D. W.：*Atomic. Absorb. Newsletter*, **7**, 55, 1968.
3) 和田　攻：金属とヒト，236-245，1986，朝倉書店，東京.
4) Wietlisbach, V., Rickenbach, M., Berode, M., *et al.*：*Environ. Res.*, **68**, 82-90, 1995.
5) 大井　玄，福田雅夫，関比呂伸，他：東京衛研年報，**23**，295-298，1971.
6) 関比呂伸，大沢誠喜，今野ヒロ子，他：東京衛研年報，**28**-1，224-227，1977.
7) 東京都公害研究所報告，浮遊粒子状物質，23，1978.
8) Bono, R., Pignata, C., Scursatone, E., *et al.*: *Environ. Res.*, **70**, 30-34, 1995.
9) 野牛　弘，秋山和幸，高橋利恵子，他：東京衛研年報，**23**，287-294，1971.
10) Annest, J., Pirkle, J. L., Mukug, D., *et al.*,：*N. Engl. J. Med.*, **308**, 1373-1377, 1983.
11) Arnetz, B., and Nicolich, J.：*Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **62**, 397-402, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 225-237, 1996

ディーゼルエンジン排気ガスの暴露は，ラットの成長板の病理学的変化を起こし，骨量を減少させる

渡辺伸枝*，池田眞悟*，大澤誠喜*，土屋悦輝*，鈴木重任*

Inhalation of Diesel Engine Exhaust Causes Pathological Changes of Growth Plates and Decreases Bone Mineral Contents in Rats

NOBUE WATANABE*, SHINGO IKEDA*, MASANOBU OHSAWA*,
YOSHITERU TSUCHIYA* and SHIGETOU SUZUKI*

ディーゼルエンジン排気ガスの暴露は，骨代謝にどのような影響を及ぼすのかを雌雄のラットを用いて検討した．実験群は，全排気ガス暴露群(粒子濃度5.63mg/m³，二酸化窒素濃度4.10ppm，一酸化窒素濃度8.10ppm)，排気ガスから粒子状物質を除去した除粒子暴露群，並びに清浄空気に暴露された対照群の3群から構成された．暴露スケジュールは，一日6時間，一週5日間の暴露を行い，出生時から各々3，6，12ヶ月後に解剖に供した．

暴露3ヶ月後では，全排気ガス暴露群・除粒子暴露群の腰椎の骨塩量・骨密度は雌雄ともに対照群に比べ有意に増加していた．成長期における排気ガスの暴露は，海綿骨・皮質骨における骨吸収の抑制を起こし骨量の蓄積を招くことが示された．

暴露12ヶ月後の全排気ガス暴露群では，大腿骨の骨長の減少，腰椎の高さの減少と，骨塩量・骨密度の減少が雌雄ともに明らかに認められた．また，除粒子暴露群の雌では，大腿骨の骨長の減少，第二腰椎の高さの減少と，骨塩量·骨密度の減少が認められた．両暴露群の骨端軟骨部には病理学的変化，すなわち軟骨細胞柱の細胞の壊死，ヘモジテリンの沈着，細胞間物質の構成成分の一つであるグリコサミノグリカンの局在の変化が観察された．ディーゼル排気ガスの長期暴露は，肺機能の低下等による局所の血流の阻害を起こし，細胞間物質を破壊し，成熟後の骨量の維持に必要な軟骨細胞の退行性変化を招き，こうした一連の事象が骨量の減少起こすことが考えられた．

全排気ガス暴露群·除粒子暴露群ともに同様の変化がみられたことから，骨代謝の変化には排気ガス中のガス状成分の寄与率が高いことが考えられた．

Keywords：Diesel Engine Exhaust ディーゼルエンジン排気ガス，Rats ラット，Femur 大腿骨，Lumbar Vertebrae 腰椎，Bone Mineral Content (BMC)骨塩量，Bone Mineral Density (BMD)骨密度，Pathological changes 病理学的変化，Growth Plate 成長板，Hemosiderin ヘモジテリン，Glycosaminoglycans グリコサミノグリカン

Introduction

Toxic effects induced by chronic inhalation of diesel engine exhaust on the respiratory function and carcinogenic and mutagenic effects on the lungs have been reported[1,2,3,4]. Studies of the biological effects of diesel engine exhaust on other organs, however, are quite limited and research on the specific agents corresponding to the specific pathologic change is also limited.

In a previous paper, inhaling diesel engine exhaust from birth to 3 months of age was found to reduce bone turnover and led to increased bone mass in growing rats[5]. The long-term inhalation caused different effects

*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

on the skeleton system from those of short-term exposure on male rats[6]. It was also observed that chronic inhalation of diesel exhaust caused pathological and histochemical changes of the growth plate of costae, and deformity of the rib cage in rats[7].

Since skeletal tissues do not play a major role in biotransformation or elimination of potentially toxic substances from the body, most exogenous chemicals exert their effects on the skeleton via secondary mechanisms[8]. It has also been shown that toxic effects may be mediated by alterations in blood flow within the skeleton[9]. On the other hand, inhaling diesel exhaust caused pathological and functional disorders of the lungs[10]. These findings strongly suggest that bone metabolic changes are caused not only by chemical agents derived from exhaust but also by secondary mechanisms.

The present study was undertaken to determine how diesel exhaust exerts its toxicity on the bone metabolism after continuous exposure for 3, 6 and 12 months. The changes of bone mass were evaluated in relation to the histochemical and pathological changes of the growth plates. Dosing experiments of total exhaust, filtered exhaust, and a control were also conducted to clarify the type of agent that affects bone metabolism.

Materials and Methods

Animals : Rats used in the experiment were derived from 24 pregnant female Fischer rats (F344/DuCrj) purchased from Charles River Japan (Kanagawa, Japan). On the 19th day of pregnancy, the mother rats were divided into 3 groups and moved into separate inhalation chambers. Litter sizes ranged from 9 to 11. The young rats were removed from their mother at 21 day of age. At the same time, the young rats were divided into groups of males and females, then male and female rats were randomly assigned to groups of 6 that were housed in single cages.

Experimental Design : The animals were assigned to 3 groups : Group 1 was exposed to total diesel engine exhaust (the total exhaust group), Group 2 was exposed to filtered exhaust without particles (the filtered exhaust group), and Group 3 was exposed to clean air (the control group). The animals were maintained in the same way as in the previous report[5]. Six male and female rats were selected from each group for the study at 3, 6 and 12 months of age.

Generation of Diesel Exhaust : Details of generation of diesel exhaust and exposure conditions were described elsewhere[5]. Briefly, diesel engine exhaust was generated by running a 309 cc engine (Model NFAD50, Yanmar Diesel Co., Osaka, Japan) at 2,400 rpm. Exhaust was diluted with clean air in a dilution tunnel and then drawn into the inhalation chamber (particulate matter = 5.63mg/m^3, nitrogen dioxide = 4.10ppm, nitrogen monoxide = 8.10ppm). In the filtered exhaust, most of the diesel soot particles in whole exhaust were removed by HEPA filtration (ATM 3QA, Nippon Muki Co., Tokyo, Japan).

Determination of Bone Minerals : At the end of the experiment, body weights were measured. After the animals were sacrificed by exsanguination, the 2nd through 5th (L2-L5) lumbar vertebrae and the right femur were removed. Details of the measurement of bone minerals were described previously[5]. The length of the femur and the height of lumbar vertebral body (L2-L5) were measured with a micrometer.

Histology : The left femurs were fixed in 10% buffered formalin, decalcified in 10% buffered EDTA and embedded in paraffin wax. Finally, 7 μ m thick longitudinal sections of the distal one-third region of bones were cut and stained with hematoxylin and eosin, prussian blue and toluidin blue (pH 2.5).

Statistical Analysis : Student's t-test was used to determine the significance of differences between groups. All reported values were expressed as mean $\pm$ SD. P values less than 0.05 were considered significant.

Results

General Condition and Body Weights

All experimental animals appeared to remain generally normal throughout the experimental period. At the end of the experiment, the average body weights of male rats were 384.75$\pm$21.85, 401.05$\pm$16.95, 407.82$\pm$22.19 (g) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust, and the control group, respectively. The average body weights of female rats were 210.60$\pm$7.94, 215.32$\pm$10.04, 219.97$\pm$7.58 (g) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust, and in the control group, respectively. There were no significant differences in body weight among age-matched and sex-

matched groups of rats.

Bone Mineral Measurements and Bone Length of the Femur

Table 1 shows the size, bone mineral content and bone mineral density of the femoral bone in male rats. The longitudinal growth of the long bones was lower in the group exposed to total exhaust for 12 months. The lengths were 3.87±0.05, 3.93±0.03 and 3.95±0.06 (cm) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the group exposed to total ($p<0.05$) diesel exhaust compared to that of animals exposed to clean air (Table 1). There was also an inter-group difference in the length of the femur ($p<0.05$).

After 12 months exposure, The BMC values decreased in the total exhaust group. The values of BMC were 306.29±15.48, 336.89±11.98 and 329.24±18.13 (mg) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the total exhaust group ($p<0.05$) compared to those in animals exposed to clean air (Table 1). BMD values were also lower in the total exhaust group, and their values were 133.52±5.82, mg/cm² in the total exhaust group, 140.75±3.61, mg/cm² in the filtered exhaust group and 144.08±6.58, mg/cm² in the control group. BMD values showed significant decreases in the total exhaust group ($p<0.01$) compared to those in the conrol group. Between the two groups exposed to total exhaust and filtered exhaust, there were inter-group differences in the values of BMC and BMD ($p<0.01$, $p<0.05$, for BMC and BMD, respectively).

Table 2 shows the size, bone mineral content and bone mineral density of the femoral bone in the female. The longitudinal growth of the long bones decreased in both exhaust groups for 12 months. The lengths were 3.30±0.04, 3.32±0.04 and 3.38±0.02 (cm) in groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the groups exposed to total ($p<0.01$) and filtered ($p<0.05$) diesel exhaust compared to those in the control group (Table 2).

After 12 months exposure, BMC decreased in the groups exposed to diesel exhaust. BMC was 185.46±11.76, 198.50±7.53 and 209.36±8.23 (mg) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in both groups exposed to total ($p<0.05$) and filtered ($p<0.05$) diesel exhaust compared to that in the control group (Table 2). BMD also decreased in both the exhaust groups, and the values were 116.75±3.86, mg/cm² in the total exhaust group, 115.01±5.64, mg/cm² in

Table 1. Bone size, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry of the femoral bone in male rats

Group	Mesures	Exposure period		
		3 M	6 M	12M
Total exhaust	Femur length (cm)	3.60± 0.04	3.81± 0.05	3.87± 0.05[a,c]
	BMC (mg)	258.85±25.07	298.40±17.26	306.29±15.48[a,b]
	BMD (mg/cm²)	128.49± 6.61	137.58± 4.37	133.52± 5.82[a,c]
Filterd exhaust	Femur length (cm)	3.64± 0.05	3.81± 0.06	3.93± 0.03
	BMC (mg)	258.96±13.74	295.39±17.63	336.89±11.98
	BMD (mg/cm²)	125.10± 3.17	128.42± 4.91	140.75± 3.61
Control	Femur length (cm)	3.65± 0.07	3.87± 0.08	3.95± 0.06
	BMC (mg)	254.60±14.38	314.36±20.00	329.24±18.13
	BMD (mg/cm²)	123.70± 2.21	134.81± 6.16	144.08± 6.58

Values are expressed as mean±SD, Comparison among groups (Student's t-test after two factor factrial ANOVA).
a Different from control ; P〈0.05
b Different from filtered ; P〈0.01
c Different from filtered ; P〈0.05

Table 2. Bone size, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry of the femoral bone in female rats

Group	Mesures	Exposure period		
		3 M	6 M	12M
Total exhaust	Femur length (cm)	3.16± 0.04	3.30± 0.04	3.30± 0.04[a]
	BMC (mg)	176.18±10.81	186.13±11.35	185.46±11.76[b,c]
	BMD (mg/cm²)	109.40± 3.01	111.30± 4.01	116.75± 3.86[a]
Filterd exhaust	Femur length (cm)	3.17± 0.04	3.27± 0.04	3.32± 0.04[b]
	BMC (mg)	182.41± 7.72	178.08± 9.11	198.50± 7.53[b]
	BMD (mg/cm²)	107.28± 3.80	112.30± 3.78	115.01± 5.64[a]
Control	Femur length (cm)	3.14± 0.06	3.32± 0.01	3.38± 0.02
	BMC (mg)	177.96±11.40	180.50±15.70	209.36± 8.23
	BMD (mg/cm²)	110.60± 3.47	110.90± 7.80	126.37± 5.03

Values are expressed as mean±SD, Comparison among groups (Student's t-test after two-factor factrial ANOVA).
a Different from control ; P〈0.01
b Different from control ; P〈0.05
c Different from filtered; P〈0.05

the filtered exhaust group and 126.37 ± 5.03, mg/cm² in the control group. BMD showed significant decreases in the total ($p < 0.01$) and filtered exhaust groups ($p < 0.01$) compared to the control group. Between the two groups exposed to total exhaust and filtered exhaust, there were no inter-group differences in the values of BMD.

Pathological Changes of the Growth Plates of the Femur

After 3 months, the cartilage cells of the growth plates of the femur in all groups were arranged in the characteristic longitudinal columns. Blood capillaries are evident between the calcifying cartilage zone and the developing bone trabeculae. A 6-month-exposure to total exhaust resulted in a thinning of the epiphyseal cartilage compared to that of the control group. The primary trabeculae were narrow, irregular and considerably shorter than normal, and the marrow cavity extended up to the epiphyseal line in some places (Fig. 1, 2). The growth plates of the femur of a 12-month-old rat in the control group was closed and the cartilagenous matrix remained with occasional chondrocytes between the osseous plate on both the mataphyseal and epiphyseal sides (Fig. 3). The arrangement of the longitudinal columns in both exhaust groups was disrupted after 12 months exposure (Fig. 4). The deposition of hemosiderin was detected in the epiphyseal cartilage cells after 6, 12 months of exposure in the total exposed group and after 12 months exposure in the filtered group (Fig. 6, 8), though it was not detected in the control group at any point of the experiment (Fig. 5, 7). The interstitial matrix of the longitudinal columns showed metachromasia and a stained reddish purple pattern in the control group (Fig. 9, 11). Metachromasia was hardly detected after 6, 12 months in the total exhaust group and 12 months in the filtered exhaust group (Fig. 10, 12).

Bone Mineral Measurements and Height of the Lumbar Vertebrae

Table 3 shows the height, bone mineral content and bone mineral density of the lumbar vertebrae in male rats. The longitudinal growth of the third vertebral bones was lower in both groups exposed to total and filtered exhaust for 12 months. The heights of third lumbar vertebrae were 7.70±0.44, 8.09±0.34 and 8.63 ±0.23 (mm) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in both groups exposed to total ($p<0.01$) and filtered ($p<0.01$) diesel exhaust compared to that of the control group (Table 3). There were no inter-group differences in the height of the third lumbar vertebrae. The total height of lumbar vertebrae (L2-L5) was also lower in the group exposed to total ex-

Table 3. Bone size, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry of the lumber vertebrae in male rats

Group	Mesures	Exposure period 3 M	6 M	12M
Total exhaust	L2 body height (mm)	6.74± 0.53	7.66± 0.40	7.34± 0.29
	L3 body height (mm)	7.58± 0.43	7.49± 0.45	7.70± 0.44[b]
	L2-L5 body height (mm)	27.26± 2.78	30.08± 0.77	29.73± 0.91[b,d]
	BMC (mg)	271.26±18.70[c]	358.62±14.23[e]	349.34±18.80[b,e]
	BMD (mg/cm²)	149.74± 5.24[b]	163.02± 4.38	156.95± 7.86[b,d]
Filterd exhaust	L2 body height (mm)	6.86± 0.32	7.40± 0.29	7.84± 0.45
	L3 body height (mm)	7.44± 0.37	7.40± 0.23	8.09± 0.34[b]
	L2-L5 body height (mm)	28.28± 0.66	29.24± 1.01	31.93± 1.17
	BMC (mg)	275.62±12.24[b]	327.44±22.33	385.27±22.88
	BMD (mg/cm²)	150.82± 3.96[a]	158.13± 4.77	169.37± 4.32
Control	L2 body height (mm)	6.71± 0.39	7.57± 0.30	7.71± 0.38
	L3 body height (mm)	7.72± 0.24	7.68± 0.49	8.63± 0.23
	L2-L5 body height (mm)	28.23± 0.76	29.86± 0.79	31.68± 0.41
	BMC (mg)	249.43± 7.71	347.42±15.78	400.50±31.91
	BMD (mg/cm²)	140.74± 2.38	159.75± 3.25	170.43± 6.46

Values are expressed as mean±SD, Comparison among groups (Student's t-test after two-factor factrial ANOVA).
a Different from control ; $P<0.001$
b Different from control ; $P<0.01$
c Different from control ; $P<0.05$
d Different from filtered exhaust ; $P<0.01$
e Different from filtered exhaust ; $P<0.05$

haust. The total height of lumbar vertebrae was 29.73 ± 0.91, 31.93 ± 1.17 and 31.68 ± 0.41 (mm) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the total group ($p<0.01$) compared to that of the control group. There was an inter-group difference in the height of the total lumbar vertebrae ($p<0.01$).

In the lumbar vertebrae, BMC was higher in the groups exposed to diesel exhaust for 3 months. BMC was 271.26 ± 18.70, 275.62 ± 12.24 and 249.43 ± 7.71 (mg) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant increases in the groups exposed to total ($p<0.05$) and filtered ($p<0.01$) diesel exhaust compared to that in the control group (Table 3). BMD was also higher in both exhaust groups, and the values were 149.74 ± 5.24, mg/cm² in the total exhaust group; 150.82 ± 3.96, mg/cm² in the filtered exhaust group; and 140.74 ± 2.38, mg /cm² in the control group. BMD showed significant increases in the total exhaust ($p<0.01$) and filtered exhaust ($p<0.001$) compared to the control group. Between the two groups exposed to total exhaust and filtered exhaust, there were no inter-group differences in the values of BMC and BMD.

BMC of lumbar vertebrae increased in total exhaust exposed group ($p<0.05$) when compared to the filtered exhaust group after 6 months exposure.

BMC decreased in the group exposed to total diesel exhaust for 12 months. BMC was 349.34 ± 18.80, 385.27 ± 22.88 and 400.50 ± 31.91 (mg) in groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the group exposed to total exhaust ($p<0.01$) compared to that of animals exposed to clean air (Table 3). BMD also decreased in the total exhaust group, and the values were 156.95 ± 7.86, mg/cm² in the total exhaust group; 169.37 ± 4.32, mg/cm² in the filtered exhaust group; and 170.43 ± 6.46, mg /cm² in the control group. BMD decreased significantly in the total exhaust group ($p<$

0.01) compared to that of the control group. Between the total exhaust and filtered exhaust groups, there were inter-group differences in the values of BMC and BMD ($p<0.05$, $p<0.01$ for BMC and BMD, respectively).

Table 4 shows the height, bone mineral content and bone mineral density of the lumbar vertebrae in female rats. The longitudinal growth of the second vertebral bones decreased in both groups exposed to total and filtered exhaust for 12 months. The heights of the second lumbar vertebrae were 6.12 ± 0.13, 6.01 ± 0.15 and 6.35 ± 0.14 (mm) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in both groups exposed to total ($p<0.01$) and filtered ($p<0.01$) diesel exhaust compared to those of the control group (Table 3). There were no inter-group differences in the height of the third lumbar vertebrae. The total heights of lumbar vertebrae (L2-L5) was also lower in the group exposed to total exhaust. The total height of lumbar vertebrae were 25.18 ± 0.25, 25.96 ± 0.41 and 26.17 ± 0.72 (mm) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the height of the total lumbar vertebrae in the total exhaust group ($p<0.01$) compared to those in the control group. There were inter-group differences in the height of the total lumbar vertebrae ($p<0.01$).

In the lumbar vertebrae, BMC was higher in the groups exposed to diesel exhaust for 3 months. BMC was 200.06 ± 17.20, 192.00 ± 11.06 and 170.90 ± 11.60 (mg) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant increases in the groups exposed to total ($p<0.01$) and filtered ($p<0.01$) diesel exhaust compared to those in the control group (Table 4). BMD was also higher in both exhaust groups, and their values were 128.31 ± 5.69, mg/cm² in the total exhaust group, 130.10 ± 4.96, mg/cm² in the filtered exhaust group and

Table 4. Bone size, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry of the lumber vertebrae in female rats

Group	Mesures	Exposure period		
		3 M	6 M	12M
Total exhaust	L2 body height (mm)	5.71± 0.29	6.02± 0.16	6.12± 0.13[c]
	L3 body height (mm)	6.11± 0.14	6.42± 0.18	6.28± 0.27[b,e]
	L2-L5 body height (mm)	23.77± 0.59	25.33± 0.29	25.18± 0.25[b,d]
	BMC (mg)	200.06±17.20[b]	222.14±18.60	234.49± 6.68[c]
	BMD (mg/cm²)	128.31± 5.69[b,e]	141.05± 7.24	138.53± 4.93[b,e]
Filterd exhaust	L2 body height (mm)	5.77± 0.24	6.12± 0.12	6.01± 0.15[b]
	L3 body height (mm)	6.02± 0.20	6.46± 0.17	6.60± 0.23
	L2-L5 body height (mm)	23.81± 0.44	25.43± 0.64	25.96± 0.41
	BMC (mg)	192.00±11.06[b]	221.61±18.60	251.09±18.00
	BMD (mg/cm²)	130.10± 4.96[a]	136.00± 5.17	145.06± 3.64
Control	L2 body height (mm)	5.85± 0.15	6.04± 0.07	6.35± 0.14
	L3 body height (mm)	6.08± 0.13	6.55± 0.25	6.79± 0.24
	L2-L5 body height (mm)	23.76± 0.21	25.47± 0.41	26.17± 0.72
	BMC (mg)	170.90±11.60	206.68±14.00	248.59±12.85
	BMD (mg/cm²)	116.99± 4.42	140.19± 7.24	148.35± 5.21

Values are expressed as mean±SD, Comparison among groups (Student's t-test after two-factor factrial ANOVA).
a Different from control ; P〈0.001
b Different from control ; P〈0.01
c Different from control ; P〈0.05
d Different from filtered exhaust ; P〈0.01
e Different from filtered exhaust ; P〈0.05

116.99±4.42, mg/cm² in the control group. BMD values showed significant increases in the total exhaust group ($p<0.01$) and in the filtered exhaust ($p<0.001$) compared those in the control group. Between the total exhaust and filtered exhaust groups, there was an inter-group difference in the values of BMD ($p<0.05$).

BMC was lower in the group exposed to total diesel exhaust for 12 months. BMC was 234.49±6.68, 251.09 ±18.00 and 248.59±12.85 (mg) in the groups exposed to total exhaust, filtered exhaust and in the control group, respectively. There were significant decreases in the group exposed to total ($p<0.05$) diesel exhaust compared to that of the cotrol group (Table 4). BMD was also lower in the total exhaust group, and the values were 138.53 ± 4.93, mg/cm² in the total exhaust group, 145.06 ± 3.64, mg/cm² in the filtered exhaust group and 148.35±5.21, mg/cm² in the control group. BMD showed significant decreases in the total exhaust group ($p < 0.01$) compared to the control group. Between the total exhaust and filtered exhaust groups, there was an inter-group difference in the values of BMD ($p<0.05$).

Discussion

This study clearly demonstrated that inhalation of diesel engine exhaust influences bone metabolism and increases the bone mass of the lumbar vertebrae in growing rats. After a 12-month period of inhalation of total exhaust, the lenghth of the femur and the height of the lumbar vertebrae were reduced. BMC and BMD in the cancellous bone and cortical bone regions were also decreased. The lenghth and the bone mass of the femur were reduced in female rats exposed to filtered exhaust, too. There were pathological changes in the epiphyseal cartilage zone, such as the deposition of hemosiderin and the changes of the components of the interstitial matrix in both exhaust groups. Since elimination of the particulate matter by filtration did not greatly influence the results, it is suggested that the gaseous phase of the exhaust is responsible for this disturbance of bone metabolism.

Diesel exhaust may exert toxic effects on the skeleton directly or via secondary mechanisms. The mechanisms leading to the disorders of bone metabolism may differ depending on the duration of exposure and growing stage.

Regarding the reason that causes disorders of bone metabolism after 3 months, a possibility of a direct tox icity arises because the gaseous phase of diesel engine exhaust includes agents that may affect bone metabolism. One is nitrogen monoxide which is known to be a mediator of inflammation. A role of nitrogen monoxide as a modulator of bone resorption has been also proposed[11]. While several bone absorbing agents are released from inflammation sites, including prostaglandin E2, and interleukin-6, the action of nitrogen monoxide has been reported to directly inhibit osteoclastic bone resorption[12]. In this study, the inhaltion of diesel engine exhaust from birth to 3 months of age increased bone mineral contents and bone mineral density. The inhalation did not influence the length of the femur or the height of the vertebra body. There were no pathological changes either. The increased bone mineral contents and bone mineral density may not be associated with the longitudinal growth rate. As reported earlier, the urinary excretions of deoxypyridinolines, which is one of the bone resorption markers, were reduced[5]. Therefore, it may be reasonable to assume that the gaseous phase of the exhaust containing nitrogen monoxide may affect the development of osteoclasts in the bone marrow after shifting from the lung by circulation, reduce bone turnover and cause accumulation of bone during a growth phase.

As regards the mechanisms that decrease in the bone mass after 12 months, a possibility is that the toxic effects may be mediated by alterations in the lung structure and function.

It has been observed that exposure to diesel engine exhaust during the neonatal period markedly inhibited the normal developmental process of alveolarization[13,14,15] It can cause permanent inhibition of alveolar formation and pulmonary vascular development, and can reduce the surface area for respiratory exchange. It is well known that a long term inhalation of diesel exhaust increases the thickness of the air-blood barrier and reduces lung function[10]. Pulmonary insufficiency might be more serious in the animals whose lungs are immature.

In this study, the length of the femur and the height of the lumbar vertebra body decreased in the total ex-

haust exposed group after 12 months of exposure. And the bone mass was reduced in the cancellous bone and cortical bone regions. The longitudinal bone growth is determined by the rate of cell division in the proliferating zone and enlargement is caused by cell hypertrophy and production of interstitial matrix in the maturing cartilage zone[8]. Altered longitudinal bone growth rate changes the dynamics of metaphyseal bone modeling and remodeling. The homeostasis of the basic multicellular units of bone remodeling is largely responsible for maintaining bone mass in the adult skeleton[16]. These findings strongly suggest that decreased longitudinal growth might be responsible for the reduction.

On the other hand, there were some pathological changes of the growth plates. The deposition of hemosiderin may suggest that there is a disturbance of blood flow on the epiphyseal cartilage. It is reported that free-radical molecules generated by autoxidation are cleared from the blood in normal circulation, but reduced blood flow allows free-radicals to build up and may damage various structural components of the interstitial matrix, such as polysaccarides and degrade synovial fluid and cartilage[17,18]. Metachromasia that shows the localization of glycosaminoglycans was not observed in both the exposed groups in this study. These findings strongly suggest that there might have been disorders of the epiphyseal cartilage metabolism of the growth plates.

Although the mechanism that decreases the bone mass after long-term exposure is not clear at present, it may be reasonable to assume that a prolonged inhalation of diesel exhaust causes pulmonary insufficiency and other organ failures, disturbs blood flow, destroys the interstitial matrix and causes degenerative changes of cartilage cells that are needed to maintain bone mass.

The loss of the bone mass in the femur occured in the filtered female group as shown in table 2, though there were no significant decreases in the filtered male group as shown in table 1. Recently, epidemiological studies have revealed that there is a high correlation between bone mass, especially peak bone mass, and incidence of osteoporosis in both men and women. It is well known that peak bone mass in men is much higher than in women and the difference of peak bone mass is one of the reasons why osteoporosis is much more common in women than in men[19]. Female rats may be more sensitive to the agents contained in diesel exhaust after maturation.

The decrease of the bone mass was observed in the femur as shown in table 2, though the decrease of bone mass of the lumbar vertebrae was not detected in the filtered exhaust female group after 12 months as shown in table 4. The increases in the bone mass in the cancellous bone of the lumbar vertebral bone were significant in all of the exhaust groups after 3 months. The increases in the bone mass of the femur were not clear except the cortical bone of the mid-femur in the total exhaust male group after 3 months. It has been shown that increased bone turnover and resorption after ovariectomy occurs on each bone equally, but the cancellous bone loss in the femur was more conspicuous than in the lumbar vertebrae[20]. One of the reasons that caused the different response among the bones may be derived from the difference of the bone structure, such as total cancellous bone mass and the trabecular bone numbers that exsited in each bone[20]. This hypothesis may explain a part of the different response occurring in the femur and lumbar vertebrae in this study.

References

1) Carey, P.M. : EPA Technical Report Sep, EPA-AA-TSS-PA-86-5.pp.1-29, 1987.

2) Garshick, I., Schenker, M.B., Munoz, A., et al. : *Amer. Rev. Respir. Dis.*, **135**, 1242-1248, 1987.

3) Mohr, U., Takenaka, S. and Dungworth, D.L. : Morphologic effects of inhaled diesel engine exhaust on lungs of rats. In Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R.O., Stober, W. (eds.), *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*, 459-462, 1986, Elsevier Science, Amsterdam.

4) McClellan, R. O. : *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **27**, 279-300, 1987.

5) Watanabe, N. and Nakamura, T. : *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 407-411, 1996.

6) Watanabe, N., Ikeda, S., Ohsawa, M., et al. : *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab.*, **46**, 167-172, 1995.

7) Watanabe, N. : *Connective Tissue*, **23** : 15-27, 1992.

8) Woodard, J.C. and Webster, S.S.J. : Skeletal system. In Haschek, W. M. and Rousseaux, C. G. (eds.), *Handbook of toxicologic pathology*, 489-537, 1991,

Academic Press, London.

9) Jee, W.S., Ueno, K., Deng, Y.P., et al. : *Calcif. Tiss. Int.*, **37**, 148-1517, 1985.

10) Ishinishi, N., Kuwabara, N., Nagase, S., et al. : Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty diesel engines on F344 rats. In Ishinishi, N., Koizumi, A., McClellan, R.O., Stober, W. (eds.), *Carcinogenic and mutagenic effects of diesel engine exhaust*, 329-348, 1986, Elsevier Science, Amsterdam.

11) Damoulis, P.D. and Hauschka, P.V. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 924-931, 1994.

12) Mclntyre, L., Zaidi, M., Alam, A.S.M.T. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 2936-2940, 1991.

13) Wantanabe, N., Kato, T., Hamai, A. et al. : *Connective Tissue*, **22**, 71-78, 1991.

14) Wantanabe, N., Kato, T. and Sakurai, K. : *Connective Tissue*, **23**, 1-13, 1992.

15) Watanabe, N., Ikeda, S., Ohsawa, M., et al. : Ann. Rep. Tokyo Met. Res. Lab. 39, 187-192, 1988.

16) Guy, J.A., Shea, M., Peter, C.P. et al. : *Calcif. Tissue Int.*, **53**, 283-288, 19

17) Cameron, N.E. and Cotter, M.A. : *J. Clinical. Invest.*, **96**, 1159-1163, 1995.

18) Kim, H., Koehler, R.C., Hurn, P.D. et al. : *Stroke*, **27**, 114-121, 1996.

19) Johnell, O., Gullberg, B., Allander, A., et al. : *Ostepporosis Int.*, **2** : 298-302, 1992.

20) Wronski, T.J., Dann, L.M. and Horner, S.L. : *Bone*, **10**, 295-301, 1989.

Fig. 1. Tissue section of epiphyseal growth plate of the femur from a 6-month-old rat maintained in clean air (control group). The cartilage cells are arranged in the characteristic longitudinal columns. Blood capillaries are evident between the calcifying cartilage zone and the developing bone trabeculae. Hematoxylin and eosin, (×200).

Fig. 2. Growth plate of the femur from a 6-month-old rat of the total exhaust group. Arrangement of cartilage cells is disrupted because of the irregular invasion of blood capillaries and the presence of degenerated and necrotic areas in the hypertrophic and calcifying zones. Hematoxylin and eosin, (×200).

Fig. 3. Growth plate of the femur from a 12-month-old rat of the control group. Growth plate is closed, the cartilagenous matrix remained with occasional chondrocytes between the osseous plate on both the mataphyseal and epiphyseal sides. Hematoxylin and eosin, (×200).

Fig. 4. Epiphyseal growth plate of the femur from a 12-month-old rat of the filtered exhaust group. The primary trabeculae were considerably shorter and narrower than normal and the marrow cavity extended up to the epiphysial line in some places. Hematoxylin and eosin, (×200).

Fig. 5. Metaphysis from a 6-month-old rat of the control group. Deposition of hemosiderin is not detected in this area. Prussian blue and kernechtrot, (× 200).

Fig. 6. Epiphyseal growth plate from a 6-month-old rat of the total exhaust group. The deposition of hemosiderin is detected on the longitudinal columns and stained blue markedly. Prussian blue and kernechtrot, (×200).

Fig. 7. Metaphysis from a 12-month-old rat of the control group. Deposition of hemosiderin is not detected in this area. Prussian blue and kernechtrot, (×200).

Fig. 8. Epiphyseal growth plate from a 12-month-old rat of the filtered exhaust group. The deposition of hemosiderin is detected on the proliferating and maturing calcifying zones. Prussian blue and kernechtrot, (×200).

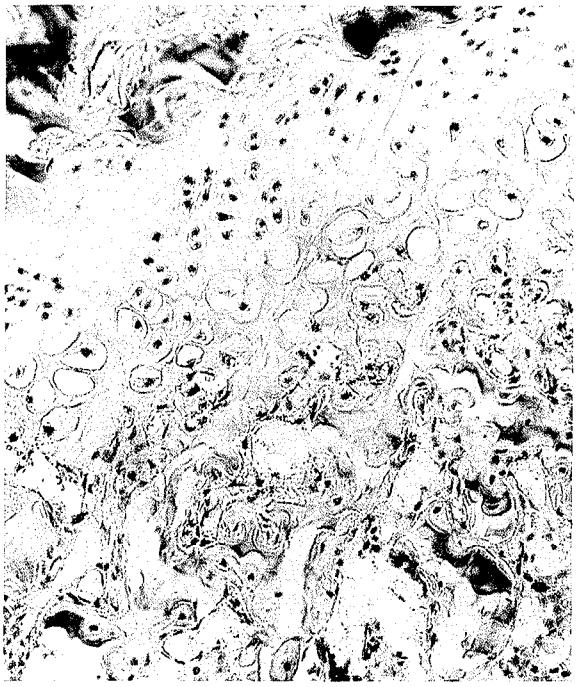


Fig. 9. Epiphyseal growth plate from a 6-month-old rat of the control group is stained with touidin blue. The interstitial matrix of the longitudinal columns shows metachromasia that indicates the localization of glycosaminoglycans and stained purple. Touidin blue (pH 2.5), (×200).

Fig. 10. Epiphysis of femur from a 6-month-old rat of the total exhaust group is stained with touidin blue. The area that shows metachromasia ishardly detected. Compare with Fig. 9. Touidin blue (pH 2.5), (×200).

Fig. 11. Metaphysis from a 12-month-old rat of the control group is stained with touidin blue. The area stained purple shows metachromasia. Touidin blue (pH 2.5), (×200).

Fig. 12. Metaphysis from a 12-month-old rat of the filtered group is stained with touidin blue. The area that shows metachromasia is hardly detected. Compare with fig. 11. Touidin blue (pH 2.5), (×200).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 239-243, 1996

ディーゼル排ガス粒子から抽出した酸性分画タール中の変異原物質の検索

斎藤育江*, 瀬戸博*, 狩野文雄*
土屋悦輝*, 鈴木重任*

Identification of Mutagens in the Acidic Fraction of the Tar Extracted from Diesel Particulate Matter.

IKUE SAITO*, HIROSHI SETO*, FUMIO KANOH*
YOSHITERU TSUCHIYA* and SHIGETOU SUZUKI*

Diesel particulate matter was collected from the deposit in the dilution tunnel conducted to exposure chambers. The benzene-ethanol extract was subjected to a separation into neutral, acidic and basic fractions. For separation of mutagens, the acidic fraction was further subdivided by high performance liquid chromatography (HPLC), then the subfractions were tested for mutagenicity in bacterial reversion assays. The HPLC fractionation and the mutagenicity assay were repeated to obtain higher mutagenic fractions.

The separated mutagenic fractions were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Polycyclic aromatic compounds, including oxygen in the molecules such as carboxylic acids, dicarboxylic acids, phenols and ketons were suggested by searches of mass spectral libraries.

Keywords：ディーゼル排ガス粒子 diesel particulate matter，酸性分画 acidic fraction，変異原物質 mutagen，サルモネラYG1024株 *Salmonella typhimurium* YG1024，高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC)，ガスクロマトグラフ/質量分析計 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

緒　言

近年，ディーゼルエンジンから排出される排ガス粒子が，大気中に含まれる粒子状物質の汚染源として注目されている．この排ガス粒子中には，種々の変異原物質が含まれており[1,2]，肺がん発生との関連が指摘されている[3,4]．

排ガス粒子から有機溶媒によって抽出したタール分は，強い変異原性を示し[5]，その中に含まれる代表的な変異原物質としては，多環芳香族炭化水素やニトロアレーン等があげられる[6,7]．抽出したタール分を液—液分配により，酸性，中性，塩基性の3つに分けた場合，酸性分画及び中性分画が変異原性を示すことは報告されている[8]．そのうち中性分画には，前述の多環芳香族炭化水素やニトロアレーンが含まれているが，酸性分画中の変異原物質については，詳しい情報が得られていない．そこで筆者らは，この酸性分画について変異原物質の分離同定を目的として検討を行い，いくつかの物質が同定(推定)されたので報告する．

実験材料及び方法

1．試料

試薬　ベンゼン，エタノール，エーテル(残留農薬試験用)，硫酸(有害金属測定用)，水酸化ナトリウム(特級)いずれも和光純薬製

試料の調製　未知の変異原物質を同定するには多量のサンプルを要するため，粉塵の採取はディーゼル暴露チャンバー装置の排気ガス希釈トンネルより行った．トンネル内に堆積した粉塵を多量に採取し，45時間減圧乾燥したのち，ベンゼン：エタノール＝3：1の混合溶媒を用いて20分間超音波抽出を行った．抽出液は遠心分離し，ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した．こうし

*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

て得られたタール分は，エーテルに溶解したのち10％硫酸を加えて液－液分配を行い，塩基性分画を分取した．更に1N水酸化ナトリウム溶液を加えて酸性分画を分取し，エーテル層に中性分画が残るようにした．塩基性分画及び酸性分画は中和したのちに，エーテルに転溶し，それぞれを濃縮，乾固後，使用直前まで－20℃で保存した．

2．分取及び分析方法

装置 高速液体クロマトグラフ：ポンプ ConstaMetric ModelⅢ(LDG社製)，UV検出器 UVILOG-5Ⅱ((株)応用分光機器製)，ガスクロマトグラフ/質量分析計：5890 SERIESⅡ/5971A (HP社製)

分取及び分析条件 高速液体クロマトグラフィー(以下，HPLCと略す)の条件1．

カラム：東ソー株式会社製 TSK ODS-120T (55mmi.d×30cm)，移動相：A液：B液＝8：2，A液-酢酸・アセトニトリル-水(2：10：88)，B液：酢酸・アセトニトリル(2：98)，流速：30ml/min，カラム温度：室温，検出器：UV(254nm)

HPLCの条件2．

カラム：東ソー株式会社製 TSK ODS-120T (22mmi.d×30cm)，移動相：30%アセトニトリル，流速：7 ml/min，カラム温度：室温，検出器：UV(254nm)

ガスクロマトグラフ/質量分析計(以下，GC/MSと略す)の条件

カラム：HP社製 Ultra 1 (0.2mm i.d×12.5m，膜厚0.33 μm)，温度：70℃－20℃/min－140℃ 140℃－5℃/min－180℃ 180℃－10℃/min－250℃

3．変異原性試験

試薬 ジメチルスルホキシド(同仁化学，蛍光分析用)，ベンゾ(a)ピレン(和光純薬)，2-ニトロフルオレン(Aldrich)，2-アミノアントラセン(和光純薬)，9-アミノアクリジン(和光純薬)，2-アミノフルオレン(和光純薬)，ラット肝S9フェノバルビタール及び5，6-ベンゾフラボン産生(オリエンタル酵母)，コファクターⅠ(オリエンタル酵母)

Amesテスト[9]

・プレインキュベーション法[10](以下，PI法と略す)

菌株は，*Salmonella typhimurium* TA100株，TA98株，TA97株，TA102株，YG1021株及びYG1024株[11]の6種の菌株を使用し，代謝活化を行うS9 mixは，フェノバルビタール及び5，6-ベンゾフラボン誘導ラット肝臓より調製したものを用いた．試料溶液0.1mlを入れた滅菌試験管にS9 mix 0.5mlまたは，0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)0.5mlを加え，更に10時間培養したサルモネラ菌の培養液0.1mlを加えて，37℃で20分間の前培養(プレインキュベーション)を行った．その後，45℃に保温した軟寒天2 mlを加えて混合し，これを最少グルコース培地上に注いでから一様に広げた．37℃で2日間培養後，プレート上に生育した復帰変異コロニー数(rev./plate)をコロニーカウンターで計測した．試料の濃度は，プレートあたり，各々400 μg，300 μg，200 μg，100 μgの4段階とし，1濃度につきプレート2枚を用いた．得られた復帰変異コロニー数と試料濃度との量－反応曲線から，一次回帰分析により，試料1 mgに対する復帰変異コロニー数を求め，これから自然復帰コロニー数を差し引いて，試料1 mgあたりの真の復帰変異コロニー数を求めた．

・マイクロサスペンジョン法[12](以下，MS法と略す)

この方法は，N.Y.Kadoらによって開発されたAmesテストの改良法で，試料溶液を微量化し，かつ試験菌の濃縮液を用いることにより菌と試料との接触密度を高め，感度の向上を図ったものである．

菌株は，*Salmonella typhimurium* YG1024株を使用し，代謝活性化を行うS9 mixは，フェノバルビタール及び5，6-ベンゾフラボン誘導ラット肝臓より調製したものを用いた．まず，10時間培養したサルモネラ菌の培養液を遠心分離(10,000×g，4℃，10min)し，これを培養菌液の1/10量の0.015Mのリン酸緩衝液(pH7.4)に再懸濁し，10倍濃縮菌液を調製する．試料溶液は，滅菌試験管に2 μl分注し，これにS9 mix 50 μlまたは，0.015Mリン酸緩衝液(pH7.4)50 μlを加え，更に10倍濃縮菌液50 μlを加えて37℃で90分間の前培養を行った．その後，45℃に保温した軟寒天2.5mlを加えて混合し，これを最少グルコース培地上に注いでから一様に広げた．37℃で2日間培養後，プレート上に生育した復帰変異コロニー数をコロニーアナライザーで計測した．

結　果

実験のフローチャートを Fig. 1に示す．

試料の調製

乾燥した粉塵約500 gを用い，抽出と液－液分配操作により2.3 gの酸性分画タールが得られた．これは,抽出により得られた全タール量の約1％に相当する量であった．

Amesテスト

液－液分配前の未分画タール及び液―液分配によって得られた酸性分画タールについて，6種の菌株を用いてPI法によりAmesテストを行った．結果を Table 1 に示す．表からも明らかなように，TA98株の復帰変異コロ

Diesel particulate matter
collected from deposit
↓ in the dilution tunnel
Ultrasonic extraction (20min)
↓ benzene : ethanol = 3 : 1
Fractionation
10% H_2SO_4 layer-Basic fraction
1N NaOH layer-Acidic fraction
↓ Ether layer-Neutral fraction
Concentrate the acidic fraction nuder vacuum
↓
Mutagenicity Test with Salmonella
pre-incubation procedure
↓ with 6 bacterial strains
Fractionation by HPLC
↓
Mutagenicity Test of the HPLC fractions
microsuspension procedure
↓ With *Salmonella typhimurium* YG1024
Analysis by GC/MS

Fig. 1. Determination Procedure of mutagens in the acidic fraction of the tar extracted from diesel particulate matter

Table 1. Mutagenic activities of the acidic components and crudetar extractedfrom diesel particulate matter tested byvarious strains (pre-incubation procedure)

Strain :	TA100	TA98	TA97	TA102	YG1021	YG1024
Acidic Fraction						
−S9MIX	734	385	607	−	1,797	3,868
+S9MIX	480	423	455	−	1,341	5,457
Crude Tar						
−S9MIX	4,057	2,442	2,578	61	12,936	16,003
+S9MIX	4,341	2,835	2,372	502	15,619	23,186

Induced revertants/mg tested material

ニー数に比べてYG株では，いずれも高い値が得られた．TA102株では，酸性分画について変異原性は検出されなかった．また，YG1024株で最も感度よく変異原性を検出できたことから，以降の試験ではYG1024株を用いた．

酸性分画タールについてMS法によるAmesテストを検討したところ，試料1mgあたりの復帰変異コロニー数は，YG1024株S 9 mix(−)で，約71,000rev./mgであった．これを Table 1 のPI法で得られた値3,868rev./mgと比較すると，変異原性検出能は，MS法の方が18倍高感度であることがわかった．したがって以降の試験では，試料の消費を極力抑える必要性から，PI法に代わり少量のサンプルで試験できるMS法を採用した．

HPLCによる分取及びAmesテスト1

酸性分画タール2 gを用いてHPLCの条件1により，ピークごとに分取を行ったところ，36個の分画が得られた．分取のクロマトグラムを Fig. 2 に示す．次に各々の分画から試料溶液2 mlを取り，乾固したのちAmesテストの試料とした．菌株は YG1024株を用い，S 9 mix(−)及びS 9 mix(+)で，MS法により試験を行った．結果を Fig. 3 に示す．S 9 mixの有無で比較すると，S 9 mix(−)の直接変異原の方が高い値を示した．S 9 mix(−)で変異原性を示す主な分画は，NO.21，25，31，35の4つ確認されたが，このうち NO.21の分画について，更に細かい検討を行った．

HPLCによる分取及びAmesテスト2

NO.21の分画について，HPLCの条件2でピークごとに分取を行ったところ，7つの分画が得られた．分取の

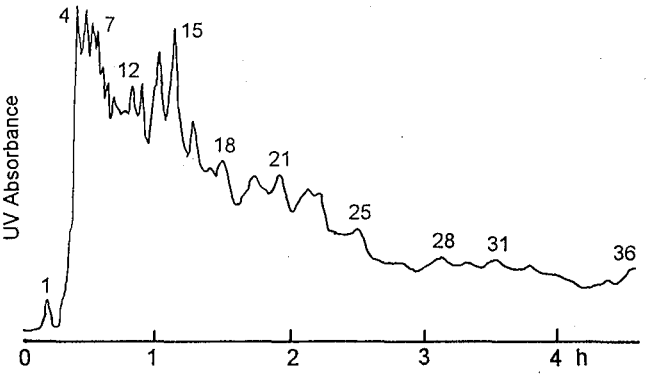


Fig. 2. HPLC fractionation profile of the acidic components extracted from diesel particulate matter
Column : TSK ODS-120T (30cm length, 55mm i. d.)
Mobil phase : A : B = 8 : 2
A-acetic acid : acetonitrile : water = 2 : 10 : 88
B-acetic acid : acetonitrile = 2 : 98
Flow rate : 30ml/min, Column temp.=room temp. Detector : UV (254nm)

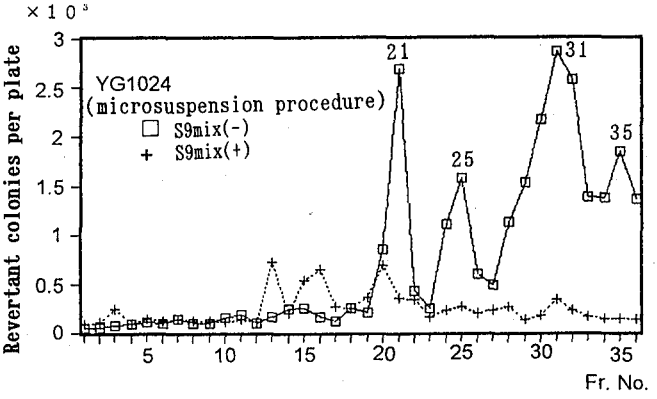


Fig. 3. Mutagenic activities of HPLC fractions obtained from the acidic components of diesel tar

クロマトグラムを Fig. 4 に示す．次にそれぞれの分画から 1 mlの溶液を取り乾固した後に，MS法によりAmesテストを行った．菌株は YG1024を用い，S 9 mix(−)で試験をした結果を Fig. 5 に示す．このうち NO. 4 の分画について，GC/MSによる分析を行った．

GC/MSによる分析

GC/MSのクロマトグラムを Fig. 6 に示す．図のように数多くのピークがみられたため，検出されたピークの一つ一つについて検索を行ったところ，単環から 3 環構造をもつカルボン酸，ジカルボン酸，フェノールおよびケトン類が同定(推定)された．それらの構造式の例を Fig. 7 に示す．単環の物質は安息香酸の構造に，メチル基やヒドロキシル基をもつものが多く見られた．2 環の構造を持つものには，フタラジン，インデン，ナフタレンの構造にそれぞれ 1 つあるいは 2 つのカルボキシル基を持つものが推定された．3 環の物質には，フェネスロール，アンスロン，アントラキノン及びベンゾシノリンの構造に 1 つのカルボキシル基を持つものが推定された．なお，アンスロン，アントラキノンについては，ケト構造の部分がエノールの構造に変換し易く，OH基の形でも存在すると考えられた．

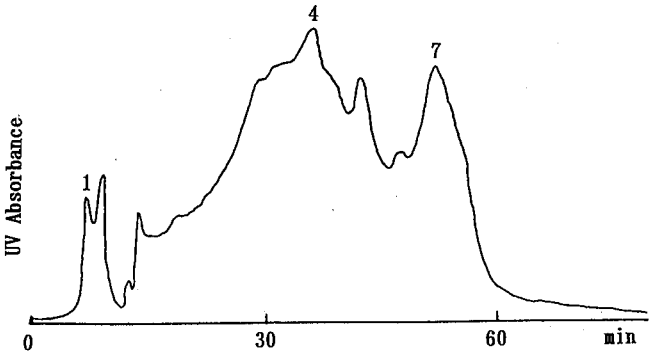


Fig. 4. HPLC fractionation profile of the NO.21 fraction, the acidic components of diesel tar
Column : TSK ODS-120T (30cm length, 22mm i.d.)
Mobil phase : 30% acetonitrile
Flow rate : 7ml/min, Column temp. = room temp.
Detector : UV (254nm)

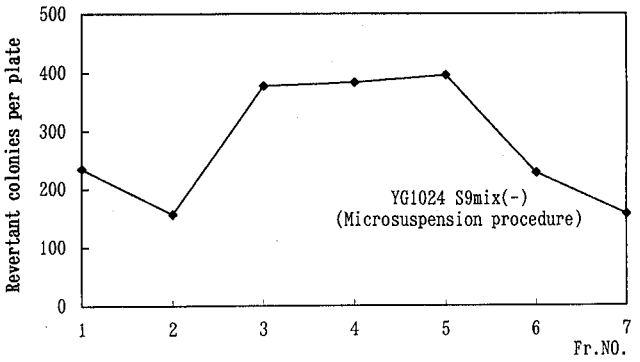


Fig. 5. Mutagenic activities of HPLC fractions obtained from the NO.21 fraction

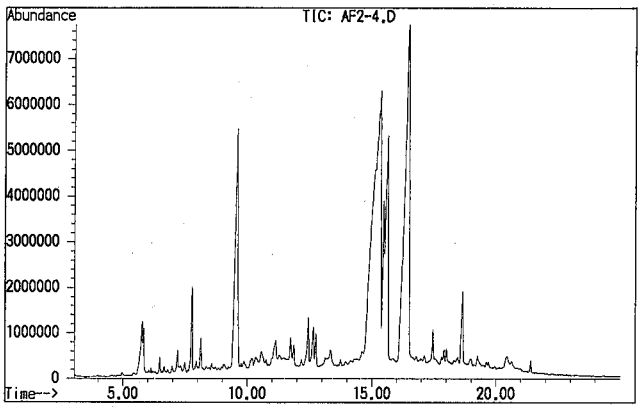


Fig. 6. Mass chromatogram (GC/MS) of the NO.21-4 fraction, the acidic components of diesel tar, obtained by HPLC separation
Column : Ultra 1 (12.5nm length, 0.2mm i.d.)
Temperature : 70℃ -20℃ /min-140℃ ,140℃ -5℃/min-180℃ ,180℃-10℃/min-250℃

考　　察

同定(推定)された物質のAmesテストによる変異原性については，アンスロン[13]及びアントラキノンに変異原性があることが報告されている[14]．また，ナフタレン[15]およびベンゾシノリンのニトロ化合物が変異原性を示すという報告もある[16]．しかし，それ以外の物質については情報が少なく，標準物質の入手が難しいことから，現在のところ，どの物質が酸性分画タールの変異原性に寄与しているかについて解明するまでには至っていない．

ディーゼル排ガス粒子の酸性分画タールについて検討するにあたり，その中に含まれている物質として，脂肪酸，芳香族のカルボン酸，ポリフェノール類を予想していたが，今回行った方法では，脂肪酸類はほとんど検出されなかった．

また，6 種の菌株を用いてAmesテストを行った結果，ニトロ還元酵素およびアセチル転移酵素高産生のYG株で高い値が得られたことから，芳香族ニトロ化合物及び芳香族ヒドロキシルアミンの存在が示唆されたが，ニトロ基あるいはヒドロキシルアミンの構造を持つものは検出されなかった．その原因としては，それらの含量がごく微量であるため GC/MSでは検出できなかったことが考えられた．

今後は，同定(推定)された物質を中心に，それらの類似化合物あるいはニトロ化物について変異原性を調査し，酸性分画タールに含まれる未知の変異原物質を明らかに

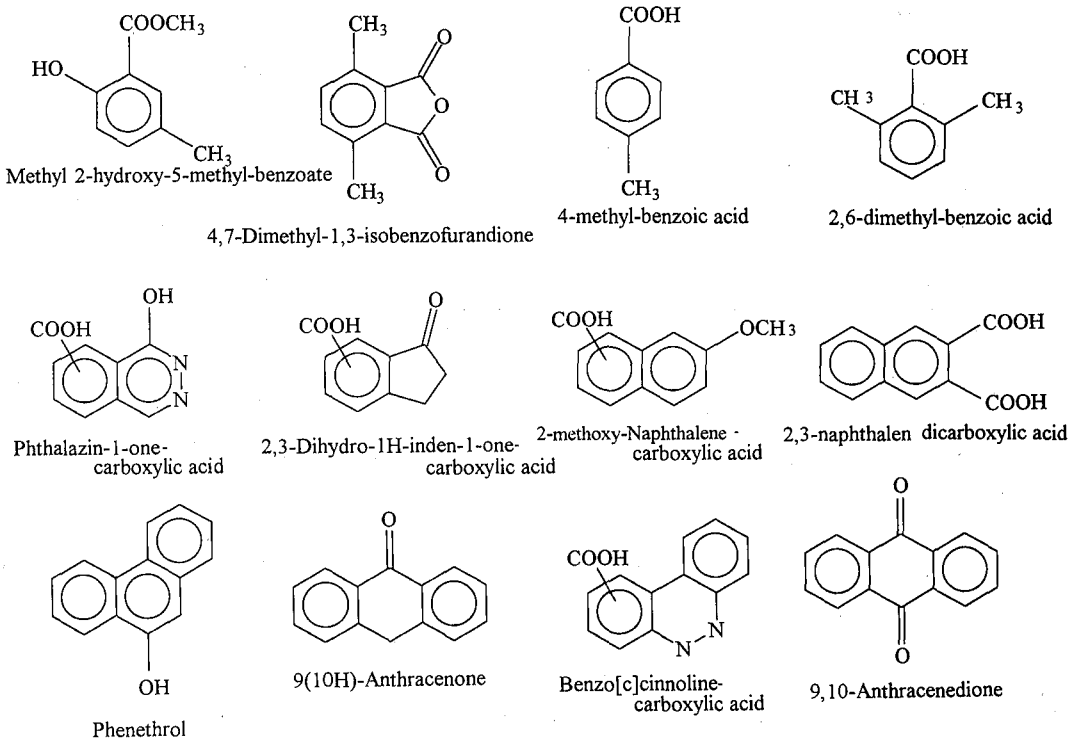


Fig. 7. Suggested polycyclic arpmatic compounds in the acidic fraction of diesel tar

する必要があると考えられる.

ま と め

ディーゼル排ガス粒子から抽出したタール分を液—液分配により，酸性，中性，塩基性に分け，酸性分画について変異原物質の分離同定を目的として研究を行った．変異原物質の分離は，HPLCによる分取と，分取により得られた各分画のAmesテストを繰り返すことにより行った．Amesテストは菌株にYG1024株を用い，N.Y.Kadoらのマイクロサスペンジョン法を採用した．分離した分画についてGC/MSによる分析を行い，単環から3環構造を持つカルボン酸類，ジカルボン酸類，フェノール類およびケトン類が同定(推定)された．

本研究は，衛生局医療福祉部環境公害保健課の大気汚染保健対策事業として実施しているものである．
(この報告の概要は第36回大気環境学会(1995年11月)で発表した.)

文 献

1) Karasek, W.F., Smythe, J.R. and Laub, J.R.：*Journal of Chromatography*, **101**, 125-136, 1974.
2) Dorie, D.L., Bagley, T.S., Leddy, G.D., et al.：*Environ.Sci.Tecnol.*, **21**, 757-765, 1987.
3) Iwai, K., Udagawa, T., Yamagishi, M., et al.：*Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust*, Elsevier Science Publishers, B.V., 349-360, 1986.
4) Heinrich, U.：*Toxcic and Carcinogenic Effects of Solid Particules in the Respiratory Tract*, ILSI press, 57-73, 1994, Washington, DC.
5) Claxton, L.D.：*Environ.Mutagen*, **5**, 609-631, 1983.
6) Schuetzle, D., Rlley, T.L.and Prater, T.J.：*Anal. Chem.*, **54**, 265-271, 1982.
7) Hayakawa, K., Kitamura, R.and Butoh, M., et al.：*Analytical Sciences*, **7**, 573-577, 1991.
8) Crebelli, R., Fuselli, S.and Conti, G.：*Mutation Res.*, **261**, 237-248, 1991.
9) Maron, D.M.and Ames, B.N.：*Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
10) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**, 1178-1189, 1975.
11) Watanabe, M., Ishidate, Jr.M.and Nohmi, T.：*Mutation Res.*, **234**, 337-348, 1990.
12) Kado, N.Y., Langly, D.and Eisenstadt, E.：*Mutation Res.*, **121**, 25-32, 1983.
13) Moller, M., Hagan, I.and Ramdahl, T.：*Mutation Res.*, **157**, 149-156, 1985.
14) Libelman, D.F., Fink, R.C., Schafer, F.L., et al.：*Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 1354-1359.
15) Chung, W.C., Lee, L.H., Ching, Y.W., et al.：*Mutation Res.*, **58**, 11-22, 1978.
16) 大山謙一，遠藤立一，川原 浩，他：東京都環境科学研究所年報，236-237, 1989.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 244-247, 1996

ラットの無麻酔下における換気機能と気道反応性検査の試み —ダブルフロープレチスモグラフ法による解析—

大澤誠喜[*1], 池田眞悟[*1], 渡辺伸枝[*1], 土屋悦輝[*1], 鈴木孝人[*2], 星野誠[*3], 沈在俊[*3], 保坂公夫[*3], 森憲二[*4]

Breath-by-breath Measurement of Ventilatory Valuables and Airway Reactivity in Unanaesthetized Rats by Using Double Flow Plethysmograhy

MASANOBU OHSAWA[*1], SHINGO IKEDA[*1], NOBUE WATANABE[*1], YOSHITERU TSUCHIYA[*1], TAKAHITO SUZUKI[*2], MAKOTO HOSHINO[*3], SHIN ZAISHUN[*3], KIMIO HOSAKA[*3] and KENJI MORI[*4]

Breath-by-breath measurement in un-anaesthetized rats was carried out by double flow plethysmography for ventilatory function test. The animal was placed in the pletysmography which had 2 parts ; a head part (1800ml) and a abdomen part (1800ml); separated from each other and covered with an air-tight film around the rat's neck. The film was composed of two rubber sheets (3 mm and 0.3mm thick) and a silicon sheet (0.03mm). Each cell was equipped with an airflow-meter for the measurement of nasal flow and abdominal movement.

The ventilatory variables were calculated in a breath-by-breath with a computer system with respect to a time component (time of inspiration and expiration), tidal volume and the time-lag between nasal and abdominal flow. We checked the air-tightness of each part with the rubber film of the box. and evaluated the airtightness to be from +10.0 to-10.0cmH_2O. No air-leakage during spontaneous and pressure loaded breathing between +0.1 and -0.1cmH_2O was confirmed.

The ventilatory function test can be conducted with this system using small animals under unanesthetized conditionin breath-by-breath.

Keywords：ボディープレチスモグラフィー body-plethysmography, 非侵襲性検査 noninvasive measurement, 無麻酔下測定 conscious and unaesthetized, ラット rat, 換気測定値 ventilatory valuables, 呼吸抵抗 respiratory resistance

はじめに

我々は，大気汚染物質の生体への影響について，呼吸機能への変化をラットを用いて検討を行ってきた[1,2]．

一定の暴露条件下で経時的に観察するのには，無麻酔下で繰り返して実施できるという点でボディープレチスモグラフ法は優れている．しかし，ラットのような小動物に応用するには，その速い換気数(70-200回)と小さな換気量(1-2 ml)にたいして，良い周波数応答性を有する測定系が必要であること，動物保定用 box 内の温度上昇がないこと，吸入気がよく mixing されて再呼吸がないようにすることなどに注意を払うことが必要である．

以上の点を考慮して，body boxを用い，頚の周りを密閉シールして，頭部(B1)と腹部(B2)とに分けてB1とB2との圧変化(容量変化)とそれぞれの圧変化の位相の

*1 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

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

*2 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

*3 東邦大学医学部第2内科

*4 東邦大学医学部大橋病院呼吸器診断部

時間差を計算して呼吸指標を計算するダブルフロープレチスモグラフィー法[3]についていくつかの検討を加え，考察を試みた．

実験方法

1．小動物用プレチスモグラフ

被検ラットは図1のように合成樹脂性の小 box に固定した．胴体部分の box (容積1800ml) と頭部分の box (容積1800ml) とは接合面にそれぞれゴム板 (厚さ3㎜) が取り付けられパッキングとなっている，さらに，シリコン製の膜板 (厚さ1.3㎜) と1枚のラテックス製膜 (0.03㎜) を挟み込む．ラテックス膜が動物の頚の周りに弾力製を持って密着してシールされる．動物の頭部の動きは自由であるが，体部分は固定用の中仕切箱で固定されているためほとんど動く事が出来ない．頚の圧迫による呼吸の変化はなく，動物が安定するまで数分間観察，確認して実験を開始する．

2．麻酔と操作

動物 (F344/DuCrj フィッシャーラット) をエーテルを用い浅麻酔下で body box に保持する，胴体部の box では尻尾を固定する補助器も装着して緩やかに固定し，麻酔の醒めるのを待ち，呼吸が安定した後測定を開始した．

3．On-Line 解析システム

body box のうち頭部B1と胴体部B2の2ツのboxの圧P1，P2とはともにA/D,D/Aコンバーターを通してパソコンの自動 on-line 測定解析システムとに接続され，ディスプレイによってP1，P2の圧変化による呼吸曲線がモニターできる．

圧変化ΔP1，ΔP2の値と2ツの位相の差とから呼吸数，1回換気量，吸気時間と呼吸抵抗値RLを測定できるダブルプレチスモグラフィー法 (Pennock BE. JAP 1993) に依ってこれらの値を測定した．

4．計算方法

呼吸と換気指標は，吸気時間 Ti と呼気時間 Te と1回換気量 Vt (ml) とが測定データとして入力された後，次の換気指標は演算によって求めた．

呼吸数 f (/min) $=60/(Ti+Te)$

分時換気量MV (ml/min) $=Vt\times f$

呼吸抵抗RL $=[(Ti+Te)/2\pi]\times(P_B-47)\times1.36\times\tan(2\pi\times\Delta t/(Ti+Te)]/Vt$

P_B = 大気圧 (㎜Hg)

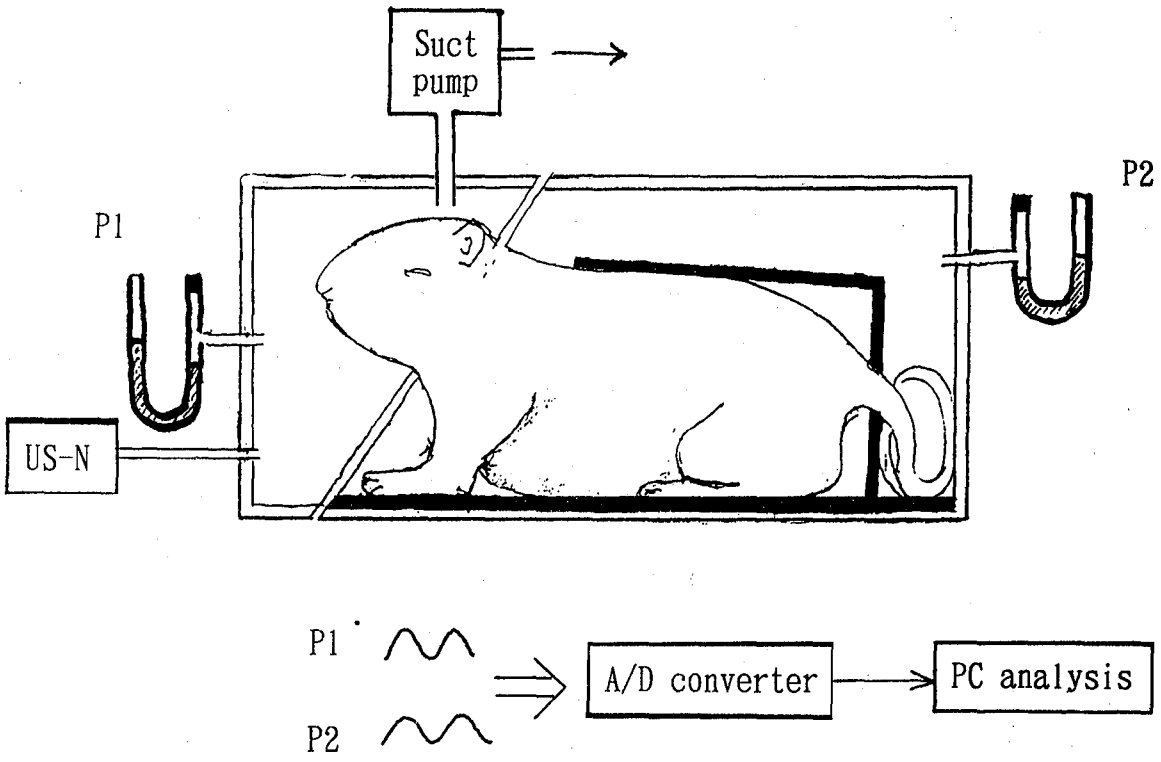


Figure 1. The Body Box and Measurement System for Rat Plethysmography
The box was divided into two parts of the whole body, the head (1800ml) and the abdomen part (1800ml). Each was separated by the flexble film sheets [two sheet of rubber (3.0㎜ and 1.3㎜ thick each)]. The divider sheet has a center hole to tightly fasten the neck rat. The anlmal was placed and fixed by the tail-fastner inside the abdomen part and breathes oxygenated room air by the contiuous flow with air-controller. Each part of the box has transducer (pressure dofference type) for flow-meter.

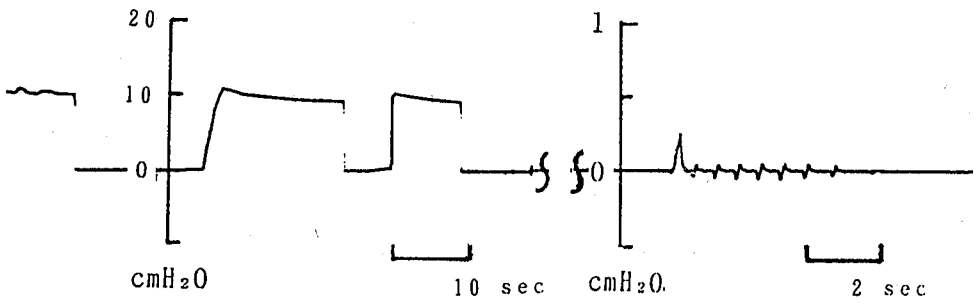
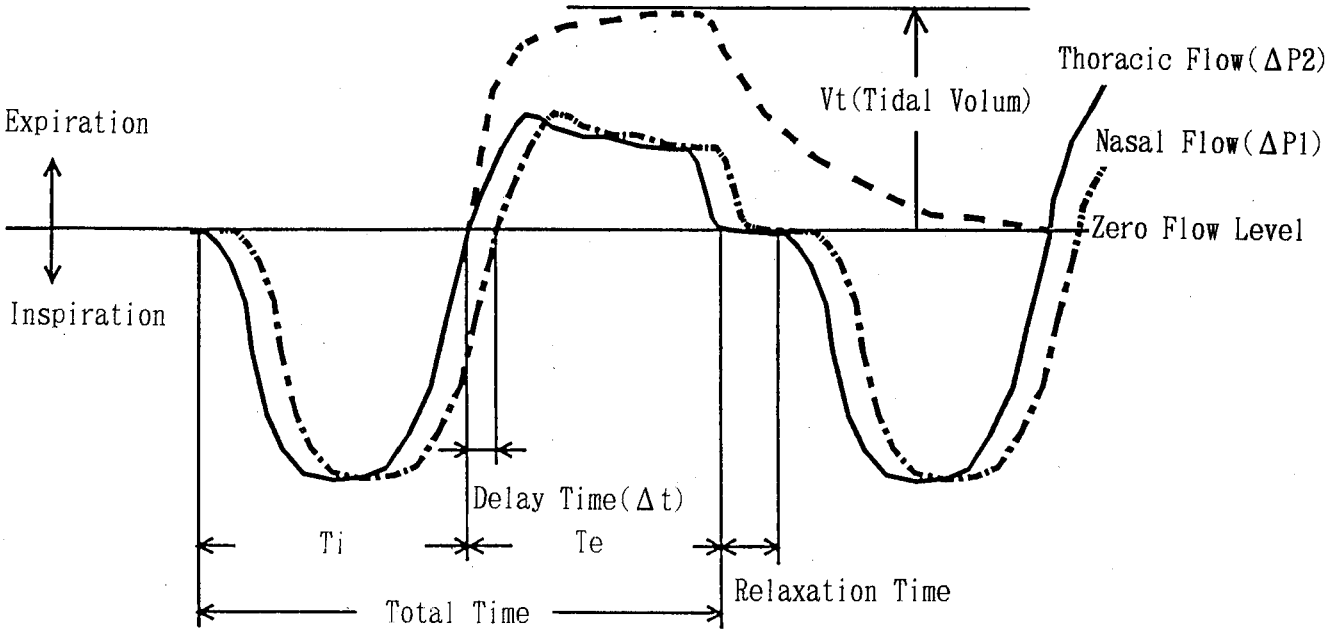


Figure 2. The Record of the Pressure Changesfor Air-Leak Check
The divider film was tested to be tight within the pressure between +10 and −10cm H_2O. The pressure changes during spontaneous breaths of an animal was also showed in the right part of the chart.



$\tan\theta = \omega \cdot R \cdot C$

RL=(Total Time/2π)×(P_B−47mmHg)×1.36×tan($2\pi \times \triangle t$/Total Time)/Vt

$\theta = 2\pi \times \triangle t$/Total Time

$\omega = 2\pi$/Total Time

C=V(P_B−47mmHG)×1.36

P_B=Barometric Pressure(mmHg)

47mmHg=Absolute Humidy of Expired Gas at 37℃

1.36=mmHg→cmH_2O Converting factor

Figure 3. The Calculation of the Tidal Volume, Frequency and Reapiratory Flow Resistance of the Animal
The abdominal flow has time-lag from the nasal flow. Respiratory requency was calculated by the inspiratory time (Ti) and expiratory time (Te), tidal volume by the calibrated height of each flow tracing. The phase-lagtime also gives respiratory resistance (RL) by the calculation.

47=呼気中の飽和水上気圧

Δt=ΔP1 ΔP2との位相差1.36=mmHg→cmH_2O 換算係数

結果および考察

1．装置の条件設定および安定性の検討

動物を容れない状態の body box だけの装置で，頭部と腹部との間仕切を施し，圧変換器で内圧をモニターしながら，シリンジで box 内に圧を加えて圧変化曲線を観察し，10cmH_2Oまでの気密は保たれている事を確認した．

次に，動物を装置内に固定し，呼吸の安定を待ってから box の圧変化を観察した．ラットの呼吸範囲の圧変

化は±0.1cmH_2O以下である事を確認した.

以上の検討と観察により box の空気漏れはある一定の範囲内の圧においては生じないこと，かつ安定した box 内圧変化を示すことを確認した.

2．無麻酔下の呼吸器能検査

一般に動物の呼吸器能を無麻酔下で実施するには多くの困難を伴う．それは，マスクを用いた測定では，頭部に装着したマスクが鼻孔を含む顔面部分を密着して覆うことが困難であるのに加えて，無麻酔下での検査では，動物の安定した定常状態が得られにくいなどの理由からである．しかし，動物は麻酔によって呼吸が抑制されると，換気数や気道収縮反応が低下するのみならず，中枢神経系の抑制とともに迷走神経の活動や反応も抑制されるために，気道反射も低下することが報告されている[4]．また，分泌物の増加や，体温の低下傾向などの生理機能の抑制や，代謝状態の変化なども起こり得る．従って，無麻酔下で呼吸機能検査が実施できれば，種々の負荷(薬物，大気汚染物質やオゾンの暴露など)による呼吸の反応や，気道反応性検査をよりヒトの条件に近づけることができるのでその利点は大きいと考えられる[1]．

3．ボディープレチスモグラフ法

無麻酔下で呼吸機能検査を実施するにはボディープレチスモグラフ法が用いられることが多い．しかし，ラット，マウスのような小動物に対しては，その換気数が70-200と速く，1回の換気量が小さいためにいくつかの工夫を必要とする[1,5]．それは、良い周波数応答性を有する測定系が必要であること，マスクを用いるには密着性が重要であること，box 内の温度が上昇しないこと，吸入気がよく mixing されて再呼吸がないようにすることなどである．このため測定系を改良し，box 内のガスの mixing をよくし，温度上昇，呼気の再呼吸を防ぐため box を含む閉鎖回路中に吸引器を用いて定常流量を循環させる方法を用いた.

この方法は，ボディープレチスモグラフ法の通常の方法による1回換気量と，内蔵タイマーを基準とした呼吸時間との基準測定値の他に，動物の鼻腔での呼吸量と，腹部での呼吸流量とでの位相差時間を利用して，計算によって呼吸抵抗を測るものである[3]．小動物においても定常状態であれば，box 内の圧変動と位相時間差も一定で良い再現性を得ることができた．今後はディーゼル暴露条件下で，同じ動物において経時的な呼吸機能検査を実施する予定である.

文　献

1）佐々木憲二，木下真男，大沢誠喜，他：大気汚染学会誌，**25**，263-269，1990.

2）東京都衛生局編：大気汚染保健対策に係る基礎的実験的研究報告書(平成3年度～6年度)，1996.

3）Pennock BE. and Donahoe M.: *J Appl Physiol.*, **74**, 485-491, 1993,

4）Holtzman MJ., Hahn H-L., Sasaki K.: *J Appl Physiol.*, **53**, 126-133, 1982.

5）横山栄二，荒川はつ子：臨床呼吸生理，**13**，36-42，1981.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 248-251, 1996

ディーゼル排ガス長期暴露ラットの気管支肺胞洗浄液(BALF)の細胞分画変動

大澤誠喜[*1], 池田眞悟[*1], 渡辺伸枝[*1], 土屋悦輝[*1], 鈴木孝人[*2],
星野誠[*3], 沈在俊[*3], 保坂公夫[*3], 藤沢道夫[*4], 森憲二[*5]

Changes of Total Cells and Fractions of Broncho-Alveoar-Lavage-Fluid of Rats Exposed to Diesel Engine Exhausts for 12 and 24 Months

MASANOBU OHSAWA[*1], SHINGO IKEDA[*1], NOBUE WATANABE[*1], YOSHITERU TSUCHIYA[*1], TAKAHITO SUZUKI[*2], MAKOTO HOSHINO[*3], SHI ZAISHUN[*3], KIMIO HOSAKA[*3], MITHIO FUJISAWA[*4] and KENJI MORI[*5]

We examined bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats (Fisher F344/DuCrj) exposed to diesel engine exhaust for 12 and 24 months. The total cell counts of BALF of total exhaust (H) or non-dust (ND) group in 12 months increased to 231.3±85.0 ($\times 10^4$) or 236.3±72.7 ($\times 10^4$) respectively, compared with 179.8±20.7 ($\times 10^4$) in the control (C) group. In 24 months the total cell counts of H or ND increased to 704.0±111.7 ($\times 10^4$) or 458.5±57.2 ($\times 10^4$) respectively, compared with 341.3±15.2 ($\times 10^4$) in the C group. It was due to the increase of alveolar macrophages in both groups of H and ND in 12 and 24 months. Other findings of cell fractions of BALF were increases of lymphocytes on in the H and ND groups in 12 months, and significant increases of neutrophils in the H group in 24 months. These findings indicate some kind of reactions to diesel engine exhaust around the bronchioles and alveolar areas.

