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

49

1998

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

R100
古紙配合率100%(本文)
白色度70%再生紙を使用しています

序

ここに平成９年度の当所における研究をまとめることができました。

今年は新館への一部引っ越しが終わり、１・２号館も取り壊されることになりました。昭和の初めから、その時々の公衆衛生上のテーマが研究され、多くの人々の夢を育てた建物が消えて行くのは感慨深いものがある一方、新しい建物では新しい発想の研究が育っていく期待もあります。今一番のテーマと言えば内分泌かく乱化学物質の問題ですが、全庁的な取り組みが行われる中で、当所は重要な部分を担当することになっています。それに関連して、来年からいよいよダイオキシンの測定も始まります。極く微量の物質を、正確かつ安全に測定するのは大変な事ですが、都民の生命と健康に関する重大な問題は私たちが責任を持ってやらなければならないと思います。待ったなしの迅速正確な結果を求められているのは、感染症も同様です。今年９月に成立した感染症新法においても、患者の人権という観点から入院や診断において、迅速で科学的な裏付けを求めています。新法で対象となる感染症も増え、その検査にも対応しなければなりません。

このように当所の持つ高度な検査機能に対する期待は大きく、０157や和歌山のヒ素カレー事件、それに続くアジ化ナトリウムなどの毒物混入事件などの危機管理問題でも、地域住民の健康管理という意味で、衛生研究所の検査・データベース・ネットワークの機能が注目されています。

以上のように、次々と起こってくる公衆衛生上の問題に対して的確な行政方針や対策を立てるためにも、必要となる高度な検査機能を保持するためにも、先行的調査研究が重要になって来ます。 今のように先行きが見えないと言われている時代を切り開いて行くのは、実態を厳しく見つめ、そこから生まれる将来への深い洞察を持った研究だと思います。

研究内容については、毎年研究調整会議において当所にふさわしいものか検討しておりますが、私共の研究が片寄ったものにならないためにも、皆様のご指導ご助言を今後もよろしくお願いします。

平成11年１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

海外旅行下痢症患者からの毒素原性大腸菌の検出状況と分離株の産生毒素型，血清型及び薬剤感受性（1996年～1997年）
……野口やよい，松下　秀，柳川　義勢，諸角　聖，五十嵐英夫
伊藤　武…… 3

東京都内のインフルエンザ検索成績（1997年12月～1998年２月）
……山崎　清，長島　真美，佐々木由紀子，平田　一郎，関根　大正…… 8

東京都における小型球形ウイルスのRT－PCR法による検査成績
……佐々木由紀子，中村　敦子，門間　公夫，森　功次，長島　真美
新開　敬行，貞升　健志，関根　整治，平田　一郎，関根　大正
伊藤　武…… 12

臨床試料からのウイルス遺伝子検出
……田部井由紀子，貞升　健志，吉田　靖子，長谷川道弥
佐々木由紀子，平田　一郎，関根　大正…… 17

エアロゾルと共に飛散させたウイルスの「セルロース吸着・凝集法」による捕集実験
……矢野　一好，竹内　正博，真木　俊夫…… 23

HIV-1抗体陽性例のペプチドELISA法によるサブタイプ解析
……貞升　健志，森　功次，関根　整治，田部井由紀子，平田　一郎
関根　大正，小久保彌太郎，味澤　篤，増田　剛太…… 29

アデノウイルス感染小児における免疫機能の測定
……森　功次，貞升　健志，田部井由紀子，平田　一郎，関根　大正…… 33

自動免疫蛍光測定装置(VIDAS)によるListeria monocytogenesの検査法の検討
……飯田　孝，神崎　政子，宮崎　奉之，丸山　務…… 38

Listeria monocytogenesが産生するP60蛋白検出キットの評価
……飯田　孝，林　亨子，神崎　政子，宮崎　奉之…… 43

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

細辛に含まれる抗発癌プロモーター作用物質とその含量による品質評価
……安田　一郎，浜野　朋子，中嶋　順一，宮武ノリヱ，守安　貴子
岸本　清子，寺島　潔，大西　和夫，鈴木　幸子，木島　孝夫
高崎みどり，徳田　春邦…… 49

生薬地黄のDNA傷害作用および作用物質の部分精製
……牛山　慶子，長井二三子，大久保智子，佐藤かな子，加納　いつ
安田　一郎，瀬戸　隆子…… 55

牡丹皮中のNa,K-ATPase活性阻害物質1,2,3,4,6-ペンタ-O-ガロイル-β-D-グルコースの分画，精製とその阻害機構の解明
……佐藤かな子，安田　一郎，長井二三子，瀬戸　隆子，加納　いつ…… 60

原料生薬に含まれる有害物質の実態調査（第２報）―ヨクイニンについて―
……中里　光男，田端　節子，永山　敏廣，観　　公子，立石　恭也
安田　和男…… 65

家庭用品の衛生化学的研究（第39報)規制対象外家庭用品中のホルムアルデヒドの実態調査
……都田　路子，山野辺秀夫，上原　真一，観　　照雄，藤井　　孝…… 71

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

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法
……立石　恭也，中里　光男，牛山　博文，小林　千種，川合　由華
守安　貴子，安田　和男…… 77

玄米中のアクリルアミドモノマーの分析法
……小沢　秀樹，井部　明広，田端　節子，宮川　弘之，貞升　友紀
安田　和男…… 84

国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査－平成９年度－
……小林　麻紀，永山　敏廣，伊藤　正子，田村　康宏，高田千恵子
橋本　常生，羽石奈穂子，安田　和男…… 88

輸入農産物中の残留農薬実態調査（有機リン系農薬及び含窒素系農薬）―平成９年度―
……田村　康宏，永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子，高田千恵子
橋本　常生，羽石奈穂子，安田　和男…… 95

輸入農産物中の残留農薬実態調査（有機塩素系農薬，N-メチルカーバメイト系農薬及びその他）―平成９年度―
……伊藤　正子，永山　敏廣，小林　麻紀，田村　康宏，高田千恵子
橋本　常生，羽石奈穂子，安田　和男……101

国内産野菜・果実中の有機スズ系農薬の残留実態
……羽石奈穂子，永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子，田村　康宏
高田千恵子，橋本　常生，安田　和男……109

東京都におけるPCB汚染の実態について（第18報）魚介類中のPCB含有量
……雨宮　　敬，小野塚春吉，水石　和子，藤井　　孝，大西　和夫
小久保彌太郎……114

市販食品における天然色素の使用実態調査（第２報）
……荻原　　勉，天川　映子，鎌田　国広，斎藤　和夫，鈴木　助治……120

缶詰食品中の金属含有量調査
……鈴木　　仁，藤沼　賢司，勝木　康隆，斎藤　和夫，安田　和男……129

茶葉及び茶飲料中のカテキン類，メチルキサンチン類及びアスコルビン酸の分析
……小林　千種，中里　光男，山嶋裕季子，川合　由華，立石　恭也
安田　和男……135

魚介類の鮮度保持に用いられる食品添加物の市販魚における使用実態調査
……井口　正雄，菊谷　典久，坂牧　成恵，門間　公夫，市川　久次
垣　　弘一，川島　幸造，阿部　則雄，金井日出夫……144

輸入食品中の放射能濃度（第７報）－平成７年度～平成９年度－
……観　公子，牛山　博文，新藤　哲也，安田　和男……149

最近11年間の食物繊維摂取量
……齋東　由紀，牛尾　房雄，門間　公夫，市川　久次……157

食品用天然着色料中の重金属及びヒ素含量
……安野　哲子，伊藤　弘一，萩原　輝彦，広門　雅子，船山　恵市
鈴木　助治，斎藤　和夫……162

輸入チーズ中のナタマイシンの検出と確認
……藤沼　賢司，竹葉　和江，宮崎　奉之……168

化学物質及び自然毒による食中毒等事件（第15報）―平成９年度―
……牛山　博文，観　公子，新藤　哲也，安田　和男……172

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

環境試料中のフラーレンの分析法
……瀬戸　博，大久保智子，竹内　正博……181

水中ヒ素化合物の化学形態
……中川　順一，中神　千穂，真木　俊夫……186

水及び底質中のスルフェンアミド類の分析法の検討
……小輪瀬　勉，岡本　寛，真木　俊夫……191

東京湾の環境汚染モニタリング（13報）スズキ・ウミネコ中の内分泌撹乱物質の濃度推移について
……斎藤　育江，瀬戸　博，大久保智子，竹内　正博……196

多摩地域北部における地下水中の硝酸性窒素の調査
……近藤　治美，矢口久美子，鈴木　俊也，稲葉美佐子，小西　浩之
五十嵐　剛，鈴木　助治……203

多摩地域における地下水中の農薬の汚染実態調査
……鈴木　俊也，稲葉美佐子，近藤　治美，矢口久美子，鈴木　助治……210

Ge半導体検出器を用いた核種分析による環境放射能調査－平成２年度から平成８年度－
……坂本　朋子，鈴木　秀雄，真木　俊夫……218

室内空気中化学物質が原因とみられる健康阻害の事例について
……斎藤　育江，瀬戸　博，竹内　正博……225

マウスのカビ抗原による抗体産生に及ぼすディーゼル粉じんのアジュバント作用
……大山　謙一，田口　和美，鈴木　孝人……232

ディーゼル排ガス暴露ラットにおける血液ガス変化と気管支肺胞洗浄液の細胞成分の変動
……大澤　誠喜，池田　眞悟，渡邊　伸枝，竹内　正博，慶長　直人
藤沢　道夫，三野　健，森　憲二……237

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

クロルプロファム（CIPC）のラットにおける亜慢性毒性試験
……藤谷　知子，多田　幸恵，野口　アパレシータ千歳，米山　允子……245

ラック色素のF344ラットによる13週間毒性試験
……坂本　義光，多田　幸恵，田山　邦昭，長澤　明道，福森　信隆
三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，池田　虎雄，高橋　博
青木　直人，佐々木美枝子……255

天然保存料しらこたん白のラットによる亜慢性毒性試験
……多田　幸恵，池田　虎雄，高橋　博，矢野　範男，湯澤　勝廣
長澤　明道，坂本　義光，福森　信隆，三栗谷久敏，田山　邦昭
佐々木美枝子……267

マウスを用いた混餌法によるイマザリルの発生毒性試験
……田中　豊人，高橋　省，大石　眞之……277

ピペロニルブトキシドのCHO-K1細胞による細胞毒性試験及び細胞遺伝学的試験
……田山寿美子，中川　好男……281

天然食品添加物のチャイニーズハムスターにおける染色体異常誘発性の検討（2）
……吉田　誠二，青木　直人……289

天然食品添加物のAmes試験における変異原性（第2報）
……藤田　博，植松　洋子，平田　恵子，広門　雅子，安田　和男
青木　直人……291

p－ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類はラット遊離肝細胞において
ミトコンドリア機能障害による細胞毒性をおこす
……中川　好男，田山寿美子，鈴木　孝人，佐々木美枝子……297

全胚培養法を用いた天然添加物のマウス胚子に及ぼす影響（Ⅱ）ムラサキトウモロコシ色素
……小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，青木　直人，佐々木美枝子……302

単孔グリッドの電子顕微鏡観察への応用
……福森　信隆，青木　直人，佐々木美枝子……305

報文Ⅵ　公衆衛生情報に関する調査研究

酵素活性測定標準化の試み—東京都・特別区衛生検査機関における生化学精度管理調査より—
……大石　向江，池田　正幸，渡邊　泰男，菅野修一郎，諸角　聖
蓑輪　佳子，伊瀬　郁，神保　勝彦，田村　行弘……313

LDL-コレステロール値の検討と健康診断への応用について
……秋場　哲哉，渡邉　泰男，安部　昭子，磯貝スエ子，入倉　善久
前　潔，山田　澄夫，上木　隆人……317

日本における死亡特性の分析
……池田　一夫，上村　尚……321

地域における健康危機管理システム
……池田　一夫，神谷　信行，上村　　尚，佐々木美枝子……329

WWWサーバとデータベースの連携
……神谷　信行，池田　一夫，上村　　尚，佐々木美枝子……334

著書及び他誌発表……339
学会発表……349

CONTENTS

REPORTS I PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Enterotoxin, Serovar-Distribution and Drug-Resistance of Enterotoxigenic Escherichia coli Isolated from Oversea-Travelers' Diarrheal Cases (1996年～1997年)
……Y. Noguchi, S. Matsushita, Y. Yanagawa, S. Morozumi, H. Igarashi and T. Ito …… 3

Prevalence of Influenza in Tokyo (Nov. 1997～Feb. 1998)
……K. Yamazaki, M. Nagashima, Y. Sasaki, I. Hirata and H. Sekine…… 8

Detection of Small Round Structured Virus (SRSV) using RT-PCR Method during 1994-1998 Season in Tokyo
……Y. Sasaki, A. Nakamura, K. Monma, K. Mori, M. Nagashima, T. Shinkai, S. Sekine, K. Sadamasu, I. Hirata, H. Sekine and T. Itoh…… 12

Viral Gene Detection for Clinical Sample
……Y. Tabei, K. Sadamasu, Y. Yoshida, M. Hasegawa, Y. Sasaki, I. Hirata, H. Sekine…… 17

Concentration of Viruses From Aerosol Using Fibriform Cellulose
……K. Yano, M. Takeuchi and T. Maki…… 23

Subtype Analysis of HIV-1 Seropositive Patients by Peptide ELISA
……K. Sadamasu, K. Mori, S. Sekine, Y. Tabei, I.Hirata, H. Sekine, Y. Kokubu, A. Ajisawa and G. Masuda…… 29

Investigation of Immunofunction in Adenovirus-Infected Infants
…… K. Mori, K. Sadamasu, Y. Tabei, I. Hirata, and H. Sekine…… 33

Study on Examination Method of Listeria monocytogenes using Vitec Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS)
……T. Iida, M. Kanzaki, T. Miyazaki, and T. Maruyama…… 38

Evaluation of Detection Kit of P60 Protein Produced by Listeria monocytogenes.
……T. Iida, K. Hayashi, M. Kanzaki and T. Miyazaki…… 43

REPORTS II PAPERS ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Anti-Tumor-Promoting Principles in Asiasarum Root and the Evaluation on their Contents
……I. Yasuda, T. Hamano, J. Nakajima, N. Miyatake, T. Moriyasu, K. Kishimoto, K. Terajima K. Onishi, Y. Suzuki, T. Konoshima, M. Takasaki and H. Tokuda…… 49

Partial Purification of the Constituents of Jiou (Rehmannia glutinisa Liboschtz) causing DNA Damage, and Study on the Mechanism of Action
……K. Ushiyama, F. Nagai, T. Okubo, K. Satoh, I. Kano, I. Yasuda and T. Seto…… 55

Purification of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose from Moutan Cortex and its Inhibitory Mechanism of Na,K-ATPase Activity
……K. Satoh, I. Yasuda, F. Nagai, T. Seto, I. Kano…… 60

Survey of Harmful Substances in Crude Drugs (II) — COICIS SEMEN —
……M. Nakazato, S. Tabata, T. Nagayama, K. Kan, Y. Tateishi and K. Yasuda…… 65

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIX) Survey of Formaldehyde in Unregulated Household Necessities
……M. Miyakoda, H. Yamanobe, S. Uehara, T. Kan and T. Fujii…… 71

REPORTS III PAPERS ON FOOD HYGIENE

Determination of Propionic Acid in Foods by High Performance Liquid Chromatography
……Y. Tateishi, M. Nakazato, H. Ushiyama, C. Kobayashi, Y. Kawai, T. Moriyasu and K. Yasuda…… 77

Determination of Acrylamide Monomer in Unhulled Rice by High Performance Liquid Chromatography
……H. Ozawa, A. Ibe, S. Tabata, H. Miyakawa, Y. Sadamasu and K. Yasuda…… 84

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Fruits— Apr. 1997 ~ Mar. 1998 —
……M. Kobayashi, T. Nagayama, M. Ito, Y. Tamura, C. Takada, T. Hashimoto, N. Haneishi and K. Yasuda…… 88

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organophosphorus pesticides and organonitrogen pesticides) - Apr.1997.~Mar.1998. -
……Y. Tamura, T. Nagayama, M. Kobayashi, M. Ito, C. Takada, T. Hashimoto, N. Haneishi, and K. Yasuda…… 95

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organochlorine, N-methyl carbamate and the other pesticides) - Apr.1997.~Mar.1998. -
……M. Ito, T. Nagayama, M. Kobayashi, Y. Tamura, C. Takada, T. Hashimoto, N. Haneishi and K. Yasuda……101

Survey of Organotin Pesticides in Domestic Vegetables and Fruits
……N. Haneishi, T. Nagayama, M. Kobayashi, M. Ito, Y. Tamura, C. Takada, T. Hashimoto and . Yasuda……109

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (X VIII) Polychlorinated Biphenyls Concentrations of Fish and Shellfish
……T. Amemiya, H. Onozuka, K. Mizuishi, T. Fujii, K. Onishi and Y. Kokubo……114

Survey of Natural Dyes in Commercial Foods (II)
……T. Ogiwara, E. Amakawa, K. Kamata, K. Saito and S. Suzuki……120

Contents of Metals in Canned Foods
……J. Suzuki, K. Fujinuma, Y. Katsuki, K. Saito and K. Yasuda……129

Analysis of Catechins, Methylxanthines and L-Ascorbic Acid in Tea Leaves and Tea Drinks
……C. Kobayashi, M. Nakazato, Y. Yamajima, Y. Kawai, Y. Tateishi and K. Yasuda……135

Contents of Food Additive Components Used for Retention of Freshness in Raw and Frozen Fish
……M. Iguchi, N. Kikutani,N. Sakamaki, K. Monma, H. Ichikawa, H. Kaki, K. Kawashima, N. Abe and H. Kanai……144

Radioactive Contamination in Imported Foods(VII) — Apr.1995 ~ Mar.1998 —
……K. Kan, H. Ushiyama, T. Shindo and K. Yasuda……149

Estimation of Daily Intake of Dietary Fiber in the Last 11 Years Using National Nutrition Surveys
……Y. Saitoh, F. Ushio, K. Monma and H. Ichikawa……157

Contents of Heavy Metals and Arsenic in Natural Colour Preparations for Food Processing
……T. Yasuno, K. Ito, T. Hagiwara, M. Hirokado, K. Funayama, S. Suzuki and K. Saito……162

Determination and Confirmation of Natamycin in Imported Cheese
……K. Fujinuma, K. Takeba and T. Miyazaki……168

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (XV) — 1997 —
……H. Ushiyama, K. Kan, T. Shindo and K. Yasuda……172

REPORTS IV PAPERS ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

Determination of C_{60} Fullerene in Environmental Samples
……H. Seto, T. Ohkubo and M. Takeuchi……181

Chmical Chracteristics of Arsenic Compounds in Water
……J. Nakagawa, C. Nakagami and T. Maki……186

A Method for Determination of Sulfenamides in Water and Sediment
……T. Kowase, Y. Okamoto and T. Maki……191

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (XIII) Concentrations of Endocrine Disrupting Chemicals in Japanese Sea Bass and Gull from 1980s.
……I. Saito, H. Seto, T. Ohkubo and M. Takeuchi……196

Survey of Nitrate-Nitrogen in Groundwater in the North of Tama District,Tokyo
……H. Kondo, K. Yaguchi, T. Suzuki, M. Inaba, H. Konishi, T. Igarashi and S. Suzuki……203

Monitoring of Pesticides in Shallow Groundwater of Tama Region in Tokyo
…… T. Suzuki, M. Inaba, H. Kondo, K. Yaguchi and S. Suzuki……210

Environmental Radioactivity Level Survey in Tokyo by γ -Ray Spectrometry with Ge detector —Apr.1990 ~ Mar.1996—
……T. Sakamoto, H. Suzuki and T. Maki……218

Some Cases of Health Complaints related to Indoor Air Chemicals
……I. Saito, H. Seto and M. Takeuchi……225

Adjuvant Activity of Diesel Exhaust Particles in Production of Specific Antibodies to Fungi Allergen in Mice
……K. Ohyama, K. Taguchi and T. Suzuki
……232

Effect of Diesel Exhaust on Changes of Arterial Blood Gases and Broncho Alveoar Lavage Fluid of Rats
……M. Ohsawa, S. Ikeda, N. Watanabe, M. Takeuchi,
N. Keichoh, M. Fujisawa, K. Sanno and K. Mori ……237

REPORTS V PAPERS ON TOXICOLOGY

Subchronic Toxicity of Chlorpropham(CIPC) in F344 Rats
T. Fujitani, Y. Tada, A. Titose Noguchi and M. Yoneyama ……245

13-Week Feed Studies of Lac Colour in F344 Rats
Y. Sakamoto, Y. Tada, K. Tayama, A. Nagasawa, N. Fukumori, H. Mikuriya, N. Yano, K. Yuzawa, H. Takahashi, T. Ikeda, N. Aoki and M. Sasaki……255

Subchronic Toxicity Test of Natural Preservative, Milt Protein, in Rats by Dietary Administration
Y. Tada, T. Ikeda, H. Takahashi, N. Yano, K. Yuzawa, A. Nagasawa, Y. Sakamoto, N. Fukumori, H. Mikuriya K. Tayama, N. Aoki and M. Sasaki……267

Developmental Toxicity Study of Imazalil Administered to Mice in the Diet
T. Tanaka, O. Takahashi, and S. Oishi……277

Cytotoxic and Genotoxic Effects of Piperonyl butoxide in CHO-K1 Cells
S. Tayama and Y. Nakagawa……281

Cytogenetic Studies of Natural Food Additives in Chinese hamsters (2)
S. Yoshida and N. Aoki……289

Mutagenicity of Natural Food Additives in the Ames Salmonella/Microsome Test (II)
H. Fujita, Y. Uematsu, K. Hirata, M. Hirokado, K. Yasuda and N. Aoki……291

p-Hydroxybenzoate Alkylesters cause Cytotoxicity via Mitochondrial Dysfunction in Isolated Rat Hepatocytes
Y. Nakagawa, S. Tayama, T. Suzuki and M. Sasaki……297

Effects of Natural Food Additive on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method II. Purple corn Color
A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo, N. Aoki and M. Sasaki……302

Applications of Single Hole Grid for Electron Microscopic Observations
N. Fukumori, N. Aoki and M. Sasaki……305

REPORTS VI PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION

An Approach of the Evaluation of Serum Enzyme Analysis in External Quality Assessment of Inter-laboratories in Tokyo
H. Oishi, M. Ikeda, Y. Watanabe, S. Kanno, S. Morozumi K. Minowa, I. Ise, K. Jinbo and Y. Tamura……313

Estimation and Application to the Medical Examination of Low Density Lipoprotein Cholesterol
T. Akiba, Y. Watanabe, A. Abe, S. Isogai, Y. Irikura, K. Mae, S. Yamada and T. Ueki ……317

Studies on Charactaristics of Cause of Death in Japan
K. Ikeda and H. Kamimura……321

Risk Management System of Public Health in Prefectures
K. Ikeda, N. Kamiya, H. Kamimura and M. Sasaki……329

Developing Database for the World Wide Web
……N. Kamiya, K. Ikeda, H. Kamimura and M. Sasaki……334

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS ……339

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS ……349

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

医療技術の発達や環境衛生の改善など，科学技術の進歩や経済条件の向上などによって感染症は制圧・撲滅されると考えられた時代もあったが，近年，ＨＩＶによるエイズ，エボラなどのウイルス性出血熱，狂牛病，病原大腸菌O-157感染症など次々と新たなる感染症が出現し，感染症は公衆衛生学上の重要分野となってきている．このような状況にあって感染症に関する研究の重要性は増している．本章には９編の論文が掲載されており，うち６編はウイルスに関する論文で，他３編は細菌に関するものである．これらは疫学調査結果及び検査法の開発・応用の検討をまとめたものである．

疫学的なものとしては，1997年12月から1998年２月にかけて調査した東京都内のインフルエンザ検索成績と1996年及び1997年２年間の海外旅行下痢症患者からの毒素原性大腸菌の検索成績の報告があげられる．前者では集団カゼ31事例についてウイルス分離試験，ＰＣＲ法による遺伝子検査及び血清学的検査を実施した．その結果30事例がＡＨ３型ウイルスによるインフルエンザ，１事例がアデノウイルスによる集団カゼであることが確認された．また，ニワトリ赤血球に対する凝集能の不安定性はこの数年の傾向と変わらず，ウイルス分離試験では細胞継代培養法のみで分離され，発育鶏卵培養法からは１例も分離されず，流行株の生物学的性状の変化はさらに強まっている可能性を指摘している．後者においては，海外旅行下痢症患者ふん便試料471件中295件から病原菌が検出され，その約６割の182件から毒素原性大腸菌(ETEC)が検出されている．ETECを分析すると，その血清型はO25：Ｈ－，O169：H41，Ｏ６：H16などが主であり，毒素型では耐熱性エンテロトキシン産生株が約７割，易熱性エンテロトキシン産生株が１割強，両エンテロトキシン産生株が２割弱であった．これらETECの約半数が抗生物質耐性菌であり，その２／３が多剤耐性であり，耐性菌出現率の上昇傾向に今後注目していくべきであるとしている．

検査法の開発および応用に関してはウイルスに関するものが５つ，細菌に関するものが２つである．

小型球形ウイルス(SRSV)の検索におけるＲＴ－ＰＣＲ法の応用に関する論文では４年間の471事例，2,579件について，事例あたりの検出率，検査数あたりの検出率，従来の電子顕微鏡法との比較，事例あたりの適性検査数，適当なサンプル量等の項目について検討している．糞便試料１gを用いて２段階のＲＴ－ＰＣＲ法を行った場合，検査数あたりの検出率は50％前後で，電子顕微鏡法の20％弱に較べ明らかに高く，約70％の事例からSRSV遺伝子を検出することができ，また１事例あたり４件以上の試料を用いて検査を行えば約90％の事例からSRSV遺伝子を検出できることを示している．感染症発生動向調査の臨床検査試料へのＰＣＲ法によるウイルス検査の導入を検討した論文では単純疱疹ウイルス，EBウイルス，サイトメガロウイルス，帯状疱疹ウイルス，アデノウイルス，ムンプスウイルス，エンテロウイルス，麻疹ウイルスの８種類のウイルスについて実験条件を検討し，いずれのウイルスにおいても従来のウイルス分離試験よりも検出率，検査の迅速性において勝る結果を示している．

ウイルスは環境中に様々な形で存在しうるが，空気中のウイルスの回収法の基礎的条件を検討した試みでは，エアロゾルとともに飛散させたポリオウイルスをDEAEセルロースで捕集する条件を検討し，直径10cm，高さ30cmのカラムに0.03％以上の濃度でセルロースで懸濁させて，８Ｌ／分程度で曝気すると飛散ウイルスの80％以上を回収できるという結果を得ている．

免疫学的な方法によるウイルス感染症の解析の試みが２編あり，その一つのＨＩＶの抗体のサブタイピングに関する論文では，ＨＩＶの構成蛋白質のアミノ酸配列の一部を合成したペプチドを用いたELISA法により，抗ＨＩＶ－１抗体のサブタイプ分類が簡易かつ迅速に行えることを示した．もう１編のアデノウイルス感染と免疫

機能の関連を調査したものでは，アデノウイルス感染小児において，正常対照と比べ，免疫系において重要な働きをもつインターロイキン－２の産生低下とリンパ球の幼若化を観察している．

細菌の検査法についての２編の論文は*Listeria monocytogenesis*の検査について検討している．自動免疫蛍光測定装置(VIDAS)を用いた場合，増菌培地を工夫すれば菌の分離同定法と同程度の検出率が得られることを確認している．また，*L. monocytogenesis*が産生するp60 蛋白質を認識する抗体を用いたキットの検討では，やはり増菌培地の工夫と交差反応する黄色ブドウ球菌との鑑別が必要であることを示した．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 3-7, 1998

海外旅行下痢症患者からの毒素原性大腸菌の検出状況と分離株の産生毒素型，血清型及び薬剤感受性(1996年～1997年)

野口やよい*, 松下　秀*, 柳川義勢*, 諸角　聖*
五十嵐英夫*, 伊藤　武*

Enterotoxin, Serovar-Distribution and Drug-Resistance of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Oversea-Travelers' Diarrheal Cases(1996年～1997年)

YAYOI NOGUCHI*, SHIGERU MATSUSHITA*, YOSHITOKI YANAGAWA*,
SATOSHI MOROZUMI*, HIDEO IGARASHI* and TAKESHI ITO*

Keywords：毒素原性大腸菌 enterotoxigenic *Escherichia coli*, 血清型 serovar, 薬剤耐性 drug-resistance, 海外旅行者下痢症 oversea-travelers' diarrhea

緒　言

我が国では,年間1,600万人を超える人々が海外旅行に出かけている．これら海外旅行者によって持ち込まれる各種輸入感染症は防疫対策上重要な問題となっている．とくに，東南アジア地域からの海外旅行帰国者からは，近年国内では少なくなった赤痢菌やコレラ菌といった伝染病菌が検出される．そして,最も多く検出されるのは下痢原性大腸菌のうちの毒素原性大腸菌である[1]．

下痢原性大腸菌はその病原機序の違いから，病原血清型大腸菌(Enteropathogenic *E.coli*, EPEC)，毒素原性大腸菌(Enterotoxigenic *E.coli*, ETEC)，組織侵入性大腸菌(Enteroinvasive *E.coli*, EIEC),腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)の4グループに分類されている.EPECはその発症機序が明らかではないが，これまでの疫学調査などから病原性が疑われる特定の血清型に属するものであり[2]，ETECは易熱性エンテロトキシン(heat-labile enterotoxin, LT)と耐熱性エンテロトキシン(heat-stable enterotoxin, ST)と呼ばれる2種類の下痢原性毒素の両方あるいはその一方を産生し，水様性の下痢を起こす大腸菌である．EIECは腸管粘膜上皮細胞に侵入し，粘膜の破壊を伴う赤痢菌と同様な病原機構を持つ．また，EHECはVero毒素(vero toxin, VT)またはShigalike toxinとよばれる毒素を産生し，血便などの下痢症状を起こす．

下痢原性大腸菌は，特定の血清型との関連性があることがこれまでの調査により明らかにされている[3]．このことから，本菌のスクリーニングには市販の型別用診断血清が使用される場合が多い．著者らは，1976年から海外旅行者下痢症における各種腸管系病原菌を対象とした健康診断を実施し，この検査の中で，下痢原性大腸菌については従来からLT，ST，VTの産生性といった病原機序に主眼をおいた検査を実施し，これまでに本下痢症においてETECが重要な原因菌であることを報告してきた[1]．本報告では，1996年と1997年の2年間における海外帰国者下痢症の検査成績と主要検出菌であるETECの検出状況，分離株の産生毒素型，血清型及び薬剤耐性について報告する．

材料および方法

1．検査対象

1996年～1997年の2年間に海外旅行者下痢症の検査を目的として当研究科に搬入された検体のうち，検体採取時に下痢症状のあった下痢現症者のふん便，1996年225検体，1997年246検体の合計471検体を対象とした．

2．腸管系病原細菌の検査法

検査対象菌は，コレラ菌，ナグビブリオ，腸炎ビブリオ，ビブリオ・フルビアリス，ビブリオ・ミミカス，エロモナス，プレジオモナス，赤痢菌，チフス菌，パラチフス菌，サルモネラ，カンピロバクター，EPEC,

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

ETEC, EIEC, EHEC, 腸炎エルシニアとした.

上記対象菌を検索するために次の培地類を用いた. すなわち, 直接分離培養には, SS培地, DHL培地, TCBS培地, ビブリオ寒天培地, CT-SMACを用いた. カンピロバクターはCCDAに直接塗抹し, 37℃48時間微好気培養を行った. また, 増菌培養には, 2%食塩加アルカリペプトン水とセレナイト培地を用いた. エロモナスは2%食塩加アルカリペプトン水で37℃20時間増菌後, アンピシリン加緬羊血液寒天で分離培養を行った. 分離平板を37℃, 約20時間培養後, 出現した菌集落について常法[4,5]に従って確認培養などの同定操作を行った.

3. ETECの検査法

ふん便をDHL寒天培地上に直接塗抹し37℃20時間培養後, 発育した集落の中から大腸菌と疑われる5集落をTSI培地, LIM培地, 普通寒天斜面培地の3培地に接種し確認培養すると共に, 大腸菌毒素産生用培地であるCAYE培地[6]に接種し, 37℃20時間振とう培養を行った. 培養液は1mlにつき2,000単位の割合でポリミキシンBを加え, 37℃1時間置いた後, 12,000rpm10分間遠心分離後, その上清を毒素試験に供した. LTの検出はセロトキシンLT(栄研化学)で, STの検出にはコリストEIA(デンカ生研)を用いたELISA法と乳のみマウス胃内接種法[7]を併用した. なお, 培養上清はVT検出キット(デンカ生研)を用いた逆受身ラテックス凝集反応によるVT検出にも供した.

分離菌の血清型別は, 市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)と自家調製した大腸菌免疫血清を用いて行った.

4. 薬剤感受性試験法

分離菌株の薬剤感受性試験はセンシディスク(BBL)を用いてKB法で行った. 供試した薬剤はクロラムフェニコール(CP), テトラサイクリン(TC), ストレプトマイシン(SM), カナマイシン(KM), アンピシリン(ABPC), スルファメタゾール・トリメトプリム合剤(ST), ナリジクス酸(NA), ホスホマイシン(FOM), ノルフロキサシン(NFX)の9薬剤である.

成　績

1. 海外旅行下痢現症者における病原菌検出状況

今回の調査対象とした下痢現症者471検体からの病原菌検出状況を表1に示した. 1996年には225件中141件(62.7%), 1997年246件中154件(62.6%), 合計471検体中295件から何らかの病原菌が検出され, 陽性率は62.6%であった. 検出病原菌は, 1996年10種, 1997年12種であり, 両年にわたって最も多く検出されたのはETECで陽性検体は182件と圧倒的に多く, 検査件数の38.6%, 病原菌陽性件数の61.7%を占めた. その他の病原菌で検出数の多かったものはエロモナス48件, プレジオモナス45件, カンピロバクター37件, サルモネラ36件であった. また, 伝染病菌検出例は赤痢菌22例, コレラ菌10例であった. また, EHEC O157が1997年に1件検出された. 赤痢菌が検出された事例のうち1例は, 約3ヶ月間にわたってタイとネパールを旅行し, 帰国後, フレキシネル1a, 1b, 2a, 3aの4菌型及びカンピロバクターが同時に検出された事例であった. 検出コレラ菌の10例はいづれもエルトール小川型で毒素産生性(+)であった.

表1. 海外旅行者の下痢症現症者における腸管系病原菌検出状況

年　次	1996年	1997年	合計
検査件数	225	246	471
病原菌陽性者数	141	154	295
(%)	(62.7)	(62.6)	(62.6)
毒素原性大腸菌	85	97	182
エロモナス	20	28	48
プレジオモナス	30	15	45
カンピロバクター	22	15	37
サルモネラ	21	15	36
赤痢菌	9	13	22
病原血清型大腸菌	6	9	15
腸炎ビブリオ	7	8	15
コレラ菌	2	8	10
ナグビブリオ	2	3	5
組織侵入性大腸菌	−	1	1
腸管出血性大腸菌	−	1	1

同一検体から複数菌種が検出された例があるので病原菌陽性者数と検出病原菌数とは一致しない

2. ETEC検出状況

ETEC陽性例182件のうち113件(62.1%)はETECのみが検出された症例であったが, 残り69件からは複数の病原菌が同時に検出された. この複数菌種検出例の内訳を表2に示した. 2菌種検出例が57件, 3菌種検出例が10件, 4菌種検出例が2件であった. 2菌種検出例ではエロモナス, プレジオモナス, カンピロバクターとの検出例が多く, 3菌種検出例ではサルモネラとエロモナス, カンピロバクターとプレジオモナスの検出例が半数をしめた. また, ETECとEPECの同時検出例は8件, ETECとEIECおよびETECとEHECの同時検出例はそれぞれ1件ずつであった. また表には示していないが,血清型の異なる複数のETECを検出した例は13件あり, そのうち3件からは3つの異なる血清型〔O6(ST/LT), O8(ST), O148(ST/LT); O114(LT), O148(ST), O169(ST); O

表2．毒素原性大腸菌と他の病原菌との同時検出例

2菌種検出例	57
ETEC, エロモナス(Aero)	16
ETEC, プレジオモナス(Ples)	13
ETEC, カンピロバクター(Camp)	9
ETEC, EPEC	7
ETEC, サルモネラ(Salm)	6
ETEC, 赤痢菌(Shig)	2
ETEC, ナグビブリオ(Nagv)	2
ETEC, EIEC	1
ETEC, 腸炎ビブリオ(Vpar)	1
3菌種検出例	10
ETEC, Salm, Aero	3
ETEC, Camp, Ples	2
ETEC, EHEC, Aero	1
ETEC, Nagv, Vpar	1
ETEC, Camp, Aero	1
ETEC, Shig, Camp	1
ETEC, Aero, Ples	1
4菌種検出例	2
ETEC, EPEC, Aero, Ples	1
ETEC, Ples, Aero, Salm	1

8(ST/LT), O153(ST), O169(ST)〕であるETECが検出された．

次に，ETECが検出された事例のうち，渡航国が1カ国であった158例について，その旅行国別に検出菌の産生毒素型と併せて表3に示した．渡航先をみると，アジア全域のみならず，アフリカ，中南米におよんでいた．

表3．毒素原性大腸菌陽性者の渡航国

渡航国	渡航者数*	陽性者数(%)	菌株数		
			ST	ST/LT	LT
インドネシア	120	60(50%)	43	10	8
タイ	88	37(42%)	34	3	2
インド	61	23(38%)	13	10	3
フィリピン	33	11(33%)	10	1	1
ネパール	10	4(40%)	3	1	1
ベトナム	13	4(34%)	3	1	
中国	7	3(43%)	3		
台湾	6	3(50%)	2	1	
エジプト	4	2(50%)	2		
カンボジア	2	2(100%)	1	2	1
マレーシア	4	2(50%)	2		
メキシコ	4	2(50%)	3		
その他の国	33	5(15%)	3	2	2
合計	385	158(41%)	122	31	18

複数のことなる産生毒素や血清型を同時に検出した例があるので陽性者数と菌株数は一致しない
*渡航国が1カ国の者に限る

ETECはインドネシア旅行者から120件中60件,陽性率も50%と最も多く検出され，次いでタイ88件中37件(42%), インド61件中23件(38%)から検出された．

3．ETECの産生毒素型及び血清型

検出されたETEC198株の産生毒素型及び血清型を表4に示した．分離されたETEC全体について産生毒素型をみると,ST単独産生株が139株(70.2%)と圧倒的に多く，ST/LT両産生株は36株(18.2%)，LT単独産生株は23株(11.6%)であった．O血清型はOUTを含めて23血清型に型

表4．海外旅行者下痢症例由来毒素原性大腸菌の産生毒素型と血清型(1996年～1997年)

血清型	菌株数			
	ST	ST/LT	LT	計
O2:H41	1			1
O6:H−	1	5		6
:H10	1			1
:H16	8	15		23
:H49	1	3		4
O8:H2	1			1
:H9		1	1	2
:H11	1			1
:H33		1		1
O15:H10	1			1
O16:H21			1	1
:H30			1	1
O17:H18		1		1
O25:H−	43		7	50
:H4			1	1
:H12	1			1
:H31		1		1
:H42	3	1		4
:HUT*			1	1
O27:H7	15			15
:H20	1			1
O64:H5			1	1
O78:H12		1		1
O85:H7		1		1
O114:H49			1	1
O115:HUT	1			1
O126:H−	1			1
:H12	6			6
O128:H12	2	1		3
:HUT	1			1
O146:H16		2		2
O148:H16		1		1
:H28	8	1		9
:H49	1			1
O151:H−			1	1
O153:H45	2			2
:HUT	1			1
O159:H7	1		1	1
:H34	2			2
:HUT			2	2
O168:H16			1	1
O169:H−	2			2
:H41	29			29
:HUT	1			1
OUT:H−	1		1	2
:H10		1	1	2
:H45	2		1	3
:HUT			1	1
合　計	139 (70.2%)	36 (18.2%)	23 (11.6%)	198 (100%)

*UT：型別できず

別され，H血清型と組み合わせると，48種類に型別された．

最も多く検出された血清型はO25:H－で50株,その産生毒素型はST単独産生株が43株，LT単独産生株が７株であった．次いでO169:H41が29株で,すべてST単独産生株であった．O6:H16は23株検出され，そのうち15株がST/LT両産生株であり,残りはST単独産生株８株で，LT単独産生株は認めなかった．O27:H7は，15株であったがすべてST単独産生株であった．O148:H28は，８株がST単独産生株で，１株だけSTとLT両毒素を産生した．また，EPECの血清型と言われているO126，O128，O146にそれぞれ７株，４株，２株，合計13株が型別された．うち10株はST単独産生株，３株はST/LT両産生株であった．また，市販血清及び当研究所で調製した型別血清のいずれにも該当しない株が８株(４%)検出された．

４．ETECの薬剤感受性

表５に今回分離したETECの薬剤感受性パターンを示した．供試した９薬剤のうち，いずれか１薬剤以上に耐性を示したのは96株(48.5%)であった．単剤耐性菌は，31株で残り65株(32.8%)が多剤耐性菌であった．多剤耐性菌のうち２薬剤耐性菌は16株で８パターンであった．３薬剤耐性菌は25株５パターンであり，４薬剤耐性菌は14株4パターンで，５薬剤耐性菌は８株２パターンであった．６薬剤耐性菌も２株あり，それぞれのパターンを示した．６薬剤に耐性のあった菌株の由来国はどちらもインドであった．最も多かった耐性パターンは，TC単剤耐性菌23株(11.6%)で，次いで，SM，ABPC，STの３剤耐性13株，TC，SM，ABPC，STの４剤耐性10株であった．

表５．海外旅行者下痢症例由来毒素原性大腸菌の産生毒素型別薬剤耐性パターン

薬剤パターン	菌株数 ST	ST/LT	LT	計
TC	21	2		23
SM	1	1		2
AP	4		1	5
ST	1			1
CP,TC	1			1
CP,SM	1			1
CP,AP	1			1
TC,SM	2		1	3
TC,AP	5			5
TC,ST			1	1
AP,ST		2		2
SM,ST	2			2
CP,TC,SM	2			2
TC,SM,AP	5			5
TC,SM,ST	1		1	2
TC,AP,ST	1		2	3
SM,AP,ST	7	1	5	13
CP,SM,AP,ST	1			1
TC,SM,AP,ST	5	2	3	10
TC,SM,KM,ST	1			1
SM,AP,ST,NA	1	1		2
CP,TC,SM,AP,ST	5	1		6
TC,SM,AP,ST,NA		2		2
CP,TC,SM,AP,ST,NA	1			1
TC,SM,AP,ST,NA,FM			1	1
合計	69	12	15	96

CP：クロラムフェニコール，TC：テトラサイクリン，SM：ストレプトマイシン，KM：カナマイシン，AP：アンピシリン，ST：スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤，NA：ナリジクス酸，FM：ホスホマイシン

考　察

我が国において1996年にEHEC O157の大流行があってから大腸菌下痢症を含めた腸管感染症に関心が高まっている．海外旅行者下痢症からはこれまでEHECは検出されていなかったが，今回の調査において初めてVT1/VT2両産生のO157:H7が１例検出された．また，今回赤痢菌陽性例の一例では，同一患者から赤痢菌４菌型とカンピロバクターが同時に検出された特異な例も見られた．なお，その他の菌分離頻度に大きな変化は認められず，これまでの成績と同様であった．

検出されたETECの産生毒素型をみると，ST産生性の株が一番多かった．血清型では，O6:H16，O25:H－，O27:H7，O148:H28の血清型を多く検出したことは，これまでの報告[8,9]とほぼ同様であった．一方，これまでの報告ではみられていないO169:H41，ST単独産生株が高頻度で検出されたこと，さらに，これまでLT単独産生株が多いと報告されているO25:H－が，今回の調査ではST単独産生の株の方が多く検出されている点も注目される．また,O2，O16，O64，O85など，これまでETECとして報告されたことのない血清型が少数ではあるが検出された．検出されたETEC198株中13株(6.6%)は，血清学的にはEPECの範ちゅうに属する血清型であることから，EPECの血清型に型別されても毒素産生性を調べる必要があると示唆するものと考える．

近年、多剤耐性ブドウ球菌をはじめとして各種抗生物質耐性の病原菌の増加が注目されている．今回検出したETECにおいても，供試したいずれかの薬剤に対する耐性菌が48.5%検出され，しかもそのうち67.7%が多剤耐性菌であったこと，さらに，以前の調査報告[8]よりもその出現率が高くなっていることを考慮すれば,今後ますます耐性化が進んでいくものと危惧された．

以前からインドネシア，タイ，インド，フィリピンへの旅行者においてETECの検出率が高いことが報告されている[1,10,11]が,今回の成績でも同様であった．また，インド旅行者ではST/LT両産生菌の検出率が他の国に比べて高い傾向が見られた．これらの地域への旅行者では、赤痢やコレラに感染した例も多く，現地における水や飲

食物の摂取には引き続き厳重な注意を払う必要のあることを示したものと言えよう。

文　献

1）松下　秀，工藤泰雄：臨床検査，**36**，843-848，1992.

2）Edelman R.,Levine M.M.:*J.Infect.*, **147**，1108-1118，1983.

3）松下　秀，工藤泰雄：臨床検査，**33**，1226-1229，1989.

4）厚生省監修:微生物検査必携，第3版，1987，日本公衆衛生協会，東京.

5）善養寺浩,坂井千三,寺山　武，他：腸管病原菌の検査法,第4版，1985，医学書院,東京.

6）Evans,D.J.Jr.,D.G.Evans,S.L.Grbach:*Infect. Immun.*, **8**，725-730，1973.

7）Dean,A.G.,Y-C.Ching,R.G.Williams,*et al*:*J. Infect. Dis.*, **125**，407-411，1972.

8）工藤泰雄，松下　秀，大橋　誠：日本の感染性腸炎，291-299，1986，菜根出版，東京.

9）塚本定三：臨床と微生物，**15**，11-16，1988.

10）工藤泰雄，山田澄夫：日本の感染性腸炎Ⅱ，99-104，1997，菜根出版，東京.

11）松下　秀：総合臨床，**46**，1613-1615，1997.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 8-11, 1998

東京都内のインフルエンザ検索成績 (1997年12月～1998年2月)

山崎　清*, 長島真美*, 佐々木由紀子*,
平田一郎*, 関根大正*

Prevalence of Influenza in Tokyo (Nov. 1997～Feb. 1998)

KIYOSHI YAMAZAKI*, MAMI NAGASHIMA*, YUKIKO SASAKI*,
ICHIRO HIRATA* 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

近年のインフルエンザの流行は，AH1型（Aソ連型）ウイルス及びAH3型（A香港型）ウイルス及びB型ウイルスによる単一型あるいはこれら三型ウイルスによる混在流行が多く認められている[1-4]．

東京都においても毎年，冬季になるとインフルエンザによる集団かぜが発生し，学級閉鎖あるいは学年閉鎖等の措置がとられている．1993年から1997年の流行は全国的には主流はAH3型ウイルスであったことが確認されているが，これにAH1型ウイルスあるいはB型ウイルスが加わった混在型であった[5-7]．

本報では，1997年12月から1998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　1997年12月上旬から1998年2月上旬までの間に，集団かぜのため学級閉鎖等の措置がとられた都内の小，中学校の計31集団137名（1集団3～5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137例について，図1に示す方法に準じ発育鶏卵培養法及び細胞継代培養法を行った．

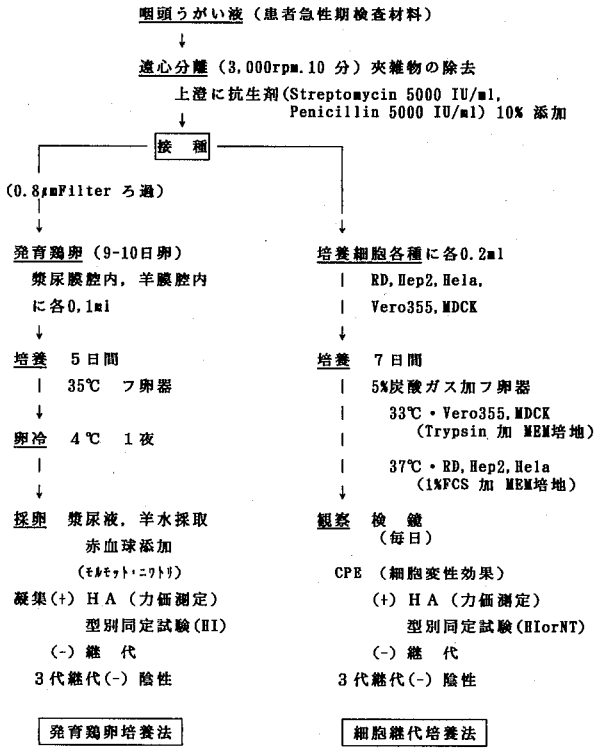


図1．発育鶏卵及び培養細胞によるウイルス分離試験

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

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

(−) 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各種培養細胞（RD，Hep2，Hela，Vero355，MDCK）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（NT）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．

表1．1997～1998年冬季、東京都における集団かぜ患者の病因検索

発生年月旬	検索対象集団例数	診断結果			
		インフルエンザウイルス			アデノウイルス
		AH1型	AH3型	B型	
1997.12 上旬	1				1
中旬	1		1		
1998. 1 中旬	24		20(4)		
下旬	3		3		
2 上旬	2		2		
計	31		26(4)		1

( )内はPCR法及び血清学的試験により確認された集団事例数

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/北　京/262/95
AH3型：A/武　漢/359/95
　　A/東　京/ 73/97
B　型：B/三　重/ 1/93
　　B/広　東/ 05/94

なお，A／東京／73／97は今期に発生した集団事例から分離した株であり，他の4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，血清学的試験は概報7)に示した検査術式に従って実施した．

成績と考察

1．患者咽頭うがい液からの病因検索

今冬季のインフルエンザ様疾患による集団例は，1997年12月上旬に町田保健所管内の小学校で発生した事例が初発で，それ以降中旬に1集団，1998年1月27集団，2月2集団の合計31集団例であった．今季搬入された集団例の患者の症状は，発熱（37.6～41.0℃），せき，頭痛，咽頭痛，筋肉・関節痛等であったが，特にこれら患者の発熱は例年（38.5～39.3℃）に比べ平均38.9～39.8℃と高いものであった．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，26集団例（患者118名中62名）からインフルエンザAH3型ウイルスを分離した．また，ウイルス分離試験は陰性であったが，PCR法及び血清学的試験の結果，AH3型ウイルスによる感染と診断された集団例が4例（1998年1月中旬）認められ，AH3型ウイルスによる事例は合計30集団例が確認された．

この他，1997年12月上旬の1集団例では，患者5名のうち4名からはアデノウイルスが検出された．また，PCR法では患者全員からアデノウイルスが検出された．患者ペア血清による血清学的試験では，同ウイルスに対する32倍以上の抗体価の有意上昇を確認した．

以上の結果からインフルエンザウイルスによる事例は31集団例中合計30集団例で，このうちAH3型ウイルスによるもの30事例，アデノウイルスによる集団例は1事例であった．

2．インフルエンザウイルス分離患者血清のＨＩ試験成績

インフルエンザウイルスが分離されAH3型ウイルスと型別同定された患者のうち，ペア血清が得られた55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／武漢／359／95，今期分離ウイルス株：A／東京／73／97のいずれの抗原株に対して4倍から64倍以上の抗体価の有意上昇が認められた．また，表中＄で示した5例は，AH1型ワクチン株：A／北京／262/95に対して4倍から16倍の抗体価の有意上昇が認められた．これら5例は，いずれも1月中旬に発生した4集団例の中の患者で，この時期に都内ではAH1型も散発的に流行していたことが推察された．なお，B／三重／ 1／93及びB／広東／05／94に対しての抗体価の有意上昇例は1例も認められなかった．

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．前者の発育鶏卵培養法によるAH3型ウイルスの分離

表2．インフルエンザウイルス検出患者由来血清55例のHI試験成績

A/武　漢/359/95(AH3)

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*												
	1												
急	2								1+/	1			2
	3									3			3
性	4										2	9	11
	5								2		2	14	18
期	6										2	6	8
	7									1		5	6
	8											4	4
	9											2	2
	>10											1	1
	計								3	5	6	41	55

A/東　京/ 73 /97(AH3)

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*												
	1												
急	2											1	1
	3									1			1
性	4									1	3	4	8
	5								1		3	17	21
期	6										2	12	14
	7											7	7
	8											2	2
	9												
	>10											1	1
	計								1	2	8	44	55

B/三　重/ 1 /93

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*	2											2
	1		2										2
急	2			4									4
	3				7	1							8
性	4					12							12
	5						17						17
期	6							8					8
	7								1				1
	8									1			1
	計	2	2	4	7	13	17	8	1	1			55

B/広　東/ 05 /94

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*	45											45
	1		2										2
急	2			4									4
	3				2								2
性	4					2							2
	5												
期	6												
	7												
	8												
	計	45	2	4	2	2							55

A/北　京/262/95(AH1)

		回復期										
		<1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	>10	計
	<1*	1											1
	1		1										1
急	2			1									1
	3				3	1							4
性	4					8		1$					9
	5						17	2	2$		1$		23
期	6							6	1				7
	7								6				6
	8									1		1$	2
	9												
	>10											2	2
	計	1	1	1	3	9	17	9	9	1	1	3	55

＊：8×2^n（抗体価）＋：例数　$：AH3型ウイルス分離患者

は困難になりつつあることを前年度に報告[8]したが，今季は1集団例からも検出されなかった．ここ数年，AH3型ウイルスのみならずAH1型あるいはB型ウイルスも発育鶏卵でのウイルスの分離は低下している．また，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と等から，今季流行株が変異しこれまでの株と生物学的性状を異にしている可能性の高いことが示唆された．

従来，ウイルス分離は陰性でしかも，急性期・回復期血清が採取できず血清学的な診断も不可能で病因診断不明例となった集団例についてもPCR法での迅速な型別診断が可能となり，病因不明の集団例数が減少し，今期は31集団のうち30集団からAH3型ウイルスを検出した．また，1集団からはアデノウイルスを検出し，血清学的試験と全く一致する成績で，全例病因は判明した．

都内におけるインフルエンザ様疾患による集団発生は，例年11月から徐々に発生し12月にピークとなり，翌年1月下旬から2月中旬にかけ二度目のピークを迎え3月頃にかけて減少し緩やかな曲線を描き二峰性と成るのであるが，今期は1月中旬に集団例が87.1％（27／31）

と集中し鋭い一峰性となった.

東京都結核・感染症サーベイランス情報[9]による今冬季の都内におけるインフルエンザ様疾患患者の発生状況は，1997年12月下旬から1998年1月中旬にかけて1定点あたり（人）1.11，0.50，1.13，2.53と患者数の増加が，見られ，下旬には17.37，43.96と患者数は急増し2月上旬に47.82となりピークを迎えた．その後，2月中旬から3月上旬にかけ27.6，12.32，4.87，1.87と徐々に患者数は減少しインフルエンザの流行は終息した.

以上のごとく東京都における今冬季の集団かぜの流行は1997年12月上旬～1998年2月中旬までで，インフルエンザAH3型ウイルスによる単独流行と推測された．しかし，表2に示すごとくAH1型に対しての抗体価の有意上昇例も認められ，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，厚生省保健医療局結核感染症課のインフルエンザ様疾患発生報告[10]によれば，東京都における集団発生は（ ）内の前年同期に比べ，学級閉鎖学校数は1,227校(884校)，患者数は143,450人（昨年23,715人）と閉鎖学校数は1.39倍であったが，患者数は6.05倍に増加した．また，全国における学年閉鎖学校数は5,990校(2,002校)，学級閉鎖学校数は16,832校（5,883校），患者数は1,274,487人(306,614人)と昨年の4.16倍の発生数であり，今季の流行規模は前季のそれに比べ大きなものであったことをうかがわせた.

他方，厚生省の調査による1997/1998インフルエンザ流行情報[11]による初発は1997年10月中旬に滋賀県で，11月上旬に北海道及び和歌山県，中旬から下旬にかけて広島県，大阪市，京都市，埼玉県にてそれぞれ集団発生の報告があり，以後，全国から発生の報告が相次いだ．今季インフルエンザウイルス検出の報告は埼玉県（集団)，岡山県（定点)，奈良県（集団）からのもので，AH3(A香港）型ウイルス検出の報告がなされた．その後，集団例では1997年11月下旬から12月上旬にかけて1都1府5県で相次いでAH3型ウイルスが確認された．また，B型ウイルスは1998年1月中旬長野県の定点観測例から，集団例では1998年1月中旬に滋賀県，2月上旬山形県においてB型ウイルスが検出された．また，AH1型ウイルス検出の報告例は1998年1月中旬に福岡県の定点観測例から，集団例では1998年3月上旬までに熊本県での1例のみであった．なお，7月上旬までの間にAH3型ウイルスによる集団例は沖縄県を除く全国で発生したのに対し，B型ウイルスによる集団例は山形県及び滋賀県の2例のみと少ないものであった.

以上のことから，全国的なインフルエンザの流行は1997年11月上旬から1998年1月にかけてAH3型ウイルスによる流行が始まり，それに同調して患者数の増加が見られ，中旬にはピークを迎え流行の形態は一峰性となった．以後，患者数は暫時減少しインフルエンザの流行は終息すると思われたが，1998年3月中旬頃からそれまで散発的に発生していたB型ウイルス（同時期全国での検出株数29株）の検出報告例数が徐々に増加し，7月までには124株となりB型ウイルスの散発流行が確認された．また，今期の全国におけるインフルエンザの流行形態は，AH3型，AH1型，AH3型＋B型，AH3型＋AH1型，AH3型＋AH1型＋B型と5形態を示したが，沖縄県を除きいずれもAH3型ウイルスが主体であった.

なお，全国でのウイルス検出株数はAH1型12株，AH3型6,013株，B型124株の計6,149株であった.

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）山崎　清，伊藤忠彦，関根整治，他：東京衛研年報，**47**，3-7，1996

8）山崎　清，長島真美，貞升健志，他：東京衛研年報，**48**，18-22，1997

9）東京都結核・感染症サーベイランス委員会：1997年第52週，1998年第1週～第10週

10）厚生省保健医療局エイズ結核感染症課：インフルエンザ様疾患発生報告（第20報)，1998

11）国立感染症研究所内WHOインフルエンザ・呼吸器ウイルス協力センター：97/98 インフルエンザシーズン流行情報(12/15/97～7/8/98)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 12-16, 1998

東京都における小型球形ウイルスのRT－PCR法による検査成績

佐々木 由紀子*, 中 村 敦 子*, 門 間 公 夫*, 森 功 次*,
長 島 真 美*, 新 開 敬 行*, 貞 升 健 志*, 関 根 整 治*,
平 田 一 郎**, 関 根 大 正*, 伊 藤 武**

Detection of Small Round Structured Virus (SRSV) Using RT-PCR Method during 1994-1998 Season in Tokyo

YUKIKO SASAKI*, ATUKO NAKAMURA*, KIMIO MONMA*,
KOHJI MORI*, MAMI NAGASHIMA*, TAKAYUKI SHINKAI*,
SEIJI SEKINE*, KENNJI SADAMASU*, ICHIRO HIRATA**,
HIROMASA SEKINE* and TAKESHI ITOH**

Keywords：ウイルス性胃腸炎 viral gastoroenteritis，小型球形ウイルス Small Round Structured Virus (SRSV), RT-PCR検査 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Method

緒　　言

SRSVは冬季に胃腸炎を引き起こす代表的なウイルスで，食品，特にカキなどの貝類の喫食との因果関係が考えられており，わが国では1997年５月，食中毒の原因物質として取り扱うことになった[1]．SRSVの検査法は，これまで電子顕微鏡による直接観察が主流であったが，機器の取扱いに熟練を要すること，ウイルスの量が微量であるため検出に時間がかかることなどから，一般的な検査法とはなっていない．食中毒の原因物質の検索は，行政対策を適正に行うために出来るだけ迅速に行なわれなければならないことより，電子顕微鏡観察に代わるSRSV検査法が求められている．

ウイルスの遺伝子の増幅反応を用いたPCR検査は，現在，臨床検査領域において，微量のウイルスの検出に欠かせないものとなっている．SRSVの遺伝子検出は，主にRNAポリメラーゼの領域を標的にして実施されており，SRSVは一本鎖のプラス鎖RNAウイルスであることから，RNAの逆転写反応でcDNAを合成してから増幅反応を行う．1994年からの２年間に亘る東京都のSRSV検査法においてこのRT－PCR法を試行した結果，高い検出率を挙げることが出来ることが知られた[2]．

今回，1994年４月から1998年３月に東京都内で発生したSRSV性胃腸炎集団事例について，RT－PCR法による検出を，従来のSRSV検査法である電子顕微鏡観察と平行して行い，結果を比較した．同時に，SRSVのRNA抽出方法，RT－PCR法の最適条件を検討した．

検査材料および方法

材料

1994年４月から1998年３月までに，東京都衛生局に報告された食中毒事件ならびに有症苦情のうち，発病者の糞便でSRSV検索に必要な量が得られたものを検査材料とした．発病の有無，事例の概略等は各保健所の調査結果報告書に基づいた．

PCR検査のための材料の作成は，既報に従った[3]．すなわち，試料にPBS（－）を加えて，10％乳剤液を調製した後，フルオロカーボン（1996年度からは代替フロンを使用）と遠心法で粗精製した画分を用いた．

RT－PCR法

粗精製画分１mlからのRNA調製は既報の通りである[3]．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，界面活性剤としてCTAB（Cetyl-trimethyl-ammonium-bromide：Sigma)を用いた．除タンパク処理を完全に行う目的で、フェノール・クロロフォルム抽出は２回行った．

＊東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊ The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakuninchо, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊東京都立衛生研究所微生物部

VIRUS CONCENTRATION

STOOL SAMPLE 1g
PBS(-) 10ml
↓ Vortex
↓ Fluorocarbon 10ml
↓ Vortex
↓ 2,500rpm, 10min, 4 ℃
sup 9ml
↓ 6000rpm, 30min, 4℃
sup 8ml
↓ PEG(final 8%)
↓ NaCl(final 0.4M)
↓ 12,000rpm, 30min, 4℃
ppt
↓ ddw 0.2ml

RNA EXTRACTION

0.1ml soln of PEG ppr
↓ ProteinaseK/SDS treatment
↓ CTAB treatment
↓ Phenol/Chloroform extraction (eq. vol)
↓ Phenol/Chloroform extraction (×0.1 vol)
↓ Isopropanol precipitation
RNA
↓ ddw 0.008ml

RT-PCR METHOD

0.004ml of extracted RNA
↓ Reverse transcription (primer:NV35/NV35A/NV35C)
↓ 1st PCR (primer:NV36)
↓ 2nd PCR (primer:NV3/NV51/NV81/NV82/SM82)

SEQUENCES OF PRIMERS

NV35 5′-CTTGTTGGTTTGAGGCCATAT-3′
NV35A 5′-CTTGTTGGTTTGAGGCCATAA-3′
NV35C 5′-CTTGTTGGTTTGAGGCCATA-3′
NV36 5′-ATAAAAGTTGGCATGAACA-3′
NV3 5′-GCACCATCTGAGATGGATGT-3′
NV51 5′-GTTGACACAATCTCATCATC-3′
NV81 5′-ACAATCTCATCATCACCATA-3′
NV82 5′-TCATTTTGATGCAGATTA-3′
SM82 5′-CCACTATGATGCAGATTA-3′

Fig. 1. Process of RT-PCR of SRSV

RT－PCR法は既報による方法[4]で反応液を調製した．すなわち，SRSVのRT－PCR法は，200μM－dNTPs（ファルマシア），0.15μM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分解酵素阻害剤（東洋紡）を含む逆転写酵素用緩衝液25μlに、調製したRNAを5μl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，0.15μM上流プライマーを加え、アニール温度50℃，35サイクル数で1段階目のPCR産物を得た．2段階目のPCR反応は，1段階目のPCR産物3μlを用いて，1段階目のPCR反応と同様の条件で行った（Fig.1）．PCR用のプライマーの塩基配列はFig.1に示したとおりである[4]．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．

結　果

1）SRSV性胃腸炎集団発生事例の月別発生状況

RT－PCR法によるSRSV検査は1994年より部分的に導入を開始したが，検出率の推移をTable 1に示した．導入前4年間の平均検出率は52％であったが，導入後は68.2％となった．1996年度に一時的に検出率が低下したが，この時期は、RT－PCR法の条件検討期間中であり，さらに検査数の急増によって検出率の低下がもたらされたと考えられる．RT－PCR法の導入は検出率を70％以上とすることが可能と考えられる．

2）RT－PCR法と電子顕微鏡観察結果との比較

1994年4月から1998年3月の4年間の，電子顕微鏡観察による検出結果とRT－PCR法による検出結果を，Table 2に示した．事例件数で比較すると，電子顕微鏡観察では平均43％，RT－PCR法では平均68％と，RT－PCR法が優位であった．検査数での比較では，電子顕微鏡観察の平均19.5％，RT－PCR法は46.5％であった．なお，一事件当たりに換算すると，電子顕微鏡観察では平均4.7検査数で，陽性は一事件当たり平均2.1件であり，RT－PCR法では，一事件当たり平均5.3検査数で，陽性

表1．ＳＲＳＶ検出数の年次変化

	検査期間	陽性事例／検査事例	検出率	平均
RT-PCR 導入前	1990.4～1991.3	33/53	62.3%	52.0%
	1991.4～1992.3	24/51	47.1%	
	1992.4～1993.3	26/41	63.4%	
	1993.4～1994.3	59/128	46.1%	
RT-PCR 導入後	1994.4～1995.3	76/87	87.4%	68.2%
	1995.4～1996.3	74/101	73.3%	
	1996.4～1997.3	97/183	53.0%	
	1997.4～1998.3	77/104	74.0%	

表2．ＲＴ－ＰＣＲ法と電子顕微鏡観察法の検出率の比較

検査期間	事例数あたり		検査数あたり	
	EM*	PCR**	EM	PCR
	陽性事例/検査事例	陽性事例/検査事例	陽性数/検査数	陽性数/検査数
1994.4～1995.3	43/82 (52.4%)	74/87 (85.1%)	91/412 (22.1%)	282/557 (50.6%)
1995.4～1996.3	49/101 (48.5%)	73/97 (75.3%)	92/544 (16.9%)	311/595 (52.3%)
1996.4～1997.3	21/76 (41.5%)	92/183 (50.3%)	55/215 (25.6%)	262/741 (35.4%)
1997.4～1998.3	27/64 (42.2%)	77/104 (74.0%)	55/331 (16.6%)	345/686 (50.3%)
合計	140/323 (43.3%)	316/471 (67.9%)	293/1502 (19.5%)	1200/2579 (46.5%)

EM*：電子顕微鏡観察法

PCR**：RT-PCR法

表3．一事例中の検査数による検出率の比較

a)．4件以上の事例の検査結果

検査期間	EM	PCR	EM	PCR
	陽性事例/検査事例	陽性事例/検査事例	陽性数/検査数	陽性数/検査数
1994.4～1995.3	24/34 (70.6%)	35/36 (97.2%)	68/329 (20.7%)	225/462 (48.7%)
1995.4～1996.3	34/50 (68.0%)	45/47 (95.7%)	74/450 (16.4%)	268/503 (53.2%)
1996.4～1997.3	19/39 (48.7%)	57/75 (76.0%)	44/164 (26.8%)	213/544 (39.2%)
1997.4～1998.3	22/38 (57.9%)	55/58 (94.8%)	50/291 (17.2%)	313/608 (51.4%)
合計	99/161 (61.5%)	192/216 (88.9%)	236/1234 (19.1%)	1019/2117 (48.1%)

b)．3件以下の事例の検査結果

検査期間	EM	PCR	EM	PCR
	陽性事例/検査事例	陽性事例/検査事例	陽性数/検査数	陽性数/検査数
1994.4～1995.3	19/48 (39.6%)	39/51 (76.5%)	23/83 (27.7%)	61/95 (64.2%)
1995.4～1996.3	15/51 (29.4%)	28/50 (56.0%)	18/94 (19.1%)	43/92 (46.7%)
1996.4～1997.3	7/38 (18.4%)	33/118 (28.0%)	10/44 (22.7%)	46/182 (25.3%)
1997.4～1998.3	5/26 (19.2%)	22/46 (47.8%)	5/40 (12.5%)	32/78 (41.0%)
合計	46/163 (28.2%)	122/265 (46.0%)	56/261 (21.5%)	182/447 (40.7%)

数は平均3.7件であった．患者数，検査数の少ない事例は検出率が下がる傾向があるが，Table. 3で，検出率を検体数の大小（4件以上の事例と3件以下の事例）によって分類し検討した．事例当たりでの検出率は，一事件当たり4件以上の大事例の場合，事例数当たりの陽性事例数は90%近くに達しているが，小事例では50%程度であった．検査数当たりの陽性率は，検体数の大小で差はなかった．

3）RT－PCR法の条件検討

1994年からの2年間のRT－PCR法の試行の結果に基づいて，SRSVの検査法としてRT－PCR法を本格的に導入するための条件検討を行った．検査法として一般化するためには，検体を受けとってから一週間以内に結果を出すことが可能な検査法でなければならない．1996年度は結果を迅速に提出することを目標として，RT－PCR法の条件設定を行った．SRSVの検査の主な検査材料は糞便であるが，糞便中にはRNA分解酵素，蛋白分解酵素等，様々なPCR反応阻害物質が含まれていると考えられる．一方，糞便中のSRSV量はごく微量であるので，SRSVのRNA抽出には，充分量RNAが得られて，阻害物質の混入が少なくなるような条件を設定する必要がある．そこで，糞便量を変えた条件でRNA抽出を行い，RT－PCR反応を行った結果，RNA抽出に用いる糞便の粗精製画分の量を1／8にした場合と，通常量とで比較したところ，Table 4 に示すように，通常量のほうが検

表4　ＲＴ－ＰＣＲ法の条件検討――検体量の影響

	大量法	少量法（1/8量）
(事例数) 陽性／総数	14/27	1/27
(検査数) 陽性／総数	34/85	1/85

出率が高かった.

考　察

SRSV性胃腸炎の検出状況

現在、SRSVの検査は，電子顕微鏡観察による方法と，遺伝子検出法の二つの方法が主流である．電子顕微鏡検査は観察に時間がかかり，観察者の熟練を要するなど問題点が多い．しかし，SRSVの検査に当たって，RT－PCR遺伝子検査だけで果たしてSRSVの存在を証明できるのか，という疑問の声がある．特に、食品を扱う業者側などから，SRSVの存在についてはっきりした証拠を要求される場合がある．電子顕微鏡観察結果はSRSVの存在を視覚的に示すことが出来るので，誰にも理解しやすいという長所がある.

SRSVの遺伝子検査は既知のSRSVの塩基情報に依存している.ウイルスは塩基が変異しやすい特徴があるが，SRSVも，様々に異なる塩基を持つことが知られている．したがって，既知のSRSVの遺伝情報を基にしたRT－PCR法では，新しいSRSVを検出出来ない場合も想定される．電子顕微鏡観察はこのような場合に有効な検査法となっている．また，東京都は長年に亘ってSRSVの電子顕微鏡検査をおこなってきており，この実績による知識の蓄積があることから，現在，東京都におけるSRSV検査は電子顕微鏡観察と，RT－PCR法による遺伝子検査の二本立てとなっている.

RT－PCR法を導入した1994年４月以降のSRSV検査結果を，電子顕微鏡による検査法だけで行ってきた結果と比較すると（Table 1)，52％から68％に検出率の増加が見られた．一時的に検出率が低下した1996年を除いた結果では78％となり，RT－PCR法の導入によって事例数当たりの検出率を70％以上とすることが可能となった.

RT－PCR法と電子顕微鏡観察の比較

両法の検出率の比較を行った結果では，Table 2 に示すように,電子顕微鏡観察では43％の事例が陽性となり，RT－PCR法では68％の事例が陽性となった．なお，1996年度に一時的に検出率の低下が見られたが，RT－PCR法の条件設定時期であったために，検出率が低下したと考えられる．因みに，1996年を除く３年間の平均では78％の事例がRT－PCR法で陽性となった.

事例当たりの検出率の高率とは異なり，検査数当たりの陽性率は，電子顕微鏡観察で20％，RT－PCR法で47％（1996年度を除くと51％）となった．しかし，RT－PCR法を用いても，検査数当たりの陽性率が半分程度であることは，検査法として改善する余地があると考えられる．特に，SRSVの遺伝子塩基配列は多様性が知られており，RT－PCR法に用いるプライマーを検討する必要があると思われる．電子顕微鏡観察は検査数当たりの陽性率が20％以下であり，人手，コスト、所要時間等を勘案すれば，迅速性が求められる食中毒行政検査法としては補助的な検査法と考えられる.

一事例中の検査数の検討

Table 3 は，一事例当たり検査数が３件以下の事例と，４件以上の事例で検出率を比較したものであるが，事例当たりでは，後者の方が電子顕微鏡観察，RT－PCR法いずれの場合も検出率が高かった．検査数当たりの検出率は両者で差は見られない．このことよりSRSVの検査を行うに当たっては，集団の数が多い時は，検体数が４件以上あるほうが望ましい.

RT－PCR法の条件検討（検体量について）

SRSVの検査の主な検査材料は糞便であるが，糞便中にはRNA分解酵素，蛋白分解酵素，DNA等，様々なPCR反応阻害物質が含まれている．糞便量が少ない条件では，阻害物質の混入も少なくなると考え，阻害物質を減少させる目的で糞便量を少なくして実験を行っている研究者もある.

今回，RT－PCR法で充分な結果が得られる糞便量を調べる目的で，糞便量を変えてRNA抽出を行い，RT－PCR反応を行った．阻害剤の除去については，フェノール・クロロフォルムによるタンパク質除去を完全にする目的で，除タンパク処理を２回行った．この同一抽出条件下において，糞便量の違いによるRT－PCR法を比較した結果，糞便量を１／８に低下させた場合では通常法に比べて検出率は低下した．これは，糞便量が１／８では充分量のRNAが得られないということ，さらに糞便量が多い場合でも２回の除タンパク処理で阻害物質が減少して充分なRT－PCR反応が出来ることを示していると考えられる．しかし，今回の実験の糞便量の違いによるRT－PCR結果の比較だけからでは，阻害剤の影響の程度を決定することは出来ない．RT－PCR反応の阻害物質として様々な物質が考えられるが，阻害の程度を調べるためには，阻害物質を特定して実験を組み立てる必要があり今後の課題である．いずれにせよ，今回の結果から，RNA抽出に当たっては，除タンパクを完全に行うことは重要で，フェノール・クロロフォルムによる除タンパク処理を２回行うことは有効な方法であると考えられる.