Further examination in detail of these cell fractions may provide information on the mechanism of the action of diesel-exhaust-inhalation.

Keywords：ディーゼルエンジン排気ガス diesel engine exhaust, ラット rat, 気管支肺胞洗浄液(BALF) broncho alveolar lavage fluid (BALF), マクロファージ macrophage, 好中球 neutrophil, 感染防御機能 defense mechanism

はじめに

呼吸器疾患において，気道分泌物は喀痰として種々の感染症や肺ガンの診断に利用されるが，特にびまん性の肺疾患や免疫異常による呼吸器疾患では，気道分泌物よりもさらに末梢気道や肺胞領域における遊走細胞成分を分析することが診断の助けになる．そのために，気管支肺胞洗浄液(BALF：broncho alveolar lavage fluid)が採取されてその分析がなされるようになった[1)]．その主要な細胞成分は肺胞マクロファージで，少数のリンパ球がこれに続く．これらの細胞は，肺胞領域や気道の末梢領域を場にした炎症や，感染防御機能の変化などの主要な担い手であることから，その細胞の分析によって直接疾患の原因や病変の性質を知り得ることがその利点である．

我々はディーゼル排気ガス曝露が，ラットにおいてその生理機能変化や形態変化を惹起することのほかに，感染防御機能や免疫機能へどのような作用を有するかを検討するには，そのBALFの分析が有用であると考え，今回は比較的長期曝露したF-344ラットにおけるBALFの

*1 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
*1 The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan
*2 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科
*3 東邦大学医学部第2内科
*4 東京大学医学部第3内科
*5 東邦大学医学部大橋病院呼吸器診断部

細胞数と，その遊走細胞成分の変動を観察して若干の結果を得たので，これについて考察を加えた．

方　法

1．実験動物及び暴露条件

実験動物は，F-344/DuCrjフィッシャーラット雄，4週令(日本チャールズリバーK.K)を使用．対照群(C群)，除塵群(ND群)および全ガス暴露群(H群)の3群に分け，各群4匹とした．動物は，容積1.6㎥のステンレス製暴露チャンバー内で専用のケージにて飼育，飼料(FNM繁殖用，オリエンタル酵母工業K.K)，および水は自由摂取とした．

暴露は，ディーゼル排ガスの発生源として，ディーゼルエンジン(NFAD 6型 排気量309cc ヤンマーディーゼルK.K)，燃料は軽油(JIS 2号相当 日本石油K.K)，潤滑油(C.C級 日本石油K.K)を使用．暴露時間は1日7時間，週5日間で12ヶ月，および24ヶ月の期間である．

排ガスは，H群においては，圧縮空気で希釈しチャンバー内へ直接導入した．ND群はHEPAフィルター(0.05 μ 99.998%カット 日本無機)を用い，粒子状物質を除いたガス体のみを導入，C群はソーダーライムと2種類の活性炭(HC-6，SX ツルミコール)層を通過させ，更にHEPAフィルターを通した室内空気をチャンバー内に導入した．

暴露ガスの濃度測定は，窒素酸化物測定器(8440 Monitor Lob. Co.)および，粉塵濃度計(β線式質量濃度計BAM-102型 柴田科学機器K.K)を用いた．

窒素酸化物濃度および，粉塵濃度の平均値を表1に示した．

Table 1. Experimental Conditions of Diesel Engine Exhausts

	NO(ppm)	NO_2(ppm)	SPM(mg/m³)
C	0.65±0.17	0.02±0.02	0.02under
ND	40.20±8.60	4.70±1.20	0.02under
H	37.70±7.30	5.60±2.30	3.90±0.80

(mean±SD)

Rats were exposed for 7 hours a day in each of 5 days a week for 12 and 24 months. The conditions were 3 groups; H for whole exhausts, ND for non-dust filtered with HEPA-filter and C for control.

2．麻酔と心肺標本の作成

動物の処理は，我々が以前に報告した方法[2]を一部変更した．すなわち，動物をペントバルビタール腹腔内麻酔の後，腹部から胸郭さらに頚部の皮膚への正中切開によって心肺と頚部気管を露出させ，腹部大動脈の切断にて脱血死させた後に，横隔膜から脊柱に沿って血管を切断しつつ頚部気管に至り，最後に鎖骨下の血管を切り離したあと頚部気管を切開して気管に鉗子をかけて心肺を取り出した．

3．BALF採取

気管に金属カニューレを挿入，固定(結紮または左手第ⅠとⅡ指とで保持)し，生理食塩水10ccを静かに注入する．そのまま注射筒ごと心肺を保持した手で静かにほぐすように肺をマッサージをした後，他方の手によって注射筒を引いて注入した生理食塩水(BALF)を回収した．これを同様の手技で3回繰り返し，いずれも同じ容器に回収して氷中に保存した．

4．BALFの分析

採取したBALFは500rpm，5分間遠沈した後，沈殿した細胞成分を脱脂乾燥したスライドグラスに薄く塗抹して得た標本を，ギムザ液にて細胞染色した．その標本を顕微鏡下に順次200個の細胞をカウントして，その形態観察によって種類を算定して記録した．

またBALFの一部を血球計算盤に導入して，臨床検査方法におけるFuchs-Rosental法に依り[3]，細胞を超生体染色して細胞数を算定した．

結　果

1．BALFの外見所見

図1に示したように，12ヶ月暴露のBALF試料の外観は，H群では炭粉粒子のために黒くなり，ND群では乳白色の所見が観察されたが，一部に少数の炭粉が混じていた(底の付近の少数の沈着像)．乳白色の混濁はマクロファージを主体とした細胞成分の存在を示している．上澄の白い泡は肺胞洗浄液の肺胞上皮の表面を覆うリン脂質による肺表面活性剤によるものである．

2．細胞数

BALF中の総細胞数はいずれも100万単位であり，これはBALF中の細胞数として一般に認められている範囲であった．総細胞数は，12ヶ月と24ヶ月のどちらの曝露期間においてもC群に比べてND，H群で増加を示した．

3．細胞分画

対照群に比べてH，ND両群での細胞総数の増加は，マクロファージ(M)の著明な増加によることが示された．さらに，12ヶ月曝露期間ではND群におけるリンパ球(L)の増加がそれに次ぎ，24ヶ月曝露期間ではH群における好中球(N)の増加がリンパ球よりも目立った．

4．動物の体重変化

検査に供された動物の体重は表3の通りで，12ヶ月の

Table 2. Total Cell Counts and the Cell Differentiation (%) of BALF in 3 Groups.

		Total ($\times 10^4$)	Macrophages (%)	Lymphocytes (%)	Neutrocytes (%)	Others (%)
12M	C	179.8±20.7	98.3±0.8	1.8±0.8	0.0	0.0
	ND	236.3±72.7	93.3±4.4	5.3±3.8	0.8±0.8	0.3±0.4
	H	231.3±85.0	97.0±1.2	2.5±1.1	0.5±0.5	0.0
24M	C	341.3±15.2	95.0±1.2	3.0±0.7	1.5±0.5	0.3±0.4
	ND	458.5±57.2	92.0±2.4	6.0±2.1	0.5±0.5	2.0±1.2
	H	704.0±111.7	70.5±2.3	6.0±3.7	23.5±3.4	0.0

(Mean±SD)

The total cell counts markedly increased in H and ND. The major cell parts increased in each group were alveolar macrophages, and and the secondly increased cell were lymphocytes in 12 months and neutrophils in 24 months.

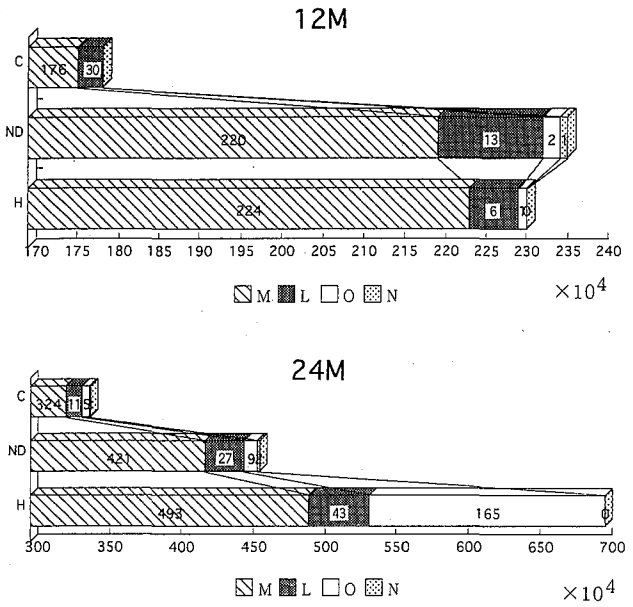


Figure 2. The Changes of Cell Counts of BALF in 3 Groups of Each Exposure Terms
M : Macrophages L : Lymphocytes
N : Neutrocytes O : Others

Table 3. Body Weights of Rats in 3 Groups (g)

	12M	24M
C	353.9±28.6	412.0±19.9
ND	372.5±36.9	414.5±19.2
H	378.1±40.0	427.5±14.0

(Mean±SD)

There was no significance among the mean weight of three groups

平均体重は368.2±10.3，24ヶ月の平均体重は417.8±6.9であり，3群の間に有意差は見られなかった．

考　察

ディーゼル排ガス長期曝露による生体への影響の観察は，病理形態変化に比べて血液所見についてはより少なく，BALFに関して，その細胞数変化や細胞分画の変動に関する報告は見あたらない．しかし18ヶ月以上のディーゼル排ガス曝露ラットの末梢血所見で，血色素や白血球数の増加や顆粒球分葉核球の比率が増加しリンパ球数が減少しているという[4,5]．成績に示すように，排ガスが作用する肺胞領域において血液側に作用した要因が，同様にBALF中の遊走細胞に対してマクロファージの著明な反応性の増加をもたらし，かつ白血球(好中球)に対しても増加(H群の24ヶ月)させたと考えられる．しかし，ND群の12ヶ月においてはリンパ球の増加がみられたが，この点については反応性に増加したと考えられるが，24ヶ月では有意な増加を見なかった事との差異は不明である．

ディーゼル排ガスなどの曝露による影響の中には，肺胞領域での吸収による全身への作用も重要であるが，肺胞や気道上皮細胞の組織固有細胞への影響はより直接的なものであり，さらには末梢気道や肺胞領域における炎症や，免疫防御機能を直接に担う遊走細胞への注目とより詳細な観察，研究が一層重要であると考えられる．

今後さらにこの方面への観察をすすめ，感染防御機能への影響を考察していく予定である．

文　献

1) 窪田達也，神林隆元：呼吸，**4**，1097-1104，1985.
2) 鈴木孝人，寺田伸枝，池田眞悟 他：東京都衛研年報，**35**，279-288，1984.
3) 金井　泉，金井正光：臨床検査法提要(改訂第29版)：1119-1120，1983，金原出版，東京.
4) Brightwell J., Fouillet X., Cassano-Zoppi AL. et al.：*Elsevier*, **5**, 471-48, 1986.
5) 前島一仁，長瀬すみ：ディーゼル排気物質の生体影響，吸入実験分科会編，HERP研究会，319-380，1987，東京.

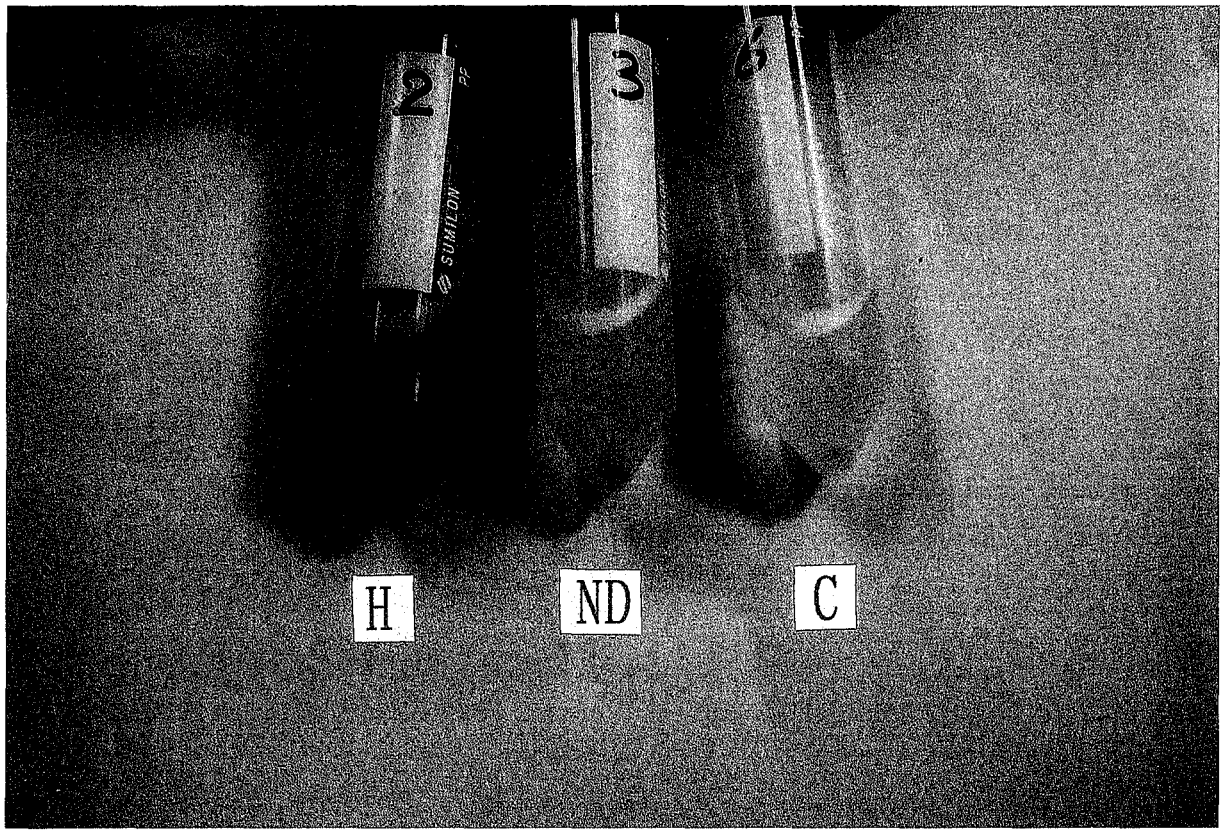


Figure 1. The Naked Appearance of BALF in Each Group
The BALF of ND group was milky white tingled with black dots and the one of H was dark and milky. The BALF of C was thin white.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 253-255, 1996

ヘッドスペースーガスクロマトグラフィー/質量分析法による 2-メチルイソボルオネオール及びジェオスミンの定量

中 川 順 一*, 高 橋 保 雄*, 竹 内 正 博*

Determination of 2-Methylisoborneol and Geosmin by Head Space Gas Chromatography/Mass Spectrometry

JUNICHI NAKAGAWA*, YASUO TAKAHASHI* and MASAHIRO TAKEUCHI*

Keywords：ヘッドスペース head space, ガスクロマトグラフィー/質量分析 gas chromatography/mass spectrometry, 2-メチルイソボルネオール 2-methylisoborneol, ジェオスミン geosmin, カビ臭 odorous compounds

はじめに

水道水源の富栄養化に伴い原水中に異臭味を発生する物質が含まれるようになり，このことが日本だけではなく世界各国の水道で問題となっている．この異臭味のなかで特に問題になっているのがカビ臭であり，日本ではこの原因物質として放線菌や藍藻類の代謝生成物である2-メチルイソボルネオール(2-MIB)とジェオスミンの2物質が確認されている．これら臭気物質による苦情発生の閾値濃度はそれぞれ20～50ng/L及び10～30ng/Lと非常に低濃度であるため，高度浄水処理では対応が可能であるが，在来の浄水処理プロセスでは十分な除去が期待できず，暫定的な除去対策として粉末活性炭の注入などが行われている．

現在，より質の高い水道水を供給するために管理を行うことが必要な項目として13項目(快適水質項目)が定められており，そのなかで2-MIB及びジェオスミンは0.02ng/Lの目標値が設定されている．

これらのかび臭物質については，様々な分析方法が開発されてきた[1-4]が，上水試験方法ではパージトラップーガスクロマトグラフィー／質量分析法(PT-GC/MS法)が採用された．しかし，この方法は，パージラインでかび臭物質の吸着が起こるメモリー現象や熱分解の問題，また塩析することによって起こるラインの目詰まりなどといったトラブルを起こしやすい．

そこで今回，ルーチン分析として行える高感度な分析法としてPT-GC/MS法に代わるヘッドスペースーGC/MS法を検討し，目標値の約1/10まで測定できる方法を確立したので報告する．

実験方法

1．試薬

1）2-MIB(和光純薬社製)：水質試験用　含量98.3%(GC)

2）ジェオスミン(和光純薬社製)：水質試験用　含量98.0%以上(GC)

3）塩化ナトリウム(和光純薬社製)：特級　450℃で8時間加熱処理したものを用いた．

4）メタノール(和光純薬社製)：残留農薬試験用

2．装置

GC/MS：ガスクロマトグラフはヒューレットパッカード社製HP5890シリーズⅡ，質量分析計はHP5972を使用した．

ヘッドスペースサンプラー：ヒューレットパッカード社製HP7673を用いた．なおトランスファーライン，サンプルループ及びサンプリングニードルなどかび臭物質と接触する部分は従来のステンレスにニッケルコーティングしたものでは，金属表面での吸着により低濃度の測定ができないため不活性処理多層コーティングしたパーツに交換した．

3．GC/MS及びヘッドスペースサンプラーの測定条件

表1にGC/MS及びヘッドスペースサンプラーの測定条件を示した．

*東京都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 Helth 24-1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 169 Japan

表1　GC/MS及びヘッドスペースサンプラーの測定条件

GC/MS

カラム：DB-XLB　30m×0.25mmid　膜厚　0.1μm
昇温条件：35℃(1min)-15℃/min-110℃-30℃/min-300℃
カラムヘッド圧：30psi(1min)-99psi/min-9psi→Constant Flow Mode
スプリット比：　3：1
注入口温度：220℃
インターフェイス温度：295℃
測定質量数(m/z)：2-MIB；95,110　ジェオスミン；112，125

ヘッドスペースサンプラー

トランスファーライン温度：220℃
サンプリングループ温度：150℃
サンプルループ：3ml
オーブン温度：80℃

4．標準液

2-MIB及びジェオスミンをそれぞれ10mg秤り取り，メタノール100mlに溶解し0.1mg/ml標準原液を調製した．

5．分析方法

試料15mlを20mlのバイアルビンにとり，塩化ナトリウム5gを加え高温用セプタムで栓をし，振とうすることにより塩化ナトリウムをできる限り溶解させ，ヘッドスペースサンプラーを用いGC/MSにより測定する．

実験結果及び考察

1．ヘッドスペースサンプラー条件の検討

1）トランスファーラインの温度

かび臭物質の測定においてトランスファーラインの温度はかなり重要である．温度が高すぎると2-MIBが熱分解し，低くすぎるとジェオスミンの吸着が起こる．トランスファーラインの温度を150℃，200℃，210℃及び220℃，と変化させた結果，ジェオスミンの面積値は，温度が高くなるほど大きくなり，装置の設定できる最大温度の220℃で最高となった．

2）オーブン温度

かび臭物質の気相への移行は試料温度が高いほど大きいと考えられるのでオーブン温度80℃の条件で検討を行った．しかし，この条件では水分も気相に多く移行するため水の影響がクロマト上問題となった．一つは，水分によるベースラインのドリフトであり，もう一つはピークがわずかにブロードになりテーリングを起こすことである．この現象はppmレベルの分析ではほとんど問題にならないが，かび臭の目標値であるpptレベルの分析では無視できない問題となる．一つの解決策は，初期温度を極力低くすることにより，カラム内から水分を速やかに通過させ，最初に溶出する2-MIBのピークに影響がでないようにすることである．そのため，GCのカラムオーブン温度の初期設定値を30℃から検討し，35℃までなら良好なクロマトグラムが得られることを確認した．

2．塩化ナトリウム添加量の影響

パージトラップ法を用いてのかび臭分析において塩析剤として塩化ナトリウムを添加することにより約4～15倍の感度を得られること，またヘッドスペース法により揮発性有機化合物を分析するときに塩析を行うと高沸点物質で感度が著しく増加することはよく知られている．

そこで，2-MIB及びジェオスミンの10ng/L溶液に塩化ナトリウムを1.5，3.0，4.5，6.0g加えた時のかび臭物質の感度に与える影響を検討し，その結果を図1に示した．カビ臭物質の面積値は塩化ナトリウムの量に比例して大きくなり，過飽和の6.0gの添加のとき，無添加のものと比較して2-MIBで9倍，ジェオスミンで10倍に感度が向上した．

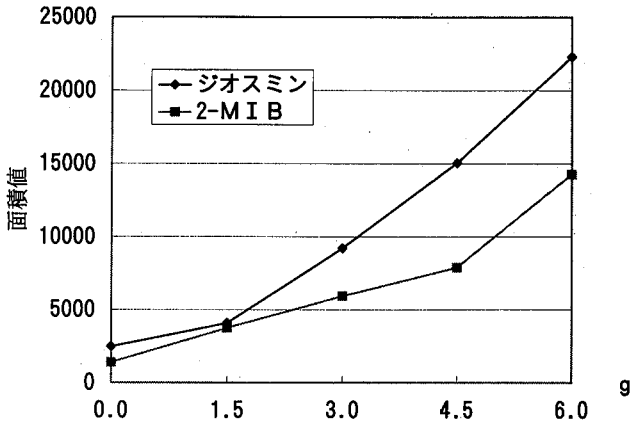


図1．塩化ナトリウム添加量の影響

3．メモリー

かび臭物質の分析の際問題となるのは測定物質のメモリーである．100ng／Lの標準溶液を分析したあとにブランクを測定するとパージトラップ法では1%のメモリーが残り，本法では0.5%であった．

4．検量線

2-MIB及びジェオスミンの標準原液100㎎/Lを段階的にメタノールで希釈し，5，25，50，500 μg /L標準溶液を調製した．この溶液のそれぞれ3 μlを精製水15mlに溶解したもので検量線を作成した．その結果，ジェオスミンは1～100ng/Lの広い濃度範囲で直線性があり，2-MIBでは2～10ng/Lの範囲で傾きが小さいものの100ng/Lまでほぼ直線的であった．

5．再現性

2-MIB及びジェオスミン5 ng/L濃度における5回の繰り返し精度を測定した結果，それぞれの変動係数(CV)は5.7%,4.2%と良好であった．

6．定量下限

2-MIB及びジェオスミンでS/N＝3を定量下限値とするとそれぞれ2 ng/L，0.5ng/Lであった．

7．回収率

水道水に2-MIB及びジェオスミンの添加濃度が各々5 ng/Lになるように調製したものを用いて添加回収試験を行った．2-MIBは残留塩素があると加熱導入される際に分解し減少することが知られている．そのため水道水はアスコルビン酸ナトリウムを加え脱塩素したものを用いて行った．なお回収率は水道水に含まれていた2-MIB及びジェオスミンの量を差し引いて求めた．

その結果2-MIBで100.6%，ジェオスミンで96.1%と良好な結果を得た．

8．実試料の分析

水道水及び河川水の分析した際のクロマトグラムと標準品5 ng/L及びブランクのクロマトグラムを図2に示した．2-MIBは水道水で30ng/L，河川水で10ng/L，ジェオスミンは水道水で1 ng/L，河川水で2 ng/Lであった．

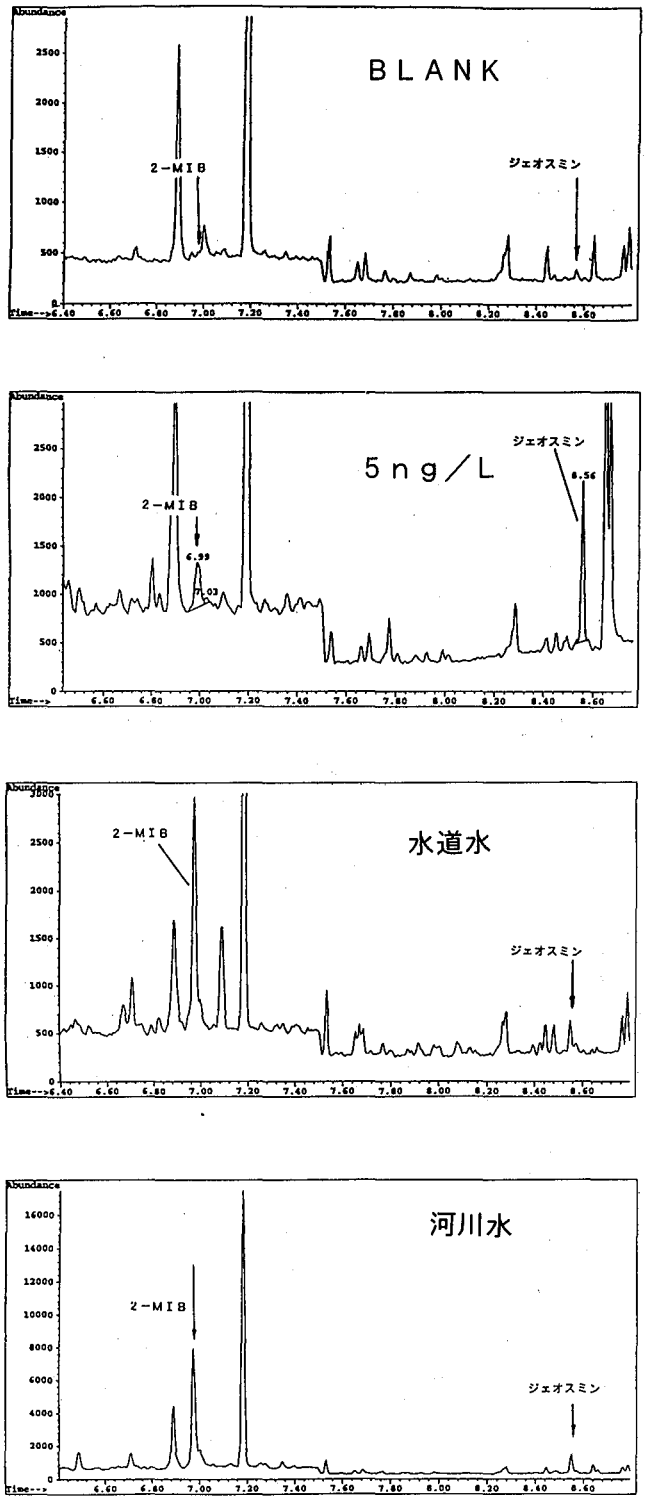


図2．ブランク，標準品(5ng/L)，水道水及び河川水のクロマトグラム

文　献

1）Bellar T.A. and Lichtenberg J. J.：J. Am. Water Works Assoc., **66**, 739, 1974

2）伊藤　保：日本水道協会雑誌，**598**，24，1984

3）梶野勝司，藤本信之，芦谷和芳，他：日本水道協会雑誌，**600**，29，1884

4）古川義郎，久野伯英，吉牟田博子，他：日本水道協会雑誌，**735**，28，1995

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 256-264, 1996

酵素反応による水試料からの大腸菌群の検出

古畑勝則*, 矢野一好*,

Detection of Coliform Group from Water Samples by Enzyme System

KATSUNORI FURUHATA and KAZUYOSHI YANO

Keywords：酵素反応 enzyme reaction，大腸菌群 coliform group，大腸菌 *Escherichia coli*，水試料 water sample

緒　　言

水中の大腸菌群を定量的に試験する方法の一つにデソキシコレート寒天培地(以下DESO培地)による混釈培養法があり，下水道法による放流水の大腸菌群検査をはじめ，種々の検査に用いられている．この方法では「培地に発生した赤～深紅色を呈する定型的集落を計数すること」[1]になっているが，大腸菌群集落を鑑別する基準が明確ではなく，そのうえ実際の水試料では種々形態を示す集落が形成されるため，確実に大腸菌群を計数するには経験が必要とされた．また，著者らが以前に行った大腸菌群検出用培地に関する検討[2]では，DESO培地での大腸菌群の発育は必ずしも良好ではなく，この培地を用いた検査成績では水系の大腸菌群汚染を過小評価しかねないことが懸念された．このため，DESO培地に代わる大腸菌群検出用培地の開発が待たれていた．

1992年，水道法の水質基準が改正され，水道水の大腸菌群試験には従来のLB-BGLB法のほかに，酵素反応を基本原理とした特定酵素基質培地法が新たに導入された[3]．この方法は合成発色基質であるo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(ONPG)によって大腸菌群固有の乳糖分解酵素であるβ-ガラクトシダーゼを検出するもので，従来の乳糖分解性を試験するものとはまったく異なる．本法は操作が簡単で判定が容易な上，特異性が高く，従来法より迅速に試験結果が得られる利点があった[4]．その反面，この特定酵素基質培地は水道水の試験用として開発されたものであるため，下水のように高濃度に細菌汚染されている試料には適さなかった．また，この培地を用いて定量試験を行うには最確数法によらなければならず，菌数が多い水試料では多くの希釈操作が必要であり煩雑であった．

しかし最近になって，酵素反応を応用した混釈培養可能な大腸菌群検出用寒天培地が考案され，国内でも市販されるようになった．そこで，これらの培地を用いて各種水試料から大腸菌群の検出を行い，従来のDESO培地での成績と比較した．

材料及び方法

1．供試培地　試験に使用した培地はDESO培地(日水製薬)と酵素基質を添加したA培地，B培地，C培地の計4種類である．これらの培地組成については表1にまとめた．

2．供試水　大腸菌群を検出するために用いた水試料は，浄化槽放流水5試料，河川水20試料，池水5試料の計30試料である．これらの試料は滅菌済みポリ容器(100ml容)に採取して研究室に持ち帰り，当日のうちに試験に供した．

3．各種水試料からの大腸菌群の検出　供試水30試料について4種類の供試培地により大腸菌群数を測定した．供試水を滅菌生理食塩水で適当な段階まで10倍希釈し，各希釈試料を8枚の滅菌済みシャーレに1mlずつとり，供試培地をそれぞれ2枚ずつに分注して混釈し，平板に固めた．重層して培地が固まってから36℃で24時間培養後，同一希釈段階で各培地ごとに菌数を計数した．

集落を計数後，各平板培地において最も典型的な集落を2個ずつ釣菌して同一種類の平板培地に画線塗抹し，36℃で24時間培養して再分離した．それぞれの平板から独立集落を選択してブレインハートインヒュージョン寒天培地（日水製薬）に移植し，36℃で24時間培養して純粋培養を行った．この培養菌を用いて同定用キットAPI

*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．供試培地の組成

成　　分	DESO培地	A培地	B培地	C培地
ペプトン	10.0*	15.0	3.0	8.0
酵母エキス	−	5.0	−	8.0 (肉エキス混合)
塩化ナトリウム	5.0	5.0	5.0	5.0
リン酸一水素カリウム	2.0	−	−	−
リン酸一水素ナトリウム	−	2.0	2.7	−
リン酸二水素ナトリウム	−	−	2.2	−
クエン酸鉄アンモニウム	2.0	−	−	−
硝酸カリウム	−	1.0	−	−
ピルビン酸ナトリウム	−	1.0	1.0	−
トリプトファン	−	−	1.0	−
乳酸	10.0	−	−	−
ソルビトール	−	−	1.0	−
X-GAL**	−	0.15	−	−
合成発色基質混合物	−	−	0.2	4.8
デソキシコール酸ナトリウム	1.0	−	−	−
ラウリル硫酸ナトリウム	−	0.15	−	−
ターシトール7	−	−	0.15	−
ニュートラルレッド	0.033	−	−	−
寒天	15.0	15.0	10.0	15.0
pH	7.1	7.1	6.8	7.2

*：g/1,000ml
**：5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド

20E（日本ビオメリュー・バイテック）により菌種の同定を行った．本キットの操作及び判定は添付された使用書に従った．また，同時にオキシダーゼテスト（栄研化学）を使用してオキシダーゼ試験を行った．

4．データ解析　得られた菌数の解析は医療向統計分析システム（日本能率協会総合研究所）で行った．各培地別に菌数の平均値と標準偏差を求め，さらに繰り返しのない二元配置分散分析法により培地間の有意差を検討した．

結　　果

1．各供試培地における大腸菌群の集落

DESO培地，A培地，B培地，C培地で混釈培養した大腸菌群の集落を図1から図5のカラー写真に示し，色調を中心とした特徴を比較した．

従来のDESO培地では，大腸菌群が乳糖を分解して生じた酸によってデソキシコール酸が析出し，これが酸性で赤変した中性紅と強く結合したため図1のような赤色集落を形成した．菌種によっては集落全体が混濁したものや集落の周辺が明瞭なものがあった．

A培地では，合成発色基質である5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（X-GAL）と大腸菌群の乳糖分解酵素であるβ-ガラクトシダーゼとの反応により大腸菌群は青色ないし青緑色集落を形成した（図2）．色調は非常に鮮明で，集落のみならずその周辺の培地も着色し，判定が容易であった．

B培地では，β-ガラクトシダーゼが発色基質の6-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（Salmon-GAL）に作用したため，大腸菌群の集落及びその周辺培地はピンク色を呈し，集落全体が著しく混濁して観察された（図3a）．だだし，大腸菌の場合は同時に大腸菌特有のβ-グルクロニダーゼと5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド（X-Glucuronide）との反応が起こったため，集落とその周辺は紫色になり（図3b），図5aのように他の大腸菌群とは容易に鑑別できた．

C培地での発色機構は公表されていないが，大腸菌群

は図4aのように赤色集落を形成し，淡いピンク色は周辺にも拡散した．しかしながら，色調は弱く判定困難な場合もあった．また，大腸菌群の発育は比較的抑制され，形成された集落は他の培地と比較して小さかった．この培地でもB培地同様，大腸菌が発育すると他の大腸菌群の色調とはまったく異なる図4bのような青色集落を形成したため，両者の鑑別は容易であった(図5b)．

2．各種水試料における培地別大腸菌群数

4種類の供試培地を用いて30試料から検出した大腸菌群数を表2に示した．同じ試料でも培地によっては計数可能な範囲の集落数(30個から300個)に該当する希釈倍数が異なったものもあったが，4培地とも同一希釈倍数

表2．水試料からの培地別大腸菌群検出数

試料No.	希釈倍数 ($\times 10^n$)	DESO培地	A培地**	B培地*	C培地
1	4	24[a]	60	31	43
2	1	200	270	260	170
3	4	29	84	69	56
4	0	68	100	59	64
5	0	55	120	74	74
6	0	11	30	22	28
7	0	20	110	80	40
8	0	100	430	260	370
9	1	80	160	88	170
10	1	46	76	97	42
11	2	290	220	110	130
12	2	85	170	180	210
13	2	24	81	210	34
14	2	44	130	140	35
15	1	210	210	300	180
16	1	150	390	360	140
17	1	120	370	420	58
18	2	57	63	57	45
19	0	300	300	190	320
20	0	210	92	89	36
21	1	46	17	57	40
22	0	10	16	55	16
23	2	110	100	490	670
24	1	80	330	220	40
25	0	7	11	4	2
26	0	10	12	4	2
27	1	10	400	120	90
28	0	70	110	27	9
29	0	54	71	27	10
30	1	220	340	240	10
平　均		91.3	162.4	144.7	104.5
標準偏差		83.1	128.4	124.6	138.0

[a]：(CFU/ml)
*：$p < 0.05$で有意差あり
**：$p < 0.01$で有意差あり

での菌数を表示した.

DESO培地, A培地, B培地, C培地で検出された大腸菌群数の平均値はそれぞれ91.3個, 162.4個, 144.7個, 104.5 個であり, A培地での検出菌数が最も多かった. 次いでB培地での菌数が多く, 以下C培地, DESO培地の順であった. また, 各培地での標準偏差は83.1, 128.4, 124.6, 138.0であり, DESO培地での値より他の3培地での値は大きく, 試料ごとの検出菌数のばらつきが大きいことを示した.

酵素基質による3種類の新培地での検出菌数を従来のDESO培地のそれと比較すると, A培地は1%の危険率で, B培地は5%の危険率でそれぞれ有意差が認められた. しかし, C培地では有意差がなかった.

3. 各種水試料からの培地別分離菌種

種々の水試料から分離同定された菌種を各培地ごとの分離率で表3にまとめた.

上段には大腸菌群として代表される4属の菌種について示した. 主な菌種は, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter amnigenus* であった. これらの大腸菌群はC培地で最も効率よく分離されており, 釣菌した菌株の85.4%を占めた. 次いでB培地での分離率が80.0%と高かったが, A培地の分離率はDESO培地の72.7%より低い66.7%であった.

菌種別にみると, どの培地においても*K.pneumoniae* と *K.oxytoca* の分離率が高い共通した傾向が認められた. 特に*K.pneumoniae* はB培地を除き25.0%～31.7%の分離率であり, 各培地での優占菌種であった. また, B培地とC培地では*E.coli* の分離率がそれぞれ31.1%, 29.3%と高率であったのに対し, DESO培地とA培地での分離率は非常に低く9.1%, 2.1%であった.

表3下段には4属の大腸菌群以外の菌種について示した. 主な菌種は *Aeromonas* spp., *Kluyvera* spp., *Rahnella aquatilis*, *Serratia* spp. などであった. これらの菌種はDESO培地でも27.3%から分離されたが, A培地での分離率は33.3%とDESO培地より高率であった. ところが, B培地では20.0%と低い傾向にあり, さらにC培地では14.6%と最も低かった.

DESO培地では *Aeromonas* spp. の分離率が11.4%と最も高く, 次いで *R.aquatilis* が9.1%であった. A培地でも同様に *Aeromonas* spp. が18.8%と高く, 次いで *Kluyvera* spp. が12.5%であった. B培地とC培地では分離株数が少なく顕著な傾向はみられなかったが, C培地では他の培地で分離された *Aeromonas* spp. はまったく分離されなかった.

考　察

近年, 一種類の酵素のみが作用する発色あるいは発光基質を用いた試験方法が開発され, 臨床検査や衛生検査の分野で実用化されている. これらの基質は酵素基質に着色物質または蛍光物質を結合させたものですべて合成

表3. 各種水試料からの培地別分離菌種

分離菌種	DESO培地	A培地	B培地	C培地
Escherichia coli	4*(9.1)	1 (2.1)	14 (31.1)	12 (29.3)
Citrobacter freundii	3 (6.8)	1 (2.1)	2 (4.4)	0 (0)
Klebsiella pneumoniae	13 (29.5)	12 (25.0)	7 (15.6)	13 (31.7)
K. oxytoca	7 (15.9)	10 (20.8)	9 (20.0)	5 (12.2)
Enterobacter cloacae	3 (6.8)	5 (10.4)	1 (2.2)	3 (7.3)
E. agglomerans	1 (2.3)	0 (0)	1 (2.2)	1 (2.4)
E. amnigenus	1 (2.3)	3 (6.3)	2 (4.4)	1 (2.4)
Aeromonas spp.	5 (11.4)	9 (18.8)	3 (6.7)	0 (0)
Buttiauxella agrestis	2 (4.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Hafnia alvei	0 (0)	1 (2.1)	0 (0)	0 (0)
Kluyvera spp.	0 (0)	6 (12.5)	1 (2.2)	4 (9.8)
Leclercia adecarboxylata	0 (0)	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)
Rahnella aquatilis	4 (9.1)	0 (0)	3 (6.7)	0 (0)
Serratia spp.	1 (2.3)	0 (0)	1 (2.2)	2 (4.9)
合　計	44 (100)	48 (100)	45 (100)	41 (100)

*：分離菌株数（%）

物質である．これらの発色基質と大腸菌群が産生する乳糖分解酵素のβ-ガラクトシダーゼが反応するとそれぞれの基質の発色物質が遊離してくるため，その色調で試験結果が判定できる．また，同様に大腸菌特有のβ-グルクロニダーゼが発光基質と反応すると蛍光物質が遊離するため容易に鑑別できる．これが酵素法による大腸菌群と大腸菌の検出原理である．

今回，新しく市販された酵素反応による大腸菌群検出用培地を用いて種々の水試料から大腸菌群の検出を試みたところ，酵素反応によるA培地での平均検出菌数が最も多く，1％の危険率で従来のDESO培地と有意差があった．また，B培地でも5％の危険率で有意差が認められたが，C培地では有意差はなかった．

従来の大腸菌群試験ではグラム陰性の無芽胞桿菌で，乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性あるいは通性嫌気性の細菌を対象としてきたが，今回検討した方法では乳糖分解に関与する一酵素であるβ-ガラクトシダーゼの存在を確認することが検出原理であり，これによって間接的に乳糖分解性を知るのである．しかし，乳糖の分解にはβ-ガラクトシダーゼのみならず細胞膜透過酵素が必要なため，β-ガラクトシダーゼの存在と乳糖分解性は必ずしも一致せず，前者が陽性でも後者は陰性のことがある。また，分類学から定義された大腸菌群には乳糖を速やかに分解しないものや乳糖から酸のみを産生しガスを産生しないものもあり，これらは衛生学上の大腸菌群から除外されていた．こうしたことが従来法と酵素法との大きな相違点である．このため，それぞれの試験法で対象となる菌種が異なることは明らかであり，酵素法の方がより多くの菌種を対象としている[5]．したがって，今回の結果でも酵素法による検出菌数が多かったものと考えられた．

細菌検査において結果の判定が容易であることは重要なポイントである．従来のDESO培地では集落の計数に際して「定型的集落」，「疑わしい集落」などの曖昧な表現で記載された試験法が多く[1,3]，大腸菌群集落の判断基準が明瞭でなかったため以前から問題視されていた[6]．しかし，今回検討した発色酵素基質による各培地で形成された大腸菌群集落は明瞭な色調を呈したため，他の大腸菌群以外の集落とは容易に区別できた。なかでも，A培地の場合は集落の色調が鮮明な青色を呈したために計数が容易であり，このため他の培地より検出菌数が多かったものと考えられた．逆に，C培地では小さな集落が多かったことから検出菌数に有意差がみられなかったものと考えられた．

水試料から分離同定された菌種構成を培地ごとにみると，いわゆる従来の大腸菌群4属に該当した菌株の分離率が最も高かったのはC培地であった．一方，A培地やB培地ではこれらと同時に *Aeromonas* spp.，*Kluyvera* spp.，*R.aquatilis* が高率に分離された．これらの菌種は自然環境の常在菌であり，糞便汚染とは直接関連がない場合も多い．しかし，一部の *Aeromonas* spp. を除き，いずれも乳糖分解菌であり，従来の大腸菌群の範疇に含まれることはいうまでもない．C培地では他の培地より *Aeromonas* spp. の陽性率が低い特徴があり，培地組成によるものと考えられたが具体的には不明であった．

発色酵素基質を添加した培地では乳糖分解性で定義された大腸菌群とともに乳糖非分解の *Aeromonas* spp. や *Serratia* spp. なども同時に検出されることを考慮しなければならない．これは既述したように，酵素法では乳糖を分解しない菌株，したがって従来の大腸菌群でない菌株であってもβ-ガラクトシダーゼを産生する細菌であればすべて検出されるためである．このことは以前に特定酵素基質培地法を公定法に採用する際に行った検討結果でも明らかにされた事実であった[4]．このように，従来の大腸菌群の定義だけでは酵素法による試験結果が合致しないため，上水試験方法では「グラム陰性，無芽胞の桿菌であって，ONPGを分解してo-ニトロフェノールを生じる好気性又は通性嫌気性の菌」を大腸菌群として追加している[3]．

大腸菌群そのものの指標性の問題については以前から度々議論されてきた[7~10]．大腸菌群が糞便汚染の指標細菌として重要な意味を持つことはいうまでもない．しかし，その定義と検査法から直接糞便汚染とは関連のない菌種も検出される事実は周知のとおりである．このため「水質汚濁に関わる環境基準」の超過率が高いことが指摘されており[8]，このような水質試験に大腸菌群を指標とすることを再考する時期にある．本来，糞便汚染の最も確実な指標細菌が大腸菌（*E.coli*）であることについては議論の余地はない．

今回検討したB培地とC培地では，従来と同じ混釈培養操作で大腸菌群と大腸菌を24時間培養後に同時に検出できる最大の利点があった．しかも，酵素反応が検出原理であるため特異性が高く，大腸菌のみを選択的に検出できた．培地別の検出菌種構成をみたときB培地とC培地では大腸菌の検出率が高かったのはこのためである．したがって，これらの培地を利用することは糞便汚染をより確実に評価できるため，非常に有用であると考えられた．

結　語

酵素反応を応用した3種類の大腸菌群用市販培地を用いて種々の水試料から大腸菌群の検出を行ったところ，いずれも従来のDESO培地より良好な成績が得られた．

A培地は鮮明な集落色調が特徴であり，大腸菌群の検出能にも優れ，水の細菌検査に広く利用できるものと考えられた．また，B培地とC培地ではともに大腸菌群と同時に大腸菌を検出することができ，糞便汚染をより正確に判断するために有効に利用できるものと考えられた．

文　献

1）日本工業標準調査会：工場排水試験方法JISK0102, 295-298, 1993, 日本規格協会, 東京.
2）古畑勝則, 松本淳彦：水道協会雑誌, **54**(9), 32-38, 1985.
3）日本水道協会：上水試験方法1993年版, 489-502, 1993, 日本水道協会, 東京.
4）古畑勝則：防菌防黴, **22**(2), 109-116, 1994.
5）寺本忠司：食品と微生物, **9**(4), 211-216, 1993.
6）浦久保五郎, 秋本義雄：衛生化学, **31**(1), 42-46, 1985.
7）小島貞男, 萩原光子：モダンメディア, **16**, 240-251, 1970.
8）上野英世：用水と廃水, **19**(5), 555-565, 1977.
9）上野英世：月刊下水道, **4**(5), 65-69, 1981.
10）金政泰弘：防菌防黴, **21**(3), 145-153, 1993.

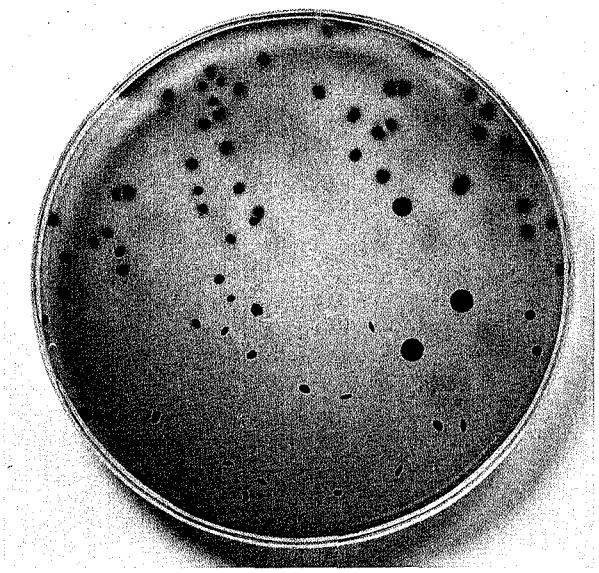


図１．DESO培地での大腸菌群集落

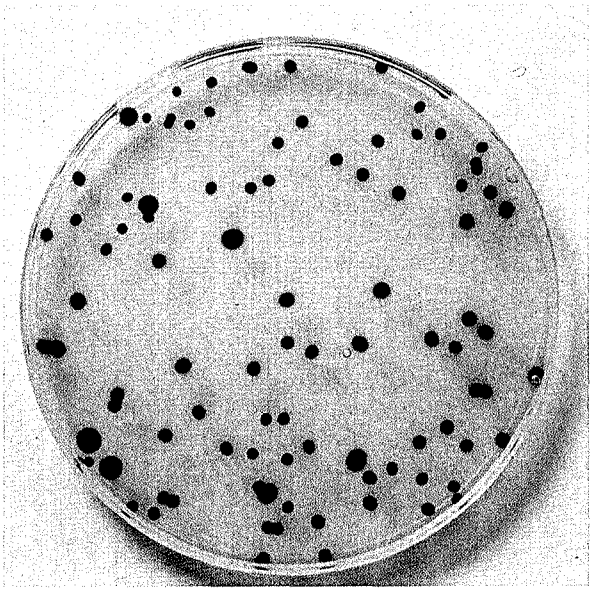
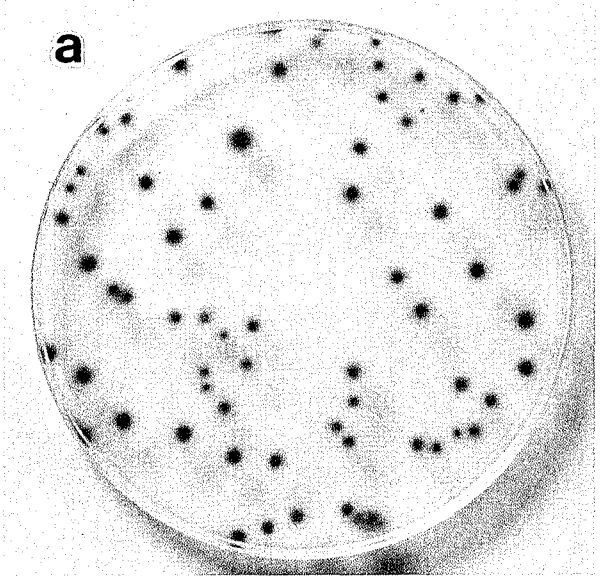


図２．A培地での大腸菌群集落



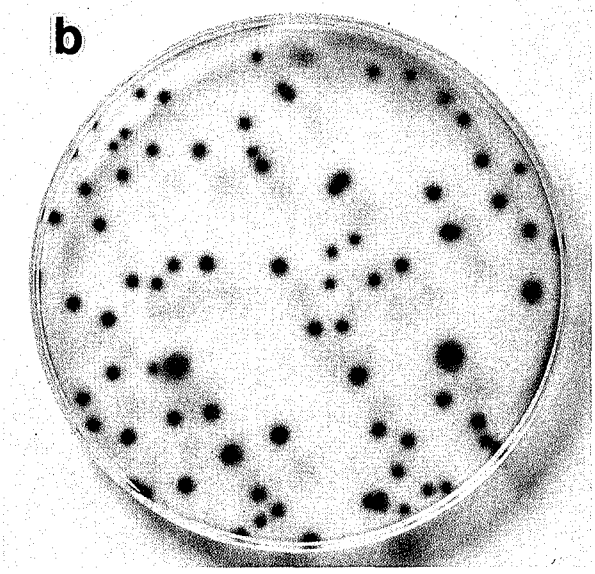


図３．B培地での集落
a：大腸菌群　　b：大腸菌

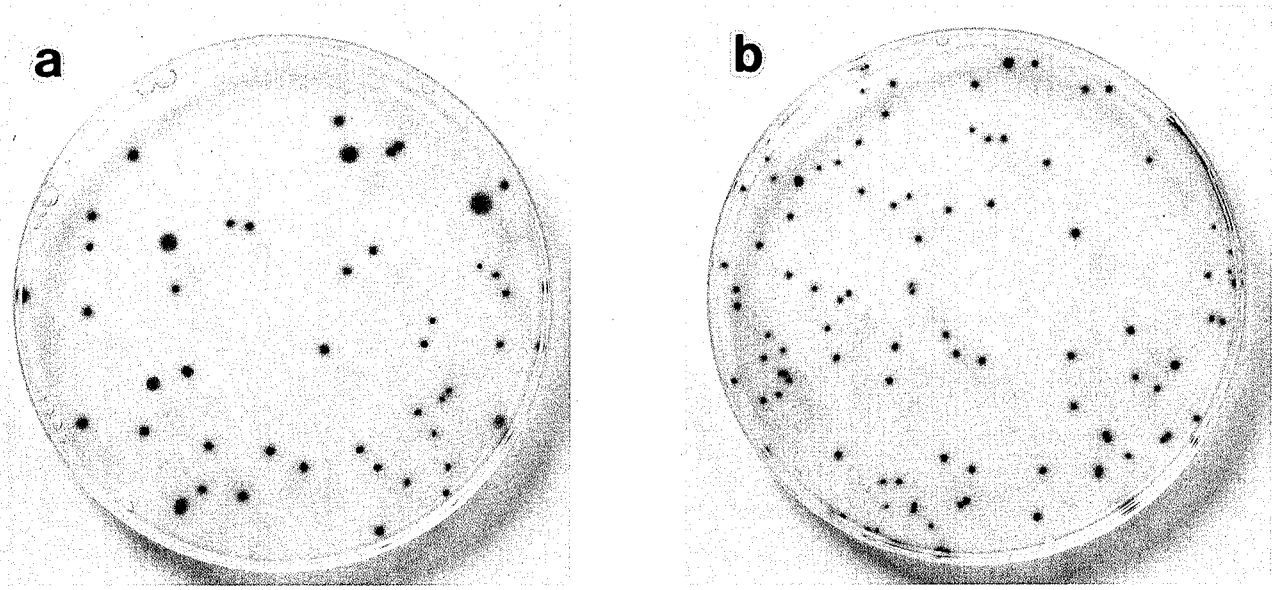


図４．Ｃ培地での集落
ａ：大腸菌群　　ｂ：大腸菌

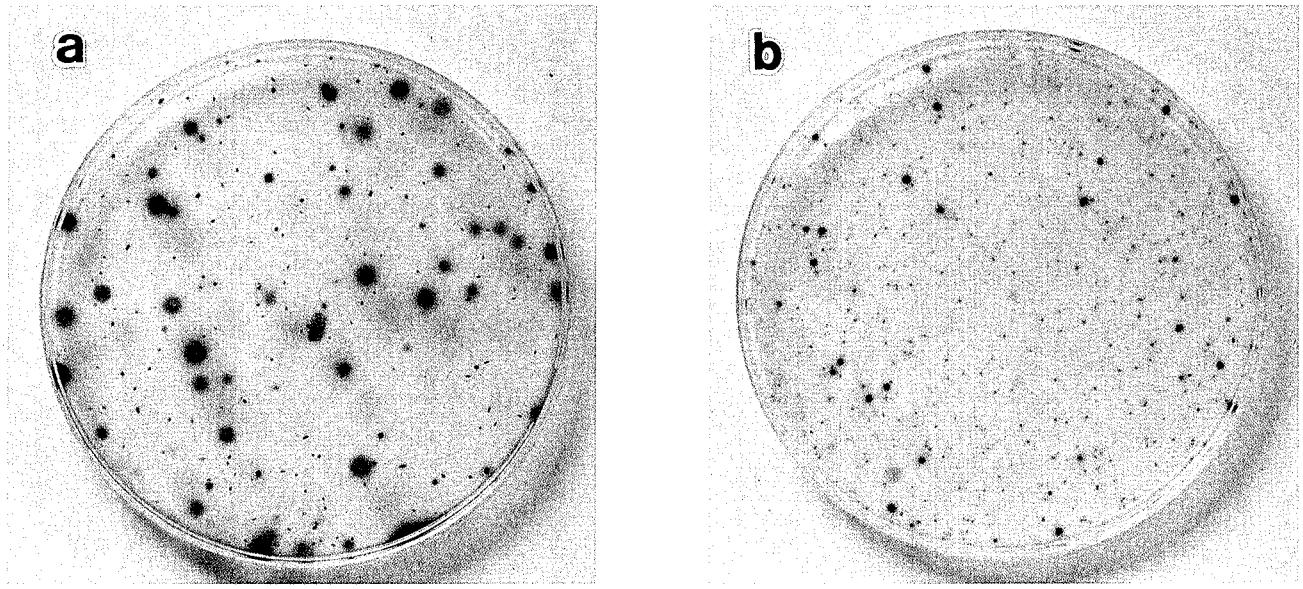


図５．河川水の培養所見
ａ：Ｂ培地　赤色集落；大腸菌群　　ｂ：Ｃ培地　赤色集落；大腸菌群
紫色集落；大腸菌　　青色集落；大腸菌

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 265-269, 1996

首都圏で採取した環境水からのウイルス分離状況 (1985—1995年)

矢野一好*, 古畑勝則*, 吉田靖子**,
林志直***, 新開敬行**

Detection of Enteroviruses from Environmental Water Samples in Tokyo Metropolitan Area (1985-1995)

KAZUYOSHI YANO*, KATSUNORI FURUHATA*, YASUKO YOSHIDA**,
YUKINAO HAYASHI*** and TAKAYUKI SHINKAI**

In order to obtain the basic information of viruses in the environment, detection of enterovirus from environmental water has been conducted during the ten years from 1985 to 1995. Activated sludge and secondary effluent samples were collected monthly at four wastewater treatment plants. Samples were centrifuged and the supernatant was applied to the virus assay using four cell lines. Reclaimed wastewater, river water and swimming pool water samples were collected and concentrated using fibriforme cellulose and organic coagulant.

The detection rate of enterovirus from 136 activated sludge samples was 58.1%, while that from 105 secondary effluent samples was only 2.9%. The reclaimed wastewater treated by sand filtration (72 samples) showed a high detection rate of enterovirus positive (33.3%), but samples treated by ozonization, microfiltration, ulterfiltration and reverse osmosis (total 96 samples) did not reveal enterovirus positive. The high detection rate of enterovirus positive (54.5%, 66 samples) was obtained from concentrated river water. Four% of swimming pool water (25 samples) was enterovirus positive.

Keywords：環境水 ambient water, エンテロウイルス enterovirus, 活性汚泥 activated sludge, 二次処理水 secondary effluent, 雑用水 reclaimed wastewater, 砂ろ過 sand filtration, 精密ろ過 microfiltration, 限外ろ過 ultrafiltration, 逆浸透 reverse osmosis

緒　言

諸外国においては，ヒトの生活環境を取り巻く様々な水系，すなわち，下水，下水処理水，雑用水，河川水，湖沼水，地下水，水泳プール水及び飲料水等のウイルス汚染調査が精力的に行われている[1—3]．しかし，我が国におけるこの種の調査は，非常に遅れており，下水と河川水について数か所の研究機関から報告されているにすぎない[4—6]．

著者らは，首都圏における環境水のウイルス汚染実態を把握する目的で，1985年から1995年の10年間にわたって，活性汚泥，二次処理下水，雑用水，河川水及び水泳プール水を対象としたウイルス分離試験を行った．

材料と方法

1．試料水

1）活性汚泥と二次処理下水：首都圏にある4か所の住宅地域専用の下水処理場を定点として，1985年から1988年の間，毎月定期的に採取した．試料の総数は，活性汚泥136件，二次処理水105件である．

2）雑用水：首都圏で実際に稼働している数か所の雑用水道施設において，1985年から1995年にかけて244件

*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微生物部ウイルス研究科
***東京都立衛生研究所多摩支所

採取した．調査定点は設けられなかったので，詳細な処理条件，施設の規模，原水の種類及び調査時期等は，一定していないが，処理過程別の概略内訳は，砂ろ過水72件，砂ろ過処理した修景用水29件，活性炭処理水16件，オゾン処理水62件，精密ろ過水(MF) 9件，限外ろ過水(UF)18件，逆浸透水(RO) 7件及び処理方法不明37件である．

3）河川水：首都圏を流れる4河川で1985年から1995年にかけて66件採取した．

4）水泳プール水：首都圏の営業用プールを中心に1985年から1995年にかけて42件採取した．

2．試料水の前処理

1）活性汚泥及び二次処理水：試料水中のウイルス量が多いと思われたので，10mlのサンプルを凍結融解したのち，3,000rpm，15分間遠心分離した上清に抗生物質混合液を1 ml添加したのみで，ウイルスの濃縮処理は行わなかった[7]．

2）その他の環境水：試料水中に混入しているウイルス量が少ないと思われるので，20～40Lの試料水について，著者らが考案し，既に「上水試験方法」[8]及び「衛生試験法」[9]に採用された「セルロース吸着・凝集法」にしたがって濃縮処理を行った．すなわち，ソフトタイプのポリエチレン製容器(20L)に試料水を採取後，ウイルス吸着剤として活性化したDEAE-セルロースを添加し，次いで有機凝集剤を添加してセルロースをフロック状態にし，スイケンバッグ(ケアメデイックス社)に回収したセルロースからビーフエキストラクト5 mlを用いてウイルスを誘出させた[8,9]．

3．ウイルス分離試験

培養細胞4種類(HeLa，Hep2，BGM，RD-18S)を使用した細胞培養法によってウイルス分離試験を行った[10]．濃縮物の接種量は，細胞1種類につき0.4ml(24穴プレート2穴使用)とした．試料水の原水量に換算すると，ウイルス濃縮処理をしていない活性汚泥と二次処理水は，約0.4ml，ウイルス濃縮処理をした環境水は，約1.6L試験に供したことになる．濃縮物を接種した培養細胞は，細胞変性効果を指標にして，1週間単位で6代まで継代培養した．初代で認められる細胞変性効果は，濃縮物由来の細胞毒性成分によって細胞変性が起こる場合が多いため，2代目以降で細胞変性効果が認められたものをウイルス分離陽性と判定した．分離したウイルスは，抗血清を用いた中和試験によって血清型別の同定を行った[10]．

結果と考察

1．活性汚泥及び二次処理下水からのウイルス分離状況

調査定点とした住宅地域専用の下水処理場で採取した活性汚泥及び二次処理下水からのウイルス分離状況を定点ごとに整理してTable 1，2及びFig. 1に示した．活性汚泥からのウイルス分離率は，調査定点によって若干の差が認められ，47%から75%の範囲にあった．平均検出率は，58%であった．二次処理下水からのウイルス分離率は，ウイルス濃縮処理をしなかったことも影響して，わずか3株，3%であった．

両試料水からのウイルス分離率を既に発表した都市下水からの分離率[11]と対比させると，かなり大きな差が認められた．すなわち，都市下水からのウイルス分離率は，活性汚泥で約80%，二次処理下水で約10%を示して

Table 1. Viruses Isolated from Activated Sludges

Virus types		Plant Location A	B	C	D	Total
Polio	1	1	1	2	3	7
	2	3	3	6	6	18
	3				1	1
Cox. B	2	1	1			2
	3		5	5	4	14
	4	9	2	6	10	27
	5	1		2	1	4
Adeno	1	2		1		3
	2		1	4	3	8
	4		1			1
	5	2	1	2		5
No. of Strains		19	15	28	28	90
No. of Positive		15	15	24	25	79
No. of Samples		32	29	32	43	136
Positive %		47	52	75	58	58

Table 2. Viruses Isolated from Secondary Effluent

Virus Types		Plant Location A	B	C	D	Total
Polio	2			1		1
Cox.B	3	1		1		2
No.of Strains		1	0	2	0	3
No.of Positive		1	0	2	0	3
No.of Samples		32	29	32	12	105
Positive %		3	0	6	0	3

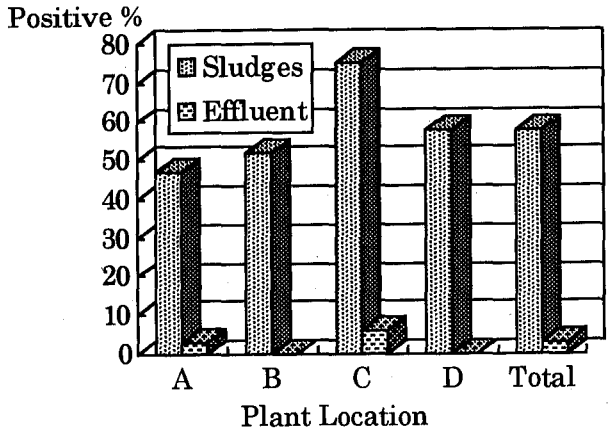


Fig. 1. Viruses Isolated from Swage

いた[11]．この原因の一つは，住宅地域の下水汚泥のウイルス吸着能が工場排水も流入する都市下水の汚泥に比較して優れていたと考えられる．つまり，住宅地域の流入下水は家庭排水が中心であるため，ウイルス吸着能の安定した微生物叢から形成された活性汚泥であることが考えられる．もう一つの原因としては，下水に流入してくるウイルス量そのものが少ないことが考えられる．我が国における腸管系ウイルス感染者の年齢変動をみると，3才以下の乳幼児では約20%と高率であるのに比較して，3才以上では数%以下に低下している[12]．したがって，調査定点とした住宅地域は3才以下の比率が小さい人口構成であったと推測される．

2．雑用水からのウイルス分離状況

二次処理下水を更に高度処理して水洗便所用水等に再利用している雑用水からのウイルス分離率を，処理過程ごとに整理してTable 3及びFig. 2に示した．砂ろ過処理だけの雑用水からは，33%という高いウイルス分離率

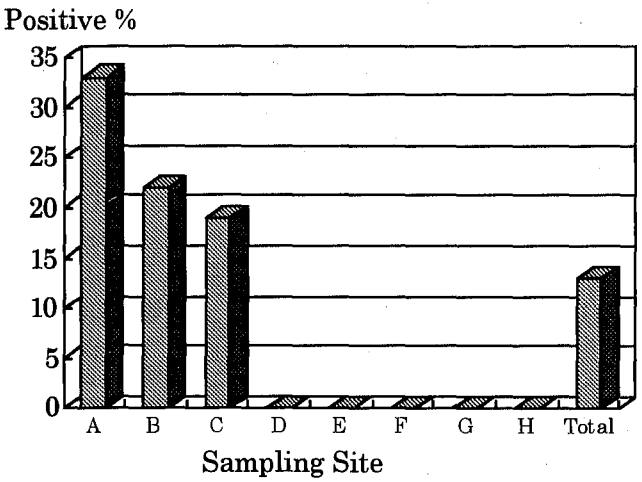


Fig. 2. Viruses Isolated from Reclaimed Wastewater
A-H：See Table 3, Footnote

Table 3. Viruses Isolated from Reclaimed Wastewater

Virus Types		Sampling site A	B	C	D	E	F	G	H	Total
Polio	1	1								1
	2	5	3	1						9
Cox.B	2	3								3
	3	3		1						4
	4	4								4
	5	3		1						4
Adeno	2	5								5
	4	2								2
ECHO	6	1								1
	7	1								1
	9		2							2
	18	2								2
	24	1								1
	30	3								3
No. of Strains		34	5	3	0	0	0	0	0	42
No. of Positive		24	5	3	0	0	0	0	0	32
No. of Tested		72	23	16	62	9	18	7	37	244
Positive %		33	22	19	0	0	0	0	0	13

A:Sand Filtration B:Ornamental Use C:Activated Carbon
D:Ozonation E:Microfiltration F:Ultrafiltration
G:Reverse Osmosis H:Unkown

を示した．砂ろ過して塩素処理したのち，人工河川や噴水等に再利用する修景用水でも，22%と高い分離率を示した．高度処理を施すにしたがって，ウイルス検出率は低下し，活性炭ろ過水で19%，オゾン処理，MF，UF及びROろ過水からは，まったくウイルスは検出されなかった．

以上の結果から，水中ウイルスからみた雑用水の安全性を確保するには，砂ろ過処理のみでは不十分であり，オゾン処理及び膜ろ過処理が，効果的であることがわかった．

3．河川水からのウイルス分離状況

首都圏を流れる4本の河川を調査定点として採取した河川水からのウイルス検出率を，Table 4及びFig. 3に示した．ウイルス検出率は，平均55%を示しており，首都圏の河川には，ウイルスが生残したままの排水がかなり多く流入している可能性が示唆された．

4．水泳プール水からのウイルス分離状況

調査例数は少ないが，首都圏で採取した水泳プール水からのウイルス検出率をTable 5及びFig. 4に示した．日本においては，プール本体にウイルス等の病原体を持ち込まないための対策として，水泳の前に高濃度の塩素(50～100mg/L)を添加した水槽を通過する設備(腰洗槽)

Table 4. Viruses Isolated from River Water

Virus Types		Sampling Location A	B	C	D	Total
Polio	2	1	5	1	2	9
Cox.B	2	4				4
	3	8	3	1	1	13
	4		1	2		3
Adeno	1	1				1
	2	2				2
	5	1				1
ECHO	4	1				1
	18	1	1			2
	30	3				3
Reo	2		1	1		2
No. of Strains		22	11	5	3	41
No. of Positive		18	11	4	3	36
No. of Tested		30	25	7	4	66
Positive %		60	44	57	75	55

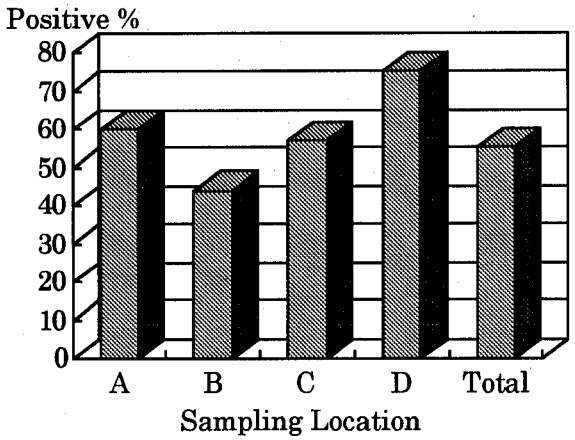


Fig. 3. Viruses Isolated from River Water

Table 5. Viruses Isolated from Swimming Pool

Virus Types		Sampling Location A	B	Total
Polio	1	1	1	2
Cox.B	4		1	1
No. of Strains		1	2	3
No. of Positive		1	2	3
No. of Tested		25	17	42
Positive %		4	12	7

A：Swimming Pool
B：High Concentration Chlorine Tub

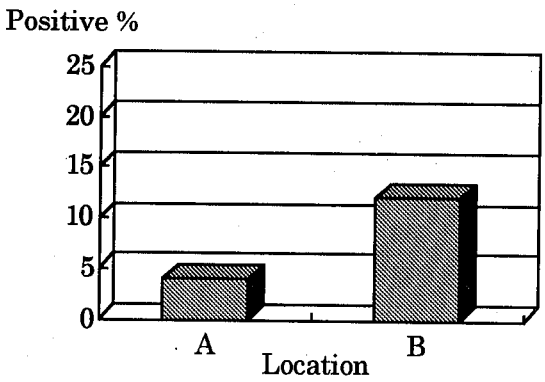


Fig. 4. Viruses Isolated from Swimming Pool
A, B：See Table 5, Footnote

が設けられていたが，この水槽からもウイルスは検出された．

結　論

首都圏における環境水の腸管系ウイルス汚染実態を把握する目的で，1985年から1995年にかけて下水汚泥136件，二次処理下水105件，雑用水244件，河川水66件及び水泳プール水42件について，培養細胞法によるウイルス分離試験を行い以下の結果を得た．

ウイルス分離率の平均値は，試料水約0.4mlを検体とした活性汚泥で58%，二次処理水で3%であった．ウイルス濃縮処理をして原水換算で約1.6Lを試験した雑用水では13%，河川水で55%，水泳プール水で4%を示した．

現行の試験方法では，水中に混入しているウイルスを定量することが困難であるので，今回の調査で検出されたウイルスが直ちにヒトに対して健康被害をもたらすかどうかについては断定できない．更に調査を継続することによって，環境水のウイルス汚染実態を詳細に究明したのちに結論を出す必要があると考える．

(本研究の概要は，国際水環境学会主催水中健康関連微生物に関するシンポジウム1996スペインで発表した．)

文　献

1) Sanchez, P. S., Agudo, E. G., Castro, F. G. and Alves, M. N.：*Water Sci. Technol.*, **18**, 61-72, 1986.
2) Toranzos, G. A., Gerba, C. P. and Hanssen, H.：*Water Sic. Technol.*, **18**, 109-114, 1986.
3) Bitton, G.,Farrah, S. R., Montague, C. L. and Akin, E. W.：*Water Sci. Technol.*, **20**, 216-222, 1986.
4) 谷　直人，井上凡己，吉田　哲，他：公衆衛生，**50**, 345-348, 1986.
5) 梨田　稔，下原悦子，杉嶋伸禄，他：水処理技術，**29**, 697-701, 1988.