文　献

1）関根大正，佐々木由紀子：日本食品微生物学会雑誌，14，135-143，1997

2）佐々木由紀子：東京衛研年報，**47**，8-14，1996
3）Jiang,X., Graham,D.Y., Wang,M. and Estes,M.K.：Science, **250.** 1581-1583，1983
4）佐々木由紀子：東京衛研年報，**48**，23-29，1997

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 17-22, 1998

臨床試料からのウイルス遺伝子検出

田部井 由紀子, 貞 升 健 志, 吉 田 靖 子,
長谷川 道 弥, 佐々木 由紀子, 平 田 一 郎, 関 根 大 正

Viral Gene Detection for Clinical Sample

YUKIKO TABEI, KENJI SADAMASU, YASUKO YOSHIDA,
MICHIYA HASEGAWA, YUKIKO SASAKI, ICHIRO HIRATA, HIROMASA SEKINE

Keywords：感染症サーベイランス infectious disease surveillance, ウイルス遺伝子 viral gene, 遺伝子診断法PCR,

緒　　言

近年，我々をとりまく環境の中で，エボラ出血熱などの新興感染症（emerging disease），結核などの再興感染症（re-emerging disease）が問題になっている[1]．また、100年ぶりに感染症予防法の改定も決まり，ウイルス感染症への関心は高くなってきている．

当所では1982年より，感染症発生動向調査事業（旧感染症サーベイランス事業）の検査定点病院から送られてくる試料について，ウイルス分離試験を行ってきた．しかし、ウイルス分離試験はウイルスの分離同定までに時間がかかるため，結果が後手になってしまうというのが現実であった．今回，感染症発生動向調査事業のウイルス検査を高感度化，迅速化するためにＰＣＲ法（polymerase chain reaction）を導入し，良好な成績があげられたので報告する．

材料と方法

1）試料

供試した試料は，感染症発生動向調査事業の検査定点病院から検査目的で当所に搬入された流行性耳下腺炎，咽頭結膜熱，手足口病，ヘルパンギーナ，無菌性髄膜炎，ウイルス性肝炎，麻疹様疾患患者の眼瞼結膜，咽頭拭い液，髄液である．

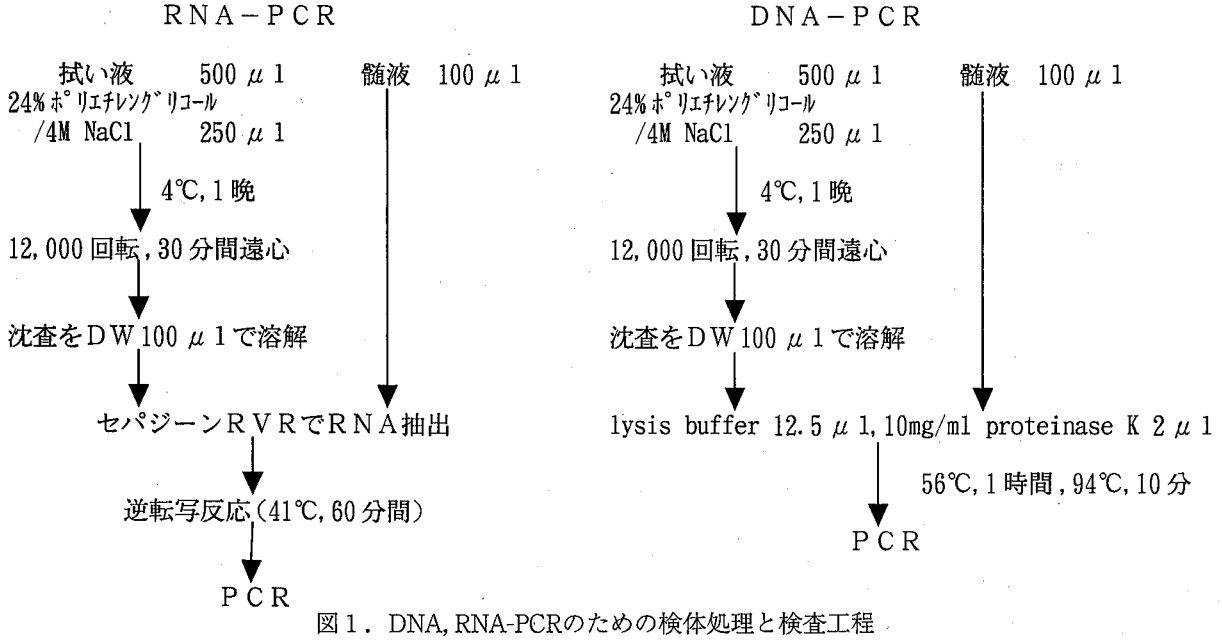


図１．DNA, RNA-PCRのための検体処理と検査工程

東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

2）試料からのDNA抽出

日常検査での使用を考慮に入れ，DNA，RNA共に抽出法には簡便な方法を用いた（図1）．

眼瞼結膜，咽頭拭い液500μlに24% polyethlenglycol／4％NaClを250μlを加え，4℃に一晩放置した．これを12,000回転，4℃で30分間遠心し，沈査を滅菌蒸留水100μlで再浮遊した（以下PEG沈殿）．これに，lysis buffer（100mM Tris-HCl pH8.3，500mM KCl，25mM MgCl 2，10mg/ml gelatin，4.5% NP-40，4.5% tween20）10μl，10mg/ml proteinase K 2μlを加え，56℃，1時間，94℃，10分間処理後，供試ＤＮＡとした[2]．

髄液はPEG沈殿を行わず，試料100μlにlysis buffer，proteinase Kを加えDNAを抽出した．

3）試料からのRNA抽出

DNA抽出と同様に，眼瞼結膜，咽頭拭い液500μlをPEG沈殿し，滅菌蒸留水100μlで再浮遊して，髄液はそのまま100μlをRNA抽出に使用した．

RNA抽出にはセパジーンRVR（三光純薬）を用いた．すなわち蛋白変性剤（試薬1）300μlに眼瞼結膜，咽頭拭い液からの再浮遊液100μlまたは髄液100μlを混和し，さらに緩衝液（試薬2）300μl，抽出剤（試薬3）600μlを加え均一に混和した．氷中で15分間放置後，12,000回転，4℃で15分間遠心した．3層のうちの上層を別のチューブに移し，等量の2-propanolを加え転倒混和し-20℃に一晩放置した．これを12,000回転，4℃で15分間遠心して，上清を除き，沈査に70%ethanolを1ml加え再浮遊し，さらに12,000回転，4℃で15分間遠心して上清を除いた．沈査を乾燥後，逆転写反応用試薬（滅菌蒸留水 7μl，RNasin(TOYOBO)1μl，各々のウイルス特異的な逆転写用プライマー（表2）1μl，1.25mM dNTPs(Perkin Elmer Cetus)8μl，AMV(TOYOBO)7unit，10×reaction buffer(Perkin Elmer Cetus)2μlの混液）21μlで溶解し供試RNAとした[3,4]．

表1．DNA-PCRに使用したプライマーの配列とPCR反応条件

ウイルス	領域	プライマー		配列（5'→3'）	位置	PCR条件		増幅産物
HSV	Glycoprotein D	1st	HS11	GTCTGTCTTTAAAAAGCAGGG	120－140	94℃ 1分		
			HS12	GCCGCGAAAGCGATTGGG	351－368	53℃ 2分	30回	249bp
	Glycoprotein D	2nd	HS13[8]	GTTAGGGAGTTGTTCGGTCATAAGCT	141－166			
			HS14[8]	TCGGCCATCTTGAGAGAGGCATCC	326－349	同上	30回	209bp
EBV	EBNA1	1st	EB3[9]	AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG	109332－109351	94℃ 1分		
			EB4[9]	AGACAATGGACTCCCTTAGC	109609－109628	55℃ 1分	30回	297bp
						72℃ 1分		
	EBNA1	2nd	EB1[9]	ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC	109353－109372	94℃ 1分		
			EB2[9]	ACTCAATGGTGTAAGACGAC	109542－109561	60℃ 1分	30回	209bp
						72℃ 1分		
CMV	IE-1	1st	C[10]	TGAGGATAAGCGGGAGATGT	236－255	94℃0.5分		
			D[10]	ACTGAGGCAAGTTCTGCAGT	459－478	53℃0.5分	20回	243bp
						72℃0.5分		
	IE-1	2nd	A[10]	AGCTGCATGATGTGAGCAAG	275－294			
			B[10]	GAAGGCTGAGTTCTTGGTAA	401－420	同上	40回	146bp
VZV	Pst 1 II	1st	VZVB1N1[11]	TTCCCTCAAGAGGCTGTTTG	36－55	94℃ 1分		
			VZVB1N2[11]	AATTGTTAGTCGGCGCGCTG	572－591	53℃ 2分	30回	556bp
						72℃ 3分		
	Pst 1 II	2nd	VZVB1N3[11]	CTGTATCCACAATGGTCCG	57－75			
			VZVB1N4[11]	TGATGTGGTTACGGAAGACG	570－589	同上	25回	533bp
Adeno	Hexon	1st	HexAA1885[12]	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC	94－111	94℃ 1分		
			HexAA1913[12]	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	367－388	53℃ 2分	30回	295bp
					72℃ 2分			
	Hexon	2nd	NeHexAA1893[13]	GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG	203－227			
			NeHexAA1905[13]	TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC	301－329			127bp
						同上	30回	
			SAD4037	TTCGGAGTACCTCAGTCCG	128－145			238bp
			MAS317	TGTGCTGGCCATGTCAAGC	347－365			(AD3,7のみ)

表2．RNA-PCRに使用したプライマーの配列とPCR温度条件

ウイルス	領域	プライマー		配列（5'→3'）	位置	PCR条件	増幅産物
Mumps	Viral protein	1st	Pr[14]	CTATCTTAGCCAATTCCACA	868−887	94℃1分	
			Pf*[14]	AACCAACTCGTTGAGCAAGGA	1149−1166	55℃2分 30回	299bp
						72℃2分	
		2nd	P10[14]	ATGAACCTGTTGGTTGGATA	895−914		
			P9[14]	CTCATTGGCAATCCAGAGCA	1098−1117	同上	223bp
Entero	5'Non code	1st	TEN1	GGTACCTTTGTACGCCTGTT	66−85	94℃1分	
			TEN2*	TCACCGGATGGCCAATCCA	622−640	53℃2分 30回	577bp
						72℃2分	
		2nd	TEN3	GCCCCTGAATGCGGCTAAT	450−468		
			TEN4	GATTGTCACCATAAGCAGCCA	577−597	同上	148bp
Measles	Fusion protein	1st	Me2[15]	GGCAATTGAGGCAATCAGACA	492−512	94℃1分	
			Me1*[15]	CTTGAGAGCCTATGTTGTACG	923−943	55℃2分 30回	452bp
		2nd	Me3[15]	AGGAGATGATATTGGCTGTT	521−540		
			Me4[15]	GACAGCGTCGGATAGGCTATAC	859−881	同上	361bp

＊逆転写反応に使用するプライマー

4）DNA-PCR

DNA-PCR用試薬（10×reaction buffer 5μl,1.25mM dNTPs 8μl，2U/μl AmpliTaq polymerase(Perkin Elmer Cetus)0.5μl，滅菌蒸留水1.5μlの混液）15μl，滅菌蒸留水21.5μl，標的とするウイルスに特異的なプライマーセット（outer）1μlを加えlst-PCR試薬とした．これに，94℃，10分間加熱後，氷中に置いた供試DNA12.5μlを加え，ミネラルオイル（シグマ）50μlを重層し，各々の反応条件でlst-PCRを行った（表1）．

新たにDNA-PCR用試薬15μl，滅菌蒸留水31μl，lst-PCRで使用したプライマーセットの内側のプライマー（inner）1μlを加え2nd-PCR試薬を調製した．

lst-PCR終了後，チューブから重層したオイルを除き，lst-PCR増幅産物を含む溶液にchloroform 50μlを加え，混和後，10,000回転，5分間遠心した．この上清3μlを2nd-PCRの鋳型用試料として2nd-PCR試薬に加え，lst-PCR同様，ミネラルオイルを重層して2nd-PCRを行った．

2nd-PCR終了後，ethidiumbromideを添加した2％agarose gelで電気泳動し，UV透過下で判定した[3,4]．

5）RNA-PCR

逆転写反応用試薬21μlで溶解した供試RNAを56℃，1分間，41℃，60分間逆転写反応し，cDNAを調製した．

滅菌蒸留水53μl，10×reaction buffer 8μl，1.25mM dNTPs 16μl，標的とするウイルスに特異的なプライマーセット（outer）1μlにcDNA21μlを加え，ミネラルオイル100μlを重層し，各々の反応条件でlst-PCRを行った．

DNA-PCRと同様にして，lst-PCRで使用したプライマーセットの内側のプライマー（inner）を使用して2nd-PCRを行い，電気泳動を行って判定した（表2）．

6）ウイルス遺伝子検出

流行性耳下腺炎患者からの咽頭拭い液3件，髄液7件，咽頭結膜熱患者からの眼瞼結膜拭い液3件，咽頭拭い液6件，麻疹様疾患患者からの咽頭拭い液6件についてはこれら疾患の主病原ウイルスについて検査した．手足口病，ヘルパンギーナ患者からの咽頭拭い液19件については主病原ウイルスと類似の症状を呈するウイルスについて検査した．また，ウイルス性肝炎患者からの咽頭拭い液6件については，近年肝炎を起こすことが報告されている[5]Epstein-Barrウイルス（以下EBV），サイトメガロウイルス（以下CMV）について検査した．更に，ウイルス分離試験で陰性だった無菌性髄膜炎患者の髄液52件についてはエンテロ，アデノ，ムンプス，HSV，インフルエンザ，水痘ウイルス（以下VZV）について検査した．

結果と考察

1）流行性耳下腺炎患者試料からのウイルス遺伝子検出

10名の患者から得られた試料10件のうち7件からムンプスウイルス遺伝子が検出された（表3）．試料は髄液の方が高率に検出できた（5／7）．ムンプスウイルス遺伝子が検出された7件のうち，合併症として髄膜炎を起こしているものが5件あったことを考慮にいれると，髄膜炎を起こしている患者の試料中には，起こさなかった患者試料中よりも多くのウイルスが存在することが推測できた．また，エンテロウイルス遺伝子が咽頭拭い液1件から検出され，エンテロウイルスによっても耳下腺炎が

表3．流行性耳下腺患者試料からのウイルス遺伝子検出

No.	年齢	性別	試料	PCR mumps	PCR entero
1	1才	F	咽頭拭い液	+	N.T.
2	1才	F	髄液	−	N.T.
3	6才	M	髄液	−	−
4	12才	M	髄液	+	N.T.
5	3才	F	髄液	+	N.T.
6	62才	F	咽頭拭い液	−	+
7	6才	M	髄液	+	N.T.
8	5才	F	髄液	+	N.T.
9	6才	M	髄液	+	−
10	5才	M	髄液	+	N.T.

N.T.：検査せず

起こることが示唆された．

2）咽頭結膜熱患者試料からのアデノウイルス遺伝子の検出

咽頭結膜熱患者6名からの眼瞼結膜，咽頭拭い液すべてからアデノウイルス遺伝子が検出された（表4）．2nd-PCRには，NeHexAA1893/NeHexAA1905とSAD4037/MAS317の2対のプライマーを混合して使用したが，アデノウイルス3,7型に特異的なプライマー(SAD4037/MAS317)でのみ,検出することができた（図2）．また，ウイルス分離試験によっても試料1，5～8ではアデノウイルス3型が，試料2～4ではアデノウイルス7型が検出された．

このプライマーを使用することで，アデノウイルスを高感度に検出すると共に,ある程度の型別が可能となり，検査への有用性が示された．

表4．咽頭結膜熱患者からのウイルス遺伝子検出

No.	年齢	性別	拭い液	PCR adeno(3,7型)	PCR adeno(その他)
1	5カ月	M	咽頭	+	−
2	7才	F	咽頭	+	−
			眼瞼結膜	+	−
3	5才	M	眼瞼結膜	+	−
4	6才	M	咽頭	+	−
			眼瞼結膜	+	−
5	7才	F	咽頭	+	−
			眼瞼結膜	+	−
6	10カ月	F	咽頭	+	−

3）手足口病，ヘルパンギーナ患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

手足口病患者9名からの試料中5件（5／9）でエンテロウイルス遺伝子が検出された．また，ヘルパンギーナ患者10名からの試料でも5件（5／10）でエンテロウイルス遺伝子が検出された．HSV遺伝子は手足口病，ヘルパンギーナ患者共に検出されなかった（表5）．ウイルス分離試験によって試料8，9からは，脳炎を併発することで話題になっている[6]エンテロウイルス71型が検出された．今回使用したエンテロウイルスのプライマーは広義のエンテロウイルス全てに共通な部分を増幅するものであるため，今後，簡易な型別法の検討が必要と思われた．

4）麻疹様疾患患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

患者6名からの試料で、麻疹ウイルス遺伝子が検出できたのは2件（2／6）だった（表6）．陰性だった試料

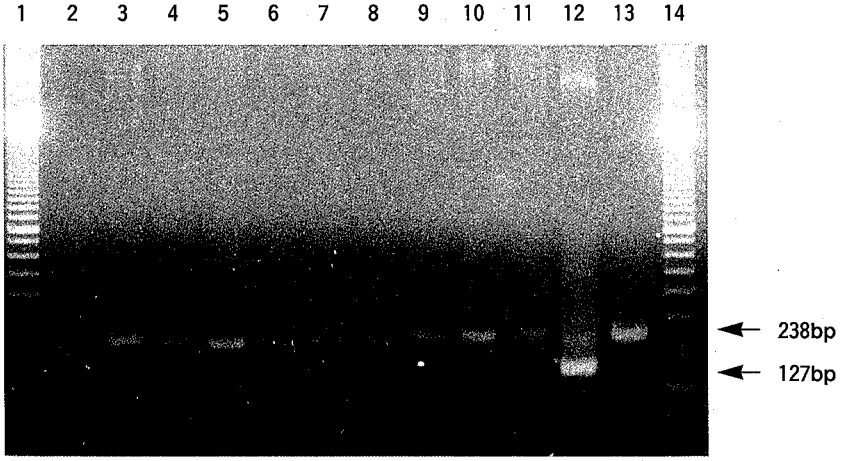


図2．患者試料からのアデノウイルス遺伝子検出

lane1,14：マーカー, lane2：N.C., lane3~11：患者試料
lane12：P.C.(アデノウイルス3,7型以外), lane13：P.C,(アデノウイルス3,7型)

表5．手足口病，ヘルパンギーナ患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

No.	年齢	性別	臨床診断	PCR entero	PCR HSV
1	6才	M	手足口病	+	−
2	2才	F	手足口病	+	N.T.
3	2才	M	手足口病	+	−
4	2才	M	手足口病	−	−
5	3才	F	手足口病	+	−
6	5才	F	手足口病	+	−
7	2才	M	手足口病	−	−
8	3才	F	手足口病	+	N.T.
9	11カ月	M	手足口病	+	N.T.
10	2才	M	ヘルパンギーナ	+	−
11	3才	F	ヘルパンギーナ	−	−
12	2才	M	ヘルパンギーナ	+	N.T.
13	10才	M	ヘルパンギーナ	−	−
14	9カ月	M	ヘルパンギーナ	+	−
15	8才	M	ヘルパンギーナ	−	−
16	1才	M	ヘルパンギーナ	+	−
17	10カ月	F	ヘルパンギーナ	−	−
18	1才	F	ヘルパンギーナ	−	−
19	11カ月	M	ヘルパンギーナ	+	−

N.T.：検査せず

表6．ウイルス分離試験陰性の麻疹様疾患患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

No.	年齢	性別	measles-PCR
1	9カ月	M	−
2	11才	F	+
3	7カ月	不明	+
4	1才	F	−
5	2才	F	−
6	1才	M	−

表7．ウイルス性肝炎患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

No.	年齢	性別	PCR EBV	PCR CMV
1	8カ月	M	−	+
2	1才	F	+	N.T.
3	9才	F	+	−
4	8カ月	M	+	N.T.
5	22才	M	+	N.T.
6	2カ月	F	−	+

N.T.：検査せず

については，麻疹様を呈する他のウイルスの検査の導入が必要である．

5）ウイルス性肝炎患者咽頭拭い液からのウイルス遺伝子検出

肝炎患者6名の咽頭拭い液からEBV，CMV遺伝子の検出を行った結果，EBVは4件（4／6），CMVはEBV陰性だった試料から検出された（表7）．CMV陽性例は，どちらも乳幼児であることから，CMV初感染による肝炎と推察された．

EBVは成人までに90%以上が感染すると言われている[7]．咽頭拭い液からのウイルス遺伝子の検出のみでは，活動性のEBV感染の証明になるとは言えない．やはり，血液試料からの検出が有用であり，試料選択についても，今後，定点病院との協力が必要と言える．また，咽頭拭

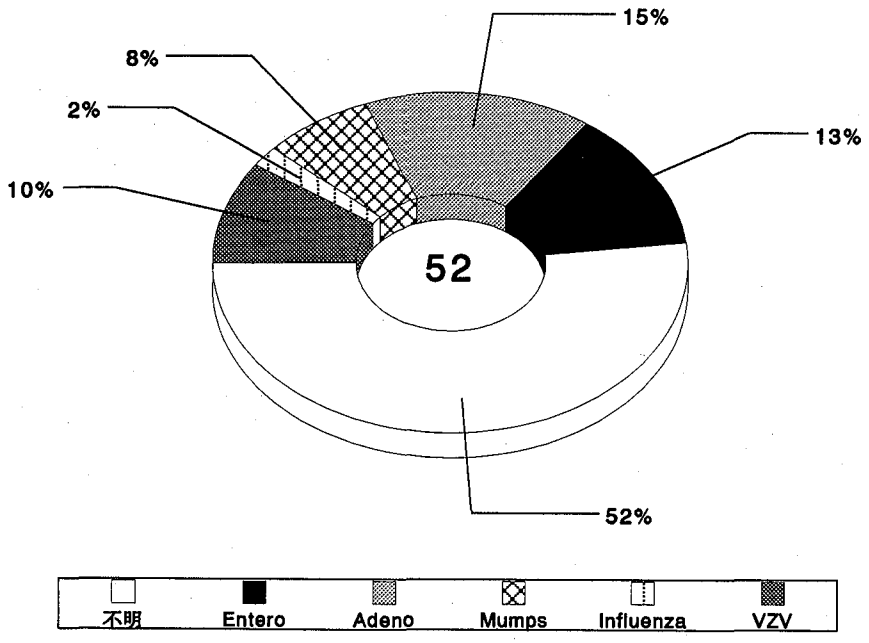


図3．ウイルス分離試験陰性の無菌性髄膜炎患者髄液からのウイルス遺伝子検出

い液からのEBV遺伝子の検出で何が言えるのかを知るためにも，健康人の保有率を調査する必要がある．

6）無菌性髄膜炎患者からのウイルス遺伝子検出

ウイルス分離試験で陰性だった無菌性髄膜炎患者52名からの髄液を検査した結果，25件（48%）から何らかのウイルスの遺伝子が検出され，27件（52%）からは検出されなかった．検出された25件の内訳はアデノウイルス遺伝子が8件（15%），エンテロウイルス遺伝子が7件（13%），VZV遺伝子が5件（10%），ムンプスウイルス遺伝子が4件（8%）インフルエンザウイルス遺伝子が1件（2%）であった．向神経性ウイルスとして知られるHSV遺伝子は今回は検出されなかった（図3）．PCR法によって，ウイルス分離試験陰性の試料の約半分からの病原ウイルスの検出が可能となった．

髄膜炎を起こすウイルスは，種類が多く，流行に季節性がある．また，検査を行うに際して，患者の年齢，髄液試料の量などを考慮に入れなければならない．有用な検査のためにも，髄膜炎の検査のアルゴリズム作りが今後の課題と言える．

今回，臨床試料からの検査にPCR法を取り入れ，良好な結果が得られたが，現時点では感染症発生動向調査の検査はウイルス分離試験を行うこととなっている．ウイルス分離試験は分離同定までに数週間と,長期間かかる場合があること，検出率もPCR法よりも劣ることなどから，感染症の発生動向を迅速に把握するのにそぐわない面がある．また，患者が退院後に結果が報告されても臨床的には役立たないため，医療機関からの協力が得にくくなる場合もある．その点PCR法を用いると，迅速かつ高率にウイルス遺伝子を確認することができるため，現行のウイルス分離試験の欠点を補うことができる．

しかし，今回導入したPCR法ではウイルスのサブタイプ分析には不十分であり，分離したウイルス株を用いた中和試験に頼らざるを得ない．今後は分離試験と遺伝子検査法の利用法や組み合わせについて検討すると共に，PCR産物の制限酵素解析等も利用して，サブタイピングの可能性についても考えていきたい．

参考文献

1）山内一也：エマージングウイルスの世紀,1997,河出書房,東京.

2）貞升健志,大貫奈穂美,伊藤忠彦,他：東京衛研年報,**43**,17-21,1992

3）貞升健志,森　功次,田部井由紀子,他：東京衛研年報,**48**,38-41,1997

4）長島真美,佐々木由紀子,山崎　清,他：東京衛研年報,**48**,30-37,1997

5）五十嵐隆：小児のウイルス肝炎,1994,金原出版,東京.

6）国立感染症研究所ホームページ　http://idsc.nih.go.jp/

7）河敬世：ＥＢウイルスの二十面相,1994,金原出版,東京.

8）青野利哉,山西弘一：ＰＣＲ法最前線,**41**(5),669-675,1996

9）Cinque P.,Brytting M.,Vago L.,et al.:*Lancet*,**342**,398-401,1993

10）Cinque P.,Vago L.,Dahl H.,et al.:*AIDS*,**10**,951-958,1996

11）本藤　良,井上　栄,大沢　忍,他：蛋白質・核酸・酵素,**35**(17),3034-3040,1990

12）Allard A.,Girones R.,Juto P.,et al.:*J.Clin.Microbiol.*,**28**,2659-2667,1990

13）Allard A.,Albinsson B.,Wadell G.,et al.:*J.Med.Virol.*,**37**,149-157,1992

14）山田章雄：臨床とウイルス,**23**,80-83,1995

15）Read J. S.,Jeffery J.M.K. and Bangham R.M.C.:*J. Clin.Microbiol.*,**35**,691-696,1997

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 23-28, 1998

エアロゾルと共に飛散させたウイルスの「セルロース吸着・凝集法」による捕集実験

矢野一好*, 竹内正博**, 真木俊夫*

Concentration of Viruses From Aerosol Using Fibriform Cellulose

KAZUYOSHI YANO*, MASAHIRO TAKEUCHI** and TOSHIO MAKI*

Keywords：空気感染 airborne infection，ウイルス virus，セルロース cellulose，濃縮 concentration，エアロゾル aerosol

緒　言

病原ウイルスがヒトに感染する様式は，消化管感染，気道感染，接触感染，咬傷感染，垂直感染などがある[1]．これらの感染様式のうち，水，空気，食品などの生活環境が関与すると考えられる感染事例の感染源を究明するのは非常に困難である．すなわち，水，空気，食品などに混入しているウイルスは，一般的に微量であるため，原因と考えられる環境試料からウイルスを濃縮して検出する必要がある[2]．

水試料からウイルスを濃縮する方法は，1970年代になって欧米諸国を中心に研究が開始された．我が国では，プラスに荷電したDEAE-セルロースをウイルスの吸着担体として使用して，大量の試料水に含まれている微量のウイルスを電気的に捕捉し，捕捉したウイルスを担体から回収する方法が採用されている[3]．

一方，気道感染を証明することを目的とした空気中のウイルス回収方法は，ほとんど検討されていない．わずかに，下水処理水を農業用水として使用している地域の空気からエアサンプラーを用いて腸管系ウイルスを検出した報告例がある程度である[2]．この調査に用いられた方法は，エアサンプラー（1,000*L*/分）によって空気中の浮遊物をフィルターに捕集し，フィルターからビーフエキストラクト溶液を用いてウイルス誘出処理を行う方法である[2]．この方法は，使用する機材が重い（10～20 Kg）ため機動性に欠ける．また，ウイルスの回収率等も不明である．

本研究の最終目的は，気道感染するといわれている病原体であるレジオネラ属菌やインフルエンザウイルスを空気中から回収する方法の開発である。本報は、その予備実験としてポリオウイルスを使用し，水試料からのウイルス濃縮方法である「セルロース吸着・凝集法」[4]が空気中のウイルス捕集方法として適用できるか否かを検討したものである．

材料と方法

1．ウイルス

バイオハザードの面を考慮して，実験室で容易に取り扱えるポリオウイルス１型のワクチン株（Lsc，2ab株）を使用した．ウイルスの定量は，プラック形成法によって行った[1]．

2．細胞

ポリオウイルスの培養及び定量には，ポリオウイルスに感受性があるBGM細胞（アフリカミドリザルの腎細胞由来）を使用した．細胞の培養は，培養面積150cm^{2}のプラスチック製フラスコ(IWAKI社製 Code 3120-150)を使用し，常法に従って行った[1]．

3．DEAE-セルロース

繊維状のN,N-ジエチルアミノエチルエーテル(DEAE)セルロース（シグマ社製 Code D-6418，以下，セルロースと略記）を活性化処理して使用した．活性化は別報に従って行った[5]．

4．凝集剤

凝集剤は，ウイルスが吸着したセルロースの回収効率

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

を向上させる目的で使用した[4]．アニオン系高分子凝集剤（市川毛織株式会社製 T212）を滅菌精製水1 Lに200 mg溶解し，5～8 mlずつ分注して冷蔵保存した．

5．スイケンバッグ

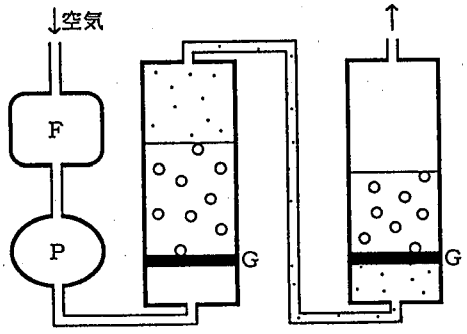
凝集処理したセルロースの回収に用いる筒状の不織布バッグで平均孔径20 μmのもの（ケアメディックス株式会社製）を用いた．

6．ウイルス誘出液

ペースト状のビーフエキストラクト（DIFCO社製 Code 0126-01-8）30～50gを精製水1 Lに溶解し，NaClを1％濃度に添加したのち，1N NaOHでpH 9に補正して121℃15分間高圧蒸気滅菌した．この誘出液は，ウイルスが吸着したセルロースからのウイルス回収に用いた．使用量は1試料あたり5 mlを目安とした[4]．

7．エアロゾル発生容器

ウイルスを飛散させるためのエアロゾル発生容器は，図1に示した形状（直径90mm，高さ340mmの円筒形で底面から50mmのところに直径85mmのガラスフィルターをセット）のものを使用した．エアロゾルは，本容器（以下，ウイルス槽と記す）に精製水1 Lとウイルス原液10～20mlを添加して，送気量約8 L/分で曝気することによって発生させた．



F：流量計
P：エアーポンプ
G：ガラスフィルター

図1．ウイルス捕集実験装置の概略

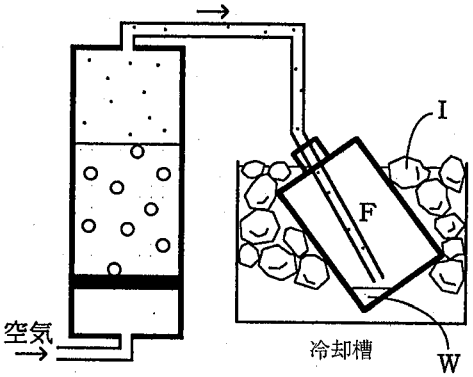
すなわち，精製水1 Lをウイルス槽に入れウイルス原液を10mlまたは20ml添加してよく撹拌した．初期のウイルス量を求める目的で実験前にあらかじめウイルス槽からウイルス液5 mlを採取した．曝気によってエアロゾル化したと考えられるウイルス液量は実験前後におけるウイルス槽全体の重量差から求めた．

8．飛散ウイルス量の測定

ウイルスを実験的に飛散させる方法は，「噴霧法」がすでに報告されている[7]．しかし，この方法は噴霧器によってウイルス液を粒径3～10 μmの水滴にさせて飛散させるため，場合によっては水中ウイルスを回収しているのと同じ結果になる場合があると思われる．

したがって，本実験では，より実際に近い状態でウイルスを飛散させるために，精製水に添加したウイルス液を曝気する方法を採用した（図2）．ウイルス液を曝気する方法で発生するエアロゾルは肉眼では水滴として確認できず，かつ実験装置の配管系にも水滴は発生しなかったので，相当小さい粒子になっていると思われた．しかし，実際に飛散したウイルス量の測定が困難であった．すなわち，曝気によってウイルス液の水分だけが飛散し，ウイルス粒子そのものは水槽に残留している可能性が考えられた．

したがって，本実験では，発生したエアロゾルを冷却して生ずる凝結水中のウイルス量から実際に飛散したと考えられるウイルス量を推定することとした．エアロゾルの冷却は，図2に示したような実験装置を組んで行い，凝結水をフラスコ内に回収した．



F：フラスコ
I：氷
W：凝結水

図2．飛散ウイルス量測定装置の概略

9．ウイルス回収容器

エアロゾルと共に飛散させたウイルスの回収容器として図1に示した形状（直径100mm，高さ330mmの円筒形で底面から60mmのところに直径85mmのガラスフィルターをセット）のものを使用した．飛散させたウイルスは，本容器（以下，セルロース槽と記す）に，精製水で所定濃度に懸濁したセルロースを添加して，送気量約8 L/分で曝気することにより回収した．

すなわち，所定量のセルロースを精製水に懸濁させたセルロース槽に，ウイルス槽で発生させたエアロゾルを送り込み，セルロースにウイルスを吸着させた．ウイル

表1．エアロゾルと共に飛散するウイルス量の推定

項目	ウイルス量 (PFU/ml)	飛散水量※1 (ml)	凝結水量 (ml)	ウイルス総量※2 (PFU)
ウイルス槽	210,000	7.9	−	1,700,000
凝結水	65	−	6.8	440
推定飛散ウイルス量※3	65	7.9	−	510
				ウイルス飛散率＝0.03%※4

※1　ウイルス槽全体を計量し、実験前後の重量の差を飛散水量とした．
※2　（ウイルス槽又は凝結水のウイルス量×飛散又は凝結水量）で求めた．
※3　ウイルス液7.9mlがエアロゾル化したときに飛散したウイルスの総量は65PFU×7.9ml=510 PFUと推定した．
※4　ウイルス飛散率は(510/1,700,000)×100で算出した．

表2．飛散させたウイルスの回収方法の検討条件

回収方法	ウイルス添加量(ml)	曝気量(L/min)	曝気時間(hour)	誘出液量(ml)
精製水	20	5	1.0	5.0
フィルター	10	3	2.5	5.0
セルロース	20	5	1.0	5.0

ス吸着が終了したセルロースは，凝集剤0.5mlで凝集させ，スイケンバッグで回収した．その後，セルロースが漏れないようにスイケンバッグをよく搾って水分を除去した．スイケンバッグをそのままシャーレの中に入れ，ウイルス誘出液5mlを添加し，スイケンバッグごと数回搾ってウイルス誘出処理を行った．搾り液は，10mlの注射筒に採り，メンブランフィルターでろ過して除菌処理し，ウイルス定量試験に供するまで−20℃以下に凍結保存した．

結果と考察

1．飛散ウイルス量の推定

図2に示した実験装置を組んで飛散ウイルス量を測定し，結果を表1に示した．すなわち，210,000PFU/mlのウイルスを添加した1 Lのウイルス液を1時間曝気（8 L/分）することによって7.9mlのウイルス液がエアロゾルとなり，エアロゾルと共に飛散したウイルス量は，510 PFU，飛散率0.03%と推定された．

飽和水蒸気の密度は，20℃で$0.0173g\cdot10^{-3}\cdot cm^{-3}$といわれている[8]．この値から室温で行った今回の実験において発生したと考えられるエアロゾル量を推定すると，8.3g（曝気量8,000ml×曝気時間60分×飽和水蒸気密度$0.0173g\cdot10^{-3}\cdot cm^{-3}$）となる．この値は，実際に凝結水として回収した水量6.8ml及びエアロゾル化したと考えられる水量7.9ml（ウイルス槽全体の実験前重量−実験後重量）と比較して遜色ない．

したがって，凝結水中のウイルス量を基に水中ウイルスの飛散率を算出すると，0.03%[(510 PFU/1,700,000 PFU)×100]と推定できた．この推定には，エアロゾル中のウイルスがすべて凝結水に取り込まれたか否かの問題が残るが，以下の実験系におけるウイルスの飛散率は0.03%とした．

2．飛散させたウイルスの回収方法の検討

飛散させたウイルスを回収する予備実験として，3種類の方法を比較した．

1）精製水による回収

実験は，図1に示した実験装置を用いて行った．すな

表3．飛散させたウイルスの回収方法と回収率

回収方法	添加ウイルス量 (PFU/ml)※1	飛散水量 (ml)	飛散ウイルス総量 (PFU)※2	回収ウイルス総量 (PFU)※3	ウイルス回収率 (%)※4
精製水	410,000	5.6	690	＜50	＜7.2
フィルター	290,000	6.6	570	350	61.4
セルロース	400,000	4.7	560	210	37.5

※1　ウイルス槽への添加ウイルス量
※2　添加ウイルス量(PFU/ml)×飛散水量(ml)×飛散率(0.03%)
※3　ウイルスを吸着させたフィルターまたはセルロースから誘出液5mlで回収したウイルスの総量
※4　[回収ウイルス総量(PFU)/飛散ウイルス総量(PFU)]×100

わち，図1に示したウイルス回収容器に精製水だけを1 L入れて表2の実験条件で曝気した．実験終了後，精製水で捕集したウイルスは，「セルロース吸着・凝集法」[4]によって濃縮した．実験結果は表3にまとめたとおりで，ウイルスの回収量は，検出限界以下となり，飛散させたウイルスを精製水に吹き込む方法では回収できないことがわかった．

2）ゼータプラスフィルターによるウイルス回収

水系からのウイルス回収に用いられるゼータプラスフィルターが，エアロゾルと共に飛散したウイルスの回収に有効であるか否かを検討した．実験は，図1に示した実験装置のエアロゾル発生容器の出口に直接ゼータプラスフィルター（CUNO，1MDS：直径47mm，孔径4 μm）をセットして行った．実験条件は表2に，実験結果は表3に示した．フィルターに捕捉したウイルスの回収は既報[9]に準じて行った．

ウイルスの回収率は61.4％となり，エアロゾルと共に飛散したウイルスの回収には，ゼータプラスフィルターが有効であると考えられた．しかし，実際の空気環境には塵や埃などが浮遊しており，フィルターが目詰まりを起こす可能性が考えられる．今回の実験でも曝気量が3 L/分と低下しており，エアーポンプへの負荷が大きいと考えられる．したがって，吸引力の強いポンプも必要となることから，使用機材の重量が重くなり野外調査における利便性に欠けると考えた．

3）セルロースによる回収

実験は，図1に示した装置を用いて行った．ウイルス回収容器へのセルロース懸濁量は1.0g/Lとした．実験条件及び結果は表2と表3に示した．ウイルスの回収率はフィルター法に比較して37.5％と低率であったが，曝気量（5 L/分）からみて，ポンプへの負荷も小さく野外調査の際に使用する機材が軽量化できる可能性が示唆された．したがって，以下の実験では，セルロースによる回収条件について検討した．

表4．セルロース吸着凝集法による回収条件

項　目	設　定　条　件
ウイルス槽の調製	：精製水1 Lにウイルス原液20mlを添加.
セルロース槽の調製	：精製水1 Lに5段階濃度でセルロースを懸濁. (0.91g, 1.36g, 2.72g, 5.43g, 10.86g)
曝気量	：5 L/min一定.
曝気時間	：1時間一定.
ウイルス誘出液量	：誘出液5ml使用.

表5．セルロース懸濁濃度と実測データ

セルロース懸濁濃度(g/L)	飛散水量 (ml)	回収ウイルス量(PFU/ml) 1回目	2回目	平均値
0.91	6.2	30	30	30
1.36	6.7	40	80	60
2.72	5.8	150	130	140
5.43	6.6	110	170	140
10.86	6.8	160	110	140
セルロース添加量(PFU/ml)		420,000	410,000	420,000

3．セルロース吸着・凝集法による回収方法の検討

ウイルスを添加した精製水を曝気することによって発生したエアロゾルと共に飛散するウイルスをセルロースで回収する場合，ウイルス回収率の変動に関与する要因は，セルロースの懸濁濃度，セルロース懸濁液の量，曝気量，曝気する気泡の大きさ，飛散ウイルス量，水温，ウイルスが吸着したセルロースからのウイルス誘出方法などがある．

これらの要因のうち水温とウイルス誘出方法については，既報の条件に従った[4]．曝気量はヒトが1分間に呼吸

表6．セルロース懸濁濃度とウイルス回収率

セルロース懸濁濃度 (g/L)	飛散ウイルス総量 (PFU)※2	回収ウイルス総量 (PFU)※4	ウイルス回収率 (%)※1
0.91	780	150	19.2
1.36	840	300	35.7
2.72	730	700	95.9
5.43	830	700	84.3
10.86	860	680	81.4

※1　回収率(%)＝回収ウイルス総量(PFU)※4/飛散ウイルス総量(PFU)※2×100
※2　回収ウイルス総量(PFU)＝回収ウイルス量(PFU/ml)※3×誘出液量(5ml)
※3　表5に示した回収ウイルス量(PFU/ml)の平均値
※4　飛散ウイルス総量(PFU)＝添加ウイルス量(PFU/ml)※5×飛散水量(ml)※6×ウイルス飛散率(0.03％)
※5　表5に示したウイルス添加量(PFU/ml)の平均値
※6　表5に示した飛散水量

表7．ウイルス捕集装置の概要

構成部品	仕様
セルロース槽	材質：塩化ビニルまたはアクリル製． 寸法：直径100mm，高さ330mm程度の円筒． 散気板：ガラスフィルターNo.1，直径85mmを，底面から60mmのところに装着． DEAE-セルロース添加量：0.3gを1Lの精製水に懸濁する．
エアーポンプ	10L/min程度でバッテリー駆動のもの．

表8．「セルロース曝気法」の手順

手順	概要
①セルロース槽の準備	精製水1Lにセルロース0.3gを懸濁する．
②試料採取	エアーポンプをセルロース槽に接続して曝気する．
③セルロースの回収	凝集剤を0.5ml添加して攪拌したのち，スイケンバッグでセルロースを回収する．
④ウイルスの誘出	ウイルス誘出液5mlを用いて，セルロースからウイルスを誘出させる．
⑤除菌	誘出試料をメンブランフィルターでろ過し，ろ液をウイルス検査材料とする．

する換気量といわれている7L/分を目標値とした．気泡の大きさは，細かいほどセルロースとウイルスの接触頻度が高くなると考えられるが，細かすぎると実用に際して目詰まりを起こすと考えられるので，一般的な曝気に使用されているガラスフィルターNO.1を使用した．飛散ウイルス量は，実験値の変動を小さくするために可能な限り高濃度のウイルス液を作成して曝気することとした．予備実験の結果，ウイルス添加量は精製水1Lに対してウイルス原液20mlとした．これ以上の濃度で添加すると多量の泡が発生し，実験に支障を来すことが判明した．

したがって，実験には，ウイルス回収率の変動に最も大きな影響を及ぼすと考えられる「セルロースの懸濁濃度」の要因について検討することとし，その他の要因は一定条件として設定した．実験装置は，図1に示したものを使用した．実験条件は表4にまとめた．

セルロース濃度を5段階に分けて行った実験結果を表5に示した．各実験系での飛散水量は5.8～6.8mlの範囲であった．誘出液5mlを用いてセルロースから誘出させた回収ウイルス量（PFU/ml）は，セルロース懸濁濃度の増加にともなって急激に増加した（ウイルス量の測定は2回繰り返して行った）．

この実測データを基にセルロース懸濁濃度ごとに算出したウイルスの回収率を表6に示した．すなわち，ウイルスの回収率は，セルロース懸濁濃度0.91g/Lでは19.2%であったが，1.36g/Lで35.7%となり，2.72g/L以上になると81.4～95.9%まで上昇した．この結果から，今回の実験条件（表4）でウイルスを効率よく回収するにはセルロース懸濁濃度が，約0.3%（2.72g/L）以上であればよいことが判明した．

4．エアロゾル中のウイルス捕集方法の提案

今回の実験結果を基にしてエアロゾル中のウイルス捕集装置「セルロース曝気法」を提案する．機器の構成は表7にまとめた．

この程度の装置であれば，小さめのバッグで携帯できるため室内はもとより電源設備のない野外での調査にも使用できると考える．具体的な操作手順は，表8にまとめた．すなわち，調査現場ではセルロースを充填したセルロース槽とエアーポンプを接続して，一定時間曝気したのち，装置全体を研究室へ持ち帰り，研究室でウイルスの誘出処理を行えばよいことになる．

5．今後の課題

今回の基礎実験は，実験室で培養したポリオウイルスを精製水に添加して曝気した．したがって，エアロゾルと共に飛散したウイルスは飽和状態の水分に包まれた状態と考えられる．このような状態のウイルス粒子は，懸濁状態のセルロースに速やかに吸着すると考えられるので，ウイルスの回収率が高くなった可能性がある．実際の空気環境におけるウイルスは，乾燥した浮遊粒子にも吸着していると考えられるので，水相との親和性が劣り回収率が低くなるおそれがある．乾燥状態の浮遊粒子にウイルスを吸着させて基礎実験を行う必要がある．

もう一つの課題としてはウイルスの種類がある．今回の実験には広いpH域で安定なポリオウイルスを用いたので，pH9のビーフエキストラクトを用いてセルロースからウイルスを誘出させることができたが，インフルエンザウイルス等を対象とした場合は，ウイルス誘出方法を再検討する必要がある．また，微量のウイルスを高感度に検出できるPCR法などを行う場合は，回収したウイルスの精製が必要になる可能性も考えられる．

結　論

ヒトの生活環境を取り巻く空気中に浮遊しているウイルスを効率よく検出できるウイルス捕集装置の開発を目的として，基礎実験を行った．

1）実験には，ポリオウイルスのワクチン株を用いた．ウイルス液は精製水で10^5 PFU/mlを目標に希釈し，直径90mm高さ340mm（底部より50mmのところにガラスフィルター装着）の塩化ビニル製の筒に入れ，曝気して発生するエアロゾルと共に飛散させた．

飛散ウイルス量は，曝気によって発生したエアロゾルを冷却して回収した凝結水中のウイルス量とした．凝結水中のウイルス量は，精製水で調製したウイルス量の0.03%であった．

すなわち，曝気によって発生するエアロゾルと共に飛散するウイルス量は，液相におけるウイルス量の0.03%であると推定した．

2）飛散させたウイルスを回収する予備実験として，ウイルスを含むエアロゾルを1 *L*の精製水を入れたカラムに導入して曝気する方法，ゼータプラスフィルターで捕集する方法及び1 *L*の精製水にセルロースを懸濁させて曝気する方法で回収した．ウイルスの回収率は，精製水に曝気する方法で検出限界以下（<7.2%），ゼータプラスフィルターで，61.4%，セルロース曝気で37.5%であった．

ウイルスの回収率は，ゼータプラスフィルターで最も高かったが，フィルターの目詰まりなどを考慮して，セルロースで曝気する方法が実用的であると判断した．

3）飛散させたウイルスをセルロースで回収する条件検討を行った．その結果，直径100mm高さ330mmのカラム（底部より60mmのところにガラスフィルター装着）に0.3%以上の濃度でセルロースを懸濁させて8 *L*/分程度で曝気すると飛散させたウイルスの80%以上が回収できた．

（本研究の概要は，日本防菌防黴学会第25回年次大会1998年10月で発表した．）

文　献

1）微生物検査必携　ウイルス・リケッチア検査　第2版，1978，日本公衆衛生協会，東京．
2）USEPA：*Survey of Virus Isolation Data From Environmental Samples*, 91, 1985, New York.
3）*Standerd Methods for The Examination of Water and Wastewater* 18th Ed (American Public Health Association, 1992).
4）Kazuyoshi, Y., Yasuko, Y., Takayuki, S. and Mitumi, K.：*Water Science and Technology* **27**, 295-298, 1993.
5）上水試験方法　549-551，日本水道協会，1993.
6）日本薬学会編（1995追補）衛生試験法・注解，金原出版，1995，東京．
7）末崎拓広，田代義和，高坂良臣，小倉治夫，田口文章：日本防菌防黴学会第22回年次大会，1996，東京．
8）東京天文台：理科年表　昭和62年　436，丸善，東京．
9）矢野一好，吉田靖子，寺山　武，金子光美，市川久浩：水道協会雑誌，**59**，10-15，1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 29-32, 1998

HIV-1抗体陽性例のペプチドELISA法によるサブタイプ解析

貞升健志*, 森　功次*, 関根整治*, 田部井由紀子*, 平田一郎**,
関根大正*, 小久保彌太郎**, 味澤　篤***, 増田剛太***

Subtype Analysis of HIV-1 Seropositive Patients by Peptide ELISA

KENJI SADAMASU*, KOHJI MORI*, SEIJI SEKINE*, YUKIKO TABEI*, ICHIRO HIRATA**,
HIROMASA SEKINE*, YATARO KOKUBO**, ATSUSHI AJISAWA*** and GOHTA MASUDA***

We developped V3 peptide ELISA to distinguish between HIV-1 clade B and E serologically. Fifty-eight HIV-1 seropositive subjects (male 50, female 8) in the Tokyo metropolitan hospital were analyzed. From these, it was found that two subtypes (clade B and E) of HIV-1 existed in Tokyo. All HIV-1 patients infected by homosexual contact and contaminated blood products had clade B and the patients infected by heterosexual contact had clade E or B. Eight samples were of NR type (non-reactive for peptides), but 7 of them were of clade B and another was of clade E by nested-PCR.

Therefore, peptide ELISA is very usefull for rapid subtyping of HIV-1 except low HIV-1 antibody titer samples for clade B and E.

Keywords：ヒト免疫不全ウイルス1型 HIV-1，サブタイプB CladeB，サブタイプE CladeE，V 3 ペプチド V3 peptide，酵素抗体法 ELISA

緒　言

HIV-1(Human Immunodeficiency Virus type1)は，AIDS (Acquired Immunodeficiency syndrome，後天性免疫不全症候群）の原因ウイルスであり，1997年末現在，全世界で3,060万人以上が感染していると報告されている[1]．

近年，HIV-1はenvelope蛋白のV3ループやgag蛋白の塩基配列を用いた分子系統樹による解析により，全世界において多くのサブタイプ分類がなされている．現在，サブタイプはA，B，C，D，E，F，G，H，I，J，Oの11種類が知られており[2]，WHOの報告では日本では主としてBのみが存在すると報告されている[3]．

東京都のHIV感染者報告数は全国の32.9％を占め（1998年4月現在）[4]，都内におけるサブタイプの分布状況を把握し，サブタイプと感染地域や感染経路の関係について検討することは，疫学上重要な情報となりうる．

サブタイプ分類は，ウイルスの塩基配列決定により行うことが常法であるものの，検査に要するコスト，手間，時間や処理件数の面で，一般検査室で汎用的に行うには無理がある．

この欠点を補うために，抗体検査を利用したペプチドELISA法を開発し，都内病院のHIV抗体陽性者で，本法によるサブタイプ分類の有効性を検討し，サブタイプと感染地域や感染経路との関係を調査した．

材料および方法

1）供試試料

供試した材料は，都立駒込病院を受診した，国籍・感染原因・感染地域の判明している58例の患者由来血液（EDTA-2Na抗凝固剤入り）である(Table. 1)．

なお，すべての検体は，遠心分離操作により，血漿を分離した．血漿分離後の血液はDirect Lysis法（アンプリコア血液処理試薬：日本ロシュ）によりDNAを抽出

＊東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊ The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073, Japan
＊＊東京都立衛生研究所微生物部
＊＊＊都立駒込病院感染症科

Table 1. Nationality and sex of HIV seropositive patients

	male	Female	total
Japan	47	6	53
Thailand	0	2	2
Myanmar	3	0	3
total	58	8	58

Table 2. Peptides used for ELISA

Clade B	B_{MN} type (KRKRIHIGPGRAFYTTKNII)
	B_B type (TRKSIHLGPGQAWYTTGQII)
Clade E	E_A type (TRTSITIGPGQVFYRTGDII)

した．血漿および抽出DNAは本実験まで−20℃にて保存した．

2）ペプチドELISA法

サブタイプB，Eについて検討し，サブタイプBは欧米型の標準であるMN型（B_{MN}型）およびタイで静注薬物乱用者に多く見られる型（B_B型）を，サブタイプEはタイで異性間感染で多く見られる型（E_A型）の3型を標的とした．

Ouら[5]，Cheingsongら[6]，Gurgoら[7]の報告を参考に，各型のenvelope V3領域のアミノ酸配列に対応するペプチドをカスタム合成した（㈱ペプチド研究所）(Table. 2).

各ペプチド1 mgを秤量し，リン酸バッファー(pH.7.0)にて，1 mg/mlの濃度に溶解し，原液（100倍濃度保存液）とした．Fig. 1に示した手順によりELISA測定をした．すなわち，原液をリン酸バッファーにて100倍希釈し，Nunc Co-valink 96穴マイクロタイタープレートに1

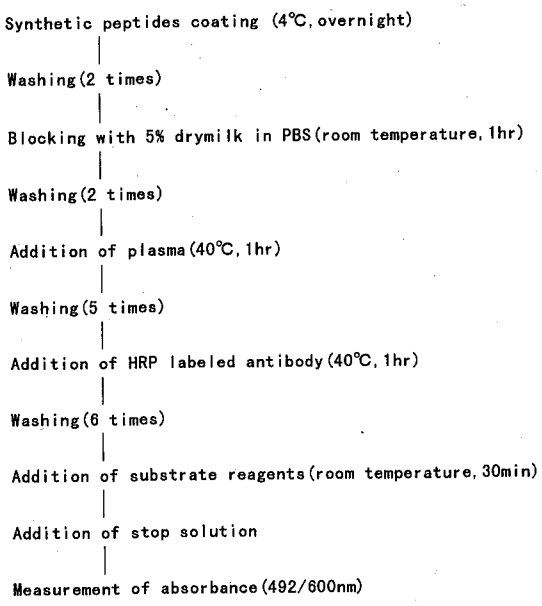


Fig.1. Schema of V3 peptide ELISA

μg/ 100μl/穴で，コーティングをした（4℃，一晩）．

洗浄液（50mM Tris･HCl pH.8.0，150mM NaCl，0.1%Tween20）で2回洗浄後，5%ドライミルクパウダー含有PBS（pH7.0）で，ブロッキングを行った（室温，1時間）．洗浄液にて2回洗浄後，5%ドライミルク含有洗浄液で100倍希釈した被検血漿100μlを各ペプチドコート穴に入れ，反応させた（40℃，1時間）．

さらに，プレート5回洗浄後，5%ドライミルク含有洗浄液で2,000倍に希釈したペルオキダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ抗体（医学生物学研究所）100μlを各穴に入れ，反応させた（40℃，1時間）．プレート6回洗浄後，OPD基質溶液各100μlを加え暗箱内にて発色後（室温，30分間），4 N硫酸50μlを加え発色停止し，主波長492nm，副波長600nmにて比色した．コントロールとして，合成ペプチドを固相化していない穴を用い，ブロッキング以降同様な操作を加え測定し，ペプチドコート穴の吸光度から，コントロール穴の吸光度を除いた値をそのペプチド固有の吸光度とし，吸光度がOD 0.5以上を呈し，かつ最大吸光度のペプチド穴をそのサブタイプ（B_{MN}型，E_A型，B_B型）と判定し，どれにも属さない例をNR(non-reactive)型とした．

3）PCR法によるサブタイプ分類法

ペプチドELISA法にてB_{MN}型であった3例，E_A型3例，NR型8例のDNAは，今井らの方法により[8]，PCR法を行い，PCR反応終了後，アガロース電気泳動を行い，特異バンドの出現の有無によりサブタイプ分類を行った．

成　　績

1．駒込病院由来陽性血清の解析

（1）感染地域別サブタイプ解析

58例の患者のうち，日本国内でHIV-1に感染した例は45例であり，海外にて感染した例が13例であった(Table. 3).

日本で感染した45例中33例はB_{MN}型に陽性であり（サブタイプB），5例がE_A型に陽性であり(サブタイプE)，7例がNR型であった．タイで感染した5例は，すべてE_A型に陽性であった．ミャンマーで感染した3例中，2例はB_{MN}型に陽性であり，1例がNR型であった．アフリカで感染した4例中，2例はB_{MN}型に陽性であり，2例がE_A型に陽性であった．台湾で感染した1例はB_{MN}型に陽性であった．また，すべての例でB_B型に反応する例は認められなかった．

（2）サブタイプ分類の有効性の検討

ペプチドELISA法でB_{MN}型に陽性であった3例とE_A

Table 3. Subtype analysis in HIV-1 infected area

infected area	serotype	B_{MN}	B_B	E_A	NR		
	genotype	B	B	E	B	E	
Japan		33	0	5	6	1	45
0verseas							
Thailand		0	0	5	0	0	5
Myanmar		2	0	0	1	0	3
Africa		2	0	2	0	0	4
Taiwan		1	0	0	0	0	1
Total		38	0	12	7	1	58

Table 4. Subtype analysis of 45 HIV-1 seropositive patients infected in Japan

Exposure category	Clade B	Clade E
Heterosexual contact	10	6
Homosexual contact	22	0
Contaminated blood products	7	0

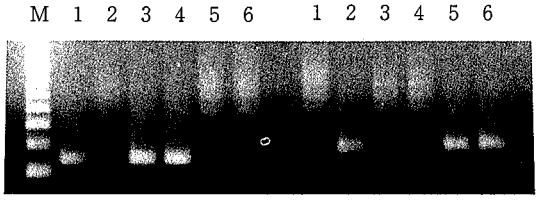
Table 5. Subtype analysis of Japanese HIV seropositive women (Infected area and subtype)

	Clade B	Clade E
Within Japan	1	2
Overseas	1	2

型に陽性であった3例について，PCR法によりサブタイプ分類を実施したところ，B_{MN}型であった3例はPCR法でサブタイプBに，E_A型であった3例はサブタイプEに分類され（Fig. 2），ペプチドELISA法とPCR法の結果が完全に一致した．また，NR型であった8例についても，PCR法により7例がサブタイプBで，1例がサブタイプEに分類された．

（3）国内感染45例の感染経路別解析

日本で感染した45例の感染原因の内訳は異性間感染が16例，同性間感染が22例，血液製剤による感染が7例である（Table. 4）．異性間感染の16例中6例はサブタイプEであり，10例はサブタイプBであった．同性間感染及び血液製剤による感染者はすべてサブタイプBであった．



Clade B specific primer Clade E specific primer

Fig.2. Clade distinction between B and E by nested-PCR (M：100bp Marker, 1, 3, 4：B_{MN} type by peptide ELISA, 2, 5, 6：E_A type by peptide ELISA)

また，日本女性感染者6例中3例は，国内感染であり（Table.5），3例が海外における感染であった．国内感染及び海外感染ともに，サブタイプBが1例，サブタイプEが2例であった．

考　察

日本におけるHIV感染者は，当初は血液製剤による感染者ならびに同性間感染が問題視されていた．しかし，1991年を境に異性間感染が爆発的に増加してきたことにより[9]，性感染症としての性格が強くなってきている．感染経路の多様化は，疫学調査において感染経路に特有なマーカーとしてのサブタイピングの重要性を高めている．また，最近は薬剤治療に重要なウイルス定量時に，検体中のウイルスのサブタイプが異なると，定量値が真の値より低く出てしまうことも報告されている[10]．従って，サブタイプを特定できるか否かは，感染源・感染経路を特定するばかりでなく，治療効果判定のためのウイルス定量においても重要な要素である．

駒込病院を診療目的で訪れた感染者のペプチドELISA法による解析では，日本，ミャンマー，アフリカ，台湾で感染した例の多くが，B_{MN}型と反応しサブタイプBに分類され，また，タイ，アフリカで感染した例が，E_A型と反応しサブタイプEと分類された．

このことは，日本[11]においてサブタイプBが，また，タイでサブタイプEが主要流行株として報告されている事実と一致した[12]。

さらに，ペプチドELISA法とPCR法によるサブタイプ分類との結果が完全に一致したことにより，本法により，サブタイプBおよびEの簡易かつ迅速な血清学的分類ができ，適当な抗原プレートが用意されれば病院検査室でも実施可能であることが示された．

しかしながら，サブタイプBやEであっても，ペプチドに対する抗体価が低い場合には，ELISA法ではNR型となってしまい，BやE以外のサブタイプなのか，あるいは単にHIV-1に対する抗体価が低いだけなのかを判別できず，鑑別のためには，PCR法により補わなければならないことも判明した．この点は今後の検討課題である．

WHOの報告では，日本には主としてサブタイプBが存在すると報告されている[3]．我々の結果では，国内感染例で同性間の性的接触，血液製剤による感染例では，サブタイプBが多いが，異性間感染の場合にはサブタイ

プB以外にサブタイプEも存在し，都内で少なくとも2種類のサブタイプが存在することが示された．

また，都内におけるサブタイプの分布状況を考えた場合，タイにおける静注薬物乱用者で見られるB_B型がなかったことから，欧米特有型であるB_{MN}型のみが，都内では同性間や異性間感染で広がったものと思われる．サブタイプE（E_A型）はタイで異性間の性的接触により広まった型として知られており，都内でも現在のところ異性間感染による感染の広がりがあることが示された．

東京都では，異性間と同様に，同性間による感染者数も多いことから，今後サブタイプEが同性間感染においてもみられるようになるか否かが注目され，また，サブタイプEは他のサブタイプに比べて，皮膚上皮細胞内のランゲルハンス細胞に感染しやすいため，異性間感染を起こしやすいという報告も存在することから[13]，異性間感染におけるサブタイプEの割合が多くなるのかについても，今後も十分監視する必要があるもののと思われる．

文　献

1）*Report on the global HIV/AIDS epidemic June 1998*, WHO, 6-75, 1998

2）Thomas Leitner：*A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos National Laboratory*, Los Alamos, NM, 1997.

3）Dale J.Hu, Timothy J.Dondero, Mark A. Rayfield., et al：*JAMA*, **275(3)**, 210-216, 1996.

4）エイズ動向委員会報告，平成10年4月末日現在届出状況

5）Ou C-Y., et al.：*Lancet*, **341**：1171-1174, 1993.

6）Chenigsong-Popov. R., et al.：*J. Infect. Dis.*, **168**, 292-297, 1993.

7）Gurgo C., et al：*Virology*, **164**. 531-536, 1988.

8）今井光信，近藤真規子，須藤弘二他：感染症学雑誌，**71(9)**，918-923, 1997.

9）貞升健志，平田一郎，関根大正：都薬雑誌，**19(5)**，50-52, 1996.

10）近藤真規子，川田かおる，伊藤　章他：感染症学雑誌，**72(6)**，609-614, 1998

11）Komiyama N., et al：*AIDS Res. Hum. Retro viruses*, **5**，411-419. 1989.

12）Osmanov S., et al：*AIDS Res. Hum. Retro viruses*, **10**，1387-1400, 1994.

13）Soto-Ramirez. LE, Renjifo B, McLane MF., et al：*Science*, **271(5253)**，1291-1293, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 33-37, 1998

アデノウイルス感染小児における免疫機能の測定

森　　功次*, 貞升健志*, 田部井由紀子*,
平田一郎*, 関根大正*

Investigation of Immunofunction in Adenovirus-Infected Infants

KOHJI MORI*, KENJI SADAMASU*, YUKIKO TABEI*,
ICHIRO HIRATA*, and HIROMASA SEKINE*

We conducted some immunofunction tests using ELISA, Flowcytometry and IL-2 ELISA kit to detect the difference in immunofunction in adenovirus- infected infants. Some differnces in immunofunction were detected in Adenovirus-infected infants, but some improvements for the detection of the adenovirus specific changes are needed.

Keywords：アデノウイルス adenovirus，サイトカイン：cytokine，免疫機能 immunofunction

はじめに

アデノウイルスは，咽頭炎や気管支炎などを引き起こす病原ウイルスの一つである．加えて，咽頭性結膜炎（プール熱）や流行性角結膜炎などの眼疾患，乳幼児の胃腸炎，下痢症など消化器疾患の原因ともなるが，ウイルス関連血球貪食症候群（Virus Asociated Hemophagocytic Syndrome：VAHS）と関連することもある[1]。

今回我々はアデノウイルス感染に起因すると思われるVAHSを経験した。このようなアデノウイルスの重症感染時に，サイトカインの変動が症状を反映する有用なマーカーとなりうるか否かを検討する目的で，免疫機能の測定を行なったのでその結果を報告する．

材料および方法

アデノウイルス重症感染時におけるアデノウイルスそ

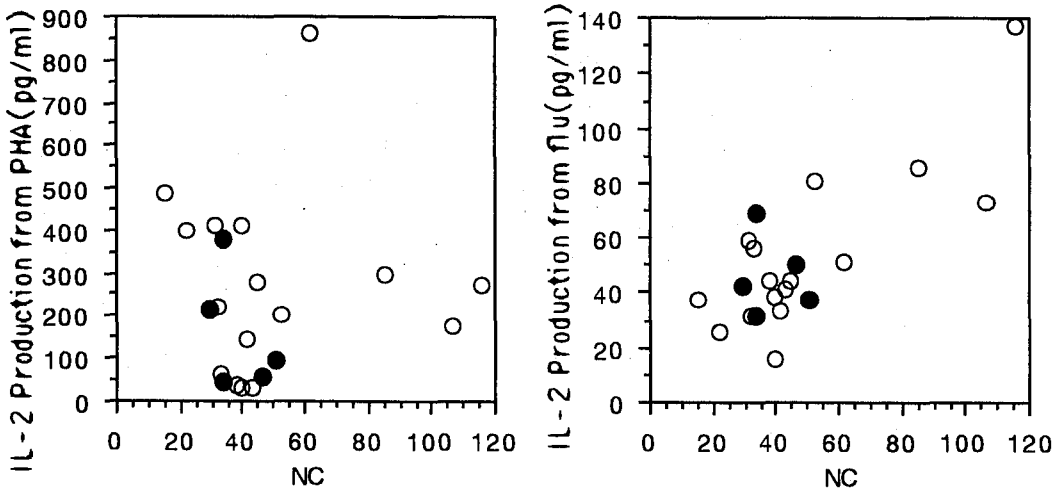


Fig. 1．Distribution of IL-2 Production
●：Adenovirus Infected Infants
○：Healthy Infants

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

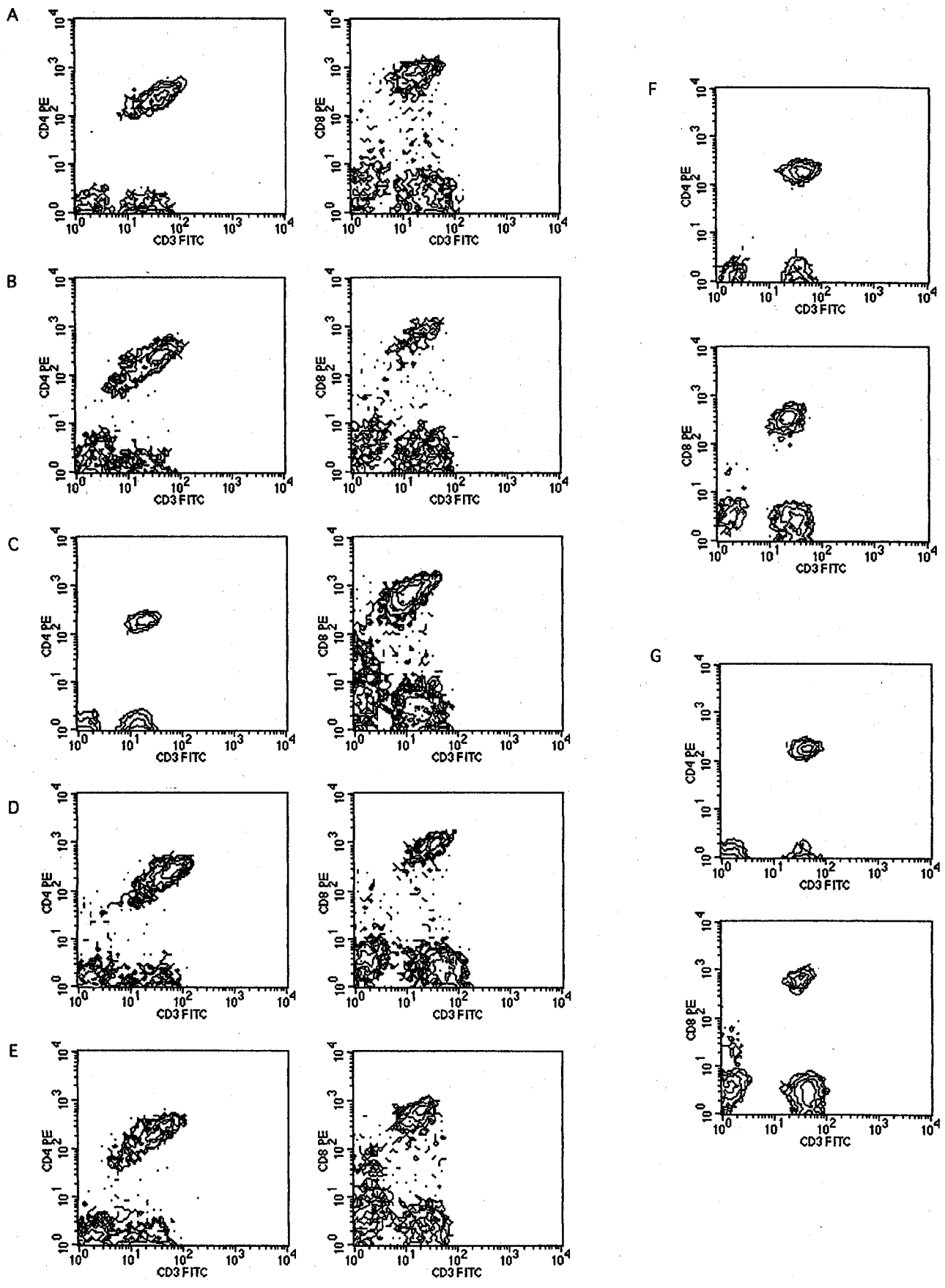


Fig. 2. Distribution of CD4 Positive Cell and CD8 Positive Cell

A－E : Adenovirus Infected Infants

F : Healthy (Adult)

G : Healthy (Infant)

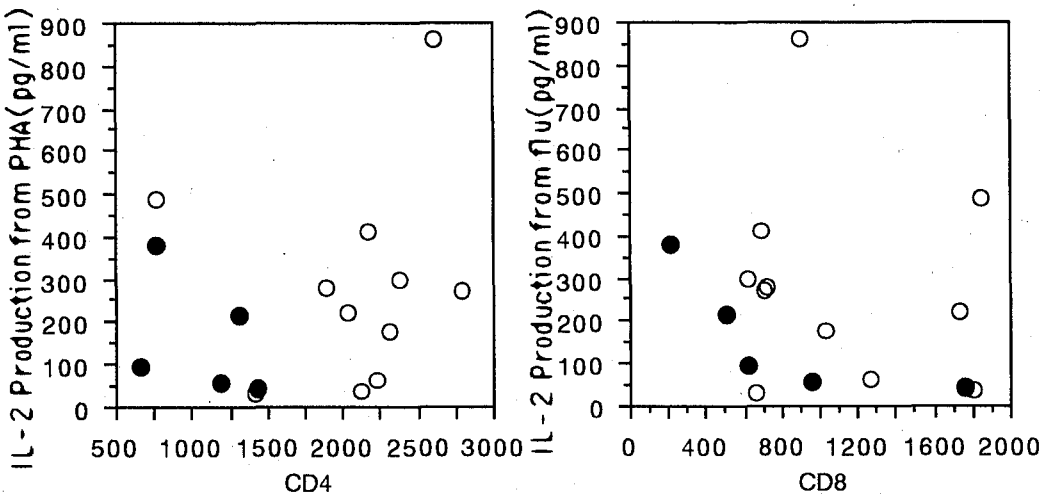


Fig. 3. Distribution of Cell Surface Antigen and IL-2 Production
●: Adenovirus Infected Infants
○: Healthy Infants

の他の外来性抗原に対する免疫機能の変化を測定する目的で，高熱，咳嗽，喘鳴，低酸素血症，気管支肺炎像，肝腫大，汎血球減少症，骨髄の血球貪食，乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の著増といった，VAHSを呈するアデノウイルス感染小児血５例を用いた．対照として健常小児血16例を用い，前報[2]の方法によりIL-2（Interleukin-2）産生能を測定した．

また感染小児血5例と健常小児血11例についてはフローサイトメトリー（FACSCalibur：Becton Dickinson社）によりリンパ球表面抗原であるCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の分布を測定した．加えて，測定時に算定用ビーズを用いCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞の絶対数を算出した．

さらに，予後とサイトカイン量の関係を検討する目的で，感染小児血清5例についてIL-6（Interleukin-6），TNF-α（Tumar Necrosis Factor-α）およびsIL-2R（Soluble Interleukin-2 Receptor）をELISA法（human Interleukin-6 ELISA, human Tumor Necrosis-α ELISA, human Soluble Interleukin-2 Receptor ELISA：Behringer Manheim社）を用いて測定した．また対照として健常小児血清28例を用いた．

結果および考察

外来性抗原刺激への反応性IL-2産生能

アデノウイルス感染症の小児と健常小児において，IL-2産生能を比較したところ，Phytohemaggulutinin (PHA)およびインフルエンザ抗原(flu)で刺激した場合とも差はみられなかった．(Fig. 1)

リンパ球の表面抗原

CD4陽性細胞の分布を比較すると，感染例は健常例に比べシグナルが５例中４例で不均一であった．また，CD4陽性細胞，CD8陽性細胞ともにT細胞のマーカーであるCD3に対するシグナルが弱いため，全体に左側への変移がみられた.この結果は，リンパ球の幼若化を示唆すると考えられた（Fig. 2）.

加えてCD4陽性細胞数およびCD8陽性細胞数を比較したところ，感染例でCD4陽性細胞数1071±339/mm^3，CD8陽性細胞数809±597/mm^{3}と健常例（CD4陽性細胞数2068±564/mm^3，CD8陽性細胞数1088±490/mm^3）に比較し陽性細胞数が少ない傾向がみられた．

IL-2産生能とリンパ球分画

そこでCD4陽性細胞数,CD8陽性細胞数とPHA抗原によるIL-2産生能の分布をみると，正常小児とは分布が異なっていた（Fig. 3）．すなわちCD4陽性細胞数,CD8陽性細胞数ともに正常小児に比べ，感染小児において減少しているが,その減少程度はCD4においてより強い．IL-2産生能も感染小児は正常小児に比較して低い傾向がみられた．細胞数の減少も相乗的な効果となって感染小児のIL-2産生能の低下は著しいものがある．細胞数の減少も細胞あたりのIL-2産生能の低下も共にリンパ球機能の消耗,枯渇を示唆しており，CD4マーカーの弱いものは未熟細胞の動員のための分化の途中の状態とも考えられる.したがってリンパ球それぞれの機能の状態に，感染例と健常例において差があることが考えられる．前述のCD4細胞としてのシグナルの弱さもこの分布の異なりと

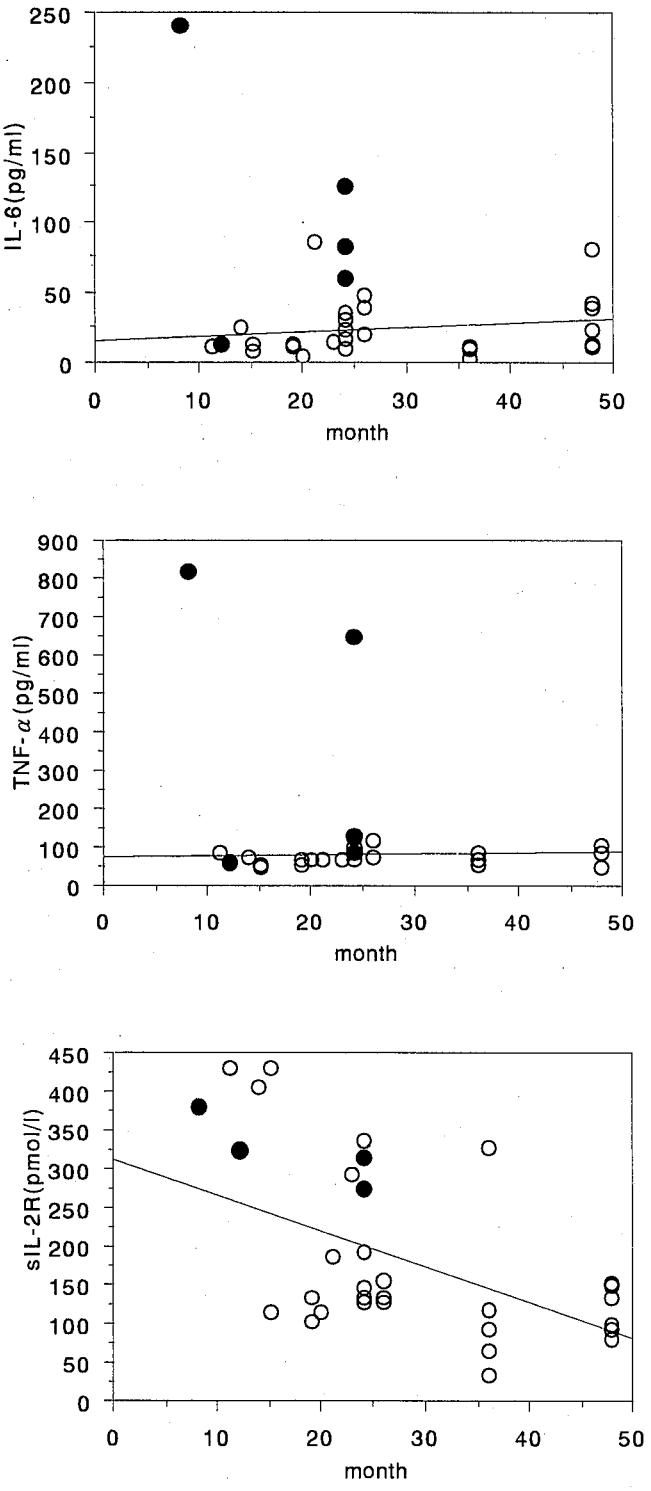


Fig. 4. Time corse of Cytokine Amount in the Infancy
●: Adenovirus Infected Infants
○: Healthy Infants

関連があると思われた.

その他の血中サイトカインの検討

血中のIL-6, TNF-αおよびsIL-2R量の測定結果をFig. 4に示した. 正常小児血清により, それぞれのバックグランドを検討すると, IL-6は加齢によるわずかな増加傾向がみられたが, TNF-αについては特に変動がみられず, sIL-2Rに関しては加齢による減少傾向がみられた.

これらの傾向に感染例をあてはめると, IL-6およびTNF-αともに5例中2例で異常値と思われる例がみられたが, sIL-2Rについては減少傾向にあてはまり,感染による異常値ではないと思われた.

VAHSとサイトカイン

病的状態をもたらす原因は, 感染症においては病原体の感染と増殖であるが, 症状の発生機序については生体側の反応が大きな役割を果たしている場合が知られている. B型肝炎における肝細胞障害は, B型肝炎のウイルス抗原に特異的な細胞障害性T細胞によってひきおこされることや, Herpes Simplex Virus (HSV)によるマウスの角膜炎がHSV抗原反応性に産生されたchemokoineによって誘導されることが, それらの例である.

近年, 小児感染症領域で注目されているものにVAHSがある. VAHSはEpstein-Barr Virus(EBV), HSV等, 様々なウイルス感染症に伴って生じる, 末梢血の特有の貪食像, 播種性血管内凝固症候群(DIC), 多臓器障害等を特長とする, 時に死にいたる重篤な症候群である. パルボウイルスやインフルエンザウイルスなどについてもVAHSと関連した報告がなされている. また, VAHSに関連し薬剤投与と血中IFN-γ(Interferon-γ)量など, 予後とサイトカインの量との関係が注目されている[3)-11)].

今回経験したアデノウイルス感染小児は, LDHが高値であり炎症性蛋白も高値を示した. 回復後も呼吸時雑音が続くなど肺組織障害が考えられたが, ステロイド療法により次第に軽快した.

VAHSはステロイドホルモンなど免疫抑制剤が効果を持つことから免疫系の関与が示唆されている, 今回測定した中に, サイトカインの血中量や反応性, リンパ球表面抗原の分布などいくつかの異常値がみられた. 血中のサイトカインの測定は単一のサイトカインの変動から特異的な病原体を検索することより, TNF-αなどの複数のサイトカインを並行に測定し, 異常値の検出による予後の判定や薬剤のウイルス増殖への抑制効果の検討に用いる方が有用であると思われる. 加えて, サイトカインを産生する細胞であるリンパ球の分布や反応性の変化も予後に大きく関与することが考えられる. 今後VAHSに限らず, これらの項目を組み合わせた免疫機能の検出系を考えていきたい.

参考文献

1) *NIKKEI MEDICAL*, 89-91, 1997.

2）森功次，貞升健志，田部井由紀子他：東京衛研年報，**48**，47-51，1997.
3）Kono T, Takigawa M, Nishimura F, et al：*J. Periodont*, **68**, 1223-1230, 1997
4）Imasuku S：*Int. J. Hemato.*, **166**, 135-151, 1997.
5）Tsuda H, Shirono K：*Br. J. Haematol.*, **93**, 572-575, 1996.
6）Su IJ, Wang CH, Cheng AL, et al.：*Leuk. Lymphoma.* **19**, 401-406, 1995.
7）Shirono K, Tsuda H：*Eur. J.Haematol.*, **55**, 240-244, 1995.
8）Watoson HG, Goulden NJ, Manson LM, et al：*Br. J. Haematol.*, **86**, 213-215, 1994.
9）Ohga S, Matuzaki A, Nishizaki M, et al：*Am. J. Pedatr. Haematol. Oncol.*, **15**, 291-298, 1993.
10）Ishii E, Ohga S, Aoki T, et al：*Acta. Haematol.* **85**, 93-99, 1991.
11）Azuma E, Tabata N, Shibata T, et al：*Am. J. Haematol.*, **35**, 266-268, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 38-42, 1998

自動免疫蛍光測定装置(VIDAS)による*Listeria monocytogenes*の検査法の検討

飯田　孝*, 神崎政子*, 宮崎奉之*, 丸山　務**

Study on Examination Method of *Listeria monocytogenes* using *Vitec* Immuno Diagnostic Assay System (VIDAS)

TAKASHI IIDA*, MASAKO KANZAKI*, TOMOYUKI MIYAZAKI*, and TSUTOMU MARUYAMA**

Keywords：自動免疫蛍光測定装置 VIDAS，リステリアモノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*，検出 detection，検査 examination.

はじめに

リステリア属菌は土壌，河川水など自然界や牛，鳥，魚等の動物に広く分布していることが知られている[1]．その中の1菌種である*Listeria monocytogenes* は人や動物に髄膜炎あるいは脳炎，流産，敗血症などの症状を呈する重要な人獣共通感染症起因菌である[1]．本症が食品を介しても起きることは1980年初めに発生したリステリアの集団感染例[2]を契機に行われた疫学調査で明らかにされた[3]．以来，乳や食肉を主原料とするチーズ，ミートパテ，アイスクリーム及び生で食べる加工済みのready-to-eat食品が感染源として注目されている[4]．これらの食品を対象にリステリア症の予防を目的として実施されている検査は，結果をより早く，より確実に安定して得る必要がある．そのために，近年免疫学的手法であるELISA法，分子生物学的手法のDNAプローブ法あるいはPCR法などを応用した検出キットが開発され[5,6]用いられるようになってきた．中でも，免疫的手法を用いた自動免疫蛍光測定装置(VIDAS)は，増菌培地，検出用試薬の製品管理が行われているだけでなく，試薬の添加，置換などが自動的に行われ*L.monocytogenes* が同定できることから[7]検査室での需要が増している．今回はこのVIDASにおける*L.monocytogenes*の検出感度，特異性について検討を行った．

材料及び方法

1．供試菌株

*L.monocytogenes*の標準菌株として ATCC49594 (Scott A)， ATCC43256 (メキシカンチーズ由来株：以下メキシカン株)の2株，髄膜炎や腎不全の患者から分離した*L.monocytogenes* 5株，食品及び動物糞便から分離した *L.monocytogenes* 3 株， *L.innocua* 26株，*L.ivanovii* 9株，*L.seeligeri* 3 株，*L.welshimeri* 3 株，*Jonesia denitrificans* 1 株，*Staphylococcus aureus* 1 株の合計51株を用いた．これらの供試菌株はTryptose broth (TB: Difco)で37℃，18時間2代継代培養して菌数が 5×10^8～10^9個/mlに発育したものを供試菌液として用いた．

2．検体

市販の鶏肉10検体，牛肉5検体を用いた．

3．食肉中におけるリステリアの分離及び同定

増菌培養は食肉10gを90mlのUVM modified Listeria enrichment broth (UVM: Difco)に加え，30秒間ストマッカーにかけて食肉を粉砕後，30℃，48時間行った．この方法をUVM増菌法とした．また，増菌培地をFraser (bioMe'rieux)に置き換え30℃，24時間培養後，その1mlを9mlのhalf-Fraser (bioMe'rieux)に加えて，30℃，24時間培養する方法をFraser増菌法とした．

分離はPALCAM-Listeria-selectiveagar (PALCAM寒天培地: Merck)にガラス棒で培養液を画線塗抹して30℃，48時間培養後に発育した直径約2mmの灰緑色で中心部に黒色の凹みがあり，集落周囲が黒褐色を呈した集落を釣菌する方法で行った．菌はその後，Tryptose agar (TA: Difco)上で単離し，性状試験を行ってグラム陽性短桿菌，30℃で運動性があり，カタラーゼ陽性，VP反応陽性，5％ヒツジ血液加寒天培地を用いたCAMPテストでβ溶血性を示し，キシロース陰性，ラム

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Reseach Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakuninchо, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 麻布大学環境保健学部

ノース陽性，マンニトール陰性を示した菌を*L.monocytogenes*と同定した．この*L.monocytogenes*をPALCAM寒天培地で分離し，菌種を決定する方法を分離同定法とした．

4．菌数の測定法

1）ATP法

添加回収実験に用いた*L.monocytogenes* の菌数は，菌が保有するATPをCell lysis system (Promega社)キットを用いて測定し,その値から*L.monocytogenes* により作製した検量線を用いて求めた．

2）表面塗抹平板法

添加又は回収した菌数を確認するために，添加又は回収した菌液を生理食塩水で10倍段階希釈し，その0.1mlずつをTAにコンラージ棒で塗抹した．平板は37℃，24時間培養後，30以上300個以下の集落が認められた平板について菌数測定を行った．夾雑菌の多い食肉の培養液では*L.monocytogenes*の菌数をTAの代わりにPALCAM寒天培地で求めた．

5．自動免疫蛍光測定装置(Vitec Immuno Diagnostic Assay System: bioMe'rieux)

VIDASは蛍光基質を用いた酵素免疫測定法(Enzyme linked fluorescent assay)で，試薬，緩衝液，酵素等の入った10のウェルから成る1本のストリップと*L.monocytogenes* 抗体が結合したピペットチップ様のスパーからなるキットと試薬との反応及び蛍光測定を自動で行う機器で構成されている．

6．VIDASによる菌の検査

1）交差反応試験

供試菌51株の供試菌液を100℃，10分間加熱してVIDASにより検査した．

2）検出限界

L.monocytogenes(Scott Aとメキシカンの2株)及びVIDASで陽性となった*L.ivanovii* 5株はFraser，UVM及びTBの各培地で培養後，それぞれ生理食塩液で10倍階段希釈して10^6，5×10^6，10^7/mlになるようにATP測定法により菌数を調製した．さらに表面塗抹平板法により菌数の再確認を行った．階段希釈した菌液は100℃，10分間加熱してVIDASにより検査した．

7．牛肉及び鶏肉への*L.monocytogenes*の添加実験

1）食肉培養液の加熱処理がVIDASの検査に与える影響の検討

分離同定法及びVIDASでリステリアが陰性の鶏肉及び牛肉各10gを3検体ずつ作製し，それを90mlのTB及びUVMに加えて，30℃，24時間培養した．この1代培養液1mlを再度9mlの新鮮なUVMに加え，同様の培養条件で培養して2代継代培養液を作製した．1代及び2代継代培養液にScott A株を10^6，5×10^6，10^7，5×10^7個/ml添加して100℃，10分間加熱後VIDASで検査した．

2）Fraser増菌法で培養した食肉培養液がVIDASの検査に与える影響の検討

分離同定法及びVIDASでリステリアが陰性の鶏肉及び牛肉各10gを3検体ずつ作製し，そこにScott A株を10個添加して90mlのTB及びFraser増菌法で培養した．その培養液は100℃，10分間加熱後VIDASにより検査した．

3）食肉に添加した*L.monocytogenes*及び*L.ivanovii*の培養後の菌数とVIDASによる検査

分離同定法及びVIDASでリステリアが陰性の鶏肉及び牛肉各10gに10個，10^2個，10^3個のScott A株を添加した後，Fraserで24時間培養後，菌数測定とVIDASによる検査を行った．Fraser増菌培養液1mlは9mlのharf-Fraserに添加して同様の培養条件で培養後の菌数測定とVIDASによる検査を行った．菌数測定はPALCAM寒天培地を用いた表面塗抹平板法により行った．

4）PALCAM寒天培地を用いた培養法の検討

分離同定法及びVIDASでリステリアが陰性の鶏肉及び牛肉10gをそれぞれ3検体ずつFraserで24時間培養後，その培養液及びTBにScott A株を10^2,10^3,10^4個/mlになるように添加した．良く撹拌した後，直ちにPALCAM寒天培地に各50μlずつ塗抹して30℃，24時間培養した．PALCAM寒天培地上に発育した集落は綿棒でかき取り，2mlの生理食塩液に懸濁した．その懸濁液を100℃，10分間煮沸した後VIDASにより検査した．この方法をPALCAM増菌法とした．

8．食肉から分離同定法及びVIDASによるリステリアの検査

鶏肉10検体及び牛肉5検体をFraser増菌法で培養後，その菌液をPALCAM寒天培地で30℃，48時間培養して，リステリアの分離を行った．VIDASによる検査はFraser増菌法及びPALCAM増菌法で得た培養液を加熱処理した検査試料を用いて行った．

結　果

1．VIDASによる交差反応試験及び検出限界

供試菌株51株を用いてVIDASの*L.monocytogenes*に対する反応特異性を調べた．結果，表1に示したように*L.monocytogenes* は100%(8/8)，*L.ivanovii* は55.6%

(5/9)が陽性を示したが，*L.innocua*，*L.seeligeri*，*L.welshimeri*，*J. denitrificans* 及び*S. aureus* はすべて陰性であった．VIDASによる*L.monocytogenes* の検出限界は表2に示した様にTBで培養したScott A株及びメキシカン株は共に5×10^6個/mlで差は見られなかった．VIDASで陽性を示した*L.ivanovii* の検出限界は表2に示したように*L.monocytogenes* と同じ5×10^6個/mlであった．

表1．VIDASによる交差反応試験

菌　株	菌株数	陽性数(%)
L.monocytogenes	8	8(100)
L.innocua	26	0
L.ivanovii	9	5(56)
L.seeligeri	3	0
L.welshimeri	3	0
J.denitrificans	1	0
S.aureus	1	0

表2．VIDASによる*L.monocytogenes* 及び*L.ivanovii*の検出限界

添加菌	VIDASによる検査		
	10^6	5×10^6	10^7個/ml
Scott A	+	+	−
メキシカン	+	+	−
L.ivanovii[1]	+	+	−

1) VIDASで陽性を示した5株

2．食肉培養液の加熱処理がVIDASの検査に与える影響の検討

VIDASでは100℃，10分間加熱した培養液を検査試料とする.その試料が蛋白を多く含む食肉培養液であった場合，加熱処理が，VIDASの検査にどのような影響を及ぼすのか調べた．リステリア陰性の鶏肉及び牛肉の1代UVM培養液と食肉を含まないTBにScott A株を5×10^6，10^7，5×10^7個/ml添加した後、VIDASで検査した．その結果，表3に示したようにTBでは5×10^6個/ml，鶏肉1代UVM培養液では5×10^7個/mlの菌数でVIDASが陽性を示した．しかし，鶏肉及び牛肉の2代継代UVM培養液を用いるとTBと同じ5×10^6個/mlの菌数で陽性となった．

表3．*L.monocytogenes*を添加した食肉培養液の加熱処理後のVIDASによる検出限界

培養液	VIDASによる検査			
	10^6	5×10^6	10^7	5×10^7個/ml[3]
TB	−	+	+	+
鶏肉1代[1]	−	−	−	+
牛肉1代[1]	−	−	−	+
鶏肉2代継代[2]	−	+	+	+
牛肉2代継代[2]	−	+	+	+

1) 鶏肉及び牛肉各3検体をUVM増菌法で培養

2) 1) をUVM培地で24時間培養

3) Scott A株添加菌数

3．Fraser増菌法で培養した食肉培養液がVIDASの検査に与える影響の検討

蛋白を多く含む食肉培養液がVIDASの検査に与える影響について，リステリア陰性の鶏肉及び牛肉をFraser増菌法で培養し，得られた培養液に10^6，5×10^6，10^7個/mlのScott A株を添加して調べた．その結果，表4に示したようにScott A株を鶏肉及び牛肉培養液に添加した場合とTBのみに添加した場合では，どちらも検出限界は5×10^6個/mlで変わらなかった．

表4．食肉培養液におけるVIDASの検出限界

培養液	VIDASによる検査		
	10^6	5×10^6	10^7個/ml[1]
TB	−	+	+
鶏肉[2]	−	+	+
牛肉[2]	−	+	+

1) 培養液に添加したScott A株の菌数

2) 各3検体をFraser増菌法で培養

4．食肉に添加した*L.monocytogenes*及び*L.ivanovii*の培養後の菌数とVIDASによる検査結果

次に，リステリア陰性の鶏肉及び牛肉に添加した*L.monocytogenes* 及び*L.ivanovii* の培養後の菌数を調べた．添加したScott A株10個/mlは，Fraserで24時間培養後，菌数をPALCAM寒天培地を用いた表面塗抹平板法により測定した．その結果，表5に示したように鶏肉に添加した菌は24時間培養後に10^8個/mlに増殖した．牛

表5．食肉に添加した*L.monocytogenes*及び*L.ivanovii*の培養後の菌数とVIDASによる検査

食肉　培養液	*L.monocytogenes*[1]		*L.ivanovii*[1]	
	菌数	VIDAS	菌数	VIDAS
鶏肉 Fraser[2]	10^8	+	10^8	+
harf-Fraser[3]	10^8<	+	10^8<	+
牛肉 Fraser[2]	3×10^7	+		
harf-Fraser[3]	10^8<	+		

1) 食肉に添加した菌数10個/ml

2) Fraserで24時間培養

3) 2)の培養液をharf-Fraserで24時間培養

注）10^8<：10^8個/ml以上

肉では，これよりやや低い3×10^7個/mlの菌数であったが，この培養液をharf-Fraserで再度培養することにより，菌数は10^8個/ml以上になった．一方，*L.ivanovii*を鶏肉に添加した場合も*L.monocytogenes*と同じ増菌量であった．

5．食肉から分離同定法及びVIDASによるリステリアの検査結果

鶏肉及び牛肉をFraser増菌法で培養後，その培養液をVIDASにより検査した．VIDASが陽性となった検体はリステリアの分離・同定を行い，菌種を決定した．その結果，表6に示したようにVIDASで陽性となった検体はNo.12と14の牛肉であった．一方，分離培養でPALCAM寒天培地上にリステリア様の集落が認められた検体はNo.1，2，4，5，6，7の鶏肉6検体，No12とNo14の牛肉2検体の計8検体であった．同定の結果，No.1，2，12，14から*L.monocytogenes*が検出された．

表6．分離同定法及びVIDASによる食肉からのリステリアの検出

検体		分離同定[1]	VIDASによる検査	
番号	由来		Fraser増菌法	PALCAM増菌法
1	鶏肉	*L.monocytogenes*	−	+
2	鶏肉	*L.monocytogenes*	−	+
3	鶏肉		−	−
4	鶏肉	*L.innocua*	−	−
5	鶏肉	*L.innocua,L.ivanovii*	−	+
6	鶏肉	*L.welshimeri*	−	−
7	鶏肉	*L.welshimeri*	−	−
8	鶏肉		−	−
9	鶏肉		−	−
10	鶏肉		−	−
11	牛肉		−	−
12	牛肉	*L.monocytogenes*	+	+
13	牛肉		−	−
14	牛肉	*L.monocytogenes*	+	−
15	牛肉		−	−

1) Fraser増菌法で培養

6．PALCAM寒天培地を用いた培養法の検討

分離同定法とVIDASによる*L.monocytogenes*の検出率が一致しなかったことからPALCAM増菌法による*L.monocytogenes*の検出を試みた．リステリアが陰性の鶏肉をFraserで24時間培養後，その菌液に*L.monocytogenes*を10^2，10^3，10^4個/mlになるように添加し，良く撹拌後に，PALCAM増菌法を行った．その結果，表7に示したようにFraserに*L.monocytogenes*が10^3個/ml存在していればVIDASで検査できることがわかった．そこで，このPALCAM増菌法を用いて食肉15検体を培養し，VIDASで*L.monocytogenes*を検査した．その結果，表6に示したようにFraser増菌法ではNo12と14の2検体のみが陽性であったのに対してPALCAM増菌法ではNo.1，2，5，12の4検体が陽性になった．

表7．VIDASでPALCAM増菌法を用いた時の*L.monocytogenes*の検出に要する菌数

培養液	VIDASによる検査		
	10^2	10^3	10^4個/ml[1]
TB[2]	−	+	+
鶏肉[3]	−	+	+
牛肉[3]	−	+	+

1) 培養液に添加したScott A株の菌数

2) TB培養後PALCAM寒天培地で培養

3) 各3検体をPALCAM増菌法で培養

考　察

今回用いたVIDASは*L.monocytogenes*の増菌培地や菌検査試薬がロットごとに品質管理され，工場で1検体に使用される分量が試薬ごとに分注されていること，菌検査及び同定試験は機械が自動的に行うので検査の習熟度による誤差が発生しないことなど，信頼性が比較的高い検査法である．しかし，VIDASは*L.monocytogenes*に対する特異性や検出感度を十分理解した上で使用しないと，結果を読み誤る恐れもある．そこで51株の供試菌を用いてVIDASの特異性を調べた結果*L.ivanovii*と54%(4/9)交差することがわかった．今回調べた*L.ivanovii*はすべてFraser，UVMでVIDASの検出限界以上に増菌されたが，9株中5株がVIDASで陰性を示した．これらの菌株は，本キットに反応する抗原を持たないか，あっても抗原量が少ない株ではないかと考えられた．その他に本キットと交差する可能性のある菌株として，以前リステリアに分類されていた*J.denitrificans*や，抗原抗体反応において菌が産生するprotein Aが抗体のFC部分に結合して非特異反応を起こすことが知られている[8] *S.aureus*があるが，いずれもVIDAS陰性であった．このように，VIDASは*L.monocytogenes*以外の*L.ivanovii*とも陽性を示すことから，菌を分離して，その性状を調べ*L.monocytogenes*であること確認しなければ陽性と判定できないことがわかった．

VIDASは培養液中に*L.monocytogenes*が5×10^6個/ml以上存在すると陽性を示した．しかし，蛋白を多く含む鶏肉，牛肉の培養液ではVIDASの検出感度は2オーダー低下した．その理由として，食肉の培養液を100℃で加熱すると肉の蛋白が変性して，そこに菌体抗

原が吸着されるためと考えられた．さらに，変性した蛋白はスパーの吸引口を塞ぎ検査が不正確になることもある．そこで，本検査では，蛋白を多く含む検体は2代継代培養を行うことで，食肉を含まない培養液と同じ検出限界を得られることがわかった．

食肉が*L.monocytogenes*の増殖に与える影響を鶏肉，牛肉に添加した*L.monocytogenes*で調べた.その結果，今回用いた食肉では，添加した10^2個/mlの*L.monocytogenes*が24時間培養後に3×10^7個/ml以上になり，それを2代継代培養すると10^8個/ml以上になった．このことから，2代継代培養を行えば食肉の成分あるいは付着菌が*L.monocytogenes*の増殖を抑制することはほとんど無いと思われた．しかし，食肉に*Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*等の菌が付着していると増菌培地中で*L.monocytogenes*の増殖抑制が起きることから[9]，VIDASを用いた食品の検査では，これらの菌の増殖を抑えた増菌法を検討した上で実施することが重要である．

次に，食肉を用いて*L.monocytogenes*の検出を試みたところ，分離同定法で*L.monocytogenes*が分離された4検体のうち，VIDASで陽性となったのは2検体であり，検査法による検出率の差が見られた．その理由として，食肉中の*L.monocytogenes*は乾燥，低温等の損傷を受けている可能性が高く，そのため選択増菌培地で発育が抑制されたり，増殖してもVIDASの検出限界以下であった[10]ことが考えられる．また，分離同定法では10^3個/mlの*L.monocytogenes*が増菌培地中に存在すれば検出できるのに対してVIDASでは，5×10^6個/mlの菌を必要とすることなどが分離同定法で*L.monocytogenes*の検出率が高くなった原因と考えられる．

そこで*L.monocytogenes*を寒天培地で増菌するPALCAM増菌法の検討を行った．その結果，PALCAM増菌法では前増菌液のFraserに10^3個/ml以上の*L.monocytogenes*が存在すればVIDASで陽性となることがわかった．このPALCAM増菌法とFraser増菌法及び分離同定法の*L.monocytogenes*の陽性数を比較すると，分離同定法では陽性数が食肉15検体中4検体であったのに対して，Fraser増菌法とVIDASの組み合わせでは2検体，PALCAM増菌法とVIDASの組み合わせでは3検体であった．このようにPALCAM増菌法はFraser増菌法に比べて，VIDASの検査に必要な菌量を効率よく得ることができる良い増菌法であることがわかった．

VIDASのマニアルには検査対象別に今回検討した増菌法が記載されている．これは，すべての食品に対応した統一した*L.monocytogenes*の検査法が確立されていないためである．従って，検査の目的と検査材料に合った方法を選択して効率よく*L.monocytogenes*を検査していかなければならないが，食肉で調べた結果ではFraserで前増菌後PALCAM増菌法を行う方法が，多少手間はかかるがVIDASの検査に適していることがわかった．VIDASを用いた検査では*L.monocytogenes*が，検出限界以上に増菌できる培養法の検討と，*L.ivanovii*で認められた非特異反応を無くすなど，解決すべき問題はあるが，自動的に*L.monocytogenes*汚染試料をスクリーニングできる点は高く評価できる．今後上記の問題点を把握した上で使用すれば食品中の*L.monocytogenes*の検査への利用価値は高いと考えられた．

謝　辞

本研究を行うに当たり協力いただきました麻布大学環境保健学部青木良江さんにお礼申し上げます．

文　献

1）小久保彌太郎：臨床検査, **39**, 1001-1007, 1995.
2）丸山務：*New Food Ind.*, **30**, 22-25. 1988.
3）Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G. W. *et al. In* Elliot T. R.and Elmer H. M.(eds.), *Listeria ,Listeriosis and foood safety*, 240-288, 1991. Dekker, Inc. Press, New York.
4）飯田孝，神崎政子，伊藤武，丸山務：東京衛研年報, **43**, 87-91. 1992.
5）Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G. W. *et al. In* Elliot T. R.and Elmer H. M.(eds.), *Listeria ,Listeriosis and foood safety*, 194-239, 1991. Dekker, Inc. Press, New York.
6）Herman, L.：*Food Microbiol.*, **14**, 103-110,1994.
7）Mabilat, C., Bukwald, S., Machabert, N. *et al.*：*Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 333-340, 1996.
8）Ito,W. and kurosawa, Y.：*J. Biol. Chem.*, **268**, 20668-20675, 1993.
9）Sulzer, G. and Busse, M.：*Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 287-296. 1991.
10）Golden, D. A., Beuchat, L. R. and Brackett, R. E.：*Food Microbiol.*, **5**, 17-23.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 43-46, 1998

*Listeria monocytogenes*が産生するP60蛋白検出キットの評価

飯田　孝*, 林　亨子**, 神崎政子*, 宮崎奉之*

Evaluation of Detection Kit of P60 Protein Produced by *Listeria monocytogenes*.

TAKASHI IIDA*, KYOKO HAYASHI**, MASAKO KANZAKI*
and TOMOYUKI MIYAZAKI*

Keywords：リステリア　モノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*, P60蛋白 P60 protein, 検出 detection, 評価 evaluation

はじめに

*Listeria monocytogenes*は6菌種から成るリステリアの1菌種で自然環境，動物，食品など広い範囲に分布しており，人や動物に流産，敗血症，脳炎などの病気を起こすことが知られている[1]．

1980年始めに*L.monocytogenes*に汚染されたチーズ，食肉加工食品等が原因でリステリア症の集団発生が欧米諸国で認められた[2]．このことが契機となって，食品から簡易迅速に*L.monocytogenes*を検出するための検査キットが開発されたが[3]，初期に開発されたキットは*L.monocytogenes*に特異的なものではなく6種類のリステリア全てに反応するものであった[3]．その後開発された*L.monocytogenes*のみを検出するキット[4-6]の中でELISA[5]，VIDAS[6]等抗菌体抗体を使ったキットでは特異性が低く，*L.monocytogenes*以外のリステリアとの交差も認められた[3,7]．そこで今回抗菌体抗体以外の*L.monocytogenes*が増殖時に産生するP60蛋白を使った検出キットが開発されたので，その特異性，検出感度について検討を行った．

材料及び方法

1．供試菌

供試菌は患者由来の*L.monocytogenes*（JTE 90-3020：Scott A）1株，食品，動物，環境材料から分離した*L.monocytogenes*（JTE 89-253, 89-456, 90-20, 90-1080）4株，*L.innocua*（JTE 89-137, 89-138, 90-713, 91-580）4株，*L.ivanovii*（JTE 90-232, 90-3011, 91-3019）3株，*L.welshmeri*（JTE 89-420, 91-3100, 91-3107）3株，*L.seeligeri*（JTE 89-422）1株，*Staphylococcus aureus*（JTE 95-7, 95-15, 95-34）3株の計19株を用いた．供試菌株は700μlのBrain heart infusion液体培地（BHI：Difco）で30℃，18時間培養後，さらに同様の条件で2代培養を行い，菌数が5×10^8～10^9個/mlの菌液を供試菌液として検査に用いた．添加回収実験は全て*L.monocytogenes*（Scott A）で行った．

2．検査材料

市販の牛肉，豚肉，鶏肉を各3検体ずつ用いた．

3．P60検出キット

Pathalert *L.monocytogenes*（P60キット：Merck）を用いた．

1）試料調製

試料は供試菌液又は食肉をUVM modified Listeria enrichment broth培地（UVM：Difco）あるいはL-PALCAM-Listeria selective enrichment broth培地（L-PALCAM：Merck）で増菌した培養液3mlを95℃，10分間加熱後，15,000rpmで1分間遠心分離(TOMY：MR-152)して得た上清0.1mlとP60キットに添付されている希釈液を1：1で混合して作製した．

2）操作手順

P60抗体が結合しているマイクロプレートに試料0.1mlを加え35℃，1時間反応後，抗ウサギ*L.monocytogenes*抗体，抗ウサギIgG酵素結合抗体を加え，それぞれ35℃，1時間反応させた．その後基質液，発色液を加えて

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakuninchо, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** イカリ消毒株式会社

*L.monocytogenes*に結合した酵素量をオートリーダー(SJeiaオートリーダー:三光純薬)により測定した．450nmの吸光度が0.1以上を示した検体を陽性とした．

3）類縁菌及び*S.aureus*との交差試験

供試菌液は試料調製を行った後，P60キットで検出して類縁菌及び*S.aureus*との交差を調べた．

4）検出限界

L.monocytogenes（JTE 90-3020：Scott A）及びP60キットで陽性を示した*S.aureus*（JTE 95-34）の供試菌液は生理食塩水で希釈して5×10^8，10^8，5×10^7，10^7個/mlを作成し，試料調製後，p60キットで検出して，検出限界を求めた．

4．P60キットによる菌の検出

1）増菌培地に添加した*L.monocytogenes*及び*S.aureus*の検出

UVM及びL-PALCAM培地3mlに10個の*L.monocytogenes*（Scott A）を加え，UVM培地は30℃，L-PALCAM培地は37℃で24時間培養した．その増菌液0.1mlを新鮮な各培地10mlに添加して，同様の条件で2代増菌培養した．その培養液の菌数は，増菌液を生理食塩水で10倍階段希釈して，その0.1mlをTryptose agar培地(TA: Difco)に塗抹後30℃，24時間培養する表面塗抹平板法により求めた．また，培養液は試料調製後，P60キットで検出した．

表1．P60抗原の検出

菌種	検査件数	陽性
L.monocytogenes	5	5
L.innocua	4	0
L.ivanovii	3	0
L.welshimeri	3	0
L.seeligeri	1	0
S.aureus	3	1

2）食肉中に添加した*L.monocytogenes*の増菌数及びP60キットによる検出

牛，豚，鶏の各食肉25gにUVM及びL-PALCAM培地をそれぞれ225mlずつ加え，ストマッカーで1分間良く撹拌した後，*L.monocytogenes*（Scott A）を10個添加した．それぞれの培地の設定温度で2代増菌培養した培養液は，生理食塩水で10倍階段希釈列を作成した．各希釈列の菌液0.1mlをPALCAM Listeria-selective agar培地（PALCAM寒天培地：Merck）に塗抹して30℃，48時間培養後，発育した集落数から菌数を求めた．また，培養液は試料調製後，P60キットで検出した．

表2．P60キットによる*L.monocytgenes*及び*S.aureus*の検出

菌　種	P60抗原				
	5×10^6	10^7	5×10^7	10^8	5×10^8個/ml
L.monocytogenes[1]	−	−	+	+	+
S.aureus[2]	−	−	−	−	+

1）Scott A　2）JTE 95-34

注）＋：陽性，－：陰性

表3．UVM及びL-PALCAM培地に添加した*L.monocytgenes*及び*S.aureus*の増菌数とP60キットによる検出

検　出	*L.monocytgenes*[1]		*S.aureus*[2]	
	UVM	L-PALCAM	UVM	L-PALCAM
菌数(個/ml)	8.2×10^8	4.1×10^8	$<10^5$	5.0×10^8
P60抗原	＋	＋	－	＋

1）Scott A　2）JTE 95-34

注）添加菌量　10個

表4．食肉中に添加した*L.monocytgenes*のUVM及びL-PALCAM培地における増菌数とP60キットによる検出

増菌培地	牛肉		豚肉		鶏肉	
	菌数[1]	P60[2]	菌数[1]	P60[2]	菌数[1]	P60[2]
UVM	$<10^5$	−	3.6×10^7	＋	10^5	−
L-PALCAM	1.7×10^8	＋	5.2×10^7	＋	10^7	−

1）個/ml，2）P60キットによる検出

注）添加菌及び量：Scott A，10個，＋：陽性，－：陰性

結　果

*L.monocytogenes*に対するP60キットの特異性を*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.welshmeri*, *L.seeligeri*のステリア16株，*S.aureus* 3株を用いて調べた．その結果，表1に示したように*L.monocytogenes*は5株中5株，*S.aureus*は3株中1株が陽性を示したが，その他のリステリアはすべて陰性であった．P60キットの検出限界は表2に示したように*L.monocytogenes*（Scott A）は5×10^7個/ml，*S.aureus*は5×10^8個/mlであった．

*L.monocytogenes*及び*S.aureus*各10個をUVM及びL-PALCAM培地で24時間増菌した培養液の菌数とP60キットの検出結果を表3に示した．*L.monocytogenes* はUVM培地又はL-PALCAM培地のどちらでもよく増殖してP60キットで検出できた．しかし，培養液の菌数はUVM培地の方が8.2×10^8個/mlでL-PALCAM培地の2倍であった．一方，*S.aureus*は L-PALCAM培地に添加した時のみP60キットで検出できた．その菌数はUVM培地が10^5個/ml以下，L-PALCAM培地が5.0×10^8個/mlであった．

食肉25g中に添加した10個の*L.monocytogenes*をUVM培地及びL-PALCAM培地で24時間増菌した培養液の菌数とP60キットの検出結果を表4に示した．UVM培地で*L.monocytogenes*と豚肉を増菌すると*L.monocytogenes*は3.6×10^7個/mlに増菌されたのに対して，牛肉及び鶏肉は10^5個/ml以下であった．L-PALCAM培地では，牛肉中で最も良く発育し1.7×10^8個/ml，豚肉，鶏肉はそれぞれ5.2×10^7個/ml，10^7個/mlでUVM培地より発育が良かった．

食肉中の*L.monocytogenes*はP60キットで菌数が3.6×10^7個/ml以上あると検出できた．UVM培地では豚肉，L-PALCAM培地では牛肉及び豚肉がP60キットで検出できた．増菌培地中の菌数が3.6×10^7個/ml 以下であったUVM 培地の牛肉及び鶏肉，L-PALCAM培地の鶏肉は陰性であった．

考　察

P60はリステリアの増殖時に菌体外に分泌される60KDaの蛋白である．その蛋白のC末端にはリステリアに共通のアミノ酸配列があり，N末端近くには，種が特定できるアミノ酸配列が存在している[8]．今回検討したP60キットは*L.monocytogenes* に特異的なP60蛋白のアミノ酸配列を認識する抗体で作られている．このP60キットの特異性をリステリア16株と*S.aureus* 3株の供試菌液で調べたところ，*L.monocytogenes* 以外の株で，陽性を示したのは*S.aureus*（1/3）のみであった．P60キットの特異性をBubertら[9]は*L.monocytogenes* 以外のリステリアと*Brochothrix thermosphacta, Bacillus subtilis, Erysipelothrix rusiopathiae, Pseudomonas fluorescens, Serratia liquefaciens, Streptococcus faecalis, Escherichia coli*などの菌を用いて調べ，いずれも陰性であることを証明した．しかし，Ruhlardら[8]は，免疫蛍光染色法でP60抗体と*S.aureus*が結合することを明らかにしており，Itoらも[10]，*S.aureus*の細胞表面上に存在する protein AがP60抗体のFC receptorと非特異的に反応するため*S.aureus*がP60キットで陽性を示すと述べている．今回の実験では同じ菌数の*S.aureus*を用いても3株中1株がP60キットで陽性を示した他は陰性であった．このことからprotein A産生性の良い*S.aureus* が本キットと非特異に反応したものと考えられた．

これまでに開発された種々のリステリア検出用キットの検出限界は平均して10^5～10^6個/mlであったのに対して[3]，今回調べたP60キットは5×10^7個/ml 以上の菌数を必要としたことから，本キットで*L.monocytogenes*を検出するためには効率良く菌を増菌しなければならないことが示された．そこで*L.monocytogenes*の増菌培地の中で食品，環境材料の分離に多く用いられているUVM培地と本キットの増菌培地に指定されているL-PALCAM培地における菌の発育を比較したところUVM培地は，L-PALCAM培地に比べて2倍の増菌率であることがわかった．しかもUVM培地は*S.aureus*の発育が抑制されるためP60キットで陽性にならなかったのに対して，L-PALCAM培地は*S.aureus* が5×10^8個/ml以上に発育することから，UVM培地はP60キットの増菌培地として適していると思われた．しかし，10個の*L.monocytogenes*を添加した食肉をUVM培地で増菌したところ豚肉では*L.monocytogenes* が3.6×10^7個/mlまで発育したが牛肉，鶏肉では検出限界以下の菌数であった．一方，L-PALCAM培地は鶏肉に添加した*L.monocytogenes*の発育は検出限界以下の10^7個/mlであったが牛肉，豚肉は検出限界以上に発育した．食肉中に添加した*L.monocytogenes*の増菌数が，食肉ごとに異なっていたことから，食肉中の夾雑菌が*L.monocytogenes*の増殖に影響を与えたことが考えられる[11]．UVM培地とL-PALCAM培地を比較すると夾雑菌を含まない培養液中の*L.monocytogenes*の発育はUVM培地で良かったが，夾雑菌が多い食肉では，L-PALCAM培地の方が優れておりP60キットによる成績も良かった．しかし，この検査にL-PALCAM培地を使用する場合，P60キットで陽性となった検体は，*S.aureus*による反応でないことを確認することが重要である．

P60キットは*L.monocytogenes* 以外のリステリアとは交差しなかったが*S.aureus*と交差が認められたことに加え検出限界が5×10^7個/mlと高かったことから，本キットで検査をするためには，今以上に良い選択増菌法を検討した上で行う必要がある．

文　献

1）Mclauchlin, J.：*Env. Pol. Prac.*, **3**, 201-214, 1993.

2）Fennema, O. R., Karel, M., Sanderson, G.W. *et al. In* Elliot T. R.and Elmer H. M.(eds.), *Listeria, Listeriosis and foood safety*, 240-288, 1991. Dekker, Inc. Press, New York.

3）Fennema, O. R., karel, M., Sanderson, G.W. *et al. In* Elliot T.R. and Elmer H. M.(eds.), *Listeria, Listeriosis and foood safety*, 194-239, 1991. Dekker, Inc. Press, New York.

4）Herman, L.：*Food Microbiol.*, **14**, 103-110,1994.

5）Walker, S. J., Archer, P. and Appleyard, J.：*Food Microbiol.*, **7**, 335-342, 1990.

6）Mabilat, C., Bukwald, S., Machabert, N., *et al.*：*Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 333-340, 1996.

7）飯田孝，神崎政子，宮崎奉之，他：東京衛研年報，**49**, 38-42, 1998.

8）Ruhland, G. J., Hellwing, M. Wanner, G.：*J. Gen. Microbiol.*, **139**, 609-616, 1993.

9）Bubert, A., Schubert, P., Kohler, S., *et al.*：*Appl. Env. Microbiol.*, **60**, 3120-3127, 1994.

10）Ito,W. and Kurosawa, Y.：*J. Biol. Chem.*, **268**, 20668-20675, 1993.

11）Sulzer, G. and Busse, M.：*Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 287-296, 1991.

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は，通常の行政試験検査業務の質的向上と補完とを目的に行われている．今年度は，生薬に関して4編，家庭用品に関して1編が掲載されている．

漢方方剤及び生薬は漢方薬として東洋医学の範疇に属する医薬品で，長年の経験に基づいた有効性により信頼され，今日に至っている．一方，漢方薬の有効性及び有害性を，より客観的に評価するため，現代科学の方法論を駆使した多くの調査研究が行われている．以下の4編は，その分野の成果である．

漢方薬の有効性を解明する手段として，近年，二段階発癌機構における抗発癌プロモーター作用を指標として評価する生物学的手法が注目されている．本報は，この手法により，鎮咳，鎮痛，去痰，利尿薬の構成生薬として，新陳代謝機能の亢進を目的に漢方製剤に配合されている細辛の有効性を検討した．細辛からの抽出物を*in vitro*のスクリーニング試験によって分類し，リグナン化合物のasarinin（以下，A）及びxanthoxylol（以下，X）の2種類を有効物質として得た．次いで，マウスによる二段階発癌試験を行ったところ，Aは皮膚及び肺，Xは皮膚での発癌を抑制する効果が確認された．細辛の品質調査では，市場品のA含有濃度は0.34%，Xは0.30%で，両者の含有割合の相関は高く，A含量からX含量が推定可能であると述べている．また，基原植物のウスバサイシンまたはケイリンサイシンの地上部にはA及びXはほとんど含まれていないことから，細辛の国際的な生薬規格設定には，この点を留意すべきであると提言している．

漢方薬の害作用を明らかにし，その安全性を確保するため，強壮，利尿作用があるとされる六味丸及び構成生薬が遺伝子に与える影響を検討した．その結果，六味丸にはDNAを切断する作用が認められ，有害性の一端を検証した．構成生薬別でみると，作用は地黄に強く，沢瀉及び牡丹皮はこれより弱く，茯苓，山薬及び山茱萸では明らかではなかった．地黄のDNA切断作用は，EDTAを添加した場合にのみ発現し，鉄キレート剤の添加で阻害され，カタラーゼ及びヒドロキシラジカル消去剤で抑制された．これらから，地黄のDNAに対する作用にはヒドロキシラジカル等の活性酸素が関与していると推察している．地黄を分画して得た強いDNA切断作用を示す画分A及びBのうち，AはEDTAの有無に関わらず作用を現し，Bは存在下でのみ作用した．これにより，地黄には異なる性質をもつ複数のDNA切断作用物質が含まれていることを明らかにした．

漢方薬の生体に対する影響を酵素活性の阻害作用の有無，強弱から検討することができる．これまでに，婦人薬の構成生薬として頻用される牡丹皮のエタノールエキスがNa,K-ATPase活性を強く阻害することを明らかにした．今回は，この物質を検索，精製，同定し，1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-D-glucose（以下，PGG）であることを確認した．また，PGGの作用は原料エキスよりも弱いことから，牡丹皮には他の阻害物質またはPGGの作用を増強する物質が含まれている可能性を指摘している．PGGは阻害形式が非拮抗型で，K-pNPPase活性を濃度依存性に阻害し，カリウムイオン濃度に比例して阻害率を上昇させた．さらに，Na,K-ATPaseの特異的阻害剤であるウアバインのI_{50}値（最大酵素活性を50%阻害する濃度）を変化させなかった．これらの結果から，PGGは，Na,K-ATPaseの反応過程のE_2状態に作用し，K・E_2からNa・E_1への変換を抑制することによって活性を阻害すると推測している．

ヨクイニンは日本薬局方ではハトムギの種皮を除いた種子と規定されており，生薬として解熱，鎮痛，消炎作用をもつとされている．一方，ヨクイニン及びハトムギは食品としても用いられており，これまでに食品としてのハトムギ製品の検査でカビ毒のアフラトキシンを検出，報告した．今回は生薬として入手したヨクイニン及びハトムギについて各種調査した．ヒ素及び重金属の含有量は他の報告とほぼ同じで，放射能は検出限界値の4 Bq/kg以下であった．アフラトキシンがヨクイニン5検体中1検体から検出されたがハトムギ6検体では認めら

れなかった．ヨクイニンから検出されたカビ毒は低量ではあるが，生薬は連用の可能性が高いことから，さらなる調査を期待したい．ヨクイニンに対し，有機リン系，有機塩素系，カーバメイト系等80種類の農薬を検査したが，いずれも検出限界以下であった．しかし，検体の産地が異なれば結果も異なることが予測されることから，継続的な調査が必要と思われる．

医薬品，化粧品，食品等は薬事法または食品衛生法で安全が確保されている．一方，これらを除いた衣料品，住宅用洗浄剤等の日常生活用品は「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」により安全対策がとられている．この対策の基礎として家庭用品の衛生化学的試験研究が位置づけられる．

ホルムアルデヒド（以下，HCHO）はヒトでは皮膚や眼の刺激，アレルギー性皮膚炎等が報告されている．このため，家庭用品では上記の法律により，HCHOは乳幼児用繊維製品からは検出されないこと，大人，子供用繊維製品，かつら，つけまつげ等の接着剤では75ppm以下と使用基準が設定されている．しかし，規制対象外の家庭用品であっても，HCHOが安易に，また過度に使用されるとすれば都民の健康に好ましいことではない．そこで，規制対象外の家庭用品でのHCHOの使用実態を調査したところ，繊維製品のワイシャツ，ブラウスで形態安定加工表示品に多く使用されていた．これら88検体中14検体が法規制の基準値を超えており，仮に規制対象であるとすれば16%の違反率となる．また，壁紙，カーテン，カーペット，寝具，家庭用洗浄剤等においても使用頻度は高く，壁紙，カーペットは基準値を超える製品が多かった．この調査結果は，規制対象外の家庭用品の安全性のみならず、多種多様な家庭用品から室内環境へのHCHOの拡散の危険性，不安全な家庭用品のPL法への抵触等，今後の検討課題を提起したと言えよう．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 49-54, 1998

細辛に含まれる抗発癌プロモーター作用物質とその含量による品質評価

安田一郎[*1], 浜野朋子[*1], 中嶋順一[*1], 宮武ノリエ[*1], 守安貴子[*1], 岸本清子[*1], 寺島潔[*1], 大西和夫[*1], 鈴木幸子[*2], 木島孝夫[*3], 高崎みどり[*3], 徳田春邦[*4]

Anti-Tumor-Promoting Principles in Asiasarum Root and the Evaluation on their Contents

ICHIRO YASUDA[*1], TOMOKO HAMANO[*1], JUNICHI NAKAJIMA[*1], NORIE MIYATAKE[*1], TAKAKO MORIYASU[*1], KIYOKO KISHIMOTO[*1], KIYOSHI TERAJIMA[*1], KAZUO ONISHI[*1], YUKIKO SUZUKI[*2], TAKAO KONOSHIMA[*3], MIDORI TAKASAKI[*3] and HARUKUNI TOKUDA[*4]

Two lignans, asarinin (**1**) and xanthoxylol (**2**), were isolated from the Asiasarum root, as inhibitors of Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) activation induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). These lignans also exhibited remarkable inhibitory effects on a two-stage carcinogenesis test of mouse skin, whose initiator was DMBA and the promoter was TPA, and pulmonary tumors, whose initiator was 4-NQO and the promoter was glycerol. Commercial Asiasarum roots were analyzed by HPLC and the mean of **1** was 0.34 % and that of **2** was 0.030 %. The aerial parts of *Asiasarum sieboldii* and *A. heterotropoides* var. *mandshuricum*, which are the original plants of Asiasarum root, contained little of them.

Keywords：細辛 Asiasarum root，抗発癌プロモーター作用物質 anti-tumor-promoting principles，EBV活性化抑制効果 inhibitory effects on Epstein-Barr virus early antigen activation，マウス皮膚二段階発癌 two-stage carcinogenesis of mouse skin tumors，マウス肺二段階発癌 two-stage carcinogenesis of mouse pulmonary，アサリニン asarinin，キサントキシロール xanthoxylol，品質評価 evaluation，定量分析 quantitative analysis

緒　言

漢方製剤の有効成分を特定することは難しい．それはその原料である生薬が複数の成分からなる上，漢方製剤はいくつかの生薬の組み合わせによる複合作用が治療効果となって現れるからである．昨今，複合作用を調べる生物学的手法がいくつか開発されているが，漢方製剤の有効性を解明する手段として注目されているものに，二段階発癌機構における抗発癌プロモーター作用の測定法がある．これには強力な発癌プロモーターである12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)によるEpstein-Barr virus early antigen (EBV-EA)の初期抗原誘発抑制能を指標とする*in vitro*でのスクリーニング法がある[1,2]．

著者らは先に，外用剤として皮膚疾患に用いられる紫雲膏のEpstein-Barr virus (EBV) 活性化抑制効果を調べ，構成生薬である紫根及び豚脂がその作用を担っていることを明らかにした[3]．また，十数種類の内服用漢方製剤についてもスクリーニングを行い，呼吸器系疾患に用いられる小青龍湯が極めて強い抑制効果を現し，構成生薬である細辛がその効果を示すことを確認している[4]．今回，*in vitro*で細辛に含まれるEBV活性化抑制作用物質の検索を行い，その成分を明らかにすると共に，*in vivo*でマウス皮膚二段階発癌抑制実験及び肺二段階発癌

＊1 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊1 The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊2 東京都薬用植物園
＊3 京都薬科大学
＊4 京都府立医科大学

抑制実験を行い，その抗発癌プロモーター作用を検討した．

細辛は『神農本草経』の上品に収載され，古来より鎮咳，鎮痛，去痰，利尿薬として，新陳代謝機能を亢進する目的で配合される漢方要薬である．細辛はウスバサイシン*Asiasarum sieboldii* F. Maekawa またはケイリンサイシン *Asiasarum heterotropoides* F. Maekawa var. *mandshuricum* F. Maekawa を基原植物とするものであるが，日本で用いられる生薬は，第13改正日本薬局方(局方)[5]により，その使用部位を根及び根茎と定め，地上部の混入は10%以下に規定されている．一方輸出国である中国では，日本の局方に相当する薬典[6]において，特に使用部位の規定がなく，地上部を含めた全草を細辛として使用している．市場品を中国からの輸入に依存している現状を鑑みると，このような両国間の規格の相違は，生薬の品質の混乱を招き，ひいては漢方製剤が正しい治療効果を現す妨げともなりうる．そこで今回明らかにした抗発癌プロモーター作用物質について，市場品細辛並びに基原植物の部位別含量を明らかにし，細辛の規格について考察した．

実験の部

1．実験材料

植物：ウスバサイシンは福井県大野市野生品(A)及び東京都薬用植物園栽培品(B)を，ケイリンサイシンは東京都薬用植物園栽培品2種(C，D)を用い，水洗後地上部と地下部に分け，約2週間日陰にて乾燥した．

生薬：東京市場品細辛7ロットをそのまま用いた．

2．試薬及び実験動物

TPA及び7,12-dimethylbenz[a]-anthracene (DMBA)はシグマ製，4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO)は和光純薬製を，その他の試薬はナカライテスク製を用いた．

実験動物はICR雌性マウス（6週齢，静岡実験動物）を使用した．

3．EBV活性化抑制効果の測定

EBV活性化抑制効果測定用試料は約10 mgを無水エタノール1 mlに溶かし，これをジメチルスルホキシドで100，10，1 μg/mlの濃度に希釈し，既報[3]の方法に準じてEBV活性化抑制試験を行った．

使用したRaji細胞は，1×10^6 cell/mlの濃度に調製し，4 mM酪酸，32 pM TPA及び各種濃度に調製した試料を加え，37℃，48時間培養し，EBV-EA陽性細胞の発現を観察した．その効果は，上咽頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法[7]により算出し，抑制率を%で表した．

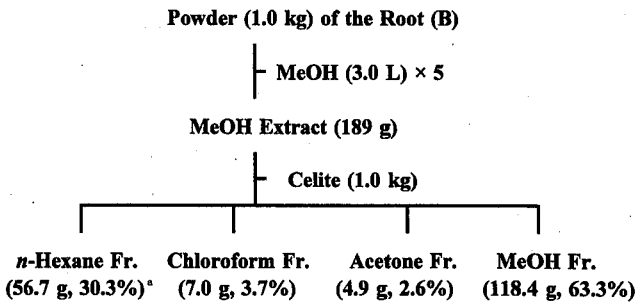


Fig. 1. Flow Diagram of Extraction and Fractionation of Root of *Asiasurum sieboldii* (B)
a : % of yield, on the basis of MeOH ext..

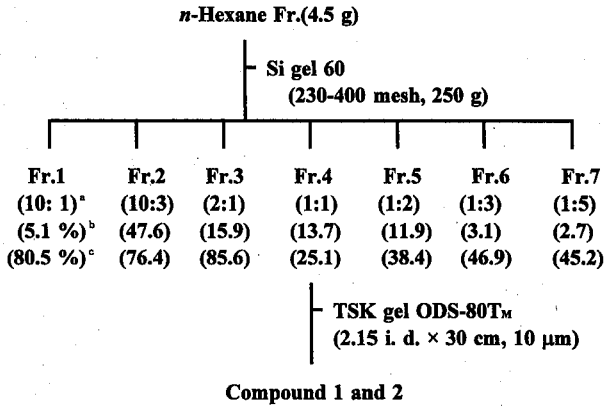


Fig. 2. Flow Diagram of Isolation of (-)-Asarinin (1) and Xanthoxylol (2) from the *n*-Hexane Fraction
a : Eluted solvent, made of *n*-Hexane/ethyl acetate mixture.
b : % of yield, on the basis of *n*-Hexane Fr..
c : % of EBV-EA induction at 10 μg/ml with respect to positive control.

4．ウスバサイシンのメタノール抽出物から作用物質の単離

ウスバサイシン(B)の地下部乾燥品を粉末とし，その1.0 kgにメタノール3.0 Lを加え，室温で2日間静置し抽出した．本操作を5回繰り返した後，抽出液を合わせ，溶媒を減圧留去して，メタノール抽出物189 gを得た(Fig. 1)．これをセライト1.0 kg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3.0 Lで順次溶出した．各溶出液の溶媒を減圧留去し，ヘキサン可溶部，クロロホルム可溶部，アセトン可溶部及びメタノール可溶部とした．

作用物質の単離精製はヘキサン可溶部を用い，Fig. 2に従って実施した．すなわち，ヘキサン可溶部4.5 gをヘキサン20 mlに溶かし，シリカゲル250 gを充てんした

カラムに付加し，ヘキサン-酢酸エチル混液で溶出させた．さらにヘキサン-酢酸エチル(1：1)混液溶出画分(Fr. 4）は溶媒を減圧留去した後，分取HPLC（カラム：TSKgel ODS-80TM，2.15 i.d.×30 cm，10μm，カラム温度：40℃，移動相：50％アセトニトリル溶液，7.0 ml/min，検出：UV 235 nm)を用い，2種類の物質(1，2)を単離した．

5．*In Vivo*マウス皮膚発癌二段階実験

既報の方法[8]に準じ，*in vivo*でマウス皮膚発癌二段階実験を行った．

マウス45匹を用い，それぞれ背部の体毛を剃り，DMBA100μgを含有したアセトン0.1 mlを剃毛部分に塗布してイニシエーションを行った．1週間後にこれらを15匹ずつⅠ-Ⅲの3群に分け，Ⅰ群は，プロモーターとしてTPA 1.7 nMを含有したアセトン溶液0.1 mlを週2回，20週間にわたり同じ部位に塗布し，これを陽性コントロールとした．一方，Ⅱ及びⅢの被験群は，前処理としてプロモーションの1時間前に0.1mlのアセトンに溶解した1及び2各85 nMを，TPA塗布と同じ部分にそれぞれ塗布し，その後Ⅰ群と同様にTPAを塗布した．これら3群とも通常の飲料水は自由に摂取させ，実験を行った．

判定はいずれもTPA塗布開始後，1週間毎に背部に発生する1 mm以上のpapillomaの総数，及びpapillomaの発生したマウスの匹数を数え，陽性コントロール群と比較した．

6．*In Vivo*マウス肺発癌二段階実験

既報の方法[9]に準じ，*in vivo*でマウス肺発癌二段階実験を行った．即ち，各群15匹のマウスを用い，Ⅰ群は無処置対照群とし，Ⅱ群はイニシエーションを行わず，8％グリセリン水を飲料水として自由に摂取させた．

イニシエーションは，5％コレステロールを含むオリーブ油に4-NQOを溶解し，1匹当たりの投与量が0.3 mgになるよう45匹のマウス背部に皮下注射した．5週間後にこれらを15匹ずつⅢ-Ⅴの3群に分け，Ⅲ群は水のみを飲料水とし，Ⅳ群はプロモーターとして8％グリセリン水を飲料水として，25週間自由に摂取させ，陽性コントロールとした．Ⅴ群は2.5 mgの被験物質1を溶解した8％グリセリン水溶液を飲料水として，自由に摂取させ25週間飼育した．消費した飲料水量は週2回測定した．

処置期間終了後は発生した腫瘍を剖検により確認し，それぞれの肺葉から，マウス1匹当たりの腫瘍数，腫瘍の発生したマウスの匹数を数え，陽性コントロール群と比較した．

7．作用物質の定量

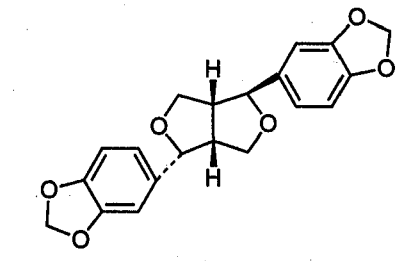
HPLC試料溶液の調製：実験材料とした植物及び生薬を粉末とし，約0.5 gを精密に量り，50%アセトニトリル溶液40 mlを加えて30分間超音波抽出後，50%アセトニトリルで，正確に50 mlとした．この一部を0.45μmのフィルターに通し，HPLC用試料溶液とした．

HPLC条件：カラムはTSKgel ODS-80TM（4.6 i.d.×150 mm，5 mm，東ソー製）を用い，移動相は45％アセトニトリル溶液を使用した．カラム温度は40℃,流量は1.0 ml/min，注入量は20μlとし，UV 235 nmで検出した．

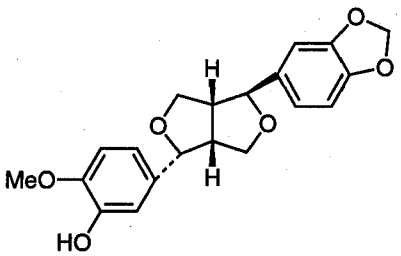
結果及び考察

1．作用物質の検索

Fig. 1に示すウスバサイシン(B)より得られた地下部メタノール抽出物は，100μg/mlの濃度で80%以上のEBV活性化抑制作用を示した．このメタノール抽出物189 gから得たヘキサン可溶部56.7gは，100μg/mlで100%，50μg/mlでも60%以上の抑制作用を示し，またクロロホルム可溶部7.0 gも100μg/mlで100%，50μg/mlで約40%の抑制作用を示した．しかし，アセトン及びメタノール可溶部においては顕著なEBV活性化抑制作用は認められなかった．そこで，最も強い抑制作用を示したヘキサン可溶部について，Fig. 2に示すようにシリカゲルカラムを用い作用物質の検索を進めた．ヘキサン中の酢酸エ



(-)-asarinin (1)



xanthoxylol (2)

Fig. 3. Chemical Structures of (-)-Asarinin (1) and Xanthoxylol (2)

Table 1. Percentages of EBV-EA Induction in Presence of (-)-Asarinin (**1**) and Xanthoxylol (**2**) with Respect to Positive Control (100%)

Compound	Concentration[a]			
	1×10^3	5×10^2	1×10^2	1×10
1	0.0[b](70)[c]	29.8 (>80)	66.7 (>80)	92.4 (>80)
2	0.0 (70)	21.5 (>80)	62.3 (>80)	100.0 (>80)

a : Mol ratio/TPA (20 ng = 32 pmol).
b : Values represent percentages to the positive control value.
c : Values in parentheses are viability percentages of Raji cells.

チル濃度を段階的にあげ，Fr. 1からFr. 7の7分画に分け溶出させたところ，Fr. 4のヘキサン-酢酸エチル(1：1)混液溶出部が，10 μg/mlの濃度において75%と最も強い抑制作用を示した．そこで引き続き本分画について分取HPLCによる作用物質の精製操作を進め (-)-asarinin（**1**）240 mg及びxanthoxylol(**2**) 56 mg を単離した．

これら2種類の物質は，Fig. 3に示すように，2つのフェニルプロパノイドモノマーが側鎖のβ位で結合したリグナンに属する化合物群で，既に細辛の成分として報告されている物質であった[10]．**1**及び**2**のEBV活性化抑制作用はTable 1に示すように，500倍モル濃度で作用が発現した．

Table 2. Incideneces of Pulmonary Tumors in Mice Treated with (-) -Asarinin (**1**)[a]

Groups	Treatment	Total number of tumors	Number of tumors per mouse	% of mice with tumors
I	Water alone	0	0	0
II	8% glycerol alone	0	0	0
III	4-NQO + water	4.0[b]	0.26[b]	13.3[b]
IV	4-NQO+8% glycerol	46.0	3.1	86.7
V	4-NQO+8% glycerol +0.0025% (-)-asarinin (**1**)	20.0[b]	1.3[b]	46.6[b]

a : Initiator ; 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) 0.3 mg per mouse, subcutaneous injection, promoter ; 8% glycerol in drinking water. The mean intake of drinking water was 7.0, 7.1, 7.0, 7.1 and 7.1 ml/mouse/day in groups I to V, respectively, and no statistically significant difference was observed between each group. The body weight of the animals was not affected by the treatment with **1** in the experiments.
b : Statistically different from the control group IV, $p<0.05$, using Student's t-test.

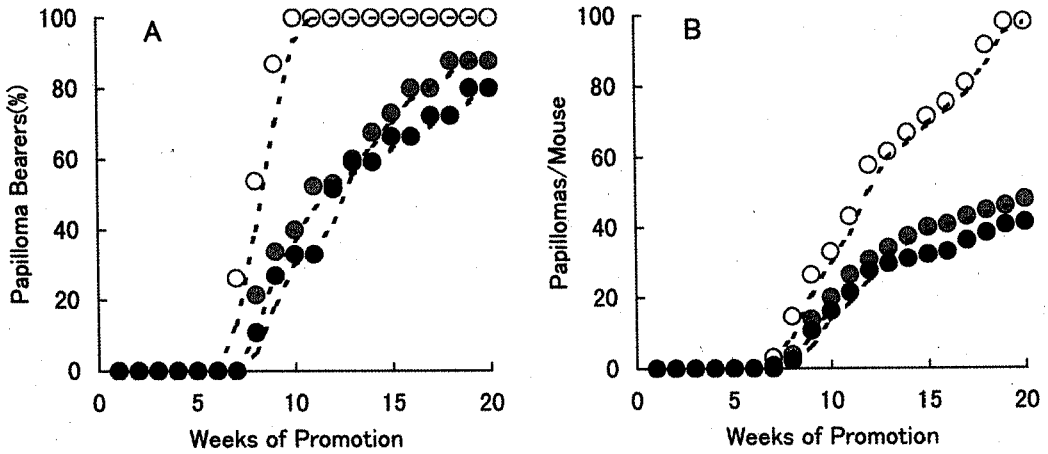


Fig. 4. Inhibition of TPA Induced Tumor Promotion by Multiple Application of (-) - Asarinin (**1**) and Xanthoxylol (**2**) (85 nM)
All mice were initiated with DMBA (390 nM) and promoted with TPA (1.7 nM) twice weekly starting 1 week after initiation.
A : Percetage of mice bearing papillomas. B : Average number of papillomas per mouce.
○, control TPA alone ; ●, TPA + 85 nM of **1** ; ●, TPA + 85 nM of **2**
At 20 weeks of promotion, groups treated with compound **1** and **2** were different from the control group ($p<0.05$) in terms of papillomas per mouse.

2．抗発癌プロモーター作用

1及び**2**の*in vivo*で抗発癌プロモーター作用を明らかにするため，マウス皮膚二段階発癌抑制実験を行った．

陽性コントロールのⅠ群ではプロモーション開始10週間後で全てのマウスにpapillomaが発生したが，**1**を塗布したⅡ群では40%，**2**を塗布したⅢ群では33 %の発生率であった．両者によるpapilloma発生率は，共に陽性コントロールに対して信頼限界５％で有意差が有り，papilloma発生を抑制させる効果が認められた(Fig.4)．

さらに，**1**についてマウス肺二段階発癌抑制実験を行い，Table 2にその結果を示した．イニシエーション無処置の群のうち，普通飼育群のⅠ群では腫瘍は発生しなかったが，イニシエーションを行わず，プロモーションのみ行ったⅡ群でも同様の結果であった．一方陽性コントロール群のⅣ群では，約87%のマウスに腫瘍が発生し１群15匹の１匹当たりの平均腫瘍数は約３個であった．イニシエーションは行ったが，プロモーションを行わなかったⅢ群では，13%のマウスに腫瘍が発生し，平均約0.3個の腫瘍が認められた．即ち，イニシエーションを行った場合には，プロモーションを行わなくても腫瘍は発生するが，発生率はプロモーションを行った陽性コントロールに対して，その15%に留まるものであった．被検群のⅤ群では発生率が47%，平均腫瘍数が約1.3個で，腫瘍の発生率はⅢ群よりは高い結果であったが，陽性コントロールに対しては50%近い顕著な抑制が観察された．

以上の実験結果から，リグナン**1**及び**2**に抗発癌プロモーター作用があることが確認された．

3．作用物質の定量

1及び**2**の定量はHPLCで行った．実験の部に記載した方法で分析すると，**1**の保持時間は18.5分，**2**の保持時間は7.6分であった．

Table 3. Contents[a] of (-)-Asarinin (**1**) and Xanthoxylol (**2**) in Commercial Asiasarum Root

Sample	1	2
1	0.45	0.042
2	0.43	0.030
3	0.39	0.037
4	0.29	0.024
5	0.28	0.028
6	0.27	0.019
7	0.27	0.027
Average	0.34	0.030
CV (%)	23.0	26.3

a：Contents values are shown as weight percentages.

Table 4. Contents[a] of (-)-Asarinin (**1**) and Xanthoxylol (**2**) in *Asiasarum sieboldii* and *A. heterotropoides* var. *mandshuricum*

	Root and Rhizome		Aerial Part	
Sample[b]	1	2	1	2
A. sieboldii				
A	0.48	0.063	—	—
B	0.23	0.019	0.11	0.005
A. heterotropoides var. *mandshuricum*				
C	0.34	0.033	0.048	0.005
D	0.26	0.028	0.037	—

a：Contents values are shown as weight percentages.
b：A was collected at Ohno City in Fukui Prefecture, B～D were cultivated at Kodaira City in Tokyo.

市場品７ロットの分析結果をTable 3に示すが，**1**の含量は0.27～0.45%で，平均は0.34%であり，**2**の含量は0.19～0.042%で，平均は0.030%であった．それぞれの変動係数は，23.0%，26.3%であったが，これらの値は，沢瀉[11]，黄耆[12]など他の生薬に含まれる成分の変動係数と大差はなく，細辛中の**1**及び**2**の含量は，他の生薬成分と同程度のバラツキを持つと考えられた．

また，**1**含量(y)と**2**含量(x)の相関関係式は以下のとおりであり，

$$y = 8.139x + 0.097$$

その相関係数ｒは0.808と比較的高い値を示した．従って，**1**含量から**2**含量を推測することは，概ね可能であると思われる．

一方，基原植物であるウスバサイシン及びケイリンサイシンについては，地下部と地上部に分けて分析した．その結果をTable 4に示したが，両者の地下部の分析結果は市場品とほとんど変わらない値を示した．しかし，地上部は**1**及び**2**が少なく，**1**の最大含量はウスバサイシン栽培品で0.11 %であり，**2**の最大含量は0.005%であった．

4．考察

今回抗発癌プロモーター作用物質として単離した**1**及び**2**は，抗アレルギー作用を現す成分として既に報告されている[13]物質である．生薬に含まれる物質が複数の作用を現す例は他にもあり，これらの物質もその一例と考えている．

今回の定量結果をもとにして小青龍湯に含まれる**1**及び**2**の含量を試算した．本剤１日量中に細辛３gが配合されることから**1**は10 mg前後，**2**は0.9 mg前後含まれることになる．湯剤なので，全て抽出されるわけではないが，その物性から相当量が小青龍湯に移行すると思わ

れる．そしてこれらが有効成分といわれているmethyleugenol, safroleなど[14]と共に薬効発現に係わると推察している．

細辛は，日本では古くから地上部を異物として除くよう取り扱われてきた[5]．しかし，中国では伝統的に，地上部を異物とすることもなく取り扱ってきている[6]．今回の実験から，地下部に含まれる作用物質は，地上部には少ないことが明らかになった．昨今，国際間での生薬規格をハーモナイズするよう叫ばれているが，この作業をスムーズに進めるためには，地上部には有効成分の含量が低いなどの科学的な実験データを提示し，話し合いに臨む必要があると考えている．

ま と め

細辛に含まれる抗発癌プロモーター作用物質の検索法として，EBV活性化抑制効果を指標としたスクリーニングを行い，(-)-asarinin (**1**)及びxanthoxylol (**2**)を単離し，これらの抗発癌プロモーター作用を検討した．DMBAをイニシエーターとし，TPAをプロモーターとするマウス皮膚二段階発癌抑制実験を行い，**1**及び**2**塗布群に50%以上の抑制効果を認めた．また，4-NQOをイニシエーターとし，グリセリンをプロモーターとするマウス肺二段階発癌抑制実験では，**1**に約50%の抑制効果を認めた．

市場品細辛7ロットの**1**平均含量は0.34%であり，**2**平均含量は0.030%であった．両者の相関係数は0.808と比較的高い値を示し，**1**含量から含量の低い**2**含量を推測することは，概ね可能であると思われた．また，ウスバサイシン及びケイリンサイシンの地上部には**1**及び**2**が少ないことが明らかとなった．

(本研究は平成9年度当所東洋医学研究事業の一環として行ったものである．)

文 献

1) Ito, Y., Kawanishi, H., Harayama, T.,et al.：*Cancer Lett.*, **12**, 175-180, 1981.
2) Ito, Y., Yanase, S., Fujita, J., et al.：*Cancer Lett.*, **13**, 29-37, 1981.
3) 浜野朋子，安田一郎，渡辺四男也，他：東京衛研年報，**43**，46-50，1992.
4) 高崎みどり，木島孝夫，安田一郎，他：日本薬学会第116年会講演要旨集2，222，1996.
5) 日本公定書協会：第13改正日本薬局方解説書，廣川書店，D-381-384，1996.
6) 中華人民共和国衛生部薬典委員会：中華人民共和国薬典1990年版一部，人民衛生出版社，198-199，1990.
7) Henle, G., Henle, W.：*J. Bacteriol.*, **91**, 1248-1253, 1966
8) 木島孝夫，小塚睦夫，徳田春邦，他：薬誌，**109**，843-846，1989.
9) 木島孝夫，高崎みどり，小塚睦夫，他：薬誌，**114**，248-256，1994.
10) 橋本和則，岡田稔，丸野政雄：*Nat. Med.*, **48**, 39-48, 1994.
11) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，他：東京衛研年報，**41**，55-61，1990.
12) 安田一郎，浜野朋子，高野伊知郎，他：東京衛研年報，**42**，27-32，1991.
13) Hashimoto, K., Yanagisawa, T.,Okui, Y.,et al.: *Planta Med.*, **60**, 124-127, 1994.
14) 糸川秀治，安田一郎：現代東洋医学，**16**，578-588，1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 55-59, 1998

生薬地黄のDNA傷害作用および作用物質の部分精製

牛山慶子*, 長井二三子*2, 大久保智子*2,
佐藤かな子*2, 加納いつ*3安田一郎*4, 瀬戸隆子*4

Partial Purification of the Constituents of Jiou (*Rehmannia glutinisa* Liboschtz) causing DNA Damage, and Study on the Mechanism of Action

KEIKO USHIYAMA*, FUMIKO NAGAI*2,
TOMOKO OKUBO*2, KANAKO SATOH*2, ITSU KANO*3,
ICHIRO YASUDA*4 and TAKAKO SETO*4

Keywords：地黄 jiou, DNA傷害作用 DNA damage, 活性酸素消去剤 active oxygen scavenger

はじめに

漢方方剤, 生薬の構成成分, 有効成分は明らかでなく, さらに有害成分が含まれている可能性もあって, 品質管理が困難である. 当研究所では「漢方方剤・生薬の品質と生体作用に関する研究」プロジェクトとして生体に対する有効性, 安全性の解明を目的として多面的研究を行っている[1]. このプロジェクト研究の共通研究材料の一つとして取り上げた六味丸は地黄, 山薬, 山茱萸, 沢瀉, 茯苓, 牡丹皮で構成される漢方方剤で強壮, 利尿作用があるといわれている. 著者らは六味丸および原料生薬の, 遺伝子に与える影響を調べる目的でDNA損傷を検討した. プラスミドDNAは物理的, 化学的刺激に鋭敏に反応し, 損傷する場合が少なくない. 無傷のDNAは二本鎖のねじれたスーパーコイルであるが, 2本鎖のうち片方の1カ所に傷がつくと, ねじれが解け, オープンサークルの構造になる. さらに2本鎖のそれぞれに1カ所に傷がつくとリニアーフォームになる. これら3種の型のDNAはアガロースゲル電気泳動の移動度が異なるため簡単にDNA損傷が検出できる[2]. この方法により六味丸および原料生薬のDNAへの影響を検討した結果, 原料生薬の地黄に強いDNA切断作用があることを見いだした. さらに地黄中のDNA切断作用物質を明らかにするために部分精製を行い, 作用機構について調べた.

実験材料および方法

材料 プラスミドpUC18 DNAは塩化セシウム密度勾配遠心法を用いて調製した[3]. デスフェラールはシグマ社製を用いた.

方法

六味丸及び原料生薬エキスの調製 粉砕した六味丸および原料生薬, 茯苓, 山薬, 沢瀉, 地黄, 牡丹皮, 山茱萸に20倍量 (V/W) の50%エタノールを加え, 24時間室温で抽出後ろ過し, 減圧濃縮して用いた[4]. エキス含量は室温で24時間減圧乾燥し, 重量を測定することにより決定した.

地黄中のDNA切断作用物質の部分精製 図1に地黄の分画過程を示した. 地黄を凍結状態で粉砕後, アセトン：水 (1：1) を加え70℃, 1時間還流抽出し, 抽出液のアセトンを減圧留去した. この溶液をC18シリカゲル (コスモシル140C18) を加え撹拌, 吸引ろ過し, 水溶液画分を分けた. C18シリカゲルに吸着した物質をメタノールで溶出, 濃縮し, これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ, クロロホルム, メタノールの濃度を変え, 溶出分画した.

DNAとの反応 pUC18DNA (0.2mg)と地黄を50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0) 2mM EDTA, 50ml中で37℃, 60分間反応し, エタノール沈殿法によりDNAを回収し,

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
*2 毒性部薬理研究科
*3 環境保健部
*4 理化学部医薬品研究科

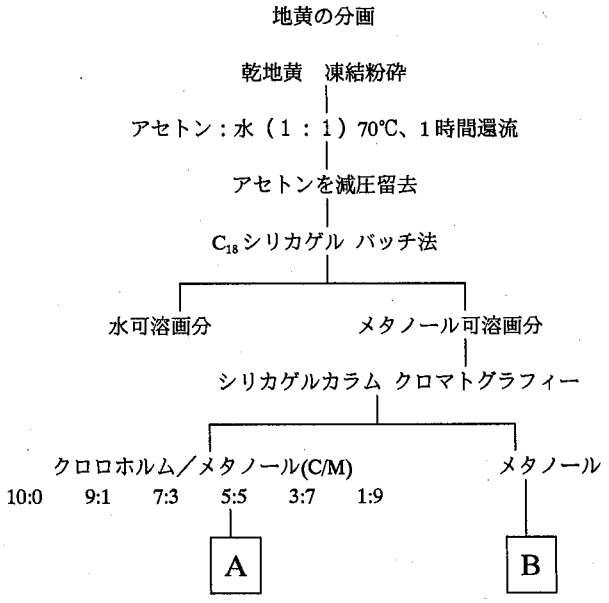


図1．地黄の分画

0.7%アガロースゲル電気泳動を行った．泳動後エチジウムブロミドでDNAを染色し，島津デンシトメーターでスーパーコイルフォーム，オープンサークルフォーム，リニアーフォームのピークの面積を測定した．これらの面積の合計に対するリニアーフォームの面積の割合を算出し，切断の指標とした[3]．

結　果

六味丸および原料生薬のDNA切断作用　六味丸および原料生薬の茯苓，山薬，沢瀉，地黄，牡丹皮，山茱萸の50%エタノールエキスと反応したpUC18DNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示した（図2）．コントロールとして設定したエキスを含まない反応液でインキュベートしたDNAにおいては，スーパーコイル（Ⅰ）は約85%，オープンサークル（Ⅱ）は約15%，リニアーフォーム（Ⅲ）は約1%であった（図．2[3]1）．これに対して地黄と反応したDNAでは，15%と，最も顕著にリニアーフォーム（Ⅲ）が出現しており，地黄によるDNA切断作用が示された（図2-5）．沢瀉および牡丹皮の場合にも，地黄に比べると少ないが，リニアーフォーム（Ⅲ）が見られた（図2-4，7）．沢瀉，牡丹皮のDNA切断作用は比較的弱いものと思われた．茯苓および山薬では，いずれもDNA切断作用は見られなかった（図2-2，3）．山茱萸と反応したDNAについては回収率の減少傾向を示したので，エキス量を下げて反応を行ったが，明らかなDNA切断作用は認められなかった（図2-7）．

地黄によるDNA切断作用の解析　最も強いDNA切断作用を示した地黄について詳しく調べるため，地黄の量を変えてDNAと反応させたところ(図3)，2mM EDTA存在下で地黄0.6mg/mlから切断作用が認められ，地黄の量の増加に従って切断作用は増強し，120mg/mlでリニアーフォームは約16%になった．しかし，EDTAを添加しないときは切断作用は現れなかった．そこでEDTA濃度を変化させて，地黄のDNAに対する作用を調べた(図4)．地黄を加えない場合，EDTA濃度の上昇に伴いDNA切断を抑制する傾向にあった．地黄(60mg/ml)添加の場合，リニアーフォームDNAの割合はEDTA無添加で2%，10^{-4}M存在下で6%，2×10^{-3}M存在下で約13.5%であり，これ以上EDTA濃度を上昇させてもリニアーフ

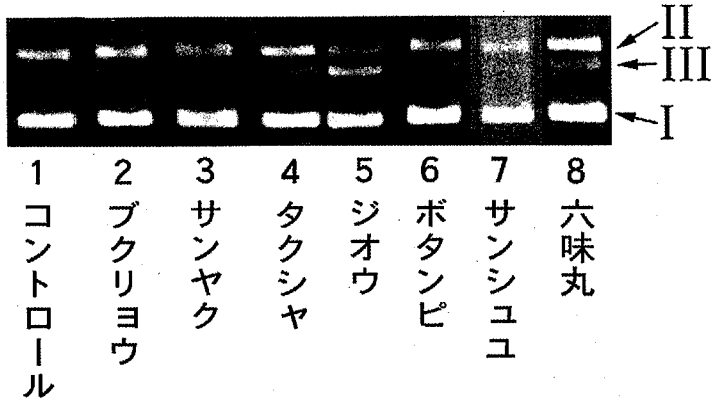


図2．六味丸散剤および原料生薬の50%エタノールエキスと反応したDNAのアガロースゲル電気泳動パターン

(1)コントロール：生薬エキスの代わりに50%エタノールを加えて反応したDNA．(2)～(8)は，各々の生薬エキス（50μl反応液中の量を示す）と反応したDNA．(2)茯苓：0.25mg (3)山薬：1.2mg (4)沢瀉：1.4mg (5)地黄：3.6mg (6)牡丹皮：2.0mg (7)山茱萸：0.35mg（原液を50%エタノールで16倍に希釈したもの）(9)六味丸：2.1mgをそれぞれ使用．スーパーコイルDNA（Ⅰ），オープンサークルDNA（Ⅱ），リニアーフォームDNA（Ⅲ）

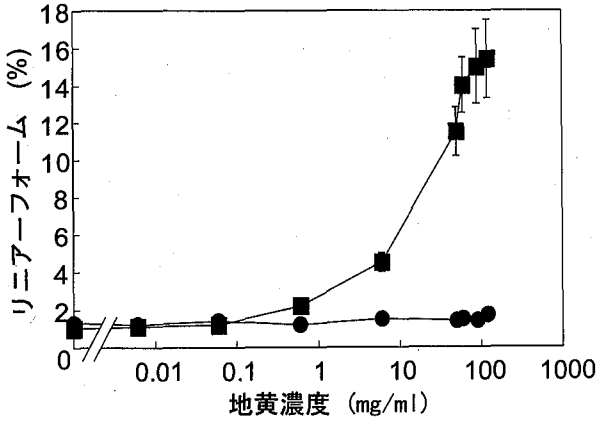


図3．地黄のDNA切断作用

50mM Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA (■), EDTA無添加 (●)．平均値±標準偏差 (n＝5)

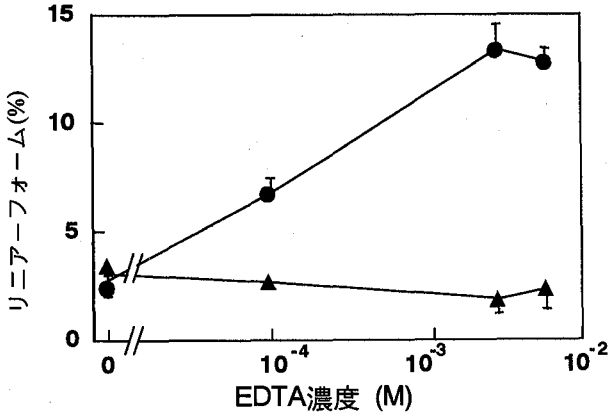


図4．地黄のDNA切断作用に対するEDTA濃度の影響

地黄無添加 (▲)，地黄60mg/ml (●)．平均値±標準偏差 (n＝5)

ォームは増加しなかった．

DNAは鉄イオンによって影響を受けることが知られている[2]．そこで鉄イオンの特異的キレート剤であるデスフェラールを地黄とDNAの反応液に加えた(図5)．デスフェラール無添加のとき，60mg/mlの地黄存在下でリニアーフォームは約13.5%であったが，10^{-4}Mデスフェラールの添加で10%，10^{-3}Mで2%となり，10^{-2}Mでは地黄無添加と同じ約1%レベルまで低下した．

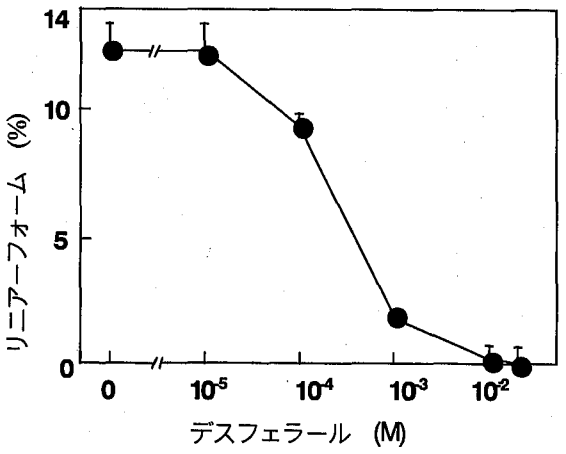


図5．地黄のDNA切断に対するデスフェラールの抑制作用

50mM Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA, 60mg/ml 地黄．横軸はデスフェラール量．平均値±標準偏差(n＝5)

地黄のDNA切断作用に対する，種々の活性酸素消去剤の影響を検討した(表1.)．地黄との反応により出現したリニアーフォームDNAの割合は約15%であったが，カタラーゼの添加により，約3%に減少した．アジ化ナトリウム，マンニトール，メチオニン，安息香酸ナトリウムも地黄のDNA切断を抑制した．銅イオンのキレート剤バソクプロインは地黄のDNA切断作用に影響しなかった．

地黄のDNA切断作用物質の検索　地黄中のDNA切断作用物質を検索するために，地黄の分画を行った．アセ

表1．地黄のDNA切断に対する各種活性酸素消去剤の抑制作用

		エキス無添加	地黄(60mg/ml)	A(1mg/ml)	B(1mg/ml)
			リニアーフォームDNA (%)		
None		1.01±0.44	14.74±3.45	15.7±0.63	10.3±2.2
カタラーゼ	(20ng/ml)	1.16±0.42	2.81±0.82*	8.31±0.30*	1.12±0.32*
アジ化ナトリウム	(0.1M)	1.81±0.27	6.40±0.62*	4.76±1.5*	1.77±0.45*
マンニトール	(0.1M)	1.47±0.28	8.56±1.30*	7.94±1.5*	3.65±0.84*
メチオニン	(0.1M)	1.59±0.54	9.19±1.70*	3.89±0.45*	2.67±0.12*
安息香酸ナトリウム	(0.1M)	1.10±0.48	9.79±1.81*	2.78±1.1*	3.41±0.89*
デスフェラール	(0.1M)	1.02±0.31	0.99±0.05*	15.4±2.7*	0.95±0.18*
バソクプロイン	(0.1M)	1.28±0.32	14.0±1.70	13.6±1.0	11.2±1.7

0.2 μg DNA、50mM TrisHCl (pH8.0), 2mM EDTA, エキス添加，または無添加の反応液に，各々の活性酸素消去剤を加えた．
*活性酸素消去剤無添加と有意差あり ($p<0.05$)

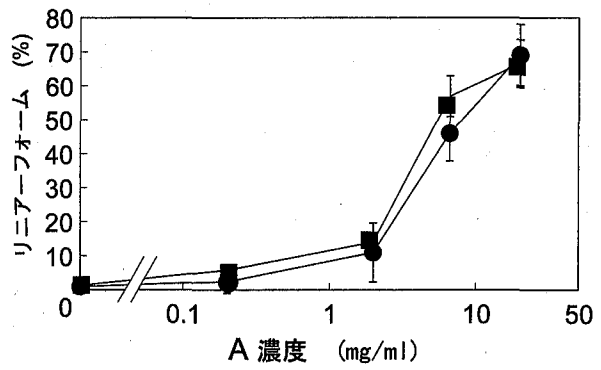


図6．AのDNA切断作用に対するEDTAの影響

50mM Tris-HCl(pH8.0), 2mM EDTA (■), EDTA無添加(●)．平均値±標準偏差(n＝5)

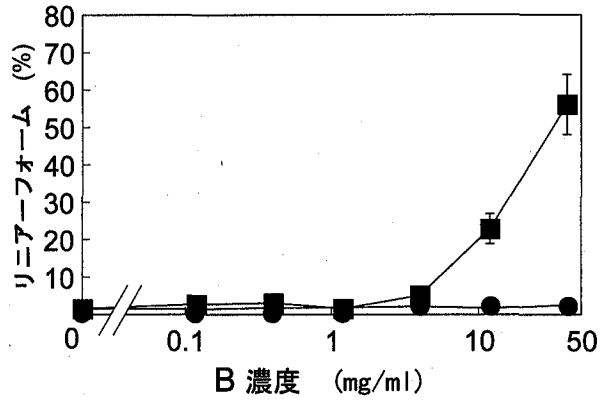


図7．BのDNA切断作用に対するEDTAの影響

50mM Tris HCl (pH8.0), 2mM EDTA (■), EDTA無添加(●)．平均値±標準偏差(n＝5)

トン：水（1：1）で抽出し，C18シリカゲルでのメタノール溶出画分をクロロホルムとメタノールの割合を変えて，シリカゲルクロマトグラフィーを行った．溶出画分のDNA切断作用を個々に調べたところ，クロロホルム：メタノール（50：50）で溶出したAとメタノール100%で溶出したBに強い作用が認められた．

2mM EDTA存在下および非存在下でA，Bの量を変えてDNAと反応した（図6，7）．Bは，EDTA添加時のみDNA切断作用を示し，5 mg/mlで5%，50mg/mlで55%リニアーフォームDNAが出現し，地黄エキスに類似した傾向であった．AのDNA切断作用は，地黄，Bとは異なりEDTA添加，無添加いずれでも強く，2，10，20mg/mlで各々10%，50%，70%のリニアーフォームが出現した．

A，BのDNA切断作用に対する活性酸素消去剤の影響を比較して調べた（表1）．カタラーゼはBによるDNA切断をほぼ完全に抑制したが，Aの作用に対しては40%程度の抑制であった．アジ化ナトリウム，マンニトール，メチオニン，安息香酸ナトリウムも両画分のDNA切断作用を抑制した．鉄イオンのキレート剤であるデスフェラールはBの作用を著しく阻害したが，Aには影響しなかった．銅イオンのキレート剤であるバソクプロインはAおよびBのDNA切断作用に影響しなかった．

考　察

六味丸の原料生薬の一つである地黄に強いDNA傷害作用がみられたので，その作用について詳しく検討した．地黄の作用はEDTA存在下でのみ生じた．EDTAの存在は，DNA分解酵素を活性化するマグネシウムイオンのような金属イオンをキレートし，DNAを安定化する効果がある[5]．しかし，地黄はEDTAの存在下でのみDNA切断作用を示した．したがって，EDTAは切断を抑制する物質をキレートすることによって，阻害している可能性が考えられる．本実験で，鉄の特異的キレート剤デスフェラールが地黄のDNA切断作用を抑制したことは，地黄によるDNA切断作用には鉄イオンが係わっていることを示している．このことから鉄とEDTAが共存した状態でも，地黄はDNA切断作用を発揮すると考えられた．

活性酸素消去剤のうちカタラーゼが地黄のDNA切断作用を強く抑制した．このことは過酸化水素の直接作用よりはむしろ過酸化水素と鉄イオンの反応により生成されるヒドロキシルラジカルが関与していると考えられる．このラジカルがDNAに変化を起こすレドックスサイクル（酸化還元反応系）の間接反応として係わっていると推定される．ヒドロキシルラジカル消去剤である安息香酸ナトリウム，マンニトールもカタラーゼほど強くはないが，抑制作用を示す．すなわち，ヒドロキシルラジカルの関与，またアジ化ナトリウム，メチオニンも効果があったことから一重項酸素の作用も考えられる[6]．

部分精製したAとBのDNA切断作用の大きな違いは，(1) AのDNA切断作用はEDTAの存在に関わらず生じたのに対し，BはEDTA存在下でのみ，その作用を現したこと，(2) デスフェラールによる抑制はAでは見られず，Bで現れたこと，(3) カタラーゼの抑制はBで強く現れたこと等である．このようにAとBのDNA切断作用のメカニズムの相違から，地黄には異なる性質をもつDNA切断作用物質が含まれることが明らかになった．

文　献

1）プロジェクト研究報告書「漢方方剤および生薬の安全性・有効性に関する研究」－六味丸の安全性・有効性について－(東京都立衛生研究所)，1993

2）Nagai, F., Ushiyama, K. and Kano, I., *Arch. Toxicol.*,

67, 552-557, 1993

3) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., in : *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 88-94, 1989

4) 牛山慶子, 長井二三子, 佐藤かな子, 加納いつ, 安田一郎, プロジェクト研究報告書「漢方方剤および生薬の安全性・有効性に関する研究」－六味丸の安全性・有効性について－(東京都立衛生研究所), 191-195, 1993.