6）日本水道協会：水中ウイルスの解説，37-46，1986，東京.
7）矢野一好，吉田靖子，新開敬行，他：臨床とウイルス，**21**，17-21，1993.
8）厚生省監修：上水試験方法，549-551，1993，日本水道協会，東京.
9）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1833-1841，1995，金原出版，東京.
10）厚生省監修：ウイルス・リケッチア検査，265-275，日本公衆衛生協会，東京.
11）矢野一好，林志直，薮内清，田口文章：用水と廃水，**27**，489-495，1985.
12）薮内　清，矢野一好，柴田タツ美，他：東京衛研年報，**31**-1，36-39，1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 270-273, 1996

平成７年度多摩地域飲用水の水質検査

五十嵐　剛*, 矢口久美子*, 鈴木俊也*, 稲葉美佐子*,
近藤治美*, 潮田弘*, 新井輝義*, 神眞知子*,
楠くみ子*, 石上武*, 山田澄夫*, 藤井孝*,
田村行弘*

Evaluation of Drinking-Water Quality in Tama District, Tokyo
- April 1995～March 1996 -

TSUYOSHI IGARASHI*, KUMIKO YAGUCHI*, TOSHINARI SUZUKI*, MISAKO INABA*,
HARUMI KONDOH*, HIROSHI USHIODA*, TERUYOSHI ARAI*, MACHIKO JIN*,
KUMIKO KUSUNOKI*, TAKESHI ISHIKAMI*, SUMIO YAMADA*, TAKASHI FUJII*
and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：井戸水 Well Water, 水道水 Tap Water, 多摩地域 Tama District, 水質 Water Quality

緒　言

東京都多摩地域の水道普及率は，ほぼ100％で[1)]，一部の山間部を除いて，ほとんどが水道水を利用している．また，多摩地域は人口増加に伴い，受水槽を備えた集合住宅，事業所等も増えている[1)]．一方では個人用井戸も数多く残っており，飲用水及び雑用水として利用されている．

当所では，受水槽を通して供給される水道水や，専用水道(101人以上の人が利用する自家用水道水)及び個人使用の井戸水について，水道法に定められている水質試験年間約7,000件を行っている．そのうち約1/3は水道法で毎月定期的に検査を行わなければならないと規定されている10項目の水質試験(以下省略不可項目と略す)である．

今回，多摩地域の飲用水水質の衛生学的な実態を把握するために，平成７年度に行った上記10項目の試験について集計，解析を行ったので結果を報告する．

調査方法

１．検査期間及び検査試料

1995年４月から1996年３月までに衛生研究所多摩支所に搬入された多摩地域の水質検体2,237件(水道水807件，井戸水1,430件)について検査した．

２．調査項目

10項目の省略不可項目について試験した．表１にそれらの項目及び水道水水質基準値を示した．

表１．調査項目及び水道水水質基準

項　目	水道水水質基準値
硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素	10mg/L以下
塩素イオン	200mg/L以下
過マンガン酸カリウム消費量	10mg/L以下
pH値	5.8～8.6の範囲内
一般細菌	1mL中100個以下
大腸菌群	検出されないこと
濁　度	２度以下
色　度	５度以下
臭気	異常でないこと
味	異常でないこと

３．試薬

各試験の標準溶液は次に示す市販の標準液を適宜希釈して調製した．

硝酸性窒素標準液(100mg/L，関東化学)，亜硝酸性窒素(100mg/L，関東化学)，塩化物イオン(1,000mg/L，和光純薬)，色度標準液(1,000度，和光純薬)，濁度標準液

*東京都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

(1,000度，和光純薬)，0.1N過マンガン酸カリウム溶液(和光純薬)，0.1Nしゅう酸ナトリウム溶液(和光純薬)及び精密分析用硫酸(和光純薬)．

細菌試験は次に示す市販の培地を用いた．

標準寒天培地(日水製薬)，LB培地(日水製薬)及びBGLB培地(栄研化学)．

4．分析装置

各試験に使用した主な分析装置を示す．

濁色度計(日本電色Water Analyzer-2000)，イオンクロマトグラフ(ダイオネックス2000i)，オートサンプラー(協和精密KMT-60A)，pHメーター(堀場製作所pH METER M-13)．

5．分析方法

各項目の分析は上水試験方法[2]に従って次の通りで行った．

硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素と塩素イオンは，イオンクロマトグラフで分析した．ガードカラムはION PAC AG4A(ダイオネックス)，分離カラムはION PAC AS4A(ダイオネックス)，サプレッサーはASRS-I(ダイオネックス)を使用し，溶離液は0.75mM$NaHCO_3$/2.2mMNa_2CO_3で，流量1.0mL/min，サンプル注入量50 μLとした．

過マンガン酸カリウム消費量は，酸性法により行った．

pH値は比色法またはガラス電極法で，味と臭気は官能法で行った．

濁度と色度は，それぞれ，積分球光電光度法，透過光測定法により行った．測定波長は濁度については660nm，色度については390nmとし，吸収セルは50mmのものを使用した．

細菌試験のうち，大腸菌群試験はLB-BGLB法で，一般細菌は標準寒天培地法で行った．

結果及び考察

1．水道水の調査結果

当所で扱った水道水807件について，水道水水質基準に対する適合，不適合率を調べた．省略不可項目10項目のうち表1に示した水質基準値を一項目でも超えれば，その水は水質基準不適合とされる．結果は，図1に示すように水道水水質基準に適合したものは97％(780件/807件)，不適合が3％(27件/807件)であった．不適合の原因を項目別に見ると，一般細菌が最も多く32％，次いで色度31％，大腸菌群16％及び濁度13％であった．当所で扱っている水道水は，ほとんどが受水槽を経由して給水される高層建築物の水や専用水道水である．このため，細菌検査の不適合率が高かった理由の一つとして，受水槽容量に対して使用量が少ない場合に，受水槽に水が長時間滞留し，残留塩素が消失してしまうことが考えられる．また，濁度及び色度が不適合になる原因は，高層建築物の場合，受水槽から給水栓までの配管が長いため，配管の材質である鉄や亜鉛が溶出し，濁度や色度が高くなることが考えられる．

2．井戸水の調査結果

井戸水についても水道水と同様に水道水水質基準に対する適合，不適合率を調べた．図2に示すように，井戸水検体1,430件の45％(649件/1,430件)が不適合であった．その原因を項目別に見ると大腸菌群の不適合率が最も高く52％で，一般細菌21％，硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素15％であった．井戸水は塩素消毒されていない場合がほとんどであるため，細菌に汚染されていることが多い．そのため，大腸菌群(定性)による汚染率は52％と高い結果であった．しかし，大腸菌群を含めて算定される一般細菌数については1mL当たり100個以上の基準を上回る

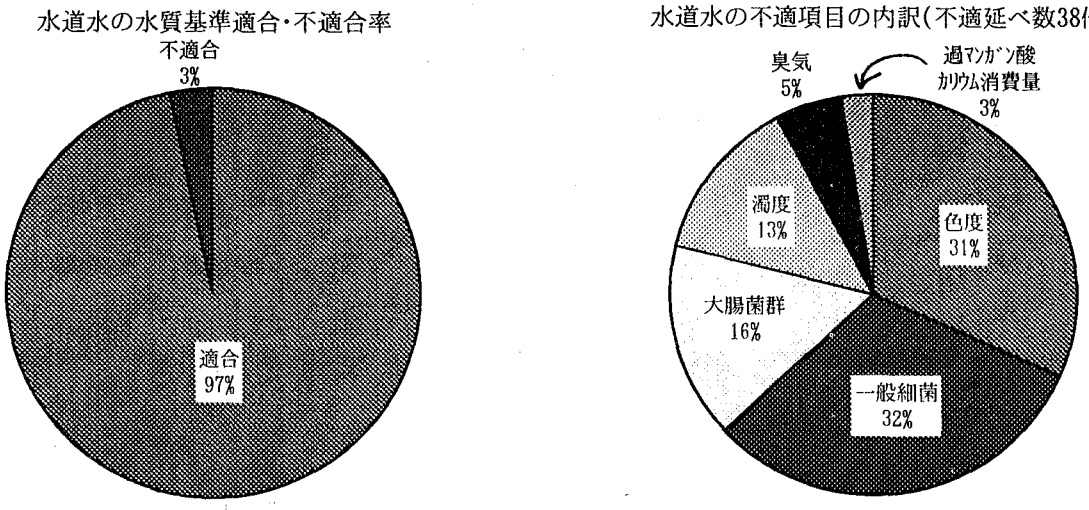


図1．多摩地域水道水の水道水水質基準による評価

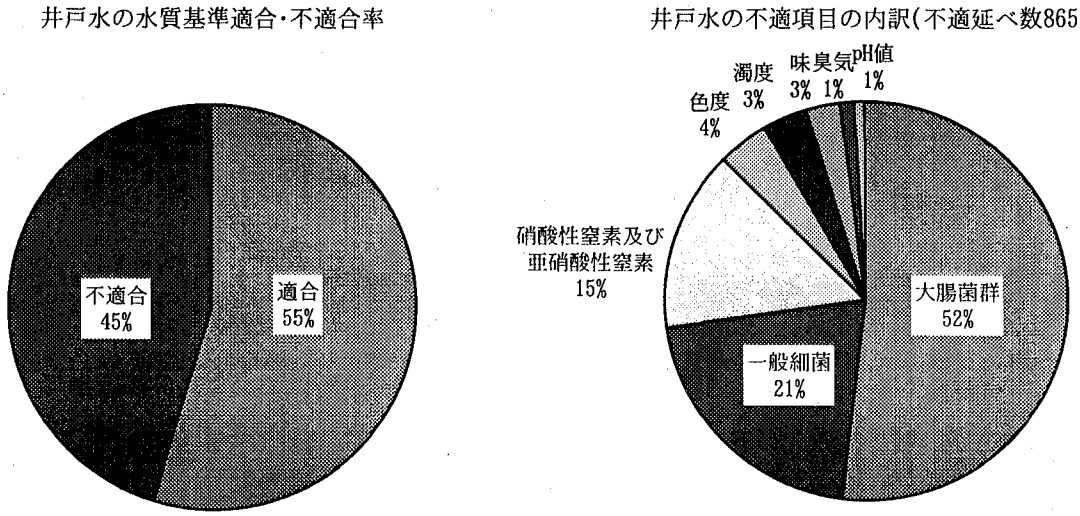


図２．多摩地域井戸水の水道水水質基準による評価

ものは21％と低かった．このことから大腸菌群の汚染菌数は少ないと推測され，さらに，これらの中に病原性大腸菌などの存在する可能性は極めてまれなものと考えられる．しかしながら，飲用水としての安全性を考慮するならば，細菌試験が不適合であった井戸水は煮沸などの殺菌処理をした上で，飲用することが望まれる．

３．井戸の深さ別の調査結果

井戸水の検体1,430件のうち井戸の深さがわかっている650件について，浅井戸，深井戸別に硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素，塩素イオン，過マンガン酸カリウム消費量，pH値について水質を比較した．多摩地域では，浅井戸の深さは，地表よりほぼ30m以内であること[3]から30m以内の井戸を浅井戸，30mを越える井戸を深井戸とした．検査した井戸水は浅井戸水561件，深井戸水89件であった．各項目の濃度幅，平均値等を表２に，ヒストグラムを図３に示した．

硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素については，浅井戸水の平均値は6.5mg/Lで，深井戸水の平均値2.8mg/Lの２倍以上であった．また，その濃度分布は，浅井戸水の場合60％が5.1～10.0mg/Lの範囲内にあり，浅層地下水の硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素汚染が進んでいることが推察される．硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素による地下水汚染は各地で問題になっており，汚染の原因として施肥や生活排水等が考えられている[4]．

浅井戸水及び深井戸水の塩素イオンの濃度平均値はそれぞれ16.0mg/L及び12.1mg/Lで，その濃度分布も浅井戸水の方が深井戸水より高濃度側であった．

当所においても多摩地域の一部の地域では汚染の調査を進めており[5]，原因については現在，調査中である．

過マンガン酸カリウム消費量は浅井戸水，深井戸水共に，低濃度でほとんど差は認められなかった．

pH値の浅井戸水の平均値は6.4，深井戸水は7.2で，ヒストグラムに示すよう浅井戸水の58％はpH6.1～6.5の範囲内に，深井戸水の55％はpH7.1～7.5であった．浅井戸水のpH値が酸性を示す要因のひとつとして土壌中の生物，微生物の作用により生じた二酸化炭素が地下水中に溶解することによる[1]ものと推察される．

表２．多摩地域浅井戸及び深井戸の水質

井戸区分		項目 硝酸・亜硝酸性窒素 (mg/L)	塩素イオン (mg/L)	過マンガン酸カリウム消費量(mg/L)	pH値
浅井戸	濃度幅	0～26.4	1.4～56.7	0～2.8	5.8～7.8
	平均	6.5	16.0	0.3	6.4
	標準偏差	1.86	4.88	0.30	0.25
深井戸	濃度幅	0～10.8	0.2～75.6	0～2.2	6.2～8.1
	平均	2.8	12.1	0.2	7.2
	標準偏差	2.30	5.70	0.16	0.36

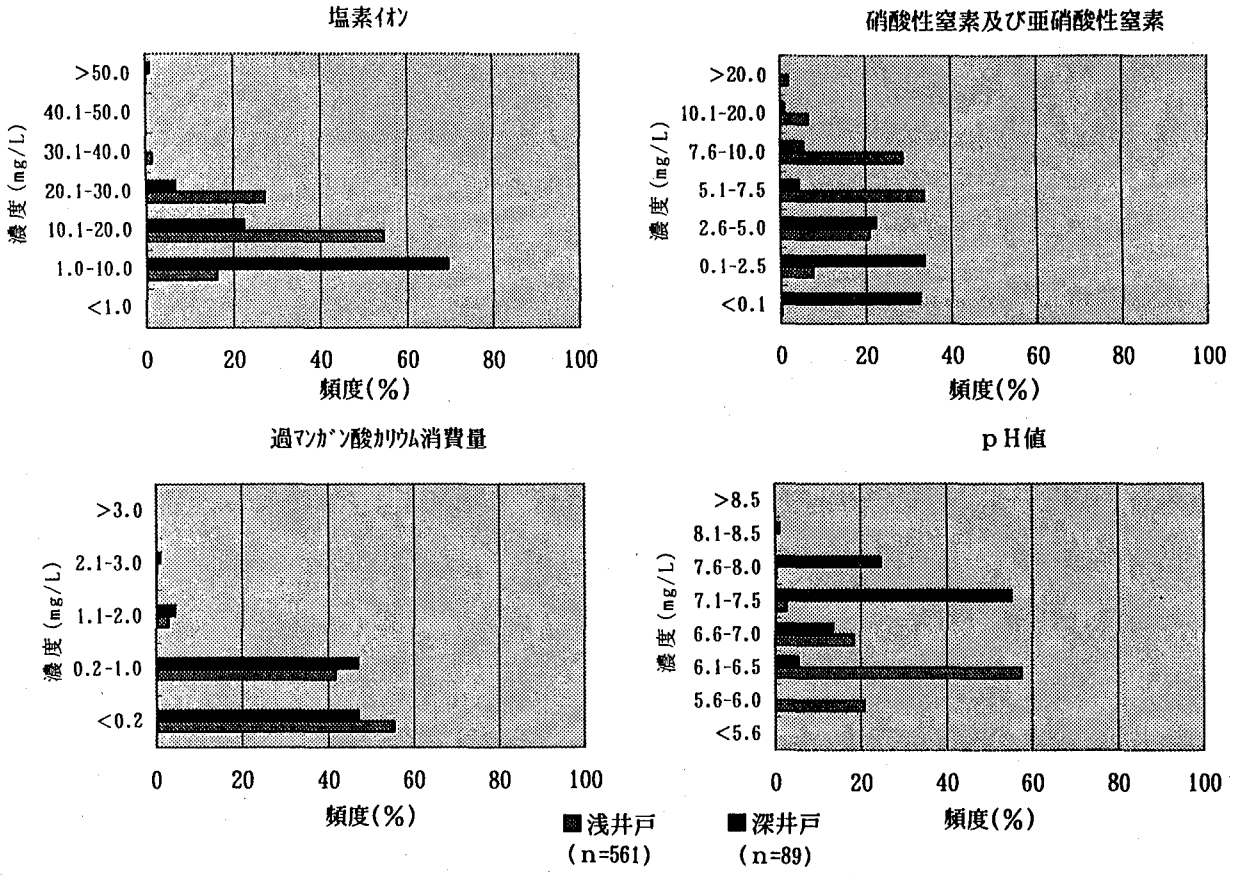


図3．多摩地域の浅井戸及び深井戸における各化合物の濃度分布

ま と め

平成7年度に多摩支所で扱った飲用水の水質の検査結果より，水道水の水質基準適合率は97%と高く，都の水道局や各市の水道事業体の浄水場から供給される水道水は，そのほとんどが衛生学的に良好な状態であった．しかし，受水槽を経由して給水される高層建築物等の水道水の中には，細菌検査，濁度及び色度により不適合となるものがあった．近年，多摩地域では，大型の受水槽を設置した高層建築物の数が増加しており，今後，これらの受水槽を経由する水道水の維持管理が適正に行われているかどうかの調査が必要である．

井戸水の水質基準適合率は55%であり，不適合となる井戸水のほとんどは，個人で使用している浅井戸で，不適合の原因は主に細菌検査と硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素であった．硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素による地下水汚染は現在，国をはじめとして，各自治体で問題となっている．今後，多摩地域における広範囲な汚染実態調査を行うとともに，その原因を明らかにする必要がある．

文 献

1）東京都衛生局生活環境部：東京都の水道，平成6年版．

2）厚生省生活衛生局監修：上水試験方法，1993年版，日本水道協会．

3）木村康夫，三村秀一，藤沢正吉，他：東京衛研年報，**19**，141-147，1967．

4）環境庁水質保全局水質管理課：硝酸性窒素による地下水汚染対策ハンドブック,1993，公害研究対策センター．

5）近藤治美，稲葉美佐子，鈴木俊也，他：第32回全国衛生化学技術協議会年会講演集，36-37，1995．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 274-280, 1996

パージ・トラップGC-MS法による地下水中揮発性有機化合物の調査

矢口久美子*, 鈴木俊也*, 五十嵐剛*, 近藤治美*,
稲葉美佐子*, 藤井孝*, 田村行弘*

Survey on the Contamination with Volatile Organic Compounds in Groundwater by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Purge and Trap Concentrator

KUMIKO YAGUCHI*, TOSHINARI SUZUKI*,
TSUYOSHI IGARASHI*, HARUMI KONDOU*, MISAKO INABA*,
TAKASHI FUJII* and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：揮発性有機化合物 volatile organic compounds, クロロホルム chloroform, 1,1-ジクロロエタン 1,1-dichloroethane, フロン112 CFC112, フロン113 CFC113, 地下水汚染 contamination of groundwater, 多摩地域 Tama district.

緒　言

東京都多摩地域では，水道原水の約35%に地下水が利用されている[1]．多摩地区の水道の普及率はほぼ100%であるが[2]，家庭用の井戸も多数利用されており，災害時の緊急用飲料水としても井戸水は再認識されている．

一方，金属部品の脱脂洗浄やクリーニングの溶剤等に利用されているトリクロロエチレン(TCE)，テトラクロロエチレン(PCE)及び1,1,1-トリクロロエタン(MC)等揮発性有機塩素化合物による地下水汚染が全国各地で認められ[3,4]，社会問題となっている．

著者らも，これまでにTCE等の化合物及びジクロロエチレン類については，汚染実態の把握と監視の目的で定期的に調査を行ってきた[5,6,7]

今回，さらに新しく水道水水質基準に加えられた化合物を中心に19種類の揮発性有機物について，汚染調査を行ったのでその結果を報告する．

調査方法

1．調査対象井戸及び期間

調査は多摩地域平地部の浅井戸261カ所及び深井戸78カ所について行った．多摩地域では浅井戸の深さはほぼ30m以下であることから[8]，30m以下の井戸を浅井戸，30mを越える井戸を深井戸とした．

調査期間は1994年9月から1995年8月までである．

2．採水方法

採水は共通すり合わせ共栓付きガラス瓶に空気のはいらないように行った．また，塩素消毒を行っていない井戸水を採水したため，採水後のトリハロメタン生成を抑制するための試薬の添加は行わなかった．

3．調査化合物

調査は表1に示すように水道水水質基準項目に含まれる揮発性化合物11化合物，監視項目に含まれる5化合物及び水道水水質基準には含まれないが，井戸水から検出された1,1-ジクロロエタン，1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン(フロン113)及び1,1,2,2-テトラクロロ-1,2-ジフルオロエタン(フロン112)についても調査を行った．

4．分析操作

1）試薬　標準溶液として飲料水中揮発性化合物分析用23化合物混合溶液1 mg/mLメタノール溶液，1,1-ジクロロエタン1 mg/mLメタノール溶液，1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン99%溶液，1,1,2,2-テトラクロロ-1,2-ジフルオロエタンをトリハロメタン分析用メタノールで適宜希釈して用いた．内部標準物質としてフルオロベンゼンおよび4-ブロモフルオロベンゼン

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

表1．調査対象化合物及び略号

水質基準項目		監視項目		その他の項目	
化合物	略号	化合物	略号	化合物	略号
トリクロロエチレン	TCE	trans-1,2-ジクロロエチレン	t1,2-DCE	トリクロロトリフルオロエタン	フロン113
テトラクロロエチレン	PCE	トルエン	−	テトラクロロジフルオロエタン	フロン112
1,1,1-トリクロロエタン	MC	キシレン	−	1,1- ジクロロエタン	1,1-DCA
1,1-ジクロロエチレン	1,1-DCE	p-ジクロロベンゼン	P-DCB		
ジクロロメタン	−	1,2-ジクロロプロパン	1,2-DCP		
cis-1,2-ジクロロエチレン	c1,2-DCE				
四塩化炭素	−				
ベンゼン	−				
1,2-ジクロロエタン	1,2-DCA				
1,1,2-トリクロロエタン	1,1,2-TCA				
クロロホルム	−				

1 mg/mLメタノール溶液を同様にトリハロメタン分析用メタノールで希釈し用いた．標準物質はすべて東京化成製，トリハロメタン分析用メタノールは和光純薬製を用いた．

2）分析装置　ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)：ガスクロマトグラフ；ヒューレットパッカード社製，5890シリーズⅡ，質量分析計；日本電子製，オートマス-Ⅱ．

パージ＆トラップ濃縮装置及びオートサンプラ：テクマー社，3000 J 及びAquatek50.

3）分析操作　上水試験方法の揮発性有機化合物の分析方法[9]に従って行った．測定はパージ＆トラップ濃縮装置付きGC-MSによりスキャン法で測定した．定量はマスクロマトグラフィーにより行い，必要に応じてマススペクトルで同定確認した．定量限界値はすべての化合物において0.1 μg /Lである．分析条件を次に示す．

パージ＆トラップ濃縮装置

トラップ管：VOCARB 3000，サンプル量：5 mL，パージ時間：8分，デソーブ温度及び流速：225℃，2 mL/分，クライオフォーカス：無

ガスクロマトグラフ

カラム：VOCOL I.D.0.53㎜×30m 膜厚3 μm

カラム温度：40℃（3分）— 昇温速度7℃/分 — 230℃（3分）

質量分析計

インターフェース温度：200℃，イオン源温度：230℃
イオン化電圧：70eV，イオン化電流：250 μA

結　果

1．未知物質の同定

調査中，GC-MSのクロマトグラム上に未知のピークが認められた試料について，これらのピークの同定を試みた．図1にそれらのピークのマススペクトルを示す．それぞれのガスクロマトグラムピークの保持時間及びマススペクトルより，未知ピーク1は1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン(フロン113)，未知ピーク2は1,1,2,2-テトラクロロ-1,2-ジフルオロエタン(フロン112)及び未知ピーク3は1,1-ジクロロエタン(1,1-DCA)であることが確認された．

これら未知ピークについては，同定後の試料より調査項目として追加した．

2．揮発性有機化合物の検出状況

浅井戸261件及び深井戸78件について，各化合物の検出率，検出濃度の平均値及び水道水水質基準値の超過率を表2に示した．

浅井戸からはベンゼン，t1,2-DCE，キシレンを除く16化合物が，深井戸からはキシレン及びフロン112を除く17化合物が検出された．

最も検出率が高かった化合物は浅井戸，深井戸共クロロホルムであった．検出の平均値はそれぞれ1.1 μg /L及び0.6 μg /Lと低濃度であったが，79.7%の浅井戸から検出され，深井戸においても52.6%の井戸から検出された．次いでこれまでの調査においても報告してきたようにTCE，PCE，MC及びc1,2-DCEの検出率が高かった[3,4,5]．また，今回未知ピークの同定を行い，途中から調査項目に加えた1,1-DCAについても浅井戸233件中，46.2%及び深井戸57件中，49.1%から検出された．フロ

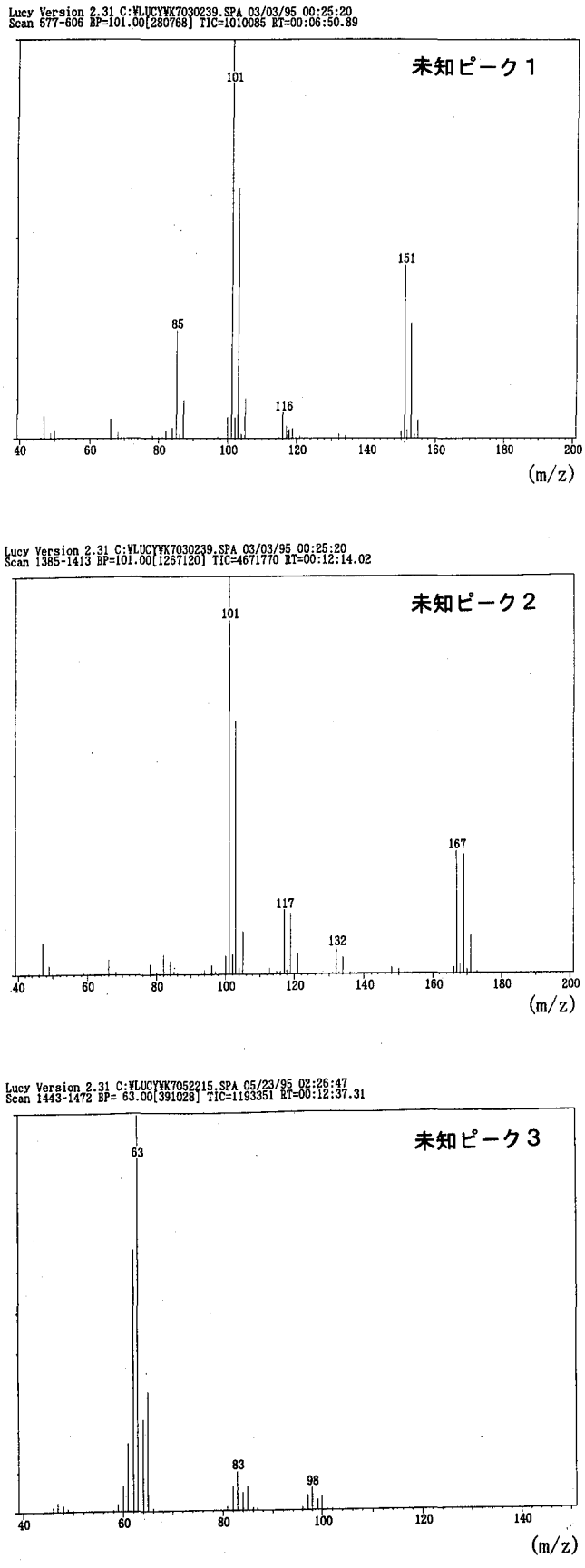


図１．井戸水から検出された未知ピークのマススペクトル

ン113も調査した浅井戸208件及び深井戸48件中，それぞれ約１／３の井戸から検出された．

水道水水質基準値超過率が高かった化合物はPCE及びTCEであった．これは過去に著者らが行った調査と同様であった[5,6,7]．

３．揮発性有機塩素化合物の濃度分布

検出率の高かったクロロホルム，TCE，MC，PCE，c1,2-DCE及び1,1-DCAの６化合物について濃度分布を調べた．図２に各化合物の濃度のヒストグラムを浅井戸，深井戸別に示した．

クロロホルム，c1,2-DCE及び1,1-DCAについては検出率は高かったが，１μg/L未満の井戸が多く，低濃度で広範囲に検出されることがわかった．一方，TCE，MC，PCE及びc1,2-DCEについては，これまでの調査と同様に，高濃度の汚染も認められた．

次に今回初めて調査を行った化合物の中で，検出率の高かったクロロホルム，1,1-DCA及びフロン113についての分布図を図３に示す．また，分布の比較をするためにTCEの分布図を合わせて掲げた．図は浅井戸についての調査結果である．クロロホルム，1,1-DCA及びフロン113はいずれも多摩地域東北部では他の地域より濃度が高い傾向が認められた．そしてこれらの化合物とＴＣＥの濃度分布は類似していることがわかった．

４．浅井戸における揮発性化合物の相関

浅井戸からの検出率の高かった６化合物について，それぞれの相関関係を調べ，結果を表３に示した．特に高い相関が認められたのはTCEとc1,2-DCE,TCEと1,1-DCA及びMCと1,1-DCAであった．

５．クロロホルムと他の揮発性有機化合物との同時検出状況

浅井戸におけるクロロホルムの検出率が著しく高かったことから，浅井戸についてクロロホルムと他の揮発性有機化合物が同時に検出される比率を求め，結果を表4に示した．クロロホルムが検出された浅井戸208件中，クロロホルムのみが検出された井戸は14件6.7%で，194件93.3%は他の化合物も同時に検出されていることがわかった．

考　　察

多摩地域地下水について揮発性有機化合物19化合物を調査した結果，浅井戸から16種の，深井戸から17種類の揮発性有機化合物が検出された．多種類の揮発性化合物の調査結果として，1982年に環境庁から発表された全国15都市地下水汚染実態調査[3]及び北九州市地下水の調査[10]がある．環境庁の調査では，検出率が最も高かっ

表2．井戸水中の揮発性有機化合物測定結果

化合物	浅井戸 井戸数	浅井戸 検出率(%)	浅井戸 検出値平均(μg/L)	浅井戸 基準超過率(%)	深井戸 井戸数	深井戸 検出率(%)	深井戸 検出値平均(μg/L)	深井戸 基準超過率(%)	水道水水質基準値(μg/L)
TCE	261	67.4	12.1	5.4	78	50.0	8.5	3.8	30
PCE	261	60.9	14.7	10.0	78	24.4	27.7	9.0	10
MC	261	67.8	7.3	0	78	48.7	4.4	0	300
1,1-DCE	261	34.1	1.2	0	78	25.6	2.0	0	20
ジクロロメタン	261	16.1	0.2	0	78	2.6	0.2	0	20
c1,2-DCE	261	53.3	2.3	0.4	78	46.2	3.1	1.3	40
四酸化炭素	261	6.9	0.4	0.4	78	21.8	0.4	0	2
ベンゼン	261	0.0	0.2	0	78	1.3	0.4	0	10
1,2-DCA	261	4.6	0.2	0	78	6.4	0.3	0	4
1,1,2-TCA	261	2.3	0.2	0	78	3.8	0.2	0	6
クロロホルム	261	79.7	1.1	0	78	52.6	0.6	0	60
t1,2-DCE	261	0.0	0.0	0	78	1.3	0.3	0	40
トルエン	261	0.4	0.2	0	78	1.3	0.2	0	600
キシレン	261	0.0	0.0	0	78	0.0	0.0	0	400
p-DCB	261	8.0	0.3	0	78	1.3	0.1	0	300
1,2-DCP	261	23.7	0.4	0	78	5.1	0.5	0	60
1,1-DCA	223	46.2	0.7	—	57	49.1	0.6	—	—
フロン113	208	36.5	1.5	—	48	37.5	0.9	—	—
フロン112	219	2.3	5.4	—	52	0.0	0.0	—	—

検出限界：0.1μg/L

表3．浅井戸から検出される揮発性有機化合物の相関表

化合物	TCE	PCE	MC	c1,2-DCE	クロロホルム
PCE	0.1017 (N=190)				
MC	0.3200* (N=200)	0.0646 (N=192)			
c1,2-DCE	0.5541* (N=177)	0.1066 (N=177)	0.1705 (N=186)		
クロロホルム	0.2258 (N=214)	0.0645 (N=218)	0.1179 (N=219)	0.2175 (N=213)	
1,1-DCA	0.5072* (N=128)	0.0799 (N=153)	0.5407* (N=160)	0.1960 (N=136)	0.0899 (N=193)

*信頼度99%で相関性あり

た化合物はTCEで27%，北九州の調査ではクロロホルムが最も検出率が高く，24%であったと報告されている．それらの調査と比較しても多摩地域における各揮発性有機化合物の検出率は高いことがわかった．検出率が高かった化合物は，クロロホルム，TCE，PCE，MC，c1,2-DCE及び1,1-DCAであった．

TCE，PCE及びMCは検出濃度が高く，これらの化合物は金属部品工場，半導体工場及びクリーニング店等で広く使用されていることから，これらの工場からの漏出や排水が汚染の原因となっていることが考えられる．

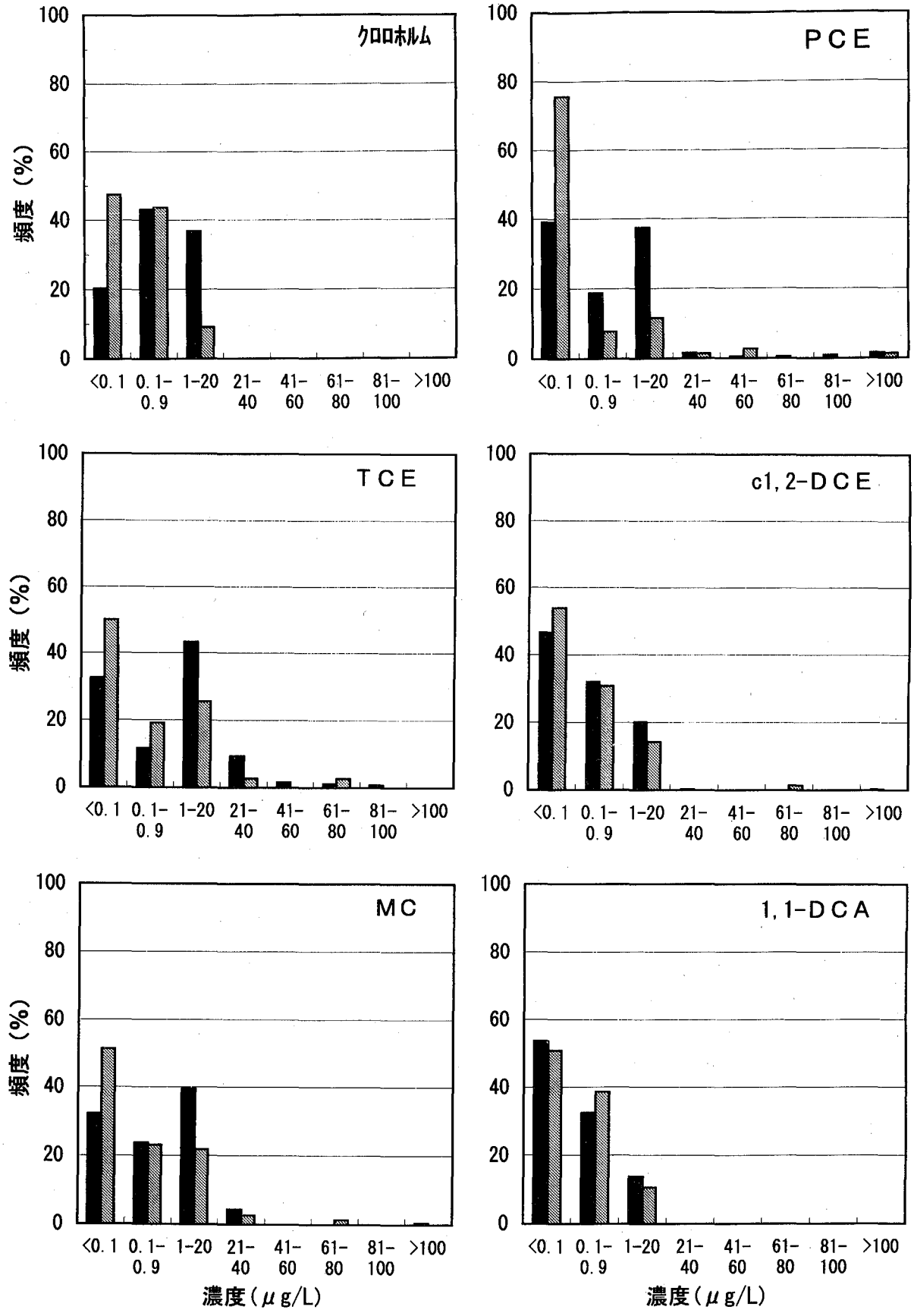


図２．多摩地域井戸水中の揮発性有機塩素化合物濃度のヒストグラム
■浅井戸（1,1-DCA：N＝223，その他：N＝267）
▨深井戸（1,1-DCA：N＝ 57，その他：N＝ 78）

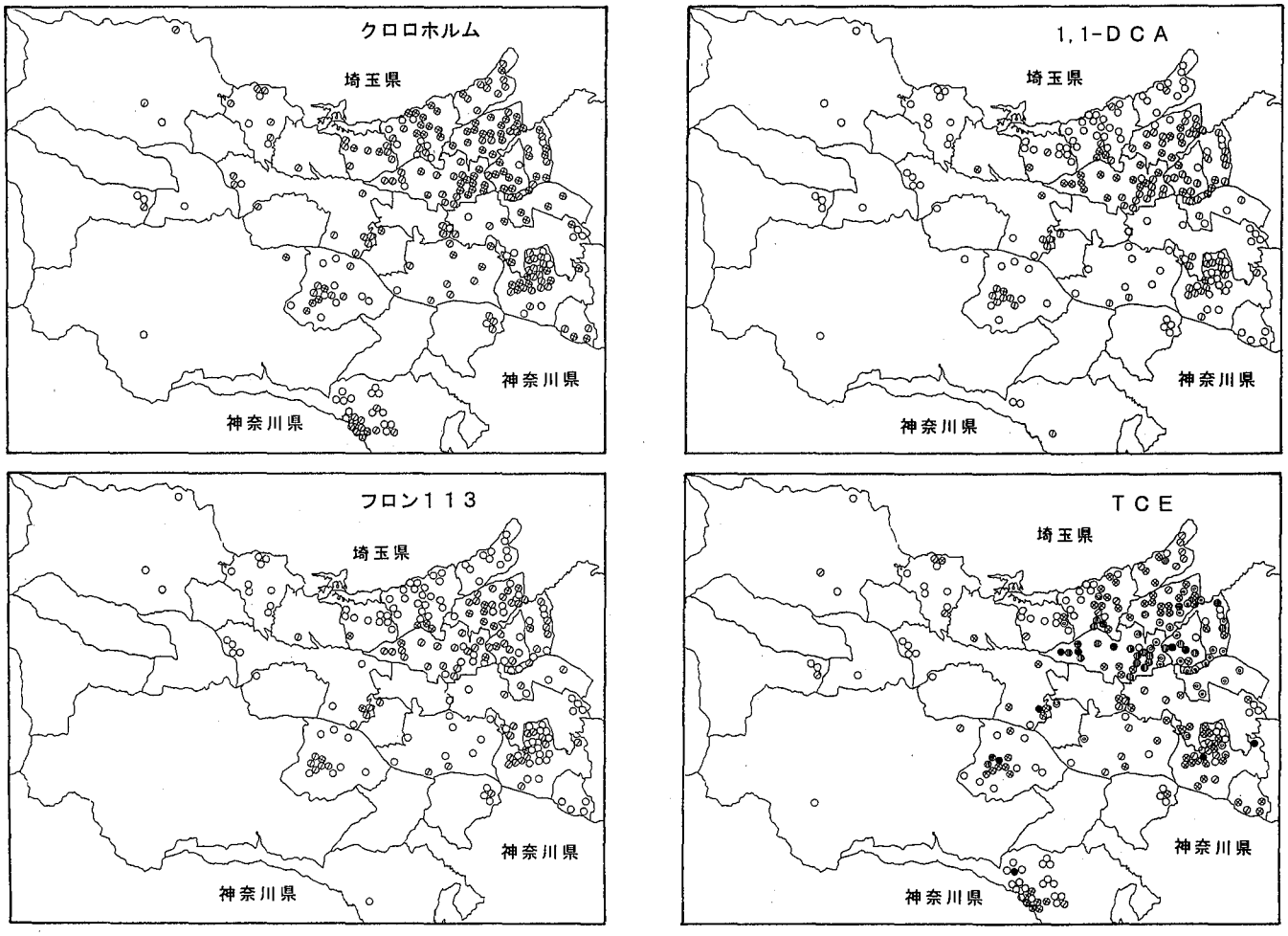


図3．多摩地域浅井戸における揮発性有機塩素化合物の濃度分布

一方，c1,2-DCEについては我が国で生産及び使用されていないことから，Vogelらが報告しているように[11] TCE及びPCEの微生物による分解生成物であると考えられている．このことは著者ら[12]や徳永ら[13]の実験によっても，土壌中の細菌によりPCEがTCEに分解され，さらにc1,2-DCEに分解されることが確認されたことと一致する．今回の調査でもTCEとc1,2-DCEとの間に高い相関が認められたことから，多摩地域地下水中のc1,2-DCEはTCE及びPCEの分解によるものと考えられる．

また，1,1-DCAも低濃度ながら浅井戸，深井戸共に検出率が高かった．1,1-DCAは抽出溶剤及び薫蒸剤として使用されているが[14]，MCが環境中で分解して生成するという報告もある[15]．今回の調査でも1,1-DCAの検出濃度が低かったこと及び1,1-DCAとMCとの相関が高かったことから，多摩地域の1,1-DCAの由来もMCの分解によるものと推察される．

クロロホルムは主にフロンやフッソ樹脂の原料として用いられ，他に医薬品や溶剤等の目的で使用されている．また水道原水，プール水及び下水処理水の塩素消毒によっても年間約600tのクロロホルムが発生すると推定されている[16]．今回の調査結果ではクロロホルムは分布図に示されるように，広範囲に低濃度で検出され，高濃度の検出は認められなかった．また，クロロホルムが検出された浅井戸の93.3%から他の揮発性有機化合物も同時に検出されている．これらのことから井戸水からクロロホルムが検出される原因として，クロロホルムを使用することによって引き起こされた地下水汚染ではなく，他の化合物の分解生成物，あるいは水道水等の塩素処理によって生成したクロロホルムを含む排水等が地下水に混入することによるとも考えられる．

また，大気汚染が問題になっているフロン113及びフロン112が一部の井戸から検出された．これらは金属部品等の脱脂，洗浄剤として使用されていたが，オゾン層破壊の問題で1996年には生産及び消費が禁止される予定である[17]．今回の調査では，わが国で使用量の多いフ

表４．浅井戸におけるクロロホルムと揮発性有機化合物の同時検出状況

クロロホルムと同時検出の化合物	井戸数（件）	比率*（%）
クロロホルムのみ	14	6.7
ＴＣＥ	168	80.8
ＰＣＥ	149	71.6
ＭＣ	168	80.8
1,1-ＤＣＥ	87	41.8
ジクロロメタン	38	18.3
c1,2-ＤＣＥ	134	64.4
四酸化炭素	17	8.2
ベンゼン	0	0
1,2-ＤＣＡ	9	4.3
1,1,2-ＴＣＡ	6	2.9
t1,2-ＤＣＥ	0	0
トルエン	0	0
キシレン	0	0
p-ＤＣＢ	20	9.6
1,2-ＤＣＰ	61	29.3
1,1-ＤＣＡ	100	48.1
フロン113	75	36.1
フロン112	5	2.4

クロロホルムが検出された浅井戸数：208件
*クロロホルムが検出された井戸数に対する比率

ロン113[17]の検出率の方が高かった．しかし，検出濃度は１ μg/L未満の井戸が多く，このように低濃度で広範囲にフロン113が検出される原因については今後検討する必要があると考える．また，フロン112の検出率は低いが，検出された井戸水については高濃度のものもあったことから，これは一部の限られた地区の汚染で，フロン112を使用したことによって引き起こされた汚染であると推定された．

ま と め

今回の調査で多摩地域の井戸水から種々の揮発性化合物が検出されたが，TCE及びPCEを除けば，いずれの化合物も水道水水質基準値より低濃度で健康に影響する濃度ではないと考えられる．またTCE及びPCEが基準値を超過して検出された一部の井戸水については，飲用に用いないよう既に指導が行われている．

しかし，地下水の水質保全の面から考えた場合，これらの化合物の調査を行った時から既に15年ほどが経過しているが，TCE，PCE及びMCによる汚染は依然として続いており，難分解性化合物による汚染の水質回復の困難さをうかがわせる．またTCE，PCE及びMCは徐々に分解され，別の有機塩素化合物汚染を引き起こしていることから今後も定期的にこれら揮発性有機塩素化合物のモニタリングを行うと共に，汚染の原因についてもさらに検討したいと考える．

地下水は都民の身近に存在する貴重な水資源であり，その水質保全のために，一層の努力が必要であると考える．

(本研究の概要は第30回日本水環境学会年会1996年３月で発表した.)

文　献

1）東京都水道局：平成５年度水質年報，1994.
2）東京都衛生局生活環境部：東京都の水道平成６年版，**25**，1995.
3）杉戸大作：水道協会雑誌，**589**，53-61，1983.
4）佐谷戸安好，中室安彦，安藤正典他：水質汚濁研究，**6**，39-45，1983.
5）矢口久美子，大橋則雄，渡辺学他：東京衛研年報，**35**，363-370，1984.
6）矢口久美子，鈴木俊也，関山登他：東京衛研年報，**39**，280-288，1988.
7）近藤治美，鈴木俊也，矢口久美子他：環境化学，**4**，65-72，1994.
8）木村康夫，三村秀一，藤沢正吉他：東京衛研年報，**19**，141-147，1969.
9）厚生省生活衛生局監修：上水試験方法，1993年版，1993，日本水道協会.
10）谷崎定二，野村義夫，馬場謙三他：地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会第４回講演集，285-288，1995.
11）Vogel，T.M. and McCarty，P.L.：*Appli. Environ. Microbiol.*，**49**，1080-1083，1985.
12）矢口久美子，渡辺学，平田一郎他：水質汚濁研究，**14**，479-486，1991.
13）徳永隆司，永淵義孝，田上四郎他：第19回環境保全・公害防止研究発表会講演集，88-90，1992.
14）有機合成化学協会編：新版溶剤ポケットブック，277-274，1994．オーム社，東京.
15）Vogel，T.M. and McCarty，P.L.:*Environ. Sci. Technol.*，**51**，720-724，1986.
16）平成６年度環境庁委託　化学物質要覧作成調査(3)，1995，日本環境協会.
17）不和敬一郎編：地球環境ハンドブック，192-194，1994，朝倉書店，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 281-288, 1996

公衆浴場における浴用剤使用の浴槽水の衛生学的研究

押田裕子*, 有賀孝成*, 栃本博*
藤井孝*, 田村行弘*

Survey of Water Quality Associated with Bath Preparations in Public Baths

HIROKO OSHIDA*, TAKANARI ARIGA*, HIROSHI TOCHIMOTO*, TAKASHI FUJII*
and YUKIHIRO TAMURA*

Keywords：公衆浴場 public baths, 浴用剤 bath preparation, 尿素 urea, 濁度 turbidity, 過マンガン酸カリウム消費量 potassiumu permanganate consumed, 大腸菌群 coliform group

はじめに

公衆浴場はその地域に生活する人々の日常生活に欠くことの出来ない施設として利用されている．東京都における普通公衆浴場は1975年には2,425施設，1施設1日当たりの平均利用者数は440人を数えた．その後の高度経済成長に伴う家庭用風呂の普及は利用者数の減少を招き，公衆浴場の経営を圧迫する要因となっている．東京都は公衆浴場を住民が健康で文化的な生活を送るために必要な基本的施設と位置づけ，施設の維持に必要な資金の助成[1]あるいは物価統制令による利用料金の抑制等[2]，様々な施策を講じている．しかし，家庭用風呂の普及率が90％を越えた1994年には1,602施設，1施設1日当たり利用者数も172人へと20年以前に比べ施設数は66％に，利用者数は40％にまで減少している．

浴用剤は温泉成分を乾燥したものなど一部では古くから販売されてきた．家庭用風呂が増加し始めた1970年代に販売量は増加し始め，1980年代にはメーカー出荷額で約200億円，それ以降浴用剤の種類も急増し1990年代には760億円に達している．当時，これらの浴用剤は公衆浴場での使用を認められていなかったことから，主に家庭用に普及したと思われる．

従来，公衆浴場の浴槽水は温泉等を使用する場合を除いては白湯のみを使用することとされてきた．しかし，浴用剤が一般家庭で普及し，健康志向が高まると共に，公衆浴場の設備の多様化に加えて浴用剤の使用が求められるようになった．こうした背景から，平成3年，公衆浴場に関する条例[3]が改正され，公衆浴場にあっても公衆衛生上支障のない範囲で浴用剤の使用が認められることとなった．しかし，浴用剤の使用に伴う浴槽水の水質に及ぼす影響についての報告は少ない．

そこで，公衆浴場における浴用剤の使用実態及び浴槽水の水質の実態を調査し，これらを基に浴用剤の水質に与える影響を検討した．また，浴用剤を使用した場合の水質管理上の問題点と水質評価の新たな指標について検討したのでその結果を報告する．

調査及び実験方法

1．浴用剤の使用実態調査

1）調査対象

東京都立川保健所管内の公衆浴場(風俗営業等の規制及び業務の適性化等に関する法律に該当する公衆浴場，いわゆる個室付き浴場を除く)45施設を対象として，1993年6月から9月までの間にアンケート方式により調査した．

2）調査項目

(1)施設の営業形態，(2)浴槽の数と種類，(3)浴用剤使用の有無，(4)浴用剤の種類，性状及び成分，(5)浴用剤の使用方法，(6)消毒剤の種類

2．浴用剤の水質への影響に関する実験

1）試料溶液の調製

公衆浴場で実際に使用されていた浴用剤20種類を用いて，その使用方法に従い精製水で調製したものを試料溶液とした．

2）実験項目

外観，pH値，濁度，過マンガン酸カリウム消費量，

*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

尿素，アンモニア性窒素，塩素要求量，色の残存率

3．浴槽水の水質実態調査

1995年6月23日から7月10日までの間に立川保健所管内にある公衆浴場45施設を対象として，営業時間中に143の浴槽水を採水し，その水質を調査した．

4．実験方法

濁度：光電光度法[4]，過マンガン酸カリウム消費量：上水試験方法[4]，尿素：ジアセチルモノオキシムによる比色定量法[5]，アンモニア性窒素：インドフェノールによる吸光光度法[4]，pH値：ガラス電極法[4]，遊離残留塩素：オルトトリジン法[4]，大腸菌群数：デソキシコール酸塩寒天培地法[6]

塩素要求量：上水試験方法に従った．ただし，遊離残留塩素濃度は残留塩素計(セントラル科学社製UC－5型)で測定した．

色の残存率：始めに試料溶液の最大吸収波長における吸光度を測定した．次に，試料溶液の遊離残留塩素濃度が0.5mg/Lとなるように次亜塩素酸カルシウム溶液を添加した．42℃で2時間放置した後試料溶液の吸光度を測定し，次亜塩素酸カルシウム溶液を添加する前の吸光度に対する割合を求め，色の残存率とした．

結果及び考察

1．浴用剤の使用実態

1）公衆浴場の形態と浴槽数

公衆浴場は「公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例」(都条例)で普通公衆浴場とその他の公衆浴場に分類されている．普通公衆浴場とは地域住民の日常生活において保健衛生上必要な施設として利用される公衆浴場である．その他の公衆浴場とは健康ランド，スポーツ施設，従業員の福利厚生施設，サウナあるいは老人福祉施設等に付属している公衆浴場である．調査地域で営業している公衆浴場は45施設あり，その内訳は普通公衆浴場が24施設，その他の公衆浴場が21施設であった．

普通公衆浴場ではいずれも男女同数の浴槽を設置しており，男女各1槽，計2槽の施設が17施設と最も多かった．4槽，6槽及び8槽の施設がそれぞれ2施設あり，10槽の浴槽を持つ施設が1施設あった．浴用剤を使用している施設は11施設であった．浴槽数が4槽以上の施設はいずれも白湯とは別に浴用剤専用の浴槽があった．また，水風呂，ラドン，露天，寝風呂等の浴槽を持つ施設もあった．

その他の公衆浴場21施設のうち浴用剤使用施設はいわゆる健康ランドといわれる大規模な2施設のみであった．浴槽数はいずれも男女別に計10槽あり，白湯，水風呂，浴用剤用の他に打たせ，泡，サウンドバス，ジャグジー等の浴槽があった．浴用剤を使用していない19施設のうち11施設は老人福祉センター等の浴場で，浴槽数は1槽が6施設，2槽が5施設であった．また，サウナに付属する公衆浴場の4施設は男湯のみであり，浴槽数は2～4槽で白湯，水風呂の他に檜，ラドン，打たせ，ハイパワー，バイブラ等の浴槽があった．その他スポーツ施設に付属しているものが3施設，事業所の福利厚生施設が1施設あり，いずれも浴槽は男女別に2～6槽であった．

2）浴用剤の種類と成分

普通公衆浴場から入手した20種類の浴用剤についてその成分を調査した．

浴用剤は構成成分により無機塩類系，炭酸ガス系(無機塩類に炭酸塩と有機酸を加えたもの)，生薬系(薬用植物)及び酵素系の4種類に分類できる．公衆浴場で実際に使用していた浴用剤は無機塩類系が10種類，生薬系が7種類，更にこれらに分類できないものが3種類あった．炭酸ガス系及び酵素系の浴用剤は使用されていなかった．この種の浴用剤はその目的成分の効果を長時間維持することが困難であるため，公衆浴場では使用されていないと考えられた．

無機塩類系浴用剤の主成分は炭酸水素ナトリウム，無水硫酸ナトリウム，香料及び着色料であった．このうち4種類の浴用剤には塩化ナトリウムが加えられていた．浴用剤100g中に含まれる成分量の1例を示すと，炭酸水素ナトリウム20g，無水硫酸ナトリウム60g，塩化ナトリウム20g，それに香料，青色1号及び2号が微量であった．この種の浴用剤は無機塩類によって温熱効果や湯を軟らかくすること，それに香りと色を加えることでリラックス感を期待している．

生薬系の浴用剤は上記無機塩類系の成分に加えて，アロエ抽出液，チンピ末，トウキ末，センキョウ末，よもぎエキス，桃葉エキス等の生薬成分が添加されており，いわゆる薬湯として，有効成分の薬効を期待して使用している．

また，分類できない浴用剤が3種類あった．その成分は流動パラフィン，オリーブ油等の保湿剤とポリオキシソルビタン，ポリオキシエチレン等の乳化剤や界面活性剤等多種類の成分が加えられていたもの，天然の温泉成分である硫黄及び消石灰を含むもの，そして無水硫酸ナトリウムにポリエチレングリコールを加えた浴用剤であった．

3）浴用剤の使用方法と浴槽水の消毒方法

普通公衆浴場で浴用剤を使用している11施設のうち7施設では毎日使用していた．6種類を日替わりで使用している施設が1施設，2～3種類を交互に使用する施設が5施設，残る1施設は1種類を毎日使用していた．その他の4施設ではいずれも1種類の浴用剤を2施設で週1回，2施設で冬期のみ使用していた．

浴用剤の剤型はほとんどが粉末であり液体のものが2種類あった．使用量は浴槽水1 t当たり100～150 gであり，浴槽水に直接投入する方法がほとんどであった．また，生薬系の浴用剤のなかには生薬末約400 gを布袋につめて浴槽につるし，営業中連続して生薬成分を抽出するものもあった．

普通公衆浴場で浴用剤使用の11施設のうち10施設では浴槽水の消毒を行なっていた．使われていた塩素剤は次亜塩素酸カルシウムが8施設，二酸化塩素が2施設であった．塩素剤は営業開始前に錠剤または顆粒を浴槽水に加えていた．

2．浴用剤の水質への影響

都条例は浴槽水の水質基準について，濁度は5度以下，過マンガン酸カリウム消費量は25mg/L以下及び大腸菌群数は1 ml中に1個以下とすることとしている．しかし，浴用剤の使用では浴用剤そのものが分析値に影響を及ぼすことが考えられる．そこで，公衆浴場で使用していた20種類の浴用剤をその使用濃度となるように調製した試料溶液についてその影響を調査し，結果を表1に示した．

試料溶液の外観は黄緑色が9種類と一番多く，桃色，

表1．浴用剤の理化学的性状

種類	色	蛍光	pH値	濁度（度）	$KMnO_4$ 消費量[1]（mg/L）	尿素（mg/L）	アンモニア性窒素（mg/L）	塩素要求量（mg/L）	色の残存率（%）
無機塩類系									
1	淡青色	無	7.5	〈0.5	1.7	〈0.05	〈0.05	〈0.5	54
2	桃色	無	7.5	〈0.5	2.1	〈0.05	〈0.05	0.6	16
3	桃色	有	7.3	0.5	2.3	〈0.05	0.05	1.9	65
4	黄緑色	有	9.4	0.5	2.4	0.08	〈0.05	〈0.5	52
5	紫色	無	8.4	0.5	2.6	〈0.05	〈0.05	6.8	95
6	黄緑色	有	7.4	0.5	2.8	〈0.05	〈0.05	0.6	24
7	黄緑色	有	7.3	0.5	2.8	〈0.05	〈0.05	1.0	27
8	黄緑色	有	7.1	〈0.5	3.0	〈0.05	〈0.05	0.8	35
9	黄緑色	有	9.0	0.9	3.4	〈0.05	0.05	1.5	58
10	白色懸濁	無	7.3	37	6.6	〈0.05	0.05	1.0	—[2]
生薬系									
1	淡青色	無	7.8	0.5	2.5	〈0.05	〈0.05	1.0	56
2	黄緑色	無	7.4	0.5	2.8	〈0.05	〈0.05	0.8	40
3	黄緑色	有	6.6	0.9	4.8	〈0.05	〈0.05	1.5	34
4	黄緑色	有	6.6	0.7	6.1	〈0.05	〈0.05	3.4	99
5	黄緑色	有	8.1	0.5	12.1	〈0.05	〈0.05	2.6	29
6	橙色	無	8.9	1.7	13.5	0.10	〈0.05	3.1	75
7	淡黄色	有	6.4	1.2	189	〈0.05	〈0.05	〉20	60
その他									
1	無色透明	無	8.7	0.5	11.8	〈0.05	〈0.05	3.2	—
2	無色透明	無	8.6	0.5	52.8	〈0.05	〈0.05	1.7	—
3	白色懸濁	無	6.7	25	126	0.08	〈0.05	〉20	—

1）過マンガン酸カリウム消費量
2）白色懸濁及び無色透明の試料溶液は塩素剤添加後変化がなかった

青色がそれぞれ2種類，紫色，橙色，黄色がそれぞれ1種類であった．その他では無色透明なものと白色懸濁するものがそれぞれ2種類あった．また，10種類の浴用剤には蛍光も認められた．

pH値は6.4～9.4の範囲であった．調査した20種類のうち7.0以下のものは4種類のみであり，多くはアルカリ性を示し7.0～8.0が9種類，8.0以上が7種類あった．

濁度は18/20種類が2度以下であり，更にそのうちの16種類は1度以下であった．濁度が基準値の5度を越えた2種類の浴用剤はいずれも白色懸濁させて濁り湯としている浴用剤であり，その値もそれぞれ25及び37度と大幅に高かった．生薬系の浴用剤は濁度が高いと思われたが0.5～1.7度と比較的低い値であった．

過マンガン酸カリウム消費量は1.7～189mg/Lと浴用剤によって大きな差があった．これを浴用剤の種類別にみると，無機塩類系の9/10種類は1.7～3.4mg/L(平均値2.56mg/L)の範囲であり，1種類は6.6mg/Lであった．これに対して，生薬系では4/7種類は2.5～6.1mg/L(平均値4.05mg/L)と無機塩類系とほとんど変わらないかやや高い程度であった．しかし，残る3種類は12.1，13.5mg/L及び189mg/Lと高い値を示した．また，分類できなかったその他の浴用剤3種類はいずれも10mg/L以上で，それぞれ11.8，52.8及び126mg/Lであった．基準値の25mg/Lを大幅に越えた3種類の浴用剤は有機物質を相当量含有する浴用剤と硫黄や消石灰等，還元作用を有する無機物質を含有する浴用剤の2つの種類があった．

これらのことから，過マンガン酸カリウム消費量は無機塩類系では比較的低い値であるが，生薬系及びその他の浴用剤では高い値を示すものが多く，その値も浴用剤の種類によって大きく異なることが分かった．また，濁度との関係では濁度2度以下あるいは無色透明で濁度0.5度以下のものでも過マンガン酸カリウム消費量が異常に高い値を示す浴用剤のあることが分かった．

都条例は温泉等を浴槽水に使用する場合，公衆衛生上支障がないと認めるときは大腸菌群数の基準を除きこの一部または全部を適用しないことが出来るとしている．すなわち，温泉あるいは浴用剤を使用した場合等で，濁度及び過マンガン酸カリウム消費量による水質評価が困難な場合，浴槽水の衛生管理は大腸菌群数のみによることもやむを得ないとしている．しかし，環境監視員による現場での監視指導業務において浴槽水の水質を評価する上で客観的な汚染指標が必要であると考える．また，浴用剤は白色懸濁あるいは着色するものが多く，色の種類や濃度も様々である．そのため，目視による管理にはおのずと限界がある．

人由来の汚染指標としては水質基準に定められている濁度，過マンガン酸カリウム消費量の他に人の汗や尿等に含まれるている尿素，アンモニア性窒素及び塩素イオン等が考えられる．しかし，前述のように濁度及び過マンガン酸カリウム消費量は浴用剤によって増加するものがありその値もさまざまである．また，塩素イオン濃度は消毒用の塩素剤によっても増加する．このため浴用剤を使用している場合にはこれらの分析値をそのまま適用することは判断を誤ることになりかねない．そこで，浴用剤を使用した場合でも浴槽水の汚染指標となる可能性がある項目として，尿素及びアンモニア性窒素について検討した．その結果，尿素は全て0.10mg/L以下であり，アンモニア性窒素も全て0.05mg/L以下であった．このことから，浴用剤は尿素及びアンモニア性窒素の分析値に妨害とならないことがわかった．尿素及びアンモニア性窒素は浴用剤を使用する浴槽水でも人由来の汚染物質の指標として有用であることが示唆された．

3．浴用剤と消毒用塩素剤との相互作用

都条例は浴槽水の微生物学的安全性を確保するための指標として大腸菌群数を1ml中に1個以下とすることを規定している．そのため，公衆浴場の多くは塩素剤による消毒を行っている．しかし，浴用剤を使用した場合，塩素剤は浴用剤に含まれている有機物や還元性の無機物によっても消費される．このため，浴用剤の種類によっては有効塩素濃度を維持することが困難な場合も考えられる．また，浴用剤が酸化されることでその効果が減退することも考えられる．そこで，浴用剤の塩素要求量すなわち，試料溶液に注入した塩素剤が一定時間経過後にも遊離残留塩素を残留させるのに必要な塩素量を測定した．また，遊離残留塩素による浴用剤の退色の程度を色の残存率として求めた．

まず塩素要求量を見ると，0.5以下～20mg/L以上と広い範囲であった．これを浴用剤の種類別に見ると，過マンガン酸カリウム消費量と同じ傾向が見られた．すなわち，無機塩類系では6.8mg/Lと高い値を示した1種類を除くと他の9種類は0.5以下～1.9mg/Lの範囲であった．また，生薬系とその他の浴用剤を含む10種類のうち4種類は0.8～1.7mg/Lと無機塩類系と同程度であったが他の4種類は2.6～3.4mg/L，2種類は20mg/L以上であり無機塩類系に比較して高い値を示した．

次に色の残存率をみると，白色懸濁しているものと無色透明なもの各2種類は塩素剤を添加しても肉眼的に何らの変化も見られなかった．また，70～100％残存した

表2．白湯の水質

公衆浴場の種類	浴槽数	pH値	濁度（度）	$KMnO_4$消費量[1]（mg/L）	尿素（mg/L）	アンモニア性窒素（mg/L）
普通公衆浴場	68	6.8 − 8.8[2]	〈0.5 − 2.1	1.2 −15.7	〈0.05− 5.45	〈0.05− 0.20
		7.98± 0.48[3]	0.25± 0.46	4.93± 3.34	1.77± 1.56	0.08± 0.05
その他の公衆浴場	57	7.0 − 8.8	〈0.5 − 2.9	0.7 −18.3	0.05− 7.58	〈0.05− 1.05
		7.67± 0.36	0.41± 0.70	3.75± 3.81	1.37± 2.03	0.14± 2.22
合　計	125	6.8 − 8.8	〈0.5 − 2.9	0.7 −18.3	〈0.05− 7.58	〈0.05− 1.05
		7.84± 0.45	0.32± 0.58	4.39± 3.61	1.59± 1.80	0.11± 1.57

1）過マンガン酸カリウム消費量
2）範囲
3）平均値±標準偏差

ものが3種類，50～70％のものが6種類あった．そして，塩素剤によって50％以下に減退したものが7種類あった．

これらのことから，浴用剤を使用している浴槽水を塩素消毒する場合，無機塩類系では遊離残留塩素として2 mg/L相当量の塩素剤を投入することでおおむね有効な遊離残留塩素濃度を確保することができる．しかし，生薬系あるいはその他の浴用剤にあっては少なくとも遊離残留塩素として4 mg/L相当量以上の塩素剤が必要であり，これによってもなお全く遊離残留塩素を得られないものもあることが分かった．また，過剰な塩素剤の投入は経済的な損失はもとより，浴用剤の有効成分の変質を招くことにもなりかねない．塩素消毒をより適確に行うためには個々の浴用剤についてその使用条件における塩素要求量を明示する必要があると考える．

4．浴槽水の水質の実態

普通公衆浴場24施設（浴槽数80件）及びその他の公衆浴場21施設（浴槽数63件）計45施設，143件の浴槽水を対象として水質調査を行った．調査当日，浴用剤を使用していた施設は8施設，浴槽数は18件，浴用剤の種類は9種類であった．また，白湯を使用している施設は37施設，浴槽数は125件であった．なお，大腸菌群数については遊離残留塩素濃度が0.4mg/L未満の浴槽水についてのみ検査を行った．

1）白湯の水質

白湯の浴槽水の調査結果を表2及び表3に示した．

pH値は6.8～8.8（平均値7.84）の範囲であった．濁度は0.5以下～2.9度の範囲であり，基準値の5度を越えるものはなかった．また，過マンガン酸カリウム消費量は0.7～18.3mg/L（平均値4.39mg/L）の範囲であり，基準値の25mg/Lを越えるものはなかった．

都条例は，遊離残留塩素濃度を定めていないが，プール水では0.4～1.0mg/Lの範囲とするよう定めている．今回の調査では79/125件（63％）が0.4mg/L以上で，このうち50件は1 mg/L以上であった．0.4mg/Lに満たない46件のうち15件（12％）は0.1～0.4mg/Lの範囲であった．残る31件（25％）は0.1mg/L未満であり，このうち8件は痕跡を認めたが，残る23件は遊離残留塩素を全く検出しなかった．

次に大腸菌群の検出状況を見ると，4/125件（3％）から大腸菌群が検出された．これらは遊離残留塩素が全く検出されなかったもの3件と痕跡のもの1件であった．

これらのことから，白湯の場合，濁度及び過マンガン酸カリウム消費量は共に基準値よりかなり低いレベルにあり，有機物による汚染は良好に制御されていることが分かった．しかし，大腸菌群が検出された浴槽水はいずれも遊離残留塩素が痕跡または全く検出しない浴槽水で

表3．白湯の遊離残留塩素と大腸菌群の検出件数

遊離残留塩素（mg/L）	普通公衆浴場		その他の公衆浴場	
	浴槽数	大腸菌群の検出件数	浴槽数	大腸菌群の検出件数
0	1	0	22	3
痕跡	2	0	6	1
0.1～0.2	4	0	4	0
0.2～0.3	3	0	0	0
0.3～0.4	4	0	0	0
0.4～1.0	12	*[1]	17	*
1.0≦	42	*	8	*

1）遊離残留塩素0.4mg/L以上の浴槽水は検査しなかった

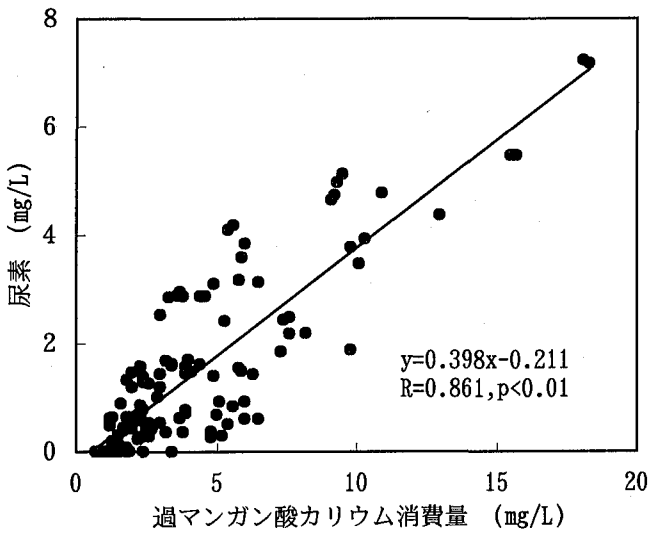


図1．尿素と過マンガン酸カリウム消費量の相関

あった．また，今回は大腸菌群が検出されないまでも遊離残留塩素濃度が0.1mg/L未満の浴槽が25％あることが分かった．浴槽水の微生物学的安全性を確保するためには遊離残留塩素の濃度管理を徹底し，0.1mg/L以上を維持することが必要であることが分かった．

次に，浴用剤を使用した場合においても利用可能な有機物の汚染指標として調査した尿素及びアンモニア性窒素について過マンガン酸カリウム消費量との関係を検討した．尿素は0.05以下～7.58mg/Lの範囲であり，平均値は1.59mg/L，標準偏差は1.80mg/Lであった．過マンガン酸カリウム消費量の分析精度は0.3mg/L程度であるのに対して尿素は0.03mg/L程度である．また，図1に示すように尿素は過マンガン酸カリウム消費量と高い相関関係があり，相関係数は0.861であった．これらのことから，尿素は過マンガン酸カリウム消費量と同様，浴槽水の有機物の汚染指標として充分利用できることが分かった．また，回帰式(Y=0.398X-0.211)より，過マンガン酸カリウム消費量の基準値25mg/Lは尿素約10mg/Lに相当することが分かった．

アンモニア性窒素は0.05以下～1.05mg/L(平均値0.11mg/L)の範囲であり，116/125件(93％)が0.2mg/L以下であった．アンモニア性窒素は測定値の範囲が狭く，過マンガン酸カリウム消費量との相関係数も0.211と尿素に比較して低かった．

2）浴用剤を使用した浴槽水の水質

浴用剤を使用している浴槽水の調査結果を表4に示した．

浴用剤を使用していた施設は8施設で浴槽数は18件であった．使われていた浴用剤は9種類で，無機塩類系が5種類，生薬系が3種類，種々の有機物を含む無色透明なものが1種類であった．今回使われていた9種類の浴用剤のうち前回の調査時にも使用されていた浴用剤は2種類のみであった．現在，浴用剤のメーカー数は約200社，商品数も2,000種類を越えるといわれており，公衆浴場では浴用剤を次々と変えて使用していると推察された．

濁度は0.5以下～12度であり，基準値の5度を越えた浴槽が5/18件(28％)あった．これらの5件はいずれも生薬系の浴用剤を使用した浴槽水であった．無機塩類系の11件及び無色透明な浴用剤の2件はいずれも2.2度以下であり，白湯と同じレベルであった．

過マンガン酸カリウム消費量は4.2～162mg/Lの範囲であった．平均値は26.0mg/L，標準偏差は37.1mg/Lであり，これは白湯の平均値4.39mg/L，標準偏差3.61mg/Lに比較して値が高く，ばらつきも大きかった．18件のうち10mg/L以下は7件だけで，14.2～16.2mg/Lの範囲にあるものが7件，基準値の25mg/Lを越えたものが4件あった．25mg/Lを越えた浴槽水はいずれも生薬系の浴用剤を使用した浴槽水で，濁度も全て5度以上であった．

尿素は0.05以下～5.18mg/Lの範囲であり，平均値は1.63mg/L，標準偏差は1.35mg/Lであった．また，アンモニア性窒素は0.05以下～2.44mg/L(平均値0.28mg/L)の範囲であった．尿素及びアンモニア性窒素はともに白湯とほとんど同じレベルであった．これらのことから，濁度あるいは過マンガン酸カリウム消費量が基準値を超える等，高い値を示したものはいずれも浴用剤に由来する有機物であり，尿素で示される人由来の有機物による汚染ではないと考えられた．今回の調査では人由来の有機物汚染は白湯の場合と浴用剤使用の場合とに大きな違いはなく，良好な水準に維持されていたと考えられる．

無機塩類系浴用剤の過マンガン酸カリウム消費量は実験室的に調製した試料溶液では1.7～3.4mg/L(平均値2.56mg/L)であったが，実際の浴槽水ではほぼ半数が14.2～16.2mg/Lと比較的高い値であった．また，生薬系の濁度は実験室的なものでは0.5以下～1.7度と低かったが，実際の浴槽水では5.5～12.0度と高く，いずれも基準値を越えていた．このことは無機塩類系，生薬系を問わず個々の浴用剤によってその特性による影響が大きいと考えられた．

遊離残留塩素は8/18件(44％)が0.4mg/L以上確保されており，5件(28％)が0.1～0.4mg/Lの範囲にあった．しかし，残る5件(28％)は全く検出しないかまたは痕跡

表4．浴用剤使用の浴槽水の水質

浴用剤の種類	pH値	濁度 (度)	$KMnO_4$ 消費量[1] (mg/L)	尿素 (mg/L)	アンモニア性窒素 (mg/L)	遊離残留塩素 (mg/L)	大腸菌群数 (個)
普通公衆浴場							
無機塩類系A	8.1	〈0.5	4.2	0.48	0.08	1.0	*[2]
〃	8.3	〈0.5	5.4	1.40	0.15	0.7	*
無機塩類系B	7.9	〈0.5	4.2	1.48	0.12	3.0	*
〃	7.7	0.9	9.5	3.73	0.80	0.3	0
無機塩類系C	8.4	1.3	7.5	2.16	0.15	Tr[3]	0
〃	8.1	2.2	15.6	5.18	0.14	0	3
無機塩類系D	7.8	0.8	14.2	0.54	〈0.05	0.1	0
〃	7.8	0.8	14.5	0.58	0.15	0.2	0
〃	7.7	1.1	15.3	0.60	0.12	0.2	0
〃	7.8	1.2	16.2	1.10	〈0.05	0.2	0
その他	7.4	〈0.5	16.0	3.14	〈0.05	2.5	*
〃	7.4	〈0.5	16.2	2.76	0.11	1.0	*
その他の公衆浴場							
無機塩類系E	8.0	〈0.5	7.0	1.74	0.21	1.0	*
生薬系A	7.4	5.2	4.2	〈0.05	0.15	0	0
生薬系B	6.8	5.5	36.9	1.33	0.18	0.4	*
〃	6.7	12.0	45.2	〈0.05	0.07	5.0	*
生薬系C	7.5	9.0	74.0	0.79	0.28	0	0
〃	7.7	12.0	162	2.53	2.44	0	0

1）過マンガン酸カリウム消費量
2）遊離残留塩素0.4mg/L以上の浴槽水は検査しなかった
3）痕跡

程度であった．そして，遊離残留塩素が検出されなかった4件のうちの1件から大腸菌群が検出された．

すなわち，浴用剤の使用の有無にかかわらず大腸菌群の検出された浴槽水はいずれも遊離残留塩素濃度が0.1mg/Lに満たない浴槽水であった．浴槽水の微生物学的安全性を確保するためには塩素消毒が極めて有効であり，それを担保するためには遊離残留塩素濃度を少なくとも0.1mg/L以上に維持すべきであることが分かった．従って，浴用剤の使用時はもちろん白湯の場合においても単に一定量の塩素剤を投入するだけでは不充分である．簡易な残留塩素測定器を常備して遊離残留塩素濃度を常時監視し，その濃度を0.1mg/L以上に維持することが必要である．また，浴用剤の理化学的性状は表1に示すようにそれぞれの浴用剤によって大きく異なる．そのため，塩素消毒を確実に行うには製造，販売において使用時における理化学的性状，とりわけ塩素要求量を個々の浴用剤に明示すべきであると考える．また，公衆浴場にあっては衛生学的な安全性を優先すべきことから，できるだけ濁度成分の少ない浴用剤を使用すること，塩素要求量が少なく，かつその有効成分が変化することなく必要な遊離残留塩素を維持することのできる浴用剤の使用が望まれる．

また，尿素は白湯において過マンガン酸カリウム消費量と高い相関を示し，その分析値は浴用剤によってもほとんど影響されなかった．このことから，尿素は浴用剤を使用する浴槽水であっても人由来の有機物の程度を判断する上で極めて有効な指標である．

まとめ

公衆浴場における浴用剤の使用実態を調査し，浴用剤の浴槽水の水質に及ぼす影響及び浴用剤と消毒用塩素剤との相互作用について検討した．また，浴槽水の水質調査と併せて，人由来の有機物の汚染指標について検討した．

1．浴用剤の過マンガン酸カリウム消費量は無機塩類

系では10種類中9種類が1.7～3.4mg/L(平均値2.56mg/L)の範囲であった．生薬系及びその他の浴用剤では10種類中6種類が10mg/L以上あり，最高値は生薬系の189mg/Lであった．

2．浴用剤の塩素要求量は無機塩類系では0.5以下～1.9mg/Lの範囲であったが，生薬系及びその他の浴用剤では半数以上が2.6mg/L以上で，20mg/L以上のものもあった．また，浴用剤の色素は塩素剤によって退色するものがあり，白濁及び無色透明なものを除く16種類中7種類が50％以下に減退した．

3．公衆浴場の実態調査から，白湯の水質は濁度0.5以下～2.9度，過マンガン酸カリウム消費量0.7～18.3mg/L(平均値4.39mg/L)，尿素0.05以下～7.58mg/L(平均値1.59mg/L)の範囲であった．

尿素は過マンガン酸カリウム消費量と高い相関を示し，相関係数は0.861(回帰式 Y=0.398X-0.211)であった．過マンガン酸カリウム消費量25mg/Lは尿素約10mg/Lに相当した．また，尿素の分析値は浴用剤に影響されないことから，人由来の有機物汚染の指標として充分利用できることが分かった．

4．浴用剤使用の浴槽水は濁度0.5以下～12度，過マンガン酸カリウム消費量4.2～162mg/L(平均値26.0mg/L)と白湯に比較して高く，特に，生薬系では全てが濁度5度以上，過マンガン酸カリウム消費量25mg/L以上であった．しかし，尿素は0.05以下～5.18mg/L(平均値1.63mg/L)であり，人由来の有機物は白湯と同程度であった．

5．遊離残留塩素が痕跡あるいは全く検出されない浴槽水が25％(36件)あり，このうちの5件から大腸菌群が検出された．このことから，浴槽水の微生物学的安全性を確保するには遊離残留塩素濃度を常時監視し，0.1mg/L以上に維持する必要がある．

謝　辞　本研究を実施するに当たり，ご協力いただいた東京都立川保健所環境監視員の各位に深謝します．

文　献

1）公衆浴場の確保のための特別措置に関する法律：昭和56年6月9日法律第68号．
2）公衆浴場入浴料金の統制額の指定等に関する省令：昭和32年9月12日厚生省令第38号．
3）公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例：昭和39年8月1日条例第184号．
4）厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法，1993，日本水道協会，東京．
5）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1028－1029，1990，金原出版，東京．
6）公衆浴場における水質等に関する基準について：昭和38年10月23日厚生省環境衛生局長通知環発第477号．

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7編掲載されており，漢方方剤に関して3編，食品添加物を取り上げたもの2編，防黴剤であるイマザリルに関するものが1編，環境汚染物質であるアスベストを対象にしたもの1編となっている．

田中らの報告は食品添加物の防虫剤として使用されるピペロニルブトキシドに関するものである．この報告は親子2世代にわたりマウスにピペロニルブトキシドを投与し，雌雄の親マウスおよび仔マウスに対する影響を観察したもので，仔マウスに関しては行動発達テストも行っている．その結果，親マウスの体重は交配前期では投与による影響を受けなかったが，実験終了時の投与群親マウスでの雌雄の肝臓重量の増加と雌の高濃度投与群での卵巣重量の減少がみられた．仔マウスでは授乳期間中の体重の抑制と行動発達の抑制が投与群でみられた．しかし，ヒトの一日摂取許容量は本実験における投与量よりはるかに少なく，さらに日本におけるピペロニルブトキシドの推定摂取量はこれより少なく，実際の摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないであろうとしている．

中川らの報告は柑橘類やバナナの防黴剤であるイマザリルを雄ラットに投与し，肝臓及び腎臓に対する影響を見たものである．その結果，イマザリルの単回経口投与は24時間後のラットの肝臓および腎臓に重篤な障害を与えなかった．一方，グルタチオンは種々の化学物質とそれらの代謝中間体に起因する酸化ストレスやアルキル化反応から細胞を防御する重要な生体成分であるが，このグルタチオンの合成を阻害するブチオニンスルフォキシミンを前投与したラットではイマザリル投与により血清トリグリセド濃度が増加し，肝細胞の脂肪変性を惹起した．このことにより肝臓のグルタチオン濃度の持続的低下はイマザリルによる肝毒性を強めることが示唆されたとしている．

福森らの報告は肺癌や悪性中皮腫との関連が指摘されている環境汚染物質であるアスベストをラットに経気管的に投与しその分布を電子顕微鏡を用い観察したものである．実験動物を使用してチャンバー内暴露により実験的病態を作ることは，動物の気道や鼻腔の解剖学的構造により繊維が入りにくいため，容易ではない．この点を考慮し著者らは気管よりクリソタイルとアモサイトの2種のアスベスト繊維を直接注入する方法を試み，注入後5，10，20分に観察した．その結果，アスベスト繊維の肺への沈着は気管に比べて少ないが，肺胞腔，Ⅰ型上皮細胞内，Ⅱ型上皮細胞外縁，マクロファージなどに観察されたものの，注入後の経時的変化は明かでなかったとしている．

藤田らの報告は，近年の自然，天然物志向により使用が増加してきた天然食品添加物について4種類の菌株を用いたAmes試験により変異原性を検索したものである．10種類の天然添加物について試験を行った結果，ムラサキトウモロコシ色素及びペクチン分解物では4菌株で変異原性がみられた．カカオ色素，スピルリナ色素，タマリンド色素及びベニコウジ色素では1-2の菌株において弱い変異原性が検出された．その他の4種類については変異原性は見られなかったとしている．

医薬品に関する3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3編のうち2編は六味丸を扱っている．当部では異なった方面から六味丸の作用の分析を続けており，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．

坂本らによる報告は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．ここではMRL/lprマウスという自己免疫疾患のモデル動物を用い自己免疫疾患の特徴的病変である糸球体病変を指標に六味丸を13週間投与しその作用を見ている．その結果，六味丸を3.6%の濃度で投与した群では0.4%群やコントロール群に比べ腎病変がやや弱い傾向がみられ，六味丸がMRL/lprマウスの腎病変を軽減する作用を有する可能性が示唆された．

小縣らの報告は主に産科領域において用いられる当帰芍薬散のマウス胚仔に対する影響を，妊娠中の胚仔を取り出し胚仔全体を培養液中で培養するという全胚培養法を用いて検索したものである．培養液中の当帰芍薬散エキス濃度が最高4000 μg /mlまでの濃度の暴露を行ったが，各種の胚仔発育指標や発育形態に対照群との有為な差は見られず，当帰芍薬散エキス末の非催奇形性を示唆する結果となった．

藤井らの報告は六味丸の長期毒性試験に関するものである．投与群のラットに0.4，1.2および3.6%の濃度で六味丸を添加した飼料を130週間にわたり摂取させたが，これらのラットでは一般状態観察，体重，臓器重量，血液学的および血清生化学的検査において顕著な変化は見られず，病理学的障害も発生しなかった．したがって本実験条件下では六味丸は雌雄のラットに対し明かな害作用を及ぼさなかったと思われる．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 291-296, 1996

マウスを用いたピペロニルブトキシドの2世代毒性試験

田中豊人*, 高橋　省*, 大石眞之*

Reproductive and Neurobehavioural Toxicity Study of Piperonyl Butoxide Administered to Mice

TOYOHITO TANAKA*, OSAMU TAKAHASHI* and SHINSHI OISHI*

Piperonyl butoxide, used as a pesticide synergist of food additive in Japan, was given in the diet to provide levels of 0 (control), 0.15, 0.30, and 0.60%, during two generations in mice. There was no significant adverse effect of piperonyl butoxide on the average body weight during the preconception period in each sex. The average parental organ weights at the terminal point of the experiment were measured, and the absolute and relative liver weights were significantly increased in treatment groups in each sex, and the absolute and relative ovary weights were significantly reduced in the high-dose group. The average body weight of offspring during the lactation period was significantly depressed in treatment groups, and several behavioural developmental parameters of offspring were significantly affected in treatment groups.