5) Aruoma,O. I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M., *J. Biol. Chem.*, **264**, 20509-20512, 1989

6) Nagai, F., Ushiyama, K., Satoh, K. and Kano, I. : *Chem.-Biol. Interact.*, **76**, 163-179, 1990.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 60-64, 1998

牡丹皮中のNa,K-ATPase活性阻害物質1,2,3,4,6-ペンタ-*O*-ガロイル-β-*D*-グルコースの分画，精製とその阻害機構の解明

佐藤 かな子*, 安田 一郎**, 長井 二三子*,
瀬戸 隆子**, 加納 いつ***

Purification of 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-*D*-glucose from Moutan Cortex and its Inhibitory Mechanism of Na,K-ATPase Activity

KANAKO SATOH*, ICHIRO YASUDA**, FUMIKO NAGAI*, TAKAKO SETO**, ITSU KANO***

Extract of Moutan Cortex (牡丹皮) strongly inhibited the activity of Na,K-ATPase. The crude extract was fractionated with solvents, and column chromatography and preparative HPLC isolated the inhibitor. The chemical structure of the inhibitor was determined to be 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-*D*-glucose (PGG). The I_{50} value of PGG was 1.8×10^{-6} M. The mode of inhibition of PGG was uncompetitive with respect to ATP as judged from Lineweaver-Burk plot. PGG did not alter the I_{50} value for ouabain. PGG also inhibited K-pNPPase activity with an I_{50} value of 5.3×10^{-6} M, and the extent of inhibition increased at higher concentrations of K^+. The $K_{0.5}$ value for K^+ was decreased by the addition of PGG from 3.3 to 2.0 mM. These results suggested that the inhibition of Na,K-ATPase activity is caused by interaction of PGG with the enzyme in the E_2 state, and the reaction step from $K\cdot E_2$ to $Na\cdot E_1$ is inhibited. The inhibitory effect of Moutan Cortex is considered to be mainly attributable to PGG.

Keywords：Na,K-ATPアーゼ Na,K-ATPase, Na,K-ATPアーゼ阻害剤 Na,K-ATPase inhibitor, 牡丹皮 Moutan Cortex, 1,2,3,4,6-ペンタ-*O*-ガロイル-β-*D*-グルコース 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-*D*-glucose

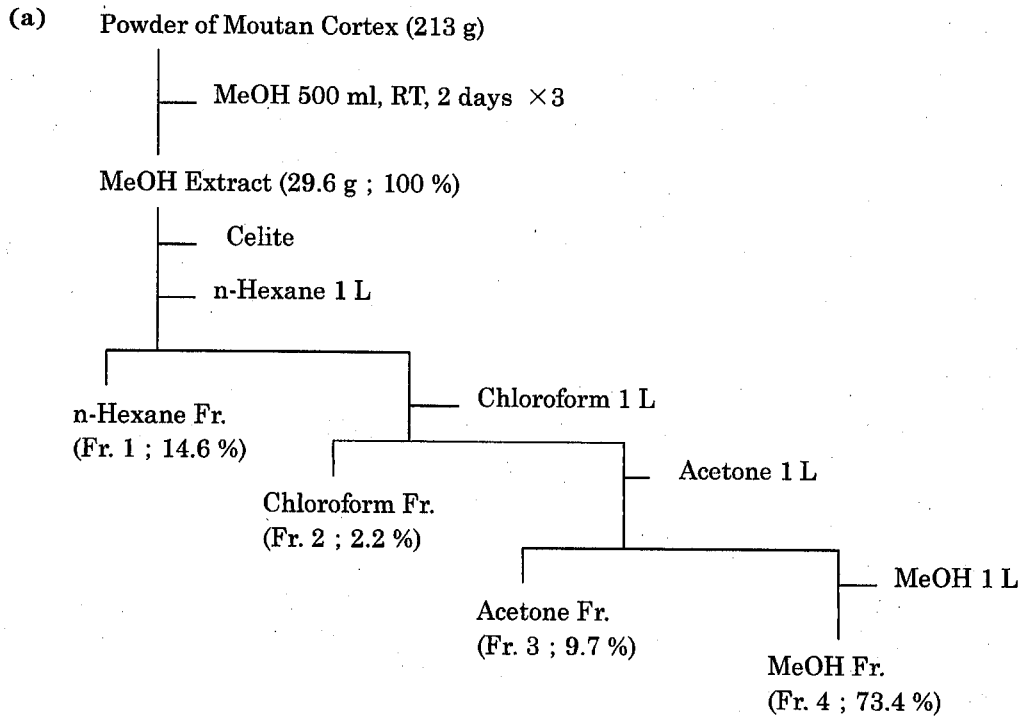
緒　言

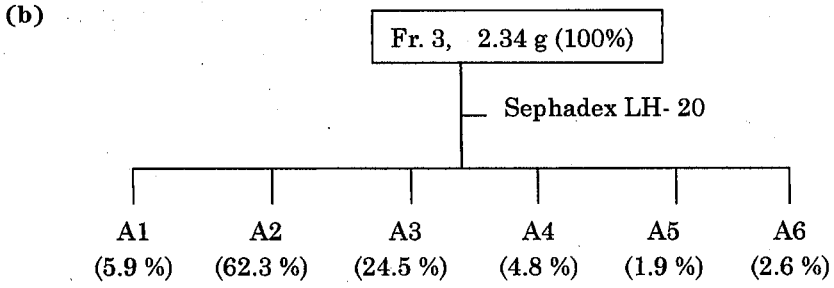
Na,K-ATPaseはすべての動物細胞膜に存在し，細胞内外のナトリウムとカリウムイオンの能動輸送を担う酵素であり，腎臓では水の再吸収機構に深く関与している[1]．我々は，利水を目的として漢方方剤に処方される生薬を中心にNa,K-ATPase活性に対する影響を調べ，駆於血薬として婦人薬によく処方される牡丹皮（牡丹*Paeonia suffruticosa* Andrewsの根皮）のエタノールエキスがNa,K-ATPase活性を最も強く阻害する事を報告した[2,3]．本報告では，牡丹皮中のNa,K-ATPase活性阻害物質が，1,2,3,4,6-ペンタ-*O*-ガロイル-β-*D*-グルコース（PGG）であること，及びそのNa,K-ATPase活性阻害機構について示す．

実験の部

牡丹皮の分画　牡丹皮213gを500mLのメタノールで室温にて2日間抽出する操作を3回繰り返し，得られた抽出液を50℃以下で溶媒を減圧留去した．この抽出物を更に24時間減圧乾燥し29.0gのメタノールエキスを得た．これにセライト（Johns-Manville社）300 gを混和し，カラムに充填した後，ヘキサン，クロロホルム，アセトン，メタノール各1 Lで順次溶出した．溶媒を減圧留去後24時間減圧乾燥し，各々ヘキサン画分(Fr. 1)，クロロホルム画分(Fr. 2)，アセトン画分(Fr. 3)，メタノール画分(Fr. 4)とした（Fig. 1a）．これらの画分のNa,K-ATPase活性に対する作用を調べ，強い阻害作用を示したFr. 3とFr. 4のエタノール可溶画分（Fr. 5）を，それぞれ

＊東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
＊＊＊東京都立衛生研究所環境保健部





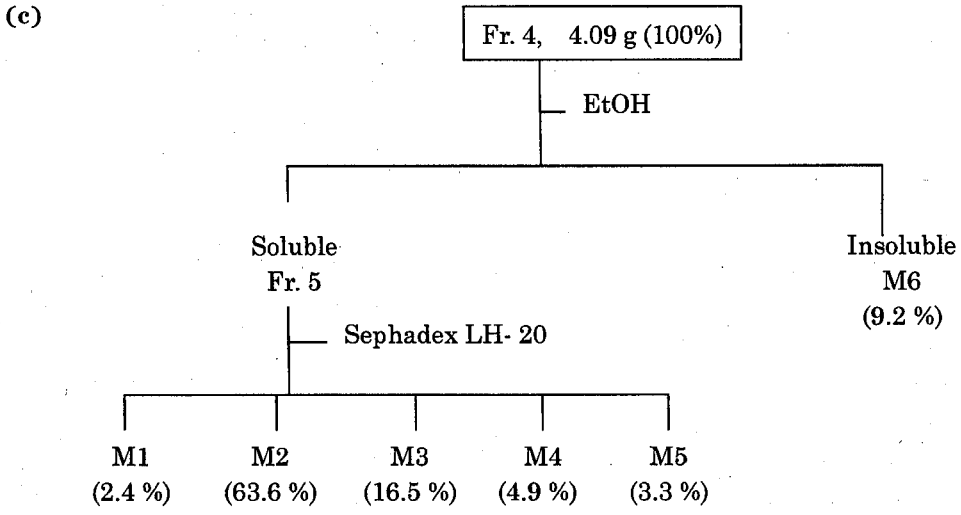


Fig. 1. Flow Diagrams of Extraction and Fractionation of Moutan Cortex (a), Fr. 3(b) and Fr.4 (c)

100gのセファデックスLH-20を充填したカラムに重積し，エタノールで溶出した．Fr.3より6溶出画分（A1～A6），Fr.4より5溶出画分（M1～M5）とエタノール不溶画分（M6）を得た（Fig. 1 b, c）．これらについても活性阻害作用を調べ，作用の強かったA5，A6，M5を合わせて分取用HPLCによる分画を行なった．HPLCは東ソー社SC-8020を用い，TSKgel ODS-80T_M（21.5 mm I.D. ×30 cm，粒子径10μm，東ソー社）カラム，アセトニトリル-水混液（1：4），流速7 ml/min，UV 280nmによる検出で行った．保持時間30.5～32.7分のところを分取した．この操作を10回繰り返し後，濃縮し26.0mgを得た．

Na,K-ATPase活性の測定方法　ウマ腎臓SDS処理Na,K-ATPase[4]（0.4μgタンパク）を3 mM ATP，140 mM NaCl，14mM KCl，5 mM $MgCl_2$，0.5 mM EDTA，1 mM EGTA，50mMイミダゾール塩酸緩衝液（pH7.2）及び牡丹皮のメタノールエキス又は溶出画分のDMSO溶解液1 μlを含む反応混合液に加え，全量100μlとして，37℃で15分間反応を行った[5]．

K-pNPPase活性の測定方法　ウマ腎臓SDS処理Na,K-ATPase[4]（0.4μgタンパク）を20mM *p*-ニトロフェニルホスフェイト（pNPP），15 mM KCl，10 mM $MgCl_2$，0.1 Mイミダゾール塩酸緩衝液（pH7.7）及び，牡丹皮のメタノールエキス又は溶出画分のDMSO溶解液1 μlを含む反応混合液に加え，全量100μlとして，37℃で10分間反応を行った[5]．

Table 1. The Inhibition of Na,K-ATPase Activity by Methanol Extract of Moutan Cortex and its Fractions.

	Amount of extract (μg/ml)		
	5	50	500
	Inhibition (%)		
MeOH Ext.	95	96	95
Fr. 1	21	71	91
Fr. 2	14	40	69
Fr. 3	73	95	95
Fr. 4	47	95	95
A1	0	46	64
A2	0	11	42
A3	6	43	59
A4	0	24	93
A5	12	88	89
A6	21	87	89
M1	30	43	77
M2	13	47	—
M3	0	14	72
M4	1	25	90
M5	9	73	86
M6	55	77	95
PGG	86	100	100

The enzyme activity was determined in the presence of various amounts of methanol extract of Moutan Cortex and its fractions. The values were indicated by the percent inhibition of Na,K-ATPase activity. The activity without extracts and fractions was 22.6 μmol Pi/mg protein/min. SD was within 2.8 %.

結　果

1．牡丹皮エキス及び各画分のNa,K-ATPase活性阻害作用　牡丹皮のメタノールエキスをFig. 1に従って分画し，各溶媒画分のNa,K-ATPase活性に対する影響を調べた（Table 1）．阻害作用が強かったA5，A6，M5を合わせて，HPLCで単一ピークを分取精製し，得られた物質のNMR及び元素分析を行い，既知のデータ[6,7]と比較し，PGG（Fig. 2)と同定した．最も強く酵素活性を阻害

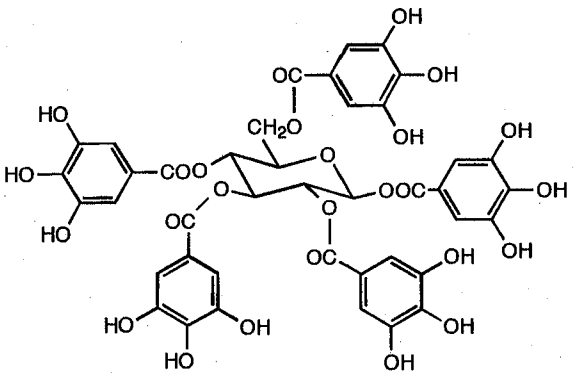


Fig. 2. Structure of PGG.

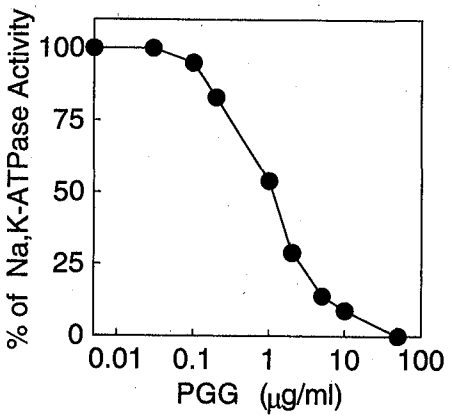


Fig. 3. Effect of Various Concentration of PGG on the Activity of Na, K-ATPase. The enzyme was incubated in the reaction mixture with various concentration of PGG. Enzyme activity without PGG was taken as 100% (22.6 μmol Pi/mg protein/min).

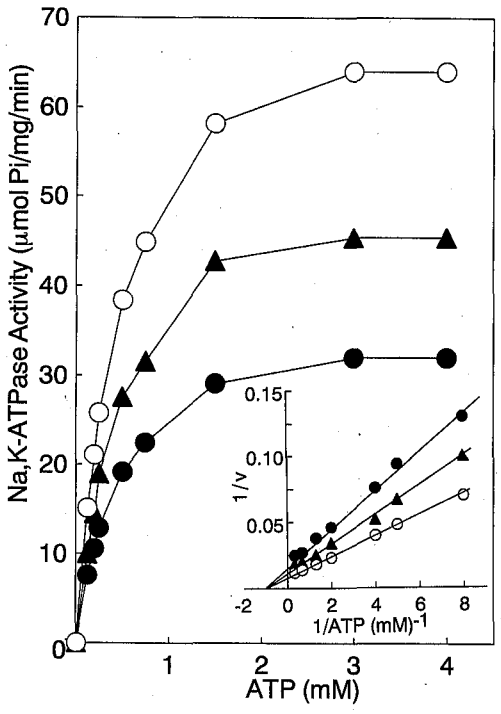


Fig. 4. Effects of Various Concentrations of ATP on the Inhibition of Na, K-ATPase Activity by PGG. Enzyme activity was determined with PGG at 1.0×10^{-6} M (▲) or 1.8×10^{-6} M(●) and without PGG (○). The concentration of ATP was varied. The SD was within 2.3%. A Lineweaver-Burk plot is shown in the inset.

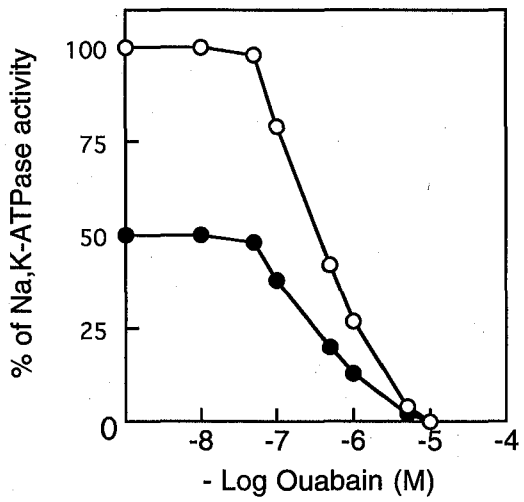


Fig. 5. Effect of Ouabain on Na, K-ATPase Activity in the Presence of PGG. The enzyme activity was determined in the presence of various concentration of ouabain with PGG at 1.8×10^{-6} M (●) or without PGG (○). The Na,K-ATPase activity without PGG and ouabain was taken as 100% (27.1 μ mol Pi/mg protein/min). The SD was within 2.4 %.

したFr.4のエタノール不溶部(M6)についてもHPLCを行い，得られた物質の同定をしたところ，これもPGGであることを確認した．HPLCで精製したPGGを以下の実験に用いた．PGGのNa,K-ATPase活性阻害曲線をFig.3に示す．PGGのI_{50}値（最大酵素活性を50%阻害したPGG濃度）は1.7μg/ml（1.8×10^{-6} M）となった[5]．

2．PGGのNa,K-ATPase活性阻害作用に及ぼすATP濃度の影響　1.8×10^{-6} Mと1.0×10^{-6} M PGGの存在下で基質であるATP濃度を0.125から4.0 mMまで変化させて，Na,K-ATPase活性を測定し(Fig. 4)，これらの結果をLineweaver-Burkプロットで示した(Fig. 4 挿入)．最大酵素活性値は，PGGの濃度が高くなるに従って減少したが，阻害率はATP濃度に関わらず一定であった．酵素と基質の親和性を示すKm値（横軸上の切片）は，いずれも0.65mMであった．これらのことより，PGGのATPに対する阻害形式は非拮抗型(noncompetitive)であった．

3．ウアバインのNa,K-ATPase活性阻害作用に及ぼすPGGの影響　Na,K-ATPaseの特異的な阻害剤であるウアバインによる作用をPGG（1.8×10^{-6} M）存在下で調べた(Fig. 5)．PGG存在下におけるウアバインのI_{50}値は，PGG非存在下と等しい3.5×10^{-7} Mであった．

4．PGGのK-pNPPase活性阻害作用に対する影響　Na,K-ATPaseの部分反応であるK-pNPPase活性に対するPGGの影響を調べた．PGGはK-pNPPase活性を濃度依存的に阻害し，I_{50}値は5.3×10^{-6} Mであり，3.3×10^{-4} Mでは完全に活性を阻害した．K-pNPPase活性に対するPGG（5.3×10^{-6} M）の影響をカリウムイオン濃度を変化させて調べた(Fig. 6)．PGGの阻害率は，カリウムイオン濃度が低い時小さく，濃度が上昇するに従って大きくなり，10mM以上では50%と一定になった（Fig. 6a)．この結果をHillプロットで表わし（Fig. 6b)，酵素に対する親和性を示す$K_{0.5}$値（最大酵素活性の50%値を示したカリウムイオン濃度）及びHill係数（n，直線の傾き）を求めた．$K_{0.5}$値はPGGにより3.3mMから2.2mMと低濃度になり，Hill定数は2.5から2.9に上昇した．

考察及び結論

牡丹皮中のNa,K-ATPase活性阻害物質の検索，精製，同定を行い，PGGであることを確認した．しかし，この分画法では，原料の牡丹皮メタノールエキスより強い阻害画分が得られなかった．牡丹皮にはPGG以外にも酵素活性阻害物質が存在し，PGGと相加的もしくは相乗的に酵素に作用しているか，あるいはPGGの阻害作用を強める物質が存在する可能性も考えられる[5]．

Na,K-ATPaseはATPを水解して生じるエネルギーを

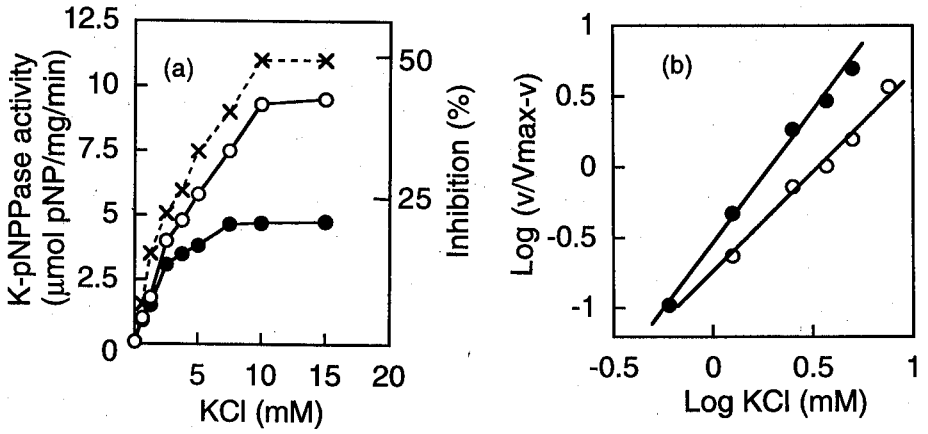


Fig. 6. Effect of PGG on K-pNPPase Activity in the Presence of Various Concentrations of K^+. (a) Enzyme activity was determined with PGG at 5.3×10^{-6} M (●) or without PGG (○). The percent inhibition by PGG is indicated (×). (b) Hill plot of the data in (a). $K_{0.5}$ for K^+, which was obtained from an intercept of the zero point of Y axis and each line of plots, was 2.2 and 3.3 mM with or without PGG, respectively. Hill coeficient (n), which was obtained as a slope, was 2.9 and 2.5 with or without PGG, respectively. The SD was less than 2.1%.

利用して細胞内外のNa^+とK^+の輸送を行うポンプの役割を担う酵素である．酵素はその反応過程において，少なくとも高エネルギー型のNa・E_1と Na・E_1-P及び低エネルギー型のK・E_2と E_2-Pである4つのリン酸化又は脱リン酸化型の中間体をとる（Fig. 7）．ATPはNa・E_1からNa・E_1-Pへの変換に関与し，カリウムイオン濃度の上昇はE_2-PからK・E_2への変換を促進する．ウアバインは酵素が低エネルギー型の時に細胞膜の外側から酵素に結合することによって活性を阻害するといわれている[8,9]．K-pNPPase活性は，Na,K-ATPaseの低エネルギー状態での反応を反映している．

PGGは基質であるATPに対して非拮抗阻害を示すことから，基質結合部位とは異なる部位に結合して阻害作用を表わすと考えられる．又，ウアバインのI_{50}値が，PGGにより変化しなかったことから，結合部位はウアバインとも異なることが示唆された．K-pNPPase活性に対するPGGの検討より，カリウムイオンの$K_{0.5}$値の減少，及びHill係数の上昇が明らかになり，PGGがカリウムイオンに対する親和性を増したことを示唆した．PGGの作用に関して得られた総ての結果より，PGGはNa,K-ATPaseのE_2状態と相互作用して，K・E_2からNa・E_1への変換を抑制すると考えられる[5]．

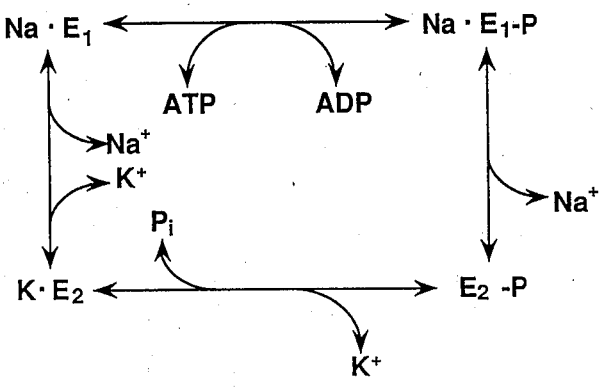


Fig. 7. Reaction Mechanism of Na,K-ATPase [8,9].

（本研究は平成5年度当所奨励研究の成果の一部をまとめたものである．）

文　献

1）Jφrgensen, P.L.：*Physiol. Rev.*, **14**, 864-917,1980.
2）佐藤かな子，安田一郎，長井二三子　他：薬誌，**111**，138-145，1991.
3）佐藤かな子，長井二三子，牛山慶子　他：プロジェクト研究報告書，「漢方方剤および生薬の安全性・有効性に関する研究」—六味丸の安全性・有効性について—，181-185，1993.
4）Nakao, T., Ohno-Fujitani, T. and Nakao, M.：*J. Biochem.*, **94**, 689-697, 1983.
5）Satoh, K., Nagai, F., Ushiyama, K., et al.：*Biochem. Pharmcol.*, **53**, 611-614, 1997.
6）西澤信，山岸喬，野中源一郎　他：薬誌，**104**，1244-1250，1984.
7）濱野朋子，安田一郎，瀬戸隆子　他：東京衛研年報，**48**，56-60，1997.
8）Post, R. L., Kume, S., Tobin, T. et al.：*J. Gen. Physiol.*, **54**, 606s-326s, 1696.
9）Taniguchi, K. and Post, R. L.：*J. Biol. Chem.*, **250**, 3010-3018, 1975.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 65-70, 1998

原料生薬に含まれる有害物質の実態調査（第2報）
—ヨクイニンについて—

中里光男*, 田端節子*, 永山敏廣*,
観公子*, 立石恭也*, 安田和男*

Survey of Harmful Substances in Crude Drugs (II)
— COICIS SEMEN —

MITSUO NAKAZATO, SETSUKO TABATA, TOSHIHIRO NAGAYAMA,
KIMIKO KAN, YUKINARI TATEISHI and KAZUO YASUDA

Keywords：ヨクイニン coicis semen, ハトムギ *Coix lacryma-jobi* L.var. *ma-yuen* Staph, 生薬 crude drugs, 漢方薬 herb medicine, 重金属 heavy metals, 放射性物質 radioactive substances, カビ毒 mycotoxins, 残留農薬 pesticide residues

緒　言

ヨクイニンは日本薬局方では，イネ科(*Gramineae*)ハトムギ*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Staph の種皮を除いた種子であると規定されている[1]．すなわち，ハトムギの果実の外殻（包皮）を開き，種皮を除いて乾燥した表面乳白色の種仁が生薬として用いられている．また，日本薬局方にはヨクイニンを粉末としたものがヨクイニン末として収載されている．

中国ではヨクイニンは「神農本草経」の上品に収載され，古来から食品に準ずる生薬として扱われてきた．その薬能は解熱，鎮痛，消炎，利尿，排膿，健胃等といわれ，西洋医学的見地の上から解熱鎮痛消炎薬とみなされる処方を中心に配合されている．しかし，本来的にヨクイニンを構成生薬とする処方の数は少なく[1-3]，むしろ，民間療法としていぼの治療や美肌保全によく用いられることから[3]，皮膚疾患に用いる漢方処方に加味して使われる例が多い．このようなことから生薬原料として消費される量はさほど多くはなく，粥として食したり，あるいは粉末を蒸しパンにしたり，饅頭等にする食品としての用途の方が多い．また，外殻をつけたままのものを「ハトムギ」と称してヨクイニンと区別して市販されており，こちらは健康茶，いわゆるハトムギ茶の原料として用いられる場合が多く，中にはすでに茶として煎ったものや焙じたものも市販されている．

ハトムギの産地は中国（福建，貴州，河北，遼寧省等），東南アジア各地（主としてベトナム，タイ等），さらに台湾，北朝鮮等であり，わが国でもわずかに栽培されているが，流通品のほとんどは上記の国々からの輸入品である[1, 4]．

このようにヨクイニンあるいはハトムギは生薬，すなわち医薬品としての領域と健康茶等の食品としての領域の両方で使用されている．著者らは従来から食品中のカビ毒[5, 6]や残留農薬[7-12]あるいは放射能[13-18]について衛生化学的実態調査を実施している．その中でハトムギ製品から発ガン性を有するカビ毒であるアフラトキシンがしばしば検出されることを報告した[5, 6]．しかしながら，生薬として衛生化学的に調査した事例は極めて少ない．今回は生薬メーカーから購入したヨクイニン及びハトムギについてヒ素，重金属，放射能，カビ毒及び残留農薬について実態を調査し，安全性評価の資料に供することとした．

実験方法

1．試料

表1に示した11検体を分析に供した．ヨクイニン及びヨクイニン末の5検体は調剤用の局方品である．ハトムギ4検体はハトムギ茶の原料等に用いられる殻付きあるいは種皮の付いたのもの，焙じハトムギは殻付きを焙じたもの，ハトムギ茶は殻付きを煎ったものである．いず

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1．供試試料

検体番号	品名	原産国	種類	販売元
H-1	ヨクイニン	中国	局方品	A社
H-2	ヨクイニン	中国	局方品	B社
H-3	ヨクイニン	中国	局方品	C社
H-4	ヨクイニン	北朝鮮	局方品	D社
H-5	ヨクイニン末	中国	局方品	C社
H-6	ハトムギ	北朝鮮	種皮付	D社
H-7	ハトムギ	中国	殻付	A社
H-8	ハトムギ	タイ	殻付	B社
H-9	ハトムギ	北朝鮮	殻付	D社
H-10	焙じハトムギ	中国	殻付	A社
H-11	ハトムギ茶	北朝鮮	殻付	D社

れも生薬メーカーから購入した．

2．分析法

1）ヒ素及び重金属等

(1) 分析対象元素

ヒ素，鉛，カドミウム，クロム，コバルト，銅，亜鉛，鉄，マンガン，マグネシウム及びカルシウム，計11元素

(2) 試験溶液の調製及び測定法

前報[19]に従った．

2）放射能

(1) 分析対象放射能核種

セシウム134（^{134}Cs）及びセシウム137（^{137}Cs）

(2) 前処理法及び測定法

前報[19]に従った．

3）カビ毒

(1) 分析対象カビ毒

アフラトキシン（B_1，B_2，G_1，G_2，M_1及びM_2），オクラトキシン（A及びB）及びシトリニン，計9種

(2) 試験溶液の調製

アフラトキシン：前報[19]に従った．

オクラトキシン及びシトリニン：中里らの方法[20]に従った．

(3) 測定法

アフラトキシン：前報[19]に従い，試験溶液を薄層板に塗布し，二次展開したのち，紫外線を照射し，アフラトキシンの蛍光及びRf値によって定性を行った．定量は薄層デンシトメーターによって行った．

なお，アフラトキシンが検出された試料については，一次展開後，トリフルオロ酢酸で誘導体を作成したのち，クロロホルム・メタノール（95：5）混液で展開し，標準品と比較して確認を行った[6]．

オクラトキシン及びシトリニン：試験溶液を蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィーに注入し，オクラトキシン及びシトリニンの定性，定量を行った[20]．なお，検出された試料については，試験溶液をあらかじめシュウ酸溶液で処理した薄層板（シリカゲル）に塗布し，クロロホルム・メタノール・ヘキサン(64：1：35)で展開後，紫外線（366nm）を照射し蛍光を観察した．次いでこの薄層版に塩化アルミニウム溶液を噴霧し，蛍光の変化を観察することによって確認を行った[21]．

4）残留農薬

(1) 検査対象農薬

有機リン系農薬は殺虫剤46種類及び殺菌剤2種類の合わせて48種類，有機塩素系農薬は殺虫剤14種類及び殺菌剤2種類の合わせて16種類，カーバメイト系農薬は殺虫剤14種類，また，含窒素系農薬は殺虫剤と殺菌剤の各1種類ずつ計2種類，総計80種類の農薬について検査を行った．農薬の内訳を①～④に示した．

①有機リン系農薬

殺虫剤：EPBP，EPN，イソキサチオン，エチオン，エチルチオメトン，エトプロホス，エトリムホス，カズサホス，キナルホス，クロルピリホス，クロルピリホスメチル，α-クロルフェンビンホス(CVP-E)，β-クロルフェンビンホス(CVP-Z)，サリチオン，シアノフェンホス(CYP)，シアノホス(CYAP)，ジアリホール，ジクロフェンチオン(ECP)，ジクロルボス(DDVP)，ジメチルビンホス，ジメトエート，ダイアジノン，チオメトン，テトラクロルビンホス(CVMP)，テルブホス，トリクロルホン(DEP)，トリクロホスメチル，パラチオン，ピラクロホス，ピリダフェンチオン，ピリミホスメチル，フェニトロチオン(MEP)，フェンスルホチオン，フェンチオン(MPP)，フェントエート(PAP)，ブタミホス，プロチオホス，プロパホス，ホサロン，ホスチアゼート，ホスメット(PMP)，ホルモチオン，マラチオン，メカルバム，メチダチオン(DMTP)，メチルパラチオン　46種

殺菌剤：イプロベンホス(IBP)，エディフェンホス(EDDP)　2種

②有機塩素系農薬

殺虫剤：α-BHC，β-BHC，γ-BHC，δ-BHC，*p,p'*-DDT，*p,p'*-DDE，*p,p'*-DDD，*o,p'*-DDT，アルドリン，エンドリン，ディルドリン，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）　14種

殺菌剤：キントゼン(PCNB)，ビンクロゾリン　2種

③カーバメイト系農薬

殺虫剤：XMC，アルジカルブ，イソプロカルブ(MIPC)，エチオフェンカルブ，オキサミル，カルバリ

表2．試料中のヒ素及び重金属等含有量

(μg/g)

検体番号	品名	As	Pb	Cd	Cr	Co	Cu	Zn	Fe	Mn	Mg	Ca
H-1	ヨクイニン	Tr	0.1	Tr	Tr	Tr	2.0	8.2	11	9.3	620	2.2
H-2	ヨクイニン	Tr	0.2	Tr	0.2	Tr	2.7	22	15	11	1,200	2.7
H-3	ヨクイニン	Tr	Tr	Tr	0.1	Tr	2.9	7.2	14	11	810	5.7
H-4	ヨクイニン	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	3.2	11	14	12	960	3.1
H-5	ヨクイニン末	Tr	Tr	Tr	0.3	Tr	3.7	7.0	42	16	1,200	19
H-6	ハトムギ	Tr	Tr	Tr	0.2	0.2	2.4	3.9	13	8.2	1,200	5.1
H-7	ハトムギ	Tr	0.2	Tr	0.2	Tr	5.3	12	13	7.4	930	12
H-8	ハトムギ	Tr	Tr	Tr	0.3	Tr	3.2	15	12	9.2	940	12
H-9	ハトムギ	Tr	Tr	Tr	0.2	Tr	3.5	10	13	11	970	16
H-10	焙じハトムギ	Tr	Tr	Tr	0.2	Tr	5.9	16	17	15	880	9.5
H-11	ハトムギ茶	Tr	Tr	Tr	0.2	Tr	3.5	14	13	11	1,100	17

Tr：0.1μg/g未満

ル(NAC)，カルボフラン，チオジカルブ，ピリミカーブ，フェノブカルブ(BPMC)，プロポキスル(PHC)，メソミル，メチオカルブ，メトルカルブ(MTMC) 14種

④含窒素系農薬

殺虫剤：クロフェンデジン 1種

殺菌剤：ビテルタノール 1種

計80種

(2) 試験溶液の調製

試料に水を加え，湿潤させたのち，アセトンで抽出した．以下食品中の残留農薬試験に関する厚生省告示法[22]に準じた．

(3) 測定法

有機リン系農薬，有機塩素系農薬及び含窒素系農薬はガスクロマトグラフィーで，カーバメイト系農薬はポストカラム高速液体クロマトグラフィーで測定した[22]．

結果及び考察

1．ヒ素及び重金属等

今回，対象としたヨクイニン，ハトムギ，ハトムギ茶等11検体中のヒ素及び重金属等の分析結果を表2に示した．

ヒ素は動物実験において，欠乏すると生育阻害や生殖能の低下をもたらすことが確認されており，ヒトでの必須性が指摘されている元素であるが，多量に摂取すると強い毒性を示す[23]．また，カドミウムも強い毒性を持つ元素として知られているが[23]，試料中のヒ素及びカドミウムはいずれも検出限界の0.1μg/g未満（Tr）であった．

鉛，クロム及びコバルトの検出量はいずれもごく微量であり，それぞれTr～0.2，Tr～0.3及びTr～0.2μg/gであった．いずれも欠乏すると貧血や成長阻害等をもたらす哺乳動物には欠くことのできない必須元素であるが，過剰に摂取すると種々の障害をもたらすことはよく知られいる[23]．しかし，検出量はごく微量であることから，問題はないと思われる．

銅，亜鉛，鉄及びマンガンの検出量はそれぞれ2.0～5.9，3.9～22，11～42及び7.4～16μg/gであり，特に高い値のものはなかった．これらも生体の恒常性維持に欠くことのできない元素であるが，多量に摂取すると過剰症をもたらす[23]．しかし，一日あたりの必要量から判断して，特に問題はないものと思われる[24]．

マグネシウム及びカルシウムの含有量はそれぞれ620～1,200及び2.2～19μg/gであった．これらの元素は生体を構成あるいは維持する主要元素であり，毒性も低い．それにもかかわらず摂取量不足が指摘されている元素である[25]．したがって，今回の結果からヨクイニンあるいはハトムギの摂取のみでは1日必要量への寄与は少ないものと思われる．

また，脱穀したヨクイニンと外殻あるいは種皮付きのハトムギあるいは焙煎処理したハトムギ茶の元素含有量の間に特に大きな違いは認められなかった．

今回の調査対象とした検体におけるこれら元素の検出量は，種々の生薬の金属元素の定量を行った糸川ら[26]あるいは松田ら[27]の報告の中のヨクイニンの値と大差のないものであり，平均的な含有量と考えられる．したがって，今回の供試した検体については，これら金属元素による生育土壌の汚染あるいは加工中での混入等の疑いはほとんどないものと思われる．

2．放射能

供試した試料11検体中に残留している放射能（^{134}Cs及び^{137}Csの合計）を測定したところ，いずれの検体においても検出限界値の4 Bq/kg以下であった．

チェルノブイリ原子力発電所事故を契機に，わが国で

はICRP（国際放射線防護委員会）勧告，放射線降下物の各種分析結果等から，^{134}Cs及び^{137}Csを指標核種として，輸入食品中の放射能濃度の暫定基準値を１kgあたり370Bq以下と定めた（昭和61年11月１日　衛検第282号）．この基準値に比べ今回のヨクイニン等の供試試料の放射能濃度ははるかに低い値であった．このように低いレベルの放射能濃度のものであれば，漢方薬あるいはハトムギ茶等の食品として長期間連用しても人の健康には影響を及ぼさないものと思われる．

チェルノブイリ原子力発電所事故後の我々の調査では，放射能の環境汚染レベルは減少傾向を示しているように見うけられる[13-18]．しかし，生薬原料の一大供給地であるアジア地域の中で，今なお核実験が行われていること，また，原子力施設からの放射能漏れや核廃棄物の不法投棄等の問題も懸念されていることから，これら原料供給地の土壌や植物が放射能に汚染されている可能性は否定できない．そのような地域において生育した植物が生薬または漢方製剤原料として流通する可能性もあることから，原料を選定する際には十分にその汚染に注意しなければならないと考える．

3．カビ毒

供試した試料11検体についてアフラトキシン，オクラトキシン及びシトリニンを分析した．前報[19]の甘草においてはアフラトキシンのみを分析対象としたが，今回は穀類での汚染例が比較的多いオクラトキシン及びシトリニンについても分析を行った[28]．結果は表３に示した通り，検体番号H-2の調剤用のヨクイニンからアフラトキシンB_1が0.8ppb，また，シトリニンが67ppb検出された．

表３．試料中のカビ毒の検査結果

検体番号	品名	カビ毒(ppb)		
		アフラトキシン	オクラトキシン	シトリニン
H-1	ヨクイニン	ND	ND	ND
H-2	ヨクイニン	0.8*	ND	67
H-3	ヨクイニン	ND	ND	ND
H-4	ヨクイニン	ND	ND	ND
H-5	ヨクイニン末	ND	ND	ND
H-6	ハトムギ	ND	ND	ND
H-7	ハトムギ	ND	ND	ND
H-8	ハトムギ	ND	ND	ND
H-9	ハトムギ	ND	ND	ND
H-10	焙じハトムギ	ND	ND	ND
H-11	ハトムギ茶	ND	ND	ND

*アフラトキシン B_1

ND：アフラトキシン類　0.1ppb未満，
　　オクラトキシン類及びシトリニン　1.0ppb未満

このような組み合わせの混合汚染はしばしば見うけられ，これは両トキシンの産生菌の分布が重複していることが主な原因と思われる．その他の10検体からはこれらのカビ毒は検出されなかった．

我々が継続的に行っている食品のアフラトキシン汚染調査においても，ハトムギ製品からはアフラトキシンがしばしば検出され，その検出率は10～20％である[5, 6]．過去，タイから輸入されたハトムギから日本での規制値10ppbを超える14.9ppbのアフラトキシンB_1が検出され[5]，食品衛生法違反で処分された例もある．今回，検出されたのは中国産であるが，中国では南部が一大生産地であり，この地方はアフラトキシンの汚染原因菌である*Aspergillus flavus*の汚染頻度の高い東南アジアに近い．したがって，中国の南部地域を原産地とするものは，食用，薬用を問わずアフラトキシンに汚染されている頻度は少なくないものと思われる．

オクラトキシンは主として*A. ochraceus*や*Penicillium viridicatum*等によって産生される腎毒性のカビ毒であり，発ガン性もある．穀類，豆類等で汚染事例があるが[28]，今回，供試した11検体からは検出されなかった．

シトリニンは主として*P. citrinum*や*P. viridicatum*等によって産生される腎毒性のカビ毒である．これによる汚染は米，麦類やそば等の穀類を中心に認められており，ハトムギからもしばしば検出される[28]．今回，ヨクイニンから検出された量はこれらの市販食品からの検出量と比較しても高い値であった．

今回，検出されたアフラトキシンの量は食品の規制値の１／10以下であり，また，シトリニンは比較的高い検出量であったが，その毒性はカビ毒の中では比較的低く，規制値も設けられていない[29]．したがって，今回，検出された量では直ちに人の健康を害するとは考え難い．しかし，ヨクイニンを疾病の治癒を目的とする漢方薬に用いる場合，あるいはハトムギを健康増進のために健康茶として用いる場合には，連用する可能性が高いことから，カビ毒を含有するものは極力排除すべきであると考える．今後は調剤用の局方品について，さらにカビ毒の汚染調査を行う必要があると思われる．

4．残留農薬

残留農薬については，検体番号H-1からH-5までの局方品のヨクイニン５検体について調査を実施した．その結果，いずれの試料からも農薬は検出されなかった（検出限界：BHC 0.001ppm，アルドリン，エンドリン，ディルドリン及びヘプタクロル（ヘプタクロルエポキサイドを含む）0.005ppm，その他の農薬 0.01ppm）．

ヨクイニンは漢方薬の構成生薬として比較的多量に配合されるため，10g以上を毎日摂取することが多い．また，民間療法としてのイボ治療法として50～100gを粥にして毎日食する方法もある．さらにヨクイニンあるいはハトムギ10～30gを一日量として煎じ，健康茶として飲用するのが一般化している．このようにヨクイニンは比較的摂取量が多い生薬であるが，今回の検査では農薬は検出されず，服用に際し，農薬の残留については問題はないと判断される．

農薬は農林産物の生産性を高めるための農業用資材の一つとして広く用いられている薬剤である．その使用に際しては，多くの国で対象作物や使用濃度及び使用回数などの使用方法が定められ，厳しく規制されている．しかし，農作物に使用された農薬は，環境中で徐々に減少するものの，その一部は環境中に長く留まり食品中に残留することがある．使用されなくなってから10年以上を経ても種々の農産物から検出され，特に乾燥品などでは，水分の減少に伴い残留濃度が高くなることが懸念される．漢方処方は主として薬用植物の乾燥品である生薬によって構成されることから，比較的高い濃度で検出される可能性がある．農薬は生産現場でその効力が期待されるものであり，食品や医薬品としての摂取段階では残留量はできる限り低いことが望ましい．生薬の種類あるいは産地によっては農薬が残留していることも推察されることから．今後も残留実態の把握が必要であると考える．

ま と め

本調査は当所における東洋医学プロジェクト研究の一環として行われたものである．今回は生薬として，また，食品としても使用されるヨクイニン及び専ら健康茶の原料として使用されるハトムギについて有害物質，すなわち，ヒ素及び重金属等，放射性物質，カビ毒及び残留農薬について調査を実施した．

ヒ素及び重金属では供試した検体のすべてにおいて通常含まれる量の範囲を超えるものはなく，土壌汚染あるいは加工中の混入が疑われるようなものは認められなかった．

放射能はいずれも^{134}Csと^{137}Csの合計が4 Bq/kg以下であり，汚染の疑いのあるものはなかった．

カビ毒では局方品のヨクイニン1検体からアフラトキシンB_1が0.8ppb，シトリニンが67ppb検出され，これは同一試料における混合汚染であった．これは局方生薬においても食品と同様，カビ毒による汚染頻度は少なくないことを示唆しているものと思われる．今後，さらなる調査が必要であると考える．

農薬は局方品のヨクイニン5検体について80種類を対象に分析を実施したが，いずれからも検出されなかった．

今回の調査ではカビ毒が検出された試料があったが，植物性生薬には採取まで長期間の生育を必要とするものがあり，その間，環境の影響を受けやすい．また，乾燥によって有害物質が濃縮して蓄積される可能性も高い．したがって，継続して他の様々な生薬について調査を行う必要があると思われる．

なお，本報告は東洋医学プロジェクト研究の一環として食品研究科職員が実施した分担調査の結果をまとめたものである．

文　献

1）日本薬局方解説書編集委員会編：第13改正日本薬局方解説書，D-1091-1093，1996，廣川書店，東京．
2）原田正敏：210処方 漢方薬物治療学〔第2版〕，194，1992，廣川書店，東京．
3）水野瑞夫監，田中俊弘編：日本薬草全書，506-508，1995，新日本法規出版，東京．
4）難波恒雄：和漢薬百科図鑑〔1〕，306-309，1993，保育社，大阪．
5）田端節子，上村　尚，田村行弘，他：食衛誌，28，395-401，1987．
6）Tabata S., Kamimura H., Ibe A. et. al. : *J. AOAC Int.*, **76**, 32-35, 1993.
7）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，他：食衛誌，**35**，652-660，1994．
8）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，他：食衛誌，**36**，383-392，1995．
9）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子，他：食衛誌，**36**，643-655，1995．
10）永山敏廣，小林麻紀，伊藤正子，他：食衛誌，**37**，127-134，1996．
11）永山敏廣，小林麻紀，伊藤正子，他：食衛誌，**37**，411-417，1996．
12）小林麻紀，永山敏廣，橋本常生，他：食衛誌，**39**，233-239，1998．
13）観　公子，真木俊夫，永山敏廣，他：東京衛研年報，**41**，113-118，1990．
14）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**42**，152-161，1991．
15）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**43**，142-148，1992．

16) 観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**44**，166-173，1993.
17) 観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**45**，105-109，1994.
18) 観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**46**，120-126，1995.
19) 中里光男，牛山博文，永山敏廣，他：東京衛研年報，**48**，61-66，1997.
20) 中里光男，斉藤和夫，石川ふさ子，他：東京衛研年報，**47**，100-104，1996.
21) 中里光男，冠　政光，中沢久美子，他：食衛誌，**23**，59-66，1982.
22) 厚生省告示第179号：“食品添加物等の規格基準”，平成9年9月1日，号外第177号，1997.
23) 桜井　弘，田中英彦編：生体微量元素，137-273，1994，廣川書店，東京.
24) 鈴木継美，和田　攻：ミネラル・微量元素の栄養学，23-36，1994，第一出版，東京.
25) 鈴木継美，和田　攻：ミネラル・微量元素の栄養学，297-327，1994，第一出版，東京.
26) 糸川秀治，渡辺謹三，田崎敏夫，他：生薬誌，**34**，155-160，1980.
27) 松田勝彦，野坂富雄，鈴木　章，他：生薬誌，**34**，321-325，1980.
28) 中里光男：マイコトキシン，**18**，6-11，1983.
29) Cole R. J. and Cox R. H.：*Handbook of Toxic Fungal Metabolites*，p824-829，1981，Academic Press，New York.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 71-74, 1998

家庭用品の衛生化学的研究（第39報*）
規制対象外家庭用品中のホルムアルデヒドの実態調査

都田路子**, 山野辺秀夫**, 上原真一***,
観照雄**, 藤井孝**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXIX)
Survey of Formaldehyde in Unregulated Household Necessities

MICHIKO MIYAKODA**, HIDEO YAMANOBE**, SHIN-ICHI UEHARA***,
TERUO KAN** and TAKASHI FUJII**

Keywords：ホルムアルデヒドformaldehyde, 家庭用品household necessities, 樹脂加工resin-treated, 繊維製品textile products, 壁紙wall paper, エアゾル製品aerosol products

緒　言

ホルムアルデヒド（HCHO）は消毒剤，防腐剤の他，繊維の形態安定加工あるいは接着剤など合成樹脂の架橋剤として多くの家庭用品に使用されている．しかし，HCHOはその強い抗原性によりアレルギー性皮膚炎を惹き起こす[1,2]など,家庭用品による健康被害の主な原因物質の一つである．

現在,「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」（家庭用品規制法）[3]によりHCHOの規制基準が設けられている家庭用品は，下着，寝衣，靴下等の繊維製品類及びかつら，つけまつげ，靴下どめ用の接着剤で，身体に直接接触して使用される度合いの大きいものである．なお，基準値は75ppm以下，但し乳幼児用繊維製品については,「検出しない」ことと定められている．

一方，HCHOは規制対象外の家庭用品にも含まれており,多様な使用目的から，健康に影響を与える機会はきわめて多いと考えられる．しかし，規制対象外家庭用品に含まれるHCHOの使用実態についての報告例は少なく，不明な点も多い．そこで，その実態を把握し，家庭用品による健康被害を未然に防止する目的で調査を行った．

実験方法

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

a）HCHO標準溶液系列：家庭用品規制法のホルムアルデヒドの項（以下,公定法）に従って標定したホルマリンを水で希釈し，HCHO濃度を0.1, 0.2, 0.3及び4.0 μg/mlとした標準溶液系列を作成した．

b）アセチルアセトン（AA）試液：酢酸アンモニウム150gを水で溶かし,氷酢酸3 ml及びアセチルアセトン2 mlを加え水で1000mlとした．

c）ジメトン・エタノール溶液：ジメトン1 gにエタノールを加え100mlとした．

d）リン酸溶液：リン酸5 gを採り水を加え25mlとした．

2．装置　自記分光光度計：日立U－3000型

3．検体　表1に示すように，平成6年～9年に都内の小売店から購入した繊維製品88検体（形態安定加工表示41，加工表示なし47）,壁紙・襖紙類44検体（壁紙・襖紙兼用4 ,壁紙28,襖紙10，障子紙2），カーテン21検体（遮光用16，浴室用5），マット・カーペット類4検体，寝具8検体，家庭用洗浄剤18検体，家庭用エアゾル製品29検体（クリーナー10，消臭スプレー10，防水スプレー9）計212検体である．

4．試料　繊維製品は部位により異なる材質で構成されていることから可能な限り部位別に分離し試料とした．

＊第38報，東京衛研年報，**48**，110-114, 1997

＊＊東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
＊＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

表１．規制対象外家庭用品中のHCHOの測定結果

検　体	検体数	HCHO量（ppm）／検体数							
		ND*	～20	～75	～150	～200	～250	～300	300～
繊維製品									
1　形態安定加工表示	41	3	4	22	4	4	2	1	1 (305ppm)
2　加工表示なし	47	17	15	13	2	0	0	0	0
壁紙，襖紙類									
1　壁紙・襖紙兼用	4	2	1	0	0	1	0	0	0
2　壁紙	28	7	15	1	4	0	0	0	1 (379ppm)
3　襖紙	10	2	7	0	1	0	0	0	0
4　障子紙	2	2	0	0	0	0	0	0	0
カーテン									
1　遮光用	16	9	6	0	0	0	0	0	1 (311ppm)
2　浴室用	5	5	0	0	0	0	0	0	0
マット・カーペット類	4	0	2	1	0	0	0	0	1 (327ppm)
寝具	8	0	5	3	0	0	0	0	0
家庭用洗浄剤	18	2	13	2	1	0	0	0	0
家庭用エアゾール製品									
1　クリーナー	10	7	0	1	1	0	0	0	1 (2057ppm)
2　消臭スプレー	10	9	0	1	0	0	0	0	0
3　防水スプレー	9	9	0	0	0	0	0	0	0

＊ND：検出しない（検出限界：1ppm）

マット・カーペット類，寝具は身体に接触する表地の部分を試料とした.その他の製品は均質とみなし,任意の一部を試料とした.

5．試験溶液の調製

a）繊維製品，壁紙・襖紙類，カーテン，マット・カーペット類,寝具：公定法に準じて調製した．試料を細切しその約１gを200mlの共栓試験管に精秤し，水100mlを加えたのち密栓し,40℃の水浴中で時々振り混ぜながら１時間抽出する．次にこの液をガラスろ過器（G2）を用いて温時ろ過し試験溶液とした.

b）家庭用洗浄剤，家庭用エアゾル製品：試料約１gを精秤し，水で20mlとした液を試験溶液とした．ただし白濁，沈殿が生ずるものについては，さらにろ過あるいは遠心分離を行った．なお，この操作後も白濁，沈澱がみられる試料及び後述の定量操作において白濁等により定量不可能となる試料は，公定法の接着剤に準じて水蒸気蒸留法による前処理を行った.

［水蒸気蒸留法］試料約１g精秤し,水50ml,リン酸溶液３mlを加え水蒸気蒸留を行い,留液200mlを試験溶液とした.

6．HCHOの定量及び確認（公定法）

a）定量:試験溶液，HCHO標準溶液系列及び水の各5.0mlを20mlの共栓試験管にとり，AA試液5.0mlを加えて振り混ぜ，40℃の水浴中で30分間加温したのち，室温に30分間放置した．この溶液について水から得られた溶液を対照として415nmにおける吸光度を測定した．HCHOの量は標準溶液系列から得られた検量線より求めた.

b）確認：試験溶液5.0mlを20mlの共栓試験管にとり，ジメドン・エタノール溶液1.0mlを加え振りまぜ，40℃の水浴中で10分間加温した.更にAA試液5.0mlを加えて上記定量法に従い操作し，得られた溶液の吸収スペクトルを測定し，412～415nmにおいて定量法で得られた溶液と同様の吸収スペクトルを示さないことを確認した.

表2．繊維製品の製品及び部位別におけるHCHOの測定結果

検体	検体数	試料数	HCHO量（ppm）／試料数							
			ND*	～20	～75	～150	～200	～250	～300	300～
繊維製品										
1．形態安定加工表示	21									
Yシャツ		21	0	3	12	2	0	2	1	1(305ppm)
身頃		21	0	4	12	5	0	0	0	0
前立		21	0	5	11	4	1	0	0	0
襟										
ブラウス・ポロシャツ	12									
身頃		12	0	0	7	1	4	0	0	0
前立		12	0	3	9	0	0	0	0	0
襟		12	0	4	8	0	0	0	0	0
ズボン	8	8	3	1	3	1	0	0	0	0
2．加工表示なし										
Yシャツ	2									
身頃		2	0	0	1	1	0	0	0	0
前立		2	0	0	1	1	0	0	0	0
襟		2	0	0	1	1	0	0	0	0
ブラウス・ポロシャツ	7									
身頃		7	1	2	3	1	0	0	0	0
前立		1	0	1	0	0	0	0	0	0
襟		5	1	3	0	1	0	0	0	0
Tシャツ等**	38	38	16	15	7	0	0	0	0	0

＊ＮＤ：検出しない（検出限界：1ppm）

＊＊Tシャツ（10検体），マフラー(5)，セーター(4)，帽子(3)，ベスト(2)，手袋(2)，ネクタイ(2),膝掛け(2)，腹巻き(2)，襦袢(2)，ズボン(1)，外衣(1)，スカート(1)，水着(1)

結果及び考察

1．繊維製品

分析結果を表1に示した．繊維製品は形態安定加工と表示されたもの（以下，加工表示品）と表示されていないもの（以下，無加工表示品）に分けて示した．なお，ワイシャツ及びブラウス・ポロシャツは部位によりHCHOの濃度が異なったが，最大値を各検体の代表値として示した．加工表示品の93%（38/41,41検体中38検体，以下同じ），無加工表示品の40%（30/47）からHCHOが検出された．家庭用品規制法が規定している基準値75ppm（以下，基準値）を超えるものは，前者では12検体で，その濃度は最大305ppmまで連続的に分布していた．一方，後者では基準値を超えるものは2検体のみで，濃度も150ppm以下と加工表示品に比べ低い結果が得られた．

次に，製品及び部位別の分析結果を表2に示した．

ワイシャツ及びブラウス，ポロシャツの加工表示品ではすべての部位からHCHOが検出された．このうち21試料は基準値以上であった．その内訳を製品及び部位別に見ると，ワイシャツの身頃は6試料，前立は5試料，襟は5試料であり，ブラウス・ポロシャツでは身頃のみに見られ，その数は5試料であった．また，濃度は身頃の部分が高く，特にワイシャツでは200ppm以上の高濃度のものは4試料あった．身頃で高濃度であった検体は，低い検体に比べて襟，前立でも高濃度を示す例が多かった．以上の結果から，HCHO濃度は身頃に高く存在し，身頃で高濃度であれば，その他の部分も高くなる傾向を示すことが分かった．

またHCHOが検出されたズボンはいずれも加工表示品であり63%（5/8）であったが，基準値を超えるものは1検体と少なかった．

なお，基準値を超える検体についてHCHOの由来を岩

間ら[4]の方法で判定したところいずれも樹脂加工によるものであることが推定された．このことから，加工表示品の高濃度HCHOは，身頃を重視した形態安定を目的とした樹脂加工に由来するものであることが明らかとなった．

一方，無加工表示品のワイシャツ及びブラウス・ポロシャツから検出されるHCHOの量は加工表示品に比べ格段に少ないが，基準値を超えるものもそれぞれ1検体見られた．HCHO濃度は部位による差は明らかでなく，加工表示品とは異なる結果であった．

無加工表示品のTシャツその他の繊維製品では58%（22/38）からHCHOが検出されたが，いずれも基準値を超えるものは無かった．

2．壁紙・襖紙類

壁紙・襖紙兼用の製品は50%（2/4）から,壁紙では75%（21/28）から，襖紙では80%（8/10）からHCHOが認められた．検出されたHCHOは製品に塗布されている接着剤に由来すると推測されたが，濃度には製品間で大きな差がありさらに検討する必要がある．

なお基準値以上検出されたものは7検体あったが，これらを接着剤のタイプ別に分けると，水をつけて使用する再湿のりタイプのものは壁紙の4検体（94，112，127，379ppm），粘着シートタイプのものでは壁紙・襖紙兼用，壁紙，襖紙の各1検体（182，76，130ppm）であった．水を使用するタイプで高濃度の検体が多かったことから，この製品でのHCHOの使用目的は接着剤の防カビではないかと推測される．障子紙からは検出されなかった．

3．カーテン

遮光用は44%（7/16）からHCHOが検出された．この内1検体は311ppmと高濃度で，防炎加工表示されたものであった．その他のものはいずれも20ppm以下と少なかった．

浴室用からは検出されなかった．

4．マット・カーペット類

4検体全部からHCHOが検出された．327ppmの高い値を示した1検体は，毛皮の敷物の毛の部分から検出したもので，毛皮のなめしに使用されたHCHOによるものと推測された．その他のものはいずれも基準値以下であった．

5．寝　　具

8検体全部からHCHOが検出されたが，いずれも基準値以下であった.寝具は皮膚と直接接触することもあり，製造には注意が払われているものと思われる．

6．家庭用洗浄剤

検体の89%（16/18）からHCHOが検出された．このうち1検体（85ppm）を除きいずれも基準値以下であった．

7．家庭用エアゾル製品

クリーナーでは30%（3/10）からHCHOが検出された．2057ppmの高い値を示した製品は「化学モップ用，化学ダスター用帯電剤」の表示がされていた．

消臭スプレーでは10%（1/10）からHCHOが検出されたが，基準値以下であった．なお「カーテンに直接噴霧し3ヶ月効果がある」との説明書きがされていた．このことはHCHOの防カビ，抗菌効果から異臭発生の抑制を期待したのではないかと思われる．

防水スプレー10検体からは検出されなかった．

ま と め

調査の結果，HCHOは多くの家庭用品に含まれていることがわかった．このうち繊維製品，壁紙，カーテン，カーペット，エアゾル製品各1検体から,305～2057ppmという高濃度のHCHOが検出された．これは通産省が繊維製品のホルマリン樹脂加工にあたって出した通達[5]の値（中衣類は300ppm，上衣類は1000ppm）を超えるものである.さらに，壁紙等はその使用面積が広いこと，エアゾル製品は噴霧すると人が直接吸い込む危険性があることなどを考え合わせると,これらの結果は室内環境，人の健康に大きな影響を及ぼす危険性を示唆していると思われる．従って，今後規制対象外の家庭用品にあってもHCHO使用に対してなんらかの規制が必要ではないかと考えられる．

(本研究の概要は,地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会1998年2月で発表した)

文　　献

1）藤原鎮男監訳：ザックス有害物質データブック，588, 1990, 丸善株式会社, 東京.
2）吉田正一郎, 早田道浩，森博美共編：急性中毒情報ファイル，第3版，336, 1996, 廣川書店，東京.
3）家庭用品規制関係実務便覧，第一法規出版，東京
4）岩間雅彦，中島重人，山本勝彦：繊維製品中ホルムアルデヒドの樹脂加工／移染判別法の改良，第32回全国衛生化学技術会年会要旨集，62-63, 1995.
5）通商産業省繊維雑貨局通達，47繊局第569号昭和47年7月20日

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16編が掲載されている．分析法の開発としては，食品中のプロピオン酸，玄米中のアクリルアミドモノマーの分析法の各１編がある．残留実態及び含有量調査としては，残留農薬実態調査に関する論文が４編，魚介類中のPCB汚染実態調査，食品中の天然色素使用実態調査，缶詰食品中の金属含有量調査，食品用天然着色料中の重金属等含有量調査，魚介類中の鮮度保持剤の使用実態調査，茶飲料等のカテキン類等の含有量調査，輸入食品の放射能濃度調査，食物繊維摂取量調査に関するもの各１編がある．その他，輸入チーズ中のナタマイシン検出例，化学性食中毒事例に関するもの各１編があり，以下に要旨を紹介する．

パン，洋菓子等の保存料であるプロピオン酸のHPLCによる分析法を検討した．試料から水蒸気蒸留後，SAX及びC18カートリッジにより精製し，酸性アセトニトリル－水系移動相を用いたHPLC-UVで測定した．各種食品に0.5，2.5g/kg添加した時の回収率は84～98％であり，検出限界は10μg/gであった．

土地造成の土壌改良剤としてポリアクリルアミド系凝集剤が用いられており，このモノマーが水田を汚染し，玄米中に残留する可能性を考えて分析法を検討した．玄米からアセトン抽出，臭素化後，酢酸エチル抽出，シリカゲルカラム精製後，HPLC-UVにて測定した．玄米からの回収率は10 ppb添加により87.5±4.0%であり，検出限界は１ppbであった．

国内産の野菜・果実類７種35検体の残留農薬を調査した結果，有機リン系農薬のクロルピリホス，DDVP，EPN，フェニトロチオン，プロチオホスが検出され，食用菊ではクロルピリホスが残留基準値を超えていた．カーバメイト系農薬ではチオジカルブ，メソミルが，有機塩素系農薬ではイプロジオン，プロシミドン，TPN，ビンクロゾリン等が検出された．無・減農薬栽培作物の残留農薬についても調査した．

輸入農産物245検体の残留農薬調査から，８種の有機リン系農薬（エチオン，クロルピリホス等），含窒素系殺虫剤（テブフェンピラド），４種の含窒素系殺菌剤（ミクロブタニル，ビテルタノール，トリアジメホン，トリアジメノール）を検出したが，いずれも国内及びFAO/WHOの残留基準値以下であった．

輸入農産物70種245作物の残留農薬調査により，有機塩素系農薬ではBHC，DDT，ジコホールを，カーバメート系農薬ではNAC，MTMC，メソミル，クロルプロファムを検出した．その他の農薬としてイマザリル，TBZ，OPP，2,4-Dが検出された．世界を５地域別として，農産物からの農薬検出率を比較した．

有機スズ系殺ダニ剤の酸化フェンブタスズ（ジ体：代謝物を含む），シヘキサチンの原子発光検出器付きガスクロマトグラフィー(GC-AED)による分析法を開発した．試料より１％酢酸・エーテル抽出，エチル化，シリカゲルカートリッジで精製後，GC-AEDで測定した．国内産農産物中の残留実態調査により，モモ２検体から酸化フェンブタスズが0.04～0.06ppm検出された．

平成元年度から９年度までに中央卸売市場入荷の魚介類，及び平成５年度から９年度までは東京湾で捕獲したスズキ中のPCB含有量調査を実施した．いずれの検体もPCB暫定基準値を超えていなかった．魚介類ではスズキ，イワシ，アイナメ，イシモチ，ギンダラで0.10ppmを超えた残留が認められた．一方，東京湾のスズキでは0.20ppm前後の横這い状況で推移していた．

天然色素は一般の加工食品の他，健康食品の分野まで幅広く使用されているところから，市販食品251試料を調査したことろ，194試料中から，延べ数で237の色素が検出された．菓子類では85試料から13種の天然色素がほぼ単独で，食肉及び魚介類ではほぼ４種類の色素が用いられていた．

輸入缶詰食品中の重金属（ヒ素，カドミウム，鉛，亜鉛，スズ）含有量を調査した．カドミウムは貝類，甲殻類，特に英国産かに（肝）から，3.2，3.6μg/gと高濃度で検出され，鉛は貝類及び魚介類から検出されたが濃

度は低かった．亜鉛は果実類を除いた全てから検出され，スズは野菜類，果実類及びきのこ類から検出され，高い値のものは缶詰内面からの溶出が示唆された．

天然着色料８種（アナトー色素，ウコン色素，エルダーベリー色素，コチニール色素，抽出コロテン，トウガラシ色素，ブドウ果皮色素，ベニコウジ色素）57製品中の重金属含有量を調査した結果，最高濃度は水銀0.04μg/g，鉛1.4μg/g，カドミウム0.07μg/g，クロム 20μg/g，マンガン37μg/g，ヒ素1.5μg/gであり，衛生行政上問題なかった．

茶葉（緑茶，ウーロン茶，紅茶など）及びこれらの茶飲料中のカテキン類８種（エピカテキンなど），メチルキサンチン類３種（カフェインなど）及びアスコルビン酸の一斉分析法を作成，含有量調査を行った．緑茶茶葉，ウーロン茶，紅茶中の総カテキン量，カフェイン，L-アスコルビン酸含量はそれぞれ，92～150，22～38，0.6～5.9 mg/g，33～87，22～30，0～0.5mg/g，10～65，23～33，0～0.5mg/gであった．

生鮮魚に使用が禁止されている食品添加物の酸化防止剤（アスコルビン酸等），pH調整剤（有機酸類），色調調整剤使用の疑いから，都内流通の鮮魚及び冷凍マグロについて調査した．鮮魚のアスコルビン酸濃度は同一魚種と同程度であり，有機酸等は殆ど検出されず，これらの使用はないものと推定された．

平成７年度から９年度までに都内で市販の輸入食品等920試料について放射能濃度を測定した．暫定規制値の370Bq/kgを超えた試料はなく，50Bq/kgを超えたものは４試料（0.4%）でいずれもキノコであった．すなわち，フランス産のピエ・ド・ムトン120Bq/kg，シャンテレール53Bq/kg，イタリア産のポルチーニ88Bq/kg，53Bq/kgであった．

昭和60年から平成７年度までの国民１人当たりの食物繊維摂取量を算出した．1000kcal当たり，7.7～8.3g（食物繊維摂取量15.8～16.9g)と目標値より２g前後少なかった．平成７年度は年齢階級別１人１日当たりの摂取量について算出し，10～30歳代では16～17g，40歳代以上では17～20gであった．

都内で収去した輸入ナチュラルチーズ44検体中の，オランダ産14検体及びノルウェー産1検体から，我が国では使用が認められていない保存料（表面防かび剤，抗生物質）のナタマイシンを検出し，確認した．チーズ表面層中の濃度として，ナタマイシンは2.6～35μg/g検出され，表面の部位による濃度変動が大きいことも明らかとなった．

平成９年度に発生した化学物質（自然毒）による食中毒のうち，①ツブ貝の唾液腺に含まれるテトラミンによる中毒事例　②ブリ照り焼きの不揮発性アミンが疑われる事例　③カジキマグロの竜田揚げの不揮発性アミンが疑われる事例　④有毒キノコのカエンタケによる中毒事例　⑤プロセスチーズの細菌増殖によるイソアミルアルコール等による異臭事例，の５例について紹介した．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 77-83, 1998

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法

立石恭也*, 中里光男*, 牛山博文*, 小林千種*
川合由華**, 守安貴子***, 安田和男*

Determination of Propionic Acid in Foods by High Performance Liquid Chromatography

YUKINARI TATEISHI*, MITSUO NAKAZATO*,
HIROFUMI USHIYAMA*, CHIGUSA KOBAYASHI*,
YUKA KAWAI**, TAKAKO MORIYASU*** and KAZUO YASUDA*

An analytical method was developed for the determination of propionic acid in foods by high performance liquid chromatography. Propionic acid was obtained by steam distillation of samples. The distillate was passed through MAXI-CLEAN SAX and Sep-Pak Vac C-18 cartridges for cleaning. Propionic acid was separated on a Inertsil ODS-3 column with a mobile phase of acetonitrile-water(6:94) mixture and a pH adjusted to 2.5, and was detected at 210nm. The recoveries of propionic acid added to various kinds of foods amounted to 84～98%, respectively. The determination limits were 10 μg/g. The contents of propionic acid in 108 commercial foods were surveyed. Propionic acid was detected in a small number of samples of bread,cakes, dairy products and soy sauces. In addition, propionic acid was detected in almost all fish sauces and oyster sauces.

Keywords：プロピオン酸 propionic acid，保存料 preservative，高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography，固相抽出 solid phase extraction，食品 foods

緒　言

プロピオン酸及びその塩類は，かび，好気性芽胞菌の発育を阻止するが，パン酵母に対する作用が比較的弱いことから，わが国では保存料としてパンに2.5g/kgまでの使用が許可されている．また，この他にも洋菓子に2.5g/kg，チーズには3g/kgまでの使用が認められている．さらにノルウェー，デンマーク等の諸外国では小麦粉，ビスケット，マーガリン，ジャム，調味料，漬物等への使用を認めている例もあり[1]，これらの国々からの輸入食品についてはプロピオン酸の検査も行う必要がある．

また，プロピオン酸は，チーズ，味噌等の発酵食品の発酵時における副産物として生成されることも知られており[2)~5)]，バックグランド値を知ることは行政上重要である．

食品中のプロピオン酸の分析法は，水蒸気蒸留により抽出し，留液を減圧濃縮後[6]あるいはイオン交換樹脂カラムで処理した後[7]，ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）により分析する方法，またはメタノール等で抽出した後，フェナシル化等を行って誘導体とし，高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）により分析する方法[8]が一般的である．しかし，これらの方法はいずれも操作が煩雑であり，また適用できる食品も限られている．

そこで，著者らは簡便で，かつ多種の食品に適用できる分析法として，クリーンアップに固相抽出を用いたHPLCによる方法について検討し，良好な結果を得た．

また，本法を用いて種々の市販食品中の含有実態調査

＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊東京都立衛生研究所精度管理室
＊＊＊東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

を行った.

特に，最近は魚醤等の調味料でプロピオン酸が検出される例が見られ，天然由来か添加したものかの判断が難しい場合があったので，これらのバックグラウンド値を把握するための調査も行ったので併せて報告する.

実験方法

1．試料

平成７年から８年に東京都内で市販されていたパン，ジャム，ビスケット，ケーキ類，チーズ，酢漬及び発酵調味料の合計108検体を用いた.

2．試薬

1）プロピオン酸標準溶液：プロピオン酸ナトリウム（関東化学（株）製，カルボン酸分析計用）0.13gを水に溶解して100mlとしたものを標準原液（本品１mlはプロピオン酸1000μgを含有する）とし，適宜希釈して使用した.

2）トリス－塩酸緩衝液(pH8.5)：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン24.2gを量り，水500mlに溶解し，２mol/L塩酸でpH8.5に調整した後，水を加え1000mlとした.

3）前処理用カートリッジ：MAXI-CLEAN SAX（強陰イオン交換型，充填量600mg，Alltech社製）及びSep-Pak Vac C18（逆相系，充填量1000mg，Millipore社製）を用いた．それぞれのカートリッジはあらかじめメタノール10ml及び水10mlで順次洗浄したものを用いた.

4）アセトニトリルはＨＰＬＣ用を，その他の試薬は試薬特級品を用いた.

3．装置

高速液体クロマトグラフ：東ソー（株）製ＣＣＰＳ型ポンプ，同ＵＶ－8020型紫外部検出器，同ＡＳ－8020型オートサンプラー，昭和電工（株）製ＡＤ－３０Ｃ型カラムオーブン，東京化成工業（株）製GASTORR ＧＴ－１０３型脱気装置，及び（株）島津製作所製ＣＲ－５Ａ型データ処理装置を用いた.

4．HPLC条件

カラム：Inertsil ODS-3(5μm，4.6mm，i.d.×250mm，ジーエルサイエンス（株）製)，

移動相：アセトニトリル－水（6:94）混液をリン酸でｐH2.5に調整したもの，

流　速：1.0ml/min，検出波長：UV 210nm，

注入量：10μl，カラム温度：40℃

5．試験溶液の調製

操作の概要をScheme.1に示した．細切またはホモジナイズした試料30gを二径フラスコに取り，水100ml，食塩80g，10％リン酸10ml及びシリコーン樹脂数滴を加え，毎分７～８mlの流出速度で水蒸気蒸留を行った．留液はあらかじめ捕集液として0.2mol/Lトリス－塩酸緩衝液（pH8.5）20mlを加えたメスシリンダー中に捕集し，留液量が280～290mlになったとき蒸留を止め，水を加えて正確に300mlとした.

次に留液の20mlを分取し,MAXI－CLEAN SAXカートリッジに負荷した後，カートリッジを水10mlで洗浄した．次いでSAXカートリッジの下にSep-pak VAC C18カートリッジを接続し，二段カートリッジとした後，これに５％塩化ナトリウム含有0.01mol/L塩酸５ml，次いでアセトニトリル－水(10：90)混液を負荷して溶出し，溶出液の全容を10mlとしたものをHPLC用試験溶液とした.

Sample 30g
- Add NaCl 80g, 10%H_3PO_4 10ml and water 100ml
- Steam distillation

Distillate (300ml)

Distillate (20ml)

MAXI－CLEAN SAX (600mg)
- Wash with water 10ml
- Connect with Sep－Pak Vac C18 (1g) to a lower part of MAXI－CLEAN SAX

SAX－C18
- Elute with 0. 01 mol/L HCl containing 5%NaCl 5ml and MeCN：water (10：90) 5ml

HPLC

Scheme 1. Analytical Procedure of Propionic Acid in Foods

結果及び考察

1．プロピオン酸の抽出

試料からのプロピオン酸の抽出には，メタノール等で直接抽出する方法[7]あるいは水蒸気蒸留によって抽出する方法等[5][6]が一般的に用いられるが，今回は適用する食品の範囲を調味料や発酵食品にまで広げているため，種々の夾雑物の影響が懸念される．そのため抽出率もよく，かつクリーンアップ効果も大きい水蒸気蒸留法を採用することとした.