Keywords：ピペロニルブトキシド piperonyl butoxide, 繁殖毒性 reproductive toxicity, 行動発達behavioural development, マウス mice

緒　言

ピペロニルブトキシド(α-[2-(2-butoxyethoxy) ethoxy]-4,5-methylenedioxy-2-propyltoluene)はピレスリンなどの殺虫剤の効果を高めるために用いられる農薬の共力剤であり，日本では食品添加物の防虫剤として登録されている．ピペロニルブトキシドは諸外国では，果実・野菜・穀物などの貯蔵や保存のためにポストハーベスト農薬として用いられている．日本ではピペロニルブトキシドは，食品添加物として穀物1kgに対して0.024g (24ppm)以下の使用が認められている．また，WHOが定める1日あたりの許容摂取量(ADI)は，体重1kg当たり0.03mgとなっている[1]．

ピペロニルブトキシドの発生毒性に関しては，ラットについて特に影響はなかったという報告[2-3]があるが，高濃度でマウス[4]及びラット[5]の4肢の発生異常を誘発することが認められている．また，マウスの後世代影響試験[6-7]で繁殖及び行動に抑制的に作用することも認められている．しかしながら，これらの報告ではピペロニルブトキシドのマウスの後世代に対する影響についてのみ述べられており，親動物に対する影響については触れられていなかった．そこで今回の報告では，ピペロニルブトキシドのマウスを用いた2世代試験の親動物と第2世代の影響について報告する．

材料と方法

試料：ピペロニルブトキシド(ロット番号DZ01)は，東京化成工業株式会社より購入し，その純度は95%以上であった．

動物と飼育条件：マウスは，日本チャールス・リバー(株)のCrj：CD-1(ICR)の雌雄を4週齢で購入し，一般状態の良好なマウスを実験に供した．マウスは温度24±1℃・相対湿度55±5%に調節された飼育室でプラスチックケージで1匹ずつ飼育し，給水瓶によってフィルターを通した水道水と実験飼料を自由摂取させた．

実験計画：ピペロニルブトキシドを混餌法により，1群雌雄各10匹ずつ0.15, 0.30, 0.60%の濃度で，5週齢より投与した．対照群として，雌雄各10匹ずつ実験期間

*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

中に標準飼料(日本クレア(株)CE-2)を投与した．各マウスの摂餌量を，交配前(5週齢から交配まで［30日間］)，交配期(5日間)，妊娠期(14日間)，授乳期(出産から離乳まで［28日間］)の4期間に分けて測定した．

繁殖試験：マウスは交配前に実験開始日(5週齢)を0日として，0，2，4，7，14，21，28，30日目に体重を測定した．9週齢時に，同じ処置群の雌雄を各1匹ずつ5日間同居交配させ，5日後に雌雄を分離した．交配後，妊娠した雌は自然分娩させ，その仔を授乳させた．新生仔については，その出生時に産仔数・1腹仔の重さ・性比を測定した．仔マウスは出生時を0日齢として，0，4，7，14，21日齢時に仔体重を1匹ずつ測定した．4週齢時に仔マウスを母親マウスから離乳させた．

解剖：雄マウスは交配終了後，雌マウスはその仔の離乳後にジエチルエーテルによる麻酔下で屠殺・解剖した．肝臓・腎臓及び精巣または卵巣を摘出し，その重量を測定した．

行動試験：仔マウスの機能と行動発達に関するテストを授乳期間中に行った．測定項目は，正向反射(4，7日齢時)[8-9]，背地走性(4，7日齢時)[8-10]，断崖回避(7日齢時)[8-10]，遊泳テスト(方向・頭角度・四肢の動き)(4，14日齢時)[8-9]，嗅覚性指向反応(14日齢時)[10-12]であり，各パラメーターは下記に示すカテゴリー分類による得点法［( )内がスコア］により，その発生頻度を分析した[13]．

1．正向反射　仔マウスの背部をなめらかな平面につけ，起きあがるまでの時間を測定した．1秒未満(2)，1秒以上2秒未満(1)，2秒以上(0)．

2．背地走性　仔マウスを30°の傾斜面に頭部を下にして置き，頭部を上に向けるまでの時間を測定した．30秒未満(2)，30秒以上60秒未満(1)，60秒以上(0)．

3．断崖回避　仔マウスをプラットホームの縁に前肢と鼻を外に出すように置き，断崖を回避するまでの時間を測定した．20秒以上(0)，20秒未満で後退により回避(1)，20秒未満で回転により回避(2)．

4．水泳試験　仔マウスを水を張った水槽に置き，水泳能力を観察した．方向：直進(3)，回転(2)，浮遊(1)．頭角度：耳が全部水面上(4)，耳が半分水面上(3)，鼻と頭頂部が水面上(2)，頭部を水面上に維持不能(1)．4肢の動き：4肢全てを使う(1)，後肢のみ(2)．

5．嗅覚性指向反応　仔マウスを2つの部屋を通路でつないだ装置の通路部分に置き，行動を観察した．一方の部屋には仔マウスのいたケージの床敷を入れ，もう一方には新しい床敷を入れた．仔マウスのいた床敷のある部屋に入るまでの時間を測定した．90秒以上(0)，90秒未満で新しい床敷の部屋経由(1)，90秒未満で直行(2)．

統計解析：出生時の性比・授乳期間中の生存率及び行動発達のデータはχ^2検定により解析し，その他のデータは一元配置分散分析またはKruskal-Wallisの順位の分散分析を行った後に，Bonfferoniの多重比較検定により解析した．

結　果

飼料及び薬物摂取量

実験期間中の飼料の摂取量は，授乳期間を除いてピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は見られなかった(Table 1)．授乳期間中，母親マウスの摂餌量は高濃度投与群で有意に抑制された．したがって，薬物摂取量は授乳期間を除いて用量依存的に増加し，摂取量の逆転は見られなかった．

親マウスの影響

交配前期：親動物の平均体重の推移には，投与開始第1週に高濃度投与群で体重の減少が見られた以外に，雌雄共にピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は認められなかった(Fig. 1)．

妊娠期：対照群の雌1匹と高濃度投与群の雌2匹は妊娠に至らなかった．また，低濃度投与群の雌1匹は流産した(Table 2)．

授乳期：対照群及び中・高濃度投与群各群2匹の計6匹の母親マウスが，授乳期の第1週に乳腺の発達不良を示した．また，高濃度投与群の母親マウス1匹が，授乳期の第2週に死亡した．

親動物の臓器重量：解剖時の親マウスの平均体重には，雌雄共にピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は見られなかった．しかしながら，肝臓の絶対重量及び相対重量は，投与群で雌雄共に有意に増加し，特に相対重量は雄の全投与群で増加した(Table 3)．高濃度投与群の肝臓の相対重量は，雌雄共に対照群の2倍以上になった．卵巣の絶対及び相対重量は，高濃度投与群で有意に減少した．腎臓の重量には，ピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は認められなかった．

仔マウスの影響

出生時の産仔数・1腹仔の重さ及び性比には，ピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は見られなかった(Table 2)．授乳期間中の平均仔体重の推移は，投与群で有意に抑制され，特に高濃度投与群で顕著であった(Fig. 2)．対照群及び中・高濃度投与群各群2腹仔計6腹仔が，母親マウスの乳腺の発達不良が原因で

Table 1. Average Food and Chemical Intake of Fo Generation Mice Administered Piperonyl Butoxide in Two-generation Toxicity Study.

	Dose Level (%)			
	0	0.15	0.30	0.60
Food intake (g/kg/day)				
preconception				
male	173.1±11.44	165.4± 8.13	163.7± 9.74	168.5± 12.95
female	209.0±36.08	198.0± 27.09	207.9± 21.02	186.7± 33.95
mating	171.8±18.98	162.1± 17.40	165.3± 19.01	168.2± 10.31
gestation	162.3±34.92	155.2± 29.73	160.0± 16.98	148.8± 19.80
lactation	581.5±96.14	526.7± 70.90	546.4± 55.15	377.4± 36.42**
Chemical intake (mg/kg/day)				
preconception				
male	—	248.1± 12.20	491.0± 29.22	1011.2± 77.68
female	—	297.0± 40.63	623.7± 63.05	1120.4±203.70
mating	—	243.1± 26.10	495.9± 57.04	1008.9± 61.89
gestation	—	232.9± 44.62	480.0± 50.95	892.5±118.82
lactation	—	790.0±106.35	1639.0±165.45	2264.4±218.53

Each value represents daily intake during each period (mean±SD).
Significantly different from controls (food intake only) : *P<0.05, **P<0.01

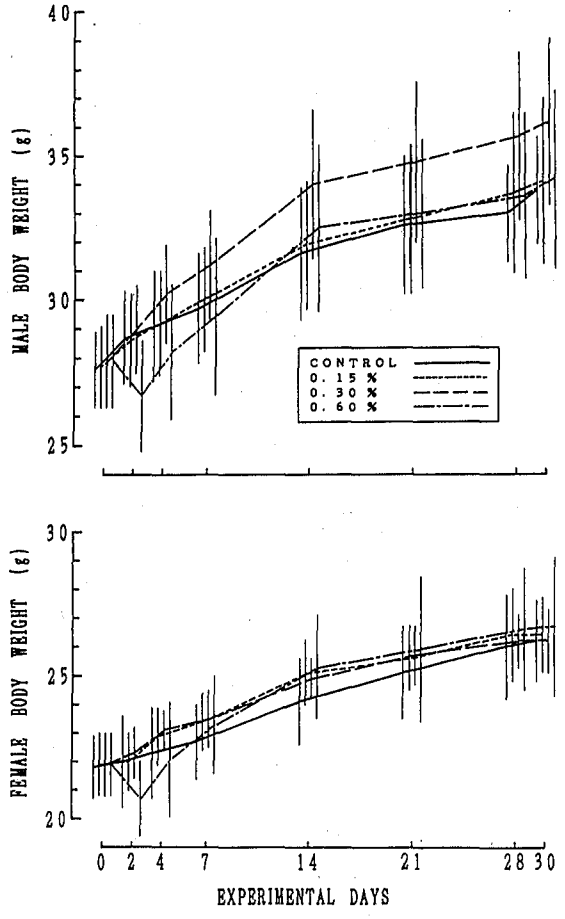


Fig. 1. Average body weight of Fo generation mice administered piperonyl butoxide during pre-conception period. Each value represents the mean±SD.

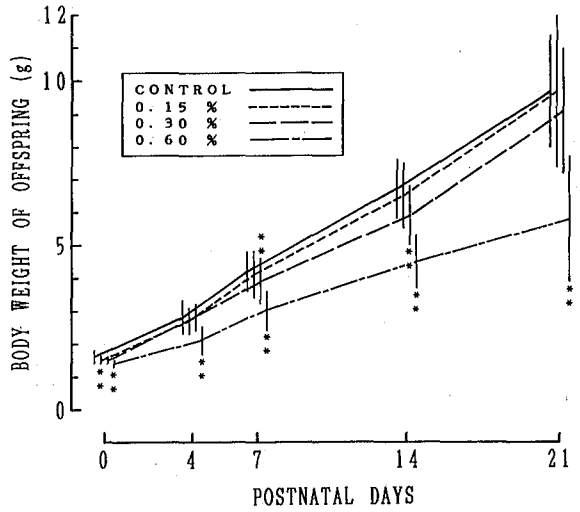


Fig. 2. Average body weight of offspring during the lactation period in F_1 generation study of piperonyl butoxide administered to mice. Each value represents the mean ± SD. Significantly different from controls : *P<0.05, **P<0.01.

授乳期の第1週に全滅した．高濃度投与群の1腹仔は，母親マウスの死亡が授乳期の第2週に確認された後に，餓死を避けるために安楽死させた．死亡した腹仔を除いて計算した生存率は，中濃度投与群で有意に増加し，高濃度投与群で有意に減少した(Table 4)．

仔マウスの行動発達のテストでは，7日齢の正向反射

Table 2. Summary of Data of Litters at Birth in F1 Generation Study of Pireronyl Butoxide Administered to Mice.

	Dose Level (%)			
	0	0.15	0.30	0.60
No. of females examined	10	10	10	10
No. of pregnant females	9	10	10	8
No. of litters	9	9	10	8
No. of offspring	101	98	105	87
Average litter size	11. 2±3.42	10.9 ±2.67	10.5 ±2.17	10.9 ±2.64
Average litter weight (g)	17.78±4.38	16.14±3.85	15.88±3.13	14.94±3.63
Sex ratio (male/female)	0.98(50/51)	1.04(50/48)	1.33(60/45)	1.29(49/38)

Each value represents the mean±SD.

Table 3. Average Parental Organ Weight of Mice Administered Piperonyl Butoxide in Two generation Toxicity Study.

	Dose Level (%)			
	0	0.15	0.30	0.60
No. of males examined	10	10	10	10
Body weight (g)	32.56±1.93	32.63±2.69	34.12±2.27	33.03±2.48
Absolute organ weight (g)				
Liver	1.680±0.233	2.020±0.237	2.725±0.297**	3.625±0.533**
Kidney	0.612±0.077	0.598±0.060	0.616±0.062	0.617±0.085
Testis	0.247±0.026	0.250±0.048	0.251±0.030	0.251±0.042
Relative organ weight (g/100 g bw)				
Liver	5.140±0.467	6.192±0.484*	8.012±0.954**	10.929±0.958**
Kidney	1.876±0.179	1.840±0.188	1.804±0.102	1.863±0.176
Testis	0.758±0.058	0.774±0.177	0.738±0.094	0.757±0.103
No. of females examined	7	9	8	5
Body weight (g)	37.30±2.69	34.67±1.67	36.02±2.01	38.12±2.39
Absolute organ weight (g)				
Liver	2.637±0.409	2.761±0.304	3.699±0.396**	5.983±0.901**
Kidney	0.538±0.065	0.519±0.047	0.558±0.036	0.609±0.049
Ovary	0.049±0.007	0.040±0.005	0.048±0.007	0.031±0.006**
Relative organ weight (g/100 g bw)				
Liver	7.038±0.690	7.954±0.681	10.250±0.681**	15.644±1.632**
Kidney	1.439±0.106	1.498±0.126	1.553±0.110	1.597±0.092
Ovary	0.132±0.017	0.117±0.012	0.132±0.015	0.081±0.016**

Each value represents the mean±SD.
Significantly different from controls : *P<0.05, **P<0.01

が高濃度投与群で有意に抑制され(Fig. 3), その影響は用量依存的であった(P<0.001). 4日齢の背地走性も高濃度投与群で有意に抑制され, その影響は用量依存的であった(P<0.05). 14日齢の嗅覚性指向反応は, 全投与群で有意に抑制され, その影響は用量依存的であった(P<0.001). 4日齢の遊泳テストでは, 方向が高濃度投与群で, 頭角度が低・高濃度投与群で, 4肢の動きが中・高濃度投与群で抑制され, これらの影響は用量依存的であった(方向：P<0.05, 頭角度：P<0.05, 4肢の動き：P<0.001). その他の測定項目には, ピペロニルブトキシドの投与によると思われる影響は見られなかった.

考　察

本実験において, ピペロニルブトキシドは親マウスに対してあまり影響を与えなかった. 交配前期の平均体重の推移と平均摂餌量に, ピペロニルブトキシドの投与による影響は見られなかったので, ピペロニルブトキシドは交配前期にはマウスにほとんど影響を及ぼさないもの

Table 4. Summary of Number of Offspring and Survival Index (%) during the Lactation Period in F_1 Generation Study of Piperonyl Butoxide Aministered to Mice.

		Dose Level (%)			
		0	0.15	0.30	0.60
Postnatal day (PND)	0	101 (100.0)	98 (100.0)	105 (100.0)	87 (100.0)
PND	4	86 (85.1)	92 (93.9) *	84 (98.8) ***	63 (72.4) *
PND	7	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8) *	55 (76.4) *
PND	14	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8) *	54 (75.0) *
PND	21	80 (89.9)	91 (92.9)	84 (98.8) *	45 (75.0) *

Each value represents number of offspring; survival index (%) in parentheses.
Survival index is calculated with exception of litters that died.
Significantly different from controls : *P<0.05, **P<0.01 ***P<0.001.

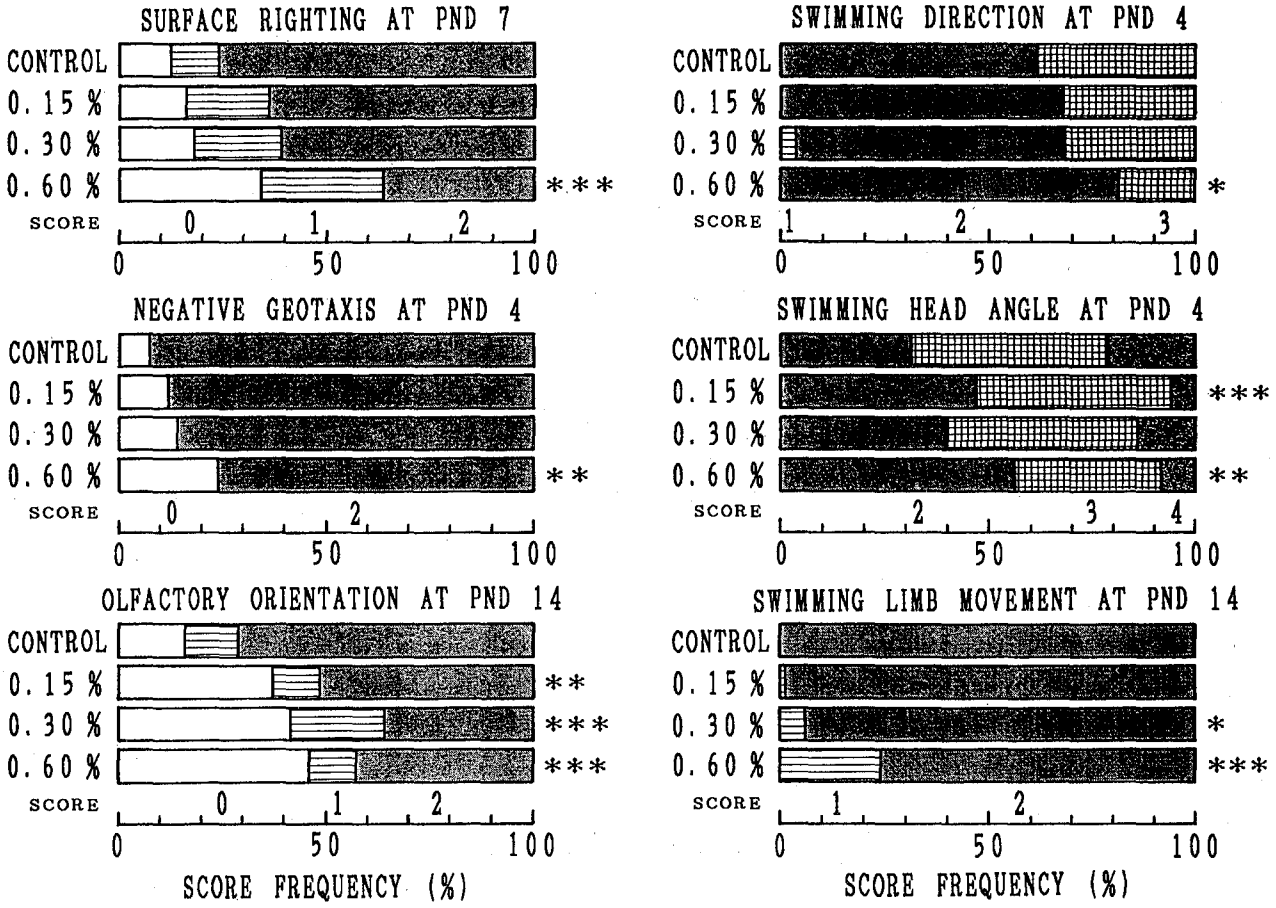


Fig. 3. Score frequencies of behavioural development in the lactation period in F_1 generation study of piperonyl butoxide administered to mice. PND=postnatal day. The higher score shows more developing stage. Significantly different from controls : *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

と思われる.

授乳期に, 母親マウス当たりの平均摂餌量が高濃度投与群で減少しているが, 仔マウスの平均体重が抑制され, 1腹仔数も減少していることから, 授乳期間中の1腹当たりの平均摂餌量は各群同程度であるのかも知れない.

解剖時の臓器重量では, 雌雄共に投与群で肝臓重量が増加しているが, ピペロニルブトキシドの投与期間は雄で5週間(35日間), 雌で11週間(77日間)であった. Fujitaniらは, ピペロニルブトキシドがマウスの20日間投与実験[14]で, 飼料中0.3%以上で肝臓重量を増加させ, 0.9%で組織学的な障害を引き起こすことを見いだした. Fujitaniらはまた, ラットの13週間投与実験[15-16]で, ピ

ペロニルブトキシドが飼料中1.2%以上で肝臓重量を増加させ，2.4%で組織学的な障害を引き起こすことを見いだし，投与開始1～12週間の間，肝臓重量を増加させることを見いだした．したがって，授乳期間中母親マウスは，交配前期に比べ約2倍量のピペロニルブトキシドを摂取しているので，マウスの肝臓は中・高濃度投与群で組織学的な障害を起こしているかもしれない．

行動発達のいくつかの項目が高濃度投与群で抑制されているが，授乳期間中の母親マウスの摂餌量が高濃度投与群で減少していることから，これらの仔マウスは栄養不良であったかもしれない．したがって，高濃度投与群で見られた行動発達の遅延は，成長の阻害によるものかもしれない．しかしながら，SmartとDobbingはラットの実験[17]で，栄養不良が仔ラットの正向反射・背地走性及び断崖回避に影響を与えないことを見いだした．また，OttingerとTanabeはラットの実験[18]で，栄養不良が仔ラットのオープンフィールドテストに影響を与えないことを見いだした．嗅覚性指向反応と遊泳テストの4肢の動きは低・中濃度投与群でも有意に抑制され，その他の抑制された項目も用量依存的にピペロニルブトキシドの影響を受けていることから，これらの影響はピペロニルブトキシドの投与によるものと思われる．

以上の結果から，本実験で用いられた用量のピペロニルブトキシドは，親動物にはあまり影響を及ぼさないが，繁殖と行動発達に対しては抑制的に影響することが確認された．しかしながら，ピペロニルブトキシドの日本における推定摂取量は，大人1人当たり1.77 μg（体重1 kg当たり0.0354 μg）と報告されており[19]，この値は人間のADIの0.03mg/kg（大人1人あたり約1.8mg）に比べてはるかに少ない．ピペロニルブトキシドのADI値の摂取レベルは約0.18ppmで，本実験の投与量と比べてはるかに少ないので，ピペロニルブトキシドは，実際の摂取量ではほとんど人体に影響を及ぼさないであろう．

文　献

1）Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)：*Pesticide Residues in Food*-1992. *Evaluations* 1992 *Part* Ⅱ-*Toxicology*, 317-324, 1993, World Health Organization, Geneva.

2）Kennedy Jr, G. L., Smith, S. H., Kinoshita, F. K., *et al.*：*Food Cosmet. Toxicol.*, **15**, 337-339, 1977.

3）Khera, K. S., Whalen, C., Angers, G., *et al.*：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 353-358, 1979.

4）Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., *et al.*：*Toxicol. Lett.*, **71**, 123-129, 1994.

5）Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., *et al.*：*Toxicol. Ind. Health*, **11**, 175-184, 1995.

6）Tanaka, T.：*Toxicol. Lett.*, 60, 83-90, 1992.

7）Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S.：*Food Chem. Toxicol.*, **30**, 1015-1019, 1992.

8）Fox, W. M.：*Anim. Behav.*, **13**, 234-241, 1965.

9）Pantaleoni, G., Fanini, D., Sponta, A. M., *et al.*：*Fundam. Appl. Toxicol.*, **11**, 440-449, 1988.

10）Altman J. and Sudarshan, K.：*Anim. Behav.*, **23**, 896-920, 1975.

11）Barlow, S. M., Knight, A. F., and Sullivan, F. M.：*Teratology*, **18**, 211-218, 1978.

12）Meyer, O. and Hansen, E.：*Toxicology*, **16**, 247-258, 1980.

13）Tanaka, T.：*Toxicol. Ind. Health*, **11**, 1-12, 1995.

14）Fujitani, T., Tanaka, T., Hashimoto, Y., *et al.*：*Toxicology*, **83**, 93-100, 1993.

15）Fujitani, T., Ando, H., Fujitani, K., *et al.*：*Toxicology*, **72**, 291-298, 1992.

16）Fujitani, T., Tada, Y., Yomeyama, M.：*Toxicology*, **84**, 171-183, 1993.

17）Smart, J. L., Dobbing, J.：*Brain Res.*, **28**, 85-95, 1971.

18）Ottinger, D. R., Tanabe, G.：*Devel. Psychobiol.*, **2**, 7-9, 1968.

19）一色賢司，津村周作，渡辺忠雄：食衛誌，**24**, 344-349, 1983.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 297-301, 1996

イマザリルの雄性ラット肝と腎に及ぼす影響

中 川 好 男*, 田 山 邦 昭*

Effects of Imazalil on Liver and Kidney in Male F344 Rats

YOSHIO NAKAGAWA* and KUNIAKI TAYAMA*

Keywords：イマザリル imazalil，防黴剤 fungicide，肝毒性 hepatotoxicity，脂肪変性 fat degeneration，ブチオニンスルフォキシミン buthionine sulfoximine，グルタチオン glutathione，ラット rat

イマザリル（IMZ；1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propenyloxy)ethyl]-1*H*-imidazole)（Fig. 1）は，収穫後のバナナおよび柑橘類の防黴剤として使用されている．IMZの生体への影響について検討した報告は，オルトフェニルフェノール（OPP），チアベンダゾール（TBZ），ジフェニールなどの防黴剤に比べて極めて少ない．Thienpontら[1]は，IMZの発癌性，催奇形性及び変異原性をラットで検討したが，これらの試験においてIMZは重篤な傷害を惹起させなかった．更に彼らによる長期試験においても，IMZ（5-80mg/kg）はラットの生存率，摂餌量及び行動様式に有意な影響を及ぼさなかった[1]．ただIMZ高用量群（80mg/kg）においてのみ，肝，腎重量の増加，肝小葉中心域細胞の軽度腫脹が認められた．IMZの経口LD_{50}は雄ラットで約340mg/kg，雌ラットで約230mg/kgであり[1]，上にあげた各防黴剤より低かった[2]．前報[3]において，我々はラット遊離肝細胞を用いてIMZ，OPP，TBZの毒性を比較したところ，各化合物の毒性は上記の *in vivo* における急性毒性の強さと相関性を示し，さらにIMZがほかの防黴剤よりも強い作用を示した．今回の実験は，(1) IMZ単回経口投与後のラット肝，腎に及ぼす影響について，(2) グルタチオン合成阻害剤とIMZの併用による両器官への影響について検討した．

実験材料および方法

試薬　IMZは和光純薬工業（株）製，ブチオニンスルフォキシミン（BSO）はSigma社製，このほかの試薬は市販の特級規格またはそれ以上のものを使用した．

動物および処置　雄性F344/DuCrj系ラット（4週齢）は日本チャールス・リバー（神奈川）より入手し，実験に用いるまでの約4週間CE-2飼料（日本クレア，東京）で飼育した．飼育室の室温は22-24℃，湿度は50-60%であった．IMZはトウモロコシ油に溶かし，一晩絶食したラットに経口投与（170mg/kg，1/2-LD_{50}；255mg/kg，3/4-LD_{50}；340mg/kg，LD_{50}）した．一群のラット数は4匹とし，対照群には等量のトウモロコシ油を投与した．また，BSO前処置群にはIMZ投与の1時間前に生理食塩水に溶かしたBSO（900mg/kg）を絶食ラットの腹腔内注射した．IMZ投与の24時間後，CO_2麻酔下ラットを断頭採血し，肝と腎を摘出した．

生化学分析　肝の一部は10mM燐酸緩衝液（pH7.4）-1.15%KClで10%ホモジネートに調製した．脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド（MDA）濃度はチオバルビツール酸反応により定量した[4]．血清中のGOT，GPT活性，尿素窒素（UN），コレステロール（CHO），トリグリセリド（TG），燐脂質（PL）濃度はオートセラ® 分析試薬（第一化学薬品（株）製）および血液自動分析装置（日立7150型）で測定した．

病理学検査　肝と腎は10%緩衝ホルマリン液で固定した．定法に従って作成したパラフィン組織切片はヘマトキシン-エオジン，オイルレッドO，ズダンブラックBで染色した．組織変化は光学顕微鏡（オリンパスVanox AHBS3）で観察した．

統計解析　各処置群と無処置群間の有意差の検定は，Dunnettの多重t検定法（体重，臓器重量）とMann-Whitney *U*検定法（生化学分析）を用いた．

結　　果

IMZ（1/2-1LD_{50}）の単回経口投与はラットの体重，肝

*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, Sinjuku-ku, Tokyo 169 Japan

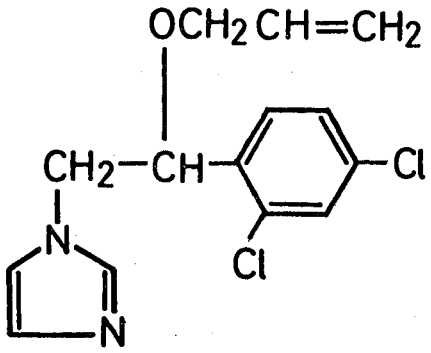


Fig. 1. Chemical stracture of IMZ

Table 1. Effects of IMZ and/or BSO on the liver and kidney weight in F344 rats. Male rats pretreated with BSO (i.p. injection, 1 hr before IMZ) were killed 24 hr after oral administration of IMZ.

Treatments		Relative organ weight	
BSO	IMZ	Liver	Kidney
(mg/kg)		(g/100 g BW)	
-	-	4.00±0.19	0.69±0.02
900	-	3.98±0.23	0.71±0.02
-	170	3.90±0.19	0.72±0.03
-	255	3.85±0.16	0.73±0.02
-	340	3.42±0.53	0.73±0.05
900	170	3.81±0.24	0.73±0.08
900	255	3.77±0.11	0.72±0.03
900	340	3.67±0.16	0.78±0.07

Each value represents the mean ± S.D. from four rats. There was no significant change.

重量，腎重量に影響を及ぼさなかった(Table 1)．BSO前処理ラットにおいても，IMZはこれらの重量に有意な影響を及ぼさなかった．

IMZの単独投与は血清GOT活性を低下させ，その低下は投与量に相関した(Table 2)．IMZの高用量群は血清脂質のTG，CHO，PL濃度を低下させた．IMZの中用量(255mg/kg)及び高用量(340mg/kg)による血清CHO，PL濃度の低下はBSOとの併用でさらに低下したが，TG濃度は逆に上昇した．

血清TG濃度の高いラットの肝細胞内には，微小ないし小空胞が多数認められた(Fig. 2 A)．この空胞は中性脂質に対して強い親和性をもつオイルレッド O (Fig. 2 B)またはズダンブラック B (Fig. 2 C)で染色したことから，脂肪滴であることが判明した．脂肪滴は肝小葉の中間域から周辺域にかけて分布したが，同じ組織で細胞壊死は認められなかった．IMZの単独投与またはBSOの単独投与はラット肝に組織変化及び細胞変性を起こさなかった．

Table 2. Effects of IMZ and/or BSO on serum biochemical parameters in F344 male rats. Rats pretreated with BSO (i.p. injection, 1 hr before IMZ) were killed 24 hr after oral administration of IMZ.

Treatments		Serum parameters				
BSO	IMZ	GOT	GPT	CHO	TG	PL
(mg/kg)		(U/l)	(U/l)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
-	-	136±19	64±6	54±3	141±18	118±4
900	-	108±24	55±9	48±5	169±28	128±10
-	170	129±12	52±2	52±4	124±19	127±13
-	255	82±12*	51±10	41±5*	149±34	95±13*
-	340	51±4*	48±3	39±8*	104±8*	79±7*
900	170	64±19*#	39±7*#	49±1	127±13	128±8
900	255	58±2*#	43±5*	42±5*	250±30*#	99±7*
900	340	50±10	39±4*	25±5*#	244±41*#	59±7*#

Each value represents the mean±S.D. from four individual rats.

*Significant difference from untreated group ($p<0.05$).

#Significant difference between IMZ alone group and BSO plus IMZ group ($p<0.05$).

かった．

Tableには示してはいないが，肝MDA濃度は対照群に比べIMZ単独の高用量群(340mg/kg)で15%($P<0.05$)，BSOと同高用量IMZの併用群で30%($P<0.05$)の増加がみられたが，ほかの群では肝MDA濃度に変化が無かった．これはIMZによる脂質過酸化がBSO併用で強まることを示している．

腎に対してIMZ単独投与，BSOとIMZの併用投与は，組織および血清尿素窒素(UN)濃度に有意な影響を及ぼさなかった．さらに剖検時の観察において，全群ラットの主だった器官に著しい病変が見られなかった．

考　察

IMZ単回投与(170-340mg/kg)はラット肝，腎に顕著な障害を起こさなかった．しかしBSOとの併用により肝小葉の中間域から周辺域にかけて小脂肪滴による典型的な脂肪変性が生じた．肝を標的とする化学物質の内のあるものは，中性脂肪の細胞内蓄積を誘導させる[5]．この脂質蓄積はTGの細胞内合成速度とTGの肝細胞から循環系への放出速度の不均衡により生じると考察されている[5]．ラット肝のグルタチオン(GSH)濃度はBSO(900mg/kg)投与で顕著に枯渇し，6時間後および24時間後でそれぞれ対照群の10%，65%の濃度であり，その回復に時間を要する[6]．GSHは種々の化学物質とそれらの代謝中間体に起因する酸化ストレスまたはアルキル化反応から細胞を防御する重要な生体成分である[7]．GSH濃

度が20-30%に低下した細胞では,毒性物質に対する細胞内防御系に障害を起こすことが知られている[8]. それゆえに, 今回のIMZ暴露下,長期的なGSH濃度の低下は脂質代謝を含めた細胞機能に影響を及ぼす可能性を示唆する.

化学物質による肝細胞の脂肪変性は必ずしも細胞死に直結していない. 例えばエチオニン, ピューロマイシン, シクロヘキシミドなどは肝細胞壊死を伴わずに脂肪蓄積を起こす[5,9]. 今回の実験においても, IMZとBSO併用により生じた脂肪変性領域に細胞壊死は認められていない(Fig. 2). 一方, Thienpontら[1]はIMZの長期投与(80mg/kg ; 1/4-LD_{50})がラット肝細胞で退行性病変を伴わずに腫脹のみを起こすことを報告している. Nakagawaら[3]はラット遊離肝細胞において, IMZ暴露によるATP, GSHの急激な枯渇が細胞死に先立って惹起すること認めている. これは細胞内エネルギー源のATPおよび酸化ストレスの防御成分であるGSHの枯渇がIMZの毒性発現と密接に関係していることを示唆している. 脂質過酸化は化学物質による組織傷害の発現に係わる重要な因子である[10-12]. IMZによる遊離肝細胞の傷害過程後期で生じたMDAの誘導は, 今回のラット肝組織においても再現している. しかしながら中用量IMZとBSOの併用は, MDAの誘導を伴なわずに肝細胞に脂肪変性のみを起こしている. つまりこれは脂質過酸化が脂肪変性の発現に直接関与しないことを示唆している.

要　旨

IMZの単回経口投与(170-340mg/kg)は雄性ラットの肝, 腎に重篤な傷害を与えなかった. しかしBSO前処置(900mg/kg)ラットにおいて, IMZは血清TG濃度を増加させ, さらに壊死を伴わない脂肪変性を肝で惹起させた. BSOによる肝GSH濃度の持続的低下は, IMZによる肝毒性を高めることを示唆した.

文　献

1) Thienpont, D., Cutsem, J. V., Cauteren, H. V., et al. : *Arzneim Forsch/Drug Res.*, **31**, 309-315, 1981.
2) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄, 食品添加物公定書注解第6版, 1992, 広川書店, 東京.
3) Nakagawa, Y. and Moore, G. A. : *Life Sciences*, **57**, 1433-1440, 1995.
4) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358, 1979.
5) Zimmerman, H. J. : Chemical hepatic injury and its detection. *In* Plaa, G. L. and Hewitt, W. R. (eds) *Toxicology of the Liver*, 1-45, 1982, Raven Press, New York.
6) Nakagawa, Y. and Tayama, K. : *Arch. Toxicol.*, **62**, 452-457, 1988.
7) Reed, D. J. : *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 603-631, 1990.
8) Moldeus, P. and Quanguan, J. : *Pharmacol. Ther.*, **33**, 37-40, 1987.
9) Hoyumpa, A. M., Greene, H. L., Dunn, G. D., et al. : *Dig. Dis.*, **20**, 107-116, 1975.
10) Eklow-Lastbom, L., Rossi, L., Thor, H., et al. : *Free Rad. Res. Comms.*, **2**, 57-68, 1986.
11) Nakagawa, Y., Cotgreave, I. and Moldeus, P. : *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 883-888, 1991.
12) Fawthrop, D. J., Boobis, A. R. and Davis, D. A. : *Arch. Toxicol.*, **65**, 437-444, 1991.

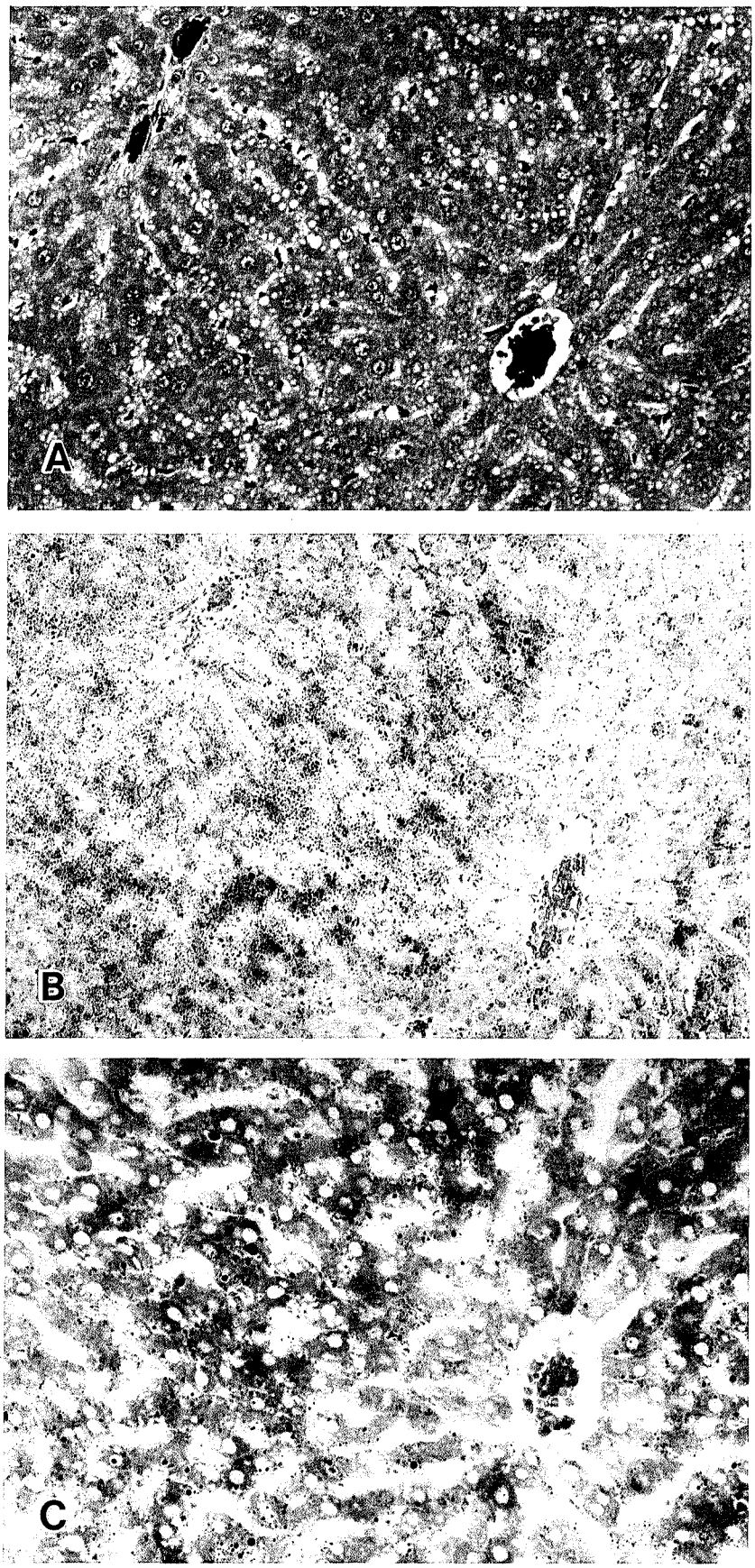


Fig. 2. Liver morphology 24 hr after coadministration of BSO (900 mg/kg) plus IMZ (255 mg/kg) in male rats. Male rats pretreated with BSO (i.p. injection 1 hr before IMZ) were killed 24 hr after oral administration of IMZ. Segments of liver were fixed in 10% neutral buffered formalin solition, embedded in paraffin, and stained with (A) hematoxylin and eosin (x200), (B) oil red O (x100), and (c) sudan black B (x200). Small fat droplets dispersed mainly throughout the cytoplasm of midzonal and/or peripheral hepatocytes.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 303-308, 1996

石綿繊維の気管内注入時における肺の電子顕微鏡的観察

福森信隆*, 青木直人*, 佐々木美枝子*

Electron Microscopic Observations of Asbestos Fibers in the Rat Lung after Intratracheal Instillation

NOBUTAKA FUKUMORI*, NAOTO AOKI*
and MIEKO SASAKI*

The deposition of asbestos fibers was examined by means of electron microscopy in the rat lung after a single intratracheal injection of 30 μl of UICC (Union International Contre le Cancer) chrysotile or amosite suspended in saline. The animals were sacrificed 5, 10, and 20 minutes after instillation. The deposited fibers were observed in the alveolar lumens, type Ⅰ epithelial cells, alveolar macrophages, and on the edge of type Ⅱ epithelial cells. No significant change of deposition pattern was noticed among the observation points. A large quantity of asbestos was deposited in the trachea compared to the lung parenchyma, which may have been due to a rather short time of observation after instillation.

Keywords：クリソタイル石綿 chrysotile asbestos, アモサイト石綿 amosite asbestos, 気管内注入 intratracheal instillation, ラット肺 rat lung, 電子顕微鏡 electron microscope

緒　言

アスベストは，断熱性，不燃性，耐薬品性，防音性，絶縁性等の優れた特性を持ち，特に抗張性と柔軟性に富む繊維状鉱物であるため，これまでに多種の資材，製品に使用されてきた[1]．しかし近年，アスベストが多量に飛散している職場環境で石綿肺や肺癌，悪性中皮腫の発生が確認され，一般環境中への飛散をも含めて社会問題となった[2]．現今，急速に増加しつつある肺癌は，喫煙や大気汚染とともにアスベストの吸入が原因のひとつであるともいわれている[3]．吸入してから発症まで約20年の長期間を要するため，因果関係の立証には困難を伴っているが，防炎や遮音のため学校や公共施設に吹き付けられたアスベストに曝露した人の健康に対する影響が今後懸念される．さらにアスベストは，喫煙と著しい相乗毒性が認められ，アスベストを曝露して喫煙していた人は，曝露しない非喫煙者に対して約50倍もの肺癌に罹患する率が高いという報告がみられる[4]．

アスベストの吸入による影響を，実験的に検討した報告は少ない．Brodyらは，ラットに1時間のクリソタイルの一回吸入曝露を行い，8日までの肺を電子顕微鏡(電顕と略す)で観察したところ，細気管支に近い肺胞部で多くの繊維の沈着がみられ，マクロファージの集積を認めた．また，吸入直後からⅠ型肺胞上皮細胞で繊維の沈着を観察している[5]．更にクリソタイルとクロシドライトの2種類のアスベストを3ケ月間長期吸入曝露したところ，クロシドライトが肺胞マクロファージで多量に沈着し，細胞の壊死を認めたのに対して，一方クリソタイルでは沈着が少なく障害を及ぼさないことから，アスベストの種類によって作用が異なることを報告した[6]．

今回，吸入されたアスベスト繊維の初期作用を検討する目的で，クリソタイル及びアモサイトを実験的に気管内に直接注入した直後の肺の形態を電子顕微鏡下で観察し，繊維の沈着を調べた．

実験方法

被験アスベスト：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

*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

アスベスト(Chrysotile A)とアモサイトアスベストを各5 mg/mlの割合で穴径0.1 μm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の上清液を使用した．

使用動物と曝露法：体重約200 gのF344/DuCrj雄性ラットを使用した．実験に際しては，ネンブタールで麻酔を施して動物を背位に保定し，気管部の皮膚を切開した後，気管を露出させた．次いで注射筒内で20 μlの空気と良く混合させた30 μlのアスベストの懸濁液を，先端を切り鈍に摩滅して懸濁液が霧状となるように改良した注射針を用いて，甲状軟骨より約2 cmの位置から肺側に注入した．その後切開した皮膚を閉じて45度の傾斜角度で保定して，5分，10分，20分放置した．大腿部からの放血により屠殺した後，各群3匹のラットの肺及び気管の一部を摘出した．肺は左葉の小葉間気管支に近い一定部位から摘出し細切した後，冷3％パラホルムアルデヒド(0.1M燐酸緩衝液，pH7.3)で浸透前固定を行った．また同様な方法でアスベストを含まない生理食塩水を注入した動物を対照とした．

試料作製：3％パラホルムアルデヒド液で前固定を行った肺の組織を1.5㎜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燐酸緩衝液，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，エポン樹脂包埋をした．薄切時に再度1㎜角にトリミングを行い，やや厚めの100nmの超薄切片を作製した．染色は，酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施した．気管は，1％オスミウム酸後固定を1時間行い，タンニン酸及びオスミウム酸による導電染色を実施した．その後エタノール脱水，酢酸イソアミル置換の常法にしたがい液状二酸化炭素を用いた臨界点乾燥装置(HCP-2型)で乾燥させ，白金パラジウムの金属蒸着を行った．

観察：肺の観察は，倍率を1万倍に設定した透過電顕(日立 H-7000型)で行い，通常の観察法に準じて組織の変化を調べると同時に，1㎜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確かめ，さらに走査透過像で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して同定を行った．気管の一部は，加速電圧15kVの電界放射型走査電顕(日立 S-800型)で粘膜上皮細胞の表面構造を観察した．

実験結果

肺組織の超薄切片像を観察すると，クリソタイルとアモサイト両繊維とも沈着は顕著ではなかった．気管が肺に入り込む部の比較的に太い小葉間気管支近傍の肺組織でも，アスベストを注入後の経時的な量的変動の差はみられなかった．このことをふまえて，気管下部を走査電顕で検索すると，多くのアスベスト繊維が遊離表面に突起を出した線毛に絡みついていた．Fig. 1は，クリソタイル注入20分後の気管内腔面の線毛円柱上皮細胞で，ここに繊維が塊状となり配列の乱れた線毛に付着している像が観察された．アモサイトも同様に粘膜表面に残存している繊維が確認され，これらは時間による付着量の相違がみられなかった．

対照として生理食塩水を注入した気管では，線毛が時間経過に伴って不整となり，粘液分泌のこう進を示すと思われる大型の分泌顆粒が認められた．肺では，肺胞腔域でのマクロファージが大きくなり，数的にも若干の増加傾向を認めた(Fig. 2)．

注入5分後では，クリソタイルは数本の束状の繊維として肺胞腔から肺胞壁を被うⅠ型上皮細胞に認められた(Fig. 3)．この繊維の長さは，束状を呈する繊維が1.8 μm，細い単繊維では0.9 μmであった．一方アモサイトは，クリソタイルに比較して全体に短い，長さ0.5 μmの単繊維が扁平なⅠ型上皮細胞にみられた．この繊維の沈着部位は，肺胞腔側に近接しており，腔から約0.5 μmの位置に認められた(Fig. 4)．両繊維とも量的には少なく，クリソタイルが束状の形態を呈するのに対して，アモサイトでは短い単繊維の形状を呈していた．

注入10分後では，クリソタイルが肺胞腔や上皮細胞にわずかに分散して沈着していた．この時の形状は，数本で構成された束状が多く，やや長い繊維も認められた．Fig. 5は細気管支の上皮細胞間に残存している3.8 μmと1.6 μmの長さを持つ束状の長いクリソタイル繊維で，他の一部では繊維の集合している断面が観察された．一方繊維径の太いアモサイトは，単繊維で沈着する傾向が強く，Fig. 6では長さ2.2 μmの比較的長い繊維を認めた．この繊維は，オスミウム好性のミエリンを封入体として持つ大型のⅡ型上皮細胞の肺胞腔側に付着していた．

注入20分後では，両繊維とも沈着する繊維数が若干多くみられたが，5分，10分後と比べ大差を認めなかった．Fig. 7は，肺胞腔内にみられた長さ1.6 μmの2本重なったクリソタイル繊維を示した．また，細胞間に位置しⅡ型上皮細胞に接したアモサイトは，直径が0.1 μm，長さが0.4 μmの短い繊維であった(Fig. 8)．

全体的に大型化した肺胞マクロファージ内の繊維数は，アモサイト投与群に比べクリソタイル投与群がやや多く

認められた．繊維が観察されたのは，肺胞腔内の一部のマクロファージであった．

考　察

アスベストは，主に呼吸器系の疾患を惹起することが知られている[2]．先の阪神大震災で，倒壊した建物から吹き付けられたアスベストが露出して，大気中に飛散した．実験動物を使用して，チャンバー内曝露による実験的病態を作成することは，容易ではない．動物の気道が狭小でかつ鼻腔構造が複雑であるため，繊維の肺への侵入を防禦していると考えられる．そのため実験的に口からの気管内投与を行う場合が多いが，異物に対する反応が強く炎症等の副次的障害が発生しやすい．これらの点を考慮して，気管に直接アスベスト繊維を注入するという方法を用いて肺への到達度を調べるとともに，繊維に対する早期の変化を観察した．

全般的にアスベストの懸濁上清液の注入噴霧の処置で，肺に沈着している繊維は気管に比べ少ない傾向を示した．走査電顕の観察で，多くの繊維が気管内腔の粘膜上皮細胞の線毛に付着した像がみられたことから，飛び散った懸濁液のかなりの量が気管に残留したと考える．その後，背位の状態で45度の傾斜保定を行ったにもかかわらず，肺への到達が少ないことは，今回の検討時間が極めて短時間であるため，繊維の移動がほとんど無かったと推察される．一方，Viallatらは，生理食塩水の0.1mlに懸濁させた0.5mgのクリソタイルを切開した皮膚から気管内へ投与後，3日以上経過して観察した結果，肺組織に沈着した繊維が胸膜へ移行することを報告した[7]．

繊維の沈着は，肺胞腔内や扁平なⅠ型上皮細胞の肺胞腔側細胞質あるいはⅡ型上皮細胞の周辺に認められた．肺胞腔での残存を除いて，Ⅱ型上皮細胞と肺胞壁の間や気管支上皮細胞間などの細胞間隙に多く沈着がみられた．その形状の特徴は，クリソタイルでは束状を呈した比較的長い繊維がみられ，アモサイトでは太く短い単繊維が認められた．このことは細長いクリソタイル繊維は，細胞間に入りやすいことを示していると考えられる．

結　語

形状の異なるクリソタイルとアモサイトアスベストをラットの気管へ強制注入し，5分，10分，20分後の肺組織での繊維の沈着を調べた．肺での沈着は，気管に比べ量的に少なかったが，肺胞腔やⅠ型上皮細胞内，Ⅱ型上皮細胞の外縁，マクロファージで繊維が観察された．注入後の経時的変動は，明らかでなかった．

文　献

1）環境庁委託業務結果報告書：大気汚染物質のレビュー石綿・ゼオライト，1986，日本科学技術情報センター．

2）*Environmental Health Criteria for Asbestos and Other Natural Mineral Fibres,* 1986, World Health Organization, Geneva.

3）竹本和夫：公害と対策，**24**，9-13，1988.

4）Reif, A. E.：*J. Natl. Cancer Inst.*, **73**, 25-39, 1984.

5）Brody, A. R., Hill, L. H., Adkins, B., et al.：*Am. Rev. Respir. Dis.*, **123**, 670-679, 1981.

6）Oghiso, Y. K. E. and Brody, A. R.：*Br. J. exp. Path.*, **65**, 467-484, 1984.

7）Viallat, J. R., Raybuad, F., Passarel, M., et al.：*Arch. Environ. Health*, **41**, 282-286, 1986.

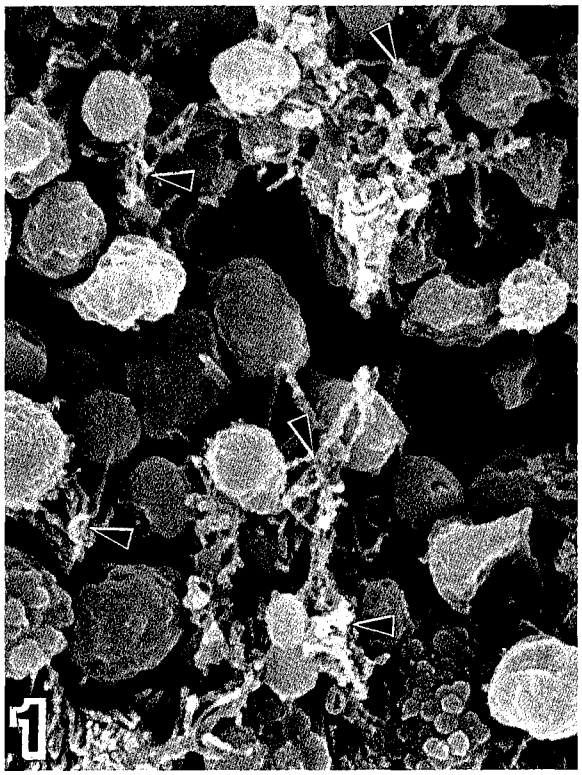


Fig. 1. Scanning electron micrograph of mucous epithelium of the rat trachea, 20 min after instillation of chrysotile asbestos. Some clusters of chrysotile (arrowheads) are seen on the cilia of epithelial cells. (x3,450)

Fig. 2. A swollen alveolar macrophage (M) of the lung from a control rat, 20 min after saline treatment by transmission electron microscopy. (x4,350)

Fig. 3. Some bundles of fibers (arrows) are observed in flat type I epithelial cell, 5 min after instillation of chrysotile. (x25,200)

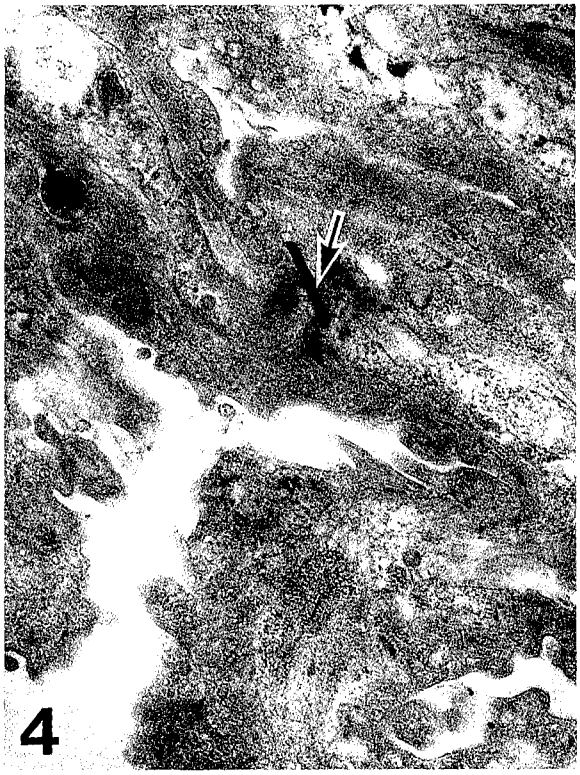


Fig. 4. Amosite asbestos fiber (arrow) in the type I epithelial cell of lung, 5 min after instillation. (x23,300)

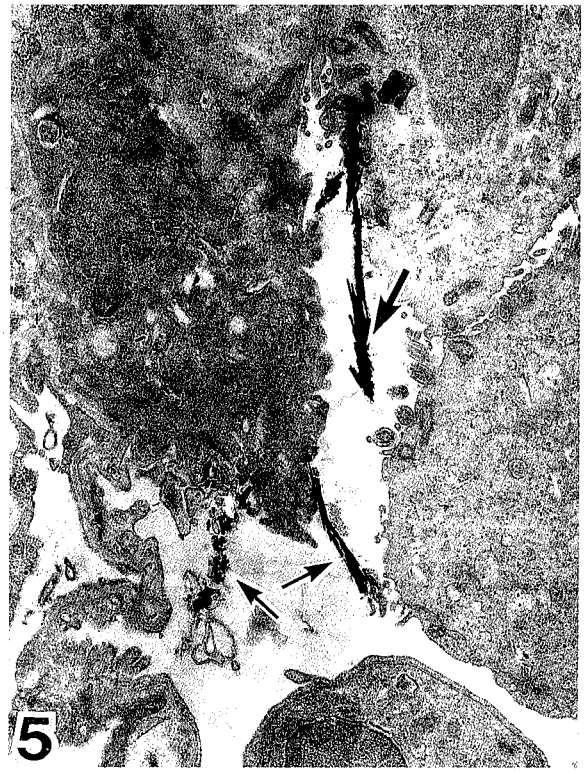


Fig. 5. The depositions of a few fibers (arrows) are observed among the epithelial cells of the bronchiole of the lung, 10 min after treatment of chrysotile. (x12,200)

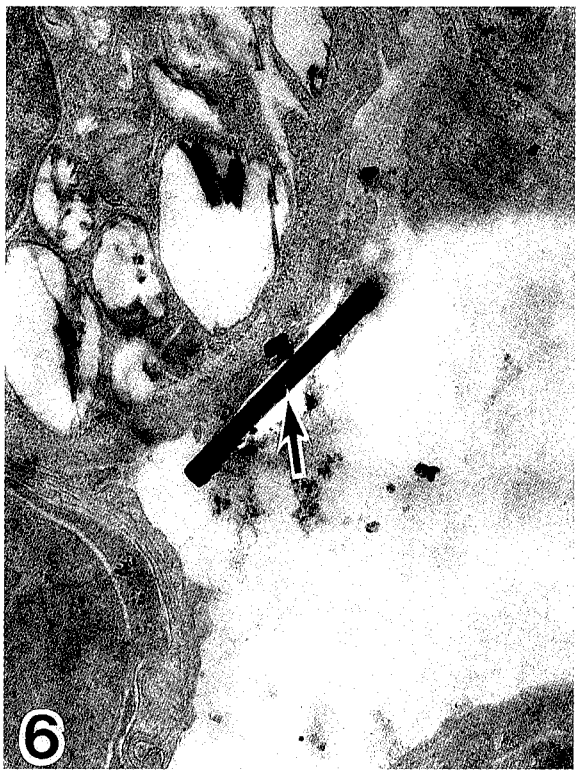


Fig. 6. A wide fiber (arrow) adhering to type Ⅱ epithelial cell with myelin figures, 10 min after treatment with amosite asbestos. (x16,700)

Fig. 7. Chrysotile asbestos (arrow) are seen in the alveolar lumen, 20 min after intratracheal injection. (x14,700)

Fig. 8. Electron micrograph showing amosite fiber (arrow) between type Ⅱ epithelial cell and the alveolar wall in a sample from the rat lung, 20 min after treatment. (x28,300)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 309-313, 1996

天然食品添加物の Ames 試験における変異原性

藤田　博*, 広門雅子**, 平田恵子**, 植松洋子**,
貞升友紀**, 安田和男**, 青木直人*

Mutagenicity of Natural Food Additives in the Ames *Salmonella*/Microsome Test

HIROSHI FUJITA*, MASAKO HIROKADO**, KEIKO HIRATA**, YOKO UEMATSU**,
YUKI SADAMASU**, KAZUO YASUDA** and NAOTO AOKI**

Keywords：変異原性 mutagenicity, 天然食品添加物 natural food additives, Ames 試験 Ames *Salmonella*/microsome test

食品添加物には，合成による添加物に加え天然添加物が用いられている．近年，自然，天然物志向に支えられて天然添加物が多用されるようになってきた．厚生省は，既存添加物一覧を作成し，天然添加物の使用品目を確定した．今後，新たな添加物の申請を行う場合は，安全性の情報を添付する事が義務づけられた．更に，既存添加物についても，安全性に関する情報を早急に収集する方向で動いている．しかし，現在のところ天然添加物の安全性についての情報は，合成による添加物に比べて十分とは言えないことから，一つでも多くの添加物について毒性試験を実施することが重要なこととなってきた．

化学物質の安全性を評価するためには，様々な毒性試験が必要であるが，遺伝毒性については種々の変異原性試験が実施されている．変異原性試験の中でもAmesら[1-3]が開発したサルモネラを用いる試験，いわゆるAmes試験は，最も多用されている試験系であり，多くの変異原の検出に貢献してきた．そこで，Ames試験により天然添加物の変異原性の検討を行うことにした．今年度は，色素(6種)，保存料(4種)について行った結果について報告する．

実験材料及び方法

試料　被検試料は，色素6種(カカオ色素，スピルリナ色素，タマリンド色素，ベニコウジ色素，ムラサキトウモロコシ色素，ラック色素)，保存料4種(しらこたん白抽出物，ツヤプリシン，ペクチン分解物，ε-ポリリジン)で，各試料に関する表示成分及び分析結果は，表1に示した[4]．すべての試料は，日本食品添加物協会より入手した．

陽性対照は，2-ニトロフルオレン(Aldrich)，2-アミノアントラセン(和光純薬)，9-アミノアクリジン(東京化成)及びマイトマイシンC(協和発酵)を用い，試験毎に実施した．

試料は，溶解性により蒸留水(DW)またはジメチルスルホキシド(DMSO，和光純薬)に溶解した．

菌株　*Salmonella typhimurium* TA97[5], TA98[1-3], TA100[1-3]及びTA102[6,7]を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2, OXOID)で一夜培養し用いた．これらの株は，B. N. Ames教授(カリフォルニア大)より分与を受けたものである．

変異原性試験　Ames法の変法であるプレインキュベーション法[3,8]により行った．代謝活性化には，アロクロール1254(ジーエルサイエンス)により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット(Crj：CD 日本チャールス・リバー)の肝臓ホモジネートから調製したS9[3]を用いた．S9 mix[3,8]中のS9量は，10% (50 μl/プレート)とした．

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ，代謝活性化する場合にはS9 mix0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(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分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[3] 2 mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[3]に重層した．37℃で2日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した．

*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
**東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

表1．試験に用いた試料の表示成分及び分析結果

化合物名	形態	分析値	表示成分
色素			
カカオ色素	粉末	色価 112(520nm)	カカオ色素95%，食品素材5%
スピルリナ色素	粉末	色価 142(618nm)	スピルリナ色素95%，クエン酸三ナトリウム5%
タマリンド色素	粉末	色価 122(500nm)	タマリンド色素100%，デキストリンを含む
ベニコウジ色素	粉末	色価 592(500nm)	ベニコウジ色素30%，デキストリン70%
ムラサキトウモロコシ色素	粉末	色価 92(515nm)	ムラサキトウモロコシ色素34%，クエン酸1%，デキストリン65%
ラック色素	粉末	色価1603(490nm)	ラック色素100%
保存料			
しらこたん白抽出物	粉末	プロタミン 77.5%	デキストリンを含む
ツヤプリシン	結晶	ヒノキチオール 99.0%	
ペクチン分解物	液状	ガラクチュロン酸 65.9%	乾燥減量37.1%
ε-ポリリジン	粉末	ε-ポリリジン 50.3%	デキストリンを含む

各濃度にプレート3枚を用い，結果は，平均値で示した．統計解析は，Kruskal-Wallis検定[9]を行い，更にMooreら[10]のプログラムによる回帰分析を行った．両検定において有意な場合，変異原性は陽性とした．

結果及び考察

10種の天然食品添加物のAmes試験による結果を表2に示した．本試験における各試料の最高濃度を決定するために，試料原料の濃度が10mg/プレート前後となるような濃度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た．しらこたん白抽出物，ツヤプリシン及びε-ポリリジンは，抗菌性が見られたため1mg/プレート以下での試験となった．

ムラサキトウモロコシ色素は，4菌株においてS9の添加に関わらず復帰コロニーが増加した．菌株により異なるが，2-5倍の増加であった．ペクチン分解物は，TA98のS9添加を除く他の菌株で復帰コロニーに増加が見られ，対照群の1.5-5倍であった．また，カカオ色素のTA97 S9無添加及びTA100 S9無添加，スピルリナ色素のTA102 S9添加，タマリンド色素のTA102 S9無添加及びベニコウジ色素のTA100 S9無添加，TA102のS9添加及びS9無添加においてもわずかではあるが，復帰コロニー数の増加が見られた．

ムラサキトウモロコシ色素及びペクチン分解物の場合には，4菌株において変異原性が検出されたこと，対照群の2倍以上の用量相関を伴う増加であることから，明らかに変異原性陽性であると考えられた．ペクチン分解物については，S9を添加することにより変異原性は少し減少するようであった．この2種類の添加物に見られた変異原性は，10mg以下では検出されないことから，陽性対照に用いている既知変異原に比べれば弱い変異原性である．

また，カカオ色素，スピルリナ色素，タマリンド色素及びベニコウジ色素については，限られた菌株での復帰コロニー数の増加であり，対照群の2倍には達しなかった．しかし，これらの増加は統計的には有意であり，用量相関を伴い，再現性もあることから，陽性と判断した．ただし，いずれもかなりの高用量であることから，その変異原性は非常に弱いものあろう．

ラック色素，しらこたん白抽出物，ツヤプリシン及びε-ポリリジンについては，復帰コロニーが増加しなかったことから陰性であると考えられる．

今回試験した10種類の天然添加物のうちいくつかの化合物は，Ames試験が実施されている．カカオ色素[11,12]及びベニコウジ色素[12,13]に陽性の報告が見られ，一方，ツヤプリシン及びε-ポリリジンについては陰性の報告[15]が見られた．これらについては，今回の我々の結果に一致するものであった．

ラック色素は，変異原性陰性で，石館ら[15]及びBanerjeeら[16]の報告と同様であったが，安井ら[13]はラック色素の主成分であるラッカイン酸について陽性の報告をしている．これらの差は，試料の違いに起因するものと思われる．

表2－1．天然食品添加物のAmes試験における変異原性

化合物名	溶媒	用量 (mg/プレート)	TA97		TA98		TA100		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
カカオ色素	DW	30	249[1)]*	124	20	17	178*	118	224	238
		20	211	130	21	20	172	108	230	255
		10	156	132	19	19	136	105	195	257
		5	146	157	14	18	112	116	177	297
		1	138	162	16	24	106	130	196	318
		0	138	181	17	31	104	120	161	287
スピルリナ色素	DW	10	124	99	21	50	116	157	197	456*
		5	120	113	16	38	125	151	197	438
		1	111	140	22	27	112	125	181	343
		0.5	128	167	18	30	123	128	166	330
		0.1	101	179	19	31	118	122	170	296
		0	138	181	17	31	104	120	161	288
タマリンド色素	DW	30	90	117	12	14	89	115	188	283
		20	93	131	11	13	96	113	210	315
		10	107	134	10	17	101	106	243	279
		5	119	166	22	21	140	161	316*	328
		1	150	166	16	21	131	133	247	326
		0	122	179	18	31	153	145	191	307
ベニコウジ色素	DW	30	114	139	23	23	147*	143	341*	567*
		20	117	163	25	19	139	141	317	589
		10	115	156	19	29	135	152	317	495
		5	148	155	21	25	112	176	244	346
		1	134	162	16	31	110	176	213	379
		0	128	178	16	29	115	125	202	344
ムラサキトウモロコシ色素	DW	30	474*	483*	71*	168*	249*	249*	535*	757*
		20	337	432	53	133	186	218	452	597
		10	196	332	29	76	133	200	311	513
		5	167	228	25	69	108	176	255	403
		1	138	184	23	39	127	151	216	421
		0	128	178	16	29	115	125	202	344
ラック色素	DMSO	10	67	146	14	24	87	128	125	297
		5	112	134	19	20	97	130	95	312
		1	124	125	16	25	111	135	180	253
		0.5	143	142	20	26	99	140	158	361
		0.1	124	161	20	31	118	106	179	304
		0	121	147	18	33	95	118	179	239

表2-2．天然食品添加物のAmes試験における変異原性

化合物名	溶媒	用量 (mg/プレート)	TA97		TA98		TA100		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
しらこたん白抽出物	DW	1	154[1)]	196	14	28	119	109	86	245
		0.5	145	188	21	29	136	132	101	246
		0.1	155	192	21	26	129	125	123	292
		0.05	146	180	21	28	124	117	131	307
		0.01	163	198	21	27	120	143	171	333
		0	150	187	21	27	121	124	188	326
ツヤプリシン	DMSO	0.1	2	3	2	6	11	8	3	4
		0.05	3	43	13	14	16	22	2	47
		0.01	119	160	20	28	147	147	237	319
		0.005	125	169	20	28	126	142	214	326
		0.001	128	184	20	22	118	132	207	355
		0	141	204	20	34	124	136	199	335
ペクチン分解物	DW	30	438*	331*	15	32	668*	297*	253	475
		20	426	234	44	32	512	213	281*	507*
		10	247	205	53*	31	262	192	266	459
		5	175	187	36	29	196	177	220	417
		1	156	194	20	27	134	148	231	354
		0	131	180	15	26	134	147	186	342
ε-ポリリジン	DW	1	10	1	12	22	88	110	0	30
		0.5	8	21	15	23	109	112	5	76
		0.1	48	144	21	25	101	122	23	148
		0.05	97	181	19	24	129	140	59	197
		0.01	125	159	19	32	125	142	153	319
		0	131	180	15	26	134	147	186	342
陽性対照										
−S9										
9-アミノアクリジン	DMSO	50 μg	675±187 (n=6)[2)]							
2-ニトロフルオレン	DMSO	5 μg			662±62 (n=6)		902±78 (n=5)			
3-メチルコラントレン	DMSO	0.5 μg							2361±224 (n=6)	
+S9										
2-アミノアントラセン	DMSO	5 μg	2141±346 (n=6)		2701±320 (n=6)		3368±512 (n=5)		1193±285 (n=7)	

1)：復帰コロニー数／プレート（プレート3枚の平均値）.
2)：平均値±標準偏差，nは実験回数.
＊：Kuraskal-Wallis検定で有意（$P<0.05$）及びMooreらの相関・回帰分析で有意（$P<0.01$）.

4菌株に明らかな変異原性が見られたムラサキトウモロコシ色素及びペクチン分解物の変異原については明らかではない．ムラサキトウモロコシ色素に関しては，峰谷ら[13]がトウモロコシが原料のコーン色素で陽性の報告をしている．各色素の主成分は，コーン色素がカロチノイド系の黄色で，ムラサキトウモロコシ色素がアントシアン系の紫色と異なっている[17]．このことから変異原性は，色素以外の成分によるのかもしれないと考えられるが，植物体に含まれているフラボノイドが変異原性を有する[18,19]ことが知られており，ムラサキトウモロコシ色素の場合は，フラボノイドに類似の構造であるアントシアニンが変異原性を有する可能性も考えられる．

今回試験したペクチン分解物は，酵素分解物であり，変異原性が認められた．一方，ペクチンそのものの変異原性は，陰性と報告[20]されており，更に，条件は異なるが，ペクチンの加熱分解物が変異原性を示すことが報告[21]されている．これらのことから今回の試料に見られた変異原は，分解物を製造する過程において生成したのかもしれないと考えられる．今後の検討課題であろう．

これまでに行われてきた添加物のAmes試験においては，TA98及びTA100が中心に用いられてきた．今回の試験では，Amesら[5-7]が後から開発したTA97及びTA102を試験に加えた．試験の結果では，スピルリナ色素及びタマリンド色素においてTA102にのみ弱い変異原性が検出された．このことは，これらの菌株の使用により今までに検出されていない変異原性が検出できる可能性が示されたと考えられる．

ま と め

10種の天然食品添加物についてAmesの試験株TA97，TA98，TA100及びTA102を用いた変異原性試験を行った．ムラサキトウモロコシ色素及びペクチン分解物では4菌株に変異原性が見られた．カカオ色素，スピルリナ色素，タマリンド色素及びベニコウジ色素では1-2の菌株において弱い変異原性が検出された．その他の4種類については変異原性は見られなかった．

謝辞 天然添加物の入手にご協力戴いた日本食品添加物協会の石井健二氏及び試料を提供して戴いた添加物製造各社に感謝いたします．

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) 広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：東京衛研年報，**47**, 175-181, 1996.
5) Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.：*Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
6) Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., et al.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
7) Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
8) 矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**, 1178-1189, 1975.
9) 石居 進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館.
10) Moore, D. and Felton, J. S.：*Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
11) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., et al.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
12) 安井陽子，武田信幸，逸見希子，他：食品衛生学雑誌，**23**, 86-90, 1982.
13) 峰谷紀之，滝澤行雄，河村太郎，他：トキシコロジーフォーラム，**8**, 91-107, 1985.
14) 祖父尼敏雄，宮部正樹，石崎睦雄，他：変異原性試験，**2**，19-28，1993.
15) 石館 基，滝澤行雄，坂部美雄，他：トキシコロジーフォーラム，**9**，628-633，1986.
16) Banerjee, T. S., Bhaumik, G., Yu, C.-L., et al.：*Fd Chem. Toxic.*, **22**, 677-679, 1984.
17) 厚生省生活衛生局食品化学課編：食品添加物総覧，183-255，1989，食品化学新聞社.
18) Sugimura, T., Nagao, M., Matsushima, T.,et al.：*Proc. Japan Acad.*, **53**, Ser. B, 194-197, 1977.
19) Czeczot, H., Tudek, B., Kusztelak, J., et al.：*Mutation Res.*, **240**, 209-216, 1990.
20) Prival, M. J., Simmon, V. F. and Mortelmans, K. E.：*Mutation Res.*, **260**, 321-329, 1991.
21) Kuroda, M., Yoshida, D. and Mizusaki, S.：*Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1893-1895, 1985.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 314-319, 1996

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3報*）
自己免疫疾患マウス(MRL/l)における
腎糸球体病変の病理組織学的検査結果

坂本義光**, 長澤明道**, 矢野範男**, 湯澤勝廣**,
青木直人**, 佐々木美枝子**

Study on the Effect of Rokumi-gan using Expermental Model Mice for Human Disease (Ⅲ*)
Histological Finding in Renal Glomerular Lesions in Autoimmune MRL/1pr Mice

YOSHIMITSU SAKAMOTO**, AKEMICHI NAGASAWA**, NORIO YANO**,
KATSUHIRO YUZAWA**, NAOTO AOKI** and MIEKO SASAKI**

MRL/1 mice spontaneously develop autoimmune disease. The effects of Rokumi-gan, a Chinese medicine, on renal glomerular lesions of MRL/1 mice were histologically examined. MRL/1 mice were fed a diet containing 0% (control), 0.4% and 3.6% Rokumi-gan for 13 weeks. 0.4% Rokumi-gan corresponds to a therapeutic dose for humans. The number of animals was 9 males and 9 females in control group (0%), 8 of each sex in 0.4% and 3.6% groups.