2．クリーンアップ条件

水蒸気蒸留による留液をHPLCに直接注入した場合，調味料及び発酵食品ではFig.1の(A)に示したように，プ

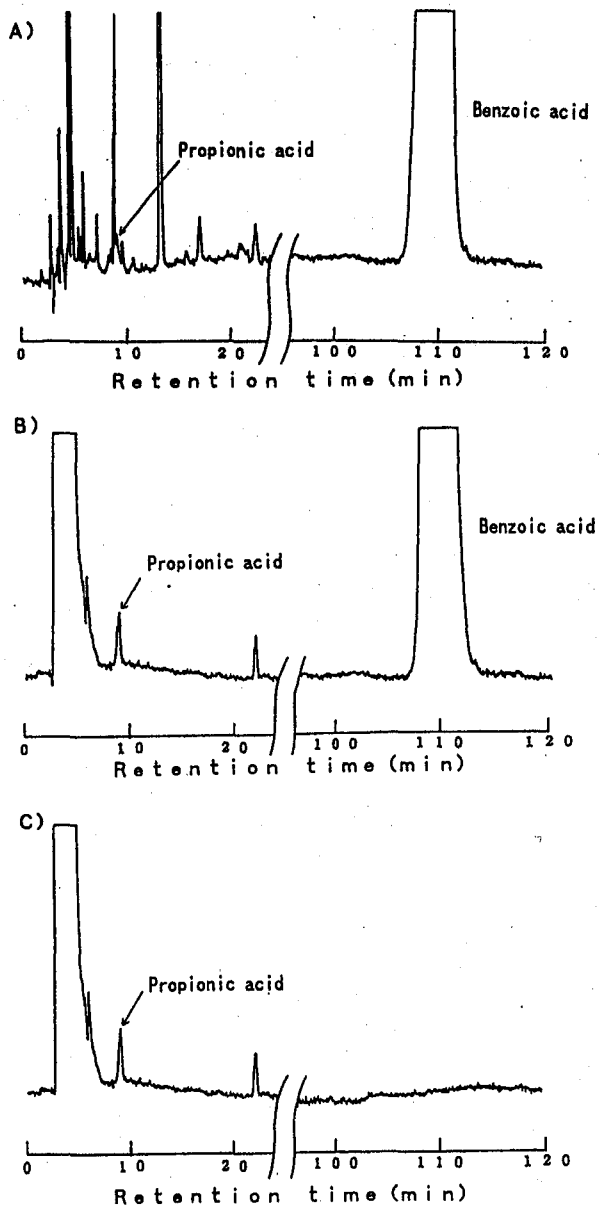


Fig.1. Chromatograms of Propionic Acid in Distillate of Seasoning
A) without SAX and C18 cartridge treatment
B) with SAX cartrige treatment
C) with SAX and C18 cartridge treatment

HPCL conditions, column : Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6mm, i.d. ×250mm) ; mobile phase: MeCN-water (6 : 94) (adjust to pH2.5) ; flow rate : 1.0ml / min ; detection : UV 210nm; column temp:40℃

ロピオン酸のピーク付近に夾雑ピークが出現し判定が困難な場合が多かった．また，Fig.1の(A)のような安息香酸を含有する試料では，クロマトグラム上約110分のところにそのピークが出現し，分析に長時間を要することが判った．他の保存料のソルビン酸及びデヒドロ酢酸等についても同様に110～130分付近にピークが出現した．そこで，これらの妨害物をカートリッジカラムにより取り除く方法について検討した．

1）SAXカートリッジによるクリーンアップ

種々のタイプのカートリッジカラムについて検討したところ，夾雑ピークを取り除く効果は強陰イオン交換型(SAX)を用いた場合に極めて大きかった．しかし，この操作においてプロピオン酸をSAXカートリッジに効率よく保持させるためには，プロピオン酸を十分解離させる必要がある．したがって留液のpHを中性付近から塩基性側に調整する必要があった．しかし，SAXカートリッジからのプロピオン酸の溶出を0.01mol/L塩酸で行うことを考慮すると留液のpHは中性付近から弱塩基性に調整することが，洗浄溶媒を少なくする上でより効果的であった．そこで捕集液にトリス－塩酸緩衝液（pH8.5）を用いることとした．

また，種々のSAXカートリッジについて比較検討をしたところ，Alltech社製のMAXI-CLEANカートリッジが，イオン交換当量も大きく，留液を20ml負荷することが可能であった．そこでSAXカートリッジはMAXI-CLEAN SAXカートリッジを用いることとした．

次にMAXI-CLEAN SAXカートリッジからのプロピオン酸の溶出条件について検討した．まず，溶出液として0.01mol/L塩酸を用いたところ，プロピオン酸を全量溶出するのに10ml以上の液量が必要であった．そこで，この溶出液に塩化ナトリウムを添加して溶出液量の減少をはかった．溶出液量を５mlとした場合に必要な塩化ナトリウム濃度について検討した結果をFig.2に示した．

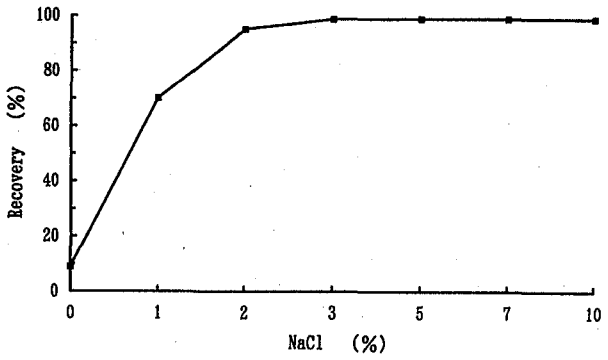


Fig.2. Effect of NaCl on the Recoveries of Propionic Acid from SAX Cartridge

プロピオン酸は0.01mol/L塩酸に添加する塩化ナトリウムの濃度が３％以上でほぼ全量溶出することから，塩化ナトリウム濃度は５％とすることとした．本条件で溶出した調味料のクロマトグラムをFig.1の(B)に示した．しかし，このクロマトグラムからも判るように，SAXカー

トリッジのみの処理では同じ酸性物質である安息香酸やソルビン酸等の共存する保存料を取り除くことができなかった．また，逆相系のカラムを用いたHPLCではこのように分配能に大きな差のある物質の分析には長時間を要することが判った．そこでSAXカートリッジで処理した溶出液を逆相系のカートリッジにさらに負荷して分配能の差を利用してプロピオン酸と他の保存料の分離を行うことにした．

2）C18カートリッジによるクリーンアップ

分離条件を検討するにあたり，共存する可能性のある保存料として安息香酸，ソルビン酸及びデヒドロ酢酸を用い，これらをそれぞれSAXカートリッジに負荷して水で洗浄した後，SAXカートリッジの下部にC18カートリッジを接続して二段式とし，これら3種の保存料のみをC18カートリッジに保持させて除去する方法について検討した．まずSAXカートリッジからの溶出溶媒である5％塩化ナトリウム含有0.01mol/L塩酸を用いてプロピオン酸及び3種の保存料を二段カートリッジから溶出すると，プロピオン酸のみが溶出し，3種の保存料は下部のC18カートリッジに全量保持された．しかし，溶出溶媒5mlではプロピオン酸も少量残存し，完全に溶出させるためには15ml以上の溶量が必要であった．そこで，この残存したプロピオン酸を10ml以内で完全に溶出させるために，5％塩化ナトリウム含有0.01mol/L塩酸5mlを負荷した後，アセトニトリル・水混液を負荷して，プロピオン酸の溶出を促進させることにした．

Fig.3にアセトニトリル－水混液5mlを用いてプロピオン酸を二段カートリッジから溶出した場合のアセトニトリル－水の組成比と回収率の関係を示した．

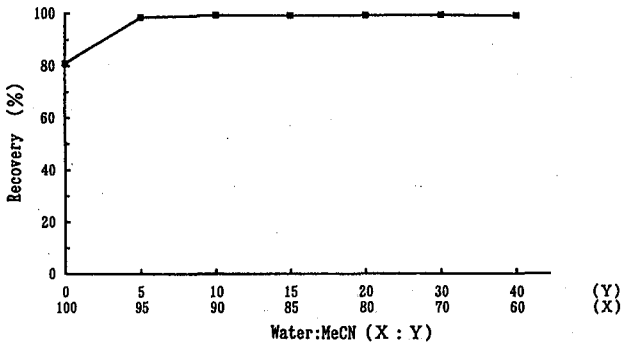


Fig.3. Effect of MeCN on the Recoveries of Propionic Acid from SAX and C18 Cartridge

アセトニトリル－水の比率が(5：95)よりアセトニトリルの比率が高い場合，プロピオン酸の全量が溶出することが判った．しかし，アセトニトリル－水の比率が(20：80)よりアセトニトリルの比率が高くなると，3種の保存料が溶出しはじめることから，用いるアセトニトリル－水の比率は(10：90)とすることとした．これによって，安息香酸等の保存料のピークが出現しなくなり，Fig.1の(C)に示したとおりHPLCによる分析が25分以内で可能となった．

3．酢酸の影響

上記の方法を種々の食品に応用したところ，しょうがの酢漬等で若干回収率の低いものが認められた．これは，主として留液中に同時に蒸留される酢酸の影響によってSAXカートリッジにプロピオン酸が全量保持されず，脱離が促されるためと考えられた．そこで，酢酸によるプロピオン酸の回収率に及ぼす影響について検討した．

まず，プロピオン酸が500μg/g含有する0.05～0.5％の酢酸溶液をそれぞれ調製し，それぞれをカートリッジに負荷した後，本法に従いHPLCによりプロピオン酸の分析を行った．

その結果，Fig.4に示したとおり酢酸の濃度が0.05％まではプロピオン酸の回収率に全く影響が見られなかったが，0.1%では96.8%，0.2%で92.8%の回収率であり，若干の影響がみられた．しかし0.3%以上では回収率も85%以下となり，影響が大きいことが判った．しかし，留液は水蒸気蒸留により10倍に希釈されていることから，酢酸の含有量が2％以下の食品であれば，概ね良好な結果が得られることが判った．

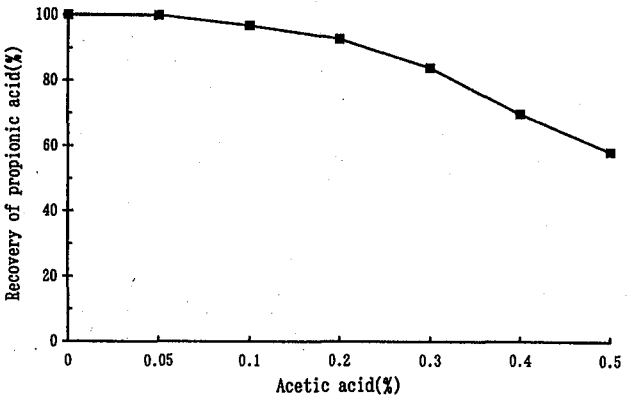


Fig.4. Influence of Acetic Acid on the Recoveries of Propionic Acid from SAX Cartridge

4．HPLC条件

HPLC試験溶液中には上記のクリーンアップの後でもプロピオン酸以外に蟻酸，酢酸，イソ酪酸，n－酪酸等が共存する場合がある．そこで，これらの有機酸との分離についてイオン対法及びイオン抑制法について検討を

行った.

その結果，イオン抑制法を用いた方が，プロピオン酸とこれらの酸類との分離には有効であった．すなわち，カラムにInertsil ODS-3，移動相にリン酸を用いてpH2.5に調整したアセトニトリル一水(6:94)混液を用いた場合，Fig. 5 に示したとおり，それぞれの保持時間は蟻酸4.1分，酢酸4.5分，プロピオン酸8.4分，n-酪酸21.1分，イソ酪酸、21.5分と良好な分離を示した.

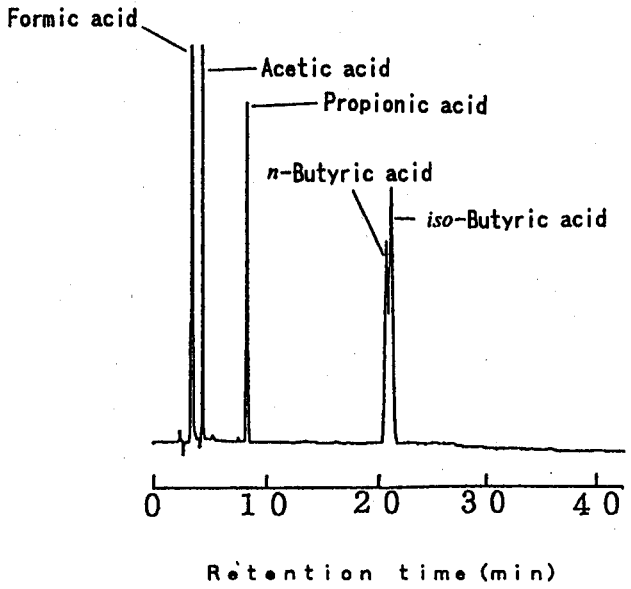


Fig.5. Chromatogram of Propionic Acid and Other Organic Acids

5．添加回収試験

食パン，ロールケーキ，ドーナッツ，バウムクーヘン等にそれぞれプロピオン酸を2.5g/kg及び0.5g/kgになるように添加し，本法に従い添加回収試験を行った.
その結果はTable.1に示したように，しょうが漬けを除く全ての検体において90%以上の回収率を示し，変動係数も3.8 以下であった.

しかし，しょうが漬けについては85%と低い回収率であったが，これは本品が酢漬けであり，酢酸が２％以上含有されているためと思われる．なお，検量線は20～500μ g / g の間で直線性を示し，また検出限界は試料中の濃度として10μ g / g であった.

6．各種市販食品の実態調査

本法を用いてパン，洋菓子，ビスケット及び味噌，醤油，魚醤等の各種調味料，計108検体について使用実態調査を行った．調味料以外の食品の分析結果をTable.2に示した.

パン１検体，洋菓子３検体及び乳製品２検体からプロピオン酸が検出された．洋菓子の中で0.03g/kg検出されたものは，原料にチーズが用いられていることから原料由来と思われた．また，ロールケーキ２検体から0.88及び2.6g/kg検出され，後者は使用基準値(2.5g/kg)を超えていた.

乳製品については，２検体ともチーズを主原料とする製品であり，いずれもプロピオン酸が製造過程で生成することが知られている[2] エメンタールチーズが原料であった.

調味料については，行政上の処置が必要とされる際の判断資料とするため，魚醤39検体，醤油７検体，オイス

Table 1. Recoveries of Propionic Acid Added to Various Foods

Sample	Added (g／kg)	Recovery (%)	C．V. (%)
Bread	2.5	96.4	1.8
	0.5	95.8	2.1
Strawberry jam	2.5	96.7	1.7
	0.5	97.4	3.1
Biscuit	2.5	94.8	1.1
	0.5	93.3	1.2
Sponge cake	2.5	96.5	0.9
	0.5	98.2	2.0
Cake(Baumkuchen)	2.5	97.0	0.6
	0.5	95.6	2.4
Bean paste (miso)	2.5	93.2	0.8
	0.5	97.6	1.9
Fish sauce	2.5	95.4	3.8
	0.5	95.3	2.8
Natural cheese	2.5	96.7	2.9
	0.5	96.7	2.7
Vinegar-pickled foods	2.5	83.8	5.4
(su-zuke)	0.5	84.3	3.6

n=3

Table 2. Contents of Propionic Acid in Commercial Foods

Sample	No. of samples	No. of detected	Found (g／kg)
Bread	6	1	0.16
Cakes	12	3	0.03, 0.88, 2.6
Jams	4	0	
Biscuits	6	0	
Dairy Products	8	2	0.71, 1.3
Pickeles	7	0	
Alcoholic Beverages	5	0	

Table 3. Contents of Propionic Acid in Commercial Seasoning

Sample	Country of production	No of samples	No of detected	Found (av.) (g/kg)
Fish sauce				
Nam pla	Thailand	17	17	0.06～0.28 (0.16)
Nuoc mam	Viet Nam	2	2	0.13, 0.15 (0.14)
Patis	Philippines	1	1	0.16
Yu−lu	China	2	2	1.0, 1.3 (1.2)
Shotturu	Japan	6	5	0.01～0.07 (0.04)
Ishiru (squid)	Japan	6	4	0.01～0.02 (0.02)
Ishiru (sardine)	Japan	4	3	0.01～0.05 (0.03)
Other	Japan	1	1	0.03
Soy sauce				
	Thailand	3	3	0.03～0.05 (0.04)
	China	1	0	
	Japan	3	0	
Oyster sauce				
	China	1	1	0.11
	Hong Kong	1	1	0.08
	Thailand	1	0	
	Japan	1	1	0.07
Bean paste				
	Japan	8	0	
	Hong Kong	2	0	

ターソース４検体，味噌10検体の合計60検体について調査を実施した．結果をTable. 3 に示したが，魚醤は39検体中35検体から0.01～1.3g/kg及びオイスターソースは４検体中３検体から0.07～0.11g/kgのプロピオン酸を検出した．また，タイ産の醤油３検体すべてから0.03～0.05g/kgのプロピオン酸を検出した．

このうちナムプラー，ヌクマム，パティスなど東南アジア産の魚醤については，検出量に多少のばらつきが見られるものの平均値は0.15g/kgと，国による大きな差異は認められなかった．国産の魚醤についても原料の違い，地域の差はほとんど認められなかったが，検出量は平均値で比較すると，東南アジア産の約１/５であった．

また，検出量から判断しても保存料として添加されたものではなく，製造工程中の微生物の影響によるものと考えられる．

しかし，中国産の魚醤のみは，平均値で1.2g/kgと他の国のものに比べて極めて値が高いことから，この魚醤については現在製造工程等について調査中である．

醤油についてもタイ産のもののみからプロピオン酸が検出されたが，これは各国での醤油の製造工程の違い，あるいは関与する微生物相の違いによるものと考えられる．特に使用されている原料の麹の違いによる影響が大きいと考えられる．オイスターソースについても，牡蠣を発酵して作られるソースであることから，その発酵過程によりプロピオン酸が産生されたものと推察される．

ま と め

１．食品中のプロピオン酸のＨＰＬＣによる分析法について検討した．

２．試料からのプロピオン酸の抽出は水蒸気蒸留法によって行い，トリス−塩酸緩衝液中に留液を捕集した．

３．クリーンアップはSAX及びC18の二つのカートリッジを二段とすることで，極めて高い効果が得られ，逆相系カラムを用いたＨＰＬＣにより１試料２５分以内の分析が可能であった．

４．本法を用いて添加回収試験を行った結果，回収率は84～98%であり，変動係数は0.6～5.4であった．なお，本法の検出限界は試料中濃度として10μg/gであった．

５．各種市販食品の実態調査を行ったところ，パン１検体，洋菓子３検体，乳製品２検体からプロピオン酸が検出された．また，調味料については魚醤及びオイスターソースのほとんどから，それぞれ0.01～1.3g/kg，

0.07～0.11g/kg検出され，醤油についてはタイ産のもの3検体からプロピオン酸が検出された．

文　献

1）金山　竜男：保存料・殺菌料の国際動向，別冊フードケミカル－6　世界の食品添加物，92－118，1994，食品化学新聞社，東京．
2）中野政弘編：発酵食品，149－152，1967，光琳，東京．
3）加藤美千子，木内　幹，森　隆，他：日食工誌，**30**，99－107，1983．
4）高橋まゆみ，蕨　由美，野沢恒平，他：食衛誌，**27**，87-90，1986．
5）藤井建夫，酒井久夫：日水誌，**50**，1061-1066，1984．
6）渡辺武明，下山節子，河村良枝，他：静岡衛研報告，**24**，45-50，1981．
7）斉藤勲，河村典久，大島晴美，他：愛知衛研所報，**36**，103-108，1986．
8）矢部芳枝，丹　茂，二宮隆博，他：食衛誌，**24**，329-332，1983．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 84-87, 1998

玄米中のアクリルアミドモノマーの分析法

小沢秀樹*, 井部明広*, 田端節子*, 宮川弘之*,
貞升友紀*, 安田和男*

Determination of Acrylamide Monomer in Unhulled Rice by High Performance Liquid Chromatography

HIDEKI OZAWA*, AKIHIRO IBE*, SETSUKO TABATA*, HIROYUKI MIYAKAWA*,
YUKI SADAMASU* and KAZUO YASUDA*

Keywords：アクリルアミドモノマー acrylamide monomer，臭素化 bromination，2,3-ジブロモプロピオンアミド 2,3-dibromopropionamide，高速液体クロマトグラフィー high-performance liquid chromatography，米 rice

緒　言

近年，土地造成の際に土壌改良剤としてポリアクリルアミド系高分子凝集剤が広く使用されている．このポリアクリルアミドは毒性が極めて弱いことが知られている[1]が，高分子中に微量に存在する未反応のアクリルアミドモノマー(AAM)は人体に対して中枢神経マヒや肝障害等を引き起こす毒性の強い有害物質である[2]．

平成９年７月，都内のA市より玄米中のアクリルアミドモノマー（AAM）の分析依頼が寄せられた．土地造成業者が土壌改良剤として使用したポリアクリルアミドが付近の水田を汚染し，その水田の所有者が収穫した玄米の安全性に不安を抱いたためである．

これまで，AAMの分析法としては，ガスクロマトグラフィー(GC)[3-7]及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)[8,9]を用いて，AAMを直接分析[9]，あるいは，AAMを臭素化して2,3-ジブロモプロピオンアミド(Br2-AAM)に誘導体化した後に分析する方法[3-8]が報告されている．これらの分析試料としては水[3,8,9]が主であり，生物試料[7]を分析した報告では，分析上の妨害物質の除去溶媒としてベンゼンやジクロロメタンが使用されており，健康や環境に対する問題もあった．そこで著者らは，それらの溶媒を使用せずに，玄米中のAAMのHPLCによる高感度分析を試みたので，その分析法と併せて，ポリアクリルアミドの汚染を受けた玄米の分析結果を報告する．

実験方法

1．試料

市販玄米１検体，及び汚染水田より収穫された玄米２検体を用いた．

2．試薬

AAM標準溶液：和光純薬工業（株）製の1,000ppm 水溶液を適宜希釈して用いた．

Br2-AAM標準溶液：東京化成工業（株）製の1,000ppmメタノール溶液を水で適宜希釈して用いた．

なお，本実験では，水はすべて蒸留水を，その他の試薬は市販特級品を使用した．

3．シリカゲルカラムの調製

シリカゲル（ワコーゲルC-100，和光純薬工業（株）製）1.5gをヘキサンを用いてポリプレップエムプティカラム（日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ（株）製）に充填して使用した．

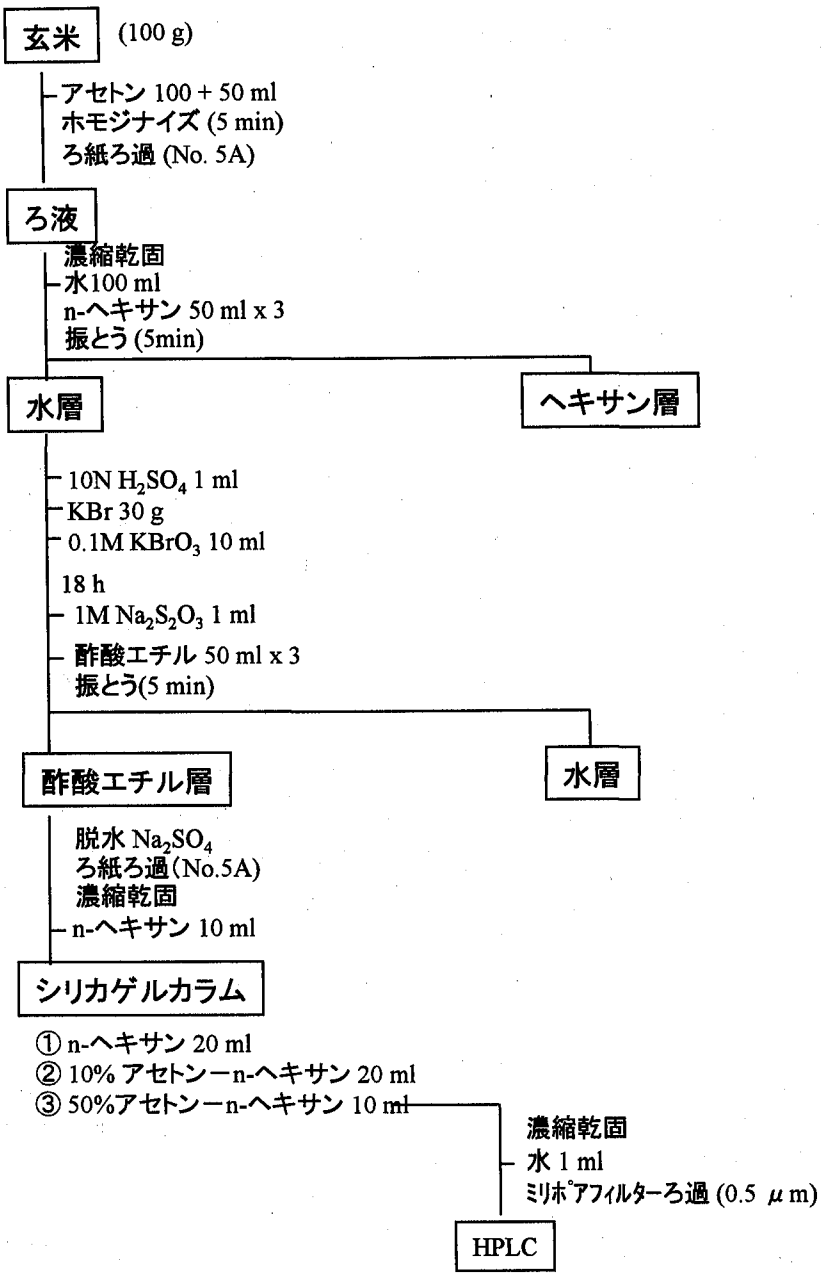
4．装置

高速液体クロマトグラフ：CLASS VP System ((株)島津製作所製)，SCL-10Avp (system controller), SIL-10ADvp (auto injector), LC-10ATvp (liquid chromatograph pump), DGU-12A (degasser), CTO-10Avp (column oven), SPD-M10Avp (diode array detector), Fujitsu conputer (FMV 5166 DB, CLASS-vp クロマトグラフィーデータシステムver. 5).

5．試験溶液の調製

試験溶液の調製方法を Scheme 1 に示した．粉砕した

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan



Scheme 1．玄米中のアクリルアミドモノマー分析法

玄米100gよりアセトン150mlを用いてAAMを抽出し，濃縮乾固後，水100 mlに溶解させた．これをn-ヘキサン150mlで脱脂した後，硫酸酸性下，臭化カリウムと臭素酸カリウムを用い18時間臭素化した．臭素化後，1Mチオ硫酸ナトリウム1 mlを加え，過剰の臭素を分解した後，臭素化で生成したBr2-AAMを酢酸エチル150mlで抽出し，濃縮乾固後n-ヘキサン10mlに溶解させた．これをシリカゲルカラムに負荷し，はじめにn-ヘキサン20ml，次に10%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒20 ml で妨害成分を除去した後，Br2-AAMを50%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒10mlで溶出させた．これを濃縮乾固した後，水1 mlに溶解し試験溶液とした．

6．分析条件

カラム：Capcell PAK UG 120 C18 (4.6mm I.D. x 150 mm，5 μm；（株）資生堂製)，移動相：水，流速：2.0ml/min，カラム温度：40℃，測定波長：196nm，注入量：10 μl

結果及び考察

1．HPLC 条件の検討

HPLCの測定条件は，L. Brownらの方法[8]に準じ，カラムはC18逆相カラムを用い，移動相は水，検出波長はUV 196nmを用いた．Br2-AAM標準溶液のHPLCクロマ

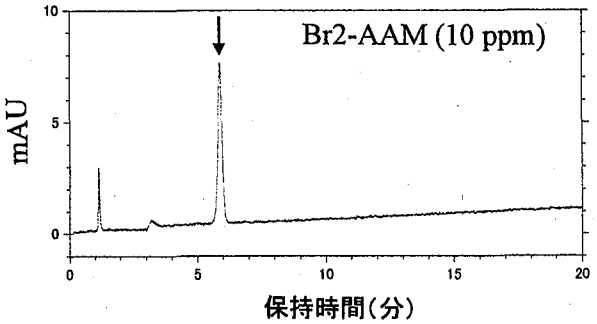


Fig. 1．Br2-AAM標準溶液のHPLCクロマトグラム

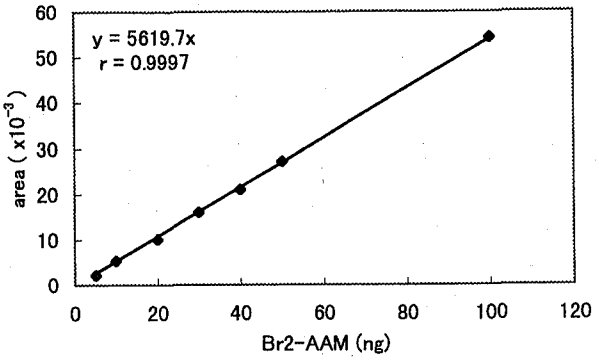


Fig. 2．Br2-AAMの検量線

トグラムをFig. 1に示した．また，検量線の作成には，Br2-AAM標準溶液を水で希釈して0.5～10 ppmの水溶液を調製し，HPLCより得られたクロマトグラムのピーク面積を用いた．Fig. 2に示すようにBr2-AAM 5～100 ngの範囲で良い直線性を示した（r＝0.9997).

2．クリーンアップ法の検討

クリーンアップ法としてこれまでにシリカゲル[5,7]あるいはフロリジル[3,6]を使用したいくつかの方法が報告されてる．しかし，いずれの方法も発ガン性のあるベンゼンや環境汚染が問題となるジクロロメタン等が使用されているため，著者らはこれらの有機溶剤を使用しない方法

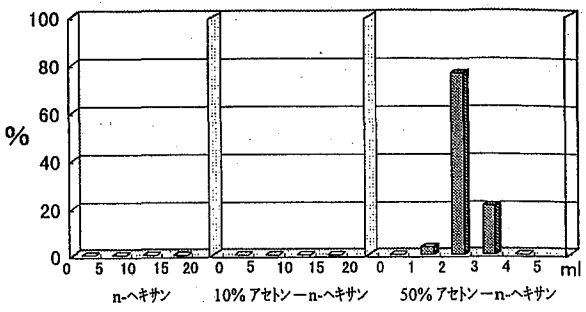


Fig. 3．Br2-AAM溶出パターン

を検討した．Br2-AAM標準溶液をn-ヘキサンで希釈し，その1 μgをとり，n-ヘキサンでコンディショニングしたシリカゲルカラムに負荷した結果，Br2-AAMはn-ヘキサン20ml，10%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒20mlでは溶出せず，50%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒5 mlで定量的に回収できることが分かった（Fig. 3)．そこで今回，著者らは50%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒10mlで溶出した．

3．臭素化物の回収率の検討

水100mlにAAMを1 μgあるいは0.1 μg添加し，Scheme 1に従って臭素化し，シリカゲルカラムでクリーンアップした後，Br2-AAMとして測定した．臭素化されたものの回収率は，1 μg添加した場合96.9±10.0 %（n＝3），0.1 μg添加した場合114.8±8.8%（n＝3）と良好な結果が得られた（Table 1)．

4．市販玄米を用いた添加回収実験

市販玄米100gにAAMを1 μg（10 ppb）あるいは0.1 μg（1 ppb）を添加してScheme 1に従って添加回収実験を行ったところ，Table 2に示すように回収率はそれぞれ87.5±4.0%（n=3)，56.2±7.5%（n=3）であり，0.1 μg（1 ppb）添加した場合の回収率が低かった．0.1 μg（1 ppb）添加におけるクロマトグラムを Fig. 4 に示し

Table 1．臭素化物の回収率

試　料	試料量(ml)	AMM添加量(μg)	Br2-AMM検出量(μg)[1)]	回収率(%)±S.D.
水	100	1.0	3.14±0.33	96.9±10.0[2)]
水	100	0.1	0.37±0.03	114.8± 8.8[3)]

1）AMM＝Br2-AMM×0.308；　2）n＝6；　3）n＝3

Table 2．市販玄米を用いた添加回収実験

試料量(g)	AMM添加量(μg)	Br2-AMM検出量(μg)[1)]	回収率(%)±S.D.
100	1.0	2.84±0.13	87.5±4.0[2)]
100	0.1	0.18±0.03	56.2±7.5[2)]

1）AMM＝Br2-AMM×0.308；　2）n＝3

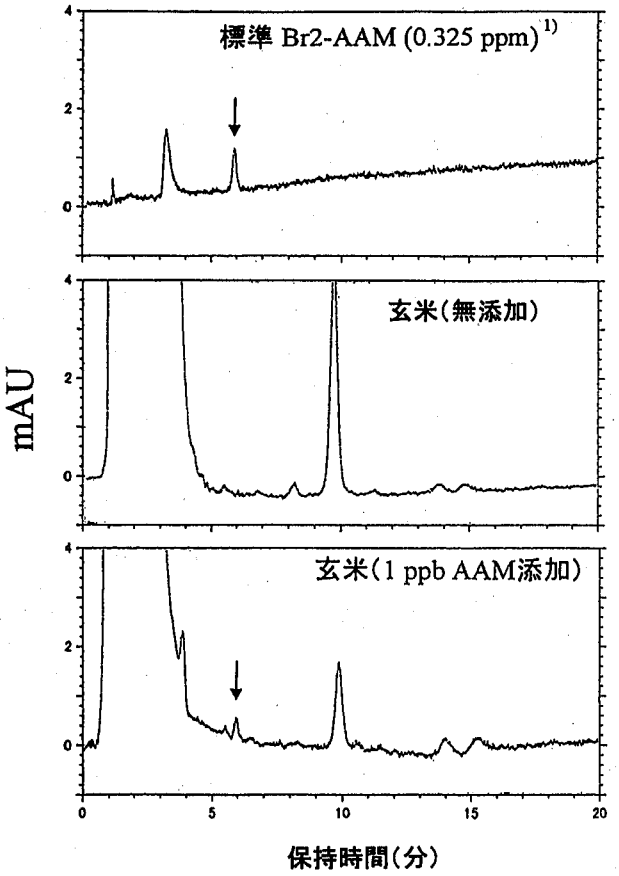


Fig. 4．市販玄米のHPLCクロマトグラム
1）AAMとして1 ppbに相当する

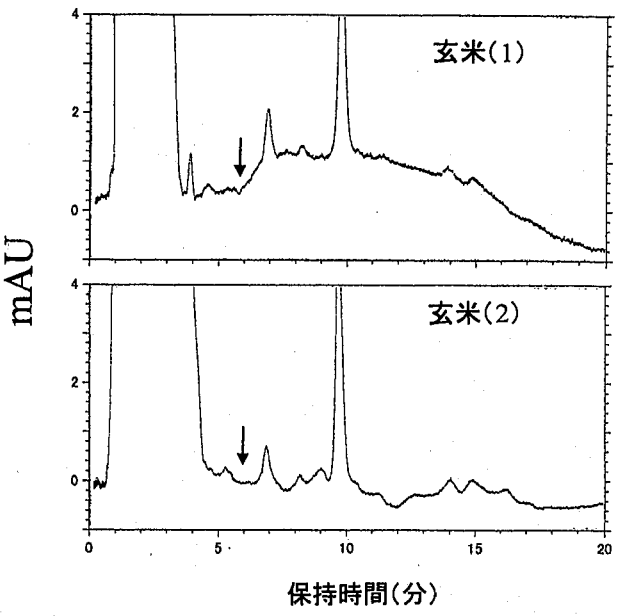


Fig. 5．ポリアクリルアミド汚染の玄米のHPLCクロマトグラム
注入量：50 μl

た．本法では玄米100gから1 ppbのAAM検出が可能であった．

5．ポリアクリルアミド汚染の玄米の分析

ポリアクリルアミド汚染水田より収穫された玄米2検体について，各100gを用いてAAMを分析した結果，Br2-AAMの保持時間5.8minにピークは認められず（Fig. 5），これらの玄米にはAAMは含有していないことが分かった．

ま と め

HPLCによる玄米中のAAM分析法を検討した．玄米中よりAAMをアセトンで抽出し，臭素化してBr2-AAMとしたのち，シリカゲルカラムによってクリーンアップを行った．Br2-AAMはカラムからベンゼンやジクロロメタンを使用することなく，50%アセトン－n-ヘキサン混合溶媒で溶出することができた．Br2-AAMは逆相カラム（C18）及びUV検出器（196nm）を用いて高速液体クロマトグラフによって分析した．玄米からの回収率は10 ppb添加で 87.5±4.0%，1 ppb添加で56.2±7.5%であった．本法による玄米中のAAMの検出限度は1 ppbであった．

文　献

1）「ポリアクリルアミド系（ノニオン，アニオン性）高分子凝集剤の安全性について」[改訂版]高分子凝集剤懇話会.
2）King, D. J. and Noss, R. R.: *Reviews on Environmental Health*, **8**, 3-16, 1989.
3）Hashimoto, A: *Analyst*, **101**, 932-938, 1976.
4）Tekel, J. and Farkas, P. and Kovac, M.: *Food Addit. and Contami.*, **3**, 377-381, 1989.
5）Andrawes, F. Greenhouse, S. and Draney, D: J. Chromatogr., **399**, 269-275, 1987.
6）高田久美代，岡本　拓：平成2年度　化学物質分析法開発調査報告書（環境庁環境保健部保健調査室，p24-35（平成3年6月）.
7）Castle, L.: J. *Agric., Food Chem.*, **41**, 1261-1263, 1993.
8）Brown, L. and Rhead, M.: *Analyst*, **104**, 391-399, 1979.
9）Smith, E. A and Oehme, F. W.: *J. Chromatogr.*, Sci., **31**, 192-195, 1993.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 88-94, 1998

国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査
—平成9年度—

小林麻紀*, 永山敏廣*, 伊藤正子*, 田村康宏*,
高田千恵子*, 橋本常生**, 羽石奈穂子***, 安田和男*

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Fruits
— Apr. 1997 ~ Mar. 1998 —

MAKI KOBAYASHI*,TOSHIHIRO NAGAYAMA*,MASAKO ITO*,YASUHIRO TAMURA*,
CHIEKO TAKADA*, TSUNEO HASHIMOTO**, NAHOKO HANEISHI*** and KAZUO YASUDA*

Pesticide residues in 35 kinds of vegetables and fruits and 24 kinds of organic cultivation crops or the like were investigated. In several kinds of crops, residues of 5 kinds of organophosphorus insecticides, 2 kinds of carbamate insecticides, 1 kind of carbamate fungicide, 1 kind of organochlorine insecticide, 4 kinds of organochlorine fungicides, 1 kind of organonitrogen insecticide and 2 kinds of organonitrogen fungicides were detected. Concentrations of organophosphorus insecticides (Chlorpyrifos, DDVP, EPN, MEP and Prothiofos), carbamate insecticides (Methomyl and Thiodicarb), carbamate fungicide (Diethofencarb) organochlorine insecticide (Benzoepin), organochlorine fungicides (Iprodione, Procymidone, TPN and Vinclozolin), organonitrogen insecticide (Tebufenpyrad) and organonitrogen fungicides (Triadimenol and Bitertanol) were 0.13 - 0.51ppm in 10 kinds of crops, 0.01 - 6.8ppm in 9 kinds of crops, 0.01 - 16ppm in 16 kinds of crops and 0.01 - 0.64ppm in 6 kinds of crops respectively.

The levels of Chlorpyrifos and Iprodione in chrysanthemum were higher than the tolerance for pesticide residues.

Methomyl in young leaves of chinese cabbage, Methomyl and Thiodicarb in lettuce and Procymidone in chrysanthemum were higher than the maximum standard limits for withholding registration.

Residues of organochlorine insecticide (Benzoepin), organochlorine fungicides (Procymidone and TPN), carbamate insecticide (methomyl) and carbamate fungicide (Diethofencarb) in 4 kinds of organic cultivation crops or the like were detected. Their concentrations were Tr - 0.64ppm.

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，有機栽培 organic cultivation

緒　言

近年，消費者の食品の安全性に対する関心が高く，特に残留農薬については健康への影響を懸念する声も聞かれる．より農薬残留量の少ない食品を求めて，有機栽培及び無・減農薬栽培農産物の需要が伸びている[1]．1996年12月農林水産省は「有機農産物及び特別栽培農産物表示ガイドライン」（以下表示ガイドライン）を示して，消費者がそれらを選択できるようにした．しかし，これ

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 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生活科学部食品添加物研究科

らの表示は商品の付加価値を高めるために使用されることも多いと言われており，その表示の信憑性に疑義が唱えられることもある．

著者らは、これまで国内産生鮮野菜・果実における農薬の残留実態調査を行ってきた[2-18]．その中で，有機栽培及び無・減農薬栽培表示野菜・果実についても調査してきた[8-18]．今回は慣行栽培野菜・果実類と共に，過去の調査で比較的農薬の検出頻度の高かった品種について無・減農薬栽培表示野菜の農薬の残留実態を調査した．

実験方法

1．試　料

(1) 慣行栽培野菜・果実類

1997年4月から1998年3月に東京都内の市場等で購入した野菜・果実及び食用花など7種35検体について調査した．

(2) 無・減農薬栽培野菜類

1997年4月から1998年3月に東京都内の市場等で購入した野菜4種24検体について調査した．

2．調査対象農薬

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

計42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，PCNB，アルドリン，イプロジオン，エンドリン，ディルドリン，カプタホール (ダイホルタン)，キャプタン，クロルニトロフェン (CNP)，クロルベンジレート，クロロタロニル (TPN)，ジコホール (ケルセン)，ビンクロゾリン，プロシミドン，ヘプタクロル，ヘプタクロルエポキサイド，ベンゾエピン (α-及びβ-ベンゾエピン)，ベンゾエピンサルフェート (エンドスルファンサルフェート)

計26種

(3) カーバメイト系農薬：アルジカルブ，イソプロカルブ (MIPC)，エチオフェンカルブ，オキサミル，カルバリル (NAC)，カルボフラン，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)，プロポキスル (PHC)，ベンダイオカルブ，メソミル，チオベンカルブ，メトルカルブ (MTMC)，

計16種

(4) その他の農薬：エスプロカルブ，オキサジアゾン，キノメチオネート，クロフェンテジン，ジクロフルアニド，テニルクロル，テブフェンピラド，トリアジメノール，トリアジメホン，ビテルタノール，ピリダベン，フェナリモル，フルシトリネート，プロピコナゾール，ペンディメタリン，ミクロブタニル，メトリブジン，メフェナセット，メプロニル

計19種

総計103種

3．装置

(1) ガスクロマトグラフ：(株) 島津製作所製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)，HNU®-Nordion社製MICROMAT HRGC-412 (検出器：ATD)

(3) 液体クロマトグラフ：(株) 島津製作所製 LC-10AD (検出器：蛍光)，LC-6AD (検出器：蛍光)，カルバメート分析システム

(4) ガスクロマトグラフー質量分析計：Finnigan Mat 社製Traker™ System及びGCQ™ System，Hewlett Packard社製HP5973

(5) 液体クロマトグラフー質量分析計：VG Biotech 社製Platform Ⅱ-LC

(6) 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.また，その他の農薬の分析は保持指標を用いた方法[19]により行った．

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7種35検体中5種10検体 (検出率：28%，以下同様) から殺虫剤であるクロルピリホス (検出検体

Table 1. Residues of Organophosphorus[1] and Carbamate[2] Pesticides in Crops

Sample	No.of sample	No.of positive	Organophosphorus(ppm)			Carbamate(ppm)		
			Insecticides			Insecticides		Fungicides
			Chlorpyrifos	DDVP	Others	Methomyl	Thiodicarb	Diethofencarb
Vegetable								
Cabbage[KYABETSU]	1	0	−3)	−	−	−	−	−
Lettuce[RETASU]	8	5	−	−	0.05,0.06(EPN)	0.03,0.04, 0.46,4.1	0.01,0.22 6.8	0.18
Spinach[HORENSO]	4	2	−	0.03,0.05	−	0.48	−	−
Young leaves of chinese cabbage [KOMATUNA]	3	1	−	−	−	1.7	1.5	−
Pimento[PIMAN]	4	3	−	−	0.12(Prothiofos)	0.01,0.14, 0.49	0.01	−
Edible flower								
Chrysanthemum[SYOKUYOGIKU]	5	4	0.08	0.02,0.05, 0.06	0.01,0.06(MEP)	0.01	−	−
Fruit								
Peach[MOMO]								
(Whole)	5	1	0.51	−	−	−	−	−
(fresh)	5	0	−	−	−	−	−	−

1) Insecticides : Chlorpyrifos, CVP, dimethoate, EPN, parathion, parathion-methyl, MEP, MPP, PAP, phosalone, DEP, DDVP diazinon, salithion, EPBP, ethylthiometon, ECP, CYAP,formothion, chlorpyrifos-methyl, prothiofos, DMTP, CVMP, propaphos,ethion,isoxathion,isofenphos,thiometon, CYP,pirimiphos-methyl,PMP, pyridaphenthion, dialifol, malathion , sulprophos,cadusafos,dimethylvinphos,fosthiazate,pyraclofos are investigated.
Fungicides : EDDP and IBP are investigated.
Herbicides : Butamifos is investigated.

2) Insecticides : Aldicarb, bendiocarb, carbofuran,ethiofencarb, NAC,BPMC, methomyl, oxamyl, pirimicarb, MIPC, thiodicarb, MTMC and PHC are investigated.
Fungicides : Diethofencarb is investigated.
Herbicides : Chlorpropham and thiobencarb are investigated.

3) − : not detected

名：食用菊及びもも，以下同様)，DDVP（食用菊及びほうれんそう)，EPN（レタス)，MEP（食用菊）及びプロチオホス（ピーマン）の5種類が0.01～0.51ppm検出された．(Table 1)．

このうち食用菊1検体から検出されたクロルピリホスはその他のきく科野菜に設定された残留基準値0.01ppmを超えていた．クロルピリホスは1日摂取許容量(ADI)0.01mg/kg/dayで，劇物に指定されている．しかし，食用菊は通常あまり多量に喫食しないこと及びADIを考慮すると，今回の検出値に特に問題はないと考える．

もも全果からもクロルピリホスは検出されたが，果肉に設定された残留基準値1.0ppmの約1/2であった．可食部である果肉からは検出されなかった．

他の食用菊からは，DDVP及びMEPも検出されているが，その検出量はいずれも残留基準値の1/20～1/2であった．DDVPは水洗により除去されやすく[20]，揮発性が高いため調理過程で消失し，喫食時にはほとんど残存していないと考えられる．

レタスから検出されたEPNは基準値0.1ppmの約1/2であった．EPNはADI0.0023mg/kg/dayで，毒物（1.5%以下の製剤は劇物）に指定されており，加熱調理後も70%以上が残存することから[21]，その残留には十分に留意する必要がある．

ピーマンから検出されたプロチオホスはピーマン及びその属する果菜類に対して残留基準が設定されていないため，他の野菜類の基準値と比較すると，いも類の基準値0.05ppmの約2倍ではあったが，しょうがの基準値1.0ppmの約1/10であった．プロチオホスはこれまでにもピーマンから検出される傾向があり，その残留濃度は0.1ppm前後である[13,15,17]．また，プロチオホスはADIが0.0015mg/kg/dayで，普通物に分類されており，今回の

Table 2. Reisdues of Organochlorine[1] and other[2] pesticides in Crops

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine (ppm)					Others (ppm)
			Benzoepin[3]	Iprodione	Procymidone	TPN	Vinclozolinb	
Vegetable								
Cabbage	1	0	—[4]	—	—	—	—	—
Lettuce	8	2	—	0.29	0.57	—	—	—
Spinach	4	1	—	—	—	0.05	—	—
Young leaves of chinese cabbage	3	1	—	—	0.04	—	—	—
Pimento	4	3	0.01[5]	0.12	—	0.03	0.03,0.25	0.01(Triadimenol)
Edible flower								
Chrysanthemum	5	4	0.02[6]	2.8,16	0.01,0.02, 8.91	—	—	—
Fruit								
Peach								
(Whole)	5	4	—	—	0.15,0.12	0.02	—	0.09,0.48(Bitertanol) 0.11(Tebufenpyrad)
(Fresh)	5	4	—	—	0.04,0.05	—	—	0.01,0.01(Bitertanol)

1) Insecticides : T-BHC(total of α-, β-, γ-, 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, benzoepin sulfate, chlorobenzilate, dicofol, heptachlor and heptachlor epoxide are invstigated.
Fungicides : Captan, captafol, PCNB, procymidone, TPN, vinclozolin and iprodione are investigated.
Herbicides : CNP is investigated.

2) Insecticides : chinomethionat,clofentezine,fenarimol,flucythrinate,pyridaben and tebufenpyrad are investigated.
Fungicides : bitertanol,dichlofluanid, mepronil, myclobutanil, propiconazole,triadimefon and triadimenol are investigated.
Herbicides : esprocarb,mefenacet,metribuzin,oxadiazon,pendimethalin and thenylchlor are investigated.

3) The amount of α-benzoepin and β-benzoepin is described.

4) — : not detected

5) α-benzoepin : below 0.01ppm, β-benzoepin : 0.01ppm,benzoepin sulfate : not detected

6) α-benzoepin : not detected, β-benzoepin : 0.02ppm,benzoepin sulfate : not detected

検出量は喫食上特に問題はないと考える.

(2) カーバメイト系農薬

殺虫剤であるチオジカルブ（レタス，こまつな，食用菊）及びメソミル（レタス，ホウレンソウ，こまつな及びピーマン）が，5種9検体（25%）から0.01～6.8ppm検出された．いずれも残留農薬基準は設定されていないが，登録保留基準としてそれぞれ2ppm及び0.5ppmが設定されている．今回，レタス1検体からチオジカルブ6.8ppm及びメソミル4.1ppmが，こまつな1検体からメソミル1.7ppmが検出され，登録保留基準値の約3倍～8倍であった．(Table 1)

チオジカルブ及びメソミルは劇物に指定されているが，ADIは0.03mg/kg/dayである．なお，メソミルはチオジカルブの分解生成物であるため，両者が検出された場合のメソミルは，チオジカルブに由来するものとも考えられる．また，メソミルは，平成3年度に初めて果菜類から検出されたが[12]，近年は葉菜類及び果菜類で検出される頻度が高い傾向にある[15-17]．レタスのように生食されることが多い作物では，水洗による農薬の除去はあるものの，加熱調理に伴う揮散はなく，残留農薬のほとんどはそのまま摂取されると推察する．過量の農薬が残留しないよう，適正使用基準の遵守などの配慮が望まれるとともに，今後の残留動向を注意深く観察していく必要がある．

殺菌剤ではジエトフェンカルブがレタスから検出されたが，残留基準値の1/27と低いレベルであった．

(3) 有機塩素系農薬及びその他の農薬

有機塩素系農薬は，6種16検体（45%）から3種の殺菌剤及び1種の殺虫剤が0.01～16ppm検出された（Table 2).

検出された殺菌剤はイプロジオン（レタス，ピーマン，食用菊及びもも），プロシミドン（レタス，こまつな，

Table 3. Detailes in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	No.	Pesticide residues(ppm)
Lettuce	1	Thiodicarb(0.01)[1], Methomyl (0.04)
	2	EPN(0.05), Thiodicarb(0.22), Methomyl(0.46)
	3	Diethofencarb(0.18), Thiodicarb(6.8), Methomyl(4.1)
	4	Procymidone(0.57), Methomyl(0.03)
Spinach	1	DDVP(0.03), Methomyl(0.48)
Young leaves of chinese cabbage	1	Thiodicarb(1.5), Methomyl(1.7)
Pimento	1	Vinclozolin(0.25), Methomyl(0.01)
	2	Prothiofos(0.12), Vinclozolin(0.03), Methomyl(0.49)
	3	α-Benzoepin(Tr[2]), β-Benzoepin(0.01), Iprodione(0.12), TPN(0.03), Thiodicarb(0.01), Methomyl(0.14), Triadimenol(0.01)
Chrysanthemum	1	DDVP(0.06), β-benzoepin(0.02), Iprodione(16), Methomyl(0.01)
	2	Chlorpyrifos(0.08), DDVP(0.02), Iprodione(2.8), Procymidone(0.01)
	3	DDVP(0.05), MEP(0.01), Procymidone(0.02)
Peach(Whole)	1	Chlorpyrifos(0.51), Bitertanol(0.09)
	2	TPN(0.02), Bitertanol(0.48)

1) The value in parentheses shows detected concentration of pesticide.
2) Tr : below 0.01ppm

食用菊及びもも）及びTPN（ほうれんそう，ピーマン及びもも）であった．

このうち食用菊2検体からイプロジオンが16ppmとその他のきく科野菜に設定されている残留基準値5ppmの約3倍，プロシミドンが8.9ppmと登録保留基準値2ppmの約4.5倍検出された．ADIはイプロジオン0.12mg/kg/day，プロシミドン0.1mg/dayであり，いずれも普通物である．また，これら農薬は，水洗及び調理過程で残留量が半減すると報告されており[20]，喫食時における残存量は少ないと考えられる．菊花のように花弁が多く重なり合ったものは農薬付着後に風雨や太陽光線の暴露を受けにくく，農薬は残留しやすいと考える．イプロジオン及びプロシミドンは、他の作物にも高濃度に残留した例があり[9,10]，農薬散布時には正しい使用方法の厳守，また登録保留基準を超えることが繰り返されるような場合には使用方法の改善等の配慮が求められる．

その他5種14検体から検出されたイプロジオン（レタス，ピーマン，食用菊及びもも全果），プロシミドン（レタス，こまつな，食用菊及びもも全果）及びTPN（ほうれんそう，ピーマン及びもも全果）の残留量はいずれも基準値の約1/200～1/2であった．

殺虫剤ではベンゾエピン（ピーマン及び食用菊）が検出されたが，登録保留基準値0.5ppmの1/50～1/25と低レベルであった．

その他の農薬では，殺ダニ剤であるテブフェンピラド（もも全果），殺菌剤であるトリアジメノール（ピーマン）及びビテルタノール（もも全果及び果肉）が検出された．

もも全果1検体から検出されたテブフェンピラドは，果肉に設定された残留基準値0.5ppmの1/5であった．なお，果肉からは検出されなかった．

ピーマン1検体から検出されたトリアジメノールはピーマンには基準値が設定されていないが，他の作物の基準値0.20ppm及び0.50ppmの1/20及び1/50以下であった．トリアジメノールはトリアジメホンの植物体内での代謝物でもあるため，今回の検出例はトリアジメホンの代謝物なのか，農薬として用いられたのものかは不明である．

もも全果2検体から検出されたビテルタノールは果肉からも基準値の1/100検出された。同様にプロシミドンも果肉から検出されたが，その検出量は0.01～0.05ppmであり，果肉への農薬の移行は全果における残留量の2～30%と少量であった．果皮が薄く柔らかいももは農薬が果肉へ移行しやすい傾向があるといわれている[22]．しかし，果肉中の濃度はいずれも0.05ppm以下と低いこと，また，いずれの農薬も洗浄あるいは果皮を剥くことによって大部分が除去されることなどから，農薬の摂取量は少ないと考えられる．

(5) 農薬の複数残留

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，ほうれんそう，こまつな，食用菊

Table 4. Residues of Pesticides[1] in Organic Cultivation Vegetable or the Like

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine(ppm)			Carbamate(ppm)	
			Insecticide	Fungicide		Insecticide	Fungicide
			Benzoepin	Procymidone	TPN	Methomyl	Diethofencarb
Lettuce	8	3	0.01[2]	0.01,0.64	Tr[3]	Tr	0.01
Spinach	6	0	—[4]	—	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage	6	0	—	—	—	—	—
Pimento	4	1	—	0.01	—	0.01	—

1) 76 kinds of insecticides (organophosphorus : 39, organochlorine : 18, carbamate : 13,others : 6), 17 kinds of fungicides (organophosphorus : 2,organochlorine : 7, carbamate : 1,others : 7), 10 kinds of herbicides (organophosphorus : 1, organochlorine : 1, carbamate : 2, others : 6)

2) α-Benzoepin : 0.01ppm, β-Benzoepin : not detected, Benzoepin sulfate : not detected

3) Tr : below 0.01ppm

4) — : not detected

及びももの5種14検体（40%）に認められた.

作物群別に複数残留のみられた割合を比較すると，葉菜類37%，果菜類60%，食用花60%及び果実類（全果）40%であった．果菜類及び食用花で複数残留の割合がやや高かった．平成元年度から今年度までの複数残留のみられた作物群別の割合は，根菜類で14～20%，葉菜類で25～75%，果菜類で25～60%，食用花で14～60%及び果実類で14～40%であった[10-17]．葉菜類，果菜類及び食用花でやや高く，これら作物には同時に多くの種類の農薬が使用される傾向のあることが推察される．今回複数残留が認められた農作物はいずれも過去の調査において，複数残留が認められている[10,12-17]．今後も同時に多数の農薬を調査し，残留状況の把握に努める必要がある．

2．無・減農薬栽培野菜類

無・減農薬栽培と表示された野菜類4種24検体について調査したところ，2種4検体（16%）から有機塩素系殺虫剤1種，殺菌剤2種，カーバメイト系殺虫剤1種及び殺菌剤1種が検出された（Table 4）.

残留基準値の設定されている農薬では，ジエトフェンカルブ（レタス）が0.01ppm検出されたが，基準値5.0ppmの1/500であった.

その他の作物から検出された農薬は，いずれも残留基準が設定されていないが，登録保留基準値は設定されている．検出されたベンゾエピン（レタス），プロシミドン（レタス及びピーマン），TPN（レタス）及びメソミル（レタス及びピーマン）は，これら登録保留基準値を超えたものはなく，いずれも基準値の1/200～1/3のレベルであった．また，近年，無・減農薬栽培野菜にみられなかった農薬の複数残留がレタス1検体（プロシミドン，メソミル及びジエトフェンカルブ）及びピーマン1検体（プロシミドン及びメソミル）で認められた.

農薬が検出された作物のうちレタス3検体は販売者独自の基準に基づき無農薬栽培と表示したものであった．ピーマン1検体は表示ガイドラインに従った減農薬栽培表示のもので，使用した農薬の名称が表示されていたが，検出したプロシミドン及びメソミルの記載はなかった.

無・減農薬栽培表示作物における農薬の検出割合は，表示ガイドライン制定後もほとんど変化がなく推移しているが[12-17]，表示ガイドラインに従った検体での検出例よりも販売者独自の表示による検体での検出例のほうが多い傾向にある[14-17]．有機栽培及び無・減農薬栽培表示作物からの検出状況を把握するため，今後とも継続して調査を行う必要があると考える.

ま と め

1997年4月から1998年3月までに都内に入荷した野菜・果実類7種59検体について，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，殺虫剤であるクロルピリホス，DDVP，EPN，MEP及びプロチオホスが5種10検体から，0.01～0.51ppm検出された．このうち，食用菊からクロルピリホスが残留基準値を超えて検出された.

カーバメイト系農薬では，殺虫剤であるチオジカルブ及びメソミルが5種9検体から0.01～6.8ppm検出された．このうち，レタスからはチオジカルブ及びメソミルが，こまつなからはメソミルが登録保留基準値を超えて検出された.

有機塩素系農薬では，殺菌剤であるイプロジオン，プロシミドン，TPN，ビンクロゾリン及び殺虫剤であるベンゾエピンが6種16検体から0.01～16ppm検出され

た．このうち食用菊２検体よりイプロジオンが残留基準値を，プロシミドンが登録保留基準を超えて検出された．

その他の農薬では，殺虫剤であるテブフェンピラド及び殺菌剤であるトリアジメノール及びビテルタノールが２種６検体から0.01～0.48ppm検出された．

また農薬の複数残留がレタス，ほうれんそうなど５種14検体に認められた．

なお，慣行栽培作物で５検体から残留基準値び登録保留基準値を超えて農薬が検出されたが，通常の喫食では健康上特に問題はないと考える．

２．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，ベンゾエピン及びTPNがTr～0.64ppm検出された．

カーバメイト系農薬では,メソミル及びジエトフェンカルブがTr～0.01ppm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．また農薬の複数残留がレタス及びピーマンの2検体に認められた．

本調査は東京都衛生局食品保健課及び東京都食品環境指導センターと協力して行ったものである．

文　献

1）「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
2）小関正道，島村保洋，真木俊夫他：東京衛研年報，**31-1**，170-173，1980.
3）小関正道，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**32-1**，172-176，1981.
4）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**34**，165-170，1983.
5）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，**35**，210-218，1984.
6）田村行弘，観　公子，永山敏廣他：東京衛研年報，**36**，199-205，1985.
7）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**37**，173-183，1986.
8）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**38**，222-228，1987.
9）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**39**，130-138，1988.
10）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**40**，155-162，1989.
11）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**41**，119-124，1990.
12）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：東京衛研年報，**42**，129-133，1991.
13）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**43**，124-129，1992.
14）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**44**，150-154，1993.
15）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**45**，92-97，1994.
16）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**46**，134-139，1995.
17）小林麻紀，永山敏廣，橋本常生他：東京衛研年報，**47**，135-140，1996.
18）田村康宏，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**48**，157-162，1997.
19）田村康宏，永山敏廣，小林麻紀他：食衛誌，**39**，225-232，1998.
20）「植物防疫講座　第２版」編集委員会：植物防疫講座　第２版－農薬・行政編－，222-232，1989，(社)日本防疫協会，東京.
21）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：第11回残留農薬分析研究会　資料，41-46，1987.
22）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**，383-392，1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 95-100, 1998

輸入農産物中の残留農薬実態調査(有機リン系農薬及び含窒素系農薬)
—平成9年度—

田村康宏*, 永山敏廣*, 小林麻紀*, 伊藤正子*
高田千恵子*, 橋本常生**, 羽石奈穂子***, 安田和男*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
(Organophosphorus pesticides and organonitrogen pesticides)
-Apr.1997.~Mar.1998.-

YASUHIRO TAMURA*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, MASAKO ITO*
CHIEKO TAKADA*, TSUNEO HASHIMOTO**, NAHOKO HANEISHI***, and KAZUO YASUDA*

Organophosphorus and organonitrogen pesticide residues in 245 imported crops were investigated. In several kinds of crops, residues of 8 kinds of organophosphorus insecticides, 1 kind of organonitrogen insecticide and 3 kinds of organonitrogen fungicides were detected. Concentrations of organophosphorus insecticides(Ethion, Chlorpyrifos, etc.) and organonitrogen insecticides(Tebufenpyrad), organonitrogen fungicides(Myclobutanil, Bitertanol, Triadimefon and Triadimenol) were trace - 0.46ppm in 23 kinds of crops, 0.05ppm in 1 kind of crops and Trace - 0.20ppm in 15 kinds of crops respectively.

Five kinds of pesticides detected in 21 kinds of crops are regulated by the tolerance for pesticide residues by the Food Sanitation Law. One kind of pesticide(Triazophos) which is not a registered agricultural chemical in Japan was detected in okura produced in Philippines.

Residues of these pesticides were at levels lower than the tolerance for pesticide residues in Japan and the CODEX maximum residue limits for pesticides.

Keywords：残留農薬 pesticide residues，輸入農産物 imported crops，有機リン系農薬 organophosphorus pesticides，含窒素系農薬 organonitrogen pesticides，残留農薬基準 tolerance for pesticide residues

緒　言

今日，食生活の多様化や市場開放が進み，多種多様な生鮮農産物が輸入されるようになった．一方，消費者は食の安全性に対して関心が高く，輸入農産物については諸外国における農薬使用状況が明らかになっていないことなどから不安を訴える声も聞こえる．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[1-11]．今年度は最近の残留農薬基準の拡充に合わせて，今までほとんど検査が行われていなかった含窒素系農薬の検査を新たに加え，調査を行ったので報告する．

実験方法

1．試料

1997年4月から1998年3月に東京都内の市場等で購入した輸入果実・野菜類及び穀類等70品種245検体について調査した．これらの試料の内訳をTable 1に示した．主に可食部について分析したが，一部の果実類は果皮等の非可食部を含む全果について分析した．

2．調査対象農薬

我が国において食品衛生法 残留農薬基準がある農薬

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 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生活科学部食品添加物研究科

Table 1. The List of Investigated Imported Crops

	Commodities		
Vegetables	Brussels sprouts [MEKYABETSU] (1), Chicory (2), Lettuce (1), Saboi(1), Spinach [HORENSO][2] (3), Trevise (2), Bamboo sprout [TAKENOKO] (3), Carrot [NINJIN] [2] (4), Japanese horseradish [WASABI] (1), Garlic [NINNIKU] (4), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] (5), HANANIRA (1), Leek [RIKI] (3), Ginger [SYOGA] (1), Onion [TAMANEGI] (5), Salsify [SEIYOGOBO] (2), Shallot [ESYAROTTO] (2), Celery (1), Celeriac (2), Parsnip (1), Okura (6), Pimento [PIMAN][2] (5), Pumpkin [KABOCHA] (8), Asparagus (5), Baby corn (1), Broccoli (6), Sweet corn[2] (4),Chinese pea [SAYAENDO] (3), String pea [SAYAINGEN][2] (3), Green soybean [EDAMAME][2] (3), Green pea [Gurinpisu][2] (3), Arrowhead [KUWAI] (1), Mashed potato (3), Potato[3] (3), Taro [SATOIMO][2] (5)	35 species	104 crops
Fruits			
Citrus[4]	Grapefruit (8), Lemon (5), Lime (2), Orange (10), Sweetie (1)	5 species	26 crops
Others	Avocado[4] (2), Banana[4] (11), Cherry [SAKURANBO] (3), Grape [BUDO] (5), Kiwifruit[4] (4), Litchi[4] (2), Chestnut [MUKIGURI] (1), Mango[4] (7), Melon[4] (2), Papaya[4] (3), Pineapple[4] (7), Strawberry [ICHIGO] (2)	12 species	49 crops
Beans	Baby lima (2), Butter bean (1), Coffee bean (5), Lentil pea (1), Soybean [DAIZU] (5)	5 species	14 crops
Mushrooms	Matsutake fungus [MATSUTAKE] (5), Shiitake fungus [SHIITAKE] (6)	2 species	11 crops
Nuts	Almond (4), Almond powder (1), Cashew nut (6), Peanut (1), Pistachio nut (2)	4 species	14 crops
Cereals	Flour [KOMUGIKO] (9), Corngrits (4), Corn flour (1), Buckwheat [GENSOBA] (4), Hop(1), Malt [BAKUGA] (3)	5 species	22 crops
Tea	Oolong tea [URONCHA] (3), Tea (2)	2 species	5 crops
		Total 70 species	245 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) precooked frozen potato
4) This sample was analyzed both whole and fresh.

及びアメリカ，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いて残留許容量が設定されている農薬などから，以下の59種類の農薬を調査対象とした．

(1) 有機リン系農薬：アジンホスメチル，イソフェンホス，エチオン，エディフェンホス(EDDP)，エトプロホス，エトリムホス，EPN，カズサホス，キナルホス，クロルピリホス，クロルピリホスメチル，クロルフェンビンホス(CVP-E,Z)，ジオキサチオン，ジクロルボス(DDVP)，ジメトエート，ジメトン(-O,-S)，ダイアジノン，チオメトン，テトラクロルビンホス(CVMP)，テルブホス，トリアゾホス，トリクロルホン(DEP)，トルクロホスメチル，パラチオン，パラチオンメチル，ピラクロホス，ピリミホスメチル，フェンチオン(MPP)，フェントエート(PAP)，フェンクロルホス，フェンスルホチオン，フェニトロチオン(MEP)，ブタミホス，プロチオホス，ブロモホスエチル，ホサロン，ホスチアゼート，ホスメット(PMP)，マラチオン，メカルバム，メチダチオン(DMTP)　計41種

(2) 含窒素系農薬：エスプロカルブ，テニルクロール，テブフェンピラド，トリアジメノール，トリアジメホン，パクロブトラゾール，ビテルタノール，ピリダベン，フェナリモル，フルシラゾール，フルトラニル，プレチラクロール，プロピコナゾール，ペンディメタリン，ミクロブタニル，メトリブジン，メフェナセット，メプロニル　計18種

3．装置

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-14A (検出器：FPD 及び FTD)

(2) キャピラリーガスクロマトグラフ：Varian Associ-

ates Inc. 製3400 (検出器：FPD), HNU®-Nordion社製 MICROMAT HRGC-412 (検出器：ATD)

(3) ガスクロマトグラフ—質量分析計：Finnigan Mat 社製 Tracker™ System, GCQ™ System, Hewlett Packard 社製 HP5973

(4) 原子発光検出器：Hewlett Packard 社製 AED HP5921A

(5) 粉砕器：㈲廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

4．分析方法

厚生省告示第239号(平成4年10月27日), 厚生省告示第221号(平成8年9月2日), 残留農薬分析法[12]及び増補残留農薬分析法[13]等に準じた.

結果及び考察

1．農薬残留実態

輸入農産物70品種245検体中15品種(検出率21%, 以下同様) 37検体(15%)から8種類の有機リン系農薬及び5種類の含窒素系農薬が, 痕跡(0.01ppm未満)～0.46ppm検出された.

(1) 果実類

果実類から検出した農薬を, Table 2に示した.

果実類のうち柑橘類5品種26検体中5品種(100%)15検体(58%)から5種類の有機リン系殺虫剤が全果で痕

Table 2. Pesticide Residues in Fruits

Sample	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Citrus						
Grapefruits						
(whole)	USA	7	4	Ethion	Tr[5], 0.02, 0.03, 0.04	0.3[2], 2[3], 2[4]
Lemon						
(whole)	USA	5	1	Chlorpyrifos	0.01	0.3[1], 0.3[3], 1.0[4]
Lime						
(whole)	Mexico	2	1	Parathion-methyl	0.02	0.2[1], 0.2[3]
Orange						
(whole)	USA	8	7	Chlorpyrifos	0.04, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.19	0.3[1], 0.3[3], 1.0[4]
				DMTP	0.10, 0.18	0.2[2], 2[3], 2.0[4]
	Spain	1	1	DMTP	0.03	0.2[2], 2[3]
	Australia	1	1	Malathion	0.02	4.0[1], 4[3]
				DMTP	0.46	0.2[2], 2[3]
Sweetie						
(whole)	Israel	2	1	Chlorpyrifos	Tr	0.3[1], 0.3[3]
Others						
Banana						
(whole)	Ecuador	5	4	Bitertanol	0.01, 0.03, 0.03, 0.20	0.5[1], 0.5[3]
	Philippines	6	4	Chlorpyrifos	Tr, 0.01	0.5[1]
				Bitertanol	0.03, 0.05, 0.17	0.5[1], 0.5[3]
(fresh)	Philippines	6	3	Bitertanol	Tr, 0.01, 0.05	0.5[1], 0.5[3]
Cherry	USA	3	1	Myclobutanil	0.02	4.0[1]
Pineapple						
(whole)	Philippines	7	3	Triadimefon	0.10, 0.10, 0.13	0.5[2], 3[3]
				Triadimenol	0.08, 0.11, 0.14	
(fresh)	Philippines	7	1	Triadimefon	0.02	0.5[2], 3[3]
				Triadimenol	0.01	
Strawberry	USA	2	2	Myclobutanil	0.01, 0.04	1.0[1], 5.0[4]

1) tolerance for pesticide residue in Japan
2) standard for withholding registration of pesticides
3) CODEX maximum residue limits for pesticides
4) tolerance in each country
5) Tr : below 0.01 ppm

跡～0.46ppm検出された.しかし，いずれも果肉からは検出されず，果皮からの移行は認められなかった．グレープフルーツからエチオン，レモンからクロルピリホス，オレンジからクロルピリホス，メチダチオンなどが検出された．これらの農薬は例年当該果実より検出されているが，本年度の特徴としてアメリカ産オレンジからのクロルピリホスの検出率が高いことが挙げられる．過去5年間におけるアメリカ産オレンジからのクロルピリホスの検出率は0～50%で推移している[7-11]のに対し，本年度は67%であった．

また，メキシコ産ライムから日本では特定毒物に指定され，農作物に使用することはできないパラチオンメチルが検出された．この農薬はメキシコではよく用いられている農薬の一つである[14]．このように日本では使用が禁止されている農薬が諸外国で日常的に使用されていることがあるため，輸入農産物中の農薬残留実態の把握には国内外の情報に十分注意し，調査することが必要である．

柑橘類を除く12品種49検体中4品種(33%)14検体(29%)から1種類の有機リン系殺虫剤及び4種類の含窒素系殺菌剤が全果で痕跡～0.20ppm検出された．バナナから検出された有機リン系殺虫剤であるクロルピリホス及び含窒素系殺菌剤であるビテルタノールはこれまでもバナナから検出されており，検出率及び残留濃度とも同程度であった．また本年度より新たに検査を実施した含窒素系農薬のうち殺菌剤であるトリアジメホン及びトリアジメノールがパイナップルから，またミクロブタニルがチェリー及びいちごから検出された．これら果物からの検出例はすでに報告されており[15,16]，今回の調査における残留濃度も同程度であった．

果肉からはフィリピン産バナナ3検体からビテルタノールが，さらにパイナップル1検体からトリアジメホン及びトリアジメノールが全果における残留濃度の10～30%程度検出され，農薬の果肉への移行が認められた．

しかし，エクアドル産のバナナ及び他のパイナップルからは，この検体と比較すると全果における残留濃度が同等若しくは多いにも関わらず果肉からは検出されなかった．このことから農薬の果肉への移行は散布方法や散布後の経過時間，保存方法など多くの要因があることが考えられた[17]．

(2) 野菜類

野菜類から検出された農薬を，Table 3に示した．

35品種104検体中6品種(17%)7検体(7%)から5種類の有機リン系殺虫剤，2種類の含窒素系殺菌剤及び1種類の含窒素系殺虫剤が痕跡～0.44ppm検出された．

有機リン系殺虫剤は5品種(14%)5検体(5%)から検出された．台湾産サヤエンドウ1検体から0.44ppm検出されたジメトエートは，過去10年間の調査においても台湾産及び中国産のものから30検体中6検体(20%)で0.01～0.08ppm検出されており，サヤエンドウでは比較的検出率の高い農薬である．今回の残留濃度は過去のそれと比較すると最高値の約6倍と高かった．この農薬は食品衛生法による残留農薬基準値が設定されていないが，登録保留基準及び国際食品規格残留農薬

Table 3. Pesticide Residues in Vegetables

Sample	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Cerliac	Belgium	2	1	Diazinon	Tr	0.5[3]
Chinese pea	China	2	1	Triadimenol	0.01	
	Taiwan	1	1	Dimethoate	0.44	1[2], 0.5[3]
				Triadimefon	Tr	1[2], 0.1[3]
				Triadimenol	0.15	
String pea	China	1	1	Parathion-methyl	0.02	1.0[1]
HANANIRA	China	1	1	Ethion	0.24	0.3[2]
Okura	Philippines	2	1	Triazophos	0.34	
Pimiento	Koria	1	1	Tebufenpyrad	0.05	

1) tolerance for pesticide residue in Japan
2) standard for withholding registration of pesticides
3) CODEX maximum residue limits for pesticides
4) tolerance in each country
5) Tr : below 0.01 ppm

許容量以内であった．ベルギー産セルリアックからダイアジノンが痕跡程度，中国産サヤインゲンからパラチオンメチルが0.02ppm検出された．ダイアジノン，パラチオンメチルは過去10年間の調査においてこれら作物から検出された例はなく，今後の残留状況の推移を観察していく必要がある．また今年度新たに検査を行ったトリアゾホスがフィリピン産のオクラから0.34ppm検出された．この農薬は日本で農薬の登録はないが，ADIは0.0002mg/kg，LD_{50}は66mg/kg(ラット，経口)[18]で，今回の残留濃度は喫食上特に問題はないと考えられる．

含窒素系殺菌剤は2品種(6%)3検体(3%)から検出された．サヤエンドウ3検体中2検体からトリアジメホン及びトリアジメノールがそれぞれ痕跡及び0.01,0.15ppm検出された．これらの農薬はパイナップルからも検出され，残留濃度は全果でそれぞれ0.10～0.13ppm及び0.08～0.14ppmであった．両農薬の残留濃度はサヤエンドウでは違いが認められたのに対し，パイナップルでは同程度であった．トリアジメノールはトリアジメホンが植物体中で代謝され生成することが知られている[13]．トリアジメホンが散布され代謝されたと仮定した場合，パイナップル及びサヤエンドウで検出された両物質の存在比の相違は，農薬の散布時期，植物による代謝活性の違いなどが考えられる．しかし，トリアジメノールは農薬として使用された可能性も否定できないため，今回の検出例ではトリアジメホンの代謝物との判別はできなかった．両農薬の使用実態の把握が必要であると考える．

またピーマンからは含窒素系殺虫剤であるテブフェンピラドが検出されたが，ピーマンに対しては残留農薬基準値が設定されていない．同じナス科野菜であるトマト，ナスに設定されている残留農薬基準値0.5ppmと比較すると，今回検出した値はその1/10であった．

(3) 穀類，豆類，キノコ類及び種実類

穀類，豆類，キノコ類及び種実類から有機リン系及び含窒素系農薬は検出されなかった．

2．地域別による比較

輸入農産物の原産国を前報[11]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 4に示した．

有機リン系及び含窒素系農薬の検出率はアメリカ産，アジア産及びヨーロッパ産でそれぞれ15%，16%及び18%とほとんど差が認められず，オセアニア産では4%と低かった．アフリカ産からはいずれも検出されなかった．有機リン系農薬と含窒素系農薬の両方が検出されたのはアメリカ産とアジア産で，それぞれの農薬の検出率はアジア産は8%，11%と同程度であるのに対し，アメリカ産は12%，6%と有機リン系農薬の方が高かった．ヨーロッパ産及びオセアニア産からは含窒素系農薬は検出されなかった．

まとめ

1997年4月から1998年3月に都内の市場等で購入した輸入生鮮農産物等70品種245検体について，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種類の有機リン系殺虫剤(エチオン，クロルピリホスなど)が23検体より痕跡～0.46ppmの範囲で検出された．

含窒素系農薬では，1種類の殺虫剤（テブフェンピラド）が1検体より0.05ppm及び4種類の殺菌剤(ミクロブタニル，トリアジメホンなど)が15検体より痕跡～0.20ppmの範囲で検出された．

食品衛生法によりそれぞれの農作物に残留農薬基準値が設定されている農薬のうちクロルピリホス，パラチオンメチル，マラチオン，ビテルタノール及びミクロブタニルの5種類が8品種(11%)21検体(9%)より検出されたが，いずれも基準値以内であった．残留農薬基準値が設

Table 4. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No.of samples	No.of positive samples				Detected rate (%)
		Organophosphorus insecticides	Organonitrogen insecticides	Organonitrogen fungicides	Total	
America	109	13 (4)[1)]	0	7 (2)	20 (6)	15
Asia	88	7 (5)	1 (1)	8 (3)	14 (9)	16
Oceania	27	1 (2)	0	0	1 (2)	4
Europe	17	2 (2)	0	0	2 (2)	18
Africa	4	0	0	0	0	0
Total	245	23 (8)	1 (1)	15 (4)	37(13)	15

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

定されていない農薬のうちエチオン，メチダチオン，ジメトエートなど8種類が8品種(11%)18検体(7%)より検出された．また，日本では登録されていない農薬であるトリアゾホスがフィリピン産のオクラから検出された．いずれも登録保留基準及び国際食品規格残留農薬許容量を超えたものはなかった．

2．地域別による比較

有機リン系及び含窒素系農薬の検出率は，調査した5つの地域の中でアメリカ産，アジア産及びヨーロッパ産が同程度で，次いでオセアニア産の順であった．アフリカ産からは検出されなかった．

本調査は東京都衛生局食品保健課及び食品環境指導センターと協力して行ったものである．

文　献

1）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**34**，165-170，1983.
2）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，**35**，210-218，1984.
3）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：食衛誌，**30**，438-443，1989.
4）永山敏廣，真木俊夫，川合由華他：東京衛研年報，**41**，125-132，1990.
5）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：東京衛研年報，**42**，134-140，1991.
6）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**43**，130-136，1992.
7）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**44**，155-161，1993.
8）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**45**，98-104，1994.
9）小林麻紀，永山敏廣，伊藤正子他：東京衛研年報，**46**，127-133，1995.
10）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**47**，141-147，1996.
11）橋本常生，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**48**，163-169，1997.
12）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.
13）後藤真康，加藤誠哉編著：増補残留農薬分析法，1987，ソフトサイエンス社，東京.
14）「諸外国で使用される農薬に関する調査」：東京都生活文化局消費者部，1992
15）外海泰秀，津村ゆかり，中村優美子他：食衛誌，**34**，216-226，1993.
16）秋山由美，吉岡直樹，矢野美穂他：食衛誌，**38**，381-389，1997.
17）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**，383-392，1995.
18）上杉康彦，上路雅子，腰岡政二：最新農薬データブック，407，1997，ソフトサイエンス社，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 101-108, 1998

輸入農産物中の残留農薬実態調査 (有機塩素系農薬，N-メチルカーバメイト系農薬及びその他) —平成9年度—

伊藤正子*, 永山敏廣*, 小林麻紀*, 田村康宏*
高田千恵子*, 橋本常生**, 羽石奈穂子***, 安田和男*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organochlorine, N-methyl carbamate and the other pesticides) -Apr.1997. Mar.1998.-

MASAKO ITO*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, YASUHIRO TAMURA*
CHIEKO TAKADA*, TSUNEO HASHIMOTO**, NAHOKO HANEISHI*** and KAZUO YASUDA*

Pesticide residues in 245 imported crops were investigated from April 1997 to March 1998. Residues of organochlorine pesticides, two kinds of insecticides and one kind of fungicide were detected at trace - 0.57 ppm and 0.02 - 0.84ppm.

As for carbamate pesticides, 4 kinds of insecticides and one kind of carbamate herbicides were detected at trace - 0.25 and 0.03 - 1.0ppm.

In the others, 3 kinds of fungicides and one kind of herbicide were detected at trace - 4.5ppm and trace - 0.11ppm respectively.

Residues of these pesticides were at levels lower than the tolerance for pesticide residues in Japan and the origin and THE FAO/WHO tolerances for residues.

With the rate of pesticide detection ,crops imported from American countries had the highest level among 5 regions such as the American, African, Asian, European, and the Oceanic countries. As for the kind of detected pesticides in imported crops, there was scarcely any difference among the 5 regions.

Keywords：残留農薬 pesticide residues，輸入農産物 imported crops，有機塩素系農薬 organochlorine pesticides，カーバメイト系農薬 carbamate pesticides，殺虫剤 insecticides，殺菌剤 fungicides，除草剤 herbicides，収穫後使用 postharvest application

緒　言

近年，生鮮農産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．

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[5-15]．そこで本報では，有機塩素系農薬，カーバメイト系農薬及び防ばい剤などのその他の農薬について，平成9年度の調査結果を報告する．

実験方法

1．試料

1997年4月から1998年3月に東京都内の市場等で購入した輸入野菜・果実類及び穀類等70種245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．主に可食部について分析したが，ブドウやイチゴ，チェリ

＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 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生活科学部食品添加物研究科

Table 1. The List of Investigated Imported Crops

	Commodities		
Vegetables	Brussels sprouts [MEKYABETSU] (1)[1], Chicory (2), Lettuce (1), Saboi (1), Spinach [HORENSO][2](3), Trevise (2), Bamboo sprout [TAKENOKO] (3), Carrot [NINJIN][2](4), Japanese horseradish [WASABI] (1), Garlic [NINNIKU] (4), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] (5), HANANIRA (1), Leek [RIKI] (3), Ginger [SYOGA] (1), Onion [TAMANEGI] (5), Salsify [SEIYOGOBO] (2), Shallot [ESYAROTTO] (2), Celery (1), Celeriac (2), Parsnip (1), Okura (6), Pimento [PIMAN]2)(5), Pumpkin [KABOCYA] (8), Asparagus (5), Baby corn (1), Broccoli (6), Sweet corn[2](4), Field pea [SAYAENDO] (3), String pea [SAYAINGEN][2](3), Green soybean [EDAMAME][2](3), Green pea[2](3), Arrowhead [KUWAI] (1), Mashed potato (3), Potato[3](3), Taro [SATOIMO][2](5)	35 species	104 crops
Fruits			
Citrus[4]	Grapefruit[4](8), Lemon[4](5), Lime[4](2), Orange[4](10), Sweetie[4](1)	5 species	26 crops
Others	Avocado[4](2), Banana[4](11), Cherry [SAKURANBO] (3), Grape [BUDO] (5), Kiwifruit[4](4), Litchi[4](2), Chestnut [MUKIGURI] (1), Mango[4](7), Melon[4](2), Papaya[4](3), Pineapple[4](7), Strawberry [ICHIGO] (2)	12 species	49 crops
Beans	Baby raima (2), Butter bean (1), Coffee bean (5), Lentil pea (1), Soybean [DAIZU] (5)	5 species	14 crops
Mushrooms	Matustake fungus [MATSUTAKE] (5), Shiitake fungus [SHIITAKE] (6)	2 species	11 crops
Nuts	Almond (4), Almond powder (1), Cashew nut (6), Peanut (1), Pistachio nut (2)	4 species	14 crops
Cereals	Wheat flour [KOMUGIKO] (9), Corngrits (4), Corn flour (1), Buckwheat [GENSOBA] (4), Hop (1), Malt [BAKUGA] (3)	5 species	22 crops
Tea	Oolong tea [URONCHA] (3), Tea (2)	2 species	5 crops
		Total 70 species	245 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) precooked frozen potato
4) analyzed both whole and fresh.

ーなどは全果，その他の果実類は果皮等の非可食部を含む全果及び果肉について分析した．

2．調査対象農薬

食品衛生法の残留農薬基準で設定された農薬及びアメリカ，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いて残留許容量が設定された農薬などのうち，以下の39種の農薬を調査対象とした．

(1) 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，*p,p'*-DDD及び*o,p'*-DDT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，エンドスルファンスルフェート：α-，β-ベンゾエピン，ベンゾエピンドスルフェート)，ビンクロゾリン　　計20種

(2) 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，メソミル，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，メトルカルブ(MTMC)　　計13種

(3) その他の農薬：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,チアベンダゾール(TBZ)，o-フェニルフェノール(OPP)　　計6種

これらのうち，穀類はカーバメイト系農薬について，柑橘類はカーバメイト系及びその他の農薬について調査した．アジア産の茶葉及び種実類は有機塩素系農薬及びカーバメイト系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．装置

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-14A (検出器：ECD，FTD)

(2) キャピラリーガスクロマトグラフ：Varian Associates Inc.製 3500(検出器：ECD，TSD)，3400 (検出器：FPD)

(3) 液体クロマトグラフ：㈱島津製作所製 LC-6AD (検出器：蛍光)，LC-10AD (検出器：蛍光，UV)，㈱島津製作所製 カルバメート分析システム

(4) ガスクロマトグラフ-質量分析計：Finnigan Mat 社製 Tracker™ System，GCQ™ System

(5) 液体クロマトグラフー質量分析計：VG Biotech社製Platform Ⅱ-LC

(6) 原子発光検出器：Hewlett Packard 社製 AED HP5921A

(7) 粉砕器：㈲廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

4．分析方法

厚生省告示第239号(平成4年10月27日)，厚生省告示第221号(平成8年9月2日)，残留農薬分析法[16]及び増補残留農薬分析法[17]等に準じた．また，これらに分析法が収載されていない農薬については，新たに開発した方法によった[18]．

結果及び考察

1．農薬残留実態

70種245作物中16種48作物(検出率20%，以下同様)から14種の農薬が，痕跡(0.01ppm未満)～4.5ppm検出された．農薬を検出した作物の残留実態について，柑橘類はTable 2に，果実類はTable 3に，野菜，種実及び茶葉類はTable 4に示した．

(1) 柑橘類

5種26作物中4種19作物(73%)から6種の農薬が痕跡～4.5ppm検出された(Table 2)．

平成3年度から8年度までの過去5年間の，柑橘類における農薬の検出率は，48～87%であり，本年度の73%もこの範囲に含まれる結果となった．残留の濃度範囲には大きな変動は見られなかった．残留濃度の平均値は平成3年度から6年度までは，0.61～0.71ppmの範囲であり，平成7年度及び8年度は0.27ppm，0.31ppmと低い値が続いたが，今年度は0.84ppmと過去6年間における平均値と比較してやや高い値であった．これは，比較的残留濃度の高いTBZ及びOPPの結果が加わったためで，これら2農薬を除く残留濃度の平均値は0.54ppmであり，例年と同レベルの結果であった．

食品衛生法による残留基準のある農薬のうち，イマザリル(検出作物名：グレープフルーツの全果及び果肉，レモンの全果及びオレンジの全果；以下同様)が3種13作物(50%)から0.11～4.0ppm検出された．イマザリルの残留基準値は5.0ppmであり，今回検出された残留濃度はいずれも基準値より下回っていた．イマザリルは平成5年度に食品添加物として使用基準，農薬として残留基準の設定が行われた．平成5年度から7年度のイマザリルの検出率は67～79%と高頻度であったが，昨年度は約30%と低下傾向にあった．今年度の検出率50%は昨年度に比べ，やや高かったが，過去4年間の平均値58%とほぼ同程度であった．また，残留濃度の平均値は平成2年度から8年度にかけては0.47～1.4ppmの範囲[5-15]であり，今年度は1.0ppmとその範囲内ではあるがやや高い傾向を示した．

イマザリルはADIが0.025mg/kg/dayのイミダゾール系殺菌剤であり，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[10-15]．今回，グレープフルーツ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，その濃度は全果の約1/30程度であった．

イマザリルと同じく，残留基準が設定されている農薬であるメチオカルブ(オレンジの全果)が，今年度初めて1種5作物(19%)から0.03～0.05ppm検出された．メチオカルブは基準値が0.05ppmと低く，今回検出された残留濃度は基準値ぎりぎりであった．

メチオカルブはADIが0.0012mg/kg/dayのカーバメイト系殺虫剤であり，残留基準値が0.05ppmと低いため，基準の遵守に注意を要する農薬である．今回はオレンジの全果のみからの検出で，果肉からは検出されなかったが，全果では検出率も高く，今後とも，その動向に注目していく必要があると考える．

今年度の検査項目に殺菌剤であるTBZとOPPを新たに加えた．TBZ(グレープフルーツの全果及び果肉，レモンの全果，オレンジの全果及びスウィーティーの全果)が4種13作物(50%)及びOPP(グレープフルーツの全果，レモンの全果及び果肉，オレンジの全果及び果肉，スウィーティーの全果)が4種9作物(35%)からそれぞれ0.09～4.5ppm，痕跡～0.64ppm検出された．

TBZ及びOPPは柑橘類に残留農薬基準及び環境庁が定めた登録保留基準が設定されていないが，食品添加物の防かび剤としていずれも0.010g/kgの基準があり，ADIはそれぞれ0.1mg/kg/day及び0.02mg/kg/dayである．残留濃度の平均値はTBZが1.5ppm，OPPが

Table 2. Pesticide Residues in Citrus Fruits

Sample	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Grapefruits						
(whole)	USA	7	4	NAC	0.02, 0.25	
				Imazalil	0.24, 0.43, 0.88, 1.7	5.0[1],5[3],10[4,6]
				TBZ	0.30, 1.3, 1.8, 2.7	10[3], 10[4,6]
				OPP	0.16, 0.22	10[3], 10[4,6]
	South Africa	1	1	TBZ	4.5	10[3]
(fresh)	USA	7	2	Imazalil	0.15	
				TBZ	0.12, 0.16	
Lemon						
(whole)	USA	5	5	Imazalil	0.11, 0.94, 4.0	5.0[1],5[3],10[4,6]
				TBZ	0.37, 1.1, 2.6	10[3], 10[4,6]
				OPP	0.01, 0.48, 0.64	10[3], 10[4]
				2,4-D	0.02, 0.05, 0.07, 0.11	2[3], 5[4]
(fresh)	USA	5	4	OPP	0.01	
				2,4-D	Tr[5], 0.01, 0.03	
Orange						
(whole)	USA	9	8	Methiocarb	0.03, 0.04, 0.05, 0.05, 0.05	0.05[1], 0.05[3]
				Imazalil	0.05, 0.33, 0.66, 1.2, 1.6, 2.2	5.0[1], 5[3], 10[4,6]
				TBZ	0.09, 1.3, 1.6, 3.1	10[3], 10[4,6]
				OPP	Tr[5], Tr[5], 0.38	10[3], 10[4]
(fresh)	USA	9	1	OPP	0.01	
Sweetie						
(whole)	Israel	1	1	TBZ	2.0	10[3]
				OPP	0.03	10[3]

1) tolerance for pesticide residue in Japan
2) standard for withholding registration of pesticides
3) CODEX maximum residue limits for pesticides
4) maximum residues in each country
5) Tr:below 0.01 ppm
6) for postharvest

0.18ppmであった．このTBZ及びOPPの検出値はFAO/WHO及び米国の柑橘類における許容量に対し，TBZが1/2以下，OPPが3/50以下であった．TBZ，OPPともに，果肉での残留が見られるが，残留濃度も少なく，通常の喫食では問題ないと考える．

柑橘類にポストハーベスト使用が認められている2,4-D(レモンの全果及び果肉)が1種5作物(19%)から0.02～0.11ppm検出された．この検出値はFAO/WHO及び米国の許容量2ppm及び5ppmの約1/20及び1/50以下であった．2,4-Dは，イマザリルと同様にレモン等の柑橘類で，果肉/果皮の濃度比が他の農薬より高く，果皮から果肉への移行が比較的起こりやすいと言われている[22]．今回も，果肉からそれらの農薬が検出されているが，残留濃度は少なく特に問題はないと考える．

(2) 果実類(柑橘類を除く)

果実類12種49作物中5種16作物(33%)から4種の農薬が痕跡～0.84ppm検出された(Table 3).

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，イプロジオン(バナナ全果及び果肉，チェリー，ブドウ及びイチゴ)が4種9作物(18%)から0.02～0.84ppm検出された．残留濃度は各果実の基準値のそれぞれ1/10，1/100，1/500及び1/200以下であった．今回イプロジオンが検出されたバナナはすべてフィリピン産のものであり，その検出割合も非常に高かった．イプロジオンはADIが0.12mg/kg/dayのジカルボキシ

Table 3. Pesticide Residues in Fruits

Sample	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Fruits						
Banana						
(whole)	Philippines	6	6	Iprodione	0.10, 0.12, 0.14, 0.19, 0.35, 0.84	10[1]
				Bitertanol	0.03, 0.05, 0.17	0.5[1], 0.5[3]
	Ecuador	5	4	Bitertanol	0.01, 0.03, 0.03, 0.20	0.5[1], 0.5[3]
(fresh)	Philippines	6	5	Iprodione	0.02, 0.02, 0.03, 0.03, 0.03	
				Bitertanol	Tr, 0.01, 0.05	0.5[1], 0.5[3]
Cherry	USA	3	1	Iprodione	0.08	10[2], 20[4]
Grape	Chile	1	1	Methomyl	0.04	1[2], 5[3]
	USA	4	1	Iprodione	0.05	25[1], 10[3], 60[4]
				Methomyl	Tr[5]	1[2], 5[3], 5[4]
Melon						
(whole)	USA	1	1	Endsulfan sulfate	0.04	0.5[2,6], 2[4]
	Mexico	1	1	Endsulfan sulfate	0.04	0.5[2,6]
(fresh)	USA	1	1	Endsulfan sulfate	0.04	
	Mexico	1	1	Endsulfan sulfate	Tr[5]	
Strawberry	USA	2	1	Iprodione	0.09	20[1], 10[3], 15[4]
				Methomyl	0.08	1[2]

1) tolerance for pesticide residue in Japan
2) standard for withholding registration of pesticides
3) CODEX maximum residue limits for pesticides
4) tolerance in each country
5) Tr:below 0.01 ppm
6) the amount of Endsulfan Ⅰ, Endsulfan Ⅱ and Endsulfan sulfate

イミド系殺菌剤である．今回の果肉からの残留濃度の最大値0.03ppmは，体重50kgの人が毎日約200kgのバナナを食べ続けても健康上特に問題がない量である．しかし，果肉からの検出頻度は100%と非常に高いため，今後も残留実態を調査する必要があると考える．

環境庁告示の登録保留基準のある農薬ではメソミル(ブドウ及びイチゴ)が2種3作物(6%)から，痕跡～0.08ppm検出されたが，基準値の1/25及び1/10以下であった．

エンドスルファンの代謝物であるエンドスルファンスルフェート（メロンの全果及び果肉)が1種2作物(4%)から痕跡～0.04ppm検出された．これらの果実類には，総エンドスルファン(エンドスルファンⅠ，Ⅱ及びエンドスルファン スルフェートの総計)として0.5ppmの登録保留基準が設定されているが，残留濃度は登録保留基準値の1/10以下であった．

(3) 野菜類

野菜類では，35種104作物中5種9作物(9%)から4種の農薬が痕跡～1.0ppm検出された(Table 4).

残留農薬基準のある農薬のうち，カーバメイト系殺虫剤のNAC(オクラ)が2作物(2%)から0.01及び0.16ppm検出され,CIPC(ポテト及びマッシュポテト)が2種5作物(5%)から0.03～1.0ppm検出された．今回の残留濃度はそれぞれ基準値の1/60以下及び1/50以下であった．

CIPCは今回調査したポテト食品（6作物）の83%から検出された．この農薬は諸外国で収穫後のポテトに発芽抑制を目的に使用されており，ポテト食品から高頻度で検出されている[8-10,12,14,15]．フライドポテトなど加熱調理後も残存することが知られており[19]，今後も残留状況を調査していく必要がある．

登録保留基準がある農薬のうち，メソミル(ホウレ

ンソウ)が1作物(1%)から痕跡程度検出され，基準値の1/50以下であった．

その他，MTMCがゴボウ2作物のうち1作物から痕跡程度検出された.MTMCはゴボウに対して残留農薬基準または登録保留基準は設定されていない．

MTMCは劇物に指定されているカーバメイト系殺虫剤で，日本では稲にのみ用いられている．諸外国における農薬の使用状況の違いが現れた例ともいえる．

(4) 種実類及び茶葉類

種実類では，4種14作物中カシューナッツ1種1作物(7%)から総BHCが痕跡程度検出された(Table 4)．総BHCは当該食品に残留農薬基準値は設けられていないが，米や大豆などで0.2ppmが設定されている，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[22]．諸外国でもその使用が規制されていることが多く，今回の検出も土壌由来と考えられる．土壌残留性が高い農薬であるため，使用されなくなってから15年以上経ても，痕跡程度ながら検出されているとの報告がある[8,9,11,14]．

茶葉類では，ウーロン茶2種5作物中1種3作物(60%)から総DDT及びジコホールが0.03～0.57ppm検出された．これら農薬の茶に対する残留農薬基準は不発酵茶にのみ設定されており，今回検出された半発酵茶であるウーロン茶には基準は設定されていない．不発酵茶における基準は茶湯として測定したとき，それぞれ0.2ppm及び3.0ppmである．DDTは1948年に農薬として登録されたが，BHCと同様に，難分解性，高蓄積性のため，1971年に登録が失効されたADIが0.005mg/kg/dayの有機塩素系殺虫剤である[22]．ジコホールはADIが0.025mg/kg/dayの有機塩素系殺虫剤で，果実，野菜，茶などに用いられている．

ウーロン茶から検出されたT-DDTの内訳をTable 5に示した．DDTは，*p,p'*-DDTが原体で，*p,p'*DDE及びDDDは代謝物，*o,p'*-DDTは合成課程における不純物である．ウーロン茶から検出された総DDTのうち，原体の*p,p'*-DDTは30%程度と低い検出割合であった．このことから，今回検出されたDDTは使用されてからかなり時間が経ったと推察され，土壌に残留していたものに由来すると考えられる．今回検出されたウーロン茶のうち1作物は*p,p'*-DDEの検出はなかったが，他の2作物はp,p'-DDD及び*o,p'*-DDTより*p,p'*-DDEの残留濃度が多かった．*p,p'*-DDTは，植物体内で*p,p'*-DDEへ代謝することが知られている[23]．これは，茶葉に取り込まれたDDTの一部が代謝を受け，*p,p'*-DDEに変化したと推察される．また，今回DDT類が検出

Table 4. Pesticide Residue in Vegetables, Nuts and Tea Leaves

Sample	Country	No. of samples	No. of positives	Pesticide	Residues (ppm)	Tolerance (ppm)
Vegetables						
Okura	Philippines	2	1	NAC	0.01	10[1]
	Thailand	4	1	NAC	0.16	10[1]
Potato	Canada	2	2	CIPC	0.04, 0.90	50[1]
	USA	1	1	CIPC	0.03	50[1], 50[3]
Mushed potato	Canada	3	2	CIPC	0.09, 0.1	50[1]
Salsify	China	2	1	MTMC	Tr[4]	
Spinach	China	3	1	Methomyl	Tr[4]	0.5[2]
Nats						
Cashew nut	China	1	1	T-BHC	Tr[3]	
Tea leaves						
Oolong tea	China	3	3	T-DDT	0.03, 0.11, 0.17	
				Dicofol	0.19, 0.34, 0.57	

1) standard for withholding registration of pesticides
2) CODEX maximum residue limits for pesticides
3) tolerance in each country
4) Tr:below 0.01 ppm

Table 5. Detailed Items of T-DDT Detected in Tea Leaves

Sample	T-DDT (ppm)	*p,p'*-DDT (ppm)	*p,p'*-DDE (ppm)	*p,p'*-DDD (ppm)	*o,p'*-DDT (ppm)
Oolong Tea	0.033 (100%)[1)]	0.010 (30.3%)	ND2)	0.008 (24.2%)	0.015 (45.5%)
	0.108 (100%)	0.027 (25.0%)	0.038 (35.2%)	0.013 (12.0%)	0.030 (27.8%)
	0.166 (100%)	0.049 (29.5%)	0.052 (31.3%)	0.024 (14.5%)	0.041 (24.7%)

1) the ratio in T-DDT
2) ND : not detected

されたウーロン茶からはいずれもジコホールが検出された．ジコホールは、ショウジョウバエの体内で，*p,p'*-DDTが酸化され生成される[23]．DDTは，多様な代謝を受けて消失していくが，いずれの代謝経路をとったとしても，完全に消失するには非常に長期間を要し，環境中に長く残留する性質がある．また，DDTの代謝中間体である*p,p'*-DDE，*p,p'*-DDD及びジコホールなども親化合物であるDDTに匹敵する慢性毒性を有するため，今後とも，その同行を見守っていきたい．

(5) 穀類，豆類，キノコ類

穀類５種22作物，豆類５種14作物及びキノコ類２種11作物からはいずれの農薬も検出されなかった．

穀類は，過去に有機リン系農薬の検出は多いが[5-15]，有機塩素系，カーバメート系及びその他の農薬の検出はほとんどない．

豆類，キノコ類は，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たが[8-11]，平成５年度からは検出されていない．

2. 地域別による比較

輸入農産物の原産国を５地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめ，Table 6に示した．

農薬の検出率は，アメリカ産が31%と最も高く，次いでアフリカ産，アジア産，ヨーロッパ産の順であった．今年度はオセアニア産からは検出されなかった．特にアメリカ産の検出率が高い要因としては，柑橘類においてポストハーベスト使用された農薬の検出率が高かったことに由来していると考える．また，アフリカ産の作物の検出率が高かったが，これは検査作物数が4作物と少なく，この結果を見て，アフリカ産の作物全体の残留農薬実態を推測することは困難である．

アジア産からは有機塩素系農薬の検出が多く見られた．これはフィリピン産のバナナから殺菌剤としてイプロジオンが高頻度で検出されたことと，中国産のウーロン茶から総DDT及びジコホールが検出したことに由来している．

検出された農薬の種類は，アジア産のバナナからアメリカ産では検出されなかった有機塩素系殺菌剤のイプロジオンが検出されたが，全体的には地域による違いはあまり見られず，輸入される農作物の種類に由来す傾向が認められた．ポテト及びその加工品からはCIPCが検出されやすく[5-15]，柑橘類からはイマザリル，TBZ，OPP，2,4-D等の検出例が多かった．

ま と め

1997年4月から1998年３月に都内の市場等で購入した輸入生鮮農作物等70種245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

有機塩素系農薬では，４種の殺虫剤(エンドスルファンスルフェート，総BHC，総DDT，ジコホール)が痕跡～0.57ppm，１種の殺菌剤(イプロジオン)が0.02～

Table 6. The Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No.of samples	No.of positive samples						rate (%)
		Organochlorine		Carbamate		Others	Total	
		Insecticides	Fungicides	Insecticides	Herbicides			
America	109	2 (1)[1)]	1 (1)	10 (3)	5 (1)	16 (4)	34 (10)	31
Asia	88	4 (3)	6 (1)	4 (3)	0	1 (2)	15 (9)	17
Oceania	27	0	0	0	0	0	0	0
Europe	17	0	0	1 (1)	0	1 (1)	2 (2)	12
Africa	4	0	0	0	0	1 (1)	1 (1)	25
Total	245	6 (4)	7 (1)	11 (3)	5 (1)	19 (4)	52 (22)	21

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

0.84ppm検出された.

カーバメイト系農薬は，3種の殺虫剤(NAC，MTMC，メソミル及びメチオカルブ)が痕跡～0.25ppm，1種の除草剤(クロルプロファム)が0.03～1.0ppm検出された.

その他の農薬では，4種の殺菌剤(イマザリル，TBZ，OPP)が痕跡～4.5ppm及び1種の除草剤(2,4-D)が痕跡～0.11ppm検出された.

2．地域別による比較

農薬の検出率は，調査した5つの地域の中でアメリカ産の農作物が最も高く，次いでアフリカ産，アジア産，ヨーロッパ産の順であった.オセアニア産からは検出されなかった．検出された農薬の種類は，バナナのイプロジオンを除くと，地域による差はほとんど見られなかった.

本調査は東京都衛生局食品保健課及び食品環境指導センターと協力して行ったものである.

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，㈳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，㈳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，㈳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）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**47**，141-147，1996.

15）橋本常生，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**48**，163-169，1997.

15）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.

16）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.

17）未発表.

18）Nagayama,T., Kikugawa, K.:*Jpn.J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 78-83, 1992.

19）上杉康彦，上路雅子，腰岡政二：最新農薬データブック，310，1997，(株)ソフトサイエンス社，東京

20）「植物防疫講座 第2版」編集委員会：植物防疫講座第2版—農薬・行政編—，229，1989，㈳日本植物防疫協会，東京.

21）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**，383-392，1995.

22）植村振作，河村宏，辻万千子他：農薬毒性の事典，1988，㈱三省堂，東京.

23）湯嶋健，桐谷圭治，金沢純：生態系と農薬，現代科学選書，63-64，1974，㈱岩波書店，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 109-113, 1998

国内産野菜・果実中の有機スズ系農薬の残留実態

羽石奈穂子*, 永山敏廣**, 小林麻紀**, 伊藤正子**,
田村康宏**, 高田千恵子**, 橋本常生***, 安田和男**

Survey of Organotin Pesticides in Domestic Vegetables and Fruits

NAHOKO HANEISHI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA**, MAKI KOBAYASHI**,
MASAKO ITO**, YASUHIRO TAMURA**, CHIEKO TAKADA**,
TSUNEO HASHIMOTO*** and KAZUO YASUDA**

The presence of organotin pesticides in 59 crops was investigated.

Fenbutatin oxide, fenbutatin oxide di-form and cyhexatin which are kinds of organotin pesticides, were extracted with an acetic acid-ethylether (1:99) mixture, then ethylated with ethylmagnesium bromide (EtMgBr), and the ethyl derivatives were purified on a Sep-pak Florisil cartridge. They were simultaneously determined with atomic emission detector (AED).

Fenbutatin oxide was found in two peaches at a level of 0.04 and 0.06 ppm. These levels were very much lower than the tolerance for pesticide residue.

Keywords：有機スズ系農薬 organotin pesticides, 酸化フェンブタスズ fenbutatin oxide, シヘキサチン cyhexatin, 原子発光検出器 atomic emission detector (AED), 野菜 vegetables, 果物 fruits

緒　　言

著者らはこれまで国内産野菜・果実における有機リン系，有機塩素系及びカーバメート系農薬等の残留実態について調査してきた[1]．今年度は新たに有機スズ系農薬である酸化フェンブタスズ（ビス［トリス(2-メチル-2-フェニルプロピル)スズ］オキシド）及びシヘキサチン（トリシクロヘキシルスズヒドロキシド）の残留実態について調査を行ったのでその結果を報告する．

酸化フェンブタスズは有機リン系及び有機塩素系農薬に感受性が低下したハダニ類にも効果を示す殺ダニ剤で，野菜・果実・花き類など多くの作物に適用されている[2]．この分析法としてフレームレス原子吸光光度計を用いた厚生省告示試験法[3]が示されているが，この方法では代謝物である酸化フェンブタスズ（ジ体）（ビス［ビス(2-メチル-2-フェニルプロピル)スズ］オキシド）など，有機スズ化合物を特定することはできない．

シヘキサチンも野菜・果樹などの広い範囲のダニ類に効果を示す薬剤であるが，国内では1985年に登録が失効されており[4]，残留基準値はいずれの作物からも不検出となっている．厚生省告示試験法[5]では，水素化後，スズ用干渉フィルターを用いたガスクロマトグラフ法が示されている．

山本ら[6]は両農薬をエチル化後，ガスクロマトグラフ（GC）で酸化フェンブタスズ及びその代謝物（ジ体），及びシヘキサチンを簡便に同時定量する方法を報告している．報告では，スズフィルター付FPD検出器を使用しているが，著者らはより選択性の高い検出器である原子発光検出器（AED）を用いた方法を検討し，良好な結果を得た．そこでこの方法を用いて種々農産物について残留実態を調査した．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 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生活科学部乳肉衛生研究科

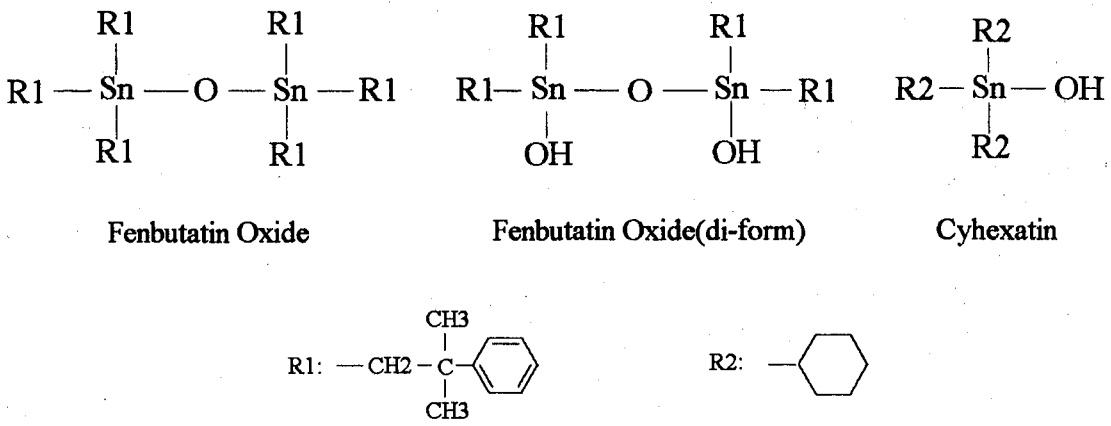


Fig 1. Structures of Fenbutatin Oxides and Cyhexatin

実験方法

1. 試料

1997年4月から1998年3月に東京都内の市場等で購入した慣行栽培及び無・減農薬栽培の野菜・果実及び食用花等8種59検体について調査した.

2. 調査対象農薬

酸化フェンブタスズ及びその代謝物（ジ体），シヘキサチンの計3種を対象とした. Fig.1 に化学構造式を示す.

3. 試薬

酸化フェンブタスズ，酸化フェンブタスズ（ジ体）及びシヘキサチン：和光純薬工業製（残留農薬分析用）

エチルマグネシウムブロマイド(EtMgBr)：東京化成工業製

フロリジルミニカラム：Sep-pak®プラスフロリジル

4. 装置

(1) ガスクロマトグラフ（GC）：Hewlett Packard社製HP5890SERIES Ⅱ（検出器：AED HP5921A）

(2) ガスクロマトグラフ－質量分析計（GC－MS）：Finigan Mat 社製Traker™System

5. 実験方法

(1) 試験溶液及び標準溶液の調製

山本ら[6]の方法に準じて次のように行った.

試験溶液の調製：試料10gに塩化ナトリウム5 g及び酢酸・ジエチルエーテル（1：99）混液100mlを加え，ホモジナイズ後吸引ろ過した. 残渣を酢酸・ジエチルエーテル（1：99）混液約20mlで洗浄後分液ロートにろ液及び洗液を移し，水層を除去した後ヘキサン100mlを加え振とうした. ヘキサン層を分取して脱水し，濃縮後残留物をジエチルエーテルで5 mlに定容した. その1 mlにEtMgBr 1 mlを加え，20分間放置後1 N硫酸10 mlを滴下した. 水10mlを加えた後ヘキサン5 mlで2回抽出し，ヘキサン層を2～3 mlまで濃縮した. あらかじめヘキサン10mlで洗浄したフロリジルミニカラムに濃縮したヘキサン層を負荷し，ヘキサン8 ml，次いでジエチルエーテル・ヘキサン（1：99）混液10mlで溶出した. これら溶出液を合わせて濃縮した後，ヘキサンで2 mlに定容し試験溶液とした.

標準溶液の調製：酸化フェンブタスズ，そのジ体，及びシヘキサチンをそれぞれ50mg秤取し，酢酸・ジクロロメタン（1：99）混液で50mlに定容したものを標準原液とした. 標準原液をエーテルで適宜希釈したものを標準溶液とした.

定性用標準溶液(St-A)：標準溶液1 mlにEtMgBr 1 mlを加えてエチル化し，以下試験溶液と同様に調製した.

定量用標準溶液(St-B)：最終溶液中濃度が0.2-4.0 μg/mlとなるようにSt-Aをとり，溶媒を留去した後，有機スズ系農薬を検出しない試験溶液に溶解した.

(2) 分析条件

GC条件

カラム：HP-1(0.32mm i.d.×25m，膜厚0.17 μm)，カラム温度：50℃(1min)－(10℃/min)－250℃(0min)－(5℃/min)－280℃(5 min)，試料注入口温度：250℃，ガス流量：ヘリウム17.5psi

AED条件

恒温槽：温度62-65℃　水圧300-400ml/min，ガス流量：ヘリウム4.2kgf/cm³，窒素2.0kgf/cm³，酸素1.8kgf/cm³，水素4.9kgf/cm³，空気4.2kgf/cm³，キャビティ圧：1.5psi，キャビティベント：60-80ml/min，窒

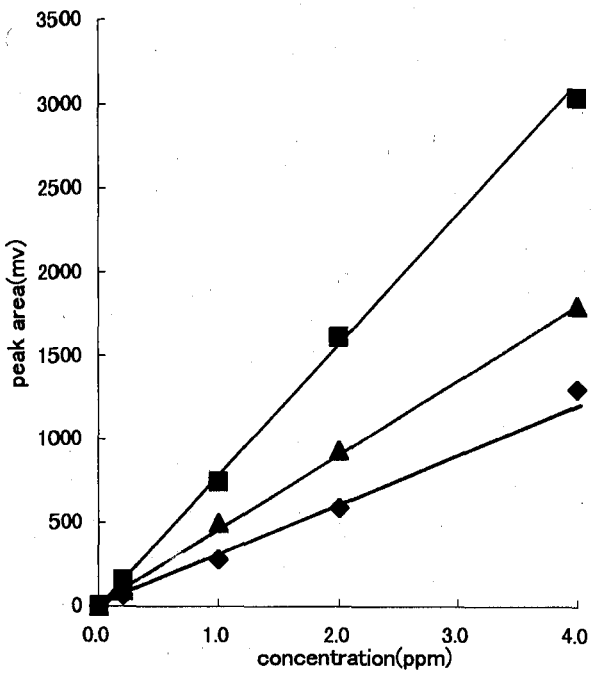


Fig 2. Calibration Curves

◆: Fenbutatin Oxide ■: Fenbutatin Oxide (di-form)
▲: Cyhexatin

素パージ：2L/min，キャビティブロック：250℃，Xファーライン：250℃，検出波長：スズ303nm

GC－MS条件

カラム：DB-5ms(0.25mm i.d.×30m, 膜厚0.25μm)，カラム温度：120℃(1.2min)－(8℃/min)－280℃(3 min)，イオン化モード：EI，イオン化電圧：70eV

6．定性試験

AEDを装着したGCに試験溶液を注入し，St-Aから得られた3成分のピークのリテンションタイムと比較した．同じリテンションタイムにピークが認められた試験溶液について定量を行った．

7．定量試験

定量対象となる試料と同じ種類の試料から得られた有機スズ系農薬を含まない抽出溶液を用いてSt-Bを調製し，得られたクロマトグラムのピーク面積から試料中の3成分の定量を行った．

結果及び考察

1．定量性の検討

山本ら[6]はヘキシルトリブチルスズを用いた内部標準法による定量を行っているが，この方法では試料の一部でシヘキサチンの添加回収率が300%を越えたものもみられた．これは，試料溶液のマトリックスによってガラスインサートへの吸着等が異なるためと考えられる．そこで，定量を行うときは，実験方法に示したように同じ種類の試料から得られた抽出溶液を添加し，試験溶液と標準溶液のマトリックスを同等なものとした．

1－1．検量線

溶液中濃度が0.2-4.0μg/mlとなるようにSt-Bを段階的に調製し，得られたクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成した．Fig.2 に添加マトリックスとしてモモ抽出液を用いたときの検量線を示す．3成分ともにr＝0.999以上の良好な直線性が得られた．

1－2．添加回収試験

細切したモモ，トマト及びホウレンソウに試料中濃度が0.5μg/mlとなるように標準溶液を添加し30分間放置後抽出・分析を行った．結果をTable 1に示す．St-Bを用いたときの各成分のの回収率はモモ73～86%，トマト82～106%，ホウレンソウ90～110%であり，いずれも良好であった．なお，定性用のSt-Aを用いたときの見かけ上の定量値から算出した回収率はモモ71～137%，トマト88～317%，ホウレンソウ77～330%となった．特にシヘキサチンのトマト及びホウレンソウにおける回収率が300%以上と非常に高く，この方法では正確な定量が困難であることがわかった．しかし，スクリーニング上は問題ないと判断し，農薬を検出した時に同じ種類の試料からの抽出溶液を用いたSt-Bを作製して，定量することにした．

Fig.3 に添加マトリックスとしてモモ抽出液を用いたときのSt-B及び標準物質のみのSt-Aのガスクロマトグ

Table 1. Recoveries[1] of Fenbutatin oxide,Fenbutatin oxide(di-form) and Cyhexatin

Samples	Fenbutatin oxide		Fenbutatin oxide(di-form)		Cyhexatin	
	St-A[2]	St-B[3]	St-A	St-B	St-A	St-B
Peach	76±9	83±9	71±10	73±8	137±15	86±6
Tomato	109±9	82±7	88±8	104±1	317±21	106±3
Spinach	114±9	107±9	77±9	90±11	330±15	110±15

1) mean(%)±SD(%), n＝3
2) Recoveries were measured by standard A for qualitative analysis.
3) Recoveries were measured by standard B for quantitative analysis.

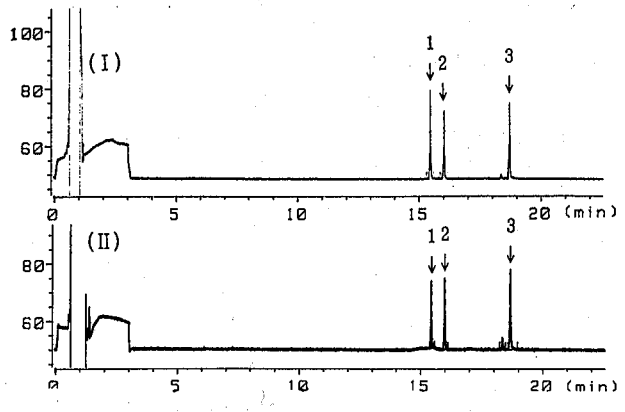
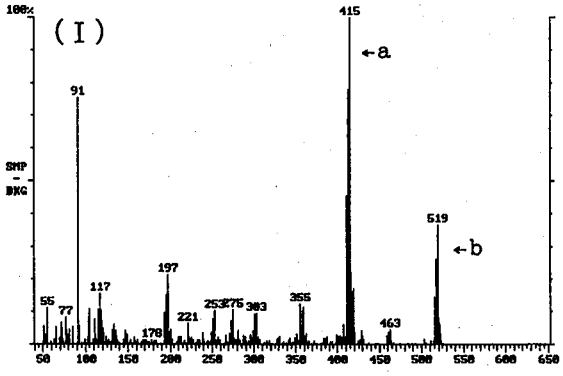


Fig 3. GC chromatogram of standards

(I) :Standard B (II) :Standard A

1 : Cyhexatin 2 : Fenbutatin Oxide (di-form)

3 : Fenbutatin Oxide



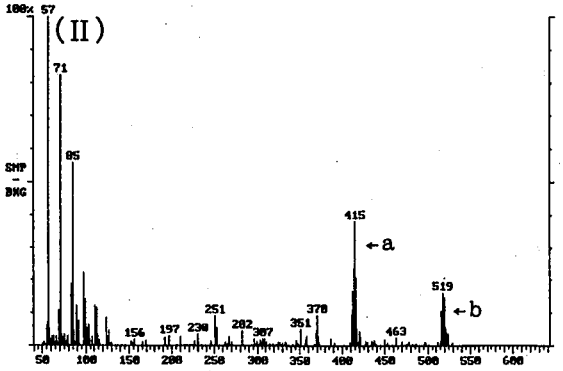


Fig 4. GC-MS spectrum of Fenbutatin Oxide

(I) : Fenbutatin Oxide standard

(II) : Extract of peach which detected Fenbutatin Oxide by GC

a, b : same as described in the legend of Fig. 5

ラムを示した．ピーク1のシヘキサチンはモモ抽出液の添加により，明らかな正のマトリックス効果が現れ，定量誤差が大きくなることがわかった．

本法によるSt-Aの定性限界は0.02 μg/ml，St-Bの定量限界は0.2 μg/mlであった．

2．GC－MSによる確認

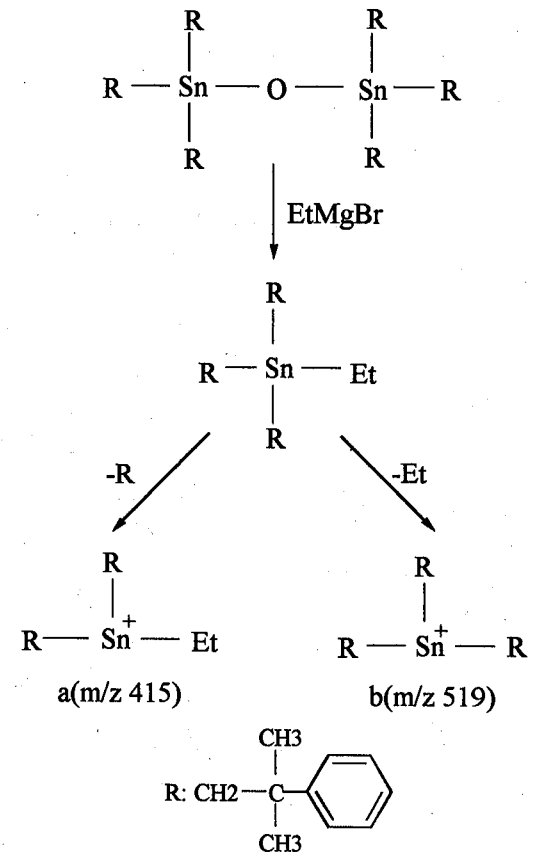


Fig 5. Ethylation and Cleavagation of Fenbutatin Oxides

AEDで酸化フェンブタスズあるいはシヘキサチン等を検出した検体はGC－MSによる確認を行った．

GC用試験溶液をGC－MSに注入し，得られたMSスペクトルをSt-AまたはSt-Bから得られた各成分のMSスペクトルと比較して，開裂イオン等が一致することを確認した．Fig.4 にモモの試験溶液について測定した酸化フェンブタスズのMSスペクトルを示す．酸化フェンブタスズは試験操作中にエチル化され，EIモードにおいてFig.5 に示すように開裂するものと考えられる．

3．残留農薬実態

8種59検体中，1種2検体（モモ全果）から酸化フェンブタスズを0.04及び0.06 ppm検出した（Table 2）．

酸化フェンブタスズは平成4年に残留基準値が設定されており，モモ（果肉）に対してはそれまで設定されていた登録保留基準値2.0ppm（果物全般）から7.0ppm（果物の中では最大値）へと基準値の見直しがされた．これは，残留基準値は個々の食品に個別に設定されるため，モモに対する酸化フェンブタスズの使用実態，残留実態及びモモの喫食量などを反映したものと推察される．全国的に調査したデータ[7-8]においても平成6年度にモモから酸化フェンブタスズが2.45ppm検出されてい

Table 2. Residues of Fenbutatin Oxides and Cyhexatin in Crops

sample	No.of sample	No.of positive	Residue(ppm)		
			Fenbutatin Oxide	Fenbutatin Oxide (di-form)	Cyhexatin
Vegetable					
Pimento [PIMAN]	8	0	—[1)]	—	—
Spinach [HORENSO]	10	0	—	—	—
Cabbege [KYABETSU]	1	0	—	—	—
Lettuce [RETASU]	16	0	—	—	—
Young leaves of chinese cabbege [KOMATSUNA]	9	0	—	—	—
Edibleflower					
Chrysanthemum [SHOKUYOGIKU]	5	0	—	—	—
Fruit					
Peach [MOMO] (whole)	5	2	0.04,0.06	—	—
(fresh)	5	0	—	—	—

1) not detected

る.

今回の残留量は果肉で設定されている基準値の1/100以下であり，平成6年度の検出データと比較しても非常に低い値であった．また，果肉からは検出されなかったため喫食上問題はない.

前述のデータ[7-8]によると，野菜・果実類50種中，酸化フェンブタスズが認められたものは，平成6年度はモモ，オレンジ，レモン，ナシ及びリンゴ(0.05～2.45ppm)，平成7年度はスモモ，リンゴ，パパイヤ及びマンゴ(0.08～0.11ppm)であり，果実から検出される傾向が高いことが示されている．酸化フェンブタスズは，安定性・残効性が高く散布後長時間残留する可能性があり，検出割合の高い農薬としてリストアップされている[7-8]．今後果実中の酸化フェンブタスズの残留に注意を払うなど，引き続き調査していく必要があると考える.

まとめ

1997年4月から1998年3月に都内の市場等で購入した野菜・果実等8種59検体について有機スズ系農薬の酸化フェンブタスズ及びその代謝物及びシヘキサチンの残留実態を調査した.

試料抽出液をEtMgBrによりエチル化後AEDを装着したGCを用いて同時定量を行い，GC－MSにより確認した.

その結果，酸化フェンブタスズがモモ2検体（全果）から0.04及び0.06ppm検出されたが果肉からは検出されず，通常の喫食上問題となる量ではなかった.

文　献

1）小林麻紀，永山敏廣，伊藤正子，他：東京衛研年報，**49**，88-94，1998.

2）香月繁孝，数賀山靖，後藤宗玄：農薬便覧，1995，**490**，農文協，東京.

3）平成4年厚生省告示第239号：平成4年10月27日官報号外第160号

4）農薬残留分析研究会編：最新　農薬の残留分析法，173，1995，中央法規出版，東京.

5）平成6年厚生省告示第199号：平成6年6月9日官報号外第106号

6）山本千佳代，中村宗和，木船信行，他：食衛誌，37，288-294，1996.

7）厚生省生活衛生局食品化学課編：食品中の残留農薬，30-184，1996，日本食品衛生協会，東京.

8）厚生省生活衛生局食品化学課編：食品中の残留農薬，39-211，1997，日本食品衛生協会，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 114-119, 1998

東京都におけるPCB汚染の実態について(第18報*)
魚介類中のPCB含有量

雨宮　敬**, 小野塚春吉**, 水石和子**,
藤井　孝**, 大西和夫**, 小久保彌太郎***

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo(XVIII)
Polychlorinated Biphenyls Concentrations of Fish and Shellfish

TAKASHI AMEMIYA**, HARUKICHI ONOZUKA**, KAZUKO MIZUISHI**
TAKASHI FUJII**, KAZUO ONISHI** and YATARO KOKUBO***

Keywords：ポリ塩化ビフェニール polychlorinated biphenyls，汚染 pollution，魚介類 fish and shellfish

緒　言

ポリ塩化ビフェニール(以下PCBと略す)は高い化学的安定性，絶縁性等を有し，1950年代後半から1960年代後半にかけて電気工業等様々な分野で使用されてきた．しかし，1966年(昭和41年)，Jensenら[1]による魚介類及び野生動物からの始めてのPCBの検出，報告を契機としてPCBによる環境汚染は地球的規模で進行していることが明らかとなった．

我が国では，1968年(昭和43年)にPCB汚染食用油に起因したカネミ油症事件が発生し，PCBによるヒトへの障害の重大性を知らされた．厚生省は食品衛生調査会答申に基づき1972年(昭和47年)にPCBの輸入，製造及び使用を禁止し，さらに食品中に残留するPCBの暫定規制値[2]を示した．すなわち，魚介類に関しては，遠洋沖合魚介類0.5ppm，近海内湾魚介類5.0ppmと定めた．この規制に基づき，東京都は都民の食生活の安全性を確保することを目的として，東京都中央卸売市場に入荷した魚介類を対象に汚染調査を1973年(昭和47年)より開始し，継続して調査している．これに加え近年は，市場入荷量が増加の一途を示している輸入魚介類についても同様に汚染調査を行っている．

また，東京湾汚染調査の一環として湾内で捕獲したスズキを指標生物としてPCB含有量調査を1984年(昭和59年)から継続して行っている．第17報では1984年(昭和59年)～1992年(平成4年)までの9年間の調査結果をまとめたが，その後のPCBの魚介類における汚染推移を観察するため今回は1989年(平成元年)から1997年(平成9年)までの9年間の市場入荷魚介類及び1993年(平成5年)から1997年(平成9年)までの5年間の東京湾産スズキのPCB汚染調査の結果を報告する．

実験方法

1）**試料**　1989年(平成元年)4月より1997年(平成9年)3月までの9年間に東京都中央卸売市場に入荷した魚介類(年間約200検体)を調査対象とした．東京湾産スズキは，1993年(平成5年)4月より1997年(平成9年)3月までの5年間に捕獲したもの145検体を調査対象とした．輸入魚介類は1989年(平成元年)4月より1997年(平成9年)3月までの9年間の都内で市販されたもの131検体を対象とした．

2）**試薬**　全て特級及び残留農薬分析用を使用した．

3）**操作方法**　試料の調製及び前処理は，厚生省環境衛生局PCB分析研究班“分析法に関する研究”[3]に準拠して行った．クリーンアップ操作はフロリジールカラムによるカラムクロマトグラフィーによった．

4）**定量**　PCBの同定及び定量は厚生省環境衛生局PCB分析研究班の統一分析法[3]に準じて，ECD付ガスクロマトグラフィーを用いて行った．測定条件は次のとおりである．

＊第17報　東京衛研年報，40，115－120，1989

＊＊東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
＊＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊＊東京都立衛生研究所微生物部

装置：島津ガスクロマトグラフGC－14Aにデータ処理装置として同社製クロマトパックC－R7A plus及び同社製自動注入装置AOC－1400を接続して用いた．カラム：1.5％Silicone OV－17＋1．95％Silicone QF－1(Uniport HP，100－120メッシュ)3 mmϕ×1500mm，ガラスカラム．カラム温度:200℃，注入口温度:250℃，検出器温度:280℃，検出器：^{63}Ni，キャリヤガス流量:$N_2$60ml／min，注入量：5μl

結果及び考察

表1～3に1989年(平成元年)4月より1997年(平成9年)3月までの3年間の各年度別の魚介類(輸入魚介類を含む)調査結果を示した．表 1～3に示すようにいずれの調査年度においても暫定規制値(遠洋沖合魚介類0.5ppm，近海内湾魚介類5.0ppm)を超えるものは認められなかった．以下，各年度及び魚種別にPCBの検出傾向について述べる．

表 1．魚介類中のPCB含有量（1989年～1991年）

試料	1989年			1990年			1991年		
	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n
アイナメ	0.01		1	0.01	ND－0.01	4	0.04	ND－0.16	6
アオダイ	ND		1		—			—	
アカガイ	ND		3	ND		2	ND		2
アサリ	ND		1		—			—	
アジ	0.01	ND－0.01	7	0.01	ND－0.03	5	0.07	ND－0.20	3
アナゴ		—		0.02		1	0.02		2
アマダイ	ND		1		—		0.01	ND－0.02	3
アユ	0.01		1	ND	ND－0.01	4	ND		2
イカ	ND		14	ND		7	ND		4
イサキ	0.01	ND－0.02	6	0.01	ND－0.02	4	ND		2
イシモチ	0.06	0.04－0.09	3	0.02		2	0.11		1
イボダイ		—			—		ND		1
イトヨリ		—			—		ND		2
イワシ	0.05	0.02－0.19	10	0.02	0.01－0.04	6	0.06	0.01－0.15	4
ウナギ	0.01	ND－0.02	9	0.02	0.01－0.03	6	0.03		1
カキ	0.02	ND－0.03	8	0.01	ND－0.02	4	0.01	0.01－0.02	4
カツオ	ND	ND－0.01	4	ND	ND－0.01	3	0.02	0.01－0.02	3
カマス	0.03	0.01－0.05	3	0.04	0.03－0.04	2	0.03	0.02－0.03	2
カレイ		—			—		ND		1
キンキ	0.01		2	0.03	0.01－0.04	2	0.02		1
ギンザケ	0.02	ND－0.03	2	ND		4	ND		1
ギンダラ	0.05		2		—		0.13	0.06－0.20	2
キンメダイ	0.07	0.01－0.17	9	0.04	0.01－0.05	3	0.12	0.02－0.23	4
コノシロ	0.02		1	0.09	0.01－0.16	2		—	
サンマ	0.01	ND－0.01	5	0.01	ND－0.04	6	ND		2
サケ	0.03	ND－0.06	3	0.02	ND－0.03	4	0.05		1
サバ	0.03	0.01－0.08	8	0.04	0.01－0.08	5	0.02		2
サヨリ		—			—			—	
サワラ	0.07	0.02－0.19	6	0.03	0.02－0.04	2	0.05	0.01－0.12	4
シイラ		—		0.02		2	ND		1
シマアジ	0.03	ND－0.05	2	0.05	0.02－0.07	5	0.04	ND－0.07	3
スケソウダラ	ND		5	ND		2		—	
スズキ	0.09	0.05－0.18	4	0.22	ND－0.82	7	0.16	0.01－0.82	11
タカベ	0.03		1		—			—	
タチウオ	0.11	0.05－0.18	2	0.12	0.03－0.20	2	0.23		1
トビウオ	ND		3	ND		4	ND		2
ニシン	0.03	0.02－0.03	2		—		0.04		1
ハマグリ	ND		2	ND		3	ND		4
ハマチ	0.09	0.05－0.13	5	0.05	0.01－0.09	7	0.07	0.05－0.11	5
ヒラメ		—		0.01	ND－0.02	9	0.01	ND－0.01	5
ブリ		—		0.03		2	0.18		1
ホウボウ	0.01		1		—			—	
ホタテガイ	ND		5	ND		5	ND		7
ホッケ	0.02	0.01－0.05	4		—			—	
ボラ	0.03	0.01－0.07	3	0.07		1	0.02		1
マコガレイ	0.01		1		—			—	
マス	ND		1	ND		1		—	
マダイ	0.02	ND－0.05	7	0.03	ND－0.06	7	0.02	ND－0.04	14
マダラ	ND		3		—			—	
ムツ		—		ND		1		—	
メヌケ	0.03		1		—			—	
メバル	0.01		1	0.01	ND－0.02	3	ND		2

n：試料数，ND：定量限界（0.01ppm）以下，単位：ppm

1989年度(平成元年)：最高値はイワシ，サワラの0.19ppmであった．スズキ(0.18ppm)，タチウオ(0.18ppm)，キンメダイ(0.17ppm)，ハマチ(0.13ppm)などが比較的高い値を示した．

1990年度(平成２年)：最高値はスズキの0.82ppm(体長65.0cm，体重1.75kg)であった．スズキ(0.24ppm)，タチウオ(0.20ppm)などが比較的高い値を示した．スズキは７検体調査を行ったが，東京湾内で漁獲されたもの５検体で0.10ppm～0.82ppmのPCBが検出された．２検体は湾外で漁獲され，それぞれ0.02ppm，NDであった．

1991年度(平成３年)：最高値は東京湾内で漁獲されたスズキの0.82ppm(体長66.0cm，体重2.10kg)であった．さらにスズキ(0.38ppm，0.21ppm，0.15ppm，0.12ppm)，キンメダイ(0.23ppm，0.21ppm)，タチウオ(0.23ppm)，ブリ(0.18ppm)，アイナメ(0.16ppm)，イワシ(0.15ppm)，ハマチ(0.11ppm)及びイシモチ(0.11ppm)などが比較的高い

表２．魚介類中のPCB含有量（1992年～1994年）

試料	1992年			1993年			1994年		
	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n
アイナメ	ND	ND－0.12	6	0.01		5	0.01	ND－0.01	9
アオダイ	ND		1		—		ND		2
アカガイ	ND		1	ND		1	ND		1
アサリ	ND		1	ND		1	ND		2
アジ	ND	ND－0.01	4	0.01	ND－0.02	5	ND	ND－0.01	8
アナゴ	0.14	0.02－0.26	2		—			—	
アマダイ	ND		2	ND		1	0.01	ND－0.01	2
アユ	ND		4		—			—	
イカ	ND		5	ND		9	ND		6
イサキ	0.01	ND－0.03	3	0.01	ND－0.01	3	ND	ND－0.01	5
イシモチ	0.04	ND－0.07	2	0.03	0.01－0.05	2	0.12	0.02－0.21	3
イトヨリ	0.02		1	0.01		2	ND		2
イボダイ		—		ND		1	0.01	0.01－0.02	2
イワシ	0.02		3	0.04	ND－0.15	6	0.06	0.01－0.17	6
ウナギ	0.01	ND－0.02	3	ND		1	0.01		1
カキ	0.01		6	0.01	ND－0.02	6	0.02		1
カツオ	ND		1	0.01		1	0.01		2
カマス	0.02	0.01－0.03	2		—		0.02	0.01－0.02	2
カレイ	ND		1		—		ND		3
キンキ	0.02	0.01－0.03	3	0.03	0.02－0.04	4	0.01		1
ギンザケ	0.01	ND－0.02	5	ND		2	ND		1
ギンダラ	0.11	0.07－0.14	2	0.11		1	0.09		1
キンメダイ	0.04	0.01－0.06	5	0.05	0.02－0.11	6	0.04	0.02－0.07	3
コノシロ		—			—			—	
サケ	ND		2		—		ND		1
サバ	0.11	0.06－0.16	2	0.02	0.01－0.02	4	0.02	0.01－0.04	7
サヨリ		—			—		0.03		1
サワラ	0.05		1		—		0.02		1
サンマ	0.01	ND－0.01	3	0.01	0.01－0.02	4	0.01		3
シイラ		—			—			—	
シマアジ	0.02		1	0.04	0.02－0.06	2	0.01		2
スケソウダラ		—		ND		1	ND		1
スズキ	0.05	0.01－0.12	8	0.09	0.02－0.18	4	0.10	0.01－0.57	9
タカベ	ND		1	ND	ND－0.01	3	ND		3
タチウオ	0.12		1		—		0.10		1
トビウオ	ND		1	ND		2	ND		3
ニシン	0.03	0.02－0.04	2	0.03		1		—	
ハマグリ	ND		4	ND		5	ND		4
ハマチ	0.07	0.06－0.07	3	0.05		1	0.03	ND－0.03	3
ヒラメ	0.01	ND－0.01	4	0.03	ND－0.14	6	ND		6
ブリ	0.08		1		—			—	
ホウボウ		—			—			—	
ホタテガイ	ND		3	ND		5	ND		6
ホッケ	0.01		1		—			—	
ボラ		—			—		0.04		1
マコガレイ	0.03		1	0.01		1	0.03		1
マス		—			—		ND		1
マダイ	0.01	ND－0.03	7	0.05	0.02－0.11	6	0.01	ND－0.02	9
マダラ	ND		1	ND	ND－0.01	6	ND		3
ムツ		—			—		0.02		1
メヌケ		—		0.05		1		—	
メバル	ND		1		—		ND		4

n：試料数，ND：定量限界（0.01ppm）以下，単位：ppm

値を示した．スズキ，アイナメ，イワシ及びイシモチはいずれも東京湾産のものであった．

1992年度(平成4年)：最高値は東京湾内漁獲のアナゴの0.26ppmであった．サバ(0.16ppm)，ギンダラ(0.14ppm)，アイナメ(0.12ppm)，スズキ(0.12ppm)，タチウオ(0.12ppm)が比較的高い値を示した．これらのうちサバ，ギンダラを除く魚種は東京湾産のものであった．

1993年度(平成5年)：最高値は東京湾内漁獲のスズキの0.18ppmであった．スズキ(0.11 ppm)，イワシ(0.15ppm)，キンメダイ(0.11 ppm)，ギンダラ(0.11ppm)などが比較的高い値を示した．

平成6年(1994)：最高値は東京湾産のスズキの0.57 ppm(体長67.0cm，体重2.00kg)であった．スズキ(0.19ppm)，イシモチ(0.21ppm)，イワシ(0.17ppm，0.14ppm)，キンメダイ(0.11ppm)，タチウオ(0.10ppm)が比較的高い値を示した．

表 3．魚介類中のPCB含有量（1995年～1997年）

試料	1995年			1996年			1997年		
	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n	平均値	範囲	n
アイナメ	0.01	ND−0.04	7	0.01	ND−0.03	7	0.02	ND−0.08	9
アオダイ		—			—		ND		1
アカガイ	ND		2	ND		1		—	
アサリ	ND		5	ND		2	ND		3
アジ	0.01	0.01−0.02	4	0.01	ND−0.02	8	0.02	ND−0.08	6
アマダイ	ND		1	0.01	ND−0.02	2	ND		2
アナゴ	0.01		1		—		0.01		2
アユ		—		ND		1	ND		1
イカ	ND		10	ND		6	ND		9
イサキ	0.01	ND−0.01	4	ND		2	0.01	ND−0.01	2
イシモチ	0.01		2	0.03	0.01−0.07	3		—	
イトヨリ	ND	ND−0.01	4	ND		5		—	
イボダイ	0.01	0.01−0.02	2	0.01	ND−0.02	2		—	
イワシ	0.05	0.01−0.11	7	0.04	0.01−0.11	7	0.03	ND−0.07	5
ウナギ		−		0.03		1	ND		1
カキ	0.01	ND−0.02	4	0.01	0.01−0.02	4	0.02	0.01−0.02	3
カツオ	0.02		1	0.01		1	ND		2
カマス		—			—			—	
カレイ	ND		3	ND		2	ND		1
キンキ	0.01		1	0.04	0.02−0.06	2	0.02		1
ギンザケ	0.01		1		—		ND		2
ギンダラ		—		0.03		1	0.08		1
キンメダイ	0.04	0.02−0.05	2	0.08	0.02−0.16	4	0.01	ND−0.01	3
コノシロ	0.03	0.01−0.06	3	0.01		1	0.03	0.01−0.07	3
サケ		—		0.04		1	0.05	0.02−0.08	6
サバ	0.02	ND−0.03	4	0.02	ND−0.05	5	0.02		1
サヨリ		—		0.04		1	ND		3
サワラ	0.04	0.01−0.08	4	0.02	0.01−0.03	2		—	
サンマ	ND		1	0.02		1	0.03	0.02−0.04	2
シイラ		—		ND		1	0.03	0.01−0.09	6
シマアジ	0.02	0.02−0.03	4	0.03	0.02−0.03	2	ND		1
スケソウダラ	ND		2	ND		1		—	
スズキ	0.07	ND−0.18	10	0.09	0.01−0.43	10		—	
タカベ	ND		2	0.01		2		—	
タチウオ	0.07	0.02−0.11	2	0.10		1	0.11	ND−0.40	13
トビウオ	0.01	ND−0.01	2	ND		1	ND		1
ニシン	0.06		1	0.05	0.04−0.05	2	0.01		1
ハマグリ	ND		3	ND		1	ND		1
ハマチ	0.04	0.02−0.05	3	0.04	0.03−0.07	3	0.05	0.03−0.10	6
ヒラメ		—		0.01	ND−0.02	3	0.01	ND−0.02	4
ブリ	0.03		1	0.02	ND−0.04	2	0.19		1
ホウボウ	0.01	ND−0.01	2		—		ND		1
ホタテガイ	ND		4	ND		5	ND		7
ホッケ		—			—			—	
ボラ		—		0.02		1		—	
マコガレイ		—		0.02	0.01−0.02	2	0.01	1	
マス		—		ND		1		—	
マダイ	0.01	ND−0.02	7	0.02	ND−0.04	7	0.06	ND−0.25	5
マダラ	ND		1	ND		1		—	
ムツ	ND	ND−0.01	1	0.01		1		—	
メヌケ	0.14		1		—			—	
メバル	ND		1	ND		5	0.01	ND−0.01	2

n：試料数，ND：定量限界（0.01ppm）以下，単位：ppm

平成7年(1995)：最高値は東京湾産のスズキの0.18ppmであった．スズキ(0.14ppm，0.12ppm)，イワシ(0.11ppm，0.10ppm)，メヌケ(0.14ppm)，タチウオ(0.11ppm)が比較的高い値を示した．

平成8年(1996)：最高値は東京湾産のスズキの0.43ppm(体長57.0cm，体重1.50kg)であった．スズキ(0.18ppm，0.11ppm)，キンメダイ(0.16ppm)，イワシ(0.11ppm)，タチウオ(0.10ppm)が比較的高い値を示した．

1997年度(平成9年)：最高値は東京湾産のスズキの0.40ppm(体長59.0cm，体重2.50kg)であった．スズキ(0.33ppm，0.25ppm，0.13ppm)，マダイ(0.25ppm)，ブリ(0.19ppm)，ハマチ(0.10ppm)が比較的高い値を示した．マダイ及びハマチは養殖魚であり，飼料由来のPCBとも考えられる．

輸入魚介類：イトヨリ(イトヨリダイ)，ギンダラ，ギンザケ，キンメダイ，サワラ，サバ，ヒラメ,シマアジ，サケ，マダイ及びサバについて調査を行った．1991年度(平成3年)輸入のギンダラ(0.20ppm)，サワラ(0.12ppm)が比較的高値を示した．その他の輸入魚介類はいずれも0.10ppm以下と低い値であった．

東京湾汚染調査：東京湾汚染調査の一環として東京湾内で捕獲されたスズキについて，PCBの分析を1984年(昭和59年)から継続して行ってきている．1984年度(昭和59年)より1992年度(平成4年)まで9年間の調査結果はすでに報告した[4]．今回はその後の調査結果を報告する．結果を表4に示す．以下，各年度におけるPCBの検出傾向について述べる．

1993年度(平成5年，28検体)：最高値は0.46ppm(体長57.0cm，体重2.30kg)であり，全検体の平均値は0.17ppm(体長48.5cm，体重 1.60 kg)であった．さらに比較的高い値を示したものは0.31ppm，0.28ppm，0.25ppm，0.23ppm，0.22ppmであった．また0.10ppm以下の低い値のものは5検体であった．

1994年(平成6年，30検体)：最高値は0.61ppm(体長46.0cm，体重1.10 kg)であり，全検体の平均値は0.21ppm(体長44.5cm，体重 1.20 kg)であった．さらに比較的高い値を示したものは0.54ppm，0.50ppm，0.45ppm，0.40ppm，0.35ppmであった．また0.10ppm以下の低い値のものは7検体であった．

1995年(平成7年，22検体)：最高値は1.03ppm(体長42.0cm，体重0.94 kg)であり，全検体の平均値は0.22ppm(体長44.0cm，体重 1.14 kg)であった．さらに比較的高い値を示したものは0.45ppm，0.45ppm，0.29ppm，0.28ppm，0.28ppmであった．また0.10ppm以下の低い値のものは7検体であった．

1996年(平成8年，31検体)：最高値は0.39ppm(体長63cm，体重3.88 kg)であり，全検体の平均値は0.18ppm(体長46.0cm，体重 1.38 kg)であった．さらに比較的高い値を示したものは0.37ppm，0.31ppm，0.29ppm，0.29ppm，0.29ppmであった．また0.10ppm以下の低い値のものは4検体であった．

1997年(平成9年，34検体)：最高値は0.41ppm(体長55cm，体重2.30 kg)であり，全検体の平均値は0.16ppm(体長51.5cm，体重 1.19 kg)であった．さらに比較的高い値を示したものは0.40ppm，0.38ppm，0.30ppm，0.28ppm，0.26ppmであった．また0.10ppm以下の低い値のものは15検体であった．

以上，スズキのPCBの検出傾向は1995(平成7年)年に1ppmを超えた検体がみられたが，各年度において多少の増減はあるが，0.20ppm前後で推移しており，経年推移は横バイ傾向を示しているといえる．

最近PCBは，社会問題化している内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)としても新たな関心を呼んでいる．近年増加している輸入魚介類も各国からの種々の魚種が市場に出回り，調査の対象となっている．環境及び食品の安全性確保のためPCBによる魚介類の汚染調査は今後も継続していく必要があると考える．

ま と め

1989年度(平成元年)から1997年度(平成9年)までの9年間に東京都中央卸売市場に入荷された魚介類(輸入魚介類を含む)中のPCB含有量調査を行った．更に東京湾汚染調査の一環として東京湾内において捕獲されたスズキ

表 4．東京湾産スズキ中のPCB含有量

年 度	試料数	PCB (ppm)		体長 (cm)		体重 (kg)	
		範 囲	平均値	範 囲	平均値	範 囲	平均値
1993	28	0.05−0.46	0.17	42.0−65.0	48.5	0.94−3.12	1.60
1994	30	0.05−0.61	0.21	36.0−60.5	44.5	0.80−2.30	1.20
1995	22	0.05−1.03	0.22	38.0−52.0	44.0	0.74−1.88	1.14
1996	31	0.08−0.39	0.18	40.0−71.0	46.0	0.91−3.88	1.38
1997	34	0.03−0.41	0.16	38.0−57.5	51.5	0.90−2.30	1.19

について，1993年度(平成５年)から1997年度(平成９年)までの5年間のPCB含有量調査を行った．

(1) スズキ，イワシ，アイナメ，アナゴ，イシモチなど0.10ppm以上の比較的高い値を示すものは東京湾内あるいは他の内湾で漁獲された魚種であった．外湾産の魚種は殆どがND～0.10ppmの範囲であった．

(2) 市場入荷量が増加している輸入魚介類のうち平成３年度輸入のギンダラ及びサワラ，サバの一部から0.10ppm以上を検出した．その他の輸入魚介類としてギンザケ，マダイ，ヒラメ，ハマグリ，イカなどを調査したが，いずれもND～0.10ppmであった．

(3) 東京湾汚染調査の一環として東京湾内で捕獲されたスズキを調査した．各年度の平均濃度は0.20ppm前後で推移しており，PCB汚染は横バイ傾向を示していた．

謝辞　本調査において，検体の購入及び採取に際し，終始ご尽力くださった衛生局獣医衛生課の方々に深謝致します．

文　献

1）Jensen, S., New Scientist, **32**, 612, 1966.

2）昭和47年８月24日付環食第442号厚生省環境衛生局長通知「食品中に残留するPCBの規制について」

3）厚生省環境衛生局PCB分析研究班：分析方法に関する研究　昭和47年１月

4）植田忠彦，佐藤憲一，中村　弘：東京衛研年報，**44**, 115－118, 1993.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 120-128, 1998

市販食品における天然色素の使用実態調査（第2報*）

荻原　勉**, 天川映子**, 鎌田国広**,
斎藤和夫***, 鈴木助治**

Survey of Natural Dyes in Commercial Foods (II*)

TSUTOMU OGIWARA**, EIKO AMAKAWA**, KUNIHIRO KAMATA**, KAZUO SAITO*** and SUKEJI SUZUKI**

Keywords：天然色素 natural dye，市販食品 commercial foods

緒　言

天然色素は，消費者の自然指向を背景に多くの市販食品に使用されている．著者らはすでに昭和60年に国内産の食品[1]，さらに，平成4年に輸入食品[2]について天然色素の使用実態調査を行い，市販食品における天然色素の使用状況を明らかにした．

しかし，近年の食品加工技術の進歩には著しいものがあり，また，平成3年には合成タール色素と同様に天然色素の全面表示の義務化及び平成7年には天然色素についても指定制が導入された．このように法的規制が強化されたことから天然色素の使用状況に大きな変化が出てきていることが予想される．

そこで，最近における天然色素の使用実態を把握することを目的に，国内産の市販食品を対象として天然色素の使用実態について調査を行ったので，その結果を報告する．

実験方法

1．試料

試料は，平成7年1月から平成10年4月の約3年間に都内で市販されていた加工食品で，外観上何らかの色が認められ，主として天然着色料の使用された旨の表示のあるもの計251種を用いた．

なお，試料は次に示した6群に大別して実験に供した．

1）菓子	102試料
2）清涼飲料水	19試料
3）食肉及び魚介加工品	51試料
4）乳製品及び乳加工品	24試料
5）穀類・豆類・野菜及び果実加工品	51試料
6）調味料	4試料

2．試薬及び試液

1）薄層クロマトグラフィー（TLC）用プレート：①高性能薄層（HPTLC）プレートのキゼルゲルシリカゲル60（10×10cm），MERCK社製，②微結晶セルロース「アビセルSF]プレート（5×20cm），フナコシ薬品（株）製．

2）展開溶媒：①n-ブタノール・エタノール・1％アンモニア（6：2：3），②アセトン・イソアミルアルコール・水（6：5：5），③酢酸・塩酸・水（15：3：82），④アセトン・0.5N塩酸(1：3)．

3）セップパックC_{18}及びQMA：ウオーターズ社製

4）吸着剤：カラムクロマトグラフィー用ポリアミドC-200，和光純薬工業（株）製．

5）色素標準品

①水溶性天然色素：コチニール色素，ラック色素（ラッカイン酸），ビートレッド（ベタニン）は東京田辺製薬（株）製，ベニコウジ黄色素はヤエガキ醗酵（株）製，ベニコウジ色素（モナスカス色素），クチナシ黄色素（クロシン），ベニバナ黄色素（サフラワーエロー），リボフラビン，クチナシ青色素（クロシンブルー）は和光純薬工業（株）製を用いた．

なお，アントシアニン色素は原料となる植物によって

＊第1報　東京衛研年報，**36**，245-250，1985

＊＊東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科　190-0023　東京都立川市柴崎町3－16－25

＊＊Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

＊＊＊東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

TLCのクロマトグラムのパターンが異なるため，生産量の多い[3]ベリー色素（東京田辺製薬（株）製），赤キャベツ色素，ムラサキトウモロコシ色素及びブドウ果皮色素（三栄化学工業（株）製）の4種を標準品として用いた．また，リボフラビンは，わが国では化学的合成品と見なされているが，欧米諸国では天然着色料として使用されることが多いので，本調査においても対象の1つとした．

②油溶性天然色素：アナトー色素（ノルビキシン，ビキシン），パプリカ色素は東京化成工業（株）製，ウコン色素（クルクミン），β-カロテンは和光純薬工業（株）製を用いた．

③タール色素：食用赤色3号，食用赤色102号，食用赤色104号，食用黄色4号，食用黄色5号は高岡化学工業（株）製，食用青色1号は第一化成工業（株）製を用いた．

その他の試薬は，すべて特級品を使用した．

3．装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ（HPLC）は，日本分光工業（株）製880シリーズ，カラムは，SUPELCOSIL LC-ABZ(SUPELCO社製，粒径5μm，4.6mmi.d.×150mm)，CHEMCOSORB 5-ODS-UH（ケムコ社製，粒径5μm，4.6mm i.d.×125mm)，Inertsil ODS 2(ジーエルサイエンス社製，粒径5μm，4.6mmi.d.×150mm)，Lichrosorb Si60（MERCK社製，粒径5μm，4.6mmi.d.×250mm)，Zorbax ODS（Du Pon社製，粒径5μm，4.6mmi.d.×250mm)を用いた．

1）HPLC測定条件Ⅰ　カラム：SUPELCOSIL LC-ABZ，移動相：メタノール・0.02 N酢酸（3：2)，流速：0.7ml/min，測定波長：490nm

2）HPLC測定条件Ⅱ　カラム：CHEMCOSORB 5-ODS-UH，移動相：メタノール・10%酢酸（1：2)，流速：0.7ml/min，測定波長：405 nm

3）HPLC測定条件Ⅲ　カラム：CHEMCOSORB 5-ODS-UH，移動相：アセトニトリル・0.05Mリン酸二水素アンモニウム（pH2.75)（8:92)，流速：0.4ml/min，測定波長：540nm

4）HPLC測定条件Ⅳ　カラム：CHEMCOSORB 5-ODS-UH，移動相：メタノール・0.02 M酢酸アンモニウム溶液（6：4)，流速：0.7ml/min，測定波長：450nm

5）HPLC測定条件Ⅴ　カラム：Inertsil ODS 2，移動相：メタノール・0.02 M酢酸アンモニウム溶液（1：1)，流速：0.7ml/min，測定波長：430nm

6）HPLC測定条件Ⅵ　カラム：CHEMCOSORB 5-ODS-UH，移動相：メタノール・水・酢酸（100：10：0.5)，流速：0.8ml/min，測定波長：450nm

7）HPLC測定条件Ⅶ　カラム；Lichrosorb Si60，移動相；ヘキサン，流速：0.8ml/min，測定波長：450nm

8)HPLC測定条件Ⅷ　カラム：Zorbax ODS，移動相：ジクロロメタン・メタノール（8：2)，流速：0.3 ml/min，測定波長：450nm

4．分析方法

試料の調製は荻原ら[4-6]に準じた．すなわち，着色の程度により試料5～25gを秤取し，液体試料はそのまま，固体試料は細切し水または水・エタノール（1：1）混液50mlを加えてホモジナイズした後，1N酢酸及び0.5Nアンモニア水を用いてpH 6～7に調整した．次に，エーテル50mlを加えて振とう抽出を行った後，有機層及び水層をそれぞれ分取した．有機層は減圧濃縮後，残留物を移動相に溶解し試料溶液とした．水層はポリアミド末を用いて精製し試料溶液を調製した．なお，ポリアミド末で精製が困難な場合はセップパックC_{18}[7]あるいはセップパックQMA[8]を用いて精製を行った．有機層については，アナトー色素及びウコン色素はHPLC測定条件Ⅵ，β-カロテンはHPLC測定条件Ⅶ，パプリカ色素はHPLC測定条件Ⅷで分析した[5]．水層については，アントシアニン色素及びクチナシ青色素はセルロースプレートで展開溶媒②，③を用い，コチニール色素及びラック色素は展開溶媒③，④を用いてTLC[4]で分析した．ビートレッド及びリボフラビンはセルロースプレートで展開溶媒②，③を用いたTLC[4]とビートレッドにはHPLC測定条件Ⅲ[9]，リボフラビンはHPLC測定条件Ⅴ[10]を併用して分析した．また，ベニコウジ色素，クチナシ黄色素，ベニバナ黄色素及びベニコウジ黄色素はシリカゲルプレートで展開溶媒①を，セルロースプレートで展開溶媒②を用いたTLC[4,6]とベニコウジ色素はHPLC測定条件Ⅰ[11]，クチナシ黄色素はHPLC測定条件Ⅴ[10]，ベニバナ黄色はHPLC測定条件Ⅱ[12]，ベニコウジ黄色素はHPLC測定条件Ⅳ[10]を併用して分析した．

結果及び考察

1．菓子

菓子85試料についての調査結果を表1に示した．

1）あめ

赤，赤紫，赤橙，桃色の赤色系のあめ12試料を調査したところ，11試料からアントシアニン色素が検出された．このうち，1試料はアナトー色素と併用されていた．また，のどあめ1試料から前回の調査では使用がみられなかったベニコウジ色素が検出された．赤色系のあめでは，

前報[1]の結果と同様にアントシアニン色素の検出率が高かった．

橙色のあめ7試料中3試料からパプリカ色素が，2試料からアナトー色素が検出された．このうち，パプリカ色素が検出された1試料には，ベニコウジ色素が併用されていた．他に，ラック色素及びクチナシ黄色素の使用が1試料づつあった．クチナシ黄色素は，pHによる色調の変化も少ないので単独で使用しても橙色にはならない．そこで，あめ中のオレンジ果汁などの成分と混合することで橙色になるものと考える．今回の調査では，パプリカ色素及びアナトー色素と油溶性色素の検出率が，7試料中5試料と高く，コチニール色素及びラック色素と水溶性色素が多用されていた前報[1]とは検出色素に大きな相違が認められた．これは食品加工技術の進歩によって，種々の乳化剤等の添加剤が開発されたことにより，今までは水溶性色素が使われたジャンルの食品にも，油

表1．菓子からの天然色素調査結果

試料名	試料の色調	試料数	検出色素(検出試料数)
あめ	赤	7	アントシアニン色素(5)，アントシアニン色素＋アナトー色素(1)，ベニコウジ色素(1)
	赤紫	3	アントシアニン色素(3)
	赤橙	1	アントシアニン色素(1)
	桃	1	アントシアニン色素(1)
	橙	7	パプリカ色素(2)，ラック色素(1)，アナトー色素(2)，クチナシ黄色素(1) ベニコウジ色素＋パプリカ色素(1)
	黄	6	クチナシ黄色素(4)，ベニコウジ黄色素＋β－カロテン(1)，ウコン色素(1)
	緑	14	ベニコウジ黄色素＋クチナシ青色素(4)， ウコン色素＋クチナシ青色素(3)， クチナシ青色素(3)，ベニバナ黄色素＋クチナシ青色素(2)， ベニコウジ黄色素(1) ウコン色素(1)
	青	1	クチナシ青色素(1)
ゼリー及びゼリービーンズ	赤	2	ラック色素(2)
	赤橙	1	ラック色素(1)
	橙	4	ラック色素＋ベニバナ黄色素(1)，アナトー色素(1)，パプリカ色素(1)，β－カロテン(1)
	黄	2	ベニバナ黄色素(2)
	緑	2	クチナシ青色素(2)
	紫	2	アントシアニン色素(2)
氷菓子	赤	5	アントシアニン色素(3)，アントシアニン色素＋ベニコウジ色素(1) アントシアニン色素＋パプリカ色素(1)
	黄	2	クチナシ黄色素(1)，クチナシ黄色素＋ベニバナ黄色素(1)
	緑	1	ベニバナ黄色素((1)
チョコレート菓子	桃	4	ビートレッド(4)
	黄	1	クチナシ黄色素(1)
スナック菓子	赤	1	ベニコウジ色素(1)
	桃	3	ビートレッド(2)，ラック色素(1)
揚げ菓子	赤	1	ベニコウジ色素＋アナトー色素(1)
	黄	1	クチナシ黄色素(1)
その他			
砂糖菓子及び菓子材料	赤	2	コチニール色素(1)，ラック色素(1)
	黄	2	クチナシ黄色素(2)
ラムネ菓子	赤	1	アントシアニン色素(1)
	橙	1	β－カロテン(1)
	黄	1	クチナシ黄色素(1)
コーンカップ	橙	2	アナトー色素(2)
ミルフィーユ	桃	1	アントシアニン色素＋ベニコウジ色素(1)
ガム	黄	1	クチナシ黄色素(1)
桜餅の皮	赤	1	コチニール色素(1)
オレンジソース	黄	1	β－カロテン(1)
計		85	102

溶性色素の使用が可能になったことによると考えられる．

黄色のあめ6試料中4試料からクチナシ黄色素が検出された．他にベニコウジ黄色素とβ-カロテンの併用及びウコン色素が検出された．クチナシ黄色素が最も多く検出されたのは，前報[1]の国内産のあめの調査結果と同様の傾向であった．なお，今回の調査で検出されたベニコウジ黄色素は，新しく開発された色素で，やや蛍光を帯びた鮮明な黄色を呈する．しかし．光に対して非常に不安定[13]であり，単独で使用することが難しい．そのため，β-カロテンと併用し，さらに，ビタミンCなどの抗酸化作用のあるものを添加して使用されたと推定される．

緑色及び青色のあめ計15試料中13試料から，クチナシ青色素が検出され，そのうちの4試料には単独で用いられていた．他の9試料では，ベニコウジ黄色素，ウコン色素及びベニバナ黄色素とそれぞれ併用されていた．また，ベニコウジ黄色素とウコン色素の単独使用が各1試料に見られた．クチナシ青色素は熱及び光にはほぼ安定であるが，pHの低い酸性領域では色素が不溶化し易い．そのため，使用出来る食品が限られおり，前報[1]及び輸入食品[2]での調査では使用例が極めて少なかったが，本調査では使用例が多くみられた．これも，この数年間における食品加工の技術革新の成果によると考えられる．

2）ゼリー及びゼリービーンズ

ゼリー及びゼリービーンズ13試料中，赤，赤橙及び橙色の4試料からラック色素が検出され，そのうち橙色の1試料ではベニバナ黄色素と併用されていた．残る9試料中黄色の2試料からベニバナ黄色素，緑色の2試料からクチナシ青色素及び紫色の2試料からアントシアニン色素がそれぞれ検出された．さらに，アナトー色素，パプリカ色素及びβ-カロテンなどの油溶性色素の使用が橙色の各1試料に認められた．なお，前報[1]の調査で多用されていたコチニール色素は，今回の調査では検出されなかった．