The severity of glomerular lesions in male mice of the 3.6% group was lower than that in the mice of the control and of the 0.4% group. It seems that Rokumi-gan has a tendency to suppress the occurence of autoimmune glomerular lesions in male mice.

Keywords：漢方薬 chinse medcine, MRLマウス MRL mice, 糸球体病変 Glomerular lesions, 13週間投与試験 13 week feeding test

緒　　言

六味丸の有効性など生物学的効果を検討することを目的として，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，投与後のマウスの生存率，血液・血清生化学検査値，臓器重量については前回報告した[1]．MRLマウスは加齢にともない糸球体腎炎，間質性肺炎，血管炎，関節炎などの自己免疫病変を発現し，自己免疫疾患の発現機構に関する研究や薬物のスクリーニングに用いられている[2-5]．今回は MRL マウスで見られるこれらの病変のうち腎糸球体病変に注目し，その発現に対する六味丸の作用について組織学的に観察し，得られた結果を報告する．

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/Mjp 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．

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．

腎重量の測定：実験終了後，エーテル麻酔下で大腿部

---

*第2報，東京衛研年報，**46**，225－231，1995

**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

動静脈の切断により放血屠殺し，左右の腎を摘出秤量した．

組織標本の作製，観察：摘出した左右の腎は10%緩衝ホルマリンで固定し，常法によりパラフィン切片を作製HE染色，PAS反応を行った．糸球体病変の観察には左腎を縦軸方向に最大割面がでるよう薄切したPAS染色切片を用い，個々の腎について50～60個の糸球体を観察し，最も多く見られた病変をその個体での病変とした．

結　果

腎重量：実験終了時生存例の重量をTable 1に示した．

雄投与群では0.4%群は対照群と比べ同様な値を示したが，3.6%群では絶対重量，相対重量ともにやや小さかった．雌投与群では0.4%群および3.6%群とも対照群と同様で，一定の傾向を示す変化はなかった．

組織学的観察：対照群，投与群に共通して，メサンギウム(MG)細胞の増生およびMG基質の増加した糸球体が組織全体に亘って認められた．変化の程度は個々のマウスや同一腎の糸球体によって多少差が見られた．糸球体係蹄における変化の範囲は正常と同様なものから糸球体全体に及んでいるものまで見られた(Fig. 1-3)．変化の見られた糸球体では，上皮細胞の腫大および係蹄の一部に毛細管基底膜の軽度な肥厚をともなっている例が多く，また好中球の存在やエオジン好性物の沈着なども認められた．変化が糸球体全体におよんでいる様な程度の強い例では細胞成分の増加に比べMG基質成分の増加が勝っている例も多く，糸球体のボーマン嚢への癒着，血管腔の消失，エオジン好性物質の沈着などの変化も多く見られた．さらに雌では以上の変化に加えてボーマン嚢上皮細胞の層状性の増生による半月体形成を見る例が多く，腎小体周囲における線維の増生やリンパ球の浸潤も認められた(Fig. 4)．そのほか雌雄でメサンギウムの変化の程度は弱いが毛細血管基底膜の肥厚の目立つ糸球体がすべてのマウスで散見されたがその割合はいずれも全糸球体中10%以下であった．以上の結果から糸球体における変化をその程度の差から以下のように4段階に分類した．すなわちMG細胞および基質の変化に基づきgrade 1；正常に近い軽度な変化(normal or minimal changes, Fig. 1)，grade 2；糸球体の一部(小葉性，segmental)に見られる変化(moderate mesangial lesions, Fig. 2)，grade 3；糸球体全体(global)におよんでいる変化(sever mesangial lesions, Fig. 3)の3段階に，さらに半月体の形成(Fig. 4)を伴うものをgrade 4とした．

Table 2は上記4段階の分類に基づき，各投与群の糸球体の変化の発現例数を雌雄べつにみたものである．

前報[1]で示したように実験では雄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)あった．今回の報告では途中死亡例も同様に観察した．

雄では対照群，投与群の全例で観察した糸球体の80%

Table 1. Body weight and kidney weight of MRL/1 Mice

Group[a]	No. of mice	Body weight (g)	Kidney weight (mg)	
			Right	Left
Male				
Control	9	50.2±4.4[b]	427± 31[d] (857± 95)	421± 33 (842± 83)
0.4%	8	51.4±4.0	426± 69 (829±119)	436± 72 (849±130)
3.6%	8	50.9±3.7	394± 41 (778±102)	393± 47 (778±134)
Female				
Control	8	44.2±3.0	311± 34 (707± 86)	303± 42 (687± 95)
0.4%	6	43.7±8.2	313± 46 (723± 47)	323± 47 (746± 50)
3.6%	5	45.1±1.7	318± 36 707± 77	328± 31 727± 73

a) Mice in each group were fed 0(control), 0.4, 3.6% Rokumi-gan in diets.
b) Absolute mean weight±SD, c) Relative mean weight (mg/100 g Body wt.) ±SD

Table 2. Incidence and Severity of Histological Lesions in Renal Glomeruli of MRL/1 Mice

Group	No. of mice examined	Severity[a]			
		1	2	3	4
Male					
Control	9	0[b]	4	5	0
0.4%	8	0	3	5	0
3.6%	8	0	7	1	0
Female					
Control	8(1)[c]	0	0	7	1(1)
0.4%	6(2)	0	1	4	1(2)
3.6%	5(3)	0	0	4	1(3)

a) Grade : 1 ; normal or minimal changes, 2 ; moderate mesangial lesions, 3 ; severe mesangial lesions, 4;crecsent formation
b) Number of mice with lesion.
c) Number in parenthes show numbers of mice that died before the termination.

以上にMGの増殖および基質の増加が認められた．変化の強さを各群で比較すると対照群および0.4%群では小葉状(grade 2)と全体的(grade 3)がほぼ半々の割合であった．3.6%群では推計学的に有意ではなかったが，程度の弱い変化(grade 2)を示す糸球体の割合が8例中7例と多かった．またTableには示していないが半月体形成が見られる糸球体が対照群の1例に4%の割合で見られた．一方雌では雄同様メサンギウムの増殖性および硬化性の変化が主であったが雄に比べ病変が糸球体全体におよんでいる例がほとんどであり，さらに半月体の形成が見られる糸球体が多かった．grade 4と判定した例は各群の生存例に各1例，また途中死亡例の対照群1例，0.4%群2例，3.6%群3例のすべてのマウスでも半月体形成(grade 4)が顕著であった．半月体の形成は生存例でgrade 3と判定したマウスでも見られ，その例数は対照群7例中5例，0.4%群4例中2例，3.6%群5例中3例で，半月体の形成が見られた糸球体は観察した糸球体の2-37%であった．雌生存例では病変の発現，その程度には対照群と比べ六味丸の作用に関しては明らかな傾向は見られなかった．

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週間摂取実験を行い，MRLマウスに特徴的な腎糸球体病変の発現に対する六味丸の作用について組織学的に観察した．MRLマウスの腎炎についてHewickerら[3]は組織学的に，focal glomerulonephritis (GN)，diffuse GN，membranoproliferative (MP) GN，crescentic GNおよびmembranous (Mem) GNの5つのタイプに分類している．このうち，メサンギウム(MG)細胞の増生およびMG基質の増加による糸球体病変(いわゆるMGの増殖性，硬化性病変)はMRLマウスに最も顕著に見られる腎病変であり，この変化が観察した糸球体の80%以下に見られる場合はfocal GN，それ以上に見られる場合をdiffuse GNと分類し，さらに半月体形成が観察した糸球体の80%以上に見られる病変をcrescentic GNとしている．Hewickerら[3]は1～24ヶ月齢までのMRLマウスの糸球体病変を観察した結果，4～5ヶ月齢ではほとんどのマウスでの変化はdiffuse GNに分類される病変であり，さらに5ヶ月齢の雌では半月体の形成を示す糸球体腎炎の発現が見られ，この変化が雌で多発することを報告している．

今回の実験で観察された糸球体病変のうちgrade 1-3の変化は基本的には同じ性質の病変でdiffuse GN，grade 4はcrescentic GNに相当すると考えらる．また，観察したマウスの年齢は18週齢で，Hewickerら[3]によって報告されている4-5ヶ月齢での結果とよく一致してる．Hewickerらはさらに進行した腎炎としてMPGNとMem GNをあげているが，発現率は非常に低く，今回の実験でも同様に観察されなかった．

MRLマウスにおける糸球体腎炎は糸球体への免疫複合体の沈着が原因となって発現することが知られている[3,6]．今回の実験ではこのような免疫機能異常によって起こる糸球体腎炎の発現に対する六味丸の作用に注目した．その結果投与に関連して雄では腎重量がやや小さく，また組織変化の軽減傾向が見られた．六味丸には尿の排出異常や浮腫などの症状を改善するいわゆる利水・利尿作用があり臨床的に応用されている．佐藤ら[7]は六味丸散剤および六味丸の成分生薬の牡丹皮に腎尿細管において水再吸収にかかわるNa-K ATP ase活性を阻害作用があり，これが六味丸の利水作用のメカニズムの一つと考えている．腎重量の減少傾向に関しては六味丸の作用によって糸球体腎炎における腎の浮腫性の変化の改善が考えられる．しかし糸球体のメサンギウムの増殖性および硬化性病変の軽減傾向がこのような六味丸の利水作用とどの様に関連しているかは不明である．

これら利水作用のメカニズムとともに六味丸投与後の腎尿細管や間質の組織変化や糸球体における免疫複合体の沈着などの変化についても観察する必要がある．

六味丸の有効性に関して，ラットによる投与実験にお

いても六味丸が腎障害誘発物質によって起こる尿細管変性や，自然発生病変として多発する慢性腎症の発現を軽減かする傾向のあることが報告されいる[8,9]．今回の結果を含め以上の動物実験の結果は六味丸の作用を反映したものと考えられる．雌の投与群の生存例における六味丸の作用は対照群と比べて差がなかった．途中死亡は雌対照群，投与群に12週齢時より見られ，いずれも半月体形成の顕著な腎炎であった．一般に腎炎や他の免疫機能異常の結果生じる病変や死亡の発生は雄に比べ雌でより早期に発症しすることが知られている[2,10]．六味丸の作用にみられた雌雄差はこの様な免疫機能異常が雌で早期にまた顕著に発現することを反映したものと思われる．

文　献

1）坂本義光，安藤　弘，池田虎雄，小縣昭夫，他：東京衛研年報，**46**，225-231，1995

2）B.S. Andrews, R.A. Eisenberg, A.N. Theofilopoulos S.Izumi, et.al.：*J.Exp. Med.*, **148**, 1198-1215, 1978

3）M. Hewicker and G. Troutwein：*J.Vet. Med.B.*, **33**, 727-739, 1986

4）T. Koizumi, Y. Nakano, T. Matsui, T. Nakagawa, et.al.：*Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **77**, 396-404, 1985

5）上出利光：第12回和漢医学会大会要旨集，pp128, 1995

6）G.J. Kolaja and P.E. Fast：*Vet. Pathol.*, **19**, 663-668, 1982

7）佐藤かな子，長井二三子，牛山慶子，安田一郎，加納いつ：薬誌，**111**，138-，1991

8）藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，他：東京衛研年報，**42**，235-242，1991

9）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

10）MRL/MpJUmmCrj-lpr マウスの生物学的特性，1989 日本チャールス・リバー

Explanation of figures

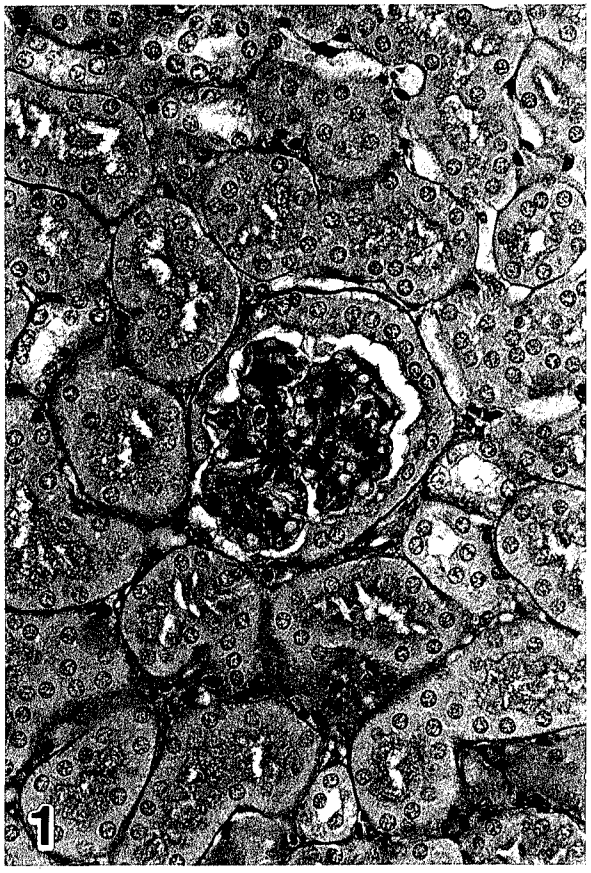
Fig. 1-4 are paraffin sections stained with PAS.

Fig. 1 Minimal changes (grade 1) in male control MRL/l mice. ×280

Fig. 2 Moderate mesangial lesions (grade 2) in male MRL/l mice of 3.6% group. Segmental enlargement of mesangial area and proliferation of mesangial cells. ×280

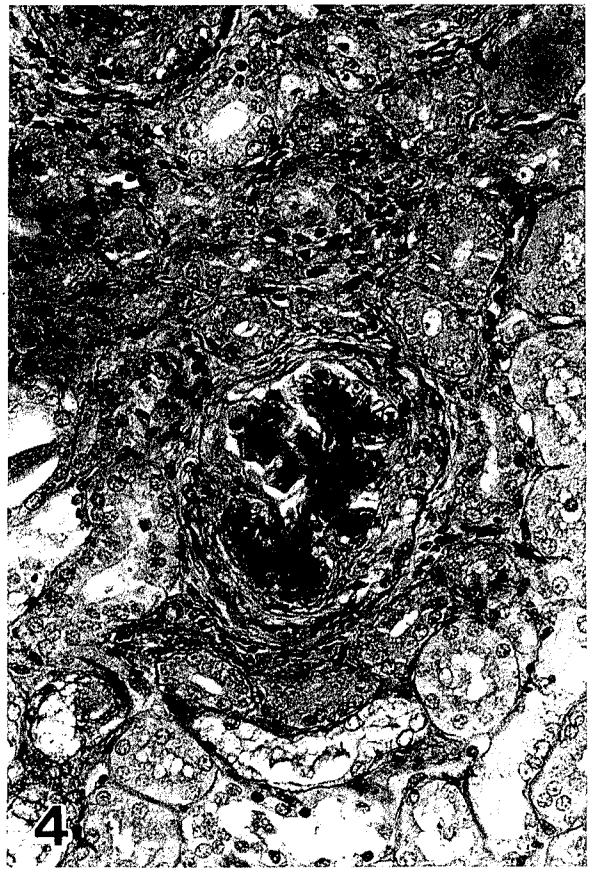
Fig. 3 Severe mesangial lesions (grade 3) in male MRL/l mice of 3.6% group. ×280

Fig. 4 Crescent formation (grade 4) in femal MRL/l mice of 3.6% group. ×280


1

2

3


4

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 321-323, 1996

全胚培養法を用いた当帰芍薬散のマウス胚子に及ぼす影響

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*,
青木直人*, 佐々木美枝子*

Effects of Tokishakuyaku-san on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*,
NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

To study the effects of Tokishakuyaku-san on mouse embryos, the whole embryo culture was carried out. On day 8 of gestation (plug day=day 0), CD-1 (ICR) mouse embryos were explanted and cultured for 48 hrs. After 24 hrs from the start of culture, the cultured mouse embryos were directly exposed to the medium containing 0 (control), 40, 400, 4000 μg/ml of extract of Tokushakuyaku-san (TS). Dead embryos were not observed in any group exposed to TS.

Yolk sac diameter, blood circuration of yolk sac, crown-rump length of embryo, number of somites and heart beats and the shape of embryos were used as parameters for the development of conceptus including embryo. No retardation or anomalies were observed in any group exposed to TS. Embryos with malformations were not detected in this study.

These results suggested that TS had no teratogenic effects in mouse whole embryo culture.

Keywords：マウス mouse, 全胚培養 whole embryo culture, 当帰芍薬散 tokishakuyaku-san

はじめに

東洋医薬は長い年月にわたるヒトへの使用の結果処方されてきており，一般的に考えられている毒性は排除されつつ今日にいたっているものと推測されるが，使用する際の安全性に対する科学的根拠に基づく情報の乏しいのが現状である．本試験に被検物質として選んだ当帰芍薬散は主として産科領域において用いられ，妊娠貧血や妊娠中毒の改善，分娩時間の短縮，流・早産経験者の無事分娩など安胎作用が認められており[1-4]，最近の東洋医薬志向を背景に今後臨床使用が増すと推測される方剤の一つである．しかしながら，その生殖毒性に関する安全性については，油田ら[5]のラットを用いて行った催奇形性について陰性の報告はあるが情報はきわめて少ない．

一方，今日化学物質の発生毒性を検索する試験は in vivo で行うことが推奨されている．しかしながら，in vivo での試験は多数の実験動物を必要とするうえに，多大の労力と時間を要し，かつその毒性発現の機序を確認しにくいことなどから，さらに簡便で能率的な試験法の開発が望まれている．また，動物愛護の立場からも，動物個体の使用数を最少に留め，有効な情報が得られるような試験法の研究が注目されている．現在，発生毒性検索のための in vivo に代わる in vitro でのさまざまな試験法が提案されている中で，哺乳動物の胚子を母体外に取り出し，生存発生させる全胚培養法は in vivo に最も近似した方法として位置づけられている[6]．

今回，衛生局東洋医学事業の一環として，漢方方剤・生薬を臨床使用する際の安全性に対する科学的情報を提供することを目的として，マウス全胚培養法を用いた当帰芍薬散の胚子に及ぼす影響について検討した．

実験材料及び方法

1．実験動物

妊娠6日齢(膣栓確認日妊娠0日)の Crj：CD-1(ICR)

*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

マウスを日本チャールスリバー㈱より購入，実験に供した．動物は培養開始まで換気毎時10回(HEPAフィルター経由)，温度23-25℃，湿度45-55%，照明12時間に制御された飼育室にて，固型飼料(CE-2：日本クレア製)と水(滅菌フィルター経由水道水)を自由に摂取させた．

2．培養方法

妊娠8日目にエーテル麻酔下で，母動物から胚子および受胎副産物を子宮ごと取り出し，次いで，子宮壁より胚子および受胎副産物を脱落膜に包まれた状態で摘出した．その後胎盤から脱落膜を，羊膜から脱落膜，栄養芽細胞層・ライヘルト膜を順次剝離除去し，胚子および胚子に付随する羊膜，卵黄嚢ならびに胎盤を完全な状態で培養系に移した．培養液は3 mg/mlのグルコースを添加したラットIC血清(Immediately centrifuged serum)を0.45 μmのミリポアフィルターで濾過滅菌したものを用いた．

培養には回転式胎児培養装置(池本理化㈱)を用い，1胚子1培養瓶2.5ml血清とし，37℃，25rpmで回転培養した．気相には20% O_2，5% CO_2，75% N_2の混合ガスを使用し，培養開始から24時間までは毎分20ml，その後培養終了まで(24時間)は毎分30mlの流量で連続的に培養瓶に供給した．

3．被検物質および暴露方法

実験に用いた当帰芍薬散は㈱ツムラに委託し芍薬4，蒼朮4，茯苓4，沢瀉4，当帰3，川キュウ3，の割合の処方より抽出した乾燥エキス末を購入，使用した．エキス末は10，100，1000mg/mlの割合で滅菌蒸留水に懸濁し，その10 μlを培養瓶に滴下し，24時間胚子に暴露した．これは培養液1 ml当たりのエキス末量40，400，4000 μgの濃度に相当する．

4．観察項目

胚子の観察及び測定は全て実体顕微鏡下にて行った．卵黄嚢径と心拍数は培養開始時(妊娠8日)，24時間後(妊娠9日)および48時間後(妊娠10日)に測定した．卵黄嚢血液循環の観察は培養開始24時間と48時間後に，胚子の頭臀長，体節数の測定および形態観察は培養開始48時間後に行った．

結果および考察

本実験ではマウスの妊娠8日に培養を開始し，24時間後(妊娠9日)に被検物質を投与，24時間暴露した後(妊娠10日)胚子の発育と形態異常の有無を観察した．結果を表1に示した．invivoでの正常に発育した妊娠10日齢の胚子は30-40体節，頭臀長は3－5 mmほどの大きさになっており，尾側神経孔は完全に閉鎖している．形態的には胚子は背方に突出する方向で屈曲しており尾端は頭部の右側に横たわりその形がアルファベットのGに似ていることから通常G型と呼ばれる．前肢芽は完全に突出してみられ，後肢芽も明瞭に隆起として認められる．鰓弓は3つまでが明瞭に区別できる．卵黄嚢はよく形成さ

Table 1. Effects of Tokishakuyaku-san on the development of mouse embryos

Dose of Tokishakuyaku-san	0 μg/ml (cont.)	40 μg/ml	400 μg/ml	4000 μg/ml
Number of embryos observed	10	15	15	15
start (day 8 of gestation)				
Yolk sac diameter (mm) *	2.2±0.3	2.2±0.3	2.2±0.4	2.2±0.3
Number of heart beats/min.*	41.4±11.4	44.0±11.9	42.9±9.0	46.4±17.9
24hrs (day 9 of gestation)				
Yolk sac diameter*	3.8±0.4	3.8±0.4	3.8±0.3	3.9±0.4
Number of heart beats*	102.2±25.9	105.5±15.4	118.9±18.8	113.3±12.0
Blood circuration of YS	+	+	+	+
48hrs (day 10 of gestation)				
Yolk sac diameter*	5.4±0.5	5.5±0.5	5.5±0.6	5.4±0.5
Crown rump length of embryos*	5.1±0.2	5.1±0.3	5.1±0.3	5.0±0.3
Number of heart beats*	79.0±46.4	70.9±42.2	71.1±47.2	63.8±41.7
Number of somites*	30.5±2.2	30.9±1.8	30.3±1.9	30.9±1.8
Blood circuration of YS	+	+	+	+
Shape of embryo	G	G	G	G

*Mean±S.D.

れた血管網をそなえており心拍動にあわせた血液循環がみられる.

これに対し，当帰芍薬散乾燥エキス末を投与した今回の実験では，何れの投与群(40, 400, 4000ug/ml)とも対照群(蒸留水のみ投与)と比べ上述したような発育に関しての遅延は認められず，また形態異常も観察されなかった．胚子の生死の判定は，心拍動ならびに胚子の体循環が停止しているものを死亡胚子としたが，対照群も含め，エキス末投与群の何れの群にも死亡胚子を認めなかった.

投与したエキス末の最高濃度である4000 μg /ml血清は蒸留水で懸濁できる限界で，これ以上の投与には他の方法を考慮しなければならない.

全胚培養法による安全性評価について，岩瀬ら[7]は催奇形性，非催奇形性物質をふくめた20種類の化合物についてラット胚子全胚培養法を用いて検討し，in vivo 試験での結果と比較している．その結果，ラット全胚培養における催奇形性の検出感度は100%，特異性は78%であり，in vivo の成績と高い相関性のあることを示し，全胚培養法が化学物質の催奇形性検出方法として有効な手段の一つであることを報告した．今回，われわれの用いたマウス全胚培養法はラットに比べ胚子が小さく取り扱いが困難なため，本法を用いた催奇形性に関する実験報告が少なく，in vivo 試験との相関性をラットでの結果ほど明確にできない．しかしながら，齧歯類を用いた in vivo 催奇形性試験と全胚培養法による結果を推計学的に検討し，その有効性について述べている中島の報告[8]では，マウスを用いた in vivo 試験で陽性のものはマウス全胚培養法での結果も陽性であることが示されている．また，これまでわれわれがマウスを用いた in vivo 試験で催奇形性を認めた Thiabendazole, Urethan, Piperonyl butoxide, all-trans Retinoicacid では今回行ったと同様の方法による全胚培養法で催奇形性を示しいる(未発表)．これらの成績はマウス全胚培養法が数多くの化学物質の催奇形性を検討する上で，in vivo 試験を行う前のスクリーニング法として有用であることを示唆するものである.

以上を考慮すると，今回行ったマウス全胚培養法による結果は当帰芍薬散エキス末の妊娠マウスに対する催奇形性の可能性は少ないことが示唆された.

今後は化学物質の代謝も加味しながら本培養法に改良を加え，in vitro 発生毒性の評価系として確立していきたい.

文　献

1) 江口勝人，高知利勝，和田志保子，他：産科と婦人科，**47**(7)，1157-1162，1980.

2) 今泉英明，山辺紘猷，経塚光夫，他：周産期医学，10(8)，1287-1291，1980.

3) 田川清和，小川郷美，河野　実，他：産婦人科の世界，**31**(9)，1010-1017，1979.

4) 吉元昭治：産科と婦人科，**45**(11)，1720-1724，1978.

5) 油田正樹，秋山喜彦，市尾義昌，他：応用薬理，**23**(6)，981-987，1982.

6) 東海林隆次郎：毒性試験講座11，発生毒性　1991，地人書館，東京

7) 岩瀬隆之，水野英子，池田保男：Mitsubishi Kasei R & D Review，**5**(1)，92-99，1991.

8) Nakashima K.：AATEX, vol.**3**, 9-16, 1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 324-336, 1996

漢方方剤六味丸の長期毒性試験

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 Testing of Rokumi-gan in Rats by Dietary Administration for 30 Months

TAKASHI FUJII*, HISATOSHI MIKURIYA**, NORIO YANO**, KATSUHIRO YUZAWA**,
AKEMICHI NAGASAWA**, YUKIE TADA**, NOBUTAKA FUKUMORI**, TORAO IKEDA**,
HIROSHI TAKAHASHI**, YOSHIMITSU SAKAMOTO** and MIEKO SASAKI**

Toxicity or efficacy of Rokumi-gan (Liu-Wei-Wan), Chinese medicine, was investigated in F344/DuCrj rats of both sexes throughout their lifespan. Groups of 50 rats of each sex at 8 weeks of age were fed one of 4 pellet diets, either the basal diet (C group) or basal diet containing 0.4, 1.2 or 3.6% Rokumi-gan (L, M or H group) for 130 weeks. The survivals of C, L, M and H groups at 130 weeks after the beginning of the administration were 24, 18, 28 and 30%, respectively, in the males and 36, 28, 34 and 40% in the females. The range of mean intakes of the Rokumi-gan (mg/kg BW/day) of L, M and H groups were 120～244, 360～780 and 1116～2232 in the males and 140～276, 420～876 and 1368～2556 in the females. No significant changes in the observation of the behaviour, weighing body or organs, examination on hematology or serum chemistry were found in the treated rats.

There were no compound-related deaths or pathological lesions among the exposed rats. Under the conditions of this study, there is no evidence of toxic activity of Rokumi-gan in rats of both sexes.

Moreover, it is suggested that Rokumi-gan may inhibit the occurrence of some kind of spontaneous disease in the rat.

Keywords：漢方薬 Chinese medicine, 六味丸 Rokumigan：Liu-Wei-Wan, 130週間 (30カ月) 毒性試験 130 weeks toxicity test, ラット rats

緒　言

東京都は，都民が豊かで充実した人生をおくるためには，自分の健康は自分で守るとの自覚が必要であり，生涯を通じて健康を維持することが基本的条件であると提起している．このため，公私一体となった健康づくりの基盤確立を目指して，自然および社会環境の整備を行っている．さらに，保健医療の施策の一つとして，都では都民の関心が高い東洋医学の活用を企図した．しかし，東洋医学医療は近代西洋医学に比べ，理論的，科学的根拠が少ないとされていたことから，その有効性を検証するため，昭和63年度，衛生局に「東洋医学検討会」を設置した．検討会には，漢方方剤および生薬(以下，漢方薬とする)の有効性，安全性を臨床研究，薬理研究および品質管理研究など多面的に検討することを目的として

*東京都立衛生研究所多摩支所　190　東京都立川市柴崎町3－16－25
*Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16-25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan
**東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 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

研究グループがつくられた.

グループでは,厖大な種類の漢方薬から,老人性疾患に多用され[1,2],動物実験では加齢に伴う動脈硬化の発症を防止する[3]との報告がある六味丸散剤(以下,六味丸と略す)を共通の被検薬剤として取り上げた.

著者らは六味丸の安全性と有効性評価とを分担研究とし,若年ラットによる13週間投与試験[4]およびラット泌尿器系の毒性物質との併用投与試験[5]を行った.この結果,短期間投与では六味丸には明らかな毒性はなく[4],ラットに膀胱癌,腎臓障害などの誘発作用を有するオルトフェニルフェノール[6-8]との併用では,この作用を,やや軽減する効果が示唆されたことを報告した[5].六味丸をラットに18カ月齢から26カ月齢まで8カ月間連続して投与した結果,中年期からの連用による安全性は高いものの,自然発生腫瘍の抑制,寿命の延長などの明らかな有効性は認められなかった[9].

今回は,六味丸をラットの若年期から老年期まで,ほぼ全生涯にわたり連続投与し,安全性および有効性を検討,結論を得たので報告する.

実験材料と方法

被検物質: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13週間投与試験[1]と同一ロット(Lot No.900830;ウチダ和漢薬株式会社,東京)の薬剤を用いた.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,当所低温薬品庫にて4℃で保管された.

実験動物と飼育環境:F344/DuCrj ラット雌雄(日本チャールス・リバー,神奈川)各200匹を4週齢で購入し,バリア飼育室にて,基礎飼料CE-2(日本クレア,東京)と水道水とを自由に摂取させ,7週齢まで飼育した.ラット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匹づつ収容した.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.

投与方法および用量:投与は,長期間の連続投与であることから,添加飼料摂取による経口投与とした.投与用量は,前回の13週間および8カ月投与試験で[4,9],ラットに明らかな障害が認められなかったことから,同一用量とした.すなわち,試験飼料への添加濃度は0.4%,1.2および3.6%に設定した.

試験飼料の作製:試験飼料の製造は日本配合飼料(株)知多工場に依頼し,粉末飼料CE-2(日本クレア,東京)に各設定濃度で添加,混合し,固形飼料化したものを購入した.試験飼料は,2カ月毎に作製し,使用するまでは4～10℃の冷蔵飼料庫に保管した.

投与群および期間の設定:ラットが8週齢になった時点で,雌雄別に体重による層別化後,無作為に各試験群に割り付けた.試験群は,雌雄とも各群50匹のラットで構成し,上記の試験飼料を摂取させる4群を設定,合計400匹を用いた.ラットが8週齢から138週齢まで,130週間(2年6カ月間)試験飼料を摂取させ,投与終了後1週間は各群とも基礎飼料を与えた.投与期間中,的確な肉眼および組織所見を得る目的で,ラットは死後変化が混入しないよう,死亡解剖ではなく,可能な限り瀕死状態で発見し,エーテル麻酔下にて剖検を実施した.

一般状態検査:瀕死,死亡および異常行動の有無の検査,被毛,可視粘膜の観察は1日2回,1週間に5日行った.土,日曜日および祝日の観察は午前1回とし,死亡例は冷蔵保存した.体重は全ラットを測定,摂餌および摂水量(重量)の測定は各群とも無作為に選別した10匹について,それぞれ投与開始後104週目まで行った.測定は開始後13週目(3カ月)までは毎週1回,その後26週目(6カ月)までは2週毎,以後104週目(2年)までは4週毎に1回の間隔で,合計39回実施した.摂餌および摂水量測定の際は,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1週間,ラットを基礎飼料で飼育し139週齢で,全生存例の解剖を行った.ラットにエーテル麻酔を施し,大腿静脈より採血,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,白血球数,ヘモグロビン量,ヘマトクリット値およ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,平均赤血球血色素量,平均赤血球血色素濃度を算出した.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:解剖時に得た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 Analyzer 7150(日立)を用いて,アルブミン量,アルカリフォスファターゼ活性,アミラーゼ活性,総ビリルビン量,直接ビリルビン量,カルシウム量,コリンエステラーゼ活性,総コレステロール量(CHO),遊離型コレステロール量(F-CHO),エステル型コレステロール量(E-CHO),クレアチンフォスフォキナーゼ活性,クレアチニン量,γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性,グルコース量,グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT),グルタミン酸ピルビ

ン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)，リパーゼ量，燐，ロイシンアミノペプチダーゼ活性，乳酸デヒドロゲナーゼ活性，燐脂質量，中性脂肪，総蛋白量，尿酸量および尿素窒素量を測定した．

病理学的検査：投与期間終了後，生存例は前述のごとく麻酔下で放血屠殺し，肉眼的検索を行った．途中死亡および瀕死屠殺例(以下，死亡例とする)も，生存例と同様に処置した．脳，心臓，肺，胸腺，脾臓，肝臓，腎臓，副腎，精巣，前立腺，子宮，卵巣は摘出し，器官重量を測定した．この他，顎下腺，舌下腺，耳下腺，食道，胃，大・小腸，膵臓，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，摂餌および摂水量，血液および血清生化学的検査および臓器重量等の測定値の検定は，Bartlett 検定法を用い，分散の均一性について検定し，分散が一様であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った．また，分散が非一様であれば Kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位和検定を行った．組織学的検査では，変化の出現率を Fisher's exact test を用いて検定した．危険率は全て５％においた．

結　　果

Table 1 に示すごとく，生存率は投与開始後104週目(２年)ではC群(対照群，０％添加飼料摂取)が雄76％，雌68％，雌雄各投与群が72～90％であった．投与終了時(２年６カ月)ではC群が雄24％，雌36％，雌雄各投与群が18～40％であった．投与開始後1年以内の死亡はL群(低投与群，0.4％添加飼料摂取)雌１例，M群(中投与群，1.2％添加飼料摂取)雄１例，雌２例，H群(高投与群，3.6％添加飼料摂取)雌２例であった．死亡例の平均生存期間はC群と各投与群との間に差はみられなかった．

投与開始後１，52(１年)および104週目(２年)の各群の平均体重値をTable 1 に示した．雌雄ともC群と投与群との間に大差無く，有意差は認められなかった．C群の平均体重を100とした投与群の相対値は，52週目が雄ではL群100％，M群99％，H群98％，雌ではL群97％，MおよびH群98％，104週目が雄ではL群96％，MおよびH群99％，雌ではLおよびM群97％，H群98％であった．C群に比べ投与群の体重増加はごく軽度に抑制されていたが，投与濃度に比例した増強または減弱傾向はみられなかった．体重増加をFig. 1 でみてみると，104週目ま

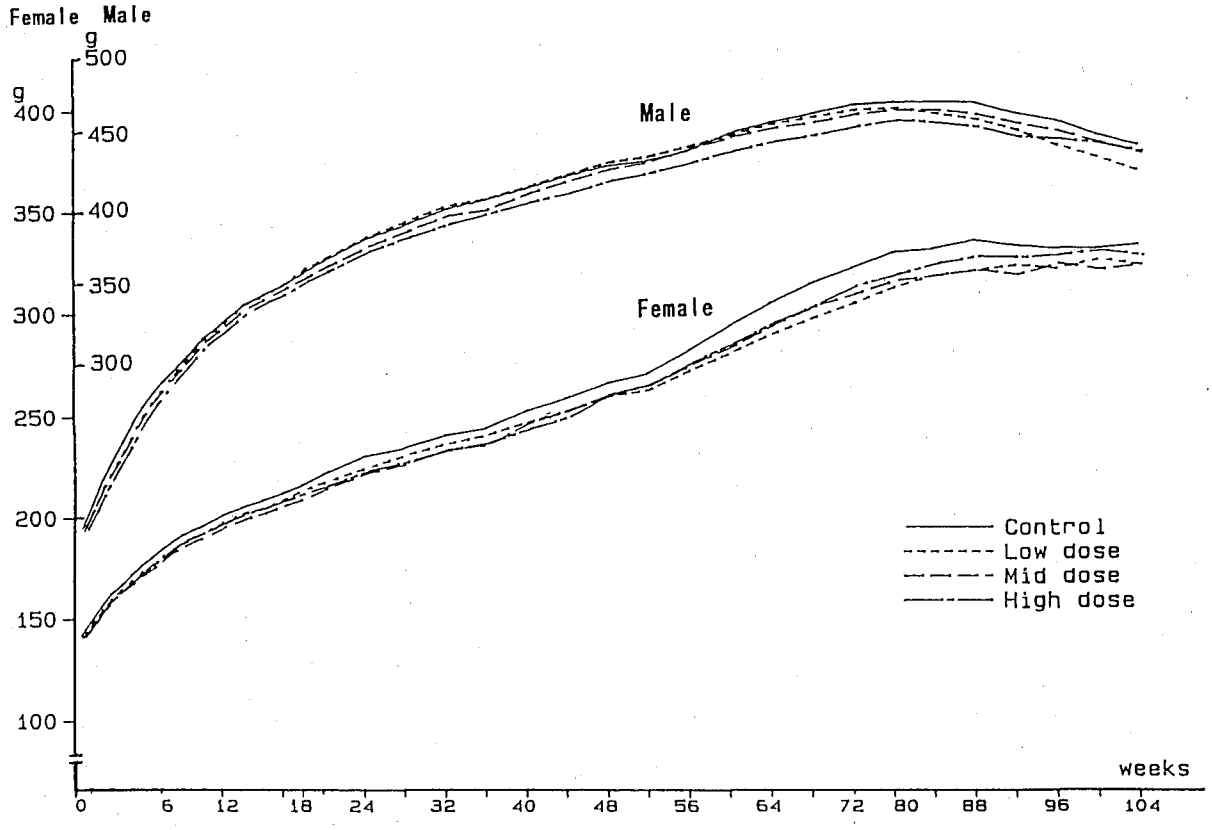


Fig. 1 Body Weight Changes in Male and Female Rats

Table 1. Survival and body weight changes.

Group[1]	Survival[2] at wk			First death[3]	Survival time of dead rats[4]	Mean body weight[5] at wk		
	52	104	130			1	52	104
Male								
C	100	76	24	79	110±14(38)	193±17(50)	431±37(50)	443±45(38)
L	100	72	18	81	111±12(41)	191±16(50)	433±40(50)	425±44(37)
M	98	72	28	45	107±20(36)	193±16(50)	428±36(49)	438±28(36)
H	100	90	30	84	115±10(35)	192±14(50)	421±27(50)	438±57(45)
Female								
C	100	68	36	79	107±17(32)	141±10(50)	267±26(50)	335±37(34)
L	98	76	28	39	108±17(36)	141±9(50)	260±25(49)	324±40(38)
M	96	78	34	45	106±20(33)	141±8(50)	261±23(48)	324±37(39)
H	96	76	40	45	101±21(30)	141±9(50)	261±24(48)	329±41(38)

1) Rats in each group were fed 0(C), 0.4(L), 1.2(M) or 3.6%(H) Rokumi-gan in diets. 2) Survival rate(%, Mean± SD) at the week 52(1 year), 104(2 years) and 130(2.5 years:end of the administration). 3) Experimental weeks of the first rat found dead. 4) Mean experimental weeks of the dead rats on each group (parenthesis shows numbers of dead rats). 5) Mean body weight(g, Mean± SD), parenthesis shows numbers of rats weighed)

Tabel 2. Daily consumption of food and water.

Weeks[1]	2	12	24	52	77	104
Food consumption						
Male[2]						
C	62± 8(10)[3]	42± 5(10)	38± 4(10)	34± 3(10)	31± 3(10)	37± 3(8)
L	61± 8(10)	44± 2(10)	38± 2(10)	34± 3(10)	30± 2(10)	35± 4(5)
M	65± 7(10)	42± 4(10)	40± 4(10)	34± 4(10)	30± 3(10)	37± 4(7)
H	62± 6(10)	42± 4(10)	39± 4(10)	34± 4(10)	31± 4(10)	37± 2(9)
Female[2]						
C	67±11(10)	50± 5(10)	50± 5(10)	45± 9(10)	37± 5(10)	47± 7(4)
L	69±12(10)	53± 8(10)	51± 6(10)	43± 6(9)	35± 3(9)	46± 6(4)
M	73±12(10)	51± 5(10)	52± 5(10)	44± 5(10)	35± 4(9)	41± 6(9)
H	71±13(10)	50± 6(10)	49± 4(10)	44± 7(10)	38± 4(8)	41± 4(5)
Water consumption						
Male						
C	90±25(10)	56±10(10)	49± 9(10)	46± 9(10)	45±14(10)	65±13(8)
L	90±11(10)	56± 7(10)	49± 9(10)	44± 5(10)	47± 6(10)	85±21(6)
M	87±10(10)	55± 7(10)	48± 5(10)	44± 4(10)	41±10(10)	63±19(8)
H	87± 7(10)	57± 4(10)	50± 5(10)	44± 7(10)	45±12(10)	63±12(9)
Female						
C	110±26(10)	83±18(10)	75±11(10)	64±10(10)	62±16(10)	93±17(4)
L	116±31(10)	90±21(10)	81±25(10)	63±14(9)	68±10(9)	100±20(4)
M	117±37(10)	97±25(10)	75±12(10)	60±10(10)	55±11(9)	74±26(9)
H	107±20(10)	82±17(10)	74±13(10)	57± 7(10)	52±10(8)	74±21(5)

1) Experimental weeks after the begining of the administration. 2) Rats in each group were fed 0(C), 0.4(L), 1.2(M) or 3.6% Rokumi-gan in diets. 3) Mean±SD(g/kgBW/day, parenthesis shows numbers of rats weighed)

での投与期間を通してC群および投与群雌雄ともに順調な増加であった．増加の推移にも，C群と投与群の間，投与各群との間に差異は認められなかった．

摂餌および摂水量の変動をTable 2 に要約した．雌雄各群の平均摂餌量は各測定時とも近似しており，投与期間に比例して漸減した．摂水量は摂餌量と同様の変動を示したが，測定例数が減少した投与開始後18カ月以降は，各群間でのバラツキがみられた．

摂餌量を基礎に六味丸の投与量(mg/kg体重)を概算したところ，雄のL群120～244，M群360～780，H群1116～2232，雌のL群140～276，M群420～876，H群1368～2556，の変動幅を示した．

血液学的検査の結果をTable 3 に示した．C群に比べ，投与群雄の血小板数は多く，M群では有意であったが，

Table 3. Summary of hematological examination.

Group[1]		C	L	M	H
No. of male rats[2]		12	9	14	15
RBC[4]	(10^6/mm^3)	7.18±1.74[3]	8.29±2.13	6.92±1.65	7.22±1.91
WBC[5]	(10^3/mm^3)	12.0±11.7	15.5±24.4	9.5±7.4	15.2±26.7
Hemoglobin	(g/dl)	12.6± 2.8	13.9± 2.9	10.7± 2.2	12.3± 3.5
Hematocrit	(%)	38.8± 7.8	42.4± 8.5	34.6± 5.6	38.7± 9.5
Platelet	(10^3/mm^3)	783±255	922±254	1320±518*	1076±450
MCV[6]	(μ^3)	54.9± 5.4	53.5±12.8	51.3± 6.6	54.2± 8.3
MCH[7]	($\mu\mu$g)	17.7± 1.2	17.5± 3.8	15.8± 2.2	17.1± 2.3
MCHC[8]	(%)	32.3± 1.3	32.8± 1.2	30.8± 1.9	31.6± 2.3
Differential of leukocytes (%)					
Neutrophils		52.5±18.2	50.1±18.0	57.6±14.0	53.6±15.9
Lymphocytes		35.7±18.7	36.9±16.8	38.2±14.2	33.9±13.9
Monocytes		2.1±1.2	2.3±1.1	2.1±0.8	2.2±1.4
Eosinophils		0.9±1.6	0.8±1.1	0.5±0.7	1.1±1.7
Others		9.2±21.5	9.9±29.7	1.6± 2.7	9.3±23.4
Group[1]		C	L	M	H
No. of female rats[2]		18	14	17	20
RBC[4]	(10^6/mm^3)	7.43±1.27[3]	8.16±0.90	7.19±2.12	7.92±1.10
WBC[5]	(10^3/mm^3)	7.4±6.8	5.8±2.7	11.2±11.5	9.4±11.5
Hemoglobin	(g/dl)	14.2± 2.5	15.1± 1.5	13.6± 3.5	14.8± 1.7
Hematocrit	(%)	42.6± 5.9	45.0± 4.2	41.3± 8.5	44.3± 4.2
Platelet	(10^3/mm^3)	648±199	638±122	752±337	644±218
MCV[6]	(μ^3)	57.9± 4.9	55.3± 2.1	60.7±13.7	56.4± 3.7
MCH[7]	($\mu\mu$g)	19.1± 1.4	18.6± 0.7	19.4± 2.8	18.7± 0.9
MCHC[6]	(%)	33.1± 2.1	33.6± 0.7	32.5± 2.6	33.3± 1.1
Differential of leukocytes (%)					
Neutrophils		49.5±15.7	49.4±10.2	53.4±18.7	53.9±16.7
Lymphocytes		42.6±17.2	42.9±14.3	42.8±18.0	38.1±17.3
Monocytes		1.9±1.6	2.6±1.6	2.6±1.7	2.8±2.0
Eosinophils		1.3±1.2	1.9±1.3	0.5±0.9	0.8±1.0
Others		4.7±15.2	3.1±11.5	0.8±1.5	4.4±18.5

1) Rats in each group were fed 0(C), 0.4(L), 1.2(M) or 3.6%(H) Rokumi-gan in diet. 2) No. of rats without leukemia from survived rats examined in each group. 3) Mean ± SD. 4) Red blood cell count. 5) White blood cell count. 6) Mean corpscular volume. 7) Mean corpscular hemoglobin. 8) Mean corpscular hemoglobin concentration.
*Significant differences to the control ($P<0.05$).

投与濃度に比例した増加ではなかった．その他の検査項目では雌雄とも著変は認められなかった．

血清生化学検査の結果を要約してTable 4示した．C群との間に有意差を生じた項目はみられなかった．投与群雄ではC群に比べ，CHO，F-CHOおよびE-CHOの低下がみられ，L群で明らかであった．雌においてもLおよびM群で同様の変化がみられたが，H群の値はC群とほぼ同等であった．この他，C群に比べ，GOTおよびGPTの低下がM群雄，中性脂肪の上昇がMおよびH群雄，中性脂肪の低下が雌の全投与群，尿素窒素の上昇がMおよびH群雌に，それぞれ認められた．これらは，いずれも投与濃度に比例した変動ではなかった．

臓器重量測定の結果は腫瘍頻発臓器を除き，要約してTable 5に示した．また，乳腺腫瘍の発生が当該例の体重に影響し，各群の解剖時体重を大きく変動させたことから，体重比重量を割愛し，絶対重量のみを掲げた．雄では，C群に比べ投与群の心臓重量が軽度に増加，肝臓重量が中等度に減少していた．雌では，全投与群の肝臓重量が軽度に増加していた．これらの変動は，いずれも投与濃度に比例した一定傾向は示さなかった．

腫瘍は，Table 6に示すように多くの臓器組織に発生し，腫瘍を認めなかったラットは，雄では全体で2例，雌では各群2～7例であった．腫瘍を持たないラットの出現数は，対照群と投与群との間で差はなかった．悪性腫瘍を持つラットの数をみると，雄ではC群と投与群との間に大差ないが，雌では投与群でやや少なかった．こ

Table 4. Summary of biochemical examination of serum.

Group[1]		C	L	M	H
No. of male rats[2]		12	9	14	15
Total cholesterol	(mg/dl)	186±47[3]	148±51	160±44	156±63
F-cholesterol[4]	(mg/dl)	54±16	45±22	47±22	50±32
E-cholesterol[5]	(mg/dl)	132±32	103±31	113±24	106±35
CPK[6]	(IU/l)	546±263	641±197	696±366	579±244
GOT[7]	(IU/l)	138±117	108± 84	79± 18	197±436
GPT[8]	(IU/l)	60±18	68±44	49±10	63±53
GOT/GPT ratio		2.09±1.16	1.74±0.83	1.67±0.35	2.14±1.50
LDH[9]	(IU/l)	744±355	922±373	878±272	1080±848
Phospholipid	(mg/dl)	324± 90	275± 91	298± 91	291±112
Trigliceride	(mg/dl)	274±278	246±171	309±240	300±281
Urinary nitrogen	(mg/dl)	44.5±30.7	33.5±15.0	35.1±14.2	35.5±20.4
Group[1]		C	L	M	H
No. of female rats[2]		18	14	17	20
Total cholesterol	(mg/dl)	195±90[3]	138±49	162±59	196±82
F-cholesterol[4]	(mg/dl)	61±30	41±17	49±18	61±29
E-cholesterol[5]	(mg/dl)	134±60	98±32	113±43	135±54
CPK[6]	(IU/l)	1300±558	1365±521	1262±501	1085±745
GOT[7]	(IU/l)	133± 87	146± 77	153±153	135±100
GOT[8]	(IU/l)	81±31	73±24	78±27	82±41
GOT/GPT ratio		1.58±0.62	1.95±0.64	1.90±1.17	1.62±0.80
LDH[9]	(IU/l)	755±166	785±237	872±417	720±228
Phospholipid	(mg/dl)	371±140	269± 93	315±106	358±140
Trigliceride	(mg/dl)	242±182	175±132	159±177	204±247
Urinary nitrogen	(mg/dl)	24.3± 9.8	20.4± 4.8	28.9±29.0	31.5±35.1

1) Rats in each group were fed 0(C), 0.4(L), 1.2(M) or 3.6%(H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean ± SD. 4) Free cholesterol. 5) Esterified cholesterol. 6) Creatine phosphokinase. 7) Glutamic oxalacetic transaminase. 8) Glutamic pyruvic transaminase. 9) Lactic dehydrogenase.

*Significant differences to the control ($P<0.05$).

Table 5. Summary of organ weight.

Group[1]		C	L	M	H
No. of male rats[2]		12	9	14	15
Brain	(mg)	2159±66[3]	2161±56	2166±69	2171±75
Heart	(mg)	1184± 98	1226±144	1325±228	1202±146
Lung	(mg)	1527±308	1676±546	1720±484	1506±299
Liver	(g)	16.46±3.73	14.03±3.06	15.60±2.30	14.26±1.87
R. Kidney	(mg)	1581±177	1468±187	1638±224	1502±103
Group[1]		C	L	M	H
No. of female rats[2]		18	14	16	20
Brain	(mg)	1987±52	2023±105	1973±70	1983±82
Heart	(mg)	987±119	978±95	964±98	990±149
Lung	(mg)	1161±229	1145±202	1181±278	1140±243
liver	(g)	11.30±1.99	11.40±2.21	12.31±6.03	12.52±3.61
R. kidney	(mg)	1180±166	1164±101	1205±134	1201±166

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6% (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats weighed each organ. 3) Absolute weights (Mean±SD).

の雌での例数減少は投与濃度に伴う変動ではなかった．悪性腫瘍のうち，単核球性白血病は雌ではC群に比べM群が有意に少なく，MおよびH群も低い発生であった．雄では明らかな差はなかった．この他の悪性腫瘍は，C群および投与各群に1，2例散発してみられた．頻発した良性腫瘍は，雌雄の下垂体腺腫，甲状腺のC-細胞腺腫，副腎の褐色細胞腫，膵臓の島細胞腫，乳腺の腺腫および線維腺腫，雄では，精巣の間細胞腫，雌では，子宮内膜ポリープであった．このなかで，下垂体腺腫は雄ではC群に比べH群が有意に少なく，投与濃度に比例した発生頻度の低下がみられた．雌では雄よりも多発したが，C群と投与群との間に明らかな差はなかった．甲状腺のC-細胞腺腫は，雄では投与群にやや多発したが投与濃度に依存した発生ではなかった．膵臓の島細胞腫は，雌雄ともC群よりも投与群で低頻度の発生であったが，濃度に伴う低下は示さなかった．包皮腺および陰核腺の腺腫は投与群で多発したが，投与濃度に比例した増加ではなかった．この他の多発腫瘍では，投与群とC群との間で発生率に有意差はなく，投与濃度との関連も認められなかった．

非腫瘍性変化は，多彩で多くの臓器組織に観察されたが，主要臓器および腫瘍頻発臓器の増殖性変化など主な変化のみをTable 7に示した．多発したのは，肝臓の肝細胞増殖巣，小胆管増殖，門脈周囲線維化，微小肉芽，腎臓の慢性腎症[19]，心臓の局所性壊死および線維化，脾臓のヘモジデリン沈着，膵臓の局所性外分泌腺萎縮であった．雄の心臓における局所性壊死はC群に比べ，発生率は高く，変化程度が増強されていたが，投与濃度に依存した所見ではなかった．慢性腎症の発生率および程度には，何れも投与濃度に関連した増強または軽減は認められなかった．このなかで，L群雌はC群を含む各群に比べ変化が軽度である例が多く認められた．その他の臓器における変化の発生率および程度には，何れも投与濃度に関連した増強または軽減は認められなかった．

考　察

本試験で用いた六味丸散剤は各種理化学試験の結果，充分満足できる品質であり，均一に混和されていると確認された[10]．本剤は漢方薬としての有効性を検討する目的に合致する薬剤と認められる．本剤に含まれる有害物質の検索で，農薬では総BHCが0.017ppm検出され，その他の農薬およびかび毒は検出限界以下であった[11]．現在，野菜，果実に対する総BHCの残留農薬基準は0.2ppm以下であり[10]，今回検出された濃度では直ちに生体に害作用を及ぼすとは考え難い．残留放射能は^{134}Csおよび^{137}Csの検出合計値が2 Bq/kg以下と，食品での暫定限度値の370Bq/kgを大きく下回っていたことから[11]，健康に害を与えないと推定される．これらのことから，本剤に含有されている上記の有害物質が六味丸の安全性検索に影響し，評価を混乱させる危険性は極めて低いと考えられる．

投与期間中，ラットに明らかな感染性疾病は発生しなかった．投与開始後104週目，112週齢におけるC群雌雄

Table 6. Summary of occurrence of neoplasms.

Groups[1] / No. of rats[2]	Male				Female			
	C 50	L 50	M 50	H 50	C 50	L 50	M 50	H 50
No. of rats with tumors	50	49	49	50	48	48	43	46
No. of rats with malignant tumor(s)	10	14	12	9	14	8	7	10
Liver								
Neoplastic nodule	1	0	1	1	0	0	0	0
Fore stomach								
Papilloma	1	0	1	0	0	0	0	1
Small intestine								
Leiomyoma	1	0	1	0	0	2	0	2
Large intestine								
Adenoma	1	0	1	0	0	0	0	0
Leiomyoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Pancreas								
Acinar cell adenoma	0	1	0	0	0	0	0	2
Acinar cell carcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Pancreatic islets								
Islet cell adenoma	19	13	11	16	7	5	6	3
Pituitary gland								
Adenoma	22	21	15	10*	31	31	29	29
Adenocarcinoma	1	1	1	0	0	0	0	0
Thyroid gland								
Follicular cell adenoma	0	0	1	1	1	1	0	1
Follicular cell carcinoma	1	0	1	0	0	1	0	0
C-cell adenoma	7	13	10	15	8	3	8	8
Adrenal cortex								
Cortical cell carcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Adrenal medulla								
Pheochromocytoma	10	7	13	11	4	5	3	2
Malignant pheochromocytoma	1	1	0	0	0	0	0	0
Ganglioneuroma	1	0	1	0	1	0	0	0
Hematopoietic organs(all site)								
Mononuclear cell leukemia	6	10	6	8	12	5	2*	7
Skin								
Neurofibroma	0	0	0	0	0	0	1	0
Squamous cell papilloma	1	2	0	0	0	0	0	0
Basal cell carcinoma	0	1	0	0	1	0	0	0
Trichoepithelioma	0	1	0	1	0	0	0	0
Subcutis								
Fibroma	2	1	1	1	0	0	0	0
Fibrosarcoma	1	1	1	1	0	0	0	0
Lipoma	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemangioma	0	0	1	0	0	0	0	0
Malignant fibrous histiocytoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Brain								
Astrocytoma	0	0	1	0	1	1	1	0

Table 6. Summary of occurrence of neoplasms (continued).

Groups[1)]	Male				Female			
	C	L	M	H	C	L	M	H
Mammary gland								
Adenoma	5	4	5	2	13	14	5	15
Fibroadenoma	11	5	4	7	3	4	7	5
Preputial/clitoral gland								
Adenoma	1	5	7	3	2	5	4	7
Squamous cell carcinoma	0	0	0	0	1	0	1	1
Testis								
Interstitial cell tumor	46	43	40	46	—	—	—	—
Uterus								
Adenoma	—	—	—	—	0	1	0	0
Adenocarcinoma	—	—	—	—	0	1	1	0
Endometrial stromal polyp	—	—	—	—	7	11	4	11
Leiomyoma	—	—	—	—	1	0	0	1
Leiomyosarcoma	—	—	—	—	2	0	1	1
Ovary								
Granulosa cell tumor	—	—	—	—	1	0	0	0
Lung								
Adenoma	2	6	5	1	1	2	2	1
Zymbal's gland								
Squamous cell papilloma	0	0	1	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma	0	1	1	0	0	0	0	0
Kidney								
Adenoma	0	0	2	0	0	0	0	0
Renal pelvis								
Transitional cell papilloma	0	1	0	0	0	1	0	0
Urinary bladder								
Transitional cell papilloma	0	0	0	0	2	0	0	1
Body cavities								
Malignant mesothelioma	0	0	1	1	2	0	1	0

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6% (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats examined microscopically. 3) No. of rats with lesions at the site.
* Significant differences to the control ($P<0.05$).

の生存率はそれぞれ約70%，投与終了時の138週齢では，雄24%，雌36%であった．著者らの蓄積データによれば，同一系統のF344/DuCrj ラットの109週齢時における無処置対照群の平均生存率は雄74% (63～86%)，雌79% (73～84%) で[13-15]，今回の生存率はこの範囲内である．これらから，本試験での実験動物の飼育環境および管理は良好であったと評価できる．

今回の薬剤投与量はヒトでの常用量180mg/kg体重/日をL群とし，9倍量をH群の用量となるように設定した．雌では，この設定と非常に近似したが，雄では投与開始後4カ月目以降はやや少なく推移した．しかし，投与期間を通しては雄においてもやや低い程度であり，設定に近い用量となった．投与量は各群間で添加濃度と同じく，ほぼ公比3で増加しており，投与は設定のごとく行われたと考えられる．

投与開始後104週目での投与群雌雄の平均体重はC群を100として96～99であり，最高でも4%の抑制である．すなわち，本試験で採用したヒト常用量の9倍量は過剰投与ではなく，ラットに腫瘍形成，疾病発生を促進させるような非生理的状態を現出させなかった．

Table 7. Summary of the observations of nonneoplastic lesions.

Groups[1] / No. of rats[2]		Male				Female			
		C 50	L 50	M 50	H 50	C 50	L 50	M 50	H 50
Heart									
Focal necrosis	[3]								
	+	2[4]	2	3	4	0	1	1	0
	++	2	6	4	5	2	0	2	0
Focal fibrosis	+	4	5	2	2	0	0	1	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	1
Spleen									
Hemosiderosis	+	9	9	6	10	11	10	18	4
	++	3	2	2	1	0	5	4	5
Liver									
Altered cell foci	+	4	6	8	6	9	9	6	6
	++	0	0	0	1	1	3	1	0
Focal necrosis	+	2	2	3	3	5	7	6	5
	++	6	5	4	7	5	2	0	1
Bile duct proliferation	+	16	20	17	21	16	21	16	15
	++	28	23	28	21	3	4	5	2
	+++	3	3	2	7	0	0	1	0
Periportal fibrosis	+	28	25	27	23	6	4	3	4
	++	1	3	1	5	1	0	0	0
Microgranuloma	+	8	7	5	4	14	11	12	14
	++	0	1	1	2	4	1	5	4
Glandular stomach									
Glandular ectasia	+	30	18	31	32	30	30	25	27
	++	5	9	3	4	2	4	1	5
Forestomach									
Ulceration	+	3	2	4	2	3	3	1	3
	++	6	2	1	5	2	2	1	0
Pancreatic islets									
Hyperplasia	+	0	1	0	0	0	0	0	0
	++	0	2	0	0	0	0	0	0
Pituitary gl.									
Hyperplasia	+	2	1	1	4	0	0	0	0
	++	1	1	1	4	4	2	0	0
	+++	1	0	0	0	0	0	0	0

以上のことから，本試験は長期間投与試験として成立しており，国際的規範[9]を満足させるものと評価できる．

投与終了時(138週齢，約32カ月齢）における生存率は，L群雌雄がC群に比べ有意ではないが低くなっていた．しかし，C群とL群との間で死亡ラットの平均生存期間に差は無く，L群に死亡の早期化は起こっていない．さらに，H群雌雄の生存率はC群を上回っていることから，L群雌雄の生存率の低下が六味丸の致死作用を示唆するものではないと考えられる．六味丸の中年期以後投与での影響を検討すべく，F344ラットに77週齢(18カ月齢)から8カ月間投与した試験(以下，8カ月間試験と略す)においても今回と同様に生存率の低下および生存期間の

Table 7. Summary of the observations of nonneoplastic lesions (continued).

Groups[1]		Male				Female			
		C	L	M	H	C	L	M	H
Thyroid gl.									
C-cell hyperplasia	[3]								
	+	0	2	2	5	2	2	0	0
	++	3	0	1	2	2	1	0	0
Adrenal gl.									
Medullary hyperplasia	+	1	1	0	4	0	0	0	0
	++	3	5	3	5	2	2	0	0
Mammary glands									
Hyperplasia of glandular	+	2	4	1	1	2	4	2	6
cells	++	3	0	1	1	3	8	2	6
	+++	0	1	0	0	0	1	0	1
Preputial/clitoral gl.									
Hyperplasia of glandular	+	1	0	0	0	2	0	0	0
cells	++	0	1	1	2	1	2	0	0
Testis									
Atrophy	+	2	2	3	1	—	—	—	—
	++	1	1	1	1	—	—	—	—
Lung	+	1	3	0	2	1	0	0	0
Hyperplasia of alveolar									
cells	++	1	2	1	1	1	1	0	0
	+++	0	0	1	1	0	0	0	0
Calcification of vascular	+	21	15	23	26	14	19	18	23
wall	++	2	2	6	2	1	1	0	0
Kidney									
Chronic nephropathy	[5]								
	1	0	0	0	0	1	3	2	1
	2	2	3	2	3	18	23	15	15
	3	11	12	13	9	19	15	17	15
	4	17	18	19	20	6	5	7	5
	E	19	17	15	18	6	2	7	9

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6% (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats examined microscopically. 3) No. of rats with lesion (s) at the site. 4) Severity of lesions: + slight, ++ moderate, +++ severe. 5) Grade in chronic nephropathy: 1 (grade 1) ~4 (grade 4) and E (end stage).

短縮は見られなかった[9]. すなわち，今回の結果は六味丸の長期間投与での安全性を再確認するものと評価できる.

H群雌雄，とくに雄の生存率がC群より高いことから六味丸の延命効果を期待させるが，有意な差ではないこと，投与量に比例した上昇ではないことから，有効であるとは認め難く，この効果を強調すべきではないと考える.

無処置対照群のF344ラットの体重は，雄では約80週齢，雌では約90週齢以降，横這いから減少に転じ[9,14-16]，自然発生疾病も頻発することが知られている. すなわち，加齢に伴う体重変化は定型的であり，老化の進行を概ね推定できる指標にもなり得る. 今回は，雌雄とも投与に関連した体重の変動はなく，増加の推移もC群と投与群との間に差異はみられなかった. 従って，体重変化を指標とした場合，六味丸は加齢の進行に影響を与えず，老化を抑制または促進させなかったと判断できる.

体重増加の推移をみると，用量に伴う変化ではないが，

投与群はC群に比べ1～4％と低率の増加抑制で終始しており，しかも摂餌量の減少は認められなかった．体重増加は成長期には成育，発達の指標であるが，周知のごとく中年以降は肥満とも表現される．このことから，六味丸の長期投与は生体にとって不必要な体重増加を制御する作用があるのではないかとも思わせる．

血液学的検査では，8カ月間試験でみられた貧血傾向[9]は無く，投与群雄で血小板数の増加が認められた．この増加は用量に依存しておらず，投与との関連は明らかではない．今回は8カ月間試験に比べ，加齢に伴なって生ずる個体間のバラツキがより顕著にみられた．この週齢では血液検査の成績を群として評価する意義を徒に重要視すべきではないことを示す結果と考えられる．

血清生化学検査では，中性脂肪が雄でやや高いが，雌では低く，さらに，コレステロール値および隣脂質は雌雄とも低下傾向を示している．これは加齢に伴う動脈硬化の発症を防止する効果がある[3]との報告を支持するものとも考えられる．ラットに5週齢から13週間，六味丸を強制経口投与した前回の13週間試験では，雌雄の最高投与群(3170mg/kg体重/日)で中性脂肪，コレステロール値および隣脂質が低下していた[4]．一方，8カ月間試験では反対にコレステロールなど血清脂質の増加が投与群雄にみられた[9]．血液検査と同様に今回の検査値を群として評価する危険性は考慮すべきであるが，前記の肥満抑制とも関連した変化であり，過小評価はできないと考えられる．

高齢時の臓器重量は腫瘍発生に大きく影響されるため，群としての平均値の変動を投与と関連づける際には慎重にすべきであろう．雌雄の肝臓重量の変動は軽度であり，用量-反応関係を示しておらず，肝細胞の組織変化は顕著ではなかった．従って，変動は障害作用の表現ではなく，酵素活性の変化などによる細胞レベルでの適応現象と推定される．雄の心臓重量の増加は投与用量に伴う変動ではないが，心筋の局所性壊死が投与群にやや多発したことから，明らかに関連が無いとは断言できない．

良性または悪性のどちらか，あるいは両方の腫瘍をもつラットの出現率(担癌動物数/群構成動物数)は投与用量に関連した変動を示さなかったことから，六味丸は個体レベルで，不特定の臓器組織において総体としての腫瘍誘発作用はないと考えられる．このなかで，用量相関および有意差はないが，雌では悪性腫瘍をもつラットの出現率の低下がみられている．これは後述する単核球性白血病の発生率の低下が大きな要因である．

臓器組織レベルで多発した腫瘍をみると，いずれも，F344ラットで加齢に伴い無処置対照群に出現する「自然発生腫瘍」として報告されている[13-15,18-20]．これら多発腫瘍の発生率および発生時期には用量-反応関係を伴う早期化および上昇はみられない．このなかで，前述の投与群雌での単核球性白血病の発生が4～14％，とくにM群は4％と有意な発生率の低下を示した．この腫瘍のF344ラット雌での自然発生率は14～20％であり[15,18-20]，これと比較してもやや低いことが分かる．M群雌では，この白血病に代替あるいは拮抗して多発した腫瘍も無いことから，機序は不明ながら六味丸による発生の抑制ではないかと推定され，今後さらに検討すべきと思われる．一方，この白血病は投与群雄ではやや多くみられ，C群との間に有意差はないがL群では20％(10/50)の発生率であった．この腫瘍は，F344ラット雄では24～34％の自然発生と報告されており[15,18-20]，L群の発生率もこの範囲に含まれている．すなわち，L群の発生率が高いのではなく，今回のC群が低かったことによる偽陽性 false positive と判断すべきであろう．良性腫瘍である下垂体腺腫の発生が投与群雄でC群よりも低く，H群雄は20％と有意に低率であった．この腫瘍は雄のF344ラットで，18～24％の自然発生であるとされており[15,18-20]，今回のC群雄の44％は異常に高い頻度と考えられる．このことから，六味丸投与によって本腫瘍の発生が抑制されたとは解釈するのは現時点では困難である．この他，雌雄ともにみられた膵臓の島細胞腫の発生率の低下も下垂体腺腫と同様の見方ができると思われる．

本試験で観察されたC群雌の白血病，雌雄の下垂体腺腫および雄の膵臓島細胞腫の発生はこれまでの蓄積データに比べ明らかに高率であった．これら腫瘍のC群での多発は前回の8カ月試験でもみられており．今回と同様に六味丸投与との関連を否定する考察を行った．しかし，今回と前回との結果が一致したことから，これら腫瘍のC群での高い発生率は偶発ではないとも考えられる．蓄積データでは雌雄とも115週齢までのラットを検索対象としている．これに対し，本試験および8カ月試験ではこれよりも約4カ月高齢での検索であり，この4カ月の生存延長期間に腫瘍が顕現化する可能性は否定できない．従って，蓄積データとの比較を根拠に，六味丸が腫瘍の発生を抑制しなかったと解釈することはやや短絡的であり，長期間投与し高齢に至った場合の有効性を示唆しているとの推察も成立するのではないか．

本試験でみられた非腫瘍性変化は，いずれもF344ラットでは加齢に伴い発現する「自然発生疾病」として記載されており[19-21]，投与群のみに発生した変化もみ

られない．さらに，頻発した肝臓，腎臓の組織変化も，C群と投与群との間で発生率に有意な差は認められなかった．このなかで，前述した投与群雄での心筋の局所性壊死を線維化の前駆像とし両変化を合算すると，C群との間の発生率に顕著な差は無くなる．これらから，六味丸は特異的に疾病を誘発することなく，自然発生疾病の発現も促進しなかったと考えられる．

慢性腎症の発生は前回の8カ月試験では，とくに雌で用量－反応関係をもって抑制されたが[9]，今回はこれを明らかに支持する結果ではなかった．しかし，L群雌ではC群に比べ，変化程度の軽減が認められている．同群で早期死亡が多発せずに，慢性腎症が多発，悪化する週齢まで生存していることから，若年死亡を原因とする発症例数および増悪例の減少ではない．今回も鮮明な結果を得られなかったが，六味丸の腎障害に対する有効性に関しては，今後も検討する必要があると考えられる．

謝辞 本研究にあたり，被検薬物の理化学的品質評価では，当所医薬品研究科の安田一郎氏，浜野朋子氏，有害物質の検討では，細菌第一研究科の和宇慶朝昭氏，細菌第二研究科の諸角　聖氏，食品研究科の観　公子氏，永山敏廣氏，水質研究科の上村　尚氏，多摩支所の田村行弘氏，真木俊夫氏に，それぞれ，多大なるご協力を頂きました．深く感謝致します．

文　献

1）李　長生：山東中医雑誌，**3**，25，1987.
2）原敬二郎：現代東洋医学，**9**(4)，11-14，1988.
3）Jiang Tingliang, Yan Shuchang, Zhao Liangfu, et al：癌と化学療法，**16**(4)，1511-1518，1989.
4）藤井　孝，三栗谷久敏，矢野範男，湯澤勝廣，長澤明道，多田幸恵，福森信隆，角　千代，佐々木美枝子：東京衛研年報，**42**，235-242，1991.
5）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.
6）Hiraga,K, and Fujii,T.：*Fd Chem.Toxic.*, **22**, 86 5-870, 1984.
7）Hiraga,K. and Fujii,T.：*Fd Cosmet.Toxicol.*,**19**, 303-310, 1981.
8）Fujii,T., Nakamura,K. & Hiraga,K.：*Fd Chem. Toxic.*, **25**, 359-362, 1987.
9）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.
10）安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，高橋奈穂子，瀬戸隆　子，渡辺四男也，秋山和幸，鈴木達夫，山川洋平：東京衛研年報，**42**，27-32，1991.
11）藤井　孝，佐々木美枝子，角　千代，長井二三子，佐藤かな子，藤田　博，小縣昭夫，吉田誠二，安田一郎，浜野朋子，田村行弘，上村　尚，真木俊夫，観　公子，永山敏広，諸角　聖，和宇慶朝昭：東京都衛生局学会誌，**86**，64-65，1991.
12）Sontag J.M., Norbert P.P. & Umbert S. (Eds.)：National Cancer Institute, Maryland, 1976.
13）Fujii,T., Mikuriya,H. & Hiraga,K.：*Fd Chem. Toxic.*, **29**, 771-775, 1991.
14）Fujii T. & Hiraga K.：*J. Saitama Medicai School*, **12**, 277-287, 1985.
15）Hiraga K. & Fujii T.：*Jpn. J. Cancer Res.* (*Gann*), 76, **79**-85, 1985.
16）山本利男，各務　進，額田久雄，井上博之：“フィッシャーラット”，Fischerラット研究会，pp33-41，1990.
17）谷本義文：実験動物の生物学的特性データ，田嶋嘉雄　監修，95-149，1989，ソフトサイエンス社，東京.
18）Maekawa A., Kurokawa Y., Takahashi M., Ogiu T., Onodera H., Tanigawa H., Ohno Y., Furukawa F. and Hayashi Y.：*Gann*, **74**, 365-372, 1983.
19）Goodman D.G., Ward J.M., Squire R.A. Chu K.C. and Linhart M.S.：*Toxic. Appli. Pharmaco.*, **48**, 237-248, 1979.
20）Coleman G., Barthold S.W., Osbaldiston G.W., Foster S.J. and Jonas A. M.：*J. Gerontology*, **32**, 258-278, 1977.
21）Sollveld H.A.,Haseman J.K. & McCnnell E.E.：*JNCI*, **72**(4), 929-940, 1984.

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

本章に関する調査研究として，論文４編と資料２編が掲載されている．内訳は公衆衛生情報に関する論文２編と資料２編及び試験検査の精度管理に関する論文２編である．

公衆衛生情報に関する論文の一編は，大気汚染の健康影響を継続的に監視するシステムに必要なプログラム作成とその評価を行ったものである．情報源として都立病院情報に着目し，患者発生数の集計プログラム，疾患分類プログラム，月補正，季節補正などの補正プログラム，回帰分析を用いたリスクアセスメントプログラム等をBASICを用いて作成した．疾患は呼吸器系の７疾患と対照としての高血圧疾患を選択している．２年間のデータを用いて作成したプログラムを評価した結果，発生数の時間的傾向は女子の慢性気管支炎について，大気汚染レベルの地域順が有意となったことを報告している．

公衆衛生情報に関する論文の他の一編は，衛生行政の企画立案を支援するための疾病動向予測システム(SAGE)を用いて，我が国の疾病特性を解析したものである．疾病として平均死亡率比が先進諸国の中で比較的高い男子の脳血管疾患と胃癌，および特に死亡者数の増加が著しい男子の肺癌を対象とした．年齢調整死亡率は，１)脳血管疾患については1965年で最高値を示し，以後減少に転じるていること，２)胃癌については1991年が1956年の約１/２に減少していること，３)肺癌については1959年以来増加傾向にあったものが1990年前後から頭打ちの状態になったことが解析されている．

試験検査の精度管理に関する論文の一編は，都区保健衛生連絡協議会として実施している精度管理事業のうち，1995年から開始した老人保健法の検査項目(中性脂肪，HDS-コレステロール，γ-グルタミルトランスフェラーゼ)についてまとめたものである．要約すると，１)中性脂肪については，半数以上の検査所が遊離コレステロール消去法を採用していた．測定値は消去法が非消去法に比べて低値であった．２)HDS-コレステロールについては，化学修飾酵素-硫酸シクロデキストリン複合系で測定する検査所が多かった．正確度は良好であった．３)γ-グルタミルトランスファーゼについては，測定法の違いによる系統誤差が観察された．以上，今回調査した３項目についてはおおむね良好な結果が得られたが，今後の課題として精度管理用試料の開発の必要性が述べられている．

試験検査の精度管理に関する論文のもう一編は，都内の登録衛生検査所を対象にアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)，アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)，アルカリホスファターゼ(ALP)，クレアチンキナーゼ(CK)，ラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)，γ-グルタミルトタンスペプチターゼ(γ-GT)，アミラーゼ(AMY)の７項目について行った外部精度管理調査をまとめたものである．測定機器については自動化が進み，測定法および使用する単位も統一されてきている．検査所間における測定値の変動はASTとALTについては減少傾向が認められたが，他の５項目については必ずしも改善されていない状況にあると結論されている．

公衆衛生情報に関する資料の一編はインターネットを利用した衛生研究所からの情報提供の可能性と運用上の問題点，更には衛生研究所の情報システムの今後の動向について述べたものである．インターネットの出現により，衛生研究所の微生物，医学，化学，毒性学等の各分野からの情報がリンクした，多面的情報システムの出現予測と，それを用いたこれまで以上の衛生行政支援の可能性を指摘している．

公衆衛生情報に関する他の資料は，インターネットによる情報収集についてまとめたものである．エボラ出血熱，狂牛病，クロプトスポリジウム，腸管出血性大腸菌O-157等，緊急課題が続出した結果，インターネット情報の有用性が認識された．ここでは感染症情報を中心に，CDCやWHO等へのアクセス例を紹介し，更にインターネット上でのMMWRやEIDの利用法，各種検索エンジンを用いた検索法にも触れている．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 339-347, 1996

大気汚染保健対策のための都立病院情報収集システムについて

牧野国義*

Information Systems Gathered from Metropolitan Hospitals for Health Measures to Air Pollution

KUNIYOSHI MAKINO*

Keywords：大気汚染 air pollution，病院記録 hospital record，都立病院 metropolitan hospital，患者発生数 number of morbidity，呼吸器疾患 respiratory disease，サーベイランスシステム surveillance system，コンピュータプログラム computer program，統計 statistics

緒　言

大気汚染などの居住環境条件による健康影響については，呼吸器疾患との密接な関連が知られている．この実態を把握する手段として，地域集団の死亡，疾病，症状などの健康状態が調査されるが，調査ではこれらの指標の地理的な発生頻度分布だけでなく，時間的な発生数の情報が必要になる．疾病指標は，死亡統計のように悉皆調査がなされず，また，標本調査としてのアンケート調査にも適さないため，一般的には情報収集が容易でない．それでも集団の健康状態を評価する上で疾病指標が重要なことから，大気汚染の健康影響に関して病院に入院した患者集団[1-3]，職場集団[4]，工場周辺地域[5,6]などの小集団について報告がみられる．しかしながら，これらは大気汚染などの影響の有無を問うており，影響の変動の監視を主旨としていない．

東京都衛生局では，大気汚染による健康影響に関するサーベイランスシステムの構築を目指しており[7]，そのために疾病についても継続的な情報収集と評価のシステム化が必要になる．既存の情報の中で，広域についての疾病情報としては，既に稼働している感染症サーベイランスシステムがあるが，大気汚染による健康影響の検討には適していない．他にも厚生省が実施する指定統計第66号の患者調査や第116号の生活基礎調査などがあり，全国的に調査されているが，ともに各呼吸器疾患に分類されていない，地域が都道府県単位，調査が3年に1度，などの理由から，これも主要な資料として利用することは困難である．一方，都立病院の患者情報についてはコンピュータによる情報管理がなされているが，従来サーベイランスシステムへの利用については考慮されず，その妥当性や手法についても検討されていなかった．しかし，疾患別患者の居住地，性，年齢，受診日などの情報が蓄積され，情報収集が比較的容易であるので，充分検討の価値があり，パイロットスタディを行ったところ，一定程度に有効利用が可能と推察された[8]．そこで，ここではシステム化のためのコンピュータプログラムについて検討した．

情報収集

1．都立病院からの情報収集

最新の都立病院の情報システムは平成5年度までに構築され，稼働するに至っており，その情報はすべて駒込病院のコンピュータが一括管理している．その情報内容は，①患者基本情報，②処方情報，③予約情報，④検査情報，⑤登録情報，⑥統計情報，⑦会計情報，⑧病歴情報，⑨給食情報である．その状況を図1に示した．平成5年以降の駒込病院以外の都立病院名は広尾，大塚，豊島，墨東，神経，府中，清瀬，松沢，大久保の各病院である．ただし，平成7年に荏原病院からの情報が加わる反面，同年途中から豊島病院からの情報が休止するなどの病院の事情による変化がある．

これらの情報の中で，サーベイランスシステムのうちの疾病についての健康モニタリングシステム（以下疾病モニタリングシステムと記す）に必要な情報は，図1中

*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

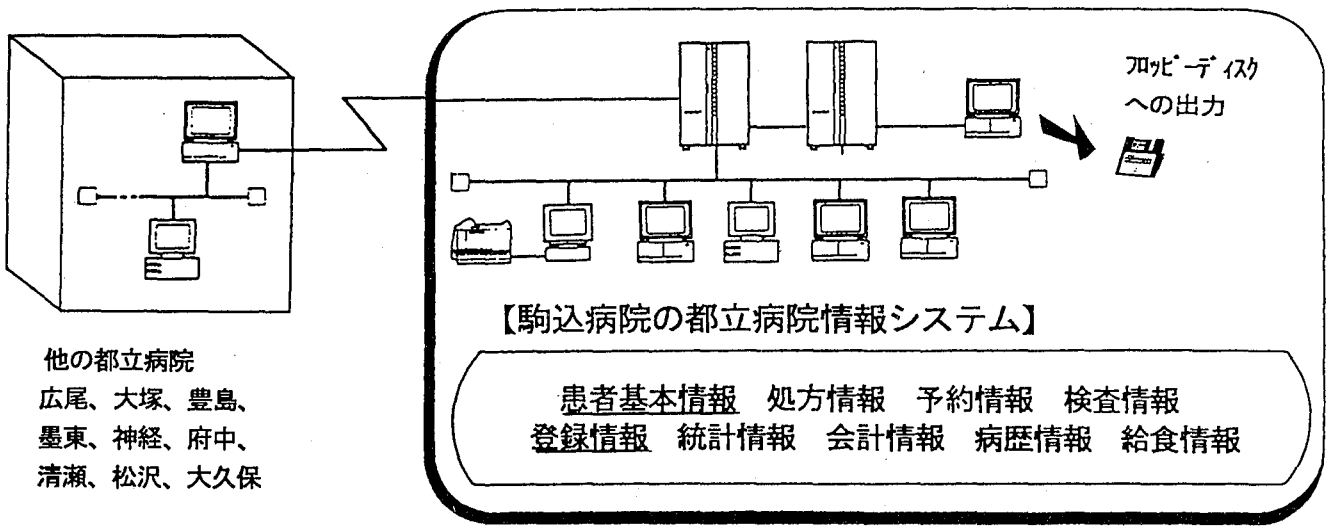


図１．病院情報システムからの情報収集

下線をひいた①，⑤に含まれている．収集目的は患者発生数にあるので，収集対象は初診者のみで，再診者は対象とならない．現在の収集方法は，このような対象者についての１年間の情報を選択的に取り出してフロッピーディスクに出力するという方法を採用している．

大気汚染による健康影響に関するサーベイランスシステムのために必要と考えた疾患は，①肺がん，②慢性気管支炎，③肺気腫，④気管支喘息，⑤気管支拡張症，⑥喘息様気管支炎，⑦その他の慢性閉息性肺疾患(COPD)および対照疾患としての⑧高血圧性疾患で，これらをICD(国際疾病分類)による病名コードで選択すると，表１のようになる．

２．患者発生数の分類，集計と加工

以下疾病モニタリングシステムとしての患者発生数の分類，集計と加工方法について述べる．まず，分類や集計のためのプログラム言語を決める必要がある．該当する言語としては，BASIC，Fortran，Cなどの汎用言語のほか，Windows上でのVBAやVC＋＋があり，独自の簡易言語を持つ統計用パッケージソフトのSPSS，SAS，BMDP，S－PLUS，GLIMなどがある．また，パソコンの表計算ソフトのロータスやエクセルなども利用できる．比較的多人数が扱いやすいことやパソコンが利用できることを考慮して，ここではBASICとロータスまたはエクセルを選択した．

次に，患者発生数の分類と集計に関してのBASICプログラムおよび表計算ソフト利用の方針を決め，そのフローを図２に示した．太線がサーベイランスシステムに直結するフローであり，細線がデータの性質などをチェックするためのフローである．５地域に区分する方

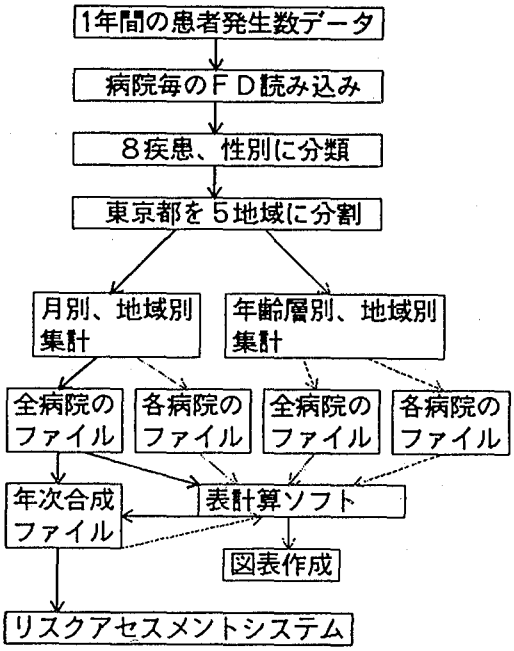


図２．疾病モニタリングシステムのＢＡＳＩＣ等プログラムフロー

法は，表２のように地域特性，二酸化窒素濃度を考慮しており，地図上に示すと図３のようになる．ファイルはすべてテキストファイルとし，１年間のデータを月別集計と年齢層別集計に分けて，全病院と各病院別に作成する．11病院であれば24ファイルとなる．全病院の月別ファイルは年次合成ファイルも作成する．このとき，月別の患者発生数は，１月を30日として補正する．また，表計算ソフトは図表の作成や年次合成ファイルの作成のために利用する．さらに，調査期間が２年以上の場合には季節指数を算出し，季節修正を可能にする．季節指数の算出方法には月別平均法，連環比率法，移動平均法な

表1．健康モニタリングで収集した慢性呼吸器疾患のコードと病名

病名コード	病名	病名コード	病名
162000	気管癌	492B00	ブラ〈気腫性嚢胞〉性肺気腫
162200	主気管支癌	492CA0	細葉中心性肺気腫
1623P0	バンコースト症候群	492CB0	小葉中心性肺気腫
1623ZZ	〔上葉、気管支または肺の悪性新生物〕	492C00	慢性肺気腫
1624ZZ	〔中葉、気管支または肺の悪性新生物〕	492L00	気腫性ブレブ
1625ZZ	〔下葉、気管支または肺の悪性新生物〕	492M00	マクラウド症候群
1628ZZ	〔その他の気管、気管支および肺の悪性新生物〕	492000	閉塞性肺気腫
1629R0	肺癌再発	492PA0	汎細葉性肺気腫
162900	肺癌	492PB0	汎小葉性肺気腫
401000	悪性高血圧症	492U00	片側性肺気腫
401100	良性高血圧症	492V00	肺胞性肺気腫
4019H0	高血圧症	492000	肺気腫
4019P0	若年性高血圧症	493ZZZ	〔喘息〕
401900	本態性高血圧症	4930AZ	アレルギー性喘息
402ZZZ	〔高血圧性心疾患〕	493000	外因性喘息
402000	悪性高血圧性心疾患	493100	内因性喘息
40Z100	良性高血圧性心疾患	4939A0	アレルギー性喘息
402900	高血圧性心疾患	4939B0	気管支喘息
403ZZZ	〔高血圧性腎疾患〕	4939R0	アレルギー性気管支炎
4030M0	悪性腎硬化症	493900	喘息
403000	悪性高血圧性腎疾患	494D00	気管支憩室(後天性)
403100	良性高血圧性腎疾患	494000	気管支拡張症
4039RZ	高血圧性腎疾患	495ZZZ	〔外因性アレルギー性肺胞炎〕
403900	高血圧性腎疾患	495000	農夫肺
404ZZZ	〔高血圧性心腎疾患〕	495100	さとうきび肺
404000	悪性高血圧性心腎疾患	495200	愛鳥家肺
404100	良性高血圧性心腎疾患	495300	コルク肺
404900	高血圧性心腎疾患	495400	麦芽製造人肺
490000	気管支炎	495500	きのこ作業者肺
491ZZZ	〔慢性気管支炎〕	495600	かえで樹皮はぎ人肺
491000	単純性慢性気管支炎	495700	換気肺炎
491100	粘液膿性慢性気管支炎	4958ZZ	〔その他のアレルギー性肺炎〕
4912A0	喘息様気管支炎	4959S0	過敏性肺臓炎
4912P0	びまん性汎細気管支炎	495900	アレルギー性肺胞炎
4912S0	副鼻腔気管支症候群	496C00	慢性肺炎
491200	閉塞性慢性気管支炎	496ZZZ	〔他に分類されない慢性気道閉塞症〕

表2．東京都の5地域分割

No.	特　徴	区　市	NO_2年平均濃度(ppb)
1	都心部商業地区	千代田，中央，港，新宿，文京，台東，品川，目黒，大田，渋谷	37.8
2	区部商業地区	墨田，江東，荒川，足立，葛飾，江戸川	34.0
3	区部住宅地区	世田谷，中野，杉並，豊島，北，板橋，練馬	30.5
4	市部1(近接)地区	武蔵野，三鷹，調布，府中，狛江，小金井，小平，国立，国分寺，保谷，田無	25～27
5	市部2(遠隔)地区	他の15市と西多摩	21～24

NO_2年平均濃度は1990年

図3．東京都地域区分

どがあるが[9]，調査年数が短い場合には月別平均法が無難であるので，ここではこの方法を利用する．なお，季節修正を行ったデータのファイルは年次合成ファイルと別に作成の有無を選択できる．

3．患者発生数の時間変動の評価

大気汚染による健康影響に関するサーベイランスシステムにおいて，現在のところまだ確立した方法があるとは言えない．まず，前提となる考え方を示す．

①表2のように，1990年の二酸化窒素年平均濃度は地域番号順となった．この順位は長期間変動せず，住民の曝露濃度もこの順位であると考える．

②都立病院情報からの患者発生数は偏りのある標本数で，地域を代表する数値でないため，地域間の実数比較は適当でない．

③したがって，リスクアセスメントシステムは，患者発生数の時間変動(トレンド)が評価方法に利用される．

④汚染の高い地域は，低い地域に比べて，患者発生数の増加割合が大きい，または，減少割合が小さい．

この考え方に基づいた手法の例を以下に示した．

n年間のデータを利用する．よって，標本数は時間単位が年のときn，月のとき12×nになる．まず，患者発生数の年変化率に着目する．区分した5地域の年変化率をa_{ji}(年番号i＝1～n-1，汚染レベル順に地域番号j＝1～5)とし，平均変化率をA_iとする．このとき検定仮説は，$A_1 \rangle A_2 \rangle A_3 \rangle A_4 \rangle A_5$となる．

次に，X軸を月i(i＝1～12×n)，Y軸を患者発生数a_{ji}とし，そのトレンドを回帰分析($y = b_{0j} + b_{1j}X$)で推定するとき検定仮説は，$b_{11} \rangle b_{12} \rangle b_{13} \rangle b_{14} \rangle b_{15}$となる．なお，季節変動の激しい疾患は季節修正を利用した方が良い．検定手法としてここでは，簡便な順位相関分析を用いた．

処理プログラム

フロッピーディスクで収集した病院情報の原データの形式は図4のようである(生年月日は個人データの保護のため伏字にしてある)．これを分類し，集計するプログラムの主文リストを図5に示した．

BASIC言語は対話型であり，矢印の指示データと項目選択のサブルーチンでは，①入力ファイルのドライブ，②集計単位が全病院か各病院かの選択，③病院名，④データの年次，⑤入力ファイル名，⑥標本数，⑦月別か年齢層別かの選択，⑧地域別か否かの選択，⑨集計結果をプリンタに出力するかの選択，⑩集計結果をファイルに出力するかの選択，もしファイルに出力する場合には，⑪出力ファイルのドライブ，⑫出力ファイル名，を入力する．一部のプログラムを組み替えれば，すべて選択式にすることもできる．また，④の選択で出力のレイアウ

図4．病院情報の原データ

```
100 '病院情報収集 Program
110 CONSOLE 0,25,0,1
120 NB=0:GOSUB *CONTROL  <---------- 指示データのｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
130 GOSUB *AREA1         <---------- 区市コードのｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
140 DIM D(12,5,2,8),E$(2),A$(11)
150  IF FFF=1 THEN OPEN FL$ FOR OUTPUT AS #2
160 OPEN FILE$ FOR  INPUT AS #1
170 E$(1)=" M " :E$(2)=" F " :E$(0)=" T "
180 COLOR 7: PRINT "サンプル数=";N
190 FOR II=1 TO N
200  INPUT #1, A$  :COLOR 5:PRINT A$
210  BO$=MID$(A$, 1,3):BO=VAL(BO$): '病院コード
220  B1$=MID$(A$, 5,2):B1=VAL(B1$): '年
230  B2$=MID$(A$, 7,2):B2=VAL(B2$): '月
240  B3$=MID$(A$,11,1)            : '性別
250  B4$=MID$(A$,19,3):B4=VAL(B4$): '年令
260  B5$=MID$(A$,24,3):B5=VAL(B5$): '地区
270  B6$=MID$(A$,35,3):B6=VAL(B6$): 'ＩＣＤ
280  B7$=MID$(A$,22,2):B7=VAL(B7$): '都県
290  B8$=MID$(A$,38,2)            : 'ＩＣＤ細目
300   IF B6=162 THEN D1=1: GOTO 360
310   IF B6=491            THEN D1=2: GOTO 360
320   IF B6>491 AND B6<495 THEN D1=B6-489: GOTO 360
330   IF B6=496  OR B6=495 THEN D1=6: GOTO 360
340   IF B6=491 AND B8$="2A" THEN D1=7
350   IF B6>400 AND B6<406 THEN D1=8
360   IF B3$="M" THEN D2=1 ELSE D2=2
370   IF B4< 5 THEN D4=1: GOTO 440
380   IF B4<10 THEN D4=2: GOTO 440
390   IF B4<20 THEN D4=3: GOTO 440
400   IF B4<40 THEN D4=4: GOTO 440
410   IF B4>79 THEN D4=9: GOTO 440
420  D4=INT((B4-10)/10)+2
430   IF FFF=1 THEN 470
440  CLS 3:LOCATE 0,0:COLOR 4:PRINT A$;
450  COLOR 5:LOCATE 60,0:PRINT USING "#####";II
460   IF B7<>13 THEN 600
470   IF Q4=0 THEN 480 ELSE 500
480   IF B5>0 AND B5<124 THEN J=1
       ELSE IF B5>199 AND B5<400 THEN J=2 ELSE J=0
490  GOTO 510
500  GOSUB *AREA2        <---------- 地域区分のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
510   IF Q1*Q4=1 AND  Q2*Q4=0 THEN D4=B2
520  D(D4,D3,D2,D1)=D(D4,D3,D2,D1)+1
530  D( 0,D3,D2,D1)=D( 0,D3,D2,D1)+1
540  D( 0,D3, 0,D1)=D( 0,D3, 0,D1)+1
550  D(D4, 0,D2,D1)=D(D4, 0,D2,D1)+1
560  D(D4, 0, 0,D1)=D(D4, 0, 0,D1)+1
570  D(D4,D3, 0,D1)=D(D4,D3, 0,D1)+1
580  D( 0, 0, 0,D1)=D( 0, 0, 0,D1)+1
590  D(D4,D3,D2, 0)=D(D4,D3,D2, 0)+1
600 NEXT II: CLOSE #1 :CONSOLE 0,25,0,1
610 CLS 3: GOSUB *PATERN <---------- 項目選択のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
620  IF Q1=1 THEN IX=12: '月別
630  IF Q2=1 THEN IX= 9: '年令層別
640 FOR K=1 TO 8      :LOCATE 0,2
650  FOR M=0 TO 2
660   FOR L=0 TO 5
670   COLOR 3: IF L>0 THEN PRINT K;E$(M);L;
                ELSE PRINT K;E$(M);" T ";
680    IF FFF=1 AND L>0 THEN PRINT #2,K;E$(M);L;
        ELSE IF FFF=1 THEN PRINT #2,K;E$(M);" T ";
690    IF KKK=1 AND L>0 THEN LPRINT K;E$(M);L;
        ELSE LPRINT K;E$(M);"T";
700    FOR I=1 TO IX
710    COLOR 5: PRINT USING"####";D(I,L,M,K);
720     IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"####";D(I,L,M,K);
730     IF KKK=1 THEN LPRINT USING"####";D(I,L,M,K);
740    NEXT I
750    COLOR 4: PRINT USING "#####";D(0,L,M,K)
760    IF KKK=1 THEN LPRINT USING"#####";D(0,L,M,K)
770    IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"#####";D(0,L,M,K)
780   NEXT L,M :PRINT
790   COLOR 5:PRINT "【";BN$(BY);"病院】"
800 NEXT K
810  IF SK=0 THEN 850
820 GOSUB *CONTROL
830  IF BY>0 THEN INPUT "FD Change"; OK ELSE GOTO 850
840 GOTO 160
850 CLOSE: END
```

図５．病院情報入力プログラム主文リスト

トが変化する．区市コードと地域区分のサブルーチンで表２の地域区分を行う．地域区分の変化が必要な場合には，サブルーチン＊AREA２で区分方法(数，区分)が簡単に変えられる．

全病院の月別データを月補正し，年次合成データとして新たにファイルを作成し，季節指数と季節修正を行うプログラムの主文リストを図６に示した．入力ファイルは新年次と前年までの合成年次のデータの２種となる．出力ファイルは，矢印の指示データのサブルーチンにより選択でき，新たな合成年次データと季節指数および季節修正されたデータのファイルとなる．前年までの季節指数や季節修正されたデータは，新たなデータを加えて算出されるので，少しずつ変化すると考えられる．なお，この処理はそれほど複雑でないので，表計算ソフトでも充分行うことができるが，表計算ソフトの場合にはメモリの消費量が大きく，調査年数が長くなると，処理できなくなる恐れがある．

新たな合成年次の季節修正がなされないまたはなされたデータについて，上記のリスクアセスメント手法を行うプログラムの主文リストが図７である．入力データの種類(ファイル)や出力ファイルの有無などは指示データのサブルーチンで決められる．ここでは，患者発生数の５地域のトレンドを回帰分析により検討する手法を採用している．出力する統計量は，疾患別，性別，５地域別の平均値，標準偏差，回帰直線の勾配，およびその95％信頼区間の推定値と相関係数と５地域間の順位相関係数で，この検定のために，t分布を利用するサブルーチンがある．また，異常値の発生などを考慮した欠測値処理

```
100 '年次合成、月補正、季節修正 Program
110 CONSOLE 0,25,0,1
120   GOSUB *CONTROL ←――― 指示データのｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
130 DIM D(12,5,2,8),DX(12,N+1),SIX(12,2,8),E$(2)
140   GOSUB *MONTH  ←――― 月補正用のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
150 OPEN FILE$ FOR  INPUT AS #1
160 E$(1)=" M " :E$(2)=" F " :E$(0)=" T "
170 FOR K=1 TO 8  :'疾患
180  FOR M=0 TO 2  :'性別
190   FOR L=0 TO 5  :'地域
200    FOR I=1 TO 12 :'月
210 INPUT #1, D(I,L,M,K)
220 COLOR 5: PRINT USING"####";D(I,L,M,K);
230    NEXT I : INPUT #1, D(0,L,M,K)
240 COLOR 4: PRINT USING "#####";D(0,L,M,K)
250    FOR I=1 TO 12
260 D(I,L,M,K)=D(I,L,M,K)/MTH(I)*30
270    NEXT I,L,M,K
280 CLOSE
290 IF FX=1 THEN OPEN FX$ FOR OUTPUT AS #2
300 OPEN FF$ FOR  INPUT AS #1
310 FOR K=1 TO 8
320  FOR M=0 TO 2
330   FOR L=0 TO 5
340 IF N=0 THEN 470
350    FOR J=1 TO N
360     FOR I=1 TO 12
370 INPUT #1, DX(I,J)
380 IF FX=1 THEN PRINT #2,USING"####";DX(I,J);
390 COLOR 5: PRINT USING"####";DX(I,J);
400 IF L=0 THEN DX(I,N+1)=DX(I,N+1)+DX(I,J)/(N+1)
410 IF L=0 AND J=N THEN
      SIX(I,M,K)=DX(I,N+1)+D(I,L,M,K)/(N+1)
420 IF L=0 AND J=N THEN
      SIX(0,M,K)=SIX(0,M,K)+SIX(I,M,K)/12
430     NEXT I : INPUT #1, DX(0,J)
440 COLOR 4: PRINT USING "#####";DX(0,J)
450 IF FX=1 THEN PRINT #2,USING"#####";DX(0,J)
460    NEXT J
470 IF FX=0 THEN 520
480     FOR I=1 TO 12
490 PRINT #2,USING"#####";D(I,L,M,K)
500     NEXT I
510 PRINT #2,USING"#####";D(0,L,M,K)
520     FOR I=1 TO 12
530 IF N>0 THEN SIX(I,M,K)=SIX(I,M,K)/SIX(0,M,K)*100
540 DX(I,N+1)=0
550    NEXT I
560 SIX(0,M,K)=0
570   NEXT M,K
580 CLOSE :IF N=0 THEN END
590 IF FFX=1 THEN OPEN FS$ FOR OUTPUT AS #2
600 IF KKX=1 THEN LPRINT "季節指数  "; K;E$(M)
610 IF FFX=1 THEN PRINT #2,"季節指数  "; K;E$(M)
620 FOR K=1 TO 8
630  FOR M=0 TO 2
640 COLOR 7:PRINT "季節指数  ";:COLOR 3:PRINT K;E$(M)
650   FOR I=1 TO 12
660 COLOR 5: PRINT USING"####.#";SIX(I,M,K);
670 IF KKX=1 THEN LPRINT USING"####.#";SIX(I,M,K);
680 IF FFX=1 THEN PRINT #2,USING"####.#";SIX(I,M,K);
690   NEXT I,M,K
700 OPEN FF$ FOR  INPUT AS #1
710 IF FFF=1 THEN OPEN FL$ FOR OUTPUT AS #2
720 IF KKK=1 THEN LPRINT "季節修正  "; K;E$(M)
730 IF FFF=1 THEN PRINT #2,"季節修正  "; K;E$(M)
740 FOR K=1 TO 8
750  FOR M=0 TO 2
760   FOR L=0 TO 5
770    FOR J=1 TO N
780     FOR I=1 TO 12
790 INPUT #1, DX(I,J)
800 DX(I,J)=DX(I,J)/SIX(I,M,K)*100
810 COLOR 5: PRINT USING"####.#";DX(I,J);
820 IF KKK=1 THEN LPRINT USING"####.#";DX(I,J);
830 IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"####.#";DX(I,J);
840     NEXT I : INPUT #1, DX(0,J)
850 COLOR 4: PRINT USING "#####";DX(0,J)
860 IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"#####";DX(0,J)
870    NEXT J
880     FOR I=1 TO 12
890 DD  =D(I,L,M,K)/SIX(I,M,K)*100
900 COLOR 5: PRINT USING"####.#";DD;
910 IF KKK=1 THEN LPRINT USING"####.#";DD;
920 IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"####.#";DD;
930     NEXT I
940 COLOR 4: PRINT USING "#####";D(0,L,M,K)
950 IF FFF=1 THEN PRINT #2,USING"#####";D(0,L.M.K)
960   NEXT L
970  NEXT M
980 NEXT K
990 CLOSE
1000 COLOR 5: END
```

図6．月補正，季節修正プログラム主文リスト

のサブルーチンを入れている．グラフ作成用のサブルーチンを利用すると，回帰直線の位置を示した散布図を描くことができる．ただし，現在は表計算ソフトに柔軟性の高いグラフ作成ツールが備わっているので，グラフ作成はそれを利用する方が便利かもしれない．なお，全患者発生数のトレンドも出力できるようにしている．このプログラムを利用して1993年と1994年のデータから，患者発生数の比を表3に，季節修正したデータの処理結果を表4に示した(8疾患中患者発生数の少ないその他のCOPDを除いた)．この検定結果によると，年単位でも月単位でも，女子の慢性気管支炎について有意であった．

考　　察

慢性呼吸器疾患，特に肺がんの疾病情報は容易には収集できず，全都立病院からの情報は貴重である．しかし，サーベイランスシステムへの利用についてはいくつかの問題点が残されており，以下に区分して述べた．

1）患者発生数の人為的変動要因

都立病院の患者発生数は，もとより偏りのある標本集

```
100 '回帰分析  Program
110 CONSOLE 0,25,0,1
120   GOSUB *CONTROL ←――― 指示データのｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
130 DIM C(12,N,5),D(N*12,4),SIX(12,2,8),
        E$(2),RN(5,2)
140 OPEN FILE$ FOR  INPUT AS #1
150 IF FX=1 THEN OPEN FX$ FOR OUTPUT AS #2
160 E$(1)=" M " :E$(2)=" F " :E$(0)=" T "
170 FOR K=1 TO 8  :'疾患
180  FOR M=0 TO 2  :'性別
190   FOR L=0 TO 5  :'地域
200    FOR J=1 TO N  :'年数
210     FOR I=1 TO 12 :'月
220 INPUT #1, C(I,J,L)
230 COLOR 5: PRINT USING"####";C(I,J,L);
240 IF K+M+L=1 THEN II=(J-1)*12+I :D(II,0)=II
250     NEXT I : INPUT #1, C(0,J,L)
260 COLOR 4: PRINT USING "#####";C(0,J,L)
270    NEXT J
280   NEXT L
290   FOR L=0 TO 5  :'地域
300 COLOR 7:PRINT K;E$(M);L;
310 IF KKK=1 THEN LPRINT K;E$(M);L;
320 IF FFF=1 THEN PRINT #2,K;E$(M);L
330   FOR J=1 TO N  :'年数
340    FOR I=1 TO 12 :'月
350 II=(J-1)*12+I
360 D(II,L+1)=C(I,J,L)
370    NEXT I
380   NEXT J
390   GOSUB *MISSING ←――― 欠測値処理のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
400 X1=0:X2=0:Y1=0:Y2=0:XY=0:NN=0
410    FOR I=1 TO NX
420 IF D(I,0)<=MSD OR D(I,L)<=MSD THEN 470
430 X1=X1+D(I,0):X2=X2+D(I,0)^2:XY=XY+D(I,0)*D(I,L)
440 Y1=Y1+D(I,L):Y2=Y2+D(I,L)^2:NN=NN+1
450 IF D(I,L)<MIN THEN MIN=D(I,L)
460 IF D(I,L)>MAX THEN MAX=D(I,L)
470    NEXT I
480  X1=X1/NN:Y1=Y1/NN: RNG=MAX-MIN
490  XX=(X2-X1^2*NN)/(NN-1):X2=SQR(XX)
500  YY=(Y2-Y1^2*NN)/(NN-1):Y2=SQR(YY)
510  XY=XY-X1*Y1*NN
520  R=XY/X2/Y2/(NN-1)
530  A1=XY/X2^2/(NN-1):B1=XY/Y2^2/(NN-1)
540   GOSUB *T-TEST ←――― t分布利用のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
550  AT=T5*Y2/X2*SQR((1-R^2)/(NN-2))
560  RN(L,1)=A1
570 COLOR 4:PRINT USING "####.#";Y1;Y2;
580 COLOR 5:PRINT USING "####.#";A1;
590 COLOR 7:PRINT " (";
600 COLOR 5:PRINT USING "####.#";A1-AT;A1+AT;
610 COLOR 7:PRINT ") ";
620 COLOR 5:PRINT USING "####.#";R;P
630 IF FFF<1 THEN 690
640  PRINT #2,USING "####.#";Y1;Y2;A1;
650  PRINT #2," (";
660  PRINT #2,USING "####.#";A1-AT;A1+AT;
670  PRINT #2,") ";
680  PRINT #2,USING "####.#";R;P
690   GOSUB *GRAPH  ←――― グラフ作成のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
700   NEXT L
710   GOSUB *RANK  ←――― 検定(順位相関)のｻﾌﾞﾙｰﾁﾝ
720 COLOR 4:PRINT USING "####.#";RC
730  NEXT M
740 NEXT K
750 CLOSE
760 END
```

図7．リスクアセスメント用回帰分析プログラム主文リスト

表3．1994年と1993年の患者発生数比

		地域				
疾患	性別	1	2	3	4	5
肺癌	男	1.09	1.08	1.36	1.36	1.41
	女	1.47	1.01	1.47	1.31	1.31
慢性気	男	0.94	1.05	1.12	0.90	1.14
管支炎	女	1.31	1.21	1.08	0.78	0.94
肺気腫	男	1.43	1.38	1.15	0.99	1.19
	女	1.50	1.09	1.24	0.70	1.50
気管支	男	0.86	0.93	0.90	0.88	1.09
喘息	女	0.96	0.94	0.92	0.96	1.12
気管支	男	0.71	2.17	1.15	0.80	0.77
拡張症	女	1.16	1.27	0.80	1.31	0.96
喘息様気	男	0.39	0.84	1.14	0.76	0.97
管支炎	女	0.31	1.00	0.79	0.78	1.18
高血圧	男	1.07	0.92	0.92	0.83	0.91
性疾患	女	1.08	0.78	1.01	0.84	0.99

団であるから，地域集団の実数比較ができない．これはやむを得ないが，時間変動にも人為的変動要因があり，病院の開設または閉鎖，呼吸器診療医師数の増減，病院の経営努力などが患者発生数の増減に影響を及ぼす要因となる可能性がある．これについては，月別患者発生数に前年と明らかに異なった変動がみられる場合は人為的変動要因が大きいと考えられる．

2）診断と登録

次に，病名登録は診断時であって，確定時でない．後で取消や病名変更があっても患者発生数には修正されない．現状では解決困難で，ごく一部と思われるが，詳細は不明である．将来的には，登録数と確定数の一致の確認が必要である．

3）リスクアセスメント手法

以上のような変動要因があるので，リスクアセスメントにおいては頑健な手法が必要になる．線形回帰分析による手法は頑健で簡単ではあるが，検定方法を含めて必ずしも精度や有効性の高い手法とは言えない．患者の年

表4．患者発生数と月との回帰計数a_1（95％信頼区間），相関計数r

疾患	地域	男			女		
		a_1	95％信頼区間	r	a_1	94％信頼区間	r
肺癌	1	0.682	(-0.405, 1.770)	0.267	2.237	(0.544, 3.930)	0.504*
	2	0.645	(-0.382, 1.672)	0.268	0.097	(-0.708, 0.901)	0.053
	3	2.619	(1.156, 4.083)	0.621**	2.926	(1.419, 4.434)	0.651***
	4	1.241	(-0.568, 3.049)	0.290	2.227	(0.625, 3.829)	0.524**
	5	1.673	(0.511, 2.836)	0.537**	1.030	(-0.742, 2.803)	0.249
慢性気管支炎	1	0.049	(-2.168, 2.266)	0.010	2.218	(0.029, 4.408)	0.409*
	2	-0.146	(-1.931, 1.639)	-0.036	1.580	(-0.308, 3.469)	0.347
	3	1.058	(-0.795, 2.911)	0.245	0.482	(-2.146, 3,110)	0.081
	4	-0.401	(-2.801, 1.999)	-0.074	-1.542	(-3.974, 0.890)	-0.270
	5	0.097	(-1.952, 2.146)	0.021	-2.336	(-6.030, 1.359)	-0.269
肺気腫	1	2.487	(0.313, 4.661)	0.451*	1.236	(-3.790, 6.263)	0.108
	2	1.383	(-0.670, 3.436)	0.285	-0.185	(-3.426, 3.057)	-0.025
	3	1.496	(-1.198, 4.189)	0.238	2.241	(-1.118, 5.601)	0.283
	4	-0.384	(-3.109, 2.340)	-0.062	-4.972	(-9.857,-0.087)	-0.410*
	5	0.451	(-2.123, 3.025)	0.077	3.075	(-2.317, 8.467)	0.245
気管支喘息	1	-0.529	(-1.654, 0.596)	-0.204	-0.402	(-1.561, 0.756)	-0.152
	2	0.053	(-1.449, 1.555)	0.015	0.062	(-1.315, 1.438)	0.020
	3	-0.185	(-1.651, 1.280)	-0.056	0.069	(-1.262, 1.399)	0.023
	4	-0.723	(-1.747, 0.302)	-0.298	0.064	(-0.751, 0.879)	0.035
	5	0.194	(-1.184, 1.572)	0.062	0.019	(-1.185, 1.224)	0.007
気管支拡張症	1	-2.164	(-5.078, 0.749)	-0.312	1.367	(-1.346, 4.079)	0.217
	2	3.437	(-0.223, 7.096)	0.384	1.443	(-3.473, 6.359)	0.129
	3	2.210	(-0.891, 5.312)	0.301	-0.755	(-4.817, 3.308)	-0.082
	4	-1.357	(-6.387, 3.673)	-0.118	2.189	(-2.509, 6.886)	0.202
	5	-1.866	(-6.155, 2.423)	-0.189	-1.668	(-6.075, 2.739)	-0.165
喘息様気管支炎	1	-6.602	(-9.867,-3.437)	-0.553**	-7.472	(-9.934,-4.911)	-0.691***
	2	-2.732	(-5.452,-0.011)	-0.406*	-0.996	(-4.274, 2.282)	-0.133
	3	1.848	(-0.993, 4.690)	0.276	-1.583	(-4.863, 1.697)	-0.209
	4	-1.448	(-4.232, 1.337)	-0.224	-1.003	(-4.151, 2.145)	-0.140
	5	0.369	(-2.053, 2.791)	0.067	2.042	(0.103, 3.980)	0.422*
高血圧性疾患	1	0.619	(-0.508, 1.746)	0.236	0.707	(-0.146, 1.559)	0.344
	2	-0.652	(-1.301,-0.003)	-0.406*	-1.610	(-2.608,-0.612)	-0.581**
	3	-0.512	(-1.498, 0.473)	-0.224	-0.011	(-0.837, 0.815)	-0.006
	4	-1.123	(-1.897,-0.348)	-0.540**	-1.024	(-1.885,-0.162)	-0.465*
	5	-0.963	(-1.681,-0.244)	-0.510*	-0.530	(-1.688, 0.628)	-0.198

＊：$p<0.05$，＊＊：$p<0.01$，＊＊＊$p<0.001$

齢も考慮する必要があり，より有効性の高い手法の検討が望まれる．

4）人口移動と職業

居住地は必ずしも発病地と限らない．人口の一部は都心部から郊外へと移動する傾向があるため，郊外地域の患者発生数の中にどの程度混入しているか明らかでない．特に成人男子については職業など大気汚染以外の原因が多く考え得るので，サーベイランスシステムへの利用は困難かもしれない．

情報の入力方法は将来的にはオンラインで行うことができるであろう．一方，リスクアセスメントシステムにおいて今回は比較的簡便な手法を用いたが，精密にすればこれより複雑となり，さらに，ソフトの種類や調査年数の長期化による計算時間や計算量の増大などで，必要な記憶容量も増大する．ソフト面だけでなく，ハード面の充実も必要である．

今回検討した2年間の例によると，女子の慢性気管支炎のみに大気汚染の影響が示唆された．調査期間の短さと慢性呼吸器疾患の曝露から発病までの時間の長さなどを考慮すると，妥当な結果であると推測される．

文　献

1）Bates, D. V. and Sizto, R.: *Can J. Public Health*,, **74**, 117-122, 1983

2）Mazumder, S., Colbus, D. S. and Townsend, M. C.: *AJPH*, **76**, 803-805, 1986

3）Smith, S. M., Colwell, L. S. Jr. and Sniezek : *AJPH*,**80**, 279-281, 1990

4）Pope, C. A.: *Arch. Environ. Health*, **46**, 90-97, 1991

5）Toeplitz, R., Goren, A., Goldsmith, J. R. and Donagi, A. : *Sci. Total Environ.*, **32**, 233-246, 1984

6）Bobak, M. and Leon, D. A.: *Lancet*, **340**, 1010-1014, 1992

7）東京都衛生局：大気汚染保健対策に係る健康影響調査　総合解析報告書，1991，東京

8）東京都衛生局：大気汚染保健対策健康管理情報の収集　解析，1993，東京

9）菅　民郎：時系列と予測，1990，社会情報サービス，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 348-354, 1996

新たに実施した中性脂肪，HDL-コレステロールおよびγ-グルタミルトランスフェラーゼの精度管理調査の結果

大石向江*，伊瀬　郁*，蓑輪佳子*，五十嵐英夫*

A Report on External Quality Assessment for Triglyceride, HDL-cholesterol and γ-Glutamyltransferase

HISAE OISHI*, IKU ISE*, KEIKO MINOWA* and HIDEO IGARASHI*

Keywords：外部精度管理調査external quality assessment，中性脂肪triglyceride，HDL-コレステロールHDL-cholesterol，γ-グルタミルトランスフェラーゼ(γ-GT)γ-Glutamyltransferase

緒　言

都内の保健所検査室および公立衛生試験所(検査所)の検査精度の向上を目的とした精度管理事業は，都区保健衛生連絡協議会の活動の一環として昭和53年度に開始されて以来18年が経過している[1-2]．生化学分野は昭和59年度から実施され，この間管理試料を用いた検査精度の検討やアンケート調査を通じて各検査施設の精度向上が図られてきた．しかし，従来より調査対象とされてきた尿素窒素，尿酸，クレアチニン，GOT(AST)およびGPT(ALT)に加え，老人保健法の検査項目である中性脂肪，HDL-コレステロールおよびγ-グルタミルトランスフェラーゼ(以下，γ-GTと略)を調査項目に付加する要望が参加者の間で高まったため，平成7年度から新たにこれらの調査も併せて実施した．そこで今回，新たに実施した老人保健法検査項目の精度管理調査結果についてその成果をまとめたので，報告する．

方　法

1．調査および集計の方法

1）調査対象：都内の保健所および公立衛生試験所(検査所)の生化学検査室，42か所(島しょ3保健所を含む)．

2）調査年：平成7年度

3）調査項目：中性脂肪，HDL-コレステロールおよびγ-GT

4）調査試料：

試料1：市販凍結乾燥血清(測定値が基準範囲内にあるもの)

試料2：市販凍結乾燥血清(測定値が基準範囲より高値であるもの)

試料3：市販凍結乾燥血清(酵素活性測定用；基準範囲内に測定値のあるもの)

試料4：市販凍結乾燥血清(酵素活性測定用；基準範囲より高値であるもの)

試料5：市販凍結総コレステロール/HDL-コレステロール標準血清；超遠心法によってHDLを分離した後，一次標準血清を基準としてアベル・ケンダール法により，標準値が決定されたもの

これらのうち，試料1，2で中性脂肪を，試料3，4ではγ-GTを，また試料5では中性脂肪およびHDL-コレステロールを被検項目とした．

5）調査方法：調査は当該年度中に1回，オープン方式で実施した．試料は参加施設の検査担当者に同一場所で同時に内容等を説明後，ドライアイス入りの発泡スチロール製輸送箱(200ml)に入れて直接手渡した．なお，島しょ保健所については，試料を説明文とともにドライアイス入りの輸送箱(5l)に入れて空輸した．試料はそれぞれ製造元で指示した術式によって測定に供されるようにした．即ち，測定時に試料1および2は精製水10mlで，また試料3および4は精製水3mlでおのおの溶解し，凍結状態の試料5は融解して測定するようにそれぞれ指示した．測定は日常業務と同じ方式で行い，調査のために特別な準備を要しないこととした．また，日常業務の中で負担なく測定できるようにするために，試料配布から結果の返送までの期間を13日間とした．測定結果として，測定値，単位，測定

*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

日，測定法，測定機器名，試薬名(製造番号を含む)，標準液(製造番号を含む)および試料採取器具の回答を求めた．また，集計の一部を測定法に従って実施する都合上，その確認のために試薬の解説書の提出を同時に求めた．

6）集計方法

① 測定法別分類：測定値は各施設の採用した測定法によって分類した．

② 測定機器別分類：①とは別に，測定値を各施設の採用している測定機器によって分類した．

③ 集計：上記①および②のように分類した後，それぞれについて採用施設数，平均値($\overline{X}$)，標準偏差(SD)，変動係数(CV)，最大値および最小値を求めた．これらを結果として後の表に記した．次に全測定値を対象として$\overline{X}\pm 2SD$を求め，それを超える値を除外して再度計算し，$\overline{X}\pm 2SD$を求めた．これらの結果を測定値の散布図として図示した．

7）配布試料のドライケミストリー方式による参考値の比較：従来の調査項目の一部に，ドライケミストリー(乾燥試験紙を使用した測定方式)による測定において，凍結乾燥血清の性状に起因するマトリックス効果が原因と思われる異常値が出現し，結果の解析に困難の生じたことがあった．そこで解析の補助手段として，長瀬産業株式会社(以下，N社と略)と富士メディカル株式会社(以下，F社と略)に同一試料の測定を依頼し，各社の標準器との間で測定値の比較を行った．

結果と考察

1．配布試料のドライケミストリー方式による参考値の比較：配布試料について，N社およびF社のドライケミストリーを用いて測定された結果を表1．に示した．N社ではEKTACHEM700XRCにより測定され，また，F社では富士ドライケム5500で測定されていた．さらに，F社では同時に自動分析機の日立7150によっても測定がなされていたので，あわせてその結果を記した．

2．各施設における中性脂肪の測定結果：各施設における中性脂肪の測定結果を表2．および図1．に示した．今回，遊離グリセロール消去法で測定した施設が非消去法で測定したものより多かった．従来，一般的に非

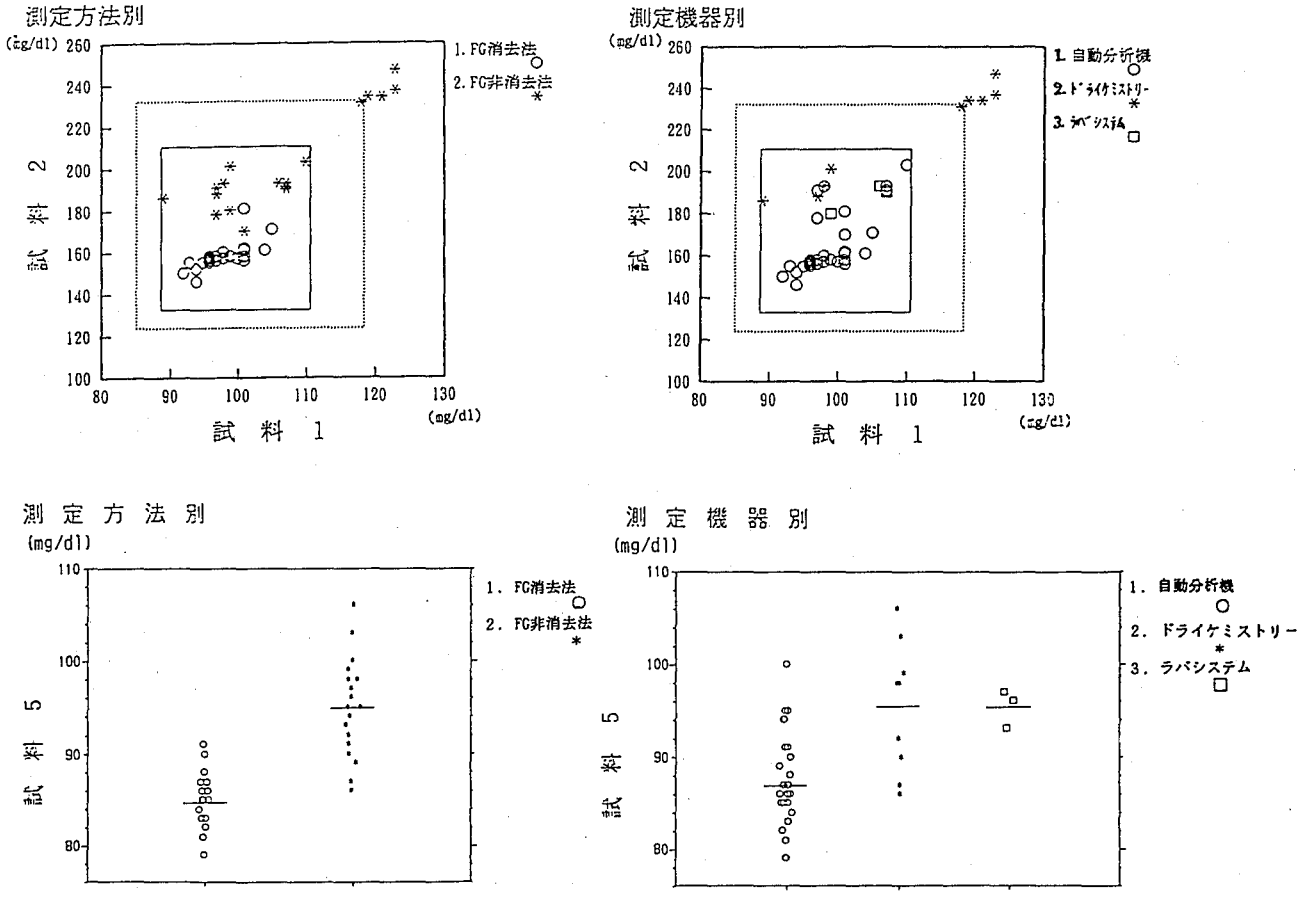


図1．測定方法別または機器別に分類した中性脂肪の測定値散布図

□：全測定値から求めた$\overline{X}\pm 2$ SDの範囲

□：上記の範囲を超えた値を除外して，再度求めた$\overline{X}\pm 2$ SDの範囲

表1．ドライケミストリー製造会社による測定結果

	中性脂肪 (mg/dl)			HDL-コレステロール (mg/dl)	γ-GT (IU/l)	
	試料 1	試料 2	試料 5	試料 5	試料 3	試料 4
N：700RXC	122	236	102	55	61	169
F：5500	99	199	91	45	33	92
F：日立7150	110	191	98	51	35	100

表2．各施設における中性脂肪の測定結果

試料 1	施設数	平均値 mg/dl	標準偏差 mg/dl	変動係数 %	最大値 mg/dl	最小値 mg/dl
測定法 1．遊離グリセロール消去法	23	98.1	3.5	3.5	105	92
測定法 2．遊離グリセロール非消去法	19	106.1	10.3	9.7	123	89
測定機器 10．自動分析機	30	99.1	4.3	4.4	110	92
測定機器 20．ドライケミストリー	9	109.7	13.6	12.4	123	89
測定機器 21．富士	4	95.8	4.6	4.8	99	89
測定機器 22．エクタケム	5	120.8	2.3	1.9	123	118
測定機器 30．ラバシステム	3	104.0	4.4	4.2	107	99
全体	42	101.7	8.3	8.2	123	89

試料 2	施設数	平均値 mg/dl	標準偏差 mg/dl	変動係数 %	最大値 mg/dl	最小値 mg/dl
測定法 1．遊離グリセロール消去法	23	158.3	6.8	4.3	181	146
測定法 2．遊離グリセロール非消去法	19	201.7	22.8	11.3	247	170
測定機器 10．自動分析機	30	165.3	15.1	9.1	203	146
測定機器 20．ドライケミストリー	9	216.8	24.3	11.2	247	186
測定機器 21．富士	4	192.0	6.7	3.5	201	186
測定機器 22．エクタケム	5	236.6	6.2	2.6	247	231
測定機器 30．ラバシステム	3	187.7	6.8	3.6	193	180
全体	42	178.0	27.1	15.2	247	146

試料 5	施設数	平均値 mg/dl	標準偏差 mg/dl	変動係数 %	最大値 mg/dl	最小値 mg/dl
測定法 1．遊離グリセロール消去法	23	84.7	3.1	3.6	91	79
測定法 2．遊離グリセロール非消去法	19	94.9	5.2	5.5	106	86
測定機器 10．自動分析機	30	86.9	5.1	5.8	100	79
測定機器 20．ドライケミストリー	9	95.4	7.0	7.4	106	86
測定機器 21．富士	4	88.8	2.8	3.1	92	86
測定機器 22．エクタケム	5	100.8	3.6	3.5	106	98
測定機器 30．ラバシステム	3	95.3	2.1	2.2	97	93
全体	42	89.3	6.6	7.4	106	79

消去法による測定が主流であったが，遊離グリセロールを測り込まない消去法へと移行してきており[3-4]，本調査でもすでに半数以上が消去法を取り入れていることから，今後消去法を採用する施設が更に増加するものと推測される．本検査項目では，図1．に示したように，再計算後の$\bar{X}\pm 2SD$を超えたものが5施設あった．これはいずれもN社のドライケミストリーの使用施設であったが，N社から報告された測定値と近似しており，試料のマトリックスの影響と考えられた．しかしながら，ヒト血清を基にして作製されている二次標準血清である試料5においても高値を示していることから，新鮮血清でない試料であるためのマトリックスの影響なのか，N社の機器の特性であるのか，今回の結果からは判断に窮する状況である．今後の検討課題と考えられる．

測定法別にみると，非消去法の平均値の方が消去法より高くなった．試料2において，ドライケミストリーの測定値を除外して検定しても消去法と非消去法の測定値の間には有意差($p<0.01$)が認められた．一方，自動分析機による測定値を測定法別に再分類して計算した結果を，表3．に示した．すべての試料で遊離グリセロール非消去法の方が平均値が高くなっていた．また，非消去法の方が標準偏差が大きくなっていることから，消去法に比較してばらつきの大きいことが示唆された．消去法より非消去法による測定値の方が遊離グリセロールを測り込むために高値を示すと従来からいわれているが[4]，本調査においても同様の結果となった．

3．各施設におけるHDL-コレステロールの測定結果：HDL-コレステロールの測定結果は，HDL-コレステロールの分離試薬の種類と直接測定法(化学修飾酵素＋硫酸シクロデキストリン複合系)とに分類して集計し，その結果を表4．および図2．に示した．試料1および2において，分離剤の種類によってはHDL-コ

表3．自動分析機による中性脂肪の測定値の測定法別集計結果

	遊離グリセロール消去法			遊離グリセロール非消去法		
	試料 1	試料 2	試料 5	試料 1	試料 2	試料 5
N	23	23	23	7	7	7
$\bar{X}$(mg/dl)	98.2	158.3	84.8	100.9	183.7	92.3
SD(mg/dl)	3.5	7.0	3.1	5.5	15.7	5.4
CV(%)	3.6	4.4	3.7	5.5	8.5	5.8

表4．各施設におけるHDL－コレステロールの測定結果

試料 5		施設数	平均値 mg/dl	標準偏差 mg/dl	変動係数 %	最大値 mg/dl	最小値 mg/dl
測定法	1．デキストラン硫酸-Mg	5	55.0	2.9	5.3	57	50
	2．リンタングステン酸-Mg	19	52.8	4.5	8.6	64	45
	3．デキストラン硫酸＋リンタングステン酸-Mg	3	50.0	3.5	6.9	52	46
	4．ポリエチレングリコール	4	55.0	2.9	5.4	58	51
	5．デキストラン硫酸-Mg ＋ポリエチレングリコール	2	52.5	-	-	59	46
	7．化学修飾酵素＋硫酸化シクロデキストリン複合系	9	58.0	3.0	5.1	62	52
測定機器	10．自動分析機	30	55.4	4.1	7.4	64	46
	20．ドライケミストリー	9	50.2	4.1	8.3	57	45
	21．富士	4	48.0	2.4	5.1	50	45
	22．エクタケム	5	52.0	4.6	8.8	57	48
	30．ラバシステム	3	53.7	3.2	6.0	56	50
全体		42	54.2	4.5	8.3	64	45

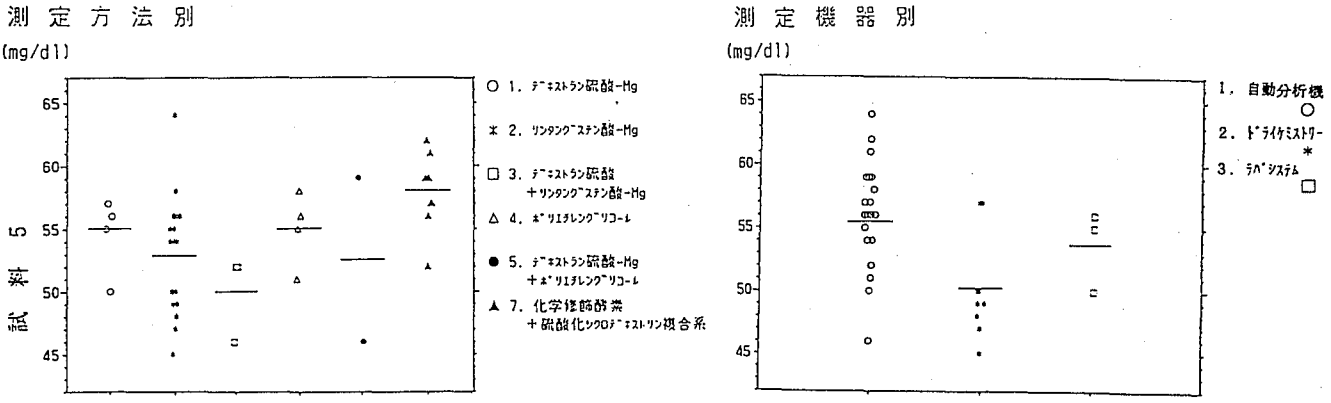


図2．測定方法別または機器別に分類したHDL-コレステロールの測定値散布図

レステロールが有効に沈殿しないことが事前に確認されていたので試料5のみを測定対象としたが，標準偏差，変動係数とも小さく，ばらつきの少ない良好な結果を得ることができた．測定機器別に分類した測定値に測定法を加味して再計算した結果を表5．に示した．分離剤によってHDL-コレステロールの沈殿効果に差があるため，本項目は従来からばらつきが多いと見なされていたが，今回の結果から試料の選択に注意を払うことによって今後ともHDL-コレステロールを精度管理調査項目に取り入れることができると判断された．試料に表示された分析値(アポリポ蛋白を含む標準値：57.7mg/dl)と比較すると，ドライケミストリーを使ってデキストラン硫酸＋リンタングステン酸の組み合わせで測定する場合に測定値が低く出る傾向が認められた．また，今回採用されていた6法のうち唯一の直接法である化学修飾酵素＋硫酸化シクロデキストリン複合系試薬での測定値が表示値にもっとも近かったが，この方法は放置によって基線が上がってくることが知られており，測定に際しては反応および測定の時間を厳守することが精度の良い測定を行う要点となると思われる．HDL-コレステロールの分離作業は手間もかかることに加え，上清液採取時に精度上の難点が生じがちなことから，直接法の試薬の出現が望まれていたものである．今回，市販後間もない直接法の試薬での測定が42施設中9施設と，21.4%であった．また，選択的にHDL-コレステロールに結合する方法を採用した直接法の新たな試薬の販売が本調査の終了直後に更に開始されており，今後直接法に移行する推移を観察したい．

4．各施設におけるγ-GTの測定結果：各施設におけるγ-GTの測定結果を表6．および図3．に示した．測定法は使用されている反応基質の種類によって分類した．それによると，従来から一般に広く使用されているγ-グルタミル-p-ニトロアニリド基質法(以下，GGNA法と略)を採用するものが20施設と最も多く，次いで，臨床化学会によって新たに勧告法として制定されたγ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法(以下，GGCN法と略)の13施設，γ-グルタミル-3-ヒドロキシメチル-4-ニトロアニリド基質法(以下，GGHN法と略)の8施設，γ-グルタミル(-3

表5．ＨＤＬ－コレステロールの測定値の測定機器別および方法別集計結果

	自動機器				ドライケミストリー				ラバシステム			
	N	$\overline{X}$ mg/dl	SD mg/dl	CV %	N	$\overline{X}$ mg/dl	SD mg/dl	CV %	N	$\overline{X}$ mg/dl	SD mg/dl	CV %
デキストラン硫酸-Mg					2	57.0	-	-	3	53.7	3.2	6.0
リンタングステン酸-Mg	12	55.5	3.3	5.9	7	48.3	1.7	3.5				
デキストラン硫酸＋リンタングステン酸-Mg	3	50.0	3.5	6.9								
ポリエチレングリコール	4	55.0	2.9	5.4								
デキストラン硫酸-Mg＋ポリエチレングリコール	2	52.5	-	-								
化学修飾酵素＋硫酸シクロデキストリン複合系	9	58.0	3.0	5.1								

表６．各施設におけるγ－ＧＴの測定結果

試　料　3		施設数	平均値 IU/l	標準偏差 IU/l	変動係数 %	最大値 IU/l	最小値 IU/l
測定法	1．GGCN*1基質法	13	37.8	4.9	12.8	47	32
	2．GGNA*2基質法	20	37.4	11.8	31.7	59	23
	3．GGHN*3基質法	8	37.3	2.3	6.0	42	35
	5．GGCNPA*4基質法	1	35	-	-	-	-
測定機器	10. 自動分析機	30	35.4	5.0	14.2	47	26
	20. ドライケミストリー	9	46.1	12.9	28.0	59	23
	21. 富士	4	34.8	7.9	22.7	40	23
	22. エクタケム	5	55.2	7.4	13.4	59	42
	30. ラバシステム	3	31.7	2.5	7.9	34	29
全　体		42	37.4	8.5	22.8	59	23

試　料　4		施設数	平均値 IU/l	標準偏差 IU/l	変動係数 %	最大値 IU/l	最小値 IU/l
測定法	1．GGCN*1基質法	13	108.5	14.9	13.8	137	86
	2．GGNA*2基質法	20	104.3	30.4	29.2	162	74
	3．GGHN*3基質法	8	108.4	6.2	5.7	122	103
	5．GGCNPA*4基質法	1	96	-	-	-	-
測定機器	10. 自動分析機	30	101.8	15.0	14.7	137	74
	20. ドライケミストリー	9	126.6	33.6	26.5	162	82
	21. 富士	4	95.0	8.9	9.3	102	74
	22. エクタケム	5	151.8	20.1	13.2	162	116
	30. ラバシステム	3	88.3	1.5	1.7	90	87
全　体		42	106.1	22.5	21.2	162	74

＊１：γ-グルタミル-３-カルボキシ-４-ニトロアニリド
＊２：γ-グルタミル-Ｐ-ニトロアニリド or-４-ニトロアニリド
＊３：γ-グルタミル-３-ヒドロキシメチル-４-ニトロアニリド
＊４：γ-グルタミル(-３-カルボキシ-４-Ｎ，Ｎ-ジ-ｎ-プロピルアミノ）アニリド

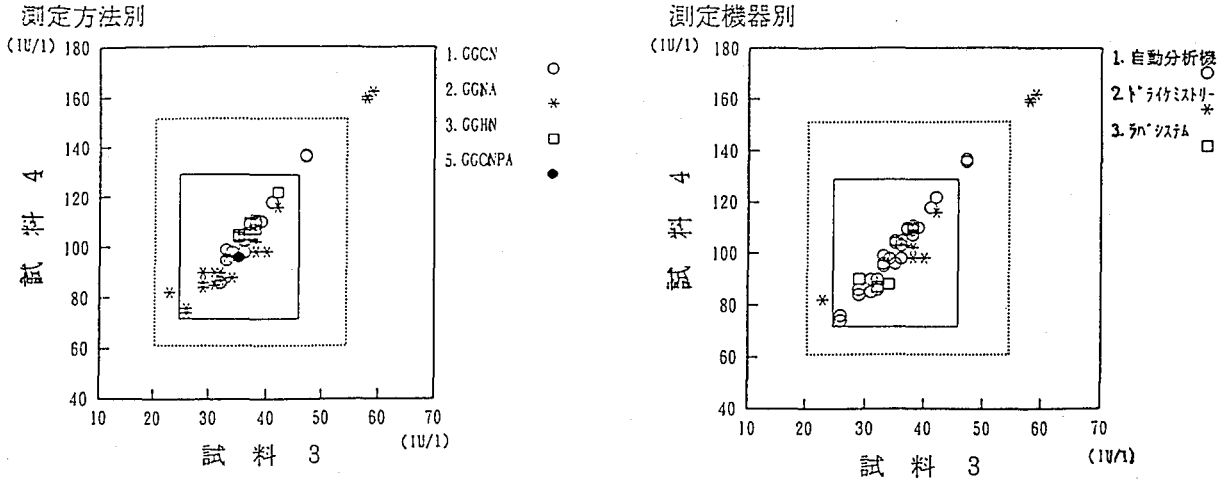


図３．測定方法別または機器別に分類したγ-GTの測定値散布図
⬚：全測定値から求めた$\bar{X}$±２SDの範囲
□：上記の範囲を超えた値を除外して，再度求めた$\bar{X}$±２SDの範囲

-カルボキシ-4-N,N-ジ-n-プロピルアミノ)アニリド基質法(以下，GGCNPA法と略)の1施設であった．γ-GTの測定については日本臨床化学会による勧告法が制定されていなかったが，さまざまな経緯を経て同会によって勧告法が制定された[5]．今後この方法を採用した測定試薬の開発が進むに伴い，この測定法を採用する施設の増加が予測される．勧告法に比べてGGNA法は低値を示すことが知られており，GGNA法で測定するエクタケムドライケミストリーは低値となるはずであるが，N社自身の測定と同様一番高い値を示しており，マトリックスの影響が懸念される．調査で使用した凍結乾燥血清はヒト血清を基に，ヒト細胞由来の精製酵素を添加して作製した酵素測定用管理血清であるが，凍結乾燥状態であることなどから，マトリックス効果を生じていることが考えられ，マトリックスの影響が発現する試料では精度管理調査を実施しても結果の正確な判定に困難を生ずることは，著者らも従来から指摘してきている．

図3．でみられるように，測定法の違いによる系統誤差の存在が明確になったが，測定の標準化に向けて勧告法の採用が今後各施設に求められるところである．しかしながら，以前，本調査で尿酸の測定法の自主的統一が迅速に進んだことを考えると，γ-GTにおいても比較的速やかに勧告法の採用が進むものと思われ，γ-GT測定の標準化が期待される．

要　約

都区保健衛生連絡協議会の事業の一つとして実施されている精度管理調査「生化学」に新たに取り込んだ中性脂肪，HDL-コレステロールおよびγ-GTの3項目について，その調査結果をまとめた．いずれも初めての調査にもかかわらず，おおむね良好な結果を得ることができた．中性脂肪の測定は，遊離グリセロール消去法によるものが半数以上であった．遊離グリセロール消去法で得られた値は，非消去法に比較してその平均値が低かった．HDL-コレステロールでは，煩雑な遠心分離作業を要しない化学修飾酵素＋硫酸化シクロデキストリン複合系の試薬で測定する施設が予想以上に多く，正確度の観点からも評価に値する結果が得られた．γ-GTでは測定法の違いにより系統誤差が観察されたが，勧告法が新たに制定されたこともあり，今後の推移を見守りたい．

凍結乾燥血清をドライケミストリーで測定した場合に生ずる問題があらゆる精度管理調査においてすでに提起されているが，今回の結果からも中性脂肪およびγ-GTのドライケミストリーによる測定ではマトリックスの影響が懸念された．精度管理調査用のより適切な試料の開発は未解決であり，今後の課題として残されている．
(付記：本調査は都区保健衛生連絡協議会総合部会において制定された「精度管理調査実施要綱」に基づき実施されたものであり，内容の一部は「平成7年度東京都・特別区衛生検査機関における精度管理調査報告書」にて報告ずみである．)

文　献

1) 東京都立衛生研究所：東京都・特別区衛生検査機関における精度管理調査報告書(第1～12回)(昭和53年度～元年度)，1991.
2) 都区保健衛生連絡協議会総合部会試験検査分科会精度管理検討委員会：平成2年度～平成6年度東京都・特別区衛生検査機関における精度管理調査報告書，1990～1994.
3) 東京都：昭和57年度～平成7年度(第1～14回)東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1982～1995.
4) 日本医師会：昭和57年度～平成7年度(第16回～第29回)臨床検査精度管理調査結果報告書，1982～1995.
5) 日本臨床化学会酵素専門委員会：臨床化学，**24**，106-121，1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 355-361, 1996

1986年-1995年東京都衛生検査所精度管理調査における酵素活性検査結果

蓑輪佳子*, 大石向江*, 伊瀬郁*, 小林千種*2
五十嵐英夫*3, 五味邦英*4, 亀井幸子*5
皆川彰*6, 河野均也*7

External Quality Control at the Registered Independent Clinical Laboratories in Tokyo for Enzyme Activity Tests from 1986 to 1995

KEIKO MINOWA*, HISAE OISHI*, IKU ISE*, CHIGUSA KOBAYASHI*2,
HIDEO IGARASHI*3, KUNIHIDE GOMI*4, SACHIKO KAMEI*5,
AKIRA MINAGAWA*6 and KINYA KAWANO*7

Keywords：精度管理調査 external quality control, 酵素活性検査 enzyme activity tests, 変動係数 coefficient of variation, 測定機器 instrument, 測定方法 method, 単位 unit

緒　言

東京都では，1982年から臨床検査の精度の向上を図るため，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，細胞診(1994年から)の検査項目を対象としている．その調査内容は日本医師会，日本臨床検査技師会が主催する広域的な精度管理調査の特長とは異なり，小規模の調査の利点を生かしたきめ細かなものとなっている．

このうち生化学の酵素活性検査については，成人病の診断や各種疾病の診断，スクリーニング検査などで有用であり，しかも多くの検査所が検査を行っているAST, ALT, ALP, LDH, γ-GT, AMYの6項目を対象に選び，1982年(第1回)から調査を行い，さらに1991年(第10回)にはCKを追加しこれまで調査を継続している．

著者らはこれまで生化学[1,2]，血液学[3]，血清学[4-6]の一部について調査結果をまとめ報告してきているが，今回は，前述の酵素活性7項目に関して1986年から1995年まで10年間の調査結果をまとめたので，ここに報告する．さらに測定機器，測定方法及び単位の10年間にわたる使用の動向を併せて報告する．

調査方法

1．精度管理調査の実施方法

1）実施年：1986年～1995年

2）対象検査所：東京都内には登録衛生検査所が約90施設あり，そのうち酵素7項目を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とした．対象検査所数は調査年度により異なるが，40～46施設の範囲であった．

3）対象項目：①AST (Aspartate aminotransferase), ② ALT (Alanine aminotransferase), ③ ALP (Alkaline phosphatase), ④CK (Creatine kinase), ⑤LDH (Lactate dehydrogenase), ⑥γ-GT (γ-Glutamyl transpeptidase), ⑦AMY (Amylase)の7項目について調査を実施した．

4）調査試料：調査試料には，2種類の市販凍結乾燥血清を使用した．1986年から1995年に使用した試料A及び試料Bの上記7項目の酵素活性値を表1に示した．これらは表に示した測定方法と国際単位で検査所から回答された各年度の測定結果の平均値の最小値から最大値である．

5）調査方法：検査所へ調査試料であることを明示して試料と調査票を配付し，測定結果の報告を求めるオープン方式で年1回実施した[7]．回答は，測定結果，測定

* 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
*2 同 食品研究科　*3 同 細菌第一研究科　*4 昭和大学医学部臨床病理学教室
*5 東京医科歯科大学医学部保健衛生学科　*6 日本医科大学第四内科教室
*7 日本大学医学部臨床病理学教室

表1．1986年～1995年に使用した配付試料の酵素活性値

検査項目	方　法	濃　度	
		試料A	試料B
1．AST	MDH-UV法	51～71 IU/l	134～166 IU/l
2．ALT	LDH-UV法	21～45 IU/l	55～134 IU/l
3．ALP	p-ニトロフェニルリン酸を基質とする方法	106～143 IU/l	235～862 IU/l
4．CK	クレアチンリン酸-UV法	124～149 IU/l	380～509 IU/l
5．LDH	P→L(NADH)-UV法	266～468 IU/l	660～936 IU/l
6．γ-GT	γ-グルタミル-4-ニトロアニリドを基質とする方法	17～31 IU/l	71～104 IU/l
7．AMY	酵素法	112～222 IU/l	601～1005 IU/l

法，外注の有無，試薬，標準液，使用機器及び単位について求めた．同時に，東京都ではブラインド調査も行っているが，ここではオープン調査のみについての報告にとどめた．

2．集計方法

1）機器別集計：ASTを代表例にとり，用手法で検査を行っている検査所数と自動機器を使用している検査所数をまとめた．また，自動機器使用については機種別の検査所数も示した．

2）測定法・単位別集計：各年度別・検査項目別に検査所が使用した測定法及び単位を分類し，全施設に対する百分率(%)で示した．

3）変動係数の経年変化：検査結果を単位，測定法別に分類し各グループごとに平均値($\overline{X}$)と標準偏差(SD)を算出した．次に，$\overline{X}\pm 3$ SDの範囲を超えた測定値を除外後，$n \geqq 6$ の場合再度$\overline{X}$とSDの計算を行い，変動係数(CV：%)を求めた．このような処理を行い，検体の取り違いやデータの記入ミスなどに由来する飛び離れ値による集計結果の偏りを避けた．

結果及び考察

1．検査所数の推移

表2に酵素7項目の参加施設数の推移を示した．

この10年間の登録衛生検査所数は，新規，廃止，検査所間の統合などがみられるが90ヶ所前後であり，この内の半数程度の登録衛生検査所が，これらの酵素項目を実施しており，10年間でその割合に顕著な増減はなかった．また，二次委託を行っている検査所が，項目により若干異なるが参加検査所の10～18%にみられた．

2．使用機器の推移

AST測定における自動機器の利用状況を表3に示した．自動化率の推移をみると1986年～1989年では，約10%の検査所は用手法による測定を行っていたが，その後自動化率が進み，1990年には1所になり1991年以降は全検査所で自動機器による測定が行われた．これは生化学の他の調査項目(総ビリルビン，総コレステロール，カルシウム，総蛋白など)でも同様な傾向であった[2)]．

自動機器の種類は，検査所の1/3から1/2が日立736を使用しているが，それを除くと使用される機種は毎年多

表2．参加検査所数の推移　　(　)：外注している検査所数

	1986年	1987年	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年	1994年	1995年
1．AST	46(8)	44(6)	44(5)	42(4)	41(4)	40(5)	42(7)	43(7)	45(7)	45(6)
2．ALT	46(8)	44(6)	44(5)	42(4)	41(4)	40(5)	42(7)	43(7)	45(7)	45(6)
3．ALP	45(8)	44(6)	43(5)	42(4)	41(4)	40(5)	42(7)	43(7)	45(7)	45(6)
4．CK	—	—	—	—	—	37(8)	37(9)	40(9)	41(9)	42(8)
5．LDH	45(8)	41(6)	42(5)	40(4)	40(4)	39(5)	41(7)	42(7)	44(7)	44(6)
6．γ-GT	46(8)	44(6)	44(5)	42(4)	41(4)	40(5)	42(7)	43(7)	45(7)	45(6)
7．AMY	43(8)	41(7)	41(5)	39(5)	38(5)	37(6)	39(8)	40(8)	42(9)	42(8)
調査時の登録検査所数	89	92	92	84	89	87	88	89	86	87

表3．ASTの測定機器の推移

	1986年	1987年	1988年	1989年	1990年	1991年	1992年	1993年	1994年	1995年
用手法	4	5	4	4	1	0	0	0	0	0
機器使用・全体	42	38	39	37	40	40	42	43	45	45
日立 400,500	1	1								
日立 706,706D	1	1	1	1						
日立 712,712S	2									
日立 726,726E	1	1	1							
日立 705,7050	3	2	2	2	3	3	1	1	1	1
日立 7070,7170							1	1	1	2
日立 7150				2	3	3	5	3	3	5
日立 7250								1	2	
日立 7350							4	3	3	4
日立 7450						2	2	4	5	6
日立 736	15	18	20	20	21	20	14	16	15	14
オリンパス ACA6000,8000	5	2								
オリンパス AU20	1									
オリンパス AU500,550,560	1	2	4	1	1	1	1	1	1	1
オリンパス AU700		1	1	1						
オリンパス AU800								2	2	3
オリンパス AU5000		2	3	3	5	5	6	4	5	4
オリンパス AU5200								1	1	1
日本電子 HS,VSシリーズ	1									
日本電子 VXシリーズ	1	1	1	1						
日本電子 RSシリーズ					1	1	1	1	1	1
日本電子 HR2100									1	1
東芝 TBA880,80S	3	2	2	2	1	1	2	1		
東芝 TBA30R					1	1	1	1	1	
島津 CL12	1	1								
島津 CL20							1		1	
島津 CL7000,7100					1	1	1	1	1	1
テクトロン XDシリーズ	2	1	1	1						
Abott ABAシリーズ	1	1	1	1	1					
アメリカンモニター ザ・パラレル	1	1	1	1	1	1	1			
Centrifi Chem	2	1	1	1	1					
エムシーメディカル スーパーZ818						1	1	1	1	1
エクタケム700N								1		
その他		1	1	1						