3）氷菓子

氷菓子8試料中赤色の5試料からアントシアニン色素が検出された．このうち2試料ではベニコウジ色素及びパプリカ色素がそれぞれ併用されていた．黄色と緑色の各2試料ではクチナシ黄色素及びベニバナ黄色素の使用が見られた．アントシアニン色素は酸性で鮮明な赤色を呈するが，蛋白質を多く含む食品では紫～灰色[14]に変色する．したがって，蛋白質をほとんど含まない氷菓子に用いられたものとおもわれる．

4）チョコレート菓子

チョコレート菓子（ミルクチョコレート）5試料中4試料からビートレッドが検出された．これらはいずれも桃色のクリーム部分に使用されていた．残り1試料の黄色に着色されたクリーム部分からクチナシ黄色素が検出された．ビートレッドは，桃色の色素であるが，前述のアントシアニン色素のように蛋白質と結合して変色[14]することがないので，ミルク蛋白を含むチョコレートに使用されたものと考えられる．

5）スナック菓子

スナック菓子4試料のうち，赤色の1試料からベニコウジ色素が検出された．桃色の2試料からビートレッドが，また，1試料からラック色素が検出された．いずれの試料も菓子原料に練乳などのミルクが使用されたものであるため，蛋白質によって変色しないベニコウジ色素やビートレッドを用いたものであろう．しかし，ラック色素は蛋白質があると灰紫色になるので，これを防ぐために明ばんなどの安定剤[14]を利用して桃色の色調を出しているものと考えられる．

6）揚げ菓子

揚げ菓子の2試料では，赤色の1試料にベニコウジ色素とアナトー色素の併用，黄色の1試料にはクチナシ黄色素の単独使用が認められた．前報[1]及び輸入食品[2]では，全試料に油溶性色素のパプリカ色素やウコン色素などが用いられていたが，本調査では，水溶性色素のベニコウジ色素及びクチナシ黄色素が使われており，使用状況に従来のものと大きな違いが見られた．なお，黄色の揚げ菓子からは，クチナシ黄色素の一成分であるクロセチンがクチナシ黄色素と共に検出された．これは，添加されたクチナシ黄色素の主成分であるクロシンが，菓子の加熱加工時に分解[15]して生成されたものと推定される．

7）その他の菓子

砂糖菓子及び菓子材料については，赤色の2試料からコチニール色素及びラック色素がそれぞれ1試料づつ検出された．黄色の試料にはクチナシ黄色素の使用が認められた．これらは，いずれもデコレーションケーキなどの上に置かれる飾りものに用いられていた．

桃色のミルフィーユ（冷凍のケーキ）のクリーム部分からアントシアニン色素及びベニコウジ色素が検出された．アントシアニン色素はクリーム中の蛋白質と結合して灰紫色[18]に変色するため，鮮明な赤橙色のベニコウジ色素を併用して桃色を呈するようにしたものと考えられる．

2．清涼飲料水

最近，市場に多く出回っているいわゆる健康飲料を中心とした清涼飲料水14試料の調査結果を表2に示した．

イチゴ飲料5試料中4試料からコチニール色素が検出された．そのうちの2試料はアントシアニン色素と併用されていた．コチニール色素は酸性で橙色を呈する．そこで，イチゴ飲料のような酸性飲料水でも安定した赤色の色調を得るためには，明ばんなどの深色効果をもつ添加剤[14]が使われているものと思われる．

オレンジ飲料3試料中2試料からコチニール色素が検出された．そのうち1試料にはクチナシ黄色素との併用が見られた．また，残りの1試料にはβ-カロテンとパプリカ色素が併用されていた．

バナナ飲料3試料中2試料からベニバナ黄色素，1試料からクチナシ黄色素がそれぞれ検出された．これらは，前報[1]とほぼ同様の傾向であった．

赤紫色のザクロ飲料からアントシアニン色素が検出された．アントシアニン色素には赤キャベツ色素，ブドウ果皮色素など十数種類あるが，紫色の濃いベリー色素で着色したものと推定される．

3．食肉及び魚介加工品

食肉及び魚介加工品の調査結果を表3に示した．

食肉及び魚介加工品の着色では，天然色素のみの使用によって十分濃い色調を得ることが難しい場合，合成着色料が補助的に使われることがある．そのため，合成着色料使用の表示のあるものについても調査対象とした．

食肉及び魚介加工品51試料中37試料に，限定された種類の天然色素が使用されていた．主として，17試料にアナトー色素，13試料にコチニール色素，5試料にベニコウジ色素が単独あるいは混合して使われていた．また，

表2． 清涼飲料水からの天然色素調査結果

試料名	試料の色調	試料数	検出色素（検出試料数）
イチゴ飲料	赤	5	コチニール色素(2)，アントシアニン色素＋コチニール色素(2) アントシアニン色素(1)
オレンジ飲料	橙	3	コチニール色素(1)，コチニール色素＋クチナシ黄色素(1) β-カロテン＋パプリカ色素(1)
バナナ飲料	黄	3	ベニバナ黄色素(2)，クチナシ黄色素(1)
コーヒー飲料	茶	1	ベニバナ黄色素(1)
ザクロ飲料	赤紫	1	アントシアニン色素(1)
ブドウ飲料	赤橙	1	アントシアニン色素＋コチニール色素(1)
計		14	19

表3．食肉及び魚介加工品からの天然色素調査結果

試料名	試料の色調	試料数	検出色素（検出試料数）
ハム・ソーセージ等	赤	10	コチニール色素（10）
食肉魚ねり製品	橙	3	アナトー色素＋R３＋R102（２），アナトー色素（１）
カニ風かまぼこ	赤	3	コチニール色素（１），ベニコウジ色素（１） ベニコウジ色素＋アナトー色素（１）
伊達巻	黄	2	β-カロテン（１），クチナシ黄色素＋アナトー色素（１）
魚の西京漬	黄	3	ウコン色素＋Ｙ４（１），クチナシ黄色素（１） リボフラビン（１）
魚卵の醤油漬	橙	2	コチニール色素（１），パプリカ色素（１）
魚の蒲焼き	橙	2	アナトー（２）
でんぶ	赤	1	コチニール色素（１）
味付けタコ	橙	4	ベニコウジ色素＋アナトー色素（２），アナトー色素（１） アナトー色素＋パプリカ色素＋R104（１）
フライの衣	橙	3	アナトー色素（２），パプリカ色素（１）
中華クラゲ	橙	1	アナトー色素（１）
イカの塩辛	赤橙	1	ベニコウジ色素＋アナトー色素＋パプリカ色素（１）
豚肉のみそ漬	橙	2	アナトー色素（２）
計		37	44

Ｒ３：食用赤色３号，Ｒ102：食用赤色102号，Ｒ104：食用赤色104号，Ｙ４：食用黄色４号

この食品群の特徴は，以下で述べるように他の食品群と比べて，合成着色料との併用が4試料と多く見られたことである．

ハム・ソーセージ13試料中赤色の10試料からコチニール色素，橙色の3試料からアナトー色素が検出され,このうちウインナーソーセージの２試料で，合成着色料の併用が見られた．コチニール色素は，熱や光に対し酸性では非常に安定である[19]．そのため，ハムなどのように流通期間の比較的長い食品に適した色素といえる．また，アナトー色素は橙色で蛋白質に対して染着力が強いので，ウインナーソーセージなどの表面を着色するために用いられることが多い．

カニ風かまぼこ３試料中，２試料からベニコウジ色素が検出された．このうち１試料にはアナトー色素が併用されていた．残り１試料からはコチニール色素が検出された．この結果は，昭和58年に行われた平田[6]らの報告とほぼ一致していた．

伊達巻２試料中１試料からβ-カロテンを検出，残り1試料ではクチナシ黄色素とアナトー色素の併用が見られた．β-カロテンは，着色料として用いられたものか原料の卵に由来するものかは明らかでない．クチナシ黄色素とアナトー色素は，共に蛋白質への染着力が強く蛋白質と結合しても色調が変わらないため，伊達巻に適している色素と言えよう．

魚の西京漬3試料からウコン色素，クチナシ黄色素及びリボフラビンがそれぞれ検出され，このうちウコン色素には合成着色料が併用されていた．リボフラビンは，鮮やかな黄色を呈し熱にも比較的安定であり，着色料の他に栄養強化剤としても用いられている．

魚卵の醤油漬２試料には，コチニール色素及びパプリカ色素が単独で使用されていた．コチニール色素が検出された試料は模造イクラであった．

味付けタコ４試料すべてから，アナトー色素が検出された．そのうち２試料にベニコウジ色素，１試料にパプリカ色素と合成着色料が併用されていた．わが国で消費されるタコの大半は，輸入されたものであり，国内産のタコに比べて色調がまだらで一定しないものが多いと言われる[16]．そこで，蛋白質への染着性に優れたアナトー色素及びベニコウジ色素が使われたものと推定される．

半調理品のフライの衣３試料には，アナトー色素及びパプリカ色素が単独で使用されていた．これらの色素はいずれも熱に強く[14]蛋白質とよく結合する．したがって衣中の蛋白質に染着し，揚げ上がりを橙黄色にするため用いられたものであろう．

イカの塩辛1試料にはベニコウジ色素，アナトー色素及びパプリカ色素と３種が併用されていた．

4．乳製品及び乳加工品

乳製品及び乳加工品18試料の調査結果を表４に示した．

アイスクリーム及びラクトアイス15試料中，赤色のものにベニコウジ色素，橙，黄及び緑色ではクチナシ黄色素，黄及び緑色ではβ-カロテンが試料に単独あるいは併用されて使われていた．他に桃色の試料にビートレッド，橙及び黄色の２試料にはアナトー色素とクチナシ黄色素が併用されていた．赤色及び桃色の試料から検出されたベニコウジ色素とビートレッド[14]は，pHによる色調の変化がなく，蛋白質と結合しても変色しない.しかし,光には弱いため，アイスクリームのように包装により光を遮断され，低温で流通される食品には適した色素であろう．

アイスモナカの皮には，表１に示したコーンカップと同じアナトー色素が使われていた．

5．穀類・豆類・野菜及び果実加工品

穀類・豆類・野菜及び果実加工品37試料の調査結果を表５に示した．

高菜醤油漬６試料すべてからウコン色素が検出された．そのうちの２試料には，クチナシ黄色素とパプリカ色素が，また，３試料には合成着色料が併用されていた．このように今回は，前報[1]の調査では見られなかった3種の色素を混合して用いる例が，高菜醤油漬においても見られた．

タクアン漬６試料では，４試料からクチナシ黄色素が検出された．そのうちの２試料は，ベニコウジ黄色素とリボフラビンとの併用であった．他にウコン色素とベニバナ黄色素が単独で使われていた．タクアン漬には，上記のようにクチナシ黄色素が多用されている．他の水溶性の黄色素にベニバナ黄色素があり，耐光性やタクアン内部への浸透性では,クチナシ黄色素より優れているが,色調がやや黒ずむ欠点[17]がある．そのため，色調が鮮やかなクチナシ黄色素 が多く使われているものと考えられる．

シバ漬４試料中３試料からラック色素，１試料からアントシアニン色素がそれぞれ単独で検出された.しかし,アントシアニン色素は，原料のシソなどの野菜由来の可能性も考えられる．

ヤマクラゲの醤油漬３試料からパプリカ色素及び合成着色料が検出された．いずれも調味料の中に赤唐辛子が使われていたため，パプリカ色素は赤唐辛子由来と考え

られる．ヤマクラゲは，最近，市場に多く出回っている野菜であり，茎チシャの茎を細く裂いて乾燥させたもので，コリコリとした食感がクラゲに似ている．野菜類は，クロロフィルを多く含むため，加工や貯蔵に際して褐変し易いので，緑の色調を保つために黄色や青色の合成着色料が用いられたと考えられる[18]．

キュウリの醤油漬2試料中1試料にクチナシ黄色素とベニコウジ色素の併用が，他の1試料にはアナトー色素が単独で使われていた．

その他の野菜加工品のラッキョウとカブの酢漬それぞれ1試料からアントシアニン色素が検出された．

果実加工品の栗甘露煮5試料からクチナシ黄色素，サクランボとアンズのシロップ漬各1試料からコチニール色素が検出された．栗は，加工及び貯蔵過程で褐変し易いため,染着力が強く鮮やかな黄色を呈するクチナシ黄色素を用いたのであろう．また，緑色のケシの実は，オードブルの飾りに使われるもので，ベニバナ黄色素とクチナシ青色素が併用されていた．

その他に，干しそばからコチニール色素が，サツマイモの甘露煮及びふりかけからクチナシ黄色素が検出された．

6．調味料

表4．乳製品及び乳加工品からの天然色素調査結果

試料名	試料の色調	試料数	検出色素（検出試料数）
アイスクリーム及び	赤	5	ベニコウジ色素（4），アントシアニン色素（1）
ラクトアイス	桃	2	ビートレッド（2）
	橙	1	クチナシ黄色素＋アナトー色素（1）
	黄	6	β-カロテン（3），クチナシ黄色素（1）
			ベニバナ黄色素（1），クチナシ黄色素＋アナトー色素（1）
	緑	1	β-カロテン＋クチナシ黄色素（1）
チェダーチーズ	橙	1	β-カロテン＋パプリカ色素（1）
アイスモナカの皮	橙	2	アナトー色素（2）
計		18	22

表5．穀類・豆類・野菜及び果実加工品からの天然色素調査結果

試料名	試料の色調	試料数	検出色素（検出試料数）
高菜醤油漬	黄	6	ウコン色素＋Y 4(3)，ウコン色素(1)
			ウコン色素＋クチナシ黄色素＋パプリカ色素(2)
タクアン漬	黄	6	クチナシ黄色素(2)，ウコン色素(1)，
			ベニバナ黄色素(1)，クチナシ黄色素＋ベニコウジ黄色素(1)
			クチナシ黄色素＋リボフラビン(1)
シバ漬	赤	4	ラック色素(3)，アントシアニン色素(1)
ヤマクラゲ醤油漬	緑	3	パプリカ色素＋Y 4(1)，パプリカ色素＋Y 4＋Y 5(1)
			パプリカ色素＋Y 4＋B 1(1)
キュウリ醤油漬	橙	2	クチナシ黄色素＋ベニコウジ色素(1)，アナトー色素(1)
その他の野菜加工品	赤	2	アントシアニン色素(2)
果実加工品			
栗甘露煮	黄	5	クチナシ黄色素(5)
サクランボ	赤	1	コチニール色素(1)
	橙	1	アナトー色素＋R 1 0 4(1)
アンズのシロップ漬	橙	1	コチニール色素(1)
ケシの実	緑	1	ベニバナ黄色素＋クチナシ青色素(1)
オレンジジャム	橙	1	ラック色素(1)
干しソバ	赤	1	コチニール色素(1)
サツマイモの甘露煮	黄	1	クチナシ黄色素(1)
ふりかけ	黄	2	クチナシ黄色素(2)
計		37	45

R104：食用赤色104号，Y 4：食用黄色4号，Y 5：食用黄色5号，B 1：食用青色1号

たれ及びスープの素4試料を調査したところ，橙色のマグロの味噌漬用のたれには，クチナシ黄色素，ベニコウジ色素及びアナトー色素と3種が併用されていた．また，橙色のあんかけ用のたれには，コチニール色素が，コンソメスープにはウコン色素がそれぞれ用いられていた．いずれも一定の色調を得るために添加されたものと考えられる．

7．食品群別による天然色素の検出状況

食品群ごとに検出された色素をまとめて表6に示した．251試料について調査した結果，194試料から14種類の総計237の色素が検出された．検出試料数と検出色素数との差は，2～3種の色素が1試料中で併用されていたことを示すものである．

菓子では，13種の色素が102試料中85試料から検出された．検出色素数について，水溶性色素と油溶性色素を比較すると，水溶性色素の81件に対し，油溶性色素21件で前報[1]とほぼ同じ検出比率であった．しかし，水溶性では各色素の使用頻度において前報[1]と本調査の結果に明らかな差が認められた．すなわち，前報[1]で全体の34％と最も高い検出率を示したコチニール色素が今回，わずか2％の検出率であったのに対し，前報[1]で13％の検出率であったアントシアニン色素が今回25％と最も高い検出率を示した.また，本調査で，予想外にクチナシ青色素が多く使用されていることがわかった．さらに，新たにベニコウジ黄色素の使用例も認められた．

また，各食品群により，多用されている色素が限定される傾向がみられた．特に食肉及び魚介加工品では，コチニール色素，ベニコウジ色素，アナトー色素及びパプリカ色素の4種類が主に検出された．また，穀類・豆類・野菜及び果実加工品では，主にクチナシ黄色素及びウコン色素が使用されていた．

食品群全体をみると本調査で多く検出された色素は，水溶性色素ではクチナシ黄色素が最も多く237件中37件で，次いでアントシアニン色素が29件，コチニール色素26件，ベニコウジ色素17件であった．油溶性色素ではアナトー色素が31件，パプリカ色素16件，ウコン色素14件，β-カロテン11件であった．

次に色素の併用状況をみると，前報[1]は，検出試料に対する併用試料の割合が約10％であったのに対し，本調査では21％と増加していた．このことは,色素の併用される傾向が前報[1]よりも強まっていることを示しており，天然色素の使用技術が向上し，併用使用による微妙な色調の変化が出せるようになったためと考えられる．

今後，消費者の自然食指向や食品加工技術の著しい開発に伴い，天然色素は,その種類が更に増加し，より広範囲の食品に高頻度で使用されると予想される．したがって，天然色素で着色された食品の安全性確保のため，その基礎資料として，今後も継続して天然色素の食品における使用実態を十分把握しておく必要があると考えられる．

ま と め

天然色素の添加が予測される市販食品を対象として，その使用実態調査を行い，次の結果を得た．

1．供試食品251試料中194試料からクチナシ黄色素，アナトー色素，アントシアニン色素，コチニール色素など14種類の天然色素が検出された．

表6．食品群別による天然色素の検出状況

食品群	試料数	検出試料数	検出色素数	水溶性天然色素										油溶性天然色素			
				アントシアニン色素	コチニール色素	ラック色素	ベニコウジ色素	ビートレッド	クチナシ黄色素	ベニバナ黄色素	ベニコウジ黄色素	リボフラビン	クチナシ青色素	アナトー色素	ウコン色素	β—カロテン	パプリカ色素
菓子	102	85	102	20	2	7	6	6	13	7	6		14	7	5	4	5
清涼飲料水	19	14	19	5	7				2	3						1	1
食肉及び魚介加工品	51	37	44		13		5		2			1		17	1	1	4
乳製品及び乳加工品	24	18	22	1			4	2	4	1				4		5	1
穀類・豆類・野菜及び果実加工品	51	37	45	3	3	4	1		15	2	1	1	1	2	7		5
調味料	4	3	5		1		1		1					1	1		
計	251	194	237	29	26	11	17	8	37	13	7	2	15	31	14	11	16

2．市販食品を6群に大別し，検出された天然色素の種類を検討した結果，各群により使用状況に特徴がみられた．特に菓子の場合は13種類と多くの色素が使用されており，単独で使用している例が比較的多かった．一方，食肉及び魚介加工品や穀類・豆類・野菜及び果実加工品では，主に4種類の色素が使用され，かつそれらの併用，あるいは合成着色料との併用例も多く認められた．

また，天然色素の併用例は，検出試料全体の約20%を占め，前報[1]の10%に比べて増加の傾向を示した．

3．食品群全体をみると，油溶性色素のアナトー色素，パプリカ色素，ウコン色素が，また，水溶性色素のクチナシ黄色素，アントシアニン色素，コチニール色素が多く用いられていた．

4．添加物として食品に用いられている天然色素は，物理化学的性質も多種多様である．しかし，それらの性質が食品の着色に巧みに利用されていることが推察された．

なお,本研究は当研究所プロジェクト研究課題「食品中の天然着色料の分析法及び使用実態調査」の一環として実施したものである．

文　献

1）荻原　勉，天川映子，平田恵子，他：東京衛研年報，**36**，245-250，1985.
2）荻原　勉，天川映子，野沢竹志，他：同上，**43**，111-117，1992.
3）月刊フードケミカル　54，(1)　1995，(株）食品化学新聞社
4）荻原　勉，野沢竹志，平田恵子，他：食衛誌，**21**，207-213，1980.
5）天川映子，平田恵子，荻原　勉，他：分析化学，**33**，586-590，1984.
6）平田恵子，荻原　勉，天川映子，他：食衛誌，**24**，1-6，1983.
7）鳥越久司，芦澤賢一，桜井弘子，他：農林規格検査所調査研究報告，80-86，(13)，1989.
8）林　智子，深谷幸代，田中　宏，：日本食品衛生学会，第64回学術講演会要旨集，49，1992.
9）藤井正美，清水孝重，中村幹雄：食用天然色素，133，1993，光琳
10）神蔵美枝子，義平邦利，富田　勲：日本食品衛生学会，第56回学術講演会要旨集，43，1988.
11）藤井正美，清水孝重，中村幹雄：食用天然色素，137，1993，光琳
12）藤井正美，清水孝重，中村幹雄：同上，106，1993，光琳
13）藤井正美，清水孝重，中村幹雄：同上，142，1993，光琳
14）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，580-583，1979，光琳
15）山田貞二：ＦＦＩ　JOURNAL，37-40，No. 172，1997
16）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，623，1979，光琳
17）谷村顕雄，片山　脩，遠藤英美，黒川和男，吉積智司：天然着色料ハンドブック，602，1979，光琳
18）天川映子，荻原　勉，大西和夫，他：東京衛研年報，**45**，79-85，1994.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 129-134, 1998

缶詰食品中の金属含有量調査

鈴木　仁* 藤沼賢司** 勝木康隆*
齋藤和夫*** 安田和男*

Contents of Metals in Canned Foods

JIN SUZUKI*, KENJI FUJINUMA**, YASUTAKA KATSUKI*,
KAZUO SAITO*** and KAZUO YASUDA*

Keywords：金属含有量 contents of metals，缶詰食品 canned food，ヒ素 arsenic，カドミウム cadmium，鉛 lead，亜鉛 zinc，スズ tin

緒　言

近年，社会構造の変化，食の多様化等により，多種多彩な食品が輸入され市場に流通している．しかし，これらの食品については，原材料の生育環境や収穫地での取扱いの方法など多くのことがわかっていない．万一，環境汚染の影響あるいは収穫や製造過程において不衛生な取扱いを受けることがあれば，食品中に種々の有害物質が混入することになる．

そこで，我々は有害物質のうち金属類について，種々の原料を用いた缶詰食品，主に輸入缶詰中のそれらの含有量を調査した．缶詰食品は，外観からは原料の加工状態や品質が観察できず，かつ保存中には容器の素材からの金属汚染も懸念される食品である．我が国では，金属類についてはいくつかの食品に対して食品衛生法における規定あるいはこれに準ずる基準が定められている．本報ではこれらの規定等のある金属類のうち，有害性金属類であるヒ素(As)，カドミウム(Cd)及び鉛(Pb)，さらに缶内面の素材から溶出する可能性のある亜鉛(Zn)及びスズ(Sn)の含有量について調査を行うとともに，生鮮原料及びその加工品の分析値と比較し，これら缶詰食品の金属汚染について検討した．

実験の部

1．試料

平成4年4月から平成10年3月にかけて東京都内で収去もしくは購入した缶詰食品162検体について調査した．これらを四訂日本食品標準成分表に基づき分類した．内訳は豆類7検体，魚介類59検体，獣鳥鯨肉類15検体，果実類37検体，野菜類35検体及びきのこ類9検体である．なお，魚介類は魚類（33検体），貝類（17検体）及び甲殻類（9検体，いか1検体を含む）に分別した．なお製造年月日（不明のものは輸入年月日）から1年以内のものについて分析を行った．

2．試薬

各金属標準液は，関東化学(株)製原子吸光分析用1,000ppm標準溶液を1 mol/L塩酸で適宜希釈して用いた．

硝酸，塩酸，硫酸，過酸化水素水，アンモニア水，クエン酸二アンモニウム，硫酸アンモニウム，ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)，4-メチル-2-ペンタノン(MIBK)は和光純薬工業(株)製有害金属分析用，水素化ホウ素ナトリウムはバリアンリミテッド社製水素化物発生装置用を用いた．その他の試薬は和光純薬工業(株)製特級を用いた．

3．装置

(1) フレーム原子吸光光度計：バリアンリミテッド社製AA-975

(2) 水素化物発生装置：バリアンリミテッド社製VGA-76

(3) ポーラログラフ：柳本製作所(株)製P8-D

4．分析方法

試料の分解は食品衛生検査指針[1]に従った．なお，油

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 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生活科学部食品添加物研究科

脂を多く含有し分解が困難な場合は，放冷後過酸化水素水1mLを加えて加熱を繰り返した．また分解後定容にする場合には水にかえて1mol/L塩酸を用い試料溶液を調製した．

(1) As：試料溶液を7mol/L塩酸で20倍希釈し，水素化物発生装置中で0.6%水素化ホウ素ナトリウム水溶液（本液は水酸化ナトリウム0.5%及びヨウ化カリウム10%を含有する）と反応させ生成したアルシン(AsH_3)を原子吸光光度法により測定した．

(2) Cd，Pb及びZn：試料溶液をアンモニア水で中和し，DDTC-MIBK抽出後原子吸光光度法により測定した．

(3) Sn：試料溶液を直接ポーラログラフ法により測定した．

なお，定量限界はAs，Cd及びPbは0.1μg/g，Zn及びSnは1μg/gとした．

結　果

分析結果を表1.に示した．

1．As

Asは魚類31検体（検出率：94%，検出範囲：0.2～4.8μg/g，以下同様），貝類17検体（100%，0.4～6.6μg/g），甲殻類9検体（100%，0.3～7.0μg/g）及びきのこ類2検体（22%，0.1～0.2μg/g）から検出された．特に，魚類のたら(肝)（デンマーク産）から4.8μg/g，貝類のロコがい（チリ産）から6.6μg/g，甲殻類のかに(肝)（イギリス産）から7.0μg/gと高い値が検出された．

魚介類から検出されるAsは，海水中のAsを取り込み濃縮したものであることが知られている．このAsは，ジメチルアルシン酸(DMA)やアルセノベタイン(AB)などの有機As化合物へと代謝され蓄積されている．しかしその毒性（マウス経口投与）は，DMAで無機As^{3+}の約1/35，ABで1/300以下と言われている[2]．今回の検出値は生鮮品や加工品のこれまでの分析値[3-5]と比較して，大きな差異が認められなかった．このことから，これらの食品の摂取による，Asによる生体への影響はないと考えられる．

2．Cd

Cdは，魚類1検体（3%，0.2μg/g），貝類12検体（71%，0.1～2.5μg/g）及び甲殻類6検体（67%，0.1～3.6μg/g）から検出された．特にかに(肝)（通称かにみそ・イギリス産）2検体から3.2μg/g，3.6μg/gと高い値が検出された．

これはCdは生体に取り込まれると，主に肝及び腎に蓄積されるためと思われる[6,7]．なかでも貝類や甲殻類の内臓の検出値は比較的高い事例が多く，けがに(肝)で13μg/g検出した例[8]もある．他の食品については，生鮮品や加工品のこれまでの分析値[3,9]と比較して大きな差異は認められなかった．

3．Pb

Pbは豆類1検体（14%，0.4μg/g），魚類1検体（3%，0.2μg/g），貝類8検体（47%，0.1～0.5μg/g），甲殻類3検体（33%，0.1～0.3μg/g），獣鳥鯨肉類1検体（7%，0.2μg/g），野菜類3検体（9%，0.1～0.3μg/g）及び果実類2検体（5%，0.1～0.2μg/g）と，低値ながらも主に貝類及び甲殻類から検出された．この検出値は生鮮品や加工品のこれまでの分析値[3,4,10,11]と比較して大きな差異は認められなかった．しかし，多くの試料が検出限界以下であるのに対し，貝類及び甲殻類での検出率が高いことは，底質中のPb濃度が影響しているのではないかと思われる．

4．Zn

Znは豆類7検体（100%，4～13μg/g），魚類33検体（100%，3～37μg/g），貝類17検体（100%，3～176μg/g），甲殻類9検体（100%，5～66μg/g），獣鳥鯨肉類15検体（100%，2～52μg/g），野菜類33検体(94%，1～15μg/g），果実類7検体（19%，1～4μg/g）及びきのこ類9検体(100%，4～9μg/g）と，果実類を除いてほぼすべてから検出された．特に，かき（韓国産）から110μg/g，180μg/gと比較的高い値で検出されたが，かきは亜鉛含有量が非常に多いことが知られており[12]，バックグランドの範囲内と考えられる．また生鮮品や加工品のこれまでの分析値[8-11,13,14]と比較してかきも含めて大きな差異は認められなかったことから，缶内面からのZn溶出はほとんどなかったものと考えられる．

5．Sn

Snは，豆類1検体（14%，2μg/g），貝類6検体(35%，2～5μg/g），甲殻類2検体（22%，3μg/g），獣鳥鯨肉類4検体(27%，1～8μg/g），野菜類18検体（51%，1～260μg/g），果実類31検体（84%，3～120μg/g）及びきのこ類9検体（100%，32～120μg/g）から検出された．特に果実類のうち，パインアップル14検体（31～110μg/g），みかん4検体(7～90μg/g），もも8検体（57～150μg/g）で高値のものが多く，マッシュルームなどきのこ類も全検体から高値で検出された．またアーティチョーク（スペイン産）2検体から230μg/g，260μg/gと非常に高値で検出された．

缶詰におけるSnの存在は，食品特に果実類を劣化させる酸素を減少させ，溶出したSnにより缶内部が還元

表1．各種缶詰食品中の金属含有量

(μg/g)

分類	原材料	原産国	As	Cd	Pb	Zn	Sn
豆類	あずき(餡)	日本	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	あずき(餡)	日本	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	あずき(餡)	日本	Tr	Tr	Tr	6	Tr
	いんげんまめ	アメリカ	Tr	Tr	Tr	10	Tr
	えんどう	アメリカ	Tr	Tr	Tr	8	Tr
	だいず	日本	Tr	Tr	Tr	13	Tr
	だいず(豆腐)	中国	Tr	Tr	0.4	13	2
魚介類<魚類>	あんこう(肝)	スペイン	1.3	Tr	Tr	12	Tr
	あんこう(肝)	日本	1.6	Tr	Tr	11	Tr
	アンチョビー	スペイン	0.6	0.2	0.2	28	Tr
	アンチョビー	中国	2.1	Tr	Tr	19	Tr
	いわし	デンマーク	0.9	Tr	Tr	14	Tr
	いわし	デンマーク	1.0	Tr	Tr	17	Tr
	いわし	ノルウェー	1.2	Tr	Tr	26	Tr
	いわし	ノルウェー	1.4	Tr	Tr	18	Tr
	いわし	ノルウェー	1.4	Tr	Tr	19	Tr
	いわし	ノルウェー	1.5	Tr	Tr	20	Tr
	いわし	ポルトガル	0.6	Tr	Tr	11	Tr
	いわし	ポルトガル	1.5	Tr	Tr	37	Tr
	カペリン	アイスランド	1.0	Tr	Tr	19	Tr
	カペリン	アイスランド	1.4	Tr	Tr	18	Tr
	カペリン	カナダ	1.2	Tr	Tr	16	Tr
	からふとます	カナダ	0.4	Tr	Tr	7	Tr
	こい	中国	Tr	Tr	Tr	19	Tr
	さけ	ドイツ	0.7	Tr	Tr	5	Tr
	さけ	日本	0.5	Tr	Tr	3	Tr
	さば	デンマーク	1.3	Tr	Tr	7	Tr
	たら(肝)	デンマーク	2.6	Tr	Tr	14	Tr
	たら(肝)	デンマーク	4.8	Tr	Tr	15	Tr
	にじます	カナダ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	にしん	デンマーク	2.1	Tr	Tr	15	Tr
	にしん	ドイツ	1.2	Tr	Tr	13	Tr
	にしん	ドイツ	1.3	Tr	Tr	16	Tr
	べにざけ	アメリカ	0.2	Tr	Tr	11	Tr
	べにざけ	カナダ	0.3	Tr	Tr	3	Tr
	べにざけ	カナダ	0.3	Tr	Tr	5	Tr
	べにざけ	ロシア	0.2	Tr	Tr	6	Tr
	べにざけ	ロシア	0.3	Tr	Tr	8	Tr
	まぐろ	フィリピン	0.5	Tr	Tr	3	Tr
	まぐろ	フィリピン	0.8	Tr	Tr	5	Tr
魚介類<貝類>	あかがい	中国	0.4	2.5	Tr	38	Tr
	あかがい	中国	0.7	0.5	0.1	22	3
	あさり	タイ	0.4	0.2	0.5	110	2
	あさり	日本	1.5	0.2	0.2	21	Tr
	あわび	オーストラリア	2.2	Tr	Tr	3	3
	かき	韓国	1.5	0.9	0.3	180	Tr
	かき	韓国	2.0	0.7	0.3	110	Tr
	ささえ	中国	0.4	Tr	Tr	21	Tr
	ささえ	中国	3.4	0.4	0.2	23	5
	はまぐり	アメリカ	0.5	Tr	Tr	7	Tr
	はまぐり	アメリカ	0.5	Tr	Tr	10	Tr
	はまぐり	チリ	0.8	0.1	Tr	15	Tr
	はまぐり	ペルー	0.6	0.4	Tr	22	Tr
	むらさきいがい	オランダ	1.1	0.1	Tr	19	5

As：ヒ素，Cd：カドミウム，Pb：鉛，Zn：亜鉛，Sn：スズ
Tr：As,Cd,Pb 0.1μg/g未満　Zn,Sn 1μg/g未満

表1．続き

(μg/g)

分類	原材料	原産国	As	Cd	Pb	Zn	Sn
魚介類<貝類>	むらさきいがい	デンマーク	0.9	0.1	0.1	25	2
	もがい	日本	0.8	0.5	0.1	21	Tr
	ロコがい	チリ	6.6	Tr	Tr	4	Tr
魚介類<甲殻類>	いか	チリ	0.4	Tr	Tr	19	Tr
	えび	タイ	0.8	Tr	Tr	5	Tr
	がざみ	タイ	0.5	0.2	0.1	61	3
	がざみ	中国	0.3	0.2	Tr	75	3
	かに(肝)	イギリス	2.1	3.2	Tr	66	Tr
	かに(肝)	イギリス	7.0	3.6	Tr	60	Tr
	たらばがに	ロシア	3.9	Tr	Tr	52	Tr
	ロブスター	カナダ	1.3	0.1	0.3	42	Tr
	ロブスター	カナダ	2.6	0.1	0.2	41	Tr
獣鳥鯨肉類	エスカルゴ	フランス	Tr	Tr	Tr	15	1
	すっぽん	中国	Tr	Tr	Tr	2	Tr
	すっぽん	中国	Tr	Tr	Tr	4	1
	牛肉	ブラジル	Tr	Tr	Tr	49	Tr
	牛肉	ブラジル	Tr	Tr	Tr	52	Tr
	豚肉	アメリカ	Tr	Tr	Tr	17	2
	豚肉	デンマーク	Tr	Tr	Tr	8	Tr
	豚肉	デンマーク	Tr	Tr	Tr	21	Tr
	豚肉	中国	Tr	Tr	0.2	30	Tr
	豚肉	中国	Tr	Tr	Tr	6	Tr
	豚肉	中国	Tr	Tr	Tr	15	Tr
	鴨肉	デンマーク	Tr	Tr	Tr	31	Tr
	鴨肉	フランス	Tr	Tr	Tr	10	Tr
	鴨肉	フランス	Tr	Tr	Tr	15	8
	鶏肉	アメリカ	Tr	Tr	Tr	15	Tr
果実類	あんず	南アフリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	60
	おうとう	アメリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
	オリーブ	ギリシャ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	クランベリー	アメリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
	ココナッツ	タイ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	ココナッツ	タイ	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	ジャックフルーツ	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	3
	パインアップル	アメリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	100
	パインアップル	インドネシア	Tr	Tr	Tr	Tr	57
	パインアップル	インドネシア	Tr	Tr	Tr	Tr	59
	パインアップル	タイ	Tr	Tr	Tr	1	110
	パインアップル	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	33
	パインアップル	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	46
	パインアップル	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	55
	パインアップル	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	55
	パインアップル	フィリピン	Tr	Tr	Tr	Tr	69
	パインアップル	フィリピン	Tr	Tr	Tr	Tr	76
	パインアップル	マレーシア	Tr	Tr	Tr	Tr	31
	パインアップル	マレーシア	Tr	Tr	Tr	Tr	38
	パインアップル	マレーシア	Tr	Tr	Tr	Tr	55
	パパイヤ	マレーシア	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
	マンゴスチン	タイ	Tr	Tr	Tr	1	120
	みかん	中国	Tr	Tr	Tr	Tr	7
	みかん	中国	Tr	Tr	Tr	Tr	86
	みかん	中国	Tr	Tr	Tr	Tr	87
	みかん	中国	Tr	Tr	Tr	Tr	90
	もも	アメリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	57

表1．続き

(μg/g)

分類	原材料	原産国	As	Cd	Pb	Zn	Sn
果実類	もも	アルゼンチン	Tr	Tr	0.2	Tr	150
	もも	ギリシャ	Tr	Tr	Tr	Tr	60
	もも	ギリシャ	Tr	Tr	Tr	Tr	71
	もも	ギリシャ	Tr	Tr	Tr	Tr	78
	もも	チリ	Tr	Tr	Tr	Tr	64
	もも	チリ	Tr	Tr	Tr	Tr	71
	もも	南アフリカ	Tr	Tr	Tr	Tr	99
	ライチー	タイ	Tr	Tr	Tr	1	60
	ライチー	中国	Tr	Tr	0.1	2	69
	ランブータン	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	83
野菜類	アーティチョーク	スペイン	Tr	Tr	Tr	2	230
	アーティチョーク	スペイン	Tr	Tr	Tr	2	260
	アスパラガス	中国	Tr	Tr	Tr	2	1
	アスパラガス	中国	Tr	Tr	Tr	2	Tr
	アスパラガス	中国	Tr	Tr	Tr	2	Tr
	アスパラガス	中国	Tr	Tr	Tr	3	110
	アスパラガス	中国	Tr	Tr	Tr	4	61
	アスパラガス	南アフリカ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	アロエ	タイ	Tr	Tr	Tr	Tr	5
	からしな	中国	Tr	Tr	Tr	2	2
	からしな	台湾	Tr	Tr	0.1	4	Tr
	キャベツ	ドイツ	Tr	Tr	Tr	2	Tr
	くわい	タイ	Tr	Tr	Tr	1	3
	ザーサイ	中国	Tr	Tr	0.2	4	2
	ザーサイ	中国	Tr	Tr	0.3	7	3
	だいこん	日本	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	たけのこ	中国	Tr	Tr	Tr	5	8
	たけのこ	日本	Tr	Tr	Tr	1	62
	とうもろこし	アメリカ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	とうもろこし	アメリカ	Tr	Tr	Tr	3	Tr
	とうもろこし	アメリカ	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	とうもろこし	アメリカ	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	とうもろこし	アメリカ	Tr	Tr	Tr	5	Tr
	とうもろこし	タイ	Tr	Tr	Tr	7	22
	トマト	アメリカ	Tr	Tr	Tr	1	Tr
	トマト	アメリカ	Tr	Tr	Tr	5	40
	トマト	イタリア	Tr	Tr	Tr	1	1
	トマト	イタリア	Tr	Tr	Tr	1	Tr
	トマト	イタリア	Tr	Tr	Tr	Tr	68
	にんにく	タイ	Tr	Tr	Tr	2	Tr
	ビート	アメリカ	Tr	Tr	Tr	4	Tr
	ほうれんそう	アメリカ	Tr	Tr	Tr	7	Tr
	やし	ブラジル	Tr	Tr	Tr	9	8
	やし	ブラジル	Tr	Tr	Tr	15	4
	れんこん	日本	Tr	Tr	Tr	2	Tr
きのこ類	なめこ	中国	Tr	Tr	Tr	4	56
	ひらたけ	中国	Tr	Tr	Tr	7	120
	ふくろたけ	中国	0.1	Tr	Tr	6	60
	マッシュルーム	インドネシア	Tr	Tr	Tr	7	32
	マッシュルーム	中国	0.2	Tr	Tr	6	46
	マッシュルーム	中国	Tr	Tr	Tr	7	48
	マッシュルーム	中国	Tr	Tr	Tr	7	66
	マッシュルーム	中国	Tr	Tr	Tr	9	36
	マッシュルーム	中国	Tr	Tr	Tr	9	80

系に保たれ，色調，香味の保持，ビタミンCが安定化されるなど，食品価値を長期間維持するためには不可欠である[15]．生鮮品の分析値[3,4]と今回調査した缶詰食品とをSn溶出の面で比較すると，パインアップルやマッシュルームなどの数十μg/g以上の高値で検出されたものは，缶内面からのSnの溶出が考えられた．しかし，これまでのパインアップル缶詰及びマッシュルーム缶詰の分析値である52～240μg/g及び60～130μg/g[3,4]と比較して，今回の検出値は大きな差は認められなかった．

ま と め

缶詰食品中の金属含有量（As，Cd，Pb，Zn及びSn）について調査を行った．

1）Asは主に魚介類から高値で検出された．このAsは，DMAやABなど有機As化合物であると考えられ，その毒性は無機As^{3+}と比較してかなり低いことから，これらの食品でのAsによる生体への影響はないと考えられる．

2）Cdは主に貝類及び甲殻類から検出された．特にイギリス産かに(肝)から3.2μg/g，3.6μg/gと高い値が検出された．

3）Pbは主に貝類及び甲殻類から検出されたが，検出値は低かった．

4）Znは果実類を除いてほとんどすべてから検出された．また缶内面からのZn溶出については，それを示唆する検出値は見られなかった．

5）Snは，主に野菜類，果実類及びきのこ類から高い値で検出された．特に果実類のパインアップル，みかん，ももで高い値のものが多く，マッシュルーム等きのこ類も高い値を検出した．アーティチョークからも200μg/gを超える高い値が検出された．また，Snを数十μg/g以上検出したこれらのものは，缶内面からの溶出が考えられた．

文 献

1）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針理化学編，177-178，日本食品衛生協会，東京．
2）桜井 弘，田中英彦編：生体微量元素，202-206，1994，廣川書店，東京．
3）細貝祐太郎，堤 忠一，高居百合子共編：食品微量元素マニュアル，371-794，1985，中央法規出版，東京．
4）大石義也，近藤久幸，藤本 喬：食品衛生研究，**39**，9，73-92，1989．
5）Underwood.E.J.：微量元素，425-429，1975，丸善，東京．
6）桜井 弘，田中英彦編：生体微量元素，222-226，1994，廣川書店，東京．
7）Underwood.E.J.：微量元素，267-280，1975，丸善，東京．
8）石崎有信，福島匡昭，坂元倫子：日衛誌，**25**，207-211，1970．
9）池辺克彦，西宗高弘，田中凉一：食衛誌，**32**，336-350，1990．
10）池辺克彦，西宗高弘，田中凉一：食衛誌，**32**，48-56，1990．
11）池辺克彦，西宗高弘，田中凉一：食衛誌，**32**，382-393，1990．
12）池辺克彦，田中之雄，田中凉一，国田信治：食衛誌，**18**，86-97，1977．
13）細貝祐太郎，堤 忠一，高居百合子共編：食品微量元素マニュアル，5-369，中央法規出版，東京．
14）Underwood.E.J.：微量元素，207-251，1975，丸善，東京．
15）日本薬学会編：衛生試験法，574-577，1995，廣川書店，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 135-143, 1998

茶葉及び茶飲料中のカテキン類、メチルキサンチン類及びアスコルビン酸の分析

小林千種*, 中里光男*, 山嶋裕季子*,
川合由華**, 立石恭也*, 安田和男*

Analysis of Catechins, Methylxanthines and L-Ascorbic Acid in Tea Leaves and Tea Drinks

CHIGUSA KOBAYASHI*, MITSUO NAKAZATO*,
YUKIKO YAMAJIMA*, YUKA KAWAI**,
YUKINARI TATEISHI* and KAZUO YASUDA*

A survey of the contents of eight catechins ; epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), epigallocatechin gallate (EGCG), catechin (C), gallocatechin (GC), catechin gallate (CG) and gallocatechin gallate (GCG), three methylxanthines ; caffeine (CF), theobromine (TB) and theophylline (TP), and L-ascorbic acid (AA) was carried out on tea leaves (green tea, oolong tea, black tea, etc.), freshly brewed tea using the above tea leaves and commercial canned tea drinks.

The catechins and methylxanthines were extracted simultaneously from samples, and chromatographed simultaneously by HPLC. The AA was analyzed elsewhere by HPLC. The contents of total catechins, CF and AA in green tea leaves (sencha, gyokuro and maccha) were in the range of 92~150, 22~38 and 0.6~5.9mg/g, respectively, that in the oolong tea leaves they were in the range of 33~87, 22~30 and 0~0.5mg/g, respectively, and that in the black tea leaves they were in the range of 10~65, 23~33 and 0~0.5mg/g, respectively.

In the case of tea leaves and freshly brewed tea, the major components in the catechines were EC, ECG, EGC, EGCG, and the four catechins accounted for more than 90% of the total catechins.

On the other hand, in canned tea drinks, isomer types of the above four catechins, that is, C, CG, GC GCG, were detected more abundantly. The isomer type catechins accounted for more than 50% of the total catechins in the canned tea drinks. The components of catechins in the freshly brewed green tea were changed to approximately those in the cannned green tea by reflux. These findings suggested that epimerization of catechins took place during the sterilization process in the production of canned teas.

Keywords：カテキン類 catechins，メチルキサンチン類 methylxanthines，アスコルビン酸 L-ascorbic acid，茶葉 tea leaves，茶飲料 tea drinks，高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒　言

近年，緑茶中に含まれるカテキン類に虫歯予防，酸化防止，癌予防，抗菌作用等の効果があることが報告されており[1]，その機能性が大いに注目されたことから，緑茶の消費量が増加している．このようなことから，通常茶を浸出して飲用する他に，手軽に飲める清涼飲料水としての缶入り茶飲料の消費が増大している．

しかしながら，市販の茶飲料においては，製造工程あ

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所精度管理室

るいは流通過程でカテキン類が異性化したり，また，酸化等によってカテキン類そのものが減衰する可能性がある．したがって，その機能性の変化あるいは低下が予想される．一方，茶中には覚醒，利尿作用を持つカフェイン等のメチルキサンチン類も含まれており，茶飲料の摂取量の増加に伴うメチルキサンチン類の摂取量の増加も懸念される．

しかし，市販茶飲料中のカテキン類及びメチルキサンチン類についての調査報告例は少なく，その中で調査対象となったカテキン類も，カテキン，エピカテキン，エピカテキンガレート，エピガロカテキン，エピガロカテキンガレートの５種と少ない[2,3]．また，茶葉中のカテキン類の含有量についても，これら5種のカテキン類の分析が中心であり[3]，それ以外のカテキン類を含めた調査例は極めて少ない[4]．

そこで，缶入り茶飲料については品質評価の観点からカテキン類８種，メチルキサンチン類３種及びアスコルビン酸についての含有量調査を行うことにした．また，茶葉及びその浸出液についてもそれらの含有量を測定し，各成分の組成を明らかにするとともに，市販の缶入り茶飲料との比較を行った．

なお，分析は緑茶カテキン類の主要構成成分であり，B環の立体配置が2Rであるエピカテキン(EC)，エピカテキンガレート(ECG)，エピガロカテキン(EGC)，エピガロカテキンガレート(EGCG)及びそれらの各異性体でB環の立体配置が2Sであるカテキン(C)，カテキンガレート(CG)，ガロカテキン(GC)，ガロカテキンガレート(GCG)の合計８種のカテキン類(Fig.1)，メチルキサンチン類の中からカフェイン(CF)，テオブロミン(TB)，テオフィリン(TP)の３種及びL-アスコルビン酸(AA) を対象に含有量の調査を行った．

実験方法

1．試料

平成８～９年に東京都内で市販されていた煎茶，玉露，抹茶等の緑茶25検体，ウーロン茶５検体，紅茶５検体，ハトムギ及びウーロン茶等を原料とするいわゆる健康茶３検体，緑茶粉末清涼飲料２検体及び缶入り茶飲料16検体について調査を行った。

2．試薬

１）カテキン類混合標準原液：C，EC，GC，EGC，GCG，EGCG，CG及びECG(栗田工業(株)製)各10mgとり，0.1%メタリン酸－メタノール(１：１)混液で溶解し10mlとした．(カテキン類：1000μg/ml)

２）メチルキサンチン類混合標準原液：TB(和光純薬工業(株)製) 50mgを約80mlの水に加温しながら溶解する．これに，TP(同製)50mg及びCF(同製)100mgを加えて溶解し，全量を100mlとした。(TP, TB：500μg/ml，CF：1000μg/ml)

３）カテキン類－メチルキサンチン類混合標準溶液：カテキン類混合標準原液1mlとメチルキサンチン類混合標準原液0.5mlをとり，0.1%メタリン酸－メタノール(１：１)混液で溶かし，10mlとした(カテキン類：100μg/ml，TP, TB：25μg/ml，CF：50μg/ml)．これを適宜希釈して用いた．

４）L-アスコルビン酸：L(+)-アスコルビン酸(和光純薬工業(株)製)を用いた．

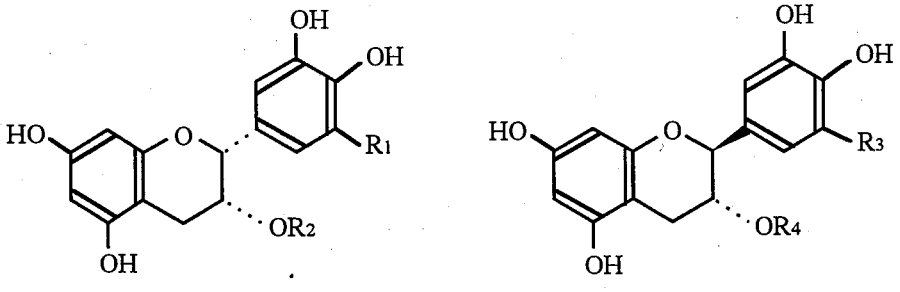


Fig. 1. Structures of Catechins

	R_1	R_2		R_3	R_4
(-)-Epicatechin (EC)	H	H	(-)-Catechin (C)	H	H
(-)-Epigallocatechin (EGC)	OH	H	(-)-Gallocatechin (GC)	OH	H
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	H	gallate	(-)-Catechin gallate (CG)	H	gallate
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	OH	gallate	(-)-Gallocatechin gallate (GCG)	OH	gallate

5）メタノール，アセトニトリル：HPLC用(ナカライテスク(株)製)を用いた．

6）前処理用カートリッジカラム：Mega Bond Elut C18(充填量1g,Varian社製)は使用前にメタノール10ml及び水10mlで洗浄した．

7）0.2mol/Lリン酸緩衝液：0.2mol/Lリン酸一カリウム溶液及び0.2mol/Lリン酸を混合し，pH2.0及びpH3.0の緩衝液を調製した．

その他の試薬はすべて特級品を用いた．

3．装置

HPLC装置：日本分光工業(株)製880-PU型ポンプ,同851-AS型オートインジェクター，(株)島津製作所製SPD-10AV型UV検出器，同CR-4A型データ処理装置，医理化機器(株)製Σ985型アンペロメトリック電気化学検出器により構成した．

4．茶葉の浸出条件

四訂日本食品標準成分表[5]の茶浸出液の調製法に従い，以下のように行った．

煎茶：茶葉10gを90℃の湯430mlで1分間浸出した．

玉露：茶葉10gを60℃の湯60mlで2.5分間浸出した．

番茶，ほうじ茶，ウーロン茶：茶葉15gを90℃の湯650mlで0.5分間浸出した．

紅茶：茶葉2.5gを90℃の湯100mlで2分間浸出した．

健康茶：各製品の添付文に従い浸出した．

粉末清涼飲料：各製品の添付文に従い調製した．

5．試験溶液の調製方法

1）カテキン類及びメチルキサンチン類

茶葉は粉砕し，1gを100mlメスフラスコにとり，アセトニトリル一水(1：1)混液でメスアップし，スターラーを用いて室温下で40分間かくはんし,ろ紙ろ過した．ろ液4mlをナシ型フラスコにとり，減圧濃縮乾固後，0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH2.0) 20mlで溶解したもの10mlをMega Bond Elut C18に負荷した．水5mlで洗浄後，メタノール−0.05mol/Lリン酸緩衝液(pH3.0)（4：6)混液で溶出し，10mlとしたものを試験溶液とした．

茶飲料は25gとり，0.2mol/Lリン酸緩衝液(pH2.0)で50mlとし，その10mlをMega Bond Elut C18に負荷した．水5mlで洗浄後，メタノール−0.05mol/Lリン酸緩衝液(pH3.0)（4：6)混液で溶出し，10mlとしたものを試験溶液とした．

2）アスコルビン酸[6]

茶葉は粉砕し，緑茶は0.5g，その他の茶は10gとり,1%メタリン酸25mlを加えて1分間ホモジナイズする操作を3回行い，抽出液と残査をあわせ，1%メタリン酸で100mlとした．3000rpmで10分間遠心し，上澄液を0.5μmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

茶飲料は20gとり，10%メタリン酸10mlを加え，水を加えて100mlとし，0.5μmのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした．

6．HPLC条件

1）カテキン類及びメチルキサンチン類

カラム：J'sphere ODS-H80（4μm，4.6mm i.d.×250mm，(株)ワイエムシィ製)，移動相：メタノール−0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH3.0)（11：39)混液，流速：0.7ml/min，カラム温度:40℃，注入量：10μl，検出：UV 275nm（島津SPD-10AV)；ECD（アンペロメトリック）600mV（医理化Σ985)

2）アスコルビン酸[6]

カラム：Hibar LiChrosorb NH2（10μm,4.0mm i.d.×250mm，関東化学(株)製)，移動相：アセトニトリル−0.01mol/Lリン酸一カリウム溶液(8：2)混液，流速：1.0ml/min，カラム温度：30℃，注入量：10μl，検出：UV 254nm（島津SPD-10AV)

結果及び考察

1．カテキン類とメチルキサンチン類の一斉分析法の検討

カテキン類とメチルキサンチン類を同時に分析した報告はいくつかみられるが[3,4]，今回調査対象としたカテキン類8種とメチルキサンチン類3種の計11成分を一斉に分析した報告はみられない．そこで，我々は調査に先立ち以下の事項について分析法の検討を行った．

1）抽出及びクリーンアップ方法の検討

茶葉からの11成分の抽出方法は検討の結果，アセトニトリル−水（1：1）混液で室温下でかくはん抽出する末松らの方法[7]が最適であった．また，試験溶液の調製方法は寺田らの方法[3]を準用し，11成分の分析に適用できるよう，クリーンアップ方法等に変更を加えた．

クリーンアップには充填量1gのBond Elut C18を使用して，カートリッジへの負荷をpH2.0に調整した0.2mol/Lリン酸緩衝液で行うことにより，11成分を効率よく保持させることができた．

次に，溶出溶媒にメタノール−リン酸緩衝液系を用いて11成分を効率良く溶出できる比率について検討した．一般に逆相系カートリッジからの溶出条件の設定は目的物質を溶出させ，かつカートリッジ内に残留した夾雑物の溶出を最小限にとどめることが望ましい．そのために溶出溶媒はなるべくメタノールの比率を少なくする必要

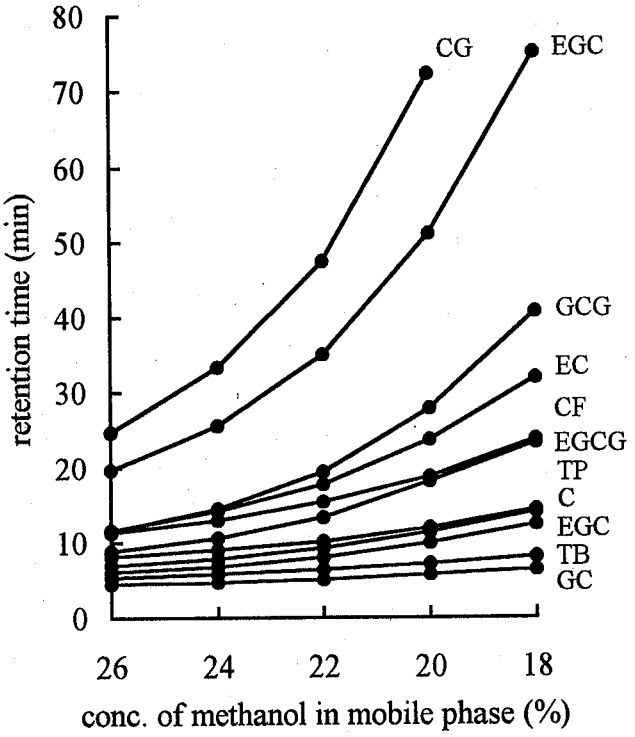


Fig. 2. Effect of Methanol Concentration in the Mobile Phase on Retention Time of Catechins and Methylxanthines

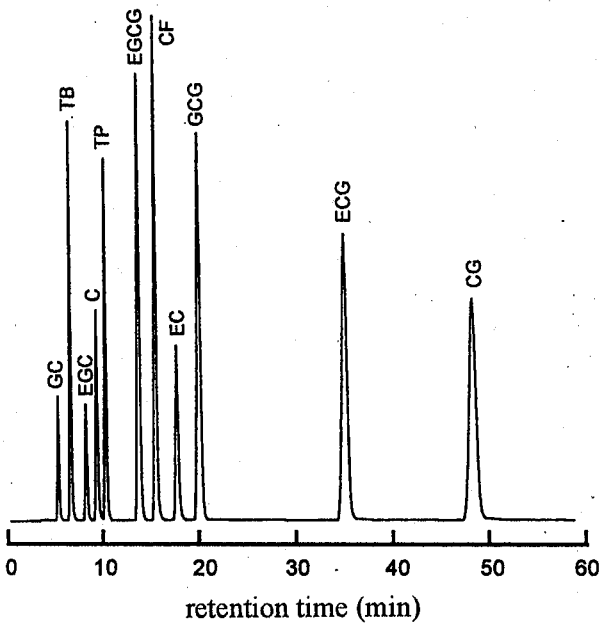


Fig. 3. High Performance Liquid Chromatogram of Catechins and Methylxanthines by UV Detection

Column: J'sphere ODS-H80 (4 μ m, 4.6mm i.d.×250mm), Mobil phase : methanol-0.1mol/L phosphate buffer (pH3.0) (11:39), Flow rate: 0.7ml/min, Column temp.: 40℃, Detection: UV 275nm, Injection vol.: 10 μ l

がある．すなわち，11成分の混合標準溶液を減圧濃縮乾固後，0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH2.0)で溶解したもの10mlをカートリッジに負荷して検討したところ，溶出液を10mlとした場合に，11成分が95%以上回収できる最もメタノール含量の少ない比率は4:6であった．そこで，メタノール－0.05mol/Lリン酸緩衝液(pH3.0)の比率は4：6とした．

2）HPLC条件の検討

HPLC条件については，UV検出器を用いたアイソクラティックな条件で検討した．カラムについては，数種類のODSカラムで検討したところ，J'sphere ODS-H80のみ11成分を完全に分離することができた．また，移動相については，寺田ら[3]が5種のカテキン類と3種のメチルキサンチン類の同時分析に用いたメタノール－リン酸緩衝液系について検討したところ，Fig.2に示すように，メタノールの割合が22%の場合に11成分を60分以内で完全に分離できることがわかった．したがって,メタノール－リン酸緩衝液(pH3.0)の比率は11：39とした．

上記条件で緑茶飲料については希釈し，ろ過して得た試験溶液を注入したとき，クロマトグラム上に妨害ピークは出現せず，十分定量が可能であった．しかし，紅茶，ウーロン茶等についてはクリーンアップした試験溶液でも，クロマトグラム上にGCの定量に妨害となるピークが出現した．そこで，検出器としてカテキン類に対してUV検出器よりもより特異性の高いアンペロメトリック電気化学検出器をUV検出器の後に直列に接続したとこ

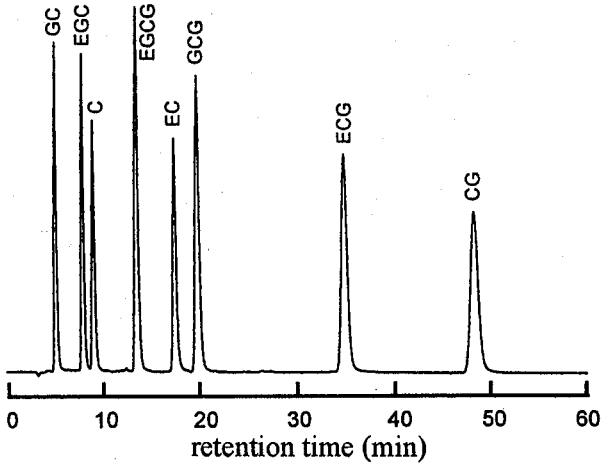


Fig. 4. High Performance Liquid Chromatogram of Catechins by Electrochemical Detection

Column: J'sphere ODS-H80 (4 μ m, 4.6mm i.d.×250mm), Mobil phase : methanol-0.1mol/L phosphate buffer (pH3.0) (11:39), Flow rate: 0.7ml/min, Column temp.: 40℃, Detection: ECD 600mV, Injection vol.: 10 μ l

ろ，妨害成分の影響もほとんどなく定量することが可能となった．そこで，UV検出器と電気化学検出器を併用することにした．電気化学検出器の条件は梅垣らの方法[8]を参考にして600mVとした．検量線は注入量を10μlとしたとき，UV検出器の場合5～100μg/ml，電気化学検出器では1～20μg/mlの範囲で直線性が得られた．

以上の条件で11成分を分析したときの標準品のクロマトグラムをFig.3及びFig.4に示した．

2．茶葉中の含有量について

茶葉中の各成分の分析結果をTable 1に示した．

各試料別の各カテキン類の分析値はTable 1のとおりであるが，これら8種のカテキン類の合計値を総カテキン量とし，これを茶種別に比較した．その平均値は，煎茶が130mg/gと最も多く，次いで玉露，抹茶の100mg/g，ウーロン茶で57mg/g，紅茶で42mg/gという順であり，発酵の度合いが深まるほど減少する傾向を示した．健康茶については，総カテキン量は5～42mg/gとバラツキが大きかった．これは，ハトムギ等の茶以外の原料を十数種類含み，カテキン類を含むウーロン茶の処方量に差があることによるためと思われる．

カテキン類の組成については，いずれの茶種においてもEGCGが最も多く，総カテキン量の約半分を占めた．続いて，EGC,ECG,ECの順に検出され，4成分の合計は総カテキン量の90%以上であった．これら4成分は2R体のカテキン類である．一方，2S体のカテキン類であるC，GC，GCG，CGの含有する割合は非常に少なかった．

メチルキサンチン類の分析結果では，CF含有量の平均値が抹茶で33mg/g，玉露で31mg/gとやや高く，煎茶，ウーロン茶，紅茶は25～28mg/gでほとんど差はみられなかった．また，TB含有量は紅茶の平均値が4 mg/gであったが，それ以外の茶ではいずれも極く少量であり，TPは全く検出されなかった．

AAについては煎茶が最も多く検出され，平均値で3.9mg/gであり，抹茶は1.1mg/g，玉露は1.8mg/gであった．不発酵茶である緑茶類からAAが多く検出された．一方，発酵茶であるウーロン茶，紅茶，健康茶ではほとんど検出されなかった．

3．茶浸出液中の含有量

茶葉を用いて茶を入れ，実際に飲用する場合の浸出液中の含有量についても調査し，その結果をTable 2に示した．

総カテキン量の平均値を比較したところ，玉露が3.8mg/gで特に多く，次いで煎茶は1.3mg/g，紅茶で0.54mg/g，ウーロン茶及び健康茶は0.13mg/gという結果であった．また，メチルキサンチン類のうち，CF含有量の平均値は，玉露が1.8mg/gと他の茶浸出液と比べて非常に高く，紅茶は0.53mg/g，煎茶は0.39mg/g，ウーロン茶，健康茶はそれぞれ0.13mg/g，0.10mg/gであった．TBについては，煎茶，玉露，紅茶の平均値はそれぞれ0.02mg/g，0.05mg/g，0.05mg/gで，わずかに検出された．AAは緑茶類のみ検出され，その平均値は玉露で0.23mg/g，煎茶で0.08mg/gであった．乾燥茶葉と比べ，茶種別の浸出液中の各成分の検出量に順位の違いがあるのは，茶の浸出条件が茶の種類により異なるためであると思われる．特に，玉露は使用する湯の量に対し，茶葉を用いる量の割合が最も多く，かつ浸出時間が長いためにいずれの成分も浸出液中の含有量が最も多くなったものと考える．

カテキン類の組成については，いずれの茶種においてもEGCGとEGCが最も多く，続いて，ECG，ECの順であった．これら2R体の4成分の合計は総カテキン量の85%以上であった．茶浸出液中のカテキン類の組成の傾向は茶葉の場合に似ているが，茶葉と比較しEGCGの割合がやや少なく，EGCの割合がやや多くなる傾向がみられた．このことは，EGCGは水に溶けにくく，EGCは溶けやすい性質が影響したものと考えられた．特に，湯の温度の低い条件で浸出する玉露の場合においてその傾向が大きかった．

4．缶入り茶飲料中の含有量

市販の缶入り茶飲料の分析結果をTable 3に示した．

総カテキン量の平均値は，緑茶飲料で0.44mg/g，ウーロン茶飲料は0.25mg/g，紅茶飲料で0.07mg/gであった．紅茶飲料のうちカテキン類を全く検出しなかったものが1検体あった．メチルキサンチン類のうち，CF含有量の平均値は緑茶飲料で0.12mg/g，紅茶飲料で0.12mg/g，ウーロン茶飲料は0.16mg/gで，大差は見られなっかった．

これらの結果を茶浸出液の場合と比較したところ，緑茶飲料では総カテキン量，CFとも煎茶浸出液の1/3，紅茶飲料では総カテキン量は浸出液の1/8，CFは1/4と検出量は低かった．ウーロン茶では総カテキン量は浸出液の2倍，CFは1.2倍の検出量であった．これらの違いは，本実験での浸出条件と缶飲料メーカーのそれとの差違によるものと考えられる．

これをCFの摂取量で考えてみると，缶入り茶飲料では茶種によるCF含有量に大差がないため，その平均値0.13mg/gと比較してみると，缶入り茶飲料を1本(350ml)飲用したときと，湯飲み茶碗1杯(100ml)の煎茶浸出液を

Table 1. Contents of Catechins , Methylxanthines and Ascorbic Acid in Tea Leaves

(mg/g)

		Catechins									Methylxanthines		L-Ascorbic
	Sample	C	EC	GC	EGC	GCG	ECGC	CG	ECG	Total	CF	TB	Acid
Green tea	sencha(sayama)	2.9	11	3.4	39	2.6	63	<1.0	12	134	24	<1.0	3.6
	sencha(sayama)	<1.0	13	5.6	40	1.3	78	(−)	15	153	27	1.6	3.8
	sencha(sayama)	1.9	11	5.6	37	3.2	68	<1.0	14	141	28	1.1	3.3
	sencha(sayama)	1.2	12	1.4	30	<1.0	53	<1.0	13	112	29	1.4	4.1
	sencha(shizuoka)	1.4	12	1.0	36	<1.0	59	<1.0	12	122	26	1.8	5.9
	sencha(shizuoka)	<1.0	12	5.3	39	<1.0	64	(−)	12	133	24	1.7	4.9
	sencha(shizuoka)	1.4	9.8	3.7	33	3.7	59	(−)	12	123	23	1.0	2.5
	sencha(shizuoka)	1.6	11	4.9	44	3.3	60	(−)	11	136	23	<1.0	2.2
	sencha(uji)	2.7	10	4.5	37	3.5	68	<1.0	13	139	27	<1.0	3.5
	sencha(uji)	<1.0	14	4.7	38	(−)	61	(−)	13	131	26	1.6	4.9
	sencha(uji)	1.5	13	2.2	38	<1.0	61	<1.0	13	130	27	1.8	5.5
	sencha(uji)	1.5	11	4.4	37	3.4	60	<1.0	13	131	26	<1.0	2.6
	sencha(kukicha)	1.8	11	5.5	37	4.2	54	(−)	10	124	22	<1.0	3.5
	gyokuro(sayama)	<1.0	8.5	1.1	22	<1.0	58	<1.0	12	103	33	1.3	1.7
	gyokuro(uji)	<1.0	10	1.4	28	<1.0	57	<1.0	11	109	30	1.2	1.7
	gyokuro(yame)	<1.0	6.9	<1.0	19	<1.0	56	(−)	12	95	33	<1.0	1.8
	gyokuro	<1.0	7.0	1.3	23	(−)	69	(−)	13	114	36	<1.0	1.6
	gyokuro	<1.0	8.4	1.8	29	<1.0	63	(−)	12	115	34	<1.0	2.4
	maccha(uji)	<1.0	7.5	3.4	25	1.1	56	(−)	12	106	27	<1.0	0.6
	maccha(uji)	<1.0	5.7	2.3	22	2.3	64	(−)	11	108	32	(−)	0.8
	maccha(uji)	<1.0	5.5	<1.0	16	(−)	54	(−)	15	92	38	(−)	1.4
	maccha(uji)	(−)	5.5	<1.0	18	(−)	57	(−)	11	92	30	(−)	1.1
	maccha(uji)	<1.0	6.3	1.2	25	(−)	59	(−)	11	103	31	(−)	1.4
	hojicha	1.3	1.7	1.1	1.9	4.3	3.5	1.1	1.4	16	12	<1.0	0.1
	bancha	<1.0	8.9	2.0	31	<1.0	30	<1.0	6.2	80	14	<1.0	1.9
Oolong tea	(china)	<1.0	5.3	5.5	19	1.1	46	<1.0	9.2	87	26	<1.0	0.1
	(china)	1.4	2.4	4.1	7.0	1.3	17	<1.0	5.1	39	22	1.1	<0.1
	(china)	<1.0	3.7	3.4	15	1.6	43	(−)	9.6	77	25	<1.0	(−)
	(taiwan)	<1.0	2.8	3.1	8.9	(−)	25	(−)	6.1	46	25	1.2	(−)
	−	<1.0	2.4	(−)	6.5	(−)	18	(−)	6.0	33	30	2.2	0.2
Black tea	darjeeling	<1.0	2.4	<1.0	5.8	<1.0	41	<1.0	14	65	32	2.7	<0.1
	darjeeling	(−)	2.3	(−)	2.8	(−)	28	(−)	11	44	29	4.9	(−)
	darjeeling	(−)	3.2	3.0	4.8	(−)	33	(−)	14	58	33	4.9	(−)
	ceylon uva	<1.0	4.1	(−)	3.3	(−)	15	(−)	10	33	26	3.7	(−)
	tea bag	<1.0	1.1	<1.0	1.0	<1.0	2.7	<1.0	3.0	9.8	23	1.7	<0.1
Health tea	blend tea	(−)	(−)	1.1	1.0	1.2	3.8	(−)	1.0	8.1	3.7	(−)	(−)
	blend tea	<1.0	2.6	2.5	5.5	1.5	21	(−)	8.0	42	16	<1.0	(−)
	blend tea	(−)	<1.0	(−)	1.0	(−)	2.0	(−)	1.3	4.8	7.6	(−)	0.1

Table 2. Contents of Catechins , Methylxanthines and Ascorbic Acid in Brewed Teas

(mg/g)

	Sample	Catechins									Methylxanthines		L-Ascorbic Acid
		C	EC	GC	EGC	GCG	ECGC	CG	ECG	Total	CF	TB	
Green tea	sencha(sayama)	0.03	0.12	0.05	0.46	0.03	0.45	(−)	0.07	1.21	0.36	<0.01	0.10
	sencha(sayama)	0.04	0.14	0.06	0.54	0.03	0.69	(−)	0.12	1.62	0.42	<0.01	0.08
	sencha(sayama)	0.01	0.18	0.06	0.52	0.02	0.66	(−)	0.12	1.58	0.49	0.03	0.07
	sencha(sayama)	0.02	0.20	0.05	0.57	0.02	0.65	<0.01	0.13	1.64	0.59	0.06	0.11
	sencha(shizuoka)	0.02	0.19	0.06	0.58	0.01	0.64	<0.01	0.12	1.62	0.48	0.04	0.12
	sencha(shizuoka)	0.01	0.12	0.05	0.37	0.03	0.36	(−)	0.08	1.01	0.28	0.02	0.09
	sencha(shizuoka)	0.02	0.14	0.05	0.39	0.05	0.42	(−)	0.09	1.15	0.31	0.03	0.05
	sencha(shizuoka)	0.01	0.12	0.05	0.41	0.03	0.33	(−)	0.07	1.00	0.25	0.01	0.06
	sencha(uji)	0.03	0.10	0.04	0.39	0.02	0.41	(−)	0.07	1.06	0.38	<0.01	0.07
	sencha(uji)	<0.01	0.14	0.04	0.40	0.04	0.33	(−)	0.08	1.04	0.35	0.02	0.09
	sencha(uji)	0.01	0.19	0.07	0.55	0.02	0.62	<0.01	0.12	1.59	0.47	0.04	0.09
	sencha(uji)	<0.01	0.13	0.04	0.36	0.03	0.30	(−)	0.07	0.94	0.32	0.02	0.05
	sencha(kukicha)	0.01	0.12	0.06	0.40	0.03	0.36	(−)	0.07	1.05	0.27	0.01	0.06
	gyokuro(sayama)	0.04	0.46	0.10	1.3	0.01	1.4	<0.01	0.23	3.55	1.4	0.07	0.19
	gyokuro(uji)	0.04	0.56	0.13	1.8	0.02	1.5	<0.01	0.25	4.31	1.4	0.07	0.13
	gyokuro(yame)	0.02	0.38	0.07	1.1	0.01	1.1	(−)	0.20	2.88	1.9	0.02	0.22
	gyokuro	0.03	0.43	0.08	1.4	(−)	1.6	(−)	0.25	3.79	2.0	0.04	0.26
	gyokuro	0.03	0.55	0.11	2.0	0.01	1.6	(−)	0.26	4.56	2.1	0.04	0.33
	hojicha	<0.01	0.02	<0.01	0.02	0.02	0.02	<0.01	<0.01	0.10	0.16	0.01	<0.01
	bancha	<0.01	0.05	0.02	0.16	<0.01	0.09	<0.01	0.02	0.36	0.15	<0.01	0.01
Oolong tea	(china)	<0.01	0.04	0.02	0.07	<0.01	0.10	<0.01	0.02	0.26	0.20	<0.01	<0.01
	(china)	<0.01	0.01	0.01	0.03	<0.01	0.04	<0.01	0.01	0.13	0.15	<0.01	<0.01
	(china)	(−)	0.01	<0.01	0.03	(−)	0.04	(−)	<0.01	0.09	0.08	(−)	(−)
	(taiwan)	(−)	0.01	0.01	0.03	(−)	0.04	(−)	0.01	0.10	0.12	(−)	(−)
	−	(−)	<0.01	(−)	0.02	(−)	0.02	(−)	<0.01	0.05	0.09	<0.01	(−)
Black tea	darjeeling	<0.01	0.04	0.02	0.05	0.01	0.58	<0.01	0.19	0.89	0.67	0.08	<0.01
	darjeeling	(−)	0.03	(−)	0.04	(−)	0.29	(−)	0.11	0.47	0.49	0.04	(−)
	darjeeling	(−)	0.03	0.06	0.06	(−)	0.29	(−)	0.11	0.55	0.50	0.04	(−)
	Ceylon uva	0.02	0.11	(−)	0.12	(−)	0.27	(−)	0.16	0.68	0.60	0.05	(−)
	tea bag	<0.01	0.02	<0.01	0.02	<0.01	0.04	<0.01	0.04	0.13	0.40	0.04	<0.01
Health tea	blend tea	(−)	(−)	0.01	0.01	0.01	0.03	(−)	<0.01	0.07	0.05	(−)	(−)
	blend tea	(−)	0.03	0.03	0.06	0.01	0.16	(−)	0.06	0.35	0.17	<0.01	(−)
	blend tea	(−)	<0.01	(−)	0.01	(−)	0.01	(−)	<0.01	0.03	0.07	(−)	(−)
Instant tea	green tea	<0.01	0.06	0.04	0.19	<0.01	0.27	(−)	0.05	0.62	0.15	<0.01	0.02
	hojicha	0.02	0.01	0.18	0.02	(−)	0.04	(−)	0.01	0.28	0.08	<0.01	<0.01

Table 3. Contents of Catechins , Methylxanthines and Ascorbic Acid in Canned Tea Drinks

(mg/g)

		Catechins									Methylxanthines		L-Ascorbic
	Sample	C	EC	GC	EGC	GCG	ECGC	CG	ECG	Total	CF	TB	Acid
Green tea	(A)	0.06	0.02	0.18	0.07	0.10	0.10	0.02	0.02	0.56	0.14	(−)	0.19
	(B)	0.05	0.02	0.16	0.06	0.08	0.08	0.01	0.01	0.48	0.11	(−)	0.31
	(C)	0.09	0.05	0.15	0.07	0.07	0.07	0.01	0.01	0.54	0.12	(−)	0.39
	(D)	0.05	0.04	0.14	0.06	0.06	0.07	0.01	0.01	0.44	0.12	(−)	0.52
	(E)	0.05	0.02	0.13	0.08	0.07	0.07	0.01	0.01	0.45	0.10	(−)	0.11
	(F)	0.03	0.01	0.06	0.03	0.02	0.02	(−)	(−)	0.16	0.12	(−)	0.13
Oolong tea	(A)	0.04	<0.01	0.09	0.06	0.07	0.06	0.01	0.01	0.35	0.18	<0.01	0.01
	(B)	0.04	(−)	0.09	0.06	0.05	0.05	0.01	0.01	0.31	0.19	<0.01	0.07
	(C)	0.01	<0.01	0.05	0.02	0.04	0.04	<0.01	<0.01	0.19	0.14	(−)	0.13
	(D)	0.01	<0.01	0.05	0.02	0.05	0.04	0.01	0.01	0.21	0.14	(−)	0.11
	(E)	0.01	<0.01	0.05	0.02	0.04	0.04	0.01	<0.01	0.18	0.16	(−)	0.03
Black tea	(A)	0.03	(−)	(−)	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.12	0.13	0.01	0.17
	(B)	0.03	(−)	0.05	0.02	0.01	0.01	0.01	<0.01	0.14	0.11	0.01	0.13
	(C)	<0.01	(−)	(−)	<0.01	0.02	0.03	<0.01	0.01	0.07	0.13	<0.01	0.13
	(D)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	0.13	(−)	0.14
	(E)	<0.01	(−)	(−)	<0.01	0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.10	<0.01	(−)

Table 4. Changes of Catechins and Methylxanthines during Reflux of Brewed Green Tea

(mg/g)

Time	Catechins									Methylxanthines	
(min)	C	EC	GC	EGC	GCG	EGCG	CG	ECG	Total	CF	TB
0	0.05	0.12	0.03	0.38	0.01	0.41	0.01	0.08	1.08	0.27	<0.01
15	0.08	0.10	0.14	0.26	0.14	0.29	0.01	0.07	1.08	0.27	<0.01
30	0.12	0.09	0.18	0.20	0.17	0.25	0.01	0.05	1.08	0.27	<0.01

飲用したときはほぼ同量の摂取量であることがわかった.

また, TBの含有量はいずれも極く少量であり, TPは全く検出されなかった.

AAについての平均値は, 緑茶飲料で0.28mg/g, ウーロン茶飲料で0.07mg/g, 紅茶飲料で0.11mg/gであった. すべての検体に酸化防止剤としてビタミンCの添加表示があった. 緑茶飲料の場合, 煎茶浸出液の検出量の平均値と比べ3倍以上であったことや, ウーロン茶や紅茶の浸出液では検出されなかったことから, AAは添加されたものであることが確認された. しかし, 今回分析した缶入り茶飲料のうち, 紅茶飲料1検体はAAを検出しなかった. このことは, 流通過程での酸化による減少あるいはAAの添加量が少なかった可能性が考えられた.

5. 缶入り茶飲料中でのカテキン類のエピメリ化

缶入り茶飲料中のカテキン類の組成についてはTable 3に示したように茶浸出液と比較して大きな違いが認められた. すなわち, 浸出液ではEC,EGC,ECG,EGCG(2R体)の含有量が多く, C,GC,CG,GCG(2S体)の含有量は極めて少なかったのに対し, 缶入り茶飲料では2S体が浸出液と比較して多量に検出され, 総カテキン量の50%以上達していた. これは, 当初存在した2R体のカテキン類が製造工程中あるいは流通過程中においてエピメリ化した可能性があり, 特に加熱滅菌工程での影響が大きいものと考えられた.

そこで, 煎茶浸出液を加熱還流してカテキン類及びメチルキサンチン類の検出量の経時変化をTable 4に示した. 総カテキン量, CF及びTBの検出量にはほとんど変化はなかったが, 加熱前には含有量が少なかったC, GC, GCGが時間の経過とともに増加し, 逆に加熱前に含有量の多かったEC, EGC, EGCG, ECGが減少した. しかし, 総カテキン量に変化がなかったことから, 加熱により2R体のカテキン類がエピメリ化して異性体である2S体に変化したものと考えれらる.