種にわたり10数種にも及んでいた．

3．測定方法・単位の変遷

図1及び図2は，10年間にわたる測定方法と単位の変遷を示したものである．

①AST・②ALT：ASTの測定法をみると1986年～1989年では，Reitman-Frankel法，GLDH-ホルマザン法，ピルビン酸オキシダーゼ法を採用していた検査所が1～3ヶ所あったが，1990年にはすべてMDH-UV法による測定になった．測定結果をどのような単位系で報告しているかをみると，1986年では国際単位(IU/l)を使用している検査所は33％であったが，年次的に国際単位(IU/l)の利用は増加し，10年後には96％の検査所が使用していた．一方，慣用単位であるカルメン単位は減少し，1995年現在カルメン単位で報告している検査所は2ヶ所にすぎない．

ALTの測定法および単位系は，いずれもASTと全く同じ傾向であり，測定法は，LDH-UV法が100％を占め，単位もIU/lの使用が96%を占めていた．

以上のように，AST，ALTではごく一部の検査所を除き，MDH-UV法(LDH-UV法)で測定を行い，IU/lで結果が報告されており，検査法，単位の統一化がほぼなされていることがわかる．

③ALP：ALPの測定結果は，1994年まで基質別に集計しており，1993年には使用される基質がp-ニトルフェニルリン酸に統一された．しかし，同一基質を使用していても緩衝液の違いが測定結果のバラツキの要因となるため，1995年からp-ニトロフェニルリン酸を基質とする場合には，使用する緩衝液によってさらに分類すること

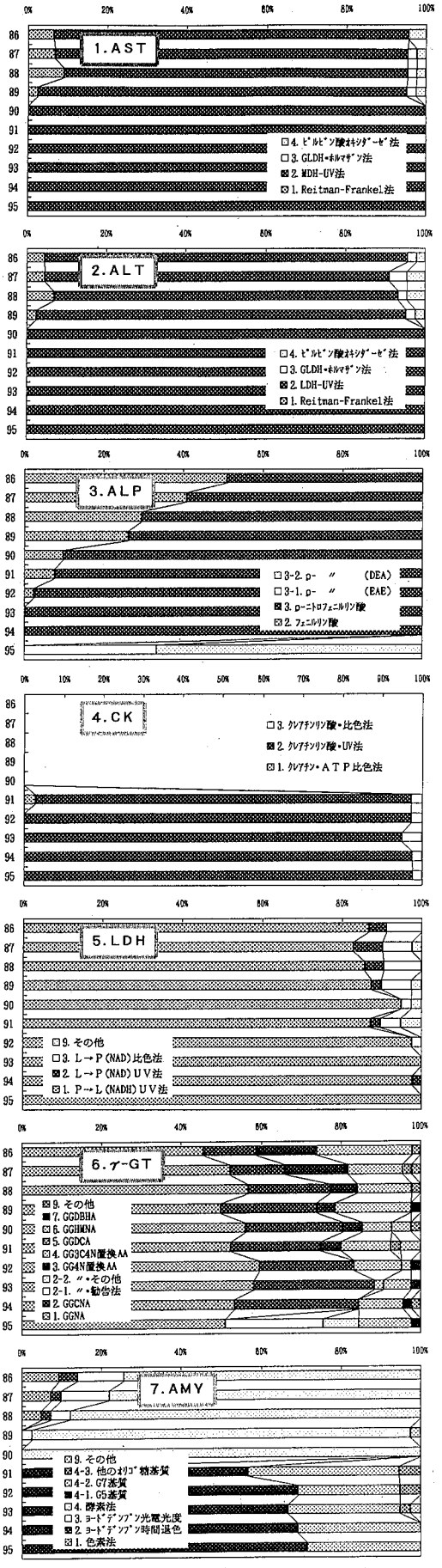


図1．測定方法の変遷

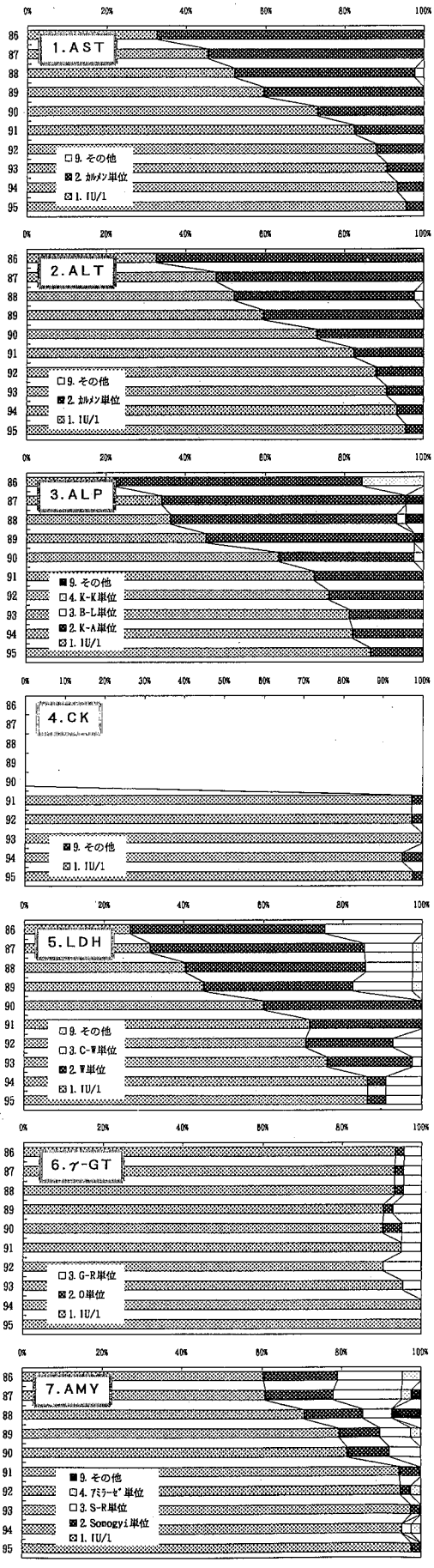


図2．単位の変遷

にした．図1をみると，基質としてフェニルリン酸を用いるKind-King法が広く用いられていたが，自動化が進んだ現在では100％p-ニトロフェニルリン酸を基質として用いる方法に変わってきている．しかし，同一基質を使用しても緩衝液にDEA(ジエタノールアミン)を使用する検査所が67％，EAE(2-エチルアミノエタノール)を使用する検査所が33％と二分化されており，これらが検査所間の活性値のバラツキが依然として改善されない一因であると考えられる．

次に，単位をみると図2に示されているように1986年では，IU/l，King-Armstrong単位，Bessey-Lowry単位，Kind-King単位など多岐にわたっていたが，ASTなどと同様に慣用単位が減少し，IU/lを採用する傾向がみられた．

④CK：1991年から調査対象に加えられた項目である．当初より1，2所を除きすべて，測定法はクレアチンリン酸・UV法を採用し，単位はIU/lを使用していた．

⑤LDH：測定法は，ピルビン酸を基質とし，NADの酸化を340nmの増減で測定するP→L(NADH)UV法がこの10年間大勢を占めており，1995年には全検査所でこの方法を使用していた．

図2から分かるようにLDHで使用される単位は，ALPと同様に国際単位を単位表示とする検査所が漸次多くなり(1986年：27％，1995年：86％)，Wróblewski単位(1986年：49％，1995年：5％)，Cabaud-Wróblewski単位(1986年：25％，1995年：9％)などの慣用単位を使用する検査所が減少する傾向がみられる．

⑥γ-GT：測定結果は，酵素反応に使用する基質により分類しているが，基質の使用頻度は10年間を通じγ-グルタミル-4-ニトロアニリド(GGNA)が半数を占め，次いでγ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド(GGCNA)，γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-N置換アミノアニリド(GG3C4N置換AA)の順で使用されている．しかし，同じように人工基質を使用しているALPに比べ，一つの方法(基質)に統一される傾向は認められず，これは測定に適した人工基質が次々に開発されているためと思われる．

それに対し，単位はIU/lが従来から大勢を占め，1994年からは全検査所で使用されていた．

⑦AMY：1989年までは，色素法，ヨードデンプン法が使用されていたが，これは用手法で測定していたためと思われる．1990年にはすべて酵素法になったため，1991年からはこの酵素法を基質の種類により分類したが，G_5基質を用いる方法が60％を占め，増加の傾向を示している．

単位をみると，1986年には検査所の40％が慣用単位を使用していたが，現在では国際単位を使用する検査所が41ヶ所(98%)となり，残りの1ヶ所がSomogyi単位を使用するのみとなった．

4．調査結果の検査所間における変動係数の経年変化

図3は，調査結果の検査所間における変動係数の経年変化を試料別に示したものである．

AST(ALT)の測定にMDH-UV法(LDH-UV法)を用い，単位にIU/lを採用していた検査所間では10年間の変動係数が経年的に小さくなり，検査所間のバラツキが少なくなってきていることが分かる．特に，ALTでは1986年の12％程度から，1995年には6％までに減少していた．しかし，他の5項目では，この10年間の変動係数からみて施設間のバラツキが改善されているとは言い難い状況であった．特に，ALP，CK，γ-GTは，その変動係数が20％前後を推移し問題が残る項目である．特に，1991年から基質の違いにより分類を行い集計したAMYでは，例年40％～50％とその変動係数は非常に大きかった．しかし，1995年に行った調査ではG_5基質を使用する測定法を用いた検査所間の変動係数は，試料A，B共に15%と著しい改善がみられた．

著者らが，これまでに報告した11年間(1982年～1992年)の生化学検査の精度管理調査結果では，総コレステロール，尿素窒素，クレアチニン，電解質(ナトリウム，カリウム，クロール)などの変動係数はいずれも2ないし3％であった[2]．バラツキが大きいと指摘されている総ビリルビンでも5％程度であった．これらは1992年以降の調査でも同様であった．これに対し，今回調査対象とした各酵素活性項目では，検査所間における測定結果のバラツキが極度に大きかった．

また，総コレステロール，尿素窒素，電解質(ナトリウム，カリウム，クロール)などの項目は，測定機器の自動化率の上昇とほぼ平行して変動係数の改善がみられ，自動化が検査所間の精度の向上に大きく寄与していた[2]ことが認められた．しかし，今回報告した酵素7項目では，完全に機器が自動化されても，施設間差の解消にはつながらなかった．

酵素活性測定においては，測定法の統一及び慣用単位から国際単位への統一が進んでいるにも拘わらず，施設間差が解消しない背景には，緩衝液の種類，濃度，pH，基質の種類，測定温度などの測定条件が多種多様であることが考えられる．これらの測定条件の違いに加えて，測定法によっては調査試料であるコントロール血清に共

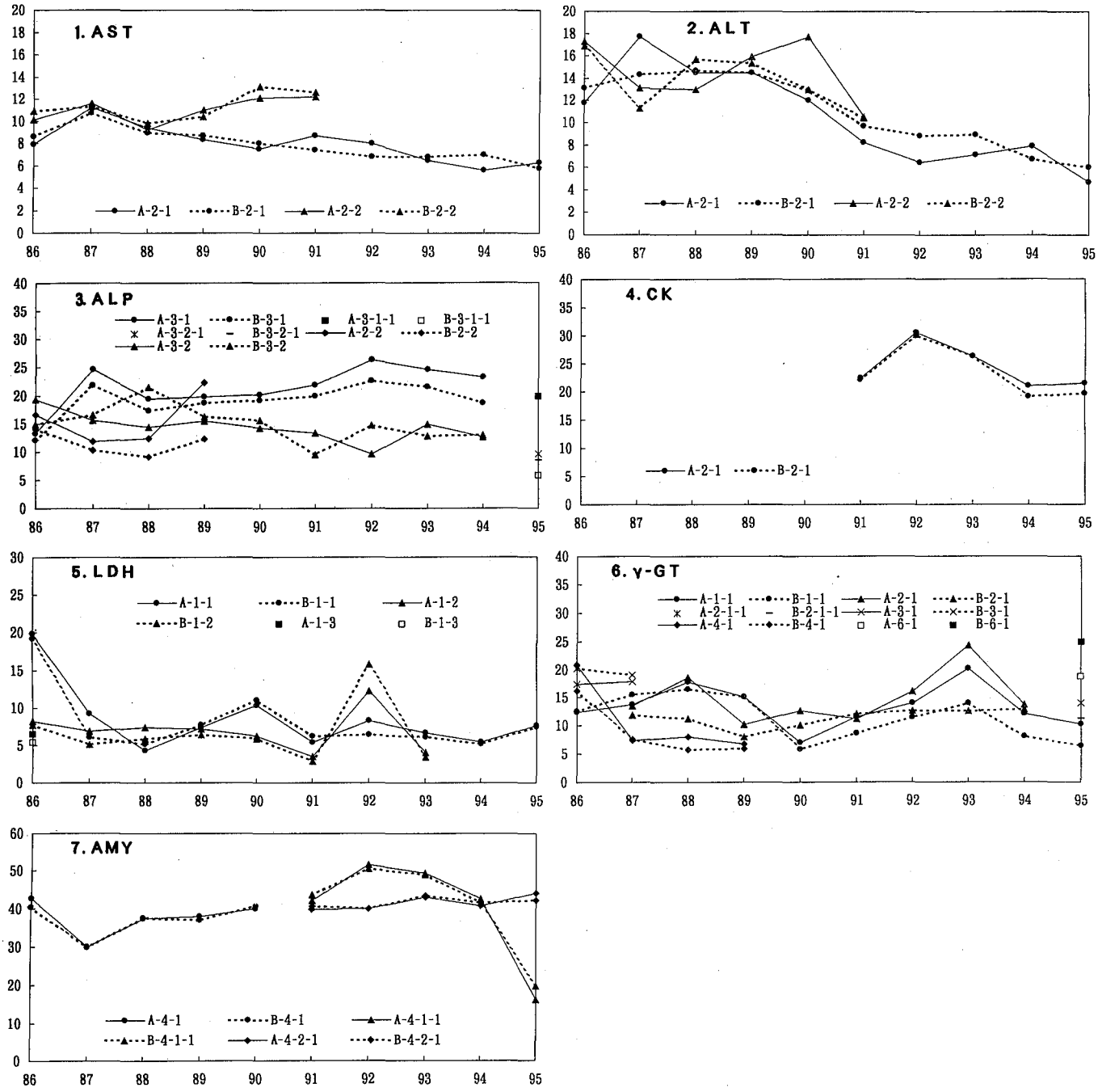


図３．調査結果の検査所間における変動係数の推移

横軸：年度　縦軸：変動係数(%)　凡例：(試料)－(測定方法)－(単位)
例(A)－ (3-1) －(1)
(B)－ (2) －(1)

項目	凡例中の番号:測定方法	凡例中の番号:単位
AST	2:MDH・UV法	1:IU/l　2:ｶﾙﾒﾝ単位
ALT	2:LDH・UV法	1:IU/l　2:ｶﾙﾒﾝ単位
ALP	2:ﾌｪﾆﾙﾘﾝ酸	1:IU/l
	3:p-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙﾘﾝ酸	2:King-Armstrong単位
	3-1:p-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙﾘﾝ酸(緩衝液EAE)	
	3-2:p-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙﾘﾝ酸(緩衝液DEA)	
CK	2:ｸﾚｱﾁﾝﾘﾝ酸・UV法	1:IU/l
LDH	1:P→L(NADH)UV法	1:IU/l　2:Wroblewski単位
		3:Cabaud-Wroblewski単位

項目	凡例中の番号:測定方法	凡例中の番号:単位
γ-GT	1:γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-4-ﾆﾄﾛｱﾆﾘﾄﾞ	1:IU/l
	2:γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-3-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4-ﾆﾄﾛｱﾆﾘﾄﾞ	
	2-1:γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-3-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4-ﾆﾄﾛｱﾆﾘﾄﾞ (勧告法の濃度)	
	3:γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-4-N置換ｱﾐﾉｱﾆﾘﾄﾞ	
	4:γ-ｸﾞﾙﾀﾐﾙ-3-ｶﾙﾎﾞｷｼ-4N置換ｱﾐﾉｱﾆﾘﾄﾞ	
AMY	4:酵素法	1:IU/l
	4-1:酵素法・G_6基質	
	4-2:酵素法・G_7基質	

※上記の番号は，図１及び図２で使用した凡例中の番号と同一

存する成分が，測定値に影響していることも結果の一致を困難にする要因であろう．

今後，病院間などの検査データの互換性が進むことを考えると，酵素活性値における施設間差の是正が必須となってくる．これまで日本臨床化学会(JSCC)により1989年にはAST，ALT，CK，ALP，LDHの5酵素項目[8,9]について，1995年にはγ-GTについて勧告法が制定された．本精度管理調査では，「酵素項目の正確度管理」としてJSCC常用基準法による表示値を付したヒト血清を検量用に使用し，未知濃度試料の測定結果の回答を求める方法の調査も同時に実施している．その方式では，測定結果の施設間のバラツキは小さかった[7]．今後，これらの勧告法が普及されることにより，施設間差も徐々に解消されていくと思われる．

今回は測定機器，測定方法及び単位について10年間の動向をまとめ，さらに変動係数の推移から施設間差の状況を報告した．今後，精度の向上を図るために，各項目の測定結果を正確度の面から解析していくことが必要となろう．

要　約

東京都内にある登録衛生検査所を対象にAST，ALT，ALP，CK，γ-GT，LDH，AMYの7項目について，検査精度の向上のために外部精度管理調査を行っている．今回は対象検査所からの10年間(1986年～1995年)にわたる調査データをもとに，測定機器，測定方法及び使用単位の動向をまとめると共に，変動係数により検査結果の施設間におけるバラツキの推移をみた．

前記7項目の酵素活性検査は，40～46ヶ所の検査所で実施されており，この10年間で顕著な増減はなかった．また，二次委託を行っている検査所が，参加検査所の10～18％にみられた．

機器の自動化率の推移をみると1986年～1989年では，約10％の検査所で用手法による測定を行っていたが，自動化率が進み，1990年には1所になり1991年以降は全検査所で自動機器による測定となった．

単位についてはいずれの項目でも国際単位(IU/l)が採用されるようになり，γ-GTでは全検査所が使用するに至り，他の6項目でも慣用単位を使用する検査所は数ヶ所になってきている．

測定方法の変遷をみると，AST，ALTは1990年から全検査所がMDH-UV法(LDH-UV法)を使用していた．また，LDHにおいても1995年には全検査所が，P→L(NADH)UV法を使用するようになった．その他の項目についても自動機器の普及により酵素法に収束してきたが，同一方法でも基質や緩衝液の違いが，検査結果のバラツキの一因となっていることが調査結果にあらわれていた．

検査所間のバラツキを変動係数の推移でみると，AST及びALTのMDH-UV法(LDH･UV法)，IU/lについては，変動係数が経年的に小さくなり検査所間のバラツキが少なくなっていることが分かった．しかし，他の5項目では，この10年間の変動係数からみると施設間のバラツキが改善されているとは言い難い状況であった．特に，ALP，CK，γ-GTは，その変動係数が20％前後を推移し，依然として問題が残されていた．AMYは，1995年から基質をG_5とG_7に分けて集計したが，G_5基質を使用するグループでのバラツキは少なかった．

(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) 仲川千種，大石向江，蓑輪佳子，鈴木重任他：東京衛研年報，**36**，132-136，1985
2) 小林千種，蓑輪佳子，大石向江，亀井幸子他：東京衛研年報，**44**，56-61，1993
3) 蓑輪佳子，大石向江，小林千種，一言　広他：東京英検年報，**42**，58-64，1991
4) 仲川千種，大石向江，蓑輪佳子，鈴木重任他：東京衛研年報，**37**，111-114，1986
5) 大石向江，小林千種，蓑輪佳子，河野均也他：医学検査，**40**(8)，1425-1430，1991
6) 蓑輪佳子，大石向江，小林千種，五十嵐英夫他：東京衛研年報，**46**，27-32，1995
7) 東京都：昭和61年(第5回)～平成7年(14回)東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1986～1995
8) 日本臨床化学会：臨床化学，**18**，211-262，1989
9) 日本臨床化学会：臨床化学，**19**，183-246，1990

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 362-367, 1996

疾病動向システムによる行政支援

池田一夫*, 上村　尚*, 竹内正博*, 鈴木重任**

Public Administration Support System using Structured Database System of Diseases

KAZUO IKEDA*, HISASHI KAMIMURA*, 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

研究目的

衛生行政の本来的な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. 当研究所では, 地域における疾病事象を把握し, 衛生行政を支援するために疾病動向予測システム(SAGE)を開発している[1-5].

本報告では, SAGEによる行政支援について考察した.

研究方法

本年は, SAGEに収蔵する統計情報の拡充とシステムの処理機能の拡充を実施した。

1．資料の収集

人口動態統計, 国勢調査人口, 住民基本台帳人口などの情報を諸外国も含めて収集した.

(1) 人口動態統計：死因, 男女, 5歳階級別
全国(1899-), 東京都(1950-), 道府県(1986-)
都2次医療圏(1986-), 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-),
その他44か国(World Health Statistics Annual最近3年分)

(2) 国勢調査：男女, 各歳人口
全国(1903-), 都道府県(1903-)

(3) 住民基本台帳人口：男女, 各歳, 区市町村別東京都(1985-)

2．SAGEの拡充

収集した情報を整理して, SAGEの地域比較の面を特に強化した.

地域比較には, 基準地域の死因・性・年齢階級別の死亡率に対する比(死亡率比, mortality ratio, MR)とその平均値(平均死亡率比, mean mortality ratio, MMR)を用いた. 各国比較の際には, 日本, アメリカ, イギリス, フランスおよびイタリアの合計値を基準とした.

研究結果

1．国際比較

日本の疾病特性を解析するために, 最近3年間の死亡パターンを国別に分析した.

基準地域(日本, アメリカ, イギリス, フランスおよびイタリアの合計値)と比較してその国の当該疾病の死亡率が高ければ暖色系で, 低ければ寒色系で彩色して, 疾病の国際比較を図1及び図2に, 地域コードと疾病コードを表1に示した.

日本の平均死亡率が基準地域と比較して顕著に高い疾病(平均死亡率比1.2以上のもの)は次のとおりであった. 男子：全結核(2.45：1994年における日本の死亡者数2,290人, 以下同様), 脳血管疾患(1.44：55,510人), 腎疾患(1.69：8,994人), 食道癌(1.20：6,778人), 胃癌(2.46：30,564人), 直腸癌(1.38：6,189人), 肝癌(2.70：20,764人)

*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

表1 地域コードと疾病コード

地域コード		
1 日本	17 オランダ	33 キルギスタン
2 アメリカ	18 ベルギー	34 カザフスタン
3 イギリス	19 スイス	35 メキシコ
4 フランス	20 オーストリア	36 ニカラグア
5 イタリア	21 スペイン	37 コスタリカ
6 カナダ	22 ポルトガル	38 コロンビア
7 オーストラリア	23 ギリシャ	39 ペルー
8 ニュージーランド	24 イスラエル	40 ブラジル
9 シンガポール	25 ポーランド	41 ウルグアイ
10 ホンコン	26 ハンガリ	42 アルゼンチン
11 韓国	27 ルーマニア	43 ジャマイカ
12 アイルランド	28 ブルガリア	44 プエルトリコ
13 フィンランド	29 ラトビア	45 トリニダードトバコ
14 ノルウェー	30 リトアニア	46 モーリシャス
15 スウェーデン	31 ロシア	
16 デンマーク	32 アルメニア	
疾病コード		
1 総死亡	12 全癌	23 前立腺癌（男子）
2 他殺	13 口腔・咽頭癌	子宮癌（女子）
3 自殺	14 食道癌	24 乳癌
4 自動車事故	15 胃癌	
5 自動車事故を除く事故	16 結腸癌	
6 全結核	17 直腸癌	
7 脳血管疾患	18 肝癌	
8 虚血性心疾患	19 喉頭癌	
9 糖尿病	20 肺癌	
10 腎疾患	21 膀胱癌	
11 肝硬変	22 白血病	

女子：自殺(1.76：6,865人)，全結核(2.02：804人)，脳血管疾患(1.35：64,729人)，腎疾患(1.84：9,795人)，胃癌(2.37：17,227人)，直腸癌(1.26：3,836人)，肝癌(2.84：7,913人)

2．年齢調整死亡率

諸外国と比べ平均死亡率比が顕著に高く，かつその死因による死亡者実数が多い疾病として男子の脳血管疾患と胃癌を，そして日本において死亡者数の増加が著しい男子の肺癌を選び，年齢調整死亡率の年次推移を各国と比較して分析した．その結果を図3，4，5に示す．

脳血管疾患の対10万人当たりの年齢調整死亡率(基準人口：1990年ヨーロッパ人口)は，1950年の246.2から増加をはじめ，1965年には370.0と最高値を示し，以後減少に転じ，1991年には93.2と最高時の約1/4となった．

胃癌は，1956年の96.1から順調に減少し，1991年には49.0と1956年の約1/2になっている．

肺癌は，1959年の12.7から年を追うごとに増加し，1989年には45.5となったが，1990年45.3，1991年45.7と頭打ちの傾向が見られ，1994年には46.4となっている．

考　察

地域の保健水準を向上させるには，①疾病状況を的確に観測し，②それを評価した上で，③行政施策を計画し，④その計画に基づき行動するということを継続して繰り返していくことが必要である(図6)．

保健水準の観測には，国内外の情報の収集とその情報に基づくデータベースの構築が必要であり，データベースを活用して計画，実施された行動の評価にも観測された情報を活用することが有効である．ここでは，SAGEによる企画および調査研究面からの行政支援について考察する．

(1) 企画

日本における肺癌の死亡者数は，1959年の男子3,329人，女子1,410人から，1994年の男子31,724人，女子11,752人へと急増している．年齢調整死亡率で見ると，

男子の場合，1959年の12.7から1989年の45.5へと増加しているが，近年では頭うちの傾向を示し1994年には46.4となった．その傾向は，アメリカ，西ドイツでも観測され，スウェーデンでは減少を示している．これらの状況を勘案すると，日本でも現状の傾向が続けば，肺癌の年齢調整死亡率の減少が期待できよう．

このような現状認識に立って計画を立案することにより，施策をより効果的，実効的なものとすることが可能となる．

(2) 調査研究

日本における脳血管疾患の年齢調整死亡率は，1960年代中ごろにピークを示したのに対し，西ドイツやスウェーデンなどでは1950年代以降順調に減少しておりピークは無い．この差は何に起因するものであろうか．また，日本の胃癌の年齢調整死亡率の高さやアメリカの低さは何に起因するのであろうか．

このように，調査研究の方向性をさぐるためにSAGEを活用することもできる．

結　論

保健医療対策に関する行政施策の立案を支援することを目的として開発した知識システム(SAGE)が，企画や調査研究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わかった．

行政が収集した情報を，行政自身が活用するのはもちろんであるが，今後は住民にも情報を積極的に公開していくことが必要であろう．

現在，一般的に印刷物として各種情報が公開されている．しかし，行政が収集した情報は基本的に住民に帰属する．住民が利用しやすい形で情報を公開していくことが必要である．インターネット上にWWWサーバーを構築し，情報を適切な形に加工して提供することも，数値情報をそのままの形で提供することも必要であろう．

当研究所では，SAGEのすべての情報をインターネット上で公開している(http：//www. tokyo-eiken. go. jp/index-j. html)．

(本研究は，平成8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．)

要　旨

地域における疾病事象を効果的に把握するための知識システムを構築した．当該地域の疾病事象を，世界，日本などのそれと比較することにより，世界的見地から地域的問題を観測することができた．本システムが，企画や調査研究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わかった．

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：肝膵胆，**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
5) 池田一夫，竹内正博，鈴木重任：東京衛研年報，**46**，293-299，1995

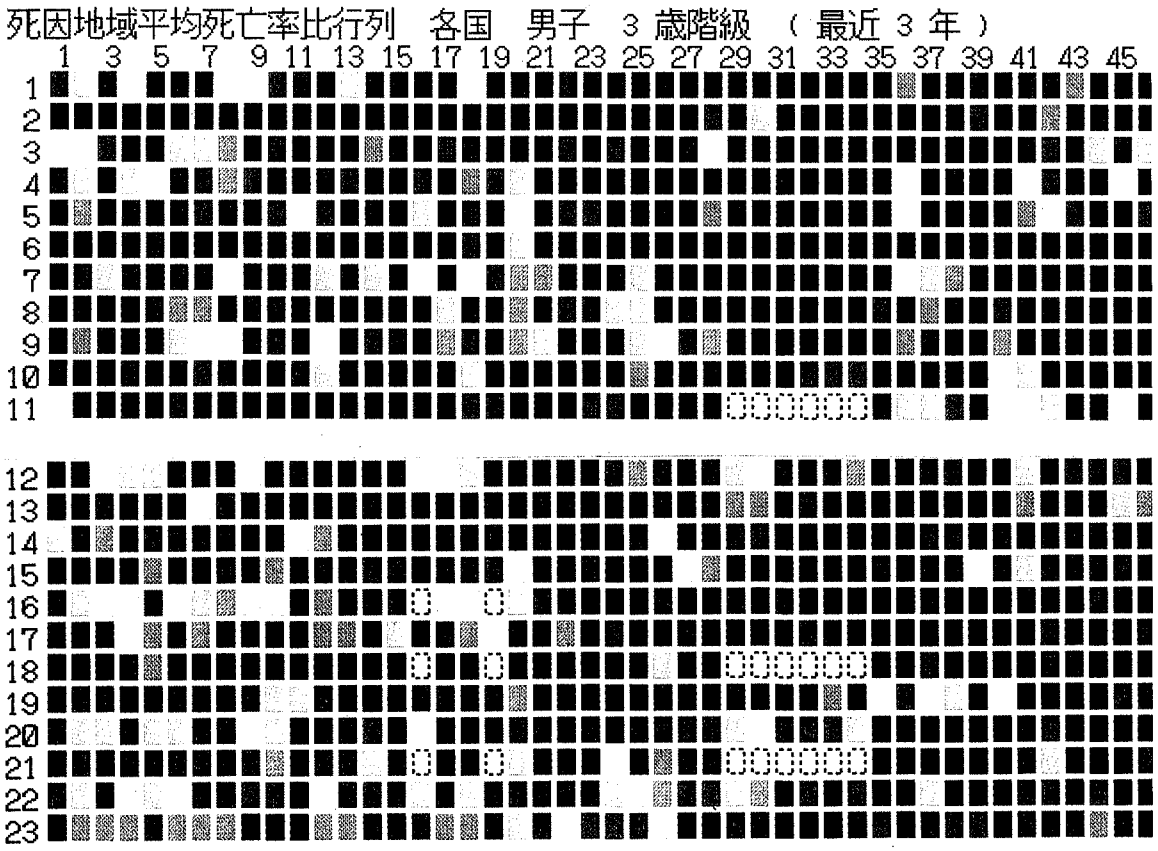


図１．平均死亡率比 死因・地域行列 各国 男子

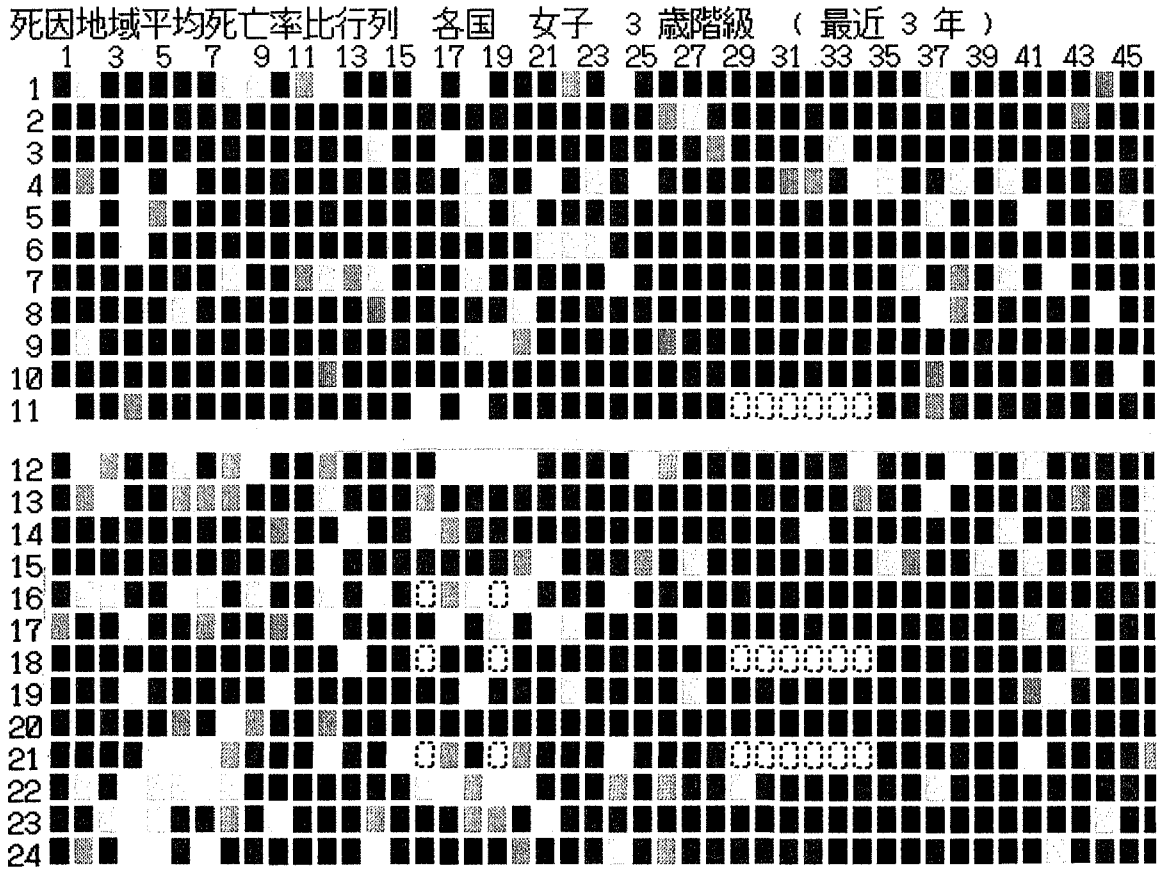


図２．平均死亡率比 死因・地域行列 各国 女子

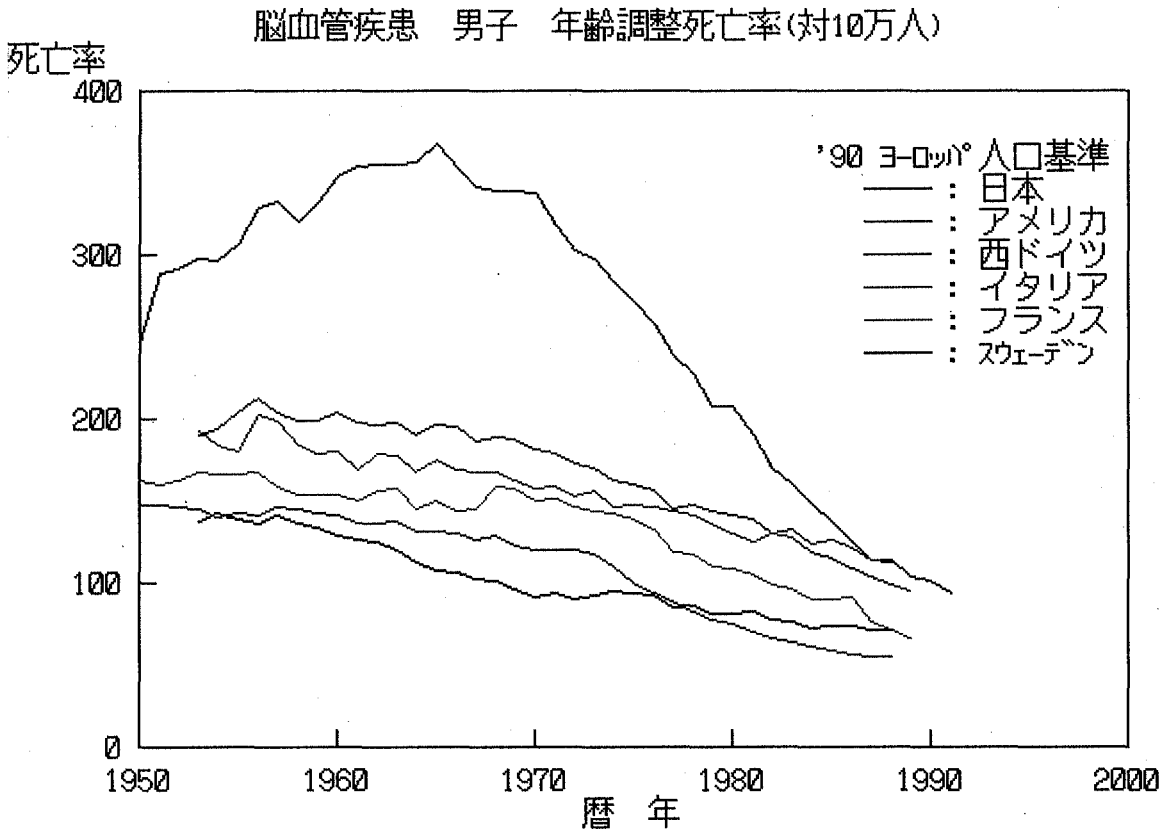


図３．脳血管疾患　年齢調整死亡率　男子

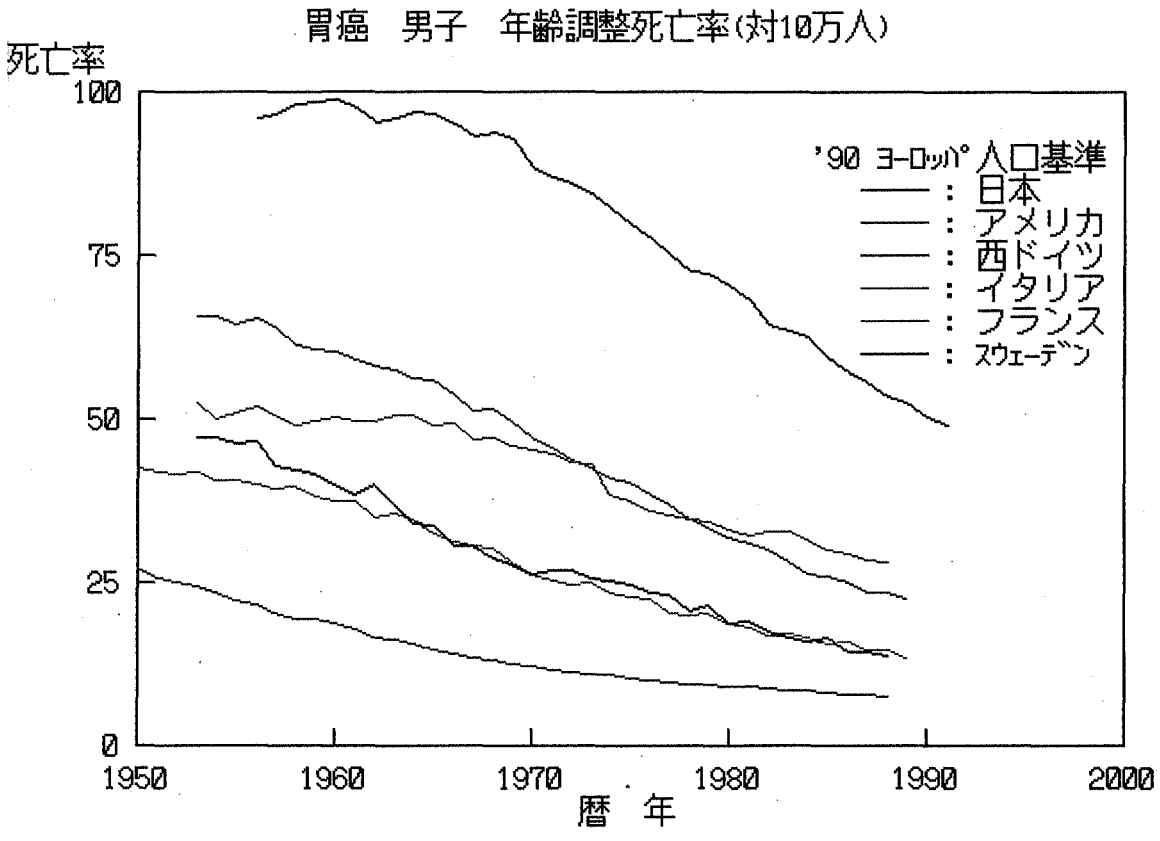


図４．胃癌　年齢調整死亡率　男子

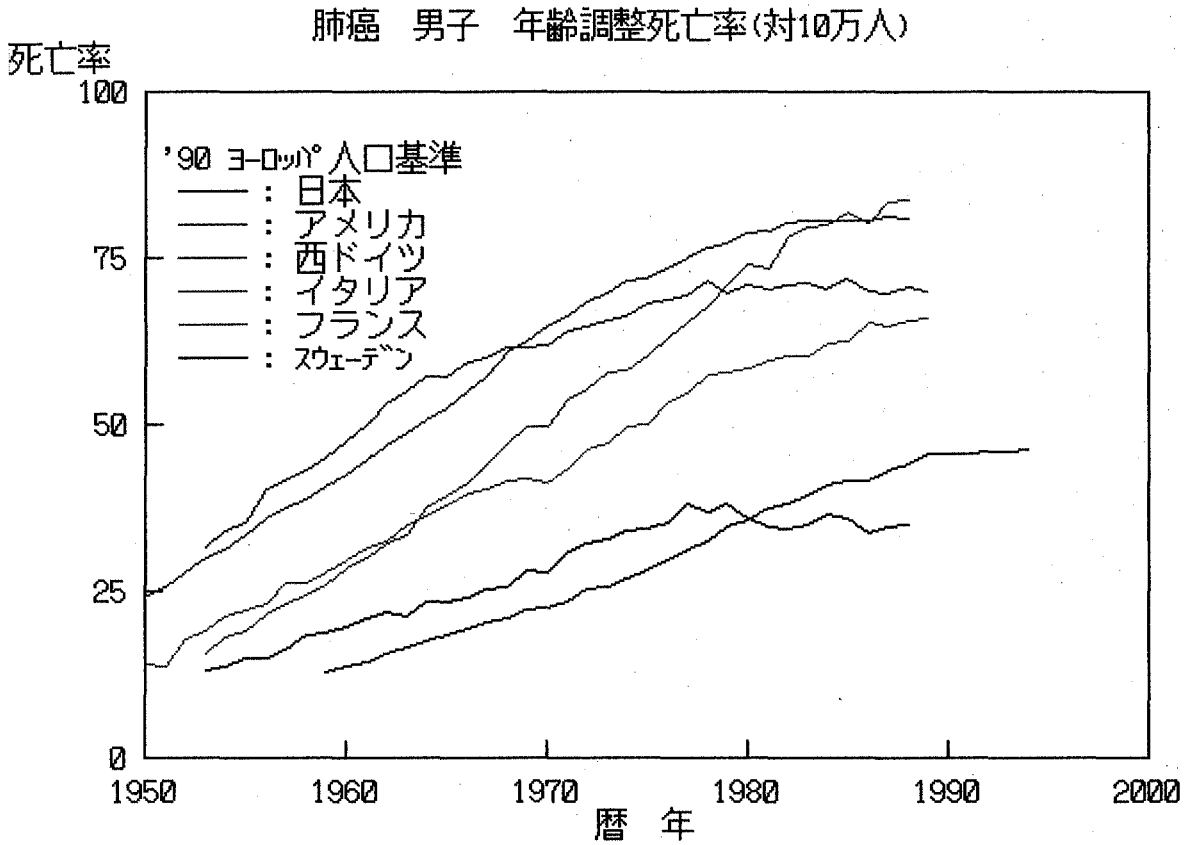


図5．肺癌 年齢調整死亡率 男子

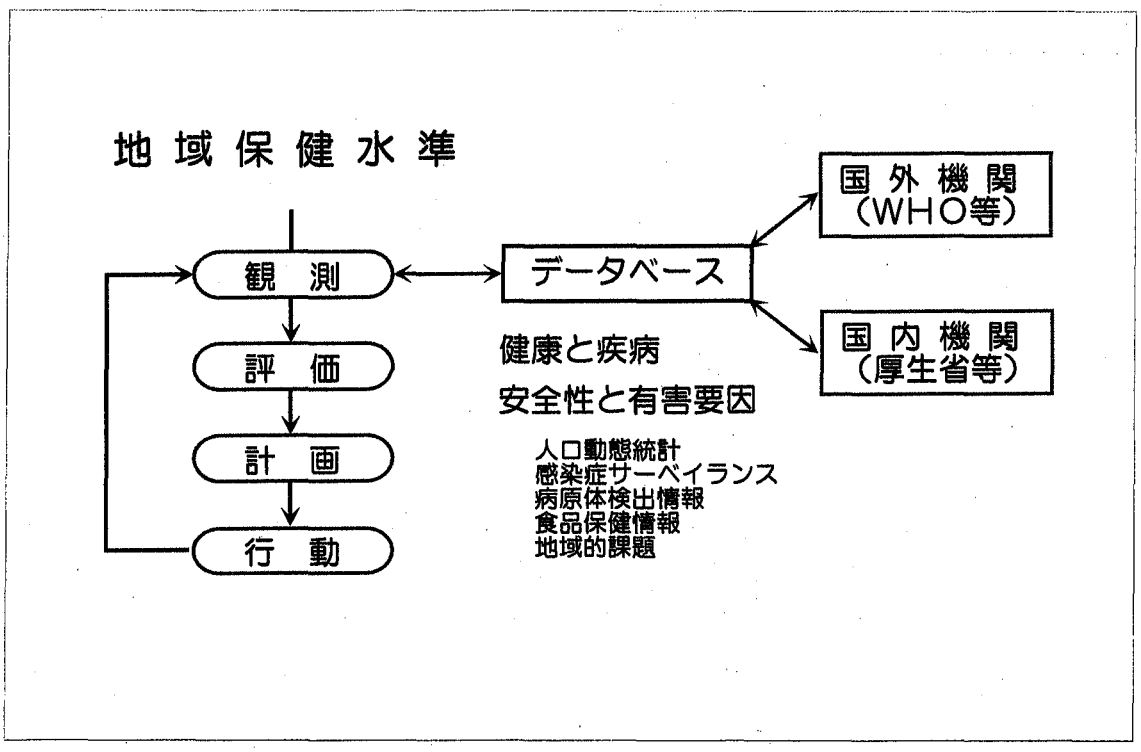


図6．データベースの役割

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 369-374, 1996

＜資料＞

衛生研究所からの情報提供

神谷信行*, 荻野周三*, 池田一夫*,
上村尚*, 竹内正博*, 佐々木美枝子**

World Wide Web (WWW) Server on tokyo-eiken. go. jp

NOBUYUKI KAMIYA*, SHUZO OGINO*,
HISASHI KAMIMURA*, MASAHIRO TAKEUCHI*
and MIEKO SASAKI**

Keywords：保健情報，公衆衛生情報 public health information，インターネット Internet，WWWサーバ WWW Server, World Wide Web

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的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．近年，化学物質，食品，飲料水，環境，感染症，食中毒等に関するさまざまな情報の集積が，ネットワークを利用して行われようとしている．地域保健サービスの充実をはかるためには，これに関係する試験研究機関や行政機関がこれらの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．

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など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．

東京都立衛生研究所では，平成6年にインターネットへの接続を行い，平成7年には情報提供のためのシステムを構築して情報の提供をはじめた．現在，インターネットを利用した衛生研究所からの情報提供の試みについて，その可能性と問題点の検討を行っている．

システムの概要

1．ネットワークシステム

システムの概要を図1に示した．すべての建物(4棟)にEthernetを敷設し，ネットワークオペレーションシステム(NOS)に，NetWare3.12Jを使用してLANを構築した．プロトコルには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．端末は各研究科の主な研究室，機器室，動物飼育室，図書室および事務室に約80台が設置されている．

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)あるいは各地域に設置されている地域ネットワーク団体に依頼することになるが，衛生研究所のような非営利の試験研究機関では，省際研究情報ネットワーク(IMnet：科学技術庁)，学術情報ネットワーク(SINET：文部省)やGDBnet(科学技術情報センター)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．

本庁および保健所からは当面，電話回線を通じてのダイアルアップで試験的に接続した．なお，各地研からも同様に接続できるように検討中である．

*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毒性部

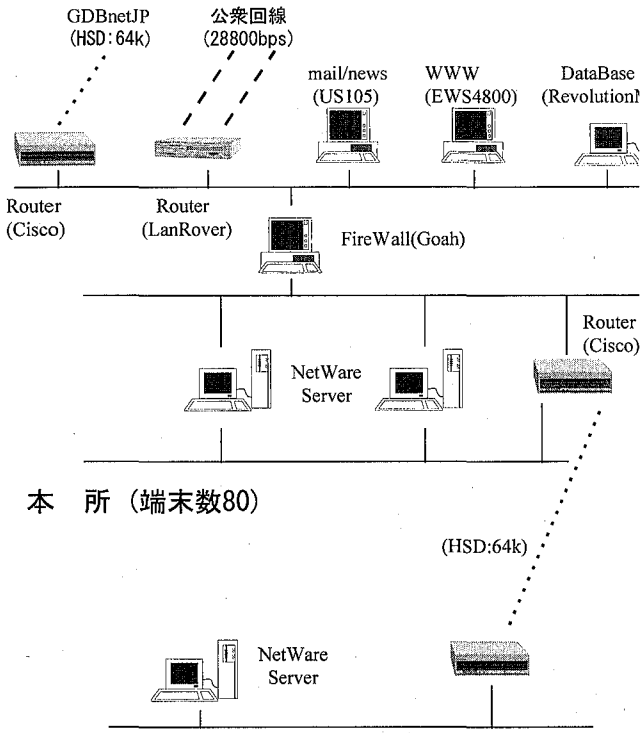


図1　システムの概要

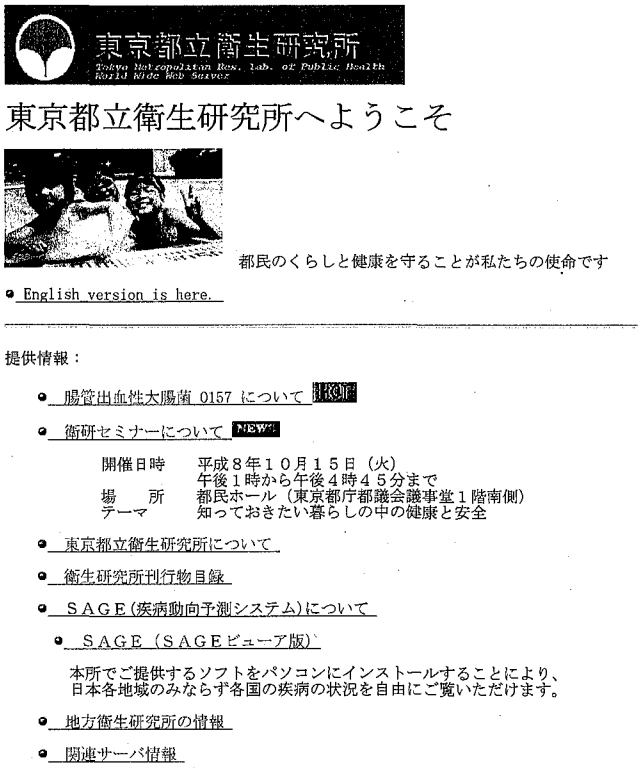


図2　東京都立衛生研究所ホームページ

機器構成は情報提供を行うWWW(World Wide Web)サーバにEWS4800(日本電気)を，電子メールやニュースを交換するためのメールサーバやニュースサーバには，US105(日本ユニシス)を，所内ネットワークを外部からの不正なアクセスから守るためのFire Wall にはGoahセキュリティサーバ(日本電気)を使用し，DNS(Domain Name System)はEWS4800に設定した．本庁，保健所等と電話回線を利用して接続するためにダイアルアップルータLanRover(Shiva)を設置した．

端末はWindows対応の機種(PC98,DOS/V)を中心として少数ではあるがMacも利用している．

2．提供情報の概要

衛生研究所からインターネットを通じて提供できる情報にはさまざまなものが考えられる．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るとともに，信頼感の向上を図ることになる．

当研究所のWWWサーバでは，東京都立衛生研究所ホームページ(図2)を開設し，以下に示すような情報をインターネットを通じて提供している．

(1)トピック：平成８年７～８月，腸管出血性(病原性)大腸菌O-157による食中毒が大阪府を中心に全国的な発生をみたが，これに関連して，細菌学的事項に関すること，食中毒に関すること，検査法に関することそれぞれについてQ&A(Qwestion & Answer)の形で情報を提供した．同時に東京都(衛生局)，厚生省，国立衛生試験所，国立予防衛生研究所，大阪府立公衆衛生研究所，大阪大学，大阪市立大学，横浜市立大学など，O-157に関する情報を提供しているWWWサーバへリンクの設定を行った(図３)．

(2)衛生研究所の概要：衛生研究所の事業内容の紹介や組織案内，各研究科の業務の内容を紹介するとともに，研究テーマや年間予算についての情報も提供している．また，科学技術週間の行事予定，衛研セミナーの案内などもその都度紹介している(図４)．

(3)地方衛生研究所の一覧：全国73地方衛生研究所の一覧を紹介するとともに，各地方衛生研究所で取り組んでいる調査研究の課題についてもその一覧を各分野ごとに紹介している．当研究所で所蔵する各地方衛生研究所発行の事業概要，業務報告，研究年報などの情報も提供している(図５)．

ベロ毒素産生性大腸菌（腸管出血性大腸菌 O-157）

- 腸管出血性大腸菌 O-157 についてのQ＆A（東京都立衛生研究所）
  - 細菌学的事項に関する質問
  - 食中毒に関する質問
  - 検査法に関する質問
  - O157、EIECおよび類似菌との鑑別性状
- 同 上 （ O157-Q&A.rtf ： 115KB, Microsoft Word形式 ）
- 他機関が提供している情報
  - Ｏ－１５７情報（厚生省）
  - 大腸菌O-157（大阪府立公衆衛生研究所）
  - 腸管出血性大腸菌とは（国立予防衛生衛生研究所）
  - 「病原性大腸菌O157」による食中毒情報（岡山大学）
  - O-157溶血性尿毒症症候群治療記録（大阪市立大学付属病院）
  - 腸管出血性病原性大腸菌O157に関する情報リンク（大阪大学）
  - 緊急情報 O-157情報（横浜市立大学）
  - O157に関する情報リンク（国立衛生試験所）
  - 病原性大腸菌 Ｏ（オー）－１５７情報（東京都）
    - 病原性大腸菌O-157の検出事例について（6月28日 東京都衛生局）
    - 病原性大腸菌O-157の検出事例について（7月12日 東京都衛生局）
    - 病原性大腸菌O-157の検出事例について（7月19日 東京都衛生局）

更新日：１９９６年８月１２日

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

「腸管出血性大腸菌 O-157」に関してご質問などがございましたら ここ をクリックしてください。

ただし、個別にお答えはしかねる場合がありますのでご了承下さい。
また、医療相談には応じられません。医院、病院でご相談下さい。

ホームページに戻る

腸管出血性大腸菌 Q&A-3

検査法に関する質問

Q 糞便からのVTEC検査用培地は何が良いのか？
A 分離培地：腸内細菌の分離培地であるDHL寒天やマッコンキー寒天など選択性のやや弱い培地を用いる．VTEC O 157を対象にする場合には本菌がソルビトール非分解あるいは遅分解であるのでマッコンキー寒天の乳糖の代わりにソルビトールを添加した培地（SMA:Oxoid）あるいはSIB（Sorbitol IPA Bile：極東製薬）寒天が市販されている．これらの分離用培地はO157の選択培地ではなく、大腸菌用の分離培地である。

Q 食品からのVTECの検査用培地は何がよいのか？
A 増菌培地は、ノボビオシンを添加したmECブイヨン（Tryptone:20g/l,bile salts #3:1.12g/l,lactose:5.0g/l,K2HPO4:4.0g/l,KH2PO4:1.5g/l,NaCl:5.0g/l, sodium novobiocin:20mg/l,pH7.0：極東製薬）がある．本培地の培養温度は他の腸内細菌の増殖を抑制できる42～43℃が最適である．ふん便性大腸菌の検査に用いられている44.5℃ではVTEC O157は増殖速度が著しく遅く、発育不良である。増菌培養後の分離培地はSIB寒天やDHL寒天を用いる。
本増菌培地もO157を選択的に増殖させるものでない。食品や水からの検査では分離寒天上の集落を可能な限り多数の集落（100集落以上）について調べなくてはならない。

Q 増菌培養液からのVTECの証明方法はあるのか？
A 増菌培養液や二次増菌培養液（TSB）中にVTECが存在することの証明法としてはVT遺伝子を検出するPCR法や菌体を証明するELISA法などの免疫学的な方法がある。また、ベロ毒素を細胞培養法により証明することもできる。これらの方法により陽性と判定された場合、増菌培養液から分離培養を行い、出来る限り多数の集落についてベロ毒素の産生性を調べる．

Q 分離菌株のVTECの同定法は？
A 分離寒天上の大腸菌を疑う集落を可能な限り多数釣菌して下記の性状を検査する．
①TSI寒天
②LIM培地
③シモンズのクエン酸塩培地
④普通寒天斜面培地（オキシダーゼ）
これらの確認培地で大腸菌が同定できるが、さらに確認するためにはVP半流動培（VP試験）、尿素培地（尿素試験）、SIM培地（IPA反応）などの培地により性状検査を実施する．VTEC O157は他の大腸菌と異なりソルビトールが陰性か遅分解であるし，MUG試験も陰性となる．その他のVTECは典型的な大腸菌の生化学的性状を示す．但し、ソルビトール陽性のO157の存在も考慮すること。

Q VTの検査は？
A VTECに該当する血清型であっても毒素非産生のこともあり、必ず毒素の試験を実施し、その結果に基づいて判定しなければならない．
VT毒素の検出法としては，菌の産生する毒素を検出する方法と，ＶＴ産生遺伝子そのものを検出する方法に大別される。前者では，培養細胞によるバイオアッセイ，ラテックス凝集反応法 やELISA法などのイムノアッセイがある。
VT産生遺伝子そのものの存在を調べる方法で，DNA プローブ法や遺伝子増幅（ＰＣＲ）法がある。

Q 何病日までの糞便ならば菌の検出が可能ですか？
A VTECの排菌量は病日の経過と共に減少するので，糞便はできる限り発病初期の、かつ抗菌物質投与前のものを採取する。これまでの報告例では下痢発症後 3-6日であれば菌検出が可能であるが、１週間以上では陽性率が30%以下となる。また下血の見

図３ 腸管出血性大腸菌O-157に関する情報

東京都立衛生研究所 事業案内

- 事 業 案 内
  - ごあんない
  - 業務の内容
  - 組 織
  - 各研究科の紹介
  - 職員数・予算・業務実績
  - 施 設
  - 案 内 図
    - 本 所（44,526ﾊﾞｲﾄ）
    - 多摩支所（31,639ﾊﾞｲﾄ）

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

「事業案内」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。

ホームページに戻る

東京都立衛生研究所 業務の内容

- 業 務 の 内 容

東京都立衛生研究所は、「組織」の項で示すように、様々な公衆衛生の分野、すなわち（1）感染症その他の疾患の予防、（2）薬事衛生、（3）食品衛生、（4）環境衛生、及び（5）毒性研究を包含しています。そして、それぞれの分野において、(i)調査研究、(ii)試験検査、(iii)研修指導、及び(iv)公衆衛生情報の収集解析提供の４つを業務の柱として活動しています。これらを互いに連携させ、基礎から応用までの幅広い業務を行う、包括的な検査サービス機関です。

- 調査研究

公衆衛生の各分野で調査や基礎的、応用的な研究が活発に行われています。先行的な調査や研究の結果が行政対応の方向付けや対策の方針決定に役立った例は少なくありません。検査法の改良、開発のための研究も大きな部分を占めています。これらの調査研究の成果は内外の学会や学術雑誌に発表し、当研究所の研究年報に公表しています。

- 試験検査

平常時検査と緊急時検査とがあります。平常時の検査には、食品、水、医薬品などの安全性を確保するための検査、患者や保菌者を早期に発見するための検査、行政上必要な検査、環境保全のための検査、各種化学物質の毒性をチェックするための検査などがあります。伝染病の流行、食中毒や事故発生時に実施される緊急時の検査は、流行の拡大や事故の再発防止をするために重要な役割を果たしています。

- 研修指導

試験検査に係わる実務研修を、都及び特別区の関係技術職員を対象として実施しています。また、WHOやＪＩＣＡなどの要請によって、海外からの研修生も受け入れています。
近年、保健医療関係の検査法が発達し、複雑化、多様化してきました。そのため、各種検査の標準化と精度管理の必要性が高まっています。当研究所では、研修指導の一環として、検査の精度を維持するための役割も果たしています。

- 公衆衛生情報の解析提供

昨今、人や物資の移動が広範化し、健康に係わる問題の把握には広域監視体制が必要となっています。感染症や食中毒の発生状況、特に病原体の特性についての全国的な情報網の中で当研究所は重要な役割を果たしています。「東京都微生物検査情報」を毎月発行し、情報を保健所、病院、都医師会会員などに提供しています。また、東南アジア諸国とも感染症に関する情報の交換に努めています。
栄養成分の摂取量、化学物質による環境汚染の全国調査にも参加しています。

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

「事業案内」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。

ホームページに戻る

図４ 東京都立衛生研究所の概要

地方衛生研究所業績集

- 地方衛生研究所業績集
  - ０１　細菌
  - ０２　ウイルス
  - ０３　衛生動物
  - ０４　臨床検査
  - ０５　食品微生物
  - ０６　食品化学
  - ０７　栄養
  - ０８　薬事
  - ０９　環境保健
  - １０　環境衛生化学
  - １１　環境微生物
  - １２　病理
  - １３　毒性
  - １４　疫学
  - １５　精神保健
  - １６　産業保健
  - １７　廃棄物
  - ５１　大気汚染
  - ５２　水質汚濁
  - ５３　騒音振動
  - ５４　環境物理（放射能）
  - ８８　その他

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

表題：高速液体クロマトグラフィーによる畜水産食品中の合成抗菌剤の一斉分析（第２報）　液－液抽出によるクリーンアップ法の検討
代表者：西村一彦　地研名：北海道　発表年：1994

表題：食品の安全性について－北海道における検査及び調査から－
代表者：岡田迪徳　地研名：北海道　発表年：1994

表題：食品検査情報システムについて
代表者：木原敏博　地研名：札幌市　発表年：1994

表題：輸入原料を使用した国内加工食品中の農薬残留実態について
代表者：伊藤正則　地研名：札幌市　発表年：1995

表題：酸化防止剤の分析におけるｹﾞﾙ浸透ｸﾛﾏﾄｸﾞﾗﾌｨｰの適用について
代表者：西尾香奈子　地研名：札幌市　発表年：1994

表題：輸入食品検査における事例紹介について
代表者：河合正暁　地研名：札幌市　発表年：1994

表題：冷凍ﾎﾟﾃﾄ中のﾏﾚｲﾝ酸ﾋﾄﾞﾗｼﾞｯﾄについて
代表者：阿部敦子　地研名：札幌市　発表年：1994

表題：青森県における貝毒調査結果（平成５年）
代表者：三浦啓徳　地研名：青森県　発表年：1994

表題：輸入食品の残留農薬に関する研究Ｖ－ＧＣ／ＭＳによる野菜中の有機塩素系及びピレスロイド系農薬の一斉分析－
代表者：菊池憲夫　地研名：岩手県　発表年：1994

表題：食品中の天然着色料コチニール色素，ラック色素の分析
代表者：小林孜　地研名：宮城県　発表年：1994

表題：平成５年度食品残留農薬実態調査
代表者：須藤由希子　地研名：宮城県　発表年：1994

表題：仙台市の住民を対象とした揮発性有機ハロゲン化合物の摂取量調査（第２報）
代表者：佐藤尚美　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：食事に由来する揮発性有機ハロゲン化合物の個人摂取量調査
代表者：佐藤尚美　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：輸入ウオッカ中のフタル酸ジブチルの定量について　－高速液体クロマトグラフおよびガスクロマトグラフ法による－
代表者：情野正道　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：タマネギ中の有機リン系農薬の簡易分析法
代表者：上西玉樹　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：食品検査における簡易金属測定の試み（第一報）　－D2補正原子吸光法－
代表者：菊池正行　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：食品添加物の一日総摂取量調査（第14報）　－高齢者を対象とした食品中のプロピレングリコールについて－
代表者：大澤テイ子　地研名：仙台市　発表年：1994

表題：食品の栄養学的成分の調査研究－新品目野菜の栄養成分，ひ素および重金属の含有量調査－
代表者：沢部光一　地研名：秋田県　発表年：1994

図５　地方衛生研究所の調査研究課題

(4) 疾病動向予測システム：当研究所で開発した疾病動向予測システム(SAGE)をＷＷＷサーバ上に構築した．Sybase (WindowsNT版) を用いたデータベースサーバを設置し，検索ソフト(Netscape)に対応したグラフ表示を行うアドインソフトを開発し，提供している．利用者は必要な条件を設定することにより，グラフ化されたわかりやすい形で提供を受けることができる．また同時に数値表としても提供している(図６)．

(5) 関連サーバの紹介：東京都の医学系試験研究機関でつくる東京メトロネット，東京都の情報を提供している東京テレポートをはじめ，国立衛生試験所，国立予防衛生研究所，国立健康・栄養研究所，国立環境研究所などの国立機関，WHO，FAO，CDC，FDAなどの海外の関連機関へ簡単に接続できるようにリンクを設定している(図７)．

システムの問題点

インターネットには，盗聴，システムへの侵入，情報破壊などいくつかの危険事項が存在する．もし，システムに進入された場合には，データの改ざんや破壊にまで進むことになるほか，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，Fire Wallと呼ばれる侵入防止システムの設置が効果を上げている．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，危険の多くは回避することができる．なお，学会等に投稿した論文等を掲載する場合は，著作権なども問題になると思われるため，この点についても注意が必要となる．

ＳＡＧＥ（疾病動向予測システム）

- ＳＡＧＥ概要

ＳＡＧＥは東京都立衛生研究所で開発している疾病動向予測システムです。
ＳＡＧＥは、疾病の状況把握と将来予測を目的としたものであり、保健医療行政をより効果的に推進することを可能にする政策支援システムです。

- ＳＡＧＥによる行政支援

- ＳＡＧＥの実際
  - 疾病構造分析
  - 疾病構造予測
  - 疾病構造分析　戦前より
  - 死因別死亡率比
  - 地域別死亡率比
  - 平均死亡率比行列

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

ＳＡＧＥ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。

ホームページに戻る

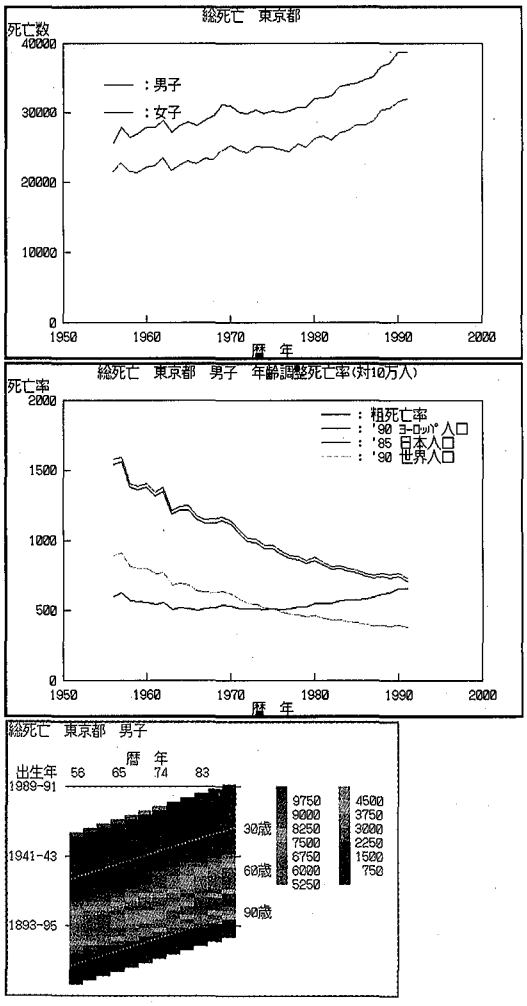


図６　疾病動向予測システム(SAGE)の提供

関連サーバ情報

•公衆衛生関連サーバ情報

- 東京メトロネット
  - (財)東京都臨床医学総合研究所
  - (財)東京都精神医学総合研究所
  - (財)東京都老人総合研究所
- 東京都
  - 東京都
- 国および地方公共団体
  - 首相官邸
  - 厚生省
  - 国立衛生試験所
  - 国立予防衛生研究所
  - 国立健康・栄養研究所
  - 家畜衛生試験所
  - 国立がんセンター
  - 国立環境研究所
  - 大阪府立公衆衛生研究所
- 諸外国
  - 世界保健機関　WHO
  - アメリカ　防疫センター　CDC
  - イギリス　防疫センター　CDSC
  - アメリカ　国立衛生研究所　NIH
  - アメリカ　食品医薬品局　FDA
  - アメリカ　環境保護局　EPA
  - アメリカ　農務省　USDA
  - 国連食糧農業機関　FAO

•情報検索

図７　関連サーバへのリンク

今後の動向

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．

今後については各地方衛生研究所でのインターネットの利用方法や食品，家庭用品などの苦情や食中毒の事例をFAQ (Frequentry Asked Question) の形で提供するほか，感染症の流行予測，食品添加物の変異原性試験の成績など試験研究データについても情報の提供を検討している．また，この夏に大きな問題となった腸管出血性(病原性)大腸菌O-157による食中毒の発生にみられるような緊急な事例が発生した場合には，随時，可能な限り迅速に情報を提供していきたいと考えている．

食品や微生物に関する検査あるいは研究情報は衛生研究所が長年にわたって培なってきたものであり，現在そ

れぞれの分野毎にデータベース化が進んでいる．それらのデータベースは衛生研究所からの情報の発信源としてますます重要になる．しかし，これらのデータベースはおうおうにして個別に構築されており，横断的，相補的なシステムになっているケースは極めて希である．今後はそれぞれのデータベースをリンクさせ，一事象を多面的に捉える情報システムを構築し，ネットワークシステムに対応させる総合的な情報システムが必要となる．コンピュータとそのソフトウェアの今日的進歩を考えれば，個別のデータベースをリンクさせることは技術的にそれほど難しいことではない．数年前までは情報ネットワークの構築は都市における下水道や高速道路網の構築にも似た一大事業と考えられてきた．しかしインターネットの出現により，いとも易く情報ネットワークの構築が可能となった．

一事象を多面的に捉える，具体的には衛生研究所の微生物，医学，化学，毒性学等の各分野が連携し，総合的な視点で捉えることができれば，これまでとは違った新しい局面が展開し，行政をこれまで以上に支援する情報提供が可能となろう．

付記　本研究は．平成7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．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **47**, 375-379, 1996

＜資料＞

インターネットで得られる感染症情報

池田一夫*, 上村　尚*

How to get Information about Infectious Diseases using Internet

KAZUO IKEDA* and HISASHI KAMIMURA*

Keywords：感染症 infectious diseases, 情報検索 information retrieval, インターネットInternet

はじめに

1993年インターネット上でWorld Wide Web Server (以下WWWサーバと略す)を用いての情報提供が開始された．これを境に，インターネット上での情報の提供方式に大規模な変革が起こった．それまでは，キーボードで暗号のようなキーワードの入力を行わない限り，インターネット上の情報を入手することができなかった．それが，マウスを使うだけで必要な情報が入手できるようになったのである．

本資料では，インターネットを用いて得られる感染症情報に関して，(1)情報を提供している機関とそのアドレス，(2)定期刊行物，(3)情報検索サーバなどについて紹介する．なお，ここで紹介するものはすべて無料で情報が入手できるものばかりである．

感染症情報を提供している機関

1995年5月にザイールでエボラ出血熱が発生した．このときに大活躍をしたのが，CDC (Centers for Disease Control, USA) と WHO (World Health Organizatio, Switzerland) である．

1　CDC

CDCのアドレスは，

http：//www.cdc.gov/

である．ホームページを図1に示す．

「Health Information」をマウスでクリックすることにより，数多くの疾病関連の情報を入手することができる．

また，

http：//wonder.cdc.gov/

にアクセスすることにより，CDCが提供している各種の情報を検索し，入手することが可能である．

2　WHO

WHOのアドレスは，

http：//www.who.ch/

である．ホームページを図2に示す．

このページで感染症関係で特に有用なのは，ページの中央付近にある「Outbreaks」である．ここをクリックすると「Outbreaks」のページが開き (図3，http：//www. who. ch/outbreak/outbreak_home. html)，さらにここで「·News reported to WHO on Disease Outbreaks」をクリックすると，感染症の発生に関する世界の最新情報を入手することが可能である (図4，http：//www. who. ch/programmes/emc/news. htm)．1995年5月にザイールでエボラ出血熱が発生した際には，情報が毎日更新され，時々刻々と変化するザイールでの状況を観測することが可能であった．

3　ProMED

The Program for Monitoring Emerging Diseases (ProMED)のアドレスは，

http：//www. healthnet. org/promed. html

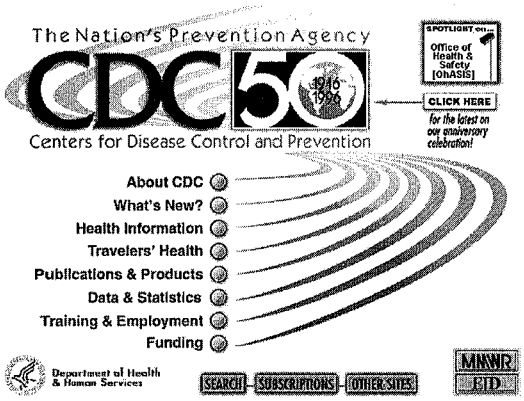
である．ホームページを図5に示す．図5のIntroductionで示されるように，ProMEDは，感染症発生の際，関係諸機関や医師がそれに迅速に対応できるように構築された情報システムである．

パソコン通信でいえば一種の談話室である．CDCやWHOとは異なり，その情報の内容については，一切チェックを受けていない．そのため，情報の質については千差万別であるが，その点を考慮して情報収集を行え

*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

[Text version]

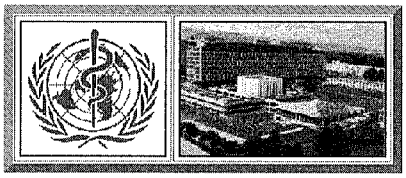


About CDC | What's New | Health Information
Travelers' Health | Publications & Products | Data & Statistics
Training & Employment | Funding

Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd., NE, Atlanta, GA 30333, USA

Send questions or comments on specific public health topics to CDC's individual Centers, Institute, and Offices.
Comments to: Webmaster

図1　CDCのホームページ



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Welcome to the home page of the experimental World Wide Web InfoServer of WHO, amongst the UN systems and the major international organizations in Geneva, Switzerland. (near Haute-Savoie, France)

[Search by keywords]
through WHO Web Information

- WHO Headquarter's Major Programmes
- WHO's Regional and other offices
- World Health Report
- WHO Weekly Epidemiological Record (WER)
- WHO Statistical Information System (WHOSIS)
- World Health Day
- Public-Information-Publique and Newsletters
- Outbreaks and World No-Tobacco Day
- International Travel and Health - Vaccination Requirements and Health Advice
- Publications, Language, Terminology and Library Services
- Directory of NGOs in Official Relations with WHO
- Vacancies and E-mail Address Directories
- WHO Gopher
- World Wide Web index, search engines, and other servers

図2　WHOのホームページ

Outbreaks

- News reported to WHO on Disease Outbreaks
- Disease Fact Sheets from EMC
- Influenza Surveillance Activities
- Outbreak in Zaire - *WHO Press Release and Travel Advice*

- **Pointers to other resources** ***(not officially endorsed by WHO)***
  - 'The Ebola Page' by Ornstein
  - ProMED

Go to WHO Home Page

図3　WHOのOutbreaksのページ

World Health Organization

Emerging and Other Communicable Diseases (EMC)

Disease outbreaks reported

(page updated when new information becomes available)

14 June (ii):

DENGUE/DENGUE HAEMORRHAGIC FEVER:

Malaysia: The dengue season has started in Malaysia with 2450 cases reported throughout the country by 1 June 1996 according to information from the WHO Collaborating Centre for Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever in Kuala Lumpur. The States most affected are the Federal Territory, Selangor, Perak, Johor and Pahang. The present season is expected to continue for the next few months reaching a peak in July/August. Active vector control measures are in place in all states.