したがって, 缶入り茶飲料についても製造工程中の加熱滅菌工程でECがCに, EGCがGCに, ECGがCGに, EGCGがGCGにエピメリ化したものと思われる. このように缶入り茶飲料では自ら茶を入れる時とは異なるカテキン類組成を持つという特徴があることが判明した. また, 各異性体間の化学的性質がかなり違っていることを考慮すると, 機能性の効果の面でも当然違いがあるものと推察される. しかし, 現在のところ異性体間の機能性の違いについて検討したデータは少なく, これらについての評価はこれからの問題であると思われる.

ま と め

1. 茶葉及び茶飲料中における8種類のカテキン類及び3種類のメチルキサンチン類の一斉分析法を開発した.

2. 茶葉中のカテキン類の組成は2R体のEC, EGC, ECG, EGCGが主要構成成分であり, 総カテキン量の90%を占めていた. また, 茶浸出液中での組成比率はおおむね茶葉中の組成と大差のないものであった.

3. 缶入り茶飲料中のカテキン類の組成は, 茶葉及び茶浸出液と比較して大きな違いが認められた. すなわち, 茶葉及び茶浸出液でわずかしか検出されなかった2S体のカテキン類(C, GC, CG, GCG)の含有量が50%以上を占めていた.

4. 缶入り茶飲料と茶浸出液におけるカテキン類の組成の違いは, 茶浸出液の加熱還流による組成の経時変化を調査した結果から, 製造工程での加熱滅菌により2R体のカテキン類から2S体のカテキン類にエピメリ化したものと推測された.

5. 缶入り茶飲料中のCF含有量は平均で0.13mg/gであり, 缶飲料1缶の飲用は茶碗1杯の緑茶浸出液の飲用とほぼ同量の摂取量であることがわかった.

6. 缶入り茶飲料中のAAについて, 茶浸出液での検出量と比較した結果, AAは添加されたものであることがわかった. 添加表示があるにもかかわらず, 検出されなかったものが1例あり, 流通過程での酸化による減少あるいは添加量が少なかった可能性も考えられた.

本調査は東京都食品環境指導センターの先行調査事業の一環として行ったものである.

文 献

1) 山本万里：日食工誌, **43** (6), 653-662, 1996.
2) 寺田志保子, 前田有美恵, 増井俊夫 他：日食工誌, **34** (1), 20-27, 1987.
3) 寺田久屋, 鈴木晃世, 田中治夫 他：食衛誌, **33** (4), 347-354, 1992.
4) 後藤哲久, 長嶋等, 吉田優子 他：茶業研究報告, **83**, 21-28, 1996.
5) 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表, 272-277, 1982, 大蔵省印刷局, 東京.
6) 井部明広, 斉藤和夫, 中里光男 他：東京衛研年報, **36**, 168-173, 1985.
7) 末松伸一, 久延義弘, 西郷英昭 他：日食工誌, **42** (6), 419-424, 1995.
8) 梅垣敬三, 江指隆年, 手塚雅勝 他：食衛誌, **37** (2), 77-82, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 144-148, 1998

魚介類の鮮度保持に用いられる食品添加物の市販魚における使用実態調査

井口正雄*, 菊谷典久*, 坂牧成恵*, 門間公夫*,
市川久次*, 垣　弘一*2, 川島幸造*3,
阿部則雄*4, 金井日出夫*4

Contents of Food Additive Components Used for Retention of Freshness in Raw and Frozen Fish

MASAO IGUCHI*, NORIHISA KIKUTANI*, NARUE SAKAMAKI*, KIMIO MONMA*,
HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROKAZU KAKI*2, KOZO KAWASHIMA*3,
NORIO ABE*4 and HIDEO KANAI*4

Keywords：鮮魚 raw fish，食品添加物 food additive，有機酸 organic acid，クエン酸 citric acid，リンゴ酸 malic acid，乳酸 lactic acid，酢酸 acetic acid，酸化防止剤 antioxidant，トコフェロール tocopherol，アスコルビン酸 ascorbic acid，鮮度 freshness，ニコチン酸 nicotinic acid，ニコチン酸アミド nicotinamide

はじめに

魚介類は漁獲直後から，酵素化学的変化を生じるとともに，外観的に魚体の色，光沢が徐々に変化する．一般に消費者が生鮮魚を購入する際，店頭で，この外観により鮮度を判定することが多い．

近年，「鮮度保持剤」と称し，酸化防止剤，品質保持剤，pH調整剤等，またこれらに天然抽出物を混合した製品が，変色防止，日持ち向上，脂質劣化防止などの効果をうたい，製造，販売されている．

現在，食品衛生法では，生鮮魚については，着色料，強化剤などの食品添加物を使用することを禁止している．また，厚生省は通達[1]により，添加物の使用が消費者の判断を誤らせるおそれがあることから，添加物の使用を禁止している．しかし，これら鮮度保持剤は，塩蔵品などの加工品，一部は冷凍鮮魚介類については使用を制限されていないため，現在も販売されていることから，生鮮魚に使用されることもあり得る．そこで，市販鮮魚及び冷凍マグロについて，これら，添加物の使用実態を明らかにするために調査を実施した．調査項目としては，酸化防止剤である，L-アスコルビン酸，エリソルビン酸，トコフェロール，pH調整剤であるクエン酸，リンゴ酸，乳酸，酢酸，また，色調調整剤であるニコチン酸及びニコチン酸アミドを対象とした．

また，これら添加物の成分は，天然に存在するものと化学的に同一，あるいは同種のものであり，生鮮魚における添加の有無を判別する際，天然の存在量を，バックグラウンド値として，把握する必要がある．そこで，まず，添加物を使用してないことを確認した近海産アジ及び日本沿岸で漁獲した生マグロについて，これら成分の含量を調査し，比較した．

実験方法

1．試料　近海産アジは，長崎県佐世保沖で漁獲され，翌日中に都内集荷業者に搬入されたものを収集し，氷冷下にて実験室に運搬し，分析に供した．この試料については，漁獲地の漁業共同組合の協力で，漁獲直後より添加物の処理をしていないことを確認したものである．生マグロは，日本沿岸（和歌山県，宮崎県，千葉県）で，また，冷凍マグロは遠洋（インド洋，北太平洋，ニュー

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
*2 東京都衛生局生活環境部食品保健課
*3 東京都衛生局食品環境指導センター
*4 東京都衛生局市場衛生検査所

Table 1. 近海産アジおよび生マグロ中のアスコルビン酸,有機酸,トコフェロール,ニコチン酸およびニコチン酸アミド含量

試料		体重	体長 (cm)	pH	アスコルビン酸 (mg/100g)	クエン酸 (mg/100g)	リンゴ酸 (mg/100g)	乳酸 (mg/100g)	酢酸 (mg/100g)	α-トコフェロール (mg/100g)	ニコチン酸 (mg/100g)	ニコチン酸アミド (mg/100g)
アジ	範囲	94～163	22～25	6.38～6.45	ND	ND～3	ND	203～557	ND～8	—	—	—
(n=5)	平均値	143 (g)	24	6.42	ND	ND	ND	362	4.5			
メバチマグロ		69 (Kg)	135	6.07	ND	ND	7	820	ND	0.30	1.4	14.3
キハダマグロ		40 (Kg)	110	5.81	ND	ND	7	1110	5	0.04	1.0	17.4
マカジキ		87 (Kg)	191	5.78	3.3	ND	ND	906	14	0.35	1.5	6.5
メカジキ		68 (Kg)	182	5.58	1.7	ND	ND	1230	ND	0.24	0.6	7.7

ND：検出せず

Table 2. 市販鮮魚中のアスコルビン酸および有機酸含量

魚種名		体重 (g)	体長 (cm)	pH	アスコルビン酸 (mg/100g)	クエン酸 (mg/100g)	リンゴ酸 (mg/100g)	乳酸 (mg/100g)	酢酸 (mg/100g)
イワシ	範囲	113～199	22～25	5.8～5.9	ND～2.3	ND	ND	760～2090	ND
(n=7)	平均値	139	23	5.9	1.1			1403	
アジ	範囲	94～163	22～25	6.3～6.4	ND～1.8	ND	ND	340～1220	ND
(n=7)	平均値	140	23	6.4	0.6			696	
サバ	範囲	148～742	20～39	5.7～6.0	ND～2.8	ND	ND	1050～2260	ND
(n=7)	平均値	393	27	5.8	1.5			1857	
サンマ	範囲	160～185	31～33	6.0～6.1	ND～3.9	ND	ND	480～1620	ND
(n=7)	平均値	170	32	6.0	1.9			924	
キチジ	範囲	216～226	23～24	7.0～7.0	ND～1.4	ND	ND	170～560	ND
(n=2)	平均値	221	24	7.0	0.7			365	
イトヨリ	(n=1)	238	28	6.5	1.6	tr	tr	630	tr
タイ頭	(n=1)	365	11	6.0	ND	tr	ND	890	tr
マダイ	(n=1)	753	33	6.2	2.1	ND	ND	1530	tr
キンメダイ	(n=1)	99	14	6.2	ND	ND	ND	1210	tr

ND：検出せず
tr：痕跡

ジーランド沖など）で漁獲され，東京都中央卸売市場に入荷したものを入手した．マグロの解体は，市場内,店舗にて，著者らの立ち会いのもとで行った．解体後，魚体の一部を，氷冷下にて実験室に搬入し，分析に供した．

市販鮮魚は，都内スーパーマーケット，小売店にて購入し，氷冷下にて実験室に搬入し，分析に供した．

2．試料の調製 市販鮮魚及び近海産アジは，3枚におろし，フィレーとし，表皮を除いた後，魚肉を細切し，乳鉢で均一としたものを分析試料とした．マグロ類については，魚体のほぼ中央部分より，尾部にかけて約10cmを円筒状になるように裁断し，骨，表皮，血合い肉を除き，表皮に近い部分（A），骨に近い部分（C），これらの中間の部分（B）の魚肉部分に，概ね3分割し，市販鮮魚と同様に細切処理し，分析試料とした．

3．試薬，器具および装置 **標準品**：L-アスコルビン酸，DL-乳酸は試薬特級，エリソルビン酸，ニコチン酸，ニコチン酸アミド，クエン酸，DL-リンゴ酸は和光特級，酢酸は精密分析用を用い，いずれも和光純薬（株）製，トコフェロール（d-トコフェロール，ビタミンE標準品キット）はエーザイ（株）製を用いた．試薬：ヘキサン，2-プロパノール，エタノールは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用，その他の試薬はいずれも和光純薬（株）製，試薬特級を用いた．カラムクロマトグラフィー充填剤には，DEAE-セファデックスA-25（Pharmacia Fine Chemicals 社製）を用いた．装置：高速液体クロマトグラフ；8000システム（株式会社東ソー）（CCPDポンプ，UV-8010紫外可視検出器，CO-8011型カラムオーブン，7125型レオダインインジェクター，FS-8010型蛍光検出器）,示差屈折計；RI-2型（昭和電工製），pHメーター；F-8型ペーハーメーター，(堀場製作所製)．ホモジナイザー：ウルトラトラックスT-25型（JANKE and KUNKERU社）を用いた．

4．検液の調製及び分析方法 1）pHの測定：常法[2]により，試料10gに精製水100mlを加え，ホモジナイズし，上清をpHメーターで測定した．2）アスコルビン酸及びエリソルビン酸：衛生試験法記載の方法[3]によった．HPLC条件：カラム；Lichrosorb NH_2(7 μm)(Merck), 250mm×4mmI.D.移動相；アセトニトリル:水：酢酸(87:11:2)，流速；2ml/min，検出；UV 254nm，カラム温度；35℃，注入量；25 μl．3）トコフェロール：勝井ら[4]の方法に準じた．HPLC条件：カラム；Lichrosorb Si-60(10 μm)（Merck），250mm×4.6mmI.D. 移動相；ヘキサン：2-プロパノール(99:1)，流速;1.0ml/min，検出；蛍光検出,励起波長298nm，蛍光波長325nm，カラム温度；35℃，注入量；20 μl．4）有機酸：平野ら[5]の方法により抽出し，抽出液を数野ら[6]の方法でカラムクロマトグラフィーで処理し，HPLCにより分析した．リンゴ酸，乳酸，酢酸はHPLC条件(1)で，クエン酸は同条件(2)で測定した．HPLC条件(1)：カラム；Ionpak KC-811（Shodex)，300mm×8.0mmI.D.移動相；0.1%りん酸，流速；0.6ml/min，検出；UV 210nm及び示差屈折計，カラム温度；60℃，注入量；20 μl HPLC条件(2)：カラム；COSMOSIL 5C18-AR（NAKARAI)，250mm×4.6mmI.D.，移動相；0.05Mりん酸,流速；1.0ml/min，検出；UV 210nm及び示差屈折計，カラム温度；35℃，注入量；20 μl．5）ニコチン酸およびニコチン酸アミド：大石ら[7]の方法により，試料をメタノールで抽出し，セップパック，アルミナN（日本ミリポア製）にて，前処理し，HPLCにて測定した．HPLC条件：カラム；Lichrosorb RP-18，300mm×4mmI.D. 移動相；メタノール－酢酸緩衝液（0.1M酢酸ナトリウム，0.01Mテトラブチルアンモニウムヒドロキシドを含む，pH5）（1：5），流速；0.6 ml/min，検出；UV 261nm，カラム温度；60℃，注入量；10 μl

結果および考察

近海産アジ及び生マグロの分析結果をTable 1.に示した．アジについては5尾について分析した結果を範囲と平均値で示した．生マグロについては，試料採取部位(A)，(B)，(C)各部位における測定値の平均を示した．近海産アジについては，外観的には死後硬直直後のものであり，鮮度は良好と思われた．これら，いずれの試料からもアスコルビン酸は検出されなかった．また，有機酸については，ほとんど検出されなかったが，クエン酸，酢酸が各1検体から検出された．生マグロについては，アスコルビン酸がマカジキ，メカジキから，いずれも数mg検出されたが，他のマグロからは検出されなかった．また，マグロ類の乳酸はアジに比べ高い値を示した．市販鮮魚の分析結果をTable 2.に示した．pHは，赤身魚のキチジが7.0とやや高い値を示した以外は，5.7～6.5の範囲にあった．アスコルビン酸については，サンマ1検体(3.9mg/100g）が他の6検体（ND～2.2mg/100g）に比べやや高い値を示し，また，今回分析した市販鮮魚の中で，最も高い値であった．有機酸については，クエン酸，リンゴ酸，酢酸のいずれも，痕跡程度か定量限界以下であった．定量限界は100gあたり，アスコルビン酸0.5mg，クエン酸3 mg，酢酸5 mg，リンゴ酸5 mg，乳酸 10mgであった．乳酸は魚種により，また，同一魚種において

Table 3. 冷凍マグロ類のアスコルビン酸，有機酸，トコフェロールおよびニコチン酸含量

試料NO.	種類	体長 (cm)	魚体重 (Kg)	pH	アスコルビン酸 (mg/100g)	エリソルビン酸 (mg/100g)	クエン酸 (mg/100g)	リンゴ酸 (mg/100g)	乳酸 (mg/100g)	酢酸 (mg/100g)	α-トコフェロール (mg/100g)	ニコチン酸 (mg/100g)	ニコチン酸アミド (mg/100g)
1	メバチマグロ	110	41.5	6.44	ND	ND	ND	10	514	6	0.08	1.0	13.8
2	メバチマグロ	140	75.0	6.44	ND	ND	ND	5	531	14	0.21	0.6	15.8
3	メバチマグロ	110	43.0	5.90	ND	ND	ND	6	808	10	0.10	ND	14.7
4	メバチマグロ	110	42.4	5.78	0.5	ND	ND	ND	1093	15	0.16	ND	12.8
5	インドマグロ	150	83.0	6.11	ND	ND	ND	tr	684	33	0.07	ND	8.2
6	本マグロ	110	32.0	5.47	3.1	ND	ND	ND	1020	ND	0.17	ND	15.6
7	キハダマグロ	120	29.0	5.97	ND	ND	ND	8	962	ND	0.03	ND	17.6
8	キハダマグロ	140	64.6	6.37	ND	ND	ND	6	666	ND	0.02	0.9	14.2
9	キハダマグロ	140	62.6	6.06	ND	ND	ND	8	943	ND	0.07	0.7	18.5
10	メカジキ	110	60.0	5.70	ND	ND	ND	tr	802	ND	0.46	ND	8.6
11	マカジキ	163	62.0	5.75	2.5	ND	ND	5	1099	ND	0.34	ND	8.1

ND：検出せず
tr：痕跡

も変動がみられた．乳酸は魚体中でグリコーゲンの嫌気的解糖により生成，蓄積するものであり，漁獲後の経過時間，魚種，体長などにより変動することが報告されている[8]．次に冷凍マグロの分析結果をTable 3.に示した．測定値は生マグロと同様，(A),(B),(C)各部位の平均値を示した．アスコルビン酸はメバチマグロ，本マグロ，マカジキから 0.5～3.1mg/100g検出された．エリソルビン酸はいずれの試料からも検出されなかった．有機酸について，クエン酸は全く検出されず，また，リンゴ酸はほとんどの試料から検出された．酢酸は，約半数の試料から検出された．トコフェロールについては，α－トコフェロールは，すべての試料から検出され，その範囲は，0.03～0.46mg/100gであった．他の同族体であるβ-，γ-，δ-の各トコフェロールについても分析を実施したが，1検体，痕跡程度検出された以外，いずれの同族体も検出されなかった．部位別では，α－トコフェロールは魚体の表皮側魚肉部（A）が，他の部位に比べ，高い傾向を示した．ニコチン酸は，ND～最大1.0mg/100gであったがニコチン酸アミドはすべての検体から検出され，その範囲は 8.1～最大18.5mg/100gであった．ニコチン酸及びニコチン酸アミドの定量限界はそれぞれ，0.5 及び 1.0mg/100gであった．

以上，市販鮮魚及び冷凍マグロについて，また，比較のために近海産アジ，生マグロについて調査した．その結果，市販鮮魚においては，同一魚種間で，鮮度保持に用いられる成分が顕著に高い値を示した試料はなかったことから，今回分析した成分を含む食品添加物は，使用されていないものと思われる．冷凍マグロ類の成分については，日本沿岸で漁獲された生マグロと比較したが，個体差によると思われる差異がみられた．更に，詳細に検討する必要があると思われる．

ま と め

市販鮮魚および冷凍マグロにおける食品添加物の使用実態を明らかにするため，調査を実施した．酸化防止剤，pH調整剤，色調調整剤の成分である，L-アスコルビン酸，エリソルビン酸，トコフェロール，有機酸，ニコチン酸及びニコチン酸アミドについて，魚肉中含量を測定した．また，食品添加物が使用されていない，近海産アジ，生マグロにおける，天然に由来するこれらの含有量について測定し比較した．市販鮮魚について，アスコルビン酸含量は，同一の魚種では，同程度の値であり，また，有機酸のうち，クエン酸，リンゴ酸，酢酸はほとんどの検体から検出されなかった．以上の結果から，これら成分を主体とした食品添加物は使用されていないと思

われた．冷凍マグロについて，市販鮮魚と同様に，アスコルビン酸，有機酸含量が顕著に高い値を示した試料はみられなかった．ニコチン酸，ニコチン酸アミドおよびトコフェロール含量については，魚種，個体差によると思われる差異がみられたことから，更に，詳細に検討する必要があると思われた．

文　献

1）厚生省生活衛生局乳肉衛生課長，食品化学課長通知：鮮魚に対する食品添加物の使用について，平成3年6月21日．衛乳第42号，衛化第36号
2）日本薬学会編：衛生試験法注解，9-12，1973，金原出版，東京
3）日本薬学会編：衛生試験法注解，370－372，1990，金原出版，東京
4）日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法，212-215，1988，東京化学同人，東京
5）平野敏行，山沢　進，須山三千三：日水誌，**44**，(9)，1037-1040，1977
6）数野千恵子，西島基弘，天川映子他：日食工誌，**34**(1)42-47，1987
7）大石充男，天川映子，萩原　勉：食衛誌，**29**，(1)32-37，1988
8）日本水産学会監修：魚介類のエキス成分，44-55，1988，恒星社厚生閣，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 149-156, 1998

輸入食品中の放射能濃度（第７報*）
― 平成７年度～平成９年度 ―

観　　公　子**, 牛　山　博　文**, 新　藤　哲　也**, 安　田　和　男**

Radioactive Contamination in Imported Foods(VII)
− Apr.1995 ～ Mar.1998 −

KIMIKO KAN**, HIROFUMI USHIYAMA**, TETSUYA SHINDO**
and KAZUO YASUDA**

Keywords：チェルノブイリ原発事故 Chernobyl reactor accident，放射能汚染 radioactive contamination，輸入食品 imported foods，調査 survey，セシウム cesium，キノコ mushroom，NaI(Tl)シンチレーションディテクタ NaI(Tl) scintillation detector

緒　　言

昭和61年４月に発生した旧ソビエト連邦チェルノブイリ原子力発電所事故による放射能汚染は，事故後，特に食料面において長期間その安全性が危惧されてきた．我が国では1965年のICRP（国際放射線防護委員会）勧告等に基づいて，放射能濃度の暫定限度値をセシウム-134(^{134}Cs)とセシウム-137(^{137}Cs)の合計で食品１kg当たり370ベクレル(Bq)以下と定め，検疫所において，放射能汚染食品が輸入されないよう監視が行われてきた[1]．しかし，これまでにも限度値を超える食品が監視の網を抜けて輸入された例もある[2,7]．

著者らは事故直後の昭和61年12月より，輸入食品等について，暫定限度値を超える食品を排除するため放射能汚染実態調査を行ってきた[2-7]．その結果，暫定限度値を超えたものが昭和63年度にトナカイの肉及び平成６年度にピエ・ド・ムトン（カノシタ）で各々１件見いだされ，今なお原発事故の影響が及んでいることが確認された．

本報では都内市販輸入食品を中心に調査した平成７年度から平成９年度の３年間についての放射能濃度調査結果を報告する．

実験方法

１．試　料

平成７年４月から平成10年３月までに東京都内に流通されていた輸入食品等で食品衛生監視員が収去した920試料を用いた．

２．器具及び装置

前報[2-7]に従った．

３．試料の調製

前報[2-7]に従った．

４．分析方法

前報[2-7]に従った．

検出限界値は測定時の各試料の採取重量及び測定時間から換算して^{134}Csと^{137}Csの合計値として18～47Bq/kgであった．

また，25Bq/kg以上を検出したものについては同定を目的として，核種分析に用いるGe半導体検出器に対応させて測定を試みた．チャンネル数をNaIシンチレーションディテクタのLL=27からUL=46の範囲で，幅を狭

表１．　放射能濃度別による検出試料数

放射能濃度	検出試料数			
(Bq/kg)	平成７年度	平成８年度	平成９年度	計
0～ 50	295	296	325	916
51～100	1	1	1	3
101～200	0	0	1	1
201～370	0	0	0	0
370～	0	0	0	0
計	296	297	327	920

＊第６報　東京衛研年報，**46**，120-126，1995

＊＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3 −24− 1 , Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表2．食品群別の試料数及び検出数*

食品群	平成7年度		平成8年度		平成9年度		計	
	試料数	検出数*	試料数	検出数*	試料数	検出数*	試料数	検出数*
1 ナッツ類	21	0	20	0	10	0	51	0
2 香辛料・ハーブ類	55	0	56	0	71	0	182	0
3 ジャム・マーマレード類	3	0	0	0	8	0	11	0
4 乳・乳製品	28	0	29	0	21	0	78	0
5 食肉・食肉製品	45	0	46	0	48	0	139	0
6 蜂蜜	11	0	10	0	19	0	40	0
7 魚介・加工品	20	0	20	0	10	0	50	0
8 菓子類	0	0	0	0	1	0	1	0
9 酒類	20	0	20	0	30	0	70	0
10 穀類	30	0	29	0	20	0	79	0
11 野菜・果実・加工品	44	1	29	1	73	2	146	4
12 油脂類	3	0	1	0	0	0	4	0
13 調味料	0	0	2	0	1	0	3	0
14 その他	16	0	35	0	15	0	66	0
計	296	1	297	1	327	2	920	4

＊：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50Bq/kgを超えた試料数

く1に設定測定し，そのカウント数をプロットし波高分布を描いた．同様にしてセシウム標準品(^{137}Cs)の波高分布と比較することにより同定を行った．なお，LL-ULはエネルギー値を示すチャンネル数の幅であってLLは低い方，ULは高い方のエネルギーを示す．チャンネル幅1はGe半導体検出器の約20keVに相当するエネルギーであり，LL-ULの27から46とは約540 keVから約920 keVである．^{137}CsはLL=28(560 keV)からUL=37(740 keV)の間に，^{134}CsはLL=37(740 keV)からUL=45(900 keV)の間に波高の最大値がある．

測定時間は各試料の放射能量により各チャンネル1幅あたり20分以内で増減し設定した．

結果及び考察

1．放射能汚染状況

都内に流通していた輸入食品等920試料（平成7年度296試料，平成8年度297試料，平成9年度327試料）について，放射能濃度を測定した．その結果，50Bq/kgを超えたものは4試料（0.4%）であり，厚生省の暫定限度値370Bq/kgを超えるものはなかった．

2．放射能検出状況

1）放射能濃度別

放射能濃度別の検出試料数を表1に示した．

放射能濃度が51～100Bq/kgのものが3試料（0.3%），101～200Bq/kgのものが1試料(0.1%)であり，201Bq/kg以上のものはなかった．また，50Bq/kg以下のものは916試料で総試料の99.6%を占めていた．

昭和63年度から平成9年度までの50Bq/kgを超えた試料の検出率の推移を図1に示した．検出率は，チェルノブイリ事故から時間の経過に伴い減少してきている．^{134}Cs及び^{137}Csの半減期の自己崩壊による減衰を考えると今後さらに減少するものと思われる．

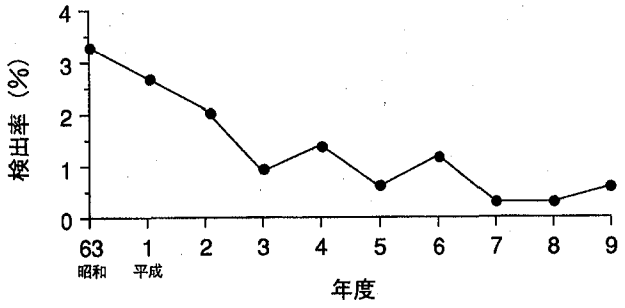


図1．放射能濃度が50Bq/kgを超えた試料の検出率の推移

2）食品群別

食品群別の検出状況を表2に示した．

食品を14群に分類したが，50Bq/kgを超えて検出された試料は全て野菜・果実・加工品群に含まれていた．

検出頻度の高い食品群は限定されてきており，50Bq/kgを超えて検出された試料も，厚生省通達（平成5年1月11日衛検第10号[8]）による全ロット検査が義務づけられた品目である野草及びその加工品に含まれ、これらについては，監視の強化を継続し，有害食品の排除に努める必要があると考える．

3）原産国別

表3． 国別の試料数及び検出数*

原産国名	平成7年度		平成8年度		平成9年度		計	
	試料数	検出数*	試料数	検出数*	試料数	検出数*	試料数	検出数*
アメリカ	37	0	44	0	49	0	130	0
フランス	36	0	38	1	38	1	112	2
ドイツ連邦	24	0	23	0	24	0	71	0
中国	21	0	24	0	18	0	63	0
日本	23	0	18	0	16	0	57	0
イタリア	10	1	15	0	21	1	46	2
デンマーク	11	0	12	0	16	0	39	0
イギリス	10	0	7	0	17	0	34	0
カナダ	6	0	9	0	13	0	28	0
オランダ	9	0	5	0	12	0	26	0
ベルギー	5	0	4	0	7	0	16	0
ニュージーランド	5	0	4	0	7	0	16	0
ノルウェー	6	0	6	0	4	0	16	0
インド	4	0	5	0	3	0	12	0
スイス	6	0	6	0	1	0	13	0
スペイン	1	0	4	0	8	0	13	0
ブラジル	6	0	5	0	0	0	11	0
ポーランド	4	0	1	0	4	0	9	0
チェコスロバキア	3	0	3	0	3	0	9	0
オーストラリア	5	0	2	0	1	0	8	0
台湾	4	0	3	0	1	0	8	0
ハンガリー	4	0	2	0	2	0	8	0
スウェーデン	3	0	1	0	3	0	7	0
インドネシア	2	0	1	0	4	0	7	0
マレーシア	0	0	3	0	4	0	7	0
ブルガリア	3	0	0	0	3	0	6	0
エジプト	3	0	2	0	1	0	6	0
モロッコ	0	0	3	0	2	0	5	0
トルコ	2	0	1	0	1	0	4	0
ポルトガル	2	0	1	0	1	0	4	0
メキシコ	2	0	0	0	2	0	4	0
ロシア連邦	2	0	1	0	0	0	3	0
タイ	2	0	1	0	0	0	3	0
南アフリカ	2	0	0	0	1	0	3	0
アイルランド	2	0	0	0	1	0	3	0
オーストリア	1	0	1	0	1	0	3	0
アルゼンチン	1	0	1	0	1	0	3	0
ギリシャ	0	0	1	0	2	0	3	0
大韓民国	0	0	3	0	0	0	3	0
イラン	1	0	1	0	0	0	2	0
ベトナム	1	0	0	0	1	0	2	0
ペルー	1	0	1	0	0	0	2	0
パキスタン	0	0	1	0	1	0	2	0
チリ	0	0	1	0	1	0	2	0
ユーゴスラビア	0	0	1	0	1	0	2	0
スリランカ	1	0	0	0	0	0	1	0
フィリピン	1	0	0	0	0	0	1	0
グアテマラ	0	0	0	0	1	0	1	0
アルバニア	0	0	0	0	1	0	1	0
アイスランド	0	0	1	0	0	0	1	0
不明	24	0	31	0	29	0	84	0

＊：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50Bq/kgを超えた試料数

：チェルノブイリ事故放射能汚染が比較的少なかった国

原産国別の検出状況を表3に示した．

原産国の明らかな50カ国の食品について検査を行った．アメリカ，フランス，ドイツ連邦，中国，日本，イタリアの順に試料数が多く，これらで全体の50%以上を

占めた．この中で50Bq/kgを超えて検出されたものはフランス産及びイタリア産の各2試料である．

これらはいずれもチェルノブイリ事故の影響により高い放射能汚染を被った国のものであり，今後ともこれらの国のものについては監視対象として注目していく必要がある．

なお，原料を輸入し生産，加工又は製造したものはその国の原産となるので，放射能汚染が比較的少なかった地域の国のものも測定したが，50Bq/kgを超えて検出されるものはなかった．しかし，近年，アジア諸国等で核実験及び核廃棄が行われている現状を考えるとチェルノブイリ事故による影響を受けなかった国のものについても監視する必要があると考える．

4）放射能濃度が50Bq/kgを超えて検出された試料

放射能濃度が50Bq/kgを超えて検出された試料の内訳を表4に，核種同定のための波高分布を図2に示した．^{134}Cs及び^{137}Csの各核種別の検出値は，^{134}Cs及び^{137}Csの合計が100Bq/kgを超えたものについて，都立産業技術研究所で精密検査をして得られたものである．

50Bq/kgを超えた試料は全てキノコであり，ポルチーニ（ヤマドリタケ）2試料，ピエ・ド・ムトン（カノシタ）及びシャンテレール（アンズタケの一種）の計4試料であった．精密検査をしたイタリア産ポルチーニ及びフランス産ピエ・ド・ムトンを写真1及び2に示した．

シャンテレール及びピエ・ド・ムトンは生鮮品であったが，乾燥品として流通する事を考え，キノコの水分含量を90%とし，試算するとシャンテレール530Bq/kg，ピエ・ド・ムトン1,200Bq/kgとなり暫定限度値を超えてしまう．同種のキノコでも検出限界値以下のものがあることから，これらのキノコは高濃度汚染された土壌で生育したものと思われる．

検疫所においても平成9年度，乾燥キノコのポルチーニから730Bq/kgが検出され積み戻しされた例がある[9]．海藻のウミトラノオはウランの核分裂で生じるテクネチウム99を蓄積する事で知られているが，植物も種によって放射性物質を蓄積するものがあることが知られている．キノコについてもCsを取り込み蓄積すること[10, 11]が報告されていることから，事故後12年を経てもなお暫定限度値を超えるものがあるものと思われる．このようにキノコは一般に放射能を比較的多く検出するものがある事に特に注目し，当分の間は放射能汚染の監視が必要と考える．

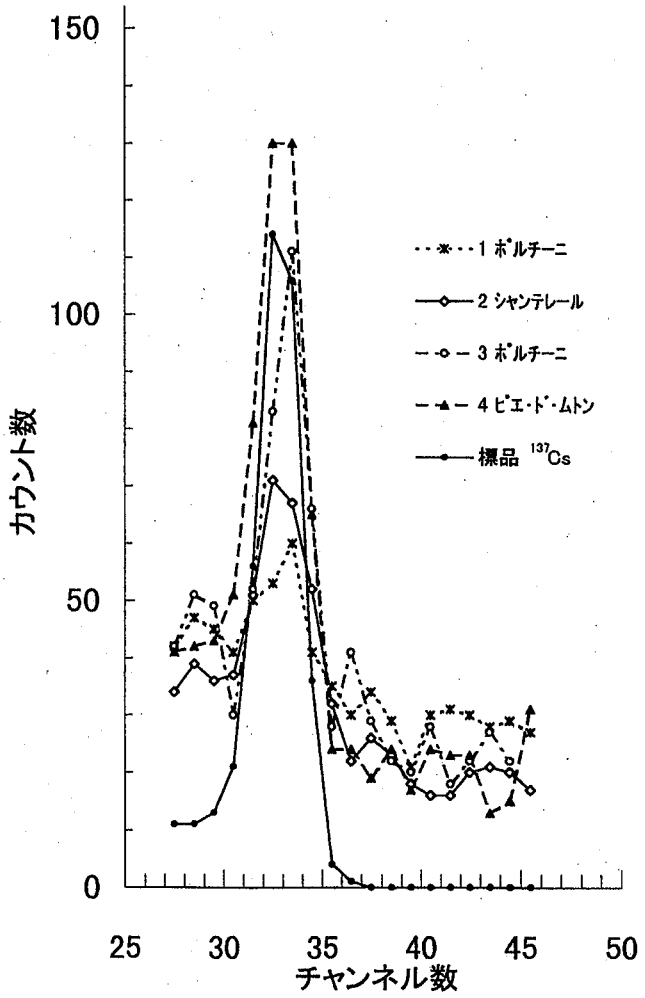


図2．試料及び^{137}Csの波高分布

なお，核種分析では^{134}Csは検出限界以下であり，^{137}Csのみが検出されている．事故当時，^{134}Cs及び^{137}Csの核種の存在比は1：2であった[12]が，半減期から算出すると事故11年後の1997年ではその比は約1：70になり，フランス産ピエ・ド・ムトンの場合，仮に^{134}Csが存在してい

表4．放射能濃度が50Bq/kgを超えた試料の内訳と検出値

No	品　名	検出値（Bq/kg）			原産国	製造または輸入年月日
		^{134}Cs+^{137}Cs	^{134}Cs	^{137}Cs		
1	ポルチーニ(ヤマドリタケ)(干)	53	／	／	イタリア	1995.10.15
2	シャンテレール(アンズタケの一種)(生)	53	／	／	フランス	1996.11.11
3	ポルチーニ(ヤマドリタケ)(干)	88	ND*	88	イタリア	1996.11.15
4	ピエ・ド・ムトン(カノシタ)(生)	120	ND**	120	フランス	1997.11.17

ND*：3.3 Bq/kg以下，ND**：4.8 Bq/kg以下

たとしても2Bq/kg以下と検出限界以下の値となる事が分かる．このように核種の自己崩壊による減衰の為，今後はよりいっそう^{134}Csの検出が困難になり，放射能汚染の源はチェルノブイリ事故によるものか，あるいは過去における核実験のフォールアウトによるものかの判断が難しくなることが示唆される．

まとめ

チェルノブイリ原子力発電所爆発事故による放射能汚染食品の排除及び実態調査のため，平成7年4月から平成10年3月までに都内で流通していた輸入食品等920試料について放射能濃度を調査した．

放射能濃度が50Bq/kgを超えて検出された試料は4試料（0.4%）であり，キノコ類でフランス産のピエ・ド・ムトン（カノシタ）が120Bq/kg及びシャンテレール（アンズタケの一種）が53Bq/kg，イタリア産のポルチーニ（ヤマドリタケ）が88Bq/kg及び53Bq/kgであった．なお，放射能濃度は暫定限度値370Bq/kgを超えて検出されたものはなかった．

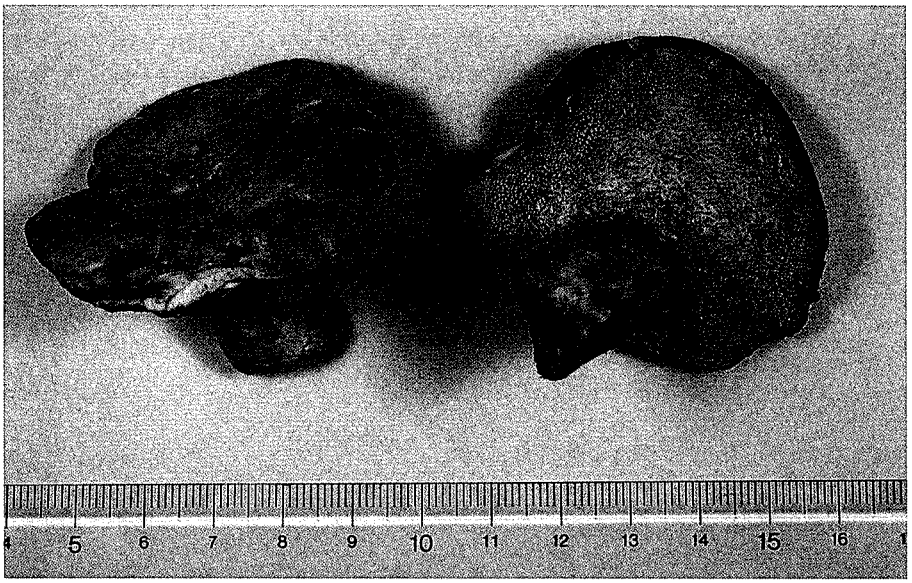
当研究室で100Bq/kgを超えて検出された試料の核種分析では^{137}Csが主であり^{134}Csは検出限界以下であった．

今後，チェルノブイリ事故による放射能汚染の可能性は，キノコ等自然環境に依存度の高い食品において考えられ，その他の食品においてはここ数年間の検出状況からもほとんど無いものと考える．しかし，いまなお検疫所ににおいて放射能汚染の食品が検出される実態や昨年来，核保有国が核実験を行っていることで再度世界的な放射能汚染が懸念され，今後も監視を強化し有害食品の排除に努める必要があると考える．

文献

1）厚生省生活衛生局：食品衛生小六法，平成6年版，2506-2507，1993，新日本法規出版株式会社，東京．
2）観　公子，真木俊夫，永山敏廣，他：東京衛研年報，**41**，113-118，1990．
3）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**42**，152-161，1991．
4）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**43**，142-148，1992．
5）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**44**，166-173，1993．
6）観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**45**，105-109，1994．
7）観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**46**，120-126，1995．
8）厚生省生活衛生局：食品衛生小六法，平成10年版，2234-2235，1997，新日本法規出版株式会社，東京．
9）検疫所における輸入食品の食品衛生法違反事例，厚生省生活環境部食品保健課，事務連絡，平成10年5月26日．
10）Korky J.K., Kowaiki L. ： *J. Agric. Fd.Chem.*, **37**, 568-569，1989．
11）杉山英男：第21回 放医研環境セミナー予稿集，27-28，1993．
12）高谷　幸：食品衛生研究，**39**(10)，15-25，1989．

1．ポルチーニ（ヤマドリタケ）（干）PORCINI SECCHI



2．ピエ・ド・ムトン（カノシタ）（生）PIEDS DO MOUTON

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 157-161, 1998

最近11年間の食物繊維摂取量

齋東由紀*, 牛尾房雄*, 門間公夫*, 市川久次*

Estimation of Daily Intake of Dietary Fiber in the Last 11 Years Using National Nutrition Surveys

YUKI SAITOH*, FUSAO USHIO*, KIMIO MONMA* and HISATUGU ICHIKAWA*

The change in the daily dietary intake of fiber per caput from 1985 to 1995 was calculated using data of the Dietary Fiber Table edited by the Japanese Association of Prefectural and Municipal Public Health and National Nutrition Surveys. Moreover, that of 1995 was also calculated by group of age.

1) The daily dietary intake of fiber per 1000 kcal from 1985 to 1995 was 7.7 ~ 8.3 g (the daily total dietary intake of fiber, 15.8 ~ 16.9 g). That per 1000 kcal was below about 2 g compared with the safe and adequate intake for Japanese.

2) In 1995, the daily dietary intake per caput of fiber for young people (at age of 10's ~ 30's, 16 ~ 17 g) was less than that for middle aged people (older than 40's, 17 ~ 20 g). So a deficiency of dietary fiber intake in young people is inferred.

Keywords：食物繊維dietary fiber, 一日摂取量daily intake, 国民栄養調査national nutrition suveys

はじめに

便秘や大腸癌等の腸疾患，糖尿病等の代謝性疾患との深い関わりから，食生活における食物繊維の重要性が認識されている[1]．今日では，食物繊維含有を強調した食品も多数販売されるようになった．しかしNishimune *et al.*[2]，岡崎ら[3]によれば若年層の，食事からの食物繊維摂取量は10g～12gと依然として少ないとの報告もある．平成９年度の厚生白書[4]では，平成27年には男女とも大腸癌が，癌死亡原因の上位を占めると予測しており，食生活の欧米化がさらに進み，動物性脂肪摂取が増加し，その反面で食物繊維の減少が一因となるとされている．平成2年地方衛生研究所全国協議会（以下地研協議会と略す）では，231種食品と21の食品群の食物繊維成分表（以下地研成分表と略す）を調べ，それを基に国民栄養調査から昭和26年から60年まで，３年から６年の間隔で１日当たりの食物繊維摂取量を推定した[5]．昭和26年の食物繊維摂取量は22.72g，昭和47年では18.76g，昭和60年では17.33gと経年的に明らかな減少傾向が示された．また，池上ら[6]は平成４年に発表された科学技術庁資源調査会編日本食品食物繊維成分表を用いて，国民栄養調査から昭和26年から60年まで，また，平成２年と４年度における１日当たりの食物繊維摂取量を算出している．昭和26年の食物繊維摂取量は23.25g，昭和47年では19.29g，昭和60年では17.22g，平成４年では16.38gと減少傾向を示した．今回我々も地研協議会の地研成分表と国民栄養調査を用いて昭和60年～平成７年までの11年間の１人１日当たりの食物繊維摂取量の算出を試みた．また，平成７年度の国民栄養調査から調査方法が改変され，世帯別から年齢階級別の摂取量を把握することができるようになったので平成７年度においては，年齢階級別１人１日当たりの食物繊維摂取量についても算出した．その結果について報告する．

方　法

１．年度別食物繊維摂取量

地研成分表[5]の値を基に,昭和60年～平成７年までの国民栄養調査[7-17]の食品群別栄養素等摂取量（全国）から

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

Table 1. Changes in Daily Food Intake per Main Food Group and Their Dietary Fiber Every Year

(daily per caput)

Food group		1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995
Rice	A	216.1	212.1	208.8	200.9	198.0	197.9	198.9	197.3	195.4	192.4	167.9
	B	1.48	1.47	1.43	1.39	1.37	1.37	1.38	1.37	1.35	1.33	1.16
	C	8.8	8.9	8.6	8.5	8.2	8.6	8.7	8.4	8.5	8.4	6.8
Wheats	A	92.5	95.0	93.4	86.1	88.3	84.8	87.2	85.3	86.9	86.4	93.7
	B	1.91	1.94	1.92	1.74	1.77	1.70	1.75	1.72	1.75	1.74	1.86
	C	11.3	11.7	11.6	10.6	10.6	10.7	11.1	10.6	11.1	11.0	11.0
Seeds	A	1.4	1.7	1.5	1.5	1.6	1.4	1.4	1.5	1.4	1.7	2.1
	B	0.09	0.11	0.10	0.10	0.11	0.09	0.09	0.10	0.09	0.11	0.14
	C	0.5	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.8
Potatoes	A	65.1	64.4	63.4	66.6	65.3	65.3	68.8	65.0	62.5	62.2	68.9
	B	1.05	0.81	1.02	1.06	1.04	1.03	1.10	1.03	0.99	0.97	1.09
	C	6.2	4.9	6.2	6.5	6.2	6.5	7.0	6.3	6.3	6.1	6.4
Pulses	A	66.6	65.3	64.4	70.7	68.1	68.5	68.6	67.5	65.9	66.8	70.0
	B	1.80	1.75	1.72	1.87	1.82	1.79	1.81	1.77	1.75	1.73	1.74
	C	10.7	10.6	10.4	11.4	10.9	11.3	11.5	10.9	11.1	10.9	10.3
Fruits	A	140.6	137	137.9	124.9	127.9	124.8	112.4	126.1	114.9	117.2	133.0
	B	1.58	1.59	1.56	1.43	1.44	1.42	1.28	1.44	1.31	1.32	1.50
	C	9.4	9.6	9.4	8.7	8.6	9.0	8.1	8.8	8.3	8.3	8.9
Green and	A	73.9	70.9	71.1	72.8	81.1	77.2	73.2	80.9	81.6	81.8	94.0
yellow	B	1.53	1.48	1.44	1.45	1.61	1.53	1.46	1.61	1.61	1.63	1.88
vegetables	C	9.1	8.9	8.7	8.9	9.6	9.7	9.3	9.9	10.2	10.3	11.1
Ofher	A	179.3	180.8	176.0	166.9	172.4	162.8	165.8	177.0	170.2	161.1	184.4
vegetables	B	4.26	4.30	4.22	3.66	3.87	3.61	3.60	4.01	3.75	3.70	4.17
	C	25.2	25.9	25.5	22.4	23.1	22.8	22.8	24.6	23.7	23.4	24.6
Mushrooms	A	9.9	10.1	9.7	9.1	10.2	10.3	10.2	10.7	10.4	10.6	11.8
	B	0.32	0.32	0.31	0.29	0.33	0.33	0.33	0.34	0.33	0.34	0.38
	C	1.9	1.9	1.9	1.8	2.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2
Seaweeds	A	5.6	5.5	5.5	5.9	5.8	6.1	6.1	5.6	5.5	5.8	5.3
	B	1.02	1.01	1.01	1.08	1.06	1.12	1.12	1.02	1.01	1.06	0.97
	C	6.0	6.1	6.1	6.6	6.3	7.1	7.1	6.3	6.4	6.7	5.7

A：amount of food intake（g） B：amount of dietary fiber intake（g） C：% of dietary fiber intake in total one

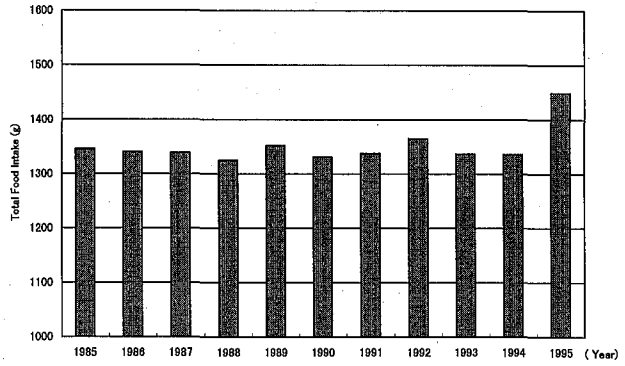


Fig. 1. Change in Daily Total Food Intake per Caput Every Year

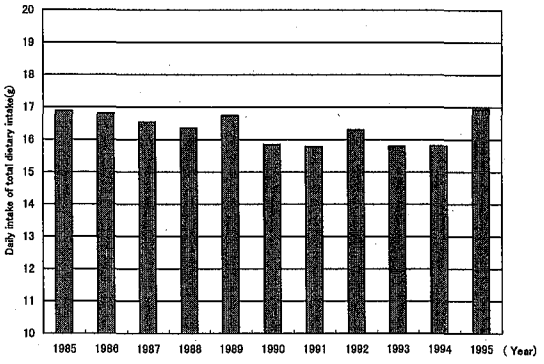


Fig. 2. Change in Daily Intake of Total Dietary Fiber per Caput Every Year

計算し求めた．米加工品群，小麦粉群，いも類加工品群，大豆類群，魚介（生干し，乾物）群，菓子パン群等については，地研成分表に報告されている各々食品群の数値を用い，報告のない食品群については，対象食品（平成7年国民栄養調査食品群別表[17]を参考）の平均値を適応した．また，報告のない食品については類似の食品を適応した．

2．年齢階級別食物繊維摂取量

平成７年度国民栄養調査から年齢階級別の食品群別摂取量が把握された．それを基に食品群別栄養素等摂取量（全国,年齢階級別）を算出し,上記１の方法で算出した．すなわち食品群別栄養素等摂取量（全国）の各食品摂取比率を算出し，年齢階級別の食品群別摂取量に換算して食品群別栄養素等摂取量（全国，年齢階級別）とした．

結果及び考察

1．年度別食物繊維摂取量

Fig. 2に示すごとく，昭和60年（1985年）～平成７年（1995年）までの１人１日当たりの食物繊維摂取量は

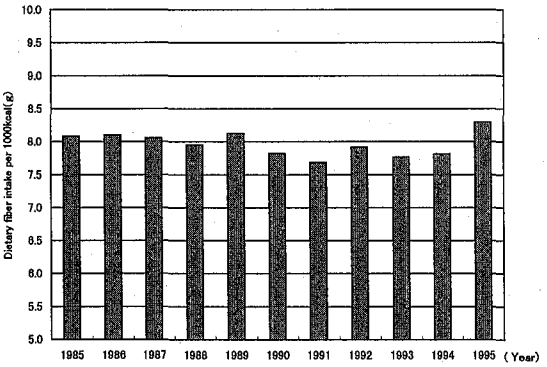


Fig. 3. Change in Daily Fiber Intake per 1000kcal Every Year

Table2. Daily Food Intake Main Food Group and Their Dietary Fiber Every Five Years of Age in 1995

(daily per caput)

Food group		15～19	20～29	30～39	40～49	50～59	60～69	≧70
Rice	A	175.7	170	174.3	178.4	191.9	192.2	173.5
	B	1.21	1.17	1.2	1.23	1.32	1.33	1.2
	C	7.2	7.5	7.2	6.9	6.8	7	7.2
Wheats	A	115.9	102.5	109.9	97.4	87.6	77.5	66
	B	2.29	2.03	2.17	1.93	1.73	1.53	1.31
	C	13.7	12.9	13	10.8	8.9	8	7.8
Seeds	A	2	1.5	1.6	2.2	3.2	2.6	2.6
	B	0.13	0.1	0.11	0.15	0.21	0.17	0.17
	C	0.8	0.6	0.7	0.8	1.1	0.9	1
Potatoes	A	74	60.6	61.9	66.4	72	76	70.8
	B	1.17	0.96	0.98	1.05	1.14	1.2	1.12
	C	7	6.1	5.9	5.9	5.9	6.3	6.7
Pulses	A	55	55	67.9	72.9	86.6	90.6	75.7
	B	1.37	1.37	1.69	1.82	2.16	2.26	1.89
	C	8.2	8.7	10.2	10.2	11.2	11.9	11.3
Fruits	A	131.8	90.2	96.4	135.6	165	172.1	152.9
	B	1.48	1.02	1.09	1.53	1.86	1.94	1.72
	C	8.8	6.5	6.5	8.6	9.6	10.2	10.3
Green and	A	89.1	88.8	92.9	97.3	114.8	110.7	99.4
yellow	B	1.78	1.77	1.86	1.94	2.29	2.21	1.99
vegetables	C	10.6	11.3	11.2	10.9	11.8	11.6	11.9
Ofher	A	170.2	171.7	185.7	206	218	217.1	185
vegetables	B	3.85	3.88	4.2	4.66	4.93	4.91	4.19
	C	23	24.7	25.2	26.1	25.5	25.8	25
Mushrooms	A	11	11.5	11.6	13.6	14.9	14	11.3
	B	0.35	0.37	0.37	0.44	0.48	0.45	0.36
	C	2.1	2.4	2.2	2.5	2.5	2.4	2.2
Seaweeds	A	4.1	4.2	4.8	5.8	6.8	7	6.7
	B	0.75	0.77	0.88	1.06	1.24	1.28	1.23
	C	4.5	4.9	5.3	5.9	6.4	6.7	7.3

A：amount of food intake（g） B：amount of dietary fiber intake（g）
C：% of dietary fiber intake in total one

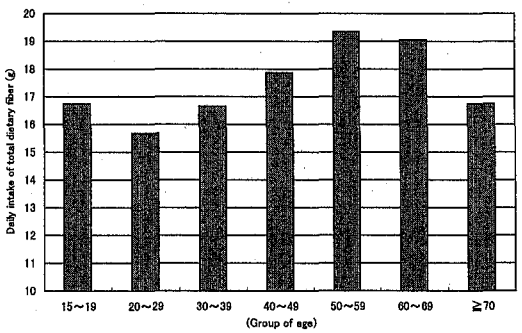


Fig. 4. Daily Intake of Total Dietary Fiber by Group of Age in 1995

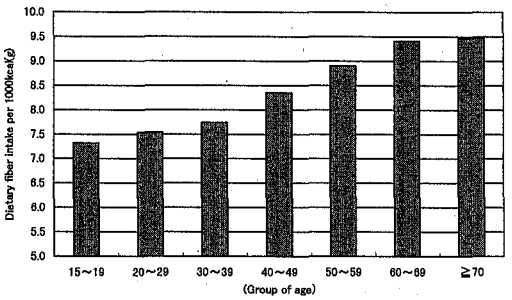


Fig. 5. Dietary Fiber Intake per 1000kcal by Groip of Age in 1995

15.8～16.9gであった．昭和60年～平成元年までの摂取量は16～17g，平成2年～平成6年までの5年間では平成4年（摂取量16.3g）以外は16gを下回る数値であった．なお，平成7年には16.94gと昭和60年からの11年間では，一番高い値であった．平成7年の食品の総摂取量も1449gと過去11年間のうちで最高値を示しており(Fig. 1)，食品総摂取量の増加が平成7年の食物繊維摂取量の増加と結びついたものとも考えられる．平成7年の国民栄養調査からは3日間の食事調査から1日間の調査へと変更されている．小林[18]によると調査日数の短縮は精度確保の上で大きな損失であるとの見解を示している．調査の変更がある種の栄養成分摂取量に影響を及ぼしたことも考えられ，国民栄養調査結果の今後の動向を見る必要がある．

1000kcal当たりの食物繊維量を見ると，昭和60年～平成7年まで7.8～8.3gを示した（Fig. 3）．第5次改定日本人の栄養所要量[19]において，日本人に対する1日当たりの目標摂取量は，成人，児童，高齢者においても1000kcal当たり10gとされており，今回の結果は1000kcal当たり食物繊維摂取量は2g前後不足となった．

Table 1に示すように，各年の食物繊維摂取量を食品群別にみると，いずれの年においても食物繊維摂取量に対する寄与は，「その他の野菜群」が一番多く，比率で25%前後となっており，総摂取量の約1/4を占めている．次いで小麦類，豆類で各10%前後であった．

2．平成7年の年齢階級別食物繊維摂取量

Fig. 4に示すように平成7年の年齢階級別食物繊維摂取量はどの年代も目標摂取量の20g～25gを下回っていたが，年齢層でみると10～30歳代で摂取量が低く，40歳以上で摂取量が多い．20～29歳の摂取量は15.68gと一番低く，一番多く摂取しているのは50～59歳で19.34gであった．平成7年度の国民栄養調査[17]の結果においては，男女共通して10～30歳代ではエネルギーの摂取量の低さが目立っており，栄養素においてカルシウム，鉄は栄養所要量を下回っていた．逆に40歳代以上はエネルギーは適正値であり，各栄養素の摂取状況は所要量を満足していた．岡崎ら[3]は女子大生と高齢者の食物摂取調査を行い比較しているが，脂質以外のエネルギー，他の栄養素，食物繊維摂取量は高齢者の方が多く摂取していたと報告している．我々の食物繊維摂取量の結果も同じ傾向を示した．また，1000kcal当たりの食物繊維摂取量は年齢階級が上昇するに従い多くなり，60～69歳，70歳以上では目標摂取量の10g/1000kcalに近い9.4gであった（Fig. 5）．Nishimune *et al.*[2]は食物繊維摂取量と加齢との間に有意な正相関のあることを指摘している．

Table 2 に示すように各年代の食物繊維摂取量を食品群別にみると，いずれの年代でも，「その他の野菜群」が一番多く，摂取比率で25%前後を示した．しかし，若い年齢層ほど小麦類からの食物繊維摂取量が多いという特徴を示し，10～30歳代では摂取比率の第2位を占めている．若い年齢層では，主食が米からパンやパスタ等小麦を用いた食品への移行がより強いことが示唆される．上記のごとく，10～30歳代でカルシウム，鉄の栄養所要量が下回った．カルシウム，鉄の主要な食品群をみるとカルシウムでは牛乳・乳製品に次いで供給源となっているのは野菜・果実類，豆類である．鉄では野菜・果実類が一番多い供給源となっている．これらの食品群は主要な食物繊維の摂取源でもある．Table 2に示すように40歳代以上に比べて10～30歳代では野菜・果実類，豆類の摂取量が少ないことから，これらの食品群を多く摂取することにより，カルシウム，鉄そして食物繊維の摂取も期待でき，栄養摂取状況の改善も可能となるのではなかろうか．

文　献

1）日本栄養士会編：食物繊維，1-3, 1995, 第一出版, 東京
2）Nishimune T, Sumimoto T, Konishi Y, *et al.*：*J Nutr Sci Vitaminol*, **39**, 263-78, 1993
3）岡崎光子，中村禎子，奥恒行：日本栄養・食糧学会誌, **51**, 47-55, 1998

4）厚生省編：平成9年度厚生白書, **52**, 1997, ぎょうせい, 東京
5）地方衛生研究所全国協議会編：食物繊維成分表, 1990, 第一出版, 東京
6）池上幸江, 大沢佐江子, 山本智子：栄養学雑誌, **54**, 195～204, 1996
7）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状　昭和60年国民栄養調査成績, 1987, 第一出版, 東京
8）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状　昭和61年国民栄養調査成績, 1988, 第一出版, 東京
9）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状　昭和62年国民栄養調査成績, 1989, 第一出版, 東京
10）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状　昭和63年国民栄養調査成績, 1990, 第一出版, 東京
11）厚生省保健医療局健康増進栄養課編：国民栄養の現状　平成元年国民栄養調査成績, 1991, 第一出版, 東京
12）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：国民栄養の現状　平成2年国民栄養調査成績, 1992, 第一出版, 東京
13）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：国民栄養の現状　平成3年国民栄養調査成績, 1993, 第一出版, 東京
14）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：国民栄養の現状　平成4年国民栄養調査成績, 1994, 第一出版, 東京
15）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：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
16）厚生省保健医療局健康増進栄養課監修：国民栄養の現状　平成6年国民栄養調査成績, 1996, 第一出版, 東京
17）厚生省保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室監修：国民栄養の現状　平成7年国民栄養調査成績, 1997, 第一出版, 東京
18）小林修平：栄養学レビュー, **55**, 68～74, 1998
19）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, 1994, 第一出版, 東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 162-167, 1998

食品用天然着色料中の重金属及びヒ素含有量

安野哲子*, 伊藤弘一*2, 萩原輝彦*, 広門雅子*3,
船山恵市*, 鈴木助治*4, 斉藤和夫*

Contents of Heavy Metals and Arsenic in Natural Colour Preparations for Food Processing

TETSUKO YASUNO*, KOICHI ITO*2, TERUHIKO HAGIWARA*, MASAKO HIROKADO*3,
KEIICHI FUNAYAMA*, SUKEJI SUZUKI*4 and KAZUO SAITO*

Keywords：重金属 heavy metal, 水銀 mercury, 鉛 lead, カドミウム cadmium, クロム chromium, マンガン manganese, ヒ素 arsenic, 天然着色料 natural colour

緒　言

平成7年5月に食品衛生法が改正され（法律第101号），従来指定制度の枠外におかれていた天然添加物が化学的合成品と同じように指定制度に組み込まれることになった．すなわち，新しい天然添加物が開発された場合は，指定添加物として認可されなければ使用できないことになった．しかし，これまで使用されていた天然添加物は，安全性の見直しをするという条件のもとではあるが，規格基準が整備されないまま引き続き使用が認められることになった[1]．このような状況の中で，9年3月，天然着色料のアナトー色素が水銀（0.83～1.01 ppm）に汚染されているとの報道が一部にあった[2]．植物などを原料とする天然着色料は土壌等の環境から重金属類に汚染される可能性が考えられる．そこで，天然着色料中の重金属類の含有量レベルを把握するために，今回，アナトー色素など8種類の天然着色料を対象にして，水銀，鉛，カドミウム，クロム，マンガン，及びヒ素の6元素について調査を行ったので，その結果を報告する．

実　験

1．試料　平成9年度に添加物メーカー及び卸売業から入手した天然着色料8種類（アナトー色素，ウコン色素，エルダーベリー色素，コチニール色素，抽出カロテン，トウガラシ色素，ブドウ果皮色素，ベニコウジ色素）の57製品を試料とした．試料の内訳，形態，及び表示成分を表1に示した．

2．試薬　水銀測定用添加剤B及びM：日本インスツルメンツ（株）製．L-システイン塩酸塩一水和物，硝酸（比重1.42），過硫酸アンモニウム，アンモニア水，酢酸，酢酸ナトリウム，硝酸マグネシウム，エタノール，塩酸，ヨウ化カリウム：和光純薬工業（株）製特級．N,N-ジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム三水和物（DDTC），4-メチル-2-ペンタノン（MIBK）：和光純薬工業（株）製原子吸光分析用．水銀標準液：和光純薬工業（株）製原子吸光分析用（100mg/L）．鉛，カドミウム，クロム，マンガン，ヒ素の各標準液：関東化学（株）製原子吸光分析用（各1,000mg/L）．0.001%L-システイン溶液：L-システイン塩酸塩一水和物10mgを水に溶かし，硝酸2 mlを加え，水で1,000mlとした．酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）：1 M酢酸59mlと1 M酢酸ナトリウム溶液141mlを混和し，pHメータでpH5.0に調整した．

3．装置　水銀測定装置：日本インスツルメンツ（株）製マーキュリーSP-3D型，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，原子吸光光度計：（株）日立製作所製Z-5300型（水素化物発生装置HFS-3型付）．

4．分析法

1）水銀　水銀は金アマルガム原子吸光光度法により定

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
*2　東京都立衛生研究所環境保健部
*3　東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
*4　東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科

表1．分析試料

種類	No.	形態	表示成分
アナトー色素	1	液状	アナトー色素73%，グリセリン16%，エタノール11%
(6社)	2	液状	アナトー色素73%，グリセリン12%，エタノール15%
	3	液状	アナトー色素60.0%，食品素材（デキストリン）30.0%，エタノール10.0%
	4	液状	アナトー色素89.7%，ショ糖脂肪酸エステル0.3%，エタノール10.0%
	5	液状	アナトー色素73%，グリセリン16%，エタノール11%
	6	液状	アナトー色素85%，プロピレングリコール15%
	7	液状	アナトー色素82%（ノルビキシンとして2%），プロピレングリコール15%，L-アスコルビン酸1%，エタノール2%
ウコン色素	1	液状	ウコン色素45%，エタノール55%
(4社)	2	液状	ウコン色素5%，グリセリン50%，エタノール45%
	3	液状	ウコン色素5%，プロピレングリコール95%
	4	液状	ウコン色素30.0%，エタノール70.0%
エルダーベリー色素	1	液状	エルダーベリー色素85.0%，クエン酸（結晶）10.0%，エタノール5.0%
(4社)	2	液状	エルダーベリー色素75%，クエン酸（結晶）5%，エタノール20%
	3	液状	エルダーベリー色素85%，クエン酸（結晶）10%，エタノール5%
	4	液状	エルダーベリー色素84.0%，クエン酸（結晶）1.0%，エタノール15.0%
	5	液状	エルダーベリー色素84.0%，クエン酸（結晶）1.0%，エタノール15.0%
コチニール色素	1	粉末	コチニール色素13%，L-酒石酸ナトリウム56%，硫酸アルミニウムカリウム（乾燥）23%，炭酸ナトリウム（無水）8%
(7社)	2	液状	コチニール色素82.0%，プロピレングリコール15.0%，クエン酸（結晶）3.0%
	3	液状	コチニール色素85%，プロピレングリコール15%
	4	液状	コチニール色素87.5%，クエン酸（結晶）2.5%，エタノール10.0%
	5	粉末	不明
	6	液状	コチニール色素18%，プロピレングリコール15%，クエン酸（結晶）3%，水64%
	7	粉末	不明
	8	液状	コチニール色素20.0%，クエン酸（結晶）0.2%，エタノール15.0%
抽出カロテン	1	液状	抽出カロチン35%，抽出トコフェロール0.5%
(4社)	2	液状	藻類カロチン50.0%，その他食品素材50.0%
	3	液状	デュナリエラカロテン30.0%，ミックストコフェロール0.5%，食用油69.5%
	4	液状	パーム油カロテン30%，食品素材（植物油）70%
	5	液状	デュナリエラカロテン20.0%，抽出トコフェロール0.5%，食品素材79.5%
トウガラシ色素	1	粉末	パプリカ色素10%，アラビアガム40%，デキストリン50%
(10社)	2	液状	パプリカ色素85%，抽出ビタミンE1%，食品素材14%
	3	液状	パプリカ色素30%，D-ソルビトール30.8%，グリセリン30.8%，レシチン5%，抽出トコフェロール2%，ショ糖脂肪酸エステル1.1%，エタノール0.3%
	4	液状	パプリカ色素21.4%，グリセリン62.8%，グリセリン脂肪酸エステル3.7%，抽出トコフェロール0.5%，食品素材11.6%
	5	液状	パプリカ色素50%
	6	液状	パプリカ色素95%，抽出トコフェロール5%
	7	液状	パプリカ色素75%，その他食品素材25%
	8	液状	パプリカ色素99.8%，ローズマリー抽出物0.1%，ミックストコフェロール0.1%
	9	液状	パプリカ色素30%，D-ソルビトール30.8%，グリセリン30.8%，レシチン5%，抽出トコフェロール2%，ショ糖脂肪酸エステル1.1%，エタノール0.3%
	10	液状	トウガラシ色素98%，ミックストコフェロール2%
	11	液状	パプリカ色素99.8%，ローズマリー抽出物0.2%
	12	液状	不明
	13	液状	不明
ブドウ果皮色素	1	液状	ブドウ果皮色素85%，プロピレングリコール15%
(2社)	2	粉末	不明
	3	粉末	不明
ベニコウジ色素	1	液状	紅麹色素100%（エタノール50%含有）
(9社)	2	液状	紅麹色素100%（エタノール50%含有）
	3	液状	紅麹色素100%（エタノール50%含有）
	4	液状	紅麹色素100%（エタノール55.0%含有）
	5	液状	紅麹色素100%（エタノール50%含有）
	6	液状	紅麹色素100%（エタノール50%含有）
	7	液状	ベニコウジ色素100%（エタノール50%含有）
	8	液状	紅麹色素45%，エタノール55%
	9	液状	紅麹色素45%，エタノール55%
	10	液状	ベニコウジ色素45%，エタノール55%
	11	液状	不明
	12	液状	不明

量した[3]．試料約0.1gをサンプルボートに精密に量り，分解のための加熱条件を第一段階（350℃）は昇温時間4分，第二段階（700℃）は昇温時間6分とし，以下，装置の常法に従って測定した．サンプルボートには試料のほか，水分や酸性ガスを吸収するために添加剤B（活性アルミナ，以下Bとする）及び添加剤M（炭酸ナトリウムと水酸化カルシウム1：1の混合物，以下Mとする）を層状に加えた．なおブランク，標準溶液，液状試料，粉末試料により添加剤の使用方法は，図1のように行った．

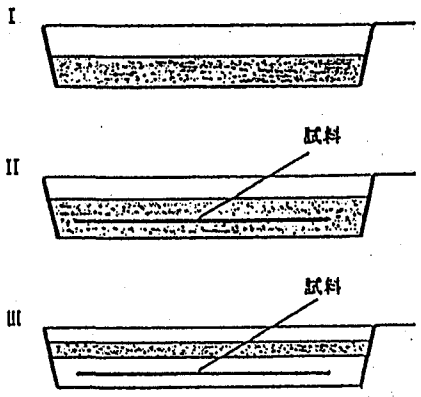


図1．水銀測定時の添加剤の加え方
Ⅰ：ブランク
Ⅱ：標準溶液又は液状試料
Ⅲ：粉末試料
▨：添加剤B，□：添加剤M

すなわち，ブランクは添加剤のみで下層にB，上層にMの二層とした．標準溶液及び液状試料の場合はサンプルボートの最下層にB，次いで標準溶液又は試料，再びB，上層にMの順に加えた．粉末試料の場合は下からM，試料，M，B，Mの順に加えた．また，サンプルボート及び添加剤はあらかじめ電気炉で700℃，7時間以上加熱して空焼きし，測定の直前に取り出して放冷したものを使用した．標準溶液は水銀標準液を0.001%L-システイン溶液で0.1μg/mlとなるように希釈して調製した．ブランク及び標準溶液10，50，100μl（それぞれ1，5，10ngに相当する）であらかじめ金アマルガム原子吸光光度法により吸光度を測定して検量線を作成し，試料の定量を行った．

2）鉛，カドミウム，クロム，マンガン　試料を効率良く処理するために，鉛，カドミウム，クロム，マンガンは多元素の同時分析が可能なICP発光分光分析法により定量した[3,4]．ただし，試料溶液中の塩類濃度が高いと物理干渉や分光干渉による分析誤差を生じたり，トーチが急速に劣化して破損することがあるため，塩類濃度の高い一部の試料（強熱残留物[5]が1%以上のもの）については原子吸光光度法により定量した[3,6]．

①ICP発光分光分析法　試料約10gを精密に量り，ホットプレート上で炭化したのち電気炉に入れ，500℃で一夜加熱して灰化した．炭化物が残る場合は少量の硝酸（1→2）で潤し，再び500℃で加熱して灰化した．灰化後，残留物に硝酸（1→2）5～10mlを加えて水浴上で蒸発乾固し，次いで硝酸（1→100）10.0mlを加えて溶解し，これを試験溶液とした．不溶物がある場合は0.45μmのプレフィルターでろ過した．標準溶液は4元素それぞれの標準液を硝酸（1→100）で各10μg/mlとなるように混合希釈して調製した．硝酸（1→100）をブランクとして標準混合溶液との2点であらかじめICP発光分光分析法により発光強度を測定して検量線を作成し，試験溶液の定量を行った．

②-1　原子吸光光度法（鉛，カドミウム，クロム）　試料約10gを精密に量り，ICP発光分光分析法の場合と同様に灰化した．灰化後，硝酸（1→2）5～10mlを加えて水浴上で蒸発乾固し，次いで硝酸（1→100）10mlを加えて10～20分間放置した．次に5%過硫酸アンモニウム溶液1mlを加え，アンモニア水（1→2）でpH4に調整した後直ちに時計皿でふたをし，沸騰水浴上で15分間加熱して酸化を進めた．放冷後分液ロートに移して酢酸－酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）5mlを加え，更に水を加えて全量を60mlとした．これに2%DDTC溶液5mlを加えて5分間放置し，MIBK10.0mlで3分間振とう抽出して試験溶液とした．標準溶液は3元素それぞれの標準液を硝酸（1→100）で鉛及びカドミウムは各10μg/ml，クロムは50μg/mlとなるように混合希釈して標準混合溶液を調製した．硝酸（1→100）をブランクとして標準混合溶液0.2，0.4，0.6，0.8，1.0mlに硝酸（1→100）10ml及び5%過硫酸アンモニウム溶液1mlを加え，以下試料と同様に操作して得た抽出液であらかじめ原子吸光光度法により吸光度を測定して検量線を作成し，試験溶液の定量を行った．

②-2　原子吸光光度法（マンガン）　試料約10gを精密に量り，①と同様に灰化等の処理をして試験溶液を調製した．標準溶液はマンガン標準液を硝酸（1→100）で0.2，0.4，0.6，0.8，1.0μg/mlとなるように希釈して調製した．硝酸（1→100）をブランクとして標準溶液であらかじめ原子吸光光度法により吸光度を測定して検量線を作成し，試験溶液の定量を行った．

3）ヒ素　ヒ素は水素化物原子吸光光度法により定量した[3,5]．試料約1gを精密に量り，硝酸マグネシウムのエタノール溶液（1→50）20mlを加え，エタノールに点

火して燃焼させたのち，電気炉に入れ，徐々に温度を上げて500℃で一夜加熱し灰化した．炭化物が残る場合は少量の硝酸で潤し，再び500℃で加熱して灰化した．灰化後，残留物に塩酸6 ml及び水20mlを加えて水浴上で約10mlになるまで濃縮し，次いで必要あればろ過して水で50.0mlとし，試料溶液とした．試料溶液10.0mlに塩酸5 ml及び20%ヨウ化カリウム溶液2.5mlを加えて水で25.0mlとし，試験溶液とした．標準溶液はヒ素標準液を水で0.2 μg/mlとなるように希釈して調製した．水をブランクとして標準溶液0.05，0.1，0.5，1.0mlを試料溶液と同様に操作して得た液であらかじめ水素化物原子吸光光度法により吸光度を測定して検量線を作成し，試験溶液の定量を行った．

結果及び考察

天然着色料8種類57製品について6元素の定量を行い，その結果を表2に示した．なお，各元素の定量限界は，水銀が0.01 μg/g，鉛0.10 μg/g，カドミウム0.01 μg/g，クロム0.05 μg/g，マンガン0.01 μg/g，ヒ素0.05 μg/gであった．

1．6元素の含有量

1）アナトー色素　6社7製品について分析した．水銀が1製品から0.04 μg/g検出されたほか，クロムが6製品から0.06～0.13 μg/gの範囲で，マンガンが7製品から0.02～0.12 μg/gの範囲で検出された．鉛，カドミウム，ヒ素は7製品とも定量限界以下であった．

2）ウコン色素　4社4製品について分析した．クロムが2製品から0.08及び0.10 μg/g検出された．また，マンガンが3製品から0.10～0.48 μg/gの範囲で検出された．水銀，鉛，カドミウム，ヒ素は4製品とも定量限界以下であった．

3）エルダーベリー色素　4社5製品について分析した．鉛が2製品からそれぞれ0.17 μg/g検出されたほか，クロムが4製品から0.10～0.30 μg/gの範囲で，マンガンが5製品から0.04～0.72 μg/gの範囲で検出された．また，ヒ素が2製品から0.10及び0.14 μg/g検出された．水銀，カドミウムは5製品とも定量限界以下であった．

4）コチニール色素　7社8製品について分析した．鉛，カドミウム，ヒ素がそれぞれ1製品から0.51 μg/g，0.07 μg/g，1.5 μg/g検出された．また，クロムが7製品から0.09～3.4 μg/gの範囲で，マンガンが8製品から0.03～9.9 μg/gの範囲で検出された．水銀は8製品とも定量限界以下であった．

5）抽出カロテン　4社5製品（デュナリエラカロテン3，パーム油カロテン1，原料不明1）について分析した．鉛が1製品から0.37 μg/g検出されたほか，クロムが3製品から0.09～20 μg/gの範囲で，マンガンが4製品から0.02～2.9 μg/gの範囲で検出された．また，ヒ素が2製品から0.16及び0.25 μg/g検出された．水銀，カドミウムは5製品とも定量限界以下であった．

6）トウガラシ色素　10社13製品について分析した．鉛が2製品から0.13及び0.27 μg/g，カドミウムが1製品から0.02 μg/g検出されたほか，クロムが8製品から0.06～0.29 μg/gの範囲で，マンガンが13製品から0.03～1.7 μg/gの範囲で検出された．水銀，ヒ素は13製品とも定量限界以下であった．

7）ブドウ果皮色素　2社3製品について分析した．鉛，クロム，マンガンがそれぞれ3製品から0.25～1.4 μg/g，0.54～4.2 μg/g，21～37 μg/gの範囲で検出された．また，ヒ素が2製品から0.10及び0.49 μg/g検出された．水銀，カドミウムは3製品とも定量限界以下であった．

8）ベニコウジ色素　9社12製品について分析した．クロムが3製品から0.07～0.86 μg/gの範囲で検出された．水銀，鉛，カドミウム，マンガン，ヒ素は12製品とも定量限界以下であった．

2．含有量と規格値との比較　今回定量した天然着色料中の6元素の含有量を関連規格の規格値と比較した．現在わが国では天然着色料には規格が設定されていないが，平成10年秋に発行が予定されている第七版食品添加物公定書に，今回分析した天然着色料のうちウコン色素，コチニール色素，抽出カロテン（デュナリエラカロテン，ニンジンカロテン，パーム油カロテン），トウガラシ色素，ブドウ果皮色素，ベニコウジ色素の6種類の規格が収載されるよう準備が進められている[7]．その他天然着色料に関する規格には日本食品添加物協会の自主規格[8]，米国のFCC（Food Chemicals Codex）規格[9]，国際的なJECFA（Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives）規格[10]などがある．これらの規格では鉛とヒ素に規格値が定められており，その規格値を表3に示した．今回の調査では鉛及びヒ素の最大値は各々1.4 μg/g，1.5 μg/gであり，いずれもこれらの規格値以下であった．これらの規格で規格値が定められていない水銀，カドミウム，クロム，マンガンについては，他の天然着色料やわが国の食品又は合成食品添加物の規格値[11]を参考にした．水銀は全試料中1試料から0.04 μg/g検出されたが，天然着色料のカラメルにFCC規格[9]で規格値が設定されており，この規格値の0.1mg/kg以下であった．また，全試料中カドミウム，クロム，マンガンはそれぞれ最高で0.07 μg/g，20 μg/g，37 μg/g検出されたが，食品や

表2．食品用天然着色料中の重金属及びヒ素含有量

種類	No.	水銀	鉛	カドミウム	クロム	マンガン	ヒ素	強熱残留物[g]
		μg/g	μg/g	μg/g	μg/g	μg/g	μg/g	%
アナトー色素	1	ND[a]	ND[b]	ND[c]	ND[d]	0.08	ND[f]	1.5
	2	0.04	ND	ND	0.09	0.11	ND	3.6
	3	ND	ND	ND	0.13	0.03	ND	1.0
	4	ND	ND	ND	0.06	0.02	ND	1.2
	5	ND	ND	ND	0.08	0.12	ND	1.6
	6	ND	ND	ND	0.06	0.03	ND	1.3
	7	ND	ND	ND	0.09	0.04	ND	2.0
ウコン色素	1	ND	ND	ND	ND	0.20	ND	0.29
	2	ND	ND	ND	ND	0.10	ND	0.05
	3	ND	ND	ND	0.10	0.48	ND	0.02
	4	ND	ND	ND	0.08	ND[e]	ND	0.02
エルダーベリー色素	1	ND	0.17	ND	0.3	0.65	0.14	0.40
	2	ND	ND	ND	0.11	0.72	ND	0.15
	3	ND	0.17	ND	0.28	0.43	ND	0.43
	4	ND	ND	ND	ND	0.04	0.10	0.31
	5	ND	ND	ND	0.10	0.49	ND	0.33
コチニール色素	1	ND	ND	ND	0.50	0.27	ND	67
	2	ND	ND	ND	3.4	0.33	ND	0.6
	3	ND	ND	ND	0.16	0.03	ND	1.4
	4	ND	ND	ND	0.17	0.04	ND	0.16
	5	ND	ND	ND	0.09	0.08	ND	0.51
	6	ND	ND	ND	0.10	0.03	ND	0.37
	7	ND	0.51	0.07	0.40	9.9	1.5	4.3
	8	ND	ND	ND	ND	6.5	ND	1.8
抽出カロテン	1	ND	ND	ND	ND	0.27	ND	0.04
	2	ND	ND	ND	0.09	0.02	ND	0.03
	3	ND	0.37	ND	20	2.9	0.25	0.98
	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.02
	5	ND	ND	ND	0.13	0.42	0.16	0.22
トウガラシ色素	1	ND	ND	ND	0.17	1.7	ND	1.3
	2	ND	ND	0.02	ND	0.22	ND	0.06
	3	ND	ND	ND	0.09	0.06	ND	0.33
	4	ND	ND	ND	ND	0.08	ND	0.06
	5	ND	ND	ND	0.08	0.05	ND	0.03
	6	ND	ND	ND	0.29	0.07	ND	0.06
	7	ND	0.27	ND	ND	0.06	ND	0.05
	8	ND	ND	ND	0.06	0.18	ND	0.20
	9	ND	ND	ND	0.10	0.16	ND