Indonesia: Over the last five months there have been over 5000 cases of dengue/dengue haemorrhagic fever and 117 deaths in 11 of the 27 provinces of Indonesia.

The highest number of cases occurred in East Java. Dengue usually occurs in densely populated areas and a campaign to educate the public on keeping the environment clean and free of stagnant water, the breeding place for mosquitoes, has been stepped up.

Background information on Dengue Haemorrhagic Fever can be found in WHO Fact Sheet No. 117

14 June:

LASSA FEVER IN SIERRA LEONE - UPDATE:

In collaboration with the Ministry of Health and Sanitation and the Lassa Fever Research project, the WHO support team with a specialist from CDC has assessed the

図4　WHOの感染症関係のニュース

The Program for Monitoring Emerging Diseases

"Thank you for sending out our report on trypanosomiasis on ProMED. We have been getting replies from various sources with much helpful information. Here is an update on our situation..." --Paul Fountain, Vanga Hospital (Zaire)

Introduction
Subscribe to ProMED-mail
ProMED-mail Hypermail Archives
Contact Information

Introduction

The Program for Monitoring Emerging Diseases (ProMED) was proposed by the Federation of American Scientists specifically to create a global system of early detection and timely response to disease outbreaks.

Many experts, both within and outside government, have warned of the need to improve capabilities for dealing with emerging infectious diseases such as the hemorrhagic fevers, and the resurgence of old scourges like tuberculosis and cholera.

ProMED was inaugurated in September 1993 at a Geneva conference co-sponsored by sixty prominent experts in human, animal and plant health. Members of the ProMED Steering Committee come from all over the world, and include representatives of:

- World Health Organization
- Centers for Disease Control and Prevention (USA)
- National Institutes of Health (USA)
- International Epizootic Organization

The ProMED-mail electronic mail conference debuted in 1994. Through *SatelLife* and HealthNet, this low cost system reaches participants in developing countries and remote areas. Subscription to the ProMED-mail conference is free of charge.

図5　proMEDのホームページ

CDC MMWR Weekly
MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT

How to download .pdf documents from Mosaic and Netscape.

Searchable Index now available.

Current Issue

June 28, 1996 / Vol. 45 / No. 25

(725,444 bytes) --- Preview

- CDC's 50th Anniversary --- July 1, 1996
- History of CDC
- Notifiable Disease Surveillance and Notifiable Disease Statistics --- United States, June 1946 and June 1996
- Addition of Prevalence of Cigarette Smoking as a Nationally Notifiable Condition --- June 1996
- Smallpox --- Stockholm, Sweden, 1963
- Pentachlorophenol Poisoning in Newborn Infants --- St. Louis, Missouri, 1967
- Outbreaks of Cyclospora cayetanensis Infection --- United States, 1996 Resources About CDC

June 21, 1996 / Vol. 45 / No. 24

(274,383 bytes) --- Preview

- Heat-Wave--Related Mortality --- Milwaukee, Wisconsin, July 1995
- National, State, and Urban Area Vaccination Coverage Levels Among Children Aged 19--35 Months --- United States, July 1994--June 1995
- Epidemic Malaria --- Tadjikistan, 1995

図6　MMWRのWeeklyのページ

ば，各種の感染症情報を入手することができる．

4　その他

感染症関係で有名なアドレスとしては，

http：//www. objarts. com/cgi-outbreak-reg/dynaserve. exe/index. html

がある．なお，この情報を得るためにはユーザ登録が必要である．

また，アメリカのピッツバーグ大学では，「グローバル・リソース情報」を下記のアドレスで提供している．

http：//www. pitt. edu/HOME/GHNet/GHKR-j. html

インターネット上で発行されている雑誌

1　Acrobat Reader

インターネットを介してMMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) をはじめとする感染症関係の定期刊行物を入手することができる．定期刊行物は，pdf (portable documentation format) と呼ばれる形式のファイルとして提供されることが多い．pdf形式で提供されるファイルをAdobe社のAcrobat Readerで読み込むことにより，印刷物として刊行されているものと全く同一の形式で，感染症関係の定期刊行物を読みかつ印刷することができる．

Adobe社が提供しているAcrobat Readerは，

http：//www. adobe. com/

から自由に入手することができる．このソフトは無料である．

2　MMWRとEID

CDCで毎週アメリカ時間の金曜日に発行されているMMWRを日本時間の土曜日の朝，読むことができる(図6)．

アドレスは，

http：//www. cdc. gov/epo/mmwr/mmwr_wk. html

である．さらに，必要ならば既刊のMMWRもインターネットを介して入手可能である．また，季刊誌EDI (Emerging Infectious Diseases) も，

http：//cdc. gov/ncidod/EID/eid. htm

から入手できる．

3　WER

WHOもWER (Weekly Epidemiological Record) を毎週金曜日に発行している(図7)．アドレスは，

http：//www. who. ch/wer/issues. htm

である．

4　CDR/weekly, CDR/review

イギリスのCDSC (Communicable Disease Surveillance Centre，ホームページのアドレスは，http：//www.

World Health Organization

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD
RELEVE EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE

Some of the graphic images (figures) included in the printed version may not be displayed in the .pdf file.

28 June 1996, Vol. 71, No. 26

Index to Nos. 1 to 26 Subject index/Index of countries and territories
Notifications of diseases subject to the Regulations
Expanded Programme on Immunization (EPI) - Measles control in the WHO African Region
Influenza
Dengue and dengue haemorrhagic fever, Malaysia
Yellow-fever vaccinating centres for international travel - Amendments to 1991 publication
Diseases subject to the Regulations

Index des N os 1 à 26 Index des sujets/Index des pays et territoires
Notifications de maladies soumises au Règlement
Programme élargi de vaccination (PEV) - Lutte contre la rougeole dans la Région africaine de l'OMS
Grippe
Dengue et dengue hémorragique, Malaisie
Centres de vaccination contre la fièvre jaune pour les voyages internationaux - Amendements à la publication de 1991
Maladies soumises au Règlement

21 June 1996, Vol. 71, No. 25

Expanded Programme on Immunization - Progress towards the global eradication of poliomyelitis, 1995

図7 WERのページ

open. gov. uk/cdsc/cdsc. htm) も週報CDR/weeklyと隔月刊のCDR/reviewをインターネット上で提供している(図8).

CDR/weekly及びCDR/reviewのアドレスは,

ftp：//ftp. open. gov. uk/pub/docs/cdsc/

である.

Current directory is /pub/docs/cdsc

```
                *** CCTA's anonymous ftp server ***

Hello and welcome to CCTA's anonymous ftp server. You should be aware
that all access to this server is logged. If you do not like this
policy, then please log off now.

For a complete listing of the files held on this server, please retrieve
a copy of the ls-lR file. This list is recreated nightly. The list is
held in three compressed formats as well as plain text.

ls-lR          -       plain text listing
ls-lR.Z        -       compressed with unix compress
ls-lR.gz       -       compressed with GNUzip
ls-lR.zip      -       compressed in a form compatible with DOS PKZip

Any problems with this server should be addressed to:

                        ftp-admin@ccta.gov.uk

CCTA


Please read the file README.FTP.EMAIL
  it was last modified on Fri Sep  8 15:03:08 1995 - 299 days ago
```

```
Please read the file README
  it was last modified on Fri Dec 22 14:26:58 1995 - 194 days ago
```

```
Up to higher level directory
  1995/                                  Mon Jan 22 09:57:00
  1996/                                  Tue Apr 30 16:57:00
  README                    267 bytes Fri Dec 22 00:00:00
```

図8 CDR/weekly及びCDR/reviewのページ

5 CCDR

カナダのCCDR(Canada Communicable Disease Report)も毎月1日と15日に発行されている. アドレスは, 次のとおりである.

http：//www. hwc. ca：8300/T632

インターネット上で入手できる一般雑誌

1 Nature

NatureもWWWサーバで雑誌の抄録情報を提供している(図9).

日本語版のネーチャーのアドレスは,

http：//www. naturejpn. com/

英語版のそれは,

http：//www. nature. com/

である. 両方とも簡単なユーザ登録が必要である.

2 Science

Scienceも抄録情報などを提供している(図10). アドレスは,

http：//science-mag. aaas. org/science/

である.

3 Elsevia

Elsevia社も自社で発行している雑誌等の情報を提供している. アドレスは,

http：//www. elsevia. nl/

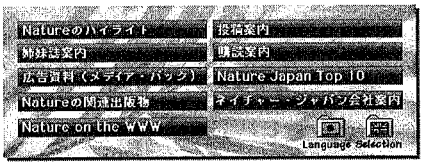
である.

nature JAPAN

Welcome to Nature Japan, your local gateway to Nature's Global Science Service

(クリックで続ける)

Note: This website is intended primarily for Japanese viewers and therefore most of the information contained herein is in the Japanese language. For more information in English, please login from here to go to Nature on the WWW.



お願い

ネイチャー・ジャパンの HOME PAGE には、どなたでもアクセスでき、自由に使うことができますが、事前登録が必要となります。 下記の簡単な質問にお答えいただくことで、自動的に登録されます。またこれらの情報は、今後のサービスの 向上につながります。どうぞご協力ください。 登録メンバーとして、過去6週間に出版された日本語版ネイチャーマガジンの記事の概要を次の画面で見ることができます。 次回ネイチャーのWWWページにアクセスする時にご使用になられるユーザー名とパスワードをつけて下さい。

このサイトに関する質問やコメントは下記まで：

Web Editor
Nature Japan K.K.
Shin Mitsuke Building 3F
3-6 Ichigaya Tamachi
Shinjuku-ku
Tokyo 162, Japan

(クリックで続ける)

Copyright 1995, Nature Japan. All Rights Reserved.

図9 ネイチャー・ジャパンのホームページ

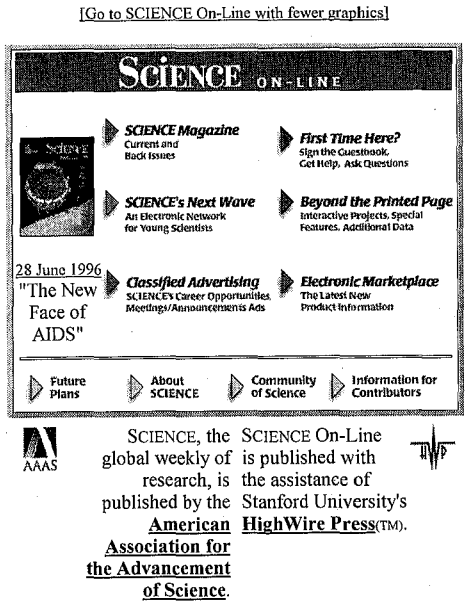


図10　サイエンスのホームページ

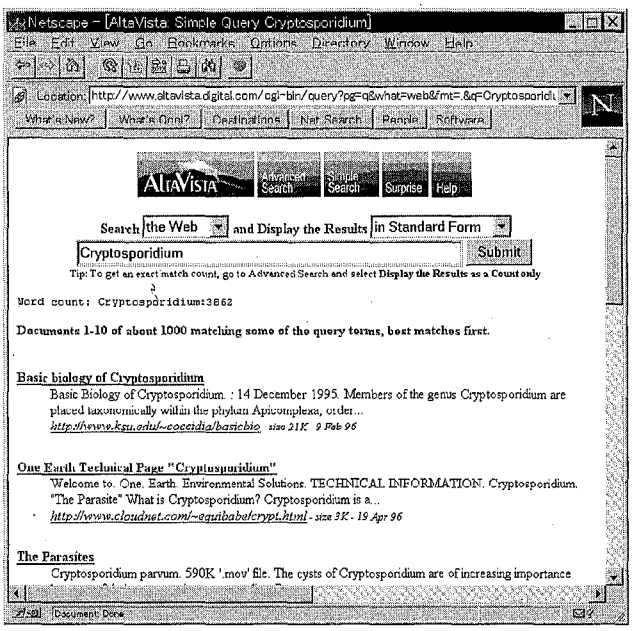


図11　AltaVistaでの検索

インターネット上での情報検索

日本国内のみならず諸外国で日々感染症が発生する．発生した感染症に関する情報をインターネットで収集することもできる．インターネットには，情報の所在を案内するWWWサーバがある．その代表的なものが，(1) AltaVista，(2) Yahooなどである．

1　AltaVista

Digital Equipment Co. が運営しているサーバである．アドレスは，

http：//www. altavista. digital. com/

である．このアドレスにアクセスすると，図11の画面が表示される．ここで，キーワードを適切に入力すれば，必要な情報を提供するサーバのアドレスが表示されるので(図11：Cryptosporidiumの情報を検索している例)，その情報を用いて必要とする情報を入手する．

2　Yahoo

YahooもAltaVistaと同様の情報検索サーバである(図12)．しかし，Yahooは，情報がカテゴリ別に分類されているという点で，AltaVistaとは異なる．Yahooのアドレスは，

http：//www. yahoo. com/

である．

3　その他

ブラウザとしてNetscapeを用いているならば，画面上中央部分に「Net Search」というバーが表示される．このバーをクリックすることによりいろいろな情報検索サーバで情報の所在を検索することができる．

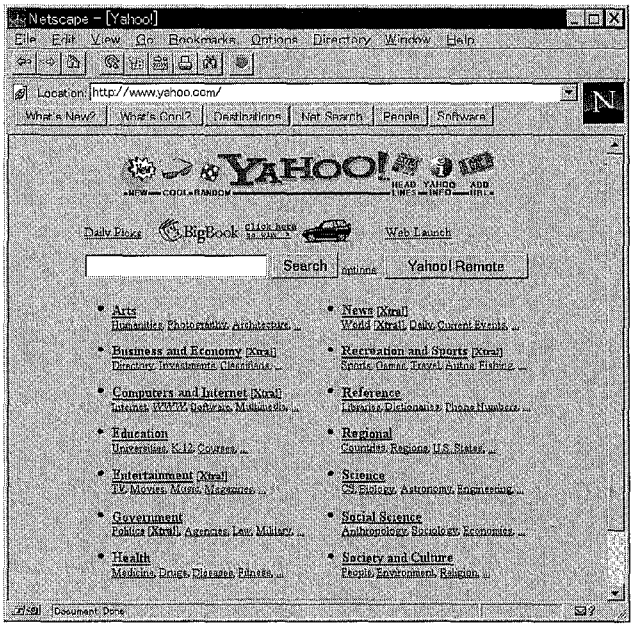


図12　YAHOOのホームページ

日本にも情報検索サーバはあるが，現時点では感染症情報を提供している日本のサーバは少ない．英語で検索をしたほうが効率よく情報検索することができる．

おわりに

インターネットで得られる感染症情報についての概略を示した．インターネット上の情報は，日進月歩というよりも秒進分歩している．日々新しい情報が提供されている．今後，インターネットを介しての情報収集も盛んになるものと思われる．公衆衛生に従事する者としてインターネットを通じた情報収集能力は不可欠のものとなろう．

著書及び他誌発表

PAPERS ON OTHER PUBLICATIONS

(1995.4—1996.3)

著書

伊藤　武：***Helicobacter pylori* と胃粘膜病変**，浅香正博編，*Helicobacter pylori* ワクチン開発の現状，238-247，1995，先端医学社，東京.

渡辺四男也：**化粧品原料基準，種別許可基準および医薬部外品原料規格に関する試験法**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，7-13，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

伊藤　弘一：**高速液体クロマトグラフィー（HPLC）**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，96-110，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

鈴木　助治：**ホルモンの分析**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，487-496，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

伊藤　弘一：**収れん剤の分析**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，581-587，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

鈴木　助治：**天然ワックスの分析**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，676-685，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

鈴木　助治：**水銀などの有害物質の分析**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，840-849，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

鈴木　助治：**ニトロソアミンの分析**，木嶋敬二編，最新香粧品分析法，850-861，1995，フレグランスジャーナル社，東京.

矢野　一好：**水道用語辞典**，1995，日本水道協会，東京.

Watanabe, M.F.：**Production of Microcystins**, Watanabe, M F., et al, edis., *Toxic Microcystis*, 35-56, 1996, CRC Press, Boca Raton.

Ho-Dog Park. and Watanabe, M.F.：**Toxic Microcystis in Eutrophic Lakes**, Watanabe, M F., et al, edis., *Toxic Microcystis*, 57-77, 1996, CRC Press, Boca Raton.

他誌発表論文

松下　秀，山田　澄夫，関口　恭子，太田　建爾，工藤　泰雄：**東京において最近5年間（1990-1994年）に分離された輸入及び国内事例由来赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性**，感染症誌，**69(12)**，1336-1341，1995.

諸岡　達也，甲斐　明美，伊藤　武，工藤　泰雄：**1994年に福岡市および近郊で分離されたVero毒素産生性大腸菌O157：H7のpulsed-field gel electrophresisによる解析**，感染症誌，**70(1)**，42-50，1996.

松下　秀，山田　澄夫，関口　恭子，太田　建爾，工藤　泰雄：**東京において最近5年間（1990-1994年）に分離された国内及び輸入事例由来サルモネラの血清型と薬剤耐性**，感染症誌，**70(1)**，42-50，1996.

山田　澄夫，松下　秀，関口　恭子，工藤　泰雄：**バリ島旅行者からの腸管系病原菌検出状況—東京都—**，病原微生物検出情報，**16(4)**，73，1995.

工藤　泰雄，伊藤　武，斎藤　香彦：**わが国における腸炎由来カンピロバクター血清型の検出動向—全国カンピロバクター・レファレンスセンターの集計結果から—**，病原微生物検出情報，**16(4)**，73，1995.

工藤　泰雄，甲斐　明美：**VTEC infections in Japan**, *Notizario*, **Vol.8**, N.10 (Suppl.2), EVC news 2, 2-3, 1995.

Fukuyama, M. and Itoh, T.：**Phenotypic characteristics of motile *Aeromonas* isolated from natural environments**, 麻布大学獣医学部研究報告, **14**, 1-8, 1995.

福山 正文, 大仲 賢二, 伊藤 武：***Bacillus thuringiensis* serovar 7(aizawai)の家兎腸管結紮試験, サルおよびイヌに対する経口感染試験**, 基礎と臨床, **29**, 2321-2335, 1995.

伊藤 武, 新垣 正夫, 平田 一郎, 増淵 尚子, 高橋 信一：***Helicobacter pylori* 感染の病態生理**, 臨床成人病, **25**, 843-848, 1995.

新垣 正夫, 只野 敬子, 伊藤 武：**高速液体クロマトグラフィーを用いた *Campylobacter jejuni* の迅速馬尿酸加水分解試験の検討**, 日本臨床微生物学雑誌, **5(4)**, 12-16, 1995.

新垣 正夫, 伊藤 武：**Fumarate hydration test for differentiation of *Campylobacter* and *Helicobacter* speces**, 感染症誌, **69**, 666-672, 1995.

伊藤 武：**食品の微生物汚染とその対策**, 月刊フードケミカル, **11(5)**, 19-21, 1995.

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**, 臨床と微生物, **22**, 219-219, 1995.

宮尾 陽子, 宗村 佳子, 鈴木 輝康, 甲斐 明美, 伊藤 武：**牛の直腸および盲腸内容物からのベロ毒素産生性大腸菌分離**, 日本獣医師会雑誌, **49**, 46-51, 1996.

海老沢 尚, 佐々木由紀子, 出口 武夫：**Complementary DNAs for two Arylamine N-acetyltransferases with identical 5'non-coding regions from rat pineal gland**, *Eur. J. Biochem.* **228**, 129-137, 1995.

佐々木由紀子：**おう吐を主訴とした今季のウイルス性胃腸炎—東京都—**, 病原微生物検出情報, **17(2)**, 3-4, 1996.

林 志直, 佐々木由紀子, 関根 整治：**都内における非細菌性胃腸炎集団発生からの小型球形ウイルスの検出（1995年9月～11月）**, 病原微生物検出情報, **16(1)**, 7, 1996.

田部井由紀子, 貞升 健志, 森 功次, 門間 公夫, 関根 大正, 工藤 泰雄, 宮沢 豊：**HIV－1母児感染についての調査成績**, 感染症学雑誌, **69(8)**, 858-863, 1995.

守安 貴子, 斉籐 和夫, 中里 光男, 石川ふさ子, 藤沼 賢司, 二島太一郎, 田村 行弘：**HPLCによる食品中のカフェイン、テオブロミン及びテオフィリンの同時分析法**, 食品衛生学雑誌, **37(1)**, 14-19, 1996.

守安 貴子, 斉籐 和夫, 中里 光男, 石川ふさ子, 藤沼 賢司, 二島太一郎, 田村 行弘：**食品中のカフェイン、テオブロミン及びテオフィリンの含有量**, 食品衛生学雑誌, **37(1)**, 59-63, 1996.

守安 貴子, 中里 光男, 小林 千種, 菊地 洋子, 早野 公美, 田村 行弘：**HPLCによる食品中のアセスルファムK, サッカリン及びアスパルテームの分析法**, 食品衛生学雑誌, **37(2)**, 91-96, 1996.

Kamata, K., Takahashi, M., Terajima, K. and Nishijima, M.：**Spectrophotometric Determination of**

Sodium Chondroitin Sulfate in Eye Drops After Derivatization with 4 -Amino -3 -hydrazino -5 -merucaputo -1, 2, 4 -triazole, *Analyst*, **120**, 2755-2758, 1995.

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性水溶液中での安定性**, 薬学雑誌, **116**, 65-70, 1996.

奥本千代美, 西島 基弘：**簡易テスト機材によるめっき廃水中のシアンの測定**, 工業用水, **445(10)**, 15-19, 1995.

奥本千代美, 徳田 俊夫, 望月富士子：**電気化学検出イオンクロマトグラフィーによる遊離シアンの分析**, 工業用水, **445(10)**, 24-27, 1995.

羽石奈穂子, 安田 一郎, 浜野 朋子, 西島 基弘, 秋山 和幸：**漢方製剤の薬剤学的研究（第3報）十全大補湯エキス顆粒剤の医薬品安定性試験**, 医薬品研究, **26(6)**, 379-385, 1995.

Konoshima, T., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Cosentino, L.M. and Lee, K.H.：**Triterpenoid saponins as anti -HIV principles from fruits of *Gledistia japonica* and *Gymnocladys chinensis*, and a structure -activity correlation**, *J.Natural Products*, **58 (9)**, 1372-1377, 1995.

Kitanaka, S., Yasuda, I., Kashiwada, Y., Hu, C.Q., Bastow, K.F., Bori, I.D. and Lee, K.H.：**Cell-based assays for idetifying novel DNA topoisomerase inhibitors Studies on the constituents of *Fatsia japonica***, *J.Natural Products*, **58(11)**, 1647-1654, 1995.

佐藤かな子, 長井二三子, 牛山 慶子, 加納 いつ：**十全大補湯、構成生薬水抽出エキスのNa, K-ATPase及びH, K-ATPase活性におよぼす影響**, 和漢医薬学雑誌, **12**, 358-359, 1995.

Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K. and Kano, I.：**Specific Inhibition of Na^+, K^+-ATPase Activity by Atractylon a Major Component of Byaku-jutsu, by Interaction with Enzyme in the E_2 State**, *Biochemical Pharmacology*, **51**, 339-343, 1996.

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**, 衛生化学, **42**, 60-66, 1996.

岩崎由美子, 奥本千代美, 中村 弘, 西島 基弘：**めっき廃水中のシアンの試験法：市販シアン簡易テスト用機材の評価**, 工業用水, **442**, 21-28, 1995.

鮫島 隆, 山中 洋之, 茶薗 明, 小久保彌太郎：**惣菜工場におけるHEPAフィルターを使用した送風機内蔵型空気清浄装置による空中浮遊微生物の除去効果**, 日本食品微生物学雑誌, **12(3)**, 165-171, 1995.

宮川 弘之, 堀井 昭三, 小久保彌太郎：**HPLCによる鶏肉中のサリノマイシン, モネンシンの同時分析法**, 食品衛生学雑誌, **36**, 725-730, 1995.

笹本 剛生, 宮崎 奉之, 橋本 常生, 小久保彌太郎：**フォトダイオードアレイ検出器付HPLCによる牛肉中の残留キチン合成阻害剤及びリニュロンの一斉分析法**, 食品衛生学雑誌, **36**, 622-626, 1995.

Oka, H., Ikai, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M., Shimizu, A., Hayasi, T., Takeba, K., Nakagawa, H. and Ito, Y.：**Separation of ivermectin components by high-speed counter -current chromatography**, *Journal of chromatography A*, **723**, 61-68, 1996.

仲真 晶子, 金子 誠二, 梅木富士郎, 伊藤 武, 小久保彌太郎, 丸山 務：**Polymerase chain reaction 法によるチーズからの *Listeria monocytogenes* の検出**, 日本食品微生物学会雑誌, **12(2)**, 135-140, 1995.

Yoshino, K., Thandavaran Ramamurthy, G.Balakrish Nair, Fukusima, H., Ohtomo, Y., Takeda, N., Kaneko, S. and Takeda, T.：**Gepgraphical Heterogeneity between Far East and Europe in Prevalance of *ypm* Gene Encoding the Novel Superantigen among *Yersinia pseudotuberculosis* Strains**, *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 3356-3358, 1995.

Kaneko, S., Ishizaki, N. and Kokubo, Y.：**Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from Pork Using the Polymerase Chain Reaction**, *Contribution to Microbiology and Immunology*, **13**, 153-155, 1995.

Ohtomo, Y., Toyokawa, Y., Saito, M., Yamaguchi, M.Kaneko, S. and Maruyama, T.：**Epidemiology of *Yersinia enterocolitica* Serover O：8 Infection in the Tsugaru Area Japan**, *Contribution to Microbiology and Immunology*, **13**, 48-50, 1995.

Shiozawa, K., Kubota, T., Akahane, S., Hattori, H., Yagi, T., Miyake, T., Takami, K. and Kaneko, S.：**Detection of *Yersinia pseudotuberculosis* DNAs in Paraffin-Embeded Tissues from Dead Chimpanzees by Using PCR**, *Contribution to Microbiology and Immunology*, **13**, 156-157, 1995.

Ueno, H., Yokota, K., Arai, T.and Muramatsu, Y., Taniyama, H., Iida, T. and Morita, C.：**The Prevalence of *Listeria monocytogenes* in the Environment of dairy farms**, *Microbiology and Immunology*, **40**, 121-124, 1996.

宮崎 奉之, 中島 勉, 橋本 常生, 小久保彌太郎：**高速液体クロマトグラフィーによる動物組織中のクレンブテロールの定量**, 食品衛生学雑誌, **36**, 269-273, 1995.

宮崎 奉之, 笹本 剛生, 橋本 常生, 小久保 彌太郎：**フォトダイオードアレイ検出HPLCによる牛肉及び牛乳中のタンパク同化ホルモンの定量**, 食品衛生学雑誌, **36**, 748-753, 1995.

宮崎 奉之, 橋本 常生, 笹本 剛生, 小久保 彌太郎：**東京湾アサリ中の残留クロルデンの年次推移**, 食品衛生学会雑誌, **36**, 738-742, 1995.

中里 光男, 斉藤 和夫, 守安 貴子, 石川ふさ子, 藤沼 賢司, 二島太一郎, 田村 行弘, 佐藤 穂積, 小川 俊雄：**くさやの加工品から検出された不揮発性アミン及び揮発性塩基窒素の由来について**, 食品衛生学雑誌, **36, 3**, 393-399, 1995.

中里 光男, 只野 敬子, 小川 仁志, 牛山 博文, 川合 由華, 小林 千種, 立石 恭也, 田村 行弘：**高速液体クロマトグラフィーによる柑橘類中のイマザリル, ジフェニル, チアベンダゾール, オルトフェニルフェノール及びバナナ中のイマザリル, チアベンダゾールの分析**, 衛生化学, **41, 5**, 392-397, 1995.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 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のビテルタノール分析法**, 食品衛生学雑誌, **36, 2**, 298-302, 1995.

安田 和男, 只野 敬子, 牛山 博文, 小川 仁志, 川合 由華, 二島太一郎：**食品中の銅クロロフィリンナトリウム分析における指標成分**, 食品衛生学雑誌, **36**, 710-716, 1995.

橋本 常生, 宮崎 奉之, 笹本 剛生, 小久保 彌太郎, 中澤 裕之：**固相抽出法を用いた蛍光検出ＨＰＬＣによる食肉中のサルブタモールの定量**, 食品衛生学雑誌, **36, 6**, 754-758, 1995.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 伊藤 正子, 田村 行弘：**果実類に使用された農薬の果皮及び果肉中の濃度**, 食品衛生学雑誌, **36, 3**, 383-392, 1995.

新藤 哲也, 廣瀬理恵子, 宮村 茜, 沼田 邦雄：**短時間真空冷却処理法による佃煮の保存性向上**, 調理食品と技術, **1(2)**, 55-59, 1995.

新藤 哲也, 廣瀬理恵子, 宮尾 茂雄, 宮村 茜：**佃煮の水分, 塩分及び可溶性全糖による水分活性の予測**, 日本食品科学工学会誌, **43**, 49-55, 1996.

橋本 常生, 宮崎 奉之, 小久保 彌太郎, 鈴木 澄子, 中澤 裕之：**蛍光検出ＨＰＬＣによる牛肉中のプロゲステロンの定量**, 食品衛生学雑誌, **36, 5**, 595-600, 1995.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 田村 行弘：**輸入農作物中の農薬残留実態**, 食品衛生学雑誌, **36, 5**, 643-655, 1995.

永山 敏廣：**農作物中の農薬残留実態**, 食品工業, **38, 22**, 53-62, 1995.

Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Aoyama, T. and Tamura, Y.：**Conversion of Aflatoxin B_1 by *Humicola fuscoatra***, *Jpn.J.Food Microbiol*, **12(4)**, 243-248, 1996.

永山 敏廣, 小林 麻紀, 塩田 寛子, 伊藤 正子, 田村 康宏, 田村 行弘：**バナナ中ビテルタノールの残留及び熟成中の変化**, 食品衛生学雑誌, **36, 3**, 400-403, 1995.

Hagiwara, T., Nishijima, M. and Suzuki, S.：**Improvement of measurement repeatability for high performance liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry by sample introducing method using auto switching valve**, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **44**, 249-259, 1996.

Hagiwara, T. and Nishijima, M.：**Optium needle materials of the corona discharge electrode for quantitative analysis by liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry**, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **43**, 365-371, 1995.

植松 洋子, 貞升 友紀：**ペパーミント等の天然香料の品質規格試験**, アロマトピア, **13**, 68-71, 1995.

Kikutani, N., Ichikawa, H. Tomomatsu, T. and Nakamura, H.：**Unique Enhanced Fluorescence of Some Lanthanides Induced by Heating with Reducing Sugars**, *Analytical Sciences*, **11**, 843-844, 1995.

Ushio, F., Eric.Antignac, Fukuhara, M. and Kimura, M.：**Differential induction of cytochrome P-450 isozymes by rifampicin in the Chinese hamster, Cricetus**, *Comp. BIochem. Physiol.*, **112C (2)**, 163-168, 1995.

Makino, K.：**Mortality from Lung Cancer and Air Pollution in Tokyo**, *Environmental Sciences*, **4**, 25-35, 1996.

Watanabe N. and Nakamura T.：**Inhalation of Diesel Engine Exhaust Increases Bone Mineral Concentra-**

tions in Growing Rats, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 407-411, 1996.

氏家　昌行，鈴木　武雄，吉川　　翠：**低真空走査型電子顕微鏡による室内塵性ダニ類観察のための簡易凍結乾燥手法**，家屋害虫，**17**，106-110，1995.

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(8)**，家屋害虫，**17**，24-36，1995.

吉川　　翠：**超音波ノミ・ダニ撃退器に対するダニの忌避効果評価**，家屋害虫，**17**，111-118，1995.

清水　　勲，平口　哲夫，吉川　　翠，入江　建久：**アレルゲンとしての家ダニの自動計測法**，空気清浄，**33**，1-6，1995.

Kano, F.：**Active Oxygen Generating from Ceramic Powders which Posses Growth Inhibitory Effects on Bacteria**, *Proceedings of the 7th congress of the Asian Pacific Confederation of Chemical Engineers*, **2**, 598-601, 1996.

古畑　勝則：**給湯水の衛生**，都薬雑誌，**17(6)**，52-58，1995.

森　正道，星野　啓一，園田　久子，吉田　広海，藪内　英子，山城　祐子，小出　道夫，斎藤　　厚，岸本　寿男，古畑　勝則，相原　雅典，嶋田　昌司：***Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例 I 臨床所見**，感染症誌，**69(6)**，646-653，1995.

藪内　英子，森　　正道，斎藤　　厚，岸本　寿男，吉澤　　晋，荒川　迪生，木ノ内良治，王　　笠，古畑　勝則，小出　道夫，山城　祐子，相原　雅典，嶋田　昌司，権平　文夫，杉山　純一，縣　　邦雄，矢野　郁也：***Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生例 II 疫学調査結果**，感染症誌，**69(6)**，654-665，1995.

古畑　勝則：**酵素基質を用いた大腸菌群および大腸菌の検出法**，環境管理技術，**13(4)**，171-178，1995.

古畑　勝則：**レジオネラという細菌**，水，**37(13)**，29-37，1995.

古畑　勝則：**酵素基質による大腸菌群及び大腸菌の迅速試験法**，食品工業，**38(24)**，45-49，1995.

古畑　勝則：**修景用水におけるレジオネラ属菌の生息状況**，環境管理技術，**13(6)**，296-300，1995.

古畑　勝則：**浴室，トイレ，洗面台などに発生するピンク色付着物**，空気調和・衛生工学，**70(1)**，53-57，1996.

Hiraishi, A., Furuhata, K., Matsumoto, A., Koike, K.A., Fukuyama, M. and Tabuchi, K.：**Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments**, *Applied and Environmental Microbiology*, **61(6)**, 2099-2107, 1995.

矢野　一好：**環境水のウイルス汚染とその制御**，水，**37(10)**，25-31，1995.

矢野　一好：**浄水処理の前処理としての付着微生物によるウイルスの除去**，日本水処理生物学会誌，**31(3)**，169-174，1995.

Ueno, Y., Nagata, S., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Watanabe, M, F., Ho-Dong Park., Gong-Chao Chen., Gang Chen. and Shun-Zhang Yu : **Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary livercancer in China, by highly sensitive immunoassay**, *Carcinogenesis*, **17(6)**, 1317-1321, 1996.

高橋 保雄, 中川 順一, 細川奈津子, 浅野 正博, 森田 昌敏：**ある河川水におけるモニタリング物質の検索及び濃度レベル**, 環境化学, **5(2)**, 207-214, 1995.

中川 順一, 土屋 悦輝：**ＩＣＰ発光分光分析及びＩＣＰ質量分析法**, 衛生化学, **41**, 116-126, 1995.

Nakagawa,Y., Nakajima, K., Tayama, S. and Moldeus, P. : **Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes : Effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor**, *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1021-1027, 1995.

Nakagawa, Y. and Moore, G. : **Cytotoxic effects of postharvest fungicides, *ortho*-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes**, *Life Sciences*, **57**, 1433-1440, 1995.

Nakagawa, Y. and Tayama, S. : **Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in CHO-K1 cells exposed to phenyl-hydroquinone, a metabolite of *ortho*-phenylphenol**, *Cancer Lett.*, **101**, 227-232, 1996.

Nakagawa, Y. : **Effects of dicoumarol on cytoxicity caused by *tert*-butylhydroquinone in isolated rat hepatocytes**, *Toxicol. Lett.*, **84**, 63-68, 1996.

Suzuki, H. and Suzuki, N. : **Piperonyl butoxide mutagenicity in human RSa cells**, *Mutation Research*, **344**, 27-30, 1995.

Takano, I., Yasuda, I., Takeya, K. and Itokawa, H. : **Guaiane Sesquiterpene Lactones from *Curcuma aeruginosa***, *Phytochemistry*, **40**, 1197-1200, 1995.

Tanaka, T. : **Reproductive and neurobehavioral effects of sunset yellow FCF administered to mice in the diet**, *Toxicology and Industrial Health*, **12**, 69-79, 1996.

Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O., Oishi, S. and Yoneyama, M. : **Developmental toxicity study of piperonyl butoxide in CD rats**, *Toxicology and Industrial Health*, **11**, 175-184, 1995.

Tanaka, T. : **Reproductive and neurobehavioral effects of imazalil administered to mice**, *Reproductive Toxicology*, **9**, 281-288, 1995.

Suzuki, N. and Suzuki, H. : **Suppression of saccharin-induced mutagenicity by interferon-α in human RSa cells**, *Cancer Research*, **55**, 4253-4256, 1995.

辻内 陽子, 東丸 貴信, 河野 浩章, 小俣 政男, 坂本 義光, 青木 直人, 内田 康美：**ヘパリンの抗血栓作用機序に関する研究**, 脈管学, **36**, 111-116, 1996.

Aoki, N., Mori, M., Kato, K., Sakamoto, Y. and Noda, K. : **Antibody against synthetic multiple anigen peptides (MAP) of JC virus capsid protein (VP1) without cross reaction to BK virus : a diagnostic tool for progressive multifocal leukoencephalopathy**, *Neuroscience Letters*, **205**, 111-114, 1996.

Kikukawa, M., Aoki, N. and Mori, M.：**A case of refractory anaemia with p53 point mutation at codon 249 (AGG toATG)**, *British Journal of Haematology*, **92**, 831-833, 1996.

Oishi, M., Irikura, Y., Nakagomi, K., Nakazawa, H. and Tanabe, S.：**Conversion of Nicotinamide to Nicotinic Acid by Bacteria Isolated from Meat**, 衛生化学, **41**, 334-341, 1995.

Suzuki, T., Yaguchi, K., Ohnishi, K. and Suga, T.：**Identification of Degradation Products of Terbutol in Environmental Water from Golf Courses**, *J. Agric. Food Chem*, **43**, **6**, 1712-1717, 1995.

栃本　博, 二島太一郎：**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ー実験室における水からの微量元素の蓄積ー**, 日本水環境学会誌, **18**, **11**, 917-923, 1995.

神保　勝彦：**畜水産食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法**, 月刊ＨＡＣＣＰ, **1(1)**, 100-106, 1995.

神保　勝彦：**畜水産食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法（その２）**, 月刊ＨＡＣＣＰ, **1(2)**, 82-86, 1995.

神保　勝彦：**畜水産食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法（その３）**, 月刊ＨＡＣＣＰ, **1(3)**, 75-80, 1995.

神保　勝彦, 片岡　潤, 小久保弥太郎, 小沼　博隆, 近藤　房雄：**畜水産食品中の残留抗菌性物質検査における微生物学的簡易検査法の検出感度**, 食品衛生学雑誌, **36(4)**, 525-531, 1995.

総　説・解　説

伊藤　武, 楠　淳：**サルモネラによる食品汚染とその対策**, 月刊フードケミカル, **11(5)**, 22-28, 1995.

楠　淳：**鶏卵とサルモネラ食中毒**, 月刊HACCP, **1(2)**, 22-26, 1995.

工藤　泰雄：**昨今のコレラ事情**, 新医協, **第1376号**, 1995.

工藤　泰雄：***Salmonella* Enteritidisによる腸炎**, 臨床検査, **39(9)**, 1050-1052, 1995.

工藤　泰雄：**コレラ菌O-139感染症**, *Medical Corner*, **97(3)**, 19-22, 1995.

工藤　泰雄：**特集「消化器疾患のすべて」ー輸入感染性腸炎，海外旅行者が注意すべき事**, 毎日ライフ, **1996年２月号**, 57-59, 1996.

工藤　泰雄：**目でみる「食中毒」**, 治療, 1996.

伊藤　武：**食中毒事故の実際とPL法対応上の諸問題，食品の腐敗変敗防止ハンドブック，サイエンスフォーラム**, 19-31, 1996, 東京

伊藤　武, 新垣　正夫, 柳川　義勢, 甲斐　明美：***Helicobacter pylori*の細菌学とその検査法**, メディアサークル, **40**, 161-172, 1995.

伊藤　武：**ヘリコバクター・ピロリと病原性**, 微研, **18(2)**, 3-11, 1995.

伊藤　武：**学校給食における食中毒予防の在り方**，スポーツと健康，**27(5)**，5-8，1995.

伊藤　武：***H. pylori*の培養法に関する問題点**，*Progress in Medicine*，15，508-514，1995.

伊藤　武，新垣　正夫：**分離用生培地について**，*Progress in Medicine*，**15(12)**，2698-2703，1995.

伊藤　武：**食品からのサルモネラ簡易検査法の進展**，食品工業，**38(12)**，38-49，1995.

安田　一郎：**山椒の成分・化学**，現代東洋医学，**16(3)**，442-428，1995.

糸川　秀治，安田　一郎：**細辛の成分・化学**，現代東洋医学，**16(4)**，578-588，1995.

小久保彌太郎：**食品の微生物汚染における衛生指標菌の意義とその検査法**，フードケミカル，**1995-5**，46-54，1995.

小久保彌太郎，熊谷　進：**HACCPシステム**，臨床獣医，**13(9)**，13-20，1995.

小久保彌太郎：**リステリア症**，臨床検査，**39(9)**，1001-1007，1995.

小久保彌太郎，熊谷　進：**HACCP導入の必要性とその問題点**，月刊HACCP，**1(1)**，24-28，1995.

熊谷　進，小久保彌太郎，小沼　博隆，豊福　肇：**危害分析重要管理点(HACCP)システムによる食品の衛生管理：危害分析と重要管理点**，食品衛生研究，**45(8)**，23-40，1995.

熊谷　進，小久保彌太郎，小沼　博隆，豊福　肇：**危害分析重要管理点(HACCP)システムによる食品の衛生管理**，食品衛生学雑誌，**37(1)**，J1-J7，1996.

竹葉　和江，藤沼　賢司，中沢　裕之：**ミツバチの病気と蜂蜜中の薬剤残留**，F.F.I.ジャーナル，**165**，63-72，1995.

金子　誠二：**青森県で分離された*Yersinia enterocolitica*血清型O8菌のリボタイプを用いた分子疫学的解析**，メディアサークル，**41**，14-18，1996.

大友　良光，豊川　安延，金子　誠二，丸山　務：**国内産ブタからの病原性*Yersinia enterocolitica*血清型O8菌の分離例**，メディアサークル，**41**，8-13，1996.

内山　竹彦，三好-秋山　徹，加藤　秀人，阿部　章夫，川原　一芳，上芝　秀博，坪倉　操，永野　哲司，金子　誠二：***Yersinia pseudotuberculosis*の産生するスーパー抗原性外毒素の遺伝子クローニングと毒性発現機序**，メディアサークル，**41**，47-51，1996.

植田　忠彦，五十嵐　脩：**ビタミンE立体異性体の分析**，化学と生物，**33(11)**，745-748，1995.

吉川　翠：**省エネルギーのための制御・管理・計測(ダニの測定)**，IBEC，**16**，53-55，1996.

吉川　翠：**住まいのダニ退治**，農林年金，**37**，10-15，1995.

吉川　翠：**室内空気汚染としてのダニ問題の今日的事情**，資源環境対策，**31**，33-38，1995.

吉川　翠：**ダニ・カビの発生を促す温度差**，快適断熱，**6**，11，1995.

吉川　翠：**東京都報告の「畳に使用される殺虫剤の調査」について**，環境管理技術，**13(3)**，40-45，1995.

吉川　翠：**ダニの退治法**，暮らしと健康，**51**，92-93，1996.

吉川　翠：**くらしの豆知識'96年版**，国民生活センター，271，1995.

鈴木　孝人：**スギ花粉症での遺伝的要因と環境因子について**，都薬雑誌，**17(4)**，47-53，1995.

青木　直人：**テロメラーゼ**，検査と技術，**23**，1009-1010，1995.

青木　直人：**ＪＣウイルスと脳症，JC virus encephalopathy**，モダンメディア，**41**，16-27，1995.

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，**17(9)**，57-62，1995.

行　政　報　告

東京都衛生検査所精度管理検討専門委員会：**平成７年度第14回東京都衛生検査所精度管理事業報告書**，1-440，1996、東京都衛生局.

坂本　朋子，鈴木　秀雄，土屋　悦輝：**東京都における放射能調査、第37回環境放射能調査研究成果論文抄録集（平成６年度）**，1995，科学技術庁.

高橋　保雄，土屋　悦輝：**水道水源水域及び利水過程における親水性利水障害物質の適正管理に関する研究，平成７年度報告書**，1995，厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課.

木嶋　敬二，鈴木　助治，中村　弘，坂口　洋，西島　靖：**化粧品原料成分の品質試験方法に関する研究，平成６年度厚生科学研究補助金事業実績報告書**，1995，厚生省.

片桐　進，佐々木美枝子，神谷　信行他：**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，平成７年度厚生科学研究（地域保健対策総合研究事業）報告書**，1996，厚生省.

神谷　信行，竹内　正博，佐々木美枝子：**衛生研究所からの情報発信、平成７年度厚生科学研究（地域保健対策総合研究事業）報告書**，9-12，1996，厚生省.

学 会 発 表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1995.4—1996.3)

学会発表

高橋　由美，野口やよい，楠　　淳，尾畑　浩魅，門間　千枝，新垣　正夫，甲斐　明美，柳川　義勢，伊藤　　武：**洋生菓子中における *Salmonella* Enteritidis の増殖と生残性に関する検討**，第16回日本食品微生物学会学術総会(1995，12)．

楠　　淳，高橋　由美，藤川　　浩，和宇慶朝昭，伊藤　　武：**冷凍食品の解凍後の品質に与える保存温度と微生物の影響**，第16回日本食品微生物学会学術総会(1995，12)．

甲斐　明美，山田　澄夫，尾畑　浩魅，松下　　秀，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**受身血球凝集反応法による Vero 毒素産生性大腸菌感染症の血清診断**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

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遺伝子保有状況と保有株の性状**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

松下　　秀，山田　澄夫，関口　恭子，太田　建爾，工藤　泰雄：**海外旅行者下痢症由来 *Shigella flexneri* variant Y について**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

山田　澄夫，松下　　秀，工藤　泰雄：**ヒトおよび環境由来 *Aeromonas* の sealed mice における腸管内液体貯留活性と HEp-2細胞侵入性**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

只野　敬子，新垣　正夫，斎藤　香彦，高橋　正樹，甲斐　明美，門間　千枝，柳川　義勢，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**下痢症患者由来 *Campylobacter jejuni* のキノロン剤に対する薬剤感受性の年次別推移**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

感染性腸炎研究会（会長　今川　八束)，小花　光夫，工藤　泰雄：**感染性腸炎起因菌とその薬剤感受性（1994年の成績)**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

感染性腸炎研究会（会長　今川　八束)，味沢　篤，工藤　泰雄：**輸入感染性腸炎について**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

工藤　泰雄：**シンポジウム　7.「PCR法による病原微生物検出における現状と問題」**，衛生微生物技術協議会第16回研究会(1995，7)．

松下　　秀：**新血清型赤痢菌が検出された事例とその検査室診断**，衛生微生物技術協議会第16回研究会(1995，7)．

Itoh，T.，Tadano，K.，Obata，H.，Shingaki，M.，Kai，A.，Saitoh，K.，Takahashi，M.，Yanagawa，Y.，Ohta，K. and Kudoh，Y.：**Emergence of Quinolones-resistance in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan**，Ⅷth International Workshop on Campylobacters，Helicobacters and related organisms(1995，7)．

楠　　淳，高橋　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：**Characterization of *Salmonella* ser. Enteritidis isolated from food poisoning in Tokyo by epidemiologic makers**，世界獣医学会(1995，9)．

関口　恭子，松下　　秀，山田　澄夫，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**1995年春インドネシアバリ島旅行者の集団コレラにおける病原検索と分離コレラ菌のパルスフィールド電気泳動法による疫学解析**，第74回日本細菌学会関東支部総会(1995，4)．

関口　恭子，松下　　秀，山田　澄夫，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**今春流行したバリ島旅行者コレラの病原検索**，第29回腸炎ビブリオシンポジウム(1995，11)．

工藤　泰雄：**特別講演「地研における腸炎ビブリオ研究の流れ」**，第29回腸炎ビブリオシンポジウム(1995，11)．

工藤　泰雄：**わが国のコレラ流行**，第4回国際医療協力シンポジウム(1995，11)．

尾畑　浩魅，甲斐　明美，伊藤　　武，工藤　泰雄：**食品からの腸管出血性大腸菌O157検出のための各種簡易・迅速キットの検討**，第16回日本食品微生物学会総会(1995，12)．

藤川　　浩，和宇慶朝昭，楠　　淳，野口やよい，高橋　由美，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**東京都におけるミネラルウオーターの真菌および細菌による異物混入**，地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第8回総会(1996，2)．

工藤　泰雄：**「細菌の話題」：感染症検査情報システムのオンライン化について―地研の立場から―**，地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第8回総会(1996，2)．

蛭田　徳昭，日守満里子，増山　　亨，山崎　　貢，松下　　秀，工藤　泰雄，伊藤健一郎：**細胞付着性大腸菌の付着条件についての検討**，地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第8回総会(1996，2)．

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：**食中毒及び散発性下痢症由来腸炎ビブリオのtrh遺伝子保有状況**，1995年度感染性腸炎研究会総会(1996，3)．

甲斐　明美，尾畑　浩魅，松下　　秀，山田　澄夫，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**Vero毒素産生性大腸菌感染症の血清診断**，1995年度感染性腸炎研究会総会(1996，3)．

工藤　泰雄，関口　恭子，松下　　秀，山田　澄夫，伊藤　　武，太田　建爾：**インドネシアバリ島旅行者におけるコレラの流行について**，1995年度感染性腸炎研究会総会(1996，3)．

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：**ヒト下痢由来trh保有腸炎ビブリオの血清型とその性状**，第69回日本細菌学会総会(1996，3)．

関口　恭子，山田　澄夫，松下　　秀，甲斐　明美，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**PAGEによるコレラの分子疫学―インドネシアを中心として―**，第69回日本細菌学会総会(1996，3)．

松下　　秀，山田　澄夫，関口　恭子，楠　　淳，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**最近5年間に東京において散発事例より分離されたサルモネラについて**，第69回日本細菌学会総会(1996，3)．

工藤　泰雄，松下　　秀，関口　恭子，山田　澄夫：**1992-1994年にフィリピンで分離された散発下痢症由来のサルモネラについて**，第69回日本細菌学会総会(1996，3)．

甲斐　明美，尾畑　浩魅，山田　澄夫，伊藤　　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**ヒト，ウシ，食肉からのVero毒素産生性大腸菌の検出と分離菌の諸性状**，第69回日本細菌学会総会(1996，3)．

伊藤　　武，新垣　正夫，甲斐　明美，尾畑　浩魅，柳川　義勢：***H.pylori*染色体DNAのパルスフィルド電

気泳動法による解析，第69回日本感染症学会総会(1995, 3).

村田　理恵，柴田　　実，安部　昭子，高野　弘紀：**高速液体クロマトグラフィーを用いたアミノ酸代謝異常症スクリーニング**，第23回日本マス・スクリーニング学会(1995, 9).

柴田　　実，村田　理恵，安部　昭子，高野　弘紀：**HPLC法によるアミノ酸測定の検討結果と将来展望**，日本マス・スクリーニング学会　第15技術部会(1996, 2).

奥野　ルミ，遠藤美代子，柏木　義勝，五十嵐英夫，金田麻里子，天野　祐次，市瀬　正之：**健康学童および小児科外来患者由来 *S.aureus* の疫学的調査**，第69回日本感染症学会(1995, 4).

奥野　ルミ，遠藤美代子，柏木　義勝，五十嵐英夫：**1993年および1994年に分離されたA群レンサ球菌の薬剤感受性について**，第28回レンサ球菌研究会(1995, 6).

奥野　ルミ，遠藤美代子，柏木　義勝，五十嵐英夫，清水　可方，大江　健二：**劇症型A群レンサ球菌感染症患者およびその他の疾患由来A群レンサ球菌のT型と発熱性毒素型**，第69回日本細菌学会総会(1996, 3).

鈴木　　淳，村田以和夫，安田　一郎，西谷　　潔，山川　浩司：**Larvicidal Principle of *Anisakis simplex* Larvae from *Curcuma longa* (*C.domestica*) and *Alpinia officinarum* (Zingiberaeae)**，環太平洋国際化学会議(1995, 12).

鈴木　　淳，安田　一郎，村田以和夫，西谷　　潔：**良姜に含有されるアニサキス殺虫成分**，日本薬学会(1996, 3).

佐々木由紀子，手嶋　力男：**RT－PCR法と細胞培養による小児のウイルス性胃腸炎の解析**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995, 6).

林　志直，佐々木由紀子，関根　整治，太田　建爾，工藤　泰雄：**RT－PCR法による非細菌性胃腸炎集団発生からのSRSV検索**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995, 6).

関根　整治，林　　志直，関根　大正，太田　建爾，工藤　泰雄，佐々木由紀子：**SRSVの検出成績ー東京都における大規模集団発生事例の解析ー**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995, 6).

関根　整治，林　　志直，佐々木由紀子，関根　大正，工藤　泰雄：**東京都内で発生した急性胃腸炎集団事例のウイルス学的検討，1984年ー1993年**，第69回日本感染症学会総会(1995, 4).

杉枝　正明，秋山　真一，西尾　智裕，長岡　宏美，赤羽　荘資，服部　　担，林　　志直，佐々木由紀子，中島　節子：**RT－PCR法を用いた急性胃腸炎患者便などからのSRSVの検出**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995, 6).

川本　尋義，宇田川悦子，斉籐　博之，沢田　春美，関根　整治，大石　　功，山西　重機，大津　隆一，木村　輝男，野田　　衛，井上　　栄：**ウイルス性胃腸炎集団発生の全国実態調査**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995, 6).

林　　志直，関根　整治，太田　建爾：**小型球形ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ領域の制限酵素解析**，第43日本ウイルス学会総会(1995, 10).

関根　整治，林　　志直，佐々木由紀子：**関東甲信静地区におけるウイルス性胃腸炎集団発生の調査**，第10回

関東甲信静地区ウイルス研究会(1995, 9).

吉田 靖子, 矢野 一好, 新開 敬行, 太田 建爾, 工藤 泰雄：**東京都における日本脳炎の疫学的研究**, 第30回日本脳炎ウイルス生態学研究会(1995, 7).

新開 敬行, 吉田 靖子, 矢野 一好, 太田 建爾, 工藤 泰雄：**継代細胞を用いた日本脳炎ウイルスの中和抗体価測定法について**, 第30回日本脳炎ウイルス生態学研究会(1995, 7).

田部井由紀子, 門間 公夫, 貞升 健志, 森 功次, 関根 大正, 安田 一郎, 塩田 寛子：**抗HIV作用を有する和漢薬に関する研究（2）生薬エキスとクマリンの抗HIV作用の機序について**, 日本薬学会第116年会(1996, 3).

貞升 健志, 門間 公夫, 森 功次, 田部井由紀子, 関根 大正, 工藤 泰雄：**seroconversion初期にHIV抗体検査を受診したと思われる1例**, 第10回関東甲信静地区ウイルス研究会(1995, 9).

貞升 健志, 森 功次, 田部井由紀子, 門間 公夫, 関根 大正, 工藤 泰雄：**東京都内におけるHIV-1抗体陽性母より生まれた児の追跡調査**, 第9回日本エイズ学会(1995, 11).

門間 公夫, 貞升 健志, 田部井由紀子, 森 功次, 関根 大正, 工藤 泰雄：**東京都におけるHIV抗体検査成績**, 第10回関東甲信静ウイルス研究会(1995, 9).

森 功次, 貞升 健志, 田部井由紀子, 門間 公夫, 関根 大正, 工藤 泰雄, 広川 淳, 滝川 逸朗, 井村 総一, 渡辺 徹：**生後6ヶ月にHTLV-I（成人T細胞白血病ウイルス）の感染が確認された1例について**, 第95回東京都衛生局学会(1995, 10).

岸本 清子, 山野辺秀夫, 観 照雄, 中村 弘：**形状記憶繊維製品のホルムアルデヒドの定量**, 第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

野尻 宗子, 鎌田 国広, 西島 基弘：**OPAを用いたポストカラムHPLC法によるビオチンの定量**, 日本薬学会第116年会(1996, 3).

寺島 潔, 鎌田 国広, 西島 基弘：**HPLCによるγ-オリザノールの定量**, 日本薬学会第116年会(1996, 3).

奥本千代美, 西島 基弘：**めっき廃水中シアンの簡易試験法**, 第8回全国協議会関東甲信静支部理化学部会(1996, 2).

佐藤かな子, 長井二三子, 牛山 慶子, 加納 いつ：**十全大補湯構成生薬水抽出エキスのNa, K-ATPaseおよびH, K-ATPase活性におよぼす影響**, 第12回日本和漢医薬学会(1995, 8).

安田 一郎, 高野伊知郎, 浜野 朋子, 瀬戸 隆子, 塩田 寛子, 西島 基弘, 中嶋 順一, 福田 達男, 清水 虎雄：**唐白朮と和白朮の成分比較**, 日本生薬学会第42回年会(1995, 9).

中嶋 順一, 福田 達男, 荒金真佐子, 吉沢 政夫, 鈴木 幸子, 清水 虎雄, 安田 一郎, 西島 基弘：**オオバナオケラ根茎と唐白朮の成分研究**, 日本生薬学会第42回年会(1995, 9).

福田 達男, 中嶋 順一, 荒金真佐子, 吉沢 政夫, 鈴木 幸子, 清水 虎雄, 安田 一郎, 西島 基弘：**オオバナオケラの栽培研究 栽培における個体変異について**, 日本生薬学会第42回年会(1995, 9).

安田　一郎，浜野　朋子，鈴木　　淳，村田以和夫：**桂皮に含まれるアニサキスⅠ型幼虫運動抑制物質**，日本香辛料研究会(1995，11)．

安田　一郎：**生薬漢方製剤の品質の安定性と医薬品安定性試験**，第7回生薬漢方製剤の微生物および異物対策ならびに品質管理に関するシンポジウム(1995，11)．

安田　一郎，塩田　寛子，浜野　朋子，高野伊知郎，瀬戸　隆子，西島　基弘，田部井由紀子，門間　公夫，関根　大正，李　　国男：**抗HIV作用を有する和漢薬に関する研究（Ⅰ）蛇床子中のクマリンについて**，日本薬学会116年会（1996，3)．

安田　一郎，佐藤かな子，瀬戸　隆子，長井二三子，加納　いつ，西島　基弘，秋山　和幸：**牡丹皮中の腎臓 Na^+，K^+-ATPase活性阻害物質**，日本薬学会116年会(1996，3)．

高崎みどり，木島　孝夫，安田　一郎，浜野　朋子，徳田　春邦：**小青龍湯構成生薬の抗発癌プロモーター作用（Ⅰ）細辛に含有されるEBV活性化抑制作用成分について**，日本薬学会116年会(1996，3)．

森　謙一郎，伊藤　弘一，中村　義昭，大貫　奈穂美，小田　陽子，中村　　弘：**HPLCによるエアゾル製品含有成分の定量法**，日本薬学会第116年会(1996，3)．

大貫奈穂美，小田　陽子，森　謙一郎，中村　義昭，伊藤　弘一，中村　　弘：**ＬＣ／ＭＳによる化粧品中のポリエチレングリコールの分析**，日本薬学会第116年会(1996，3)．

小田　陽子，森　謙一郎，伊藤　弘一，鈴木　助治，中村　　弘：**２次元ＮＭＲによる化粧品中紫外線吸収剤の簡易分析**，日本薬学会第116年会(1996，3)．

中村　　弘，林　　武史，山口　紫野，馬場　正樹，岡田　嘉仁，奥山　　徹，田中　次郎，徳田　春邦，西野　輔翼：**各種海藻の生物活性**，日本薬学会第116年会(1996，3)．

森　謙一郎，伊藤　弘一，中村　義昭，大貫奈穂美，中村　　弘：**ＨＰＬＣによるエアゾル製品含有成分の定量分析**，全国衛生化学技術協議会第32回年会(1995，11)．

観　照雄，岩崎由美子，山野辺秀夫，上原　真一，中村　　弘：**防炎加工家庭用品中のリン酸トリクロロエチル（TCEP）について**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995，11)．

雨宮　　敬，佐藤　憲一，小野塚春吉，水石　和子，中村　　弘：**魚介類中のCNPの含有量調査**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995，11)．

中村　義昭，大貫奈穂美，森　謙一郎，伊藤　弘一，中村　　弘：**ケイ光Ｘ線分析装置による化粧品及び医薬部外品中のイオウの簡易分析法について**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995，11)．

木嶋　敬二，内野　　正，安藤　正典，鈴木　助治，中村　　弘：**医薬部外品・化粧品原料のクリーンな試験法について**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995，11)．

Mizuishi，K.，Takechi，M. and Hobo，T：**Determination of TBT and TPT in Environment by GC/Negative Ion Chemical Ionization/MS**，7th International symposium on Chromatography and Electropho (1995，5)．

水石　和子，保母　敏行：**GC/NCI/MSによる有機スズハライドの高感度定量**，1995年度質量分析連合討論会(1995，6)．

水石　和子，保母　敏行：**固相マイクロ抽出／キャピラリーＧＣによる有機スズ化合物の迅速分析**，日本分析化学会第44年会(1995，9)．

水石　和子，竹内　正博，保母　敏行：**マルチキャピラリーカラムを用いる高速・高分解能ガスクロマトグラフィー**，日本化学会1996年会(1996，3)．

小久保彌太郎：**最近話題にのぼる感染症：食品媒介性リステリア症**，衛生微生物技術協議会第16回研究会(1995，7)．

岡　　尚男，猪飼　誉友，早川　順子，原田　健一，鈴木　真言，竹葉　和江，中沢　裕之：**高速液体クロマトグラフィーによるイベルメクチンの分離と精製**，第69回日本食品衛生学会学術講演会(1995，5)．

笹本　剛生，宮崎　奉之，橋本　常生，堀井　昭三，井草　京子，宮川　弘之，小久保彌太郎，依田　　修：**オーストラリア産牛肉からの農薬(クロルフルアズロン)の残留分析法の確立**，第94回東京都衛生局学会(1995，5)．

Nakama, A., Terao, M., Matsuda, M., Itoh, T., Kokubo, Y., Umeki, F. and Maruyama, T.：**Comparison of *Listeria monocytogenes* strains isolated from human infection in Japan using pulsed-field gel electrophoresis**, 12th International Symposium on Problems of Listeriosis(1995，10)．

平井　昭彦，石崎　直人，片岡　　潤，金子　誠二，小久保彌太郎：**食肉のサルモネラ汚染状況と分離株の薬剤感受性**，第16回日本食品微生物学会学術総会(1995，12)．

平井　昭彦，楠　　淳，橋本　由美，伊藤　　武：**磁気免疫法による食品中のサルモネラ検出法の検討**，第69回日本食品衛生学会学術総会(1995，5)．

片山　　丘，古屋由美子，吉田　芳哉，田中　伸久，伊藤　忠彦，坪井　義昌：**剖検材料からの *R. tsutsugamushi* DNA の検出**，第69回日本感染症学会総会(1995，4)．

秦　　和寿，植竹　秀光，鵜飼　恒治，小川　嘉一，石田　雅巳，伊藤　忠彦，山崎　清，関根　大正，工藤　泰雄：**東京の山地における病害動物とその人体被害**，第94回東京都衛生局学会(1995，5)．

竹葉　和江，藤沼　賢司，小久保彌太郎，岡　　尚男，中沢　裕之：**高速液体クロマトグラフィーによる畜産食品中のトリクラベンダゾール及びフルベンダゾールの同時分析**，第70回日本食品衛生学会学術講演会(1995，10)．

金子　誠二，小久保彌太郎，大友　良光：***Yersinia enterocolitica* 血清型O8菌のリボタイプを用いた分子疫学**，第74回日本細菌学会関東支部総会(1995，10)．

金子　誠二，小久保彌太郎，牧野　壮一，大友　良光，福島　　博：**RAPD 法による *Yersinia enterocolitica* 血清型O8菌のDNAフィンガープリンティング**，第120回日本獣医学会(1995，11)．

Pudjiatmoko, H., Fukushi, H., Hirai, K. and Kanzaki, M.：**Seroepidemiological study of *Chlamydia psittaci* in cats**, 第120回日本獣医学会(1995，11)．

Kanzaki, M., Iida, T., Kokubo, Y., Ito, N., Hiyoshi, M., Takashima, I. and Hashimoto, N.：**Molecular epidemiology of feline chlamydial infection by PCR**, World Veterinary Congress(1995，9)．

Iida, T., Kanzaki, M., Nakama, A., Umeki, F.,

Kokubo, Y., Kaneuchi, H. and Maruyama, T.：**Serotype of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan**, World Veterinary Congress (1995, 9).

中込　圭介，中沢久美子，中島　和雄，菊地　洋子，嶋村　保洋，田村　行弘：**キノリンイエローの構成色素について**，日本食品衛生学会第70回学術講演会(1995, 10).

田端　節子，上村　　尚，井部　明広，早野　公美，田村　行弘：**アフラトキシンの *Humicola fuscoatra* による生物学的変換物の構造に関する検討**，日本薬学会第116年会(1996, 3).

早野　公美，上村　　尚，井部　明広，田端　節子，木村祐起子，冠　　政光，田村　行弘：**アルコール飲料中のカルバミン酸エチル生成に及ぼす要因**，第70回日本食品衛生学会(1995, 10).

牛山　博文，後藤　純雄，戸塚ゆ加里，杉村　　隆，若林　敬二：**たばこ煙中及び加熱食品中の comutagens, β－カルボリン化合物の定量**，第54回日本癌学会総会(1995, 10).

伊藤　正子，永山　敏廣，小林　麻紀，田村　康宏，塩田　寛子，田村　行弘：**農産物中のアラニカルブ分析法**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

小林　千種，中里　光男，牛山　博文，川合　由華，立石　恭也，田村　行弘：**食品中の合成甘味料の一斉分析法**，日本食品衛生学会第70回学術講演会(1995, 10).

立石　恭也，中里　光男，守安　貴子，牛山　博文，小林　千種，川合　由華，田村　行弘：**高速液体クロマトグラフィーによる食品中のプロピオン酸の分析**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

田村　康宏，永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子，塩田　寛子，田村　行弘：**農産物中のフルシラゾール分析法**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

鈴木　　仁，奥本千代美，勝木　康隆，田村　行弘，西島　基弘，山田　　隆：**主として野菜に使用された亜塩素酸の分析法**，第70回日本食品衛生学会(1995, 10).

貞升　友紀，広門　雅子，植松　洋子，平田　恵子，安田　和男，風間　成孔：**天然増粘安定剤の品質調査**，日本食品化学学会第1回学術大会(1995, 7).

植松　洋子，貞升　友紀，平田　恵子，広門　雅子，安田　和男，鈴木　助治：**食品香料製剤中の希釈用溶剤の分析**，日本食品衛生学会第70回学術講演会(1995, 10).

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：**炊飯改良剤の品質調査**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

伊藤　弘一，中村　義昭，森　謙一朗，大貫奈穂美，中村　　弘：**フォトダイオードアレー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省令レーキ色素の分析**，第32回全国衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

伊藤　弘一，小田　陽子，大貫奈穂美，森　謙一郎，中村　　弘：**輸入化粧品におけるタール色素について**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第8回理化学研究部会(1996, 2).

伊藤　弘一，小田　陽子，大貫奈穂美，森　謙一郎，中村　義昭，中村　　弘：**HPLC および蛍光X線分析法による化粧品中レーキ色素の分析**，日本薬学会第116年会(1996, 3).

萩原　輝彦，西島　基弘，鈴木　助治：**LC／APCI－MSの定量再現性向上：自動スイッチングバルブを用いた煮干し中のBHAとBHTのSIM定量**，日本薬学会第116年会(1996，3)．

早藤知恵子，市川　久次，友松　俊夫，窪山　泉，中橋　猛，城所　敏英：**東京都四地域の骨粗しょう症予防事業における尿中骨代謝マーカーの検討：第一報**，第95回東京都衛生局学会(1995，11)．

植田　忠彦，高橋　巖，牛尾　房雄，市川　久次，村松　里穂，清瀬千佳子，五十嵐　脩：**合成型ビタミンE(all-rac-α-トコフェロール)を投与した健常者の血中α-トコフェロール立体異性体の変動について**，第95回東京都衛生局学会(1995，11)．

坂牧　成恵，高橋　巖，横山　知子，牛尾　房雄，植田　忠彦，市川　久次：**水耕栽培および四訂日本食品標準成分表未収載野菜の栄養成分について**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部，第8回理化学研究部会(1996，2)．

吉川　翠：**天然物使用防ダニ剤の効果**，第54回日本公衆衛生学会(1995，10)．

佐藤　泰仁：**室内塵（ハウスダスト）の性状及び挙動に関する調査研究（第3報）**，第54回日本公衆衛生学会(1995，10)．

牧野　国義：**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への影響について**，第54回日本公衆衛生学会(1995，10)．

大山　謙一，草野　友子，泉川　碩雄，伊藤　隆明，蟹沢　成好：**大気汚染物質による肺腫よう発生に関する研究（第3報）　浮遊粒子物質抽出物による肺腫よう発生とNO_2，SO_2暴露の影響について**，第36回大気環境学会(1995，11)．

斎藤　育江，瀬戸　博，大西　和夫，鈴木　重任：**デイーゼル排ガス粒子から抽出した酸性分画タールの変異原性**，第36回大気環境学会(1995，11)．

瀬戸　博，大久保智子，斎藤　育江，大西　和夫，鈴木　重任：**デイーゼル排ガス暴露によるラット肺組織DNA中の8－ヒドロキシデオキシグアノシンの変化**，第36回大気環境学会(1995，11)．

福留　寿生，戸塚ゆ加里，瀬戸　博，斎藤　育江，杉村　隆，若林　敬二：**^{32}P－ポストラベル法を用いたマロンジアルデヒドーDNA付加体の検出**，第54回日本癌学会総会(1995，10)．

福留　寿生，戸塚ゆ加里，瀬戸　博，斎藤　育江，杉村　隆，若林　敬二：**^{32}P－ポストラベル法によるマロンジアルデヒドーDNA付加体の解析**，第24回日本環境変異原学会(1995，11)．

瀬戸　博，大久保智子，大西　和夫，鈴木　重任：**8－ヒドロキシグアニン分析法の改良とデイーゼル排気暴露ラット臓器試料への応用**，デイーゼル排気（ＤＥ）及び微粒子（ＤＥＰ）の健康影響に関するワークショップ(1996，2)．

古畑　勝則：**特異基質を用いる大腸菌群及び大腸菌の検出法**，日本防菌防黴学会第２２回年次大会(1995，5)．

古畑　勝則，木ノ内良治：**修景用水におけるレジオネラ属菌の生息状況**，日本防菌防黴学会第22回年次大会(1995，5)．

矢野　一好：**水中ウイルスの検出法**，日本防菌防黴学会第２２回年次大会(1995，5)．

矢野 一好, 市川 久浩, 吉田 靖子：**水質評価指標微生物の測定技術**, 水環境学会 水中の健康関連微生物シンポジウム(1995, 11).

矢野 一好, 吉田 靖子, 土屋 悦輝, 鈴木 重任：**セルロース吸着・凝集法による環境水からのウイルスの検出状況 (1985-95年)**, 第30回日本水環境学会年会(1996, 3).

Watanabe, M.F.：**Species composition of *Microcystis* and microcystins**, 1st International congress on toxic Cyanobacteria(1995, 8).

Watanabe, M.F., Watanabe, Y. and Watanabe, M.：**Anabaena tenericaulis forms water bloom during winter**, 13th International symposium on Cyanophyta research(1995, 8).

渡辺真利代：***Microcystis* 属にみられる種間差異(1)**, 第60回日本陸水学会(1995, 10).

朴 虎東, 石見 千恵, 渡辺真利代, 原田 健一, 沖野外輝夫, 林 秀剛：**諏訪湖における *Microcystis* とラン藻毒 Microcystin の経年変化**, 第60回日本陸水学会(1995, 10).

高橋 保雄, 土屋 悦輝, 西尾 高好, 森田 昌敏：**水道水中の揮発性消毒副生成物**, 第4回環境化学討論会(1995, 6).

細川奈津子, 渡辺真利代, 高橋 保雄, 鈴木 英子, 土屋 悦輝：**RSa 細胞を用いた水道水中の消毒副生成物の毒性評価**, 第1回バイオアッセイ研究会・エコトキシコロジー研究会合同研究発表会(1995, 9).

細川奈津子, 渡辺真利代, 鈴木 英子, 土屋 悦輝：**藍藻 *Microcystis* 産生物質の RSa 細胞による毒性評価**, 第21回環境トキシコロジーシンポジウム(1995, 10).

神谷 信行, 池田 一夫, 荻野 周三, 竹内 正博：**衛生研究所からの情報発信**, 第9回公衆衛生情報研究協議会研究会(1996, 2).

神谷 信行：**衛生研究所における情報ネットワークと地域保健への有効活用**, 第32回衛生化学技術協議会年会(1995, 11).

深野 駿一：**薬物動態予測プログラムの開発とその応用**, 日本動物実験代替法学会(1995, 11).

鈴木 孝人, 石森 真子, 奥村 康, 加納 尭子, 大国 寿士：**ダニ抗原 (Der f II) 感作におけるディーゼル粒子 (DEP) のアジュバント作用**, 第45回日本アレルギー学会(1995, 10).

中川 好男, 中島 和雄, 田山寿美子：**没食子酸プロピルのラット肝細胞での代謝と毒性**, 第10回日本薬物動態学会(1995, 11).

田山 邦昭, 高橋 博, 志佐 湍, 高濱 素秀：**雄性ラット各系における皮膚褐色鱗屑の分布パターンの相違と分類**, 第42回日本実験動物学会総会(1995, 6).

小縣 昭夫, 上野 宗久, 高橋 博, 久保 喜一, 長澤 明道, 三栗谷久敏, 坂本 義光, 青木 直人：**SCID マウスに移植したヒト精巣腫瘍細胞に対するレチノイン酸の増殖抑制及び分化誘導作用の検討**, 日本レチノイド研究会第6回学術集会(1995, 11).

小嶋 昭江, 酒井 亮二, 荒記 俊一, 青木 直人, 金城 芳秀, 岩崎 恵子, 須貝 正夫, 大森 正英, 横山 和仁, 村田 勝敏, 玉城 悟, W, C, Willette.

：過去の食品成分摂取量に関する配偶者の回答の妥当性の検討，第54回日本公衆衛生学会総会(1995，10)．

矢口久美子，五十嵐　剛，鈴木　俊也，近藤　治美，稲葉美佐子，田村　行弘：**パージトラップGC-MS法による地下水中揮発性有機化合物の調査**，日本水環境学会(1996，3)．

近藤　治美，稲葉美佐子，鈴木　俊也，矢口久美子，藤井　　孝：**多摩地域北部における地下水の硝酸性窒素に関する調査**，全国衛生化学技術協議会(1995，11)．

鈴木　俊也，矢口久美子，田村　行弘：**ゴルフ場の芝生土壌および調整池底泥における除草剤テルブカルブの分解**，日本水環境学会年会第30回(1996，3)．

林　　志直，佐々木由紀子，関根　整治，太田　建爾，工藤　泰雄：**RT－PCR法による非細菌性胃腸炎集団発生からのＳＲＳＶ検索**，第36回日本臨床ウイルス学会(1995，6)．

新井　輝義，潮田　　弘，神　真知子，楠　くみ子，平田　一郎，鈴木　敬子，片山佳奈子，吉田　　勲，入倉　善久，諸角　　聖，二島太一郎，船山　芳樹，柿沢幹雄，長末　　修：**ハンバーガー用パテの細菌汚染実態ならびに加熱調理後の生残菌数**，日本食品衛生学会第69回学術講演会(1995，5)．

新井　輝義，潮田　　弘，神　真知子，楠　くみ子，石上　　武，入倉　善久，鈴木　敬子，吉田　　勲，片山佳奈子，諸角　　聖，田村　行弘：**各種調理済食品，食品原材料および調理環境，拭取り材料からの黄色ブドウ球菌検出法の検討ならびに検出菌の性状**，第16回日本食品微生物学会学術総会(1995，11)．

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）

諸　角　　聖	宮　崎　奉　之
関　根　大　正	竹　内　正　博
大　西　和　夫	青　木　直　人
觀　　照　雄	山　田　澄　夫
鈴　木　助　治	小　室　　匠

1996年12月　発行

規格表　第 2 類
印刷番号（8）580
刊行物番号（H）24

東京都立衛生研究所研究年報第47号

編集・発行：東京都立衛生研究所
〒169 東京都新宿区百人町3－24－1
電　話 03（3363）3231（代）

印刷所：大東印刷工業株式会社
〒131 東京都墨田区向島3－35－9
電　話 03（3625）7481（代）

R70
古紙配合率70％再生紙を使用しています（本文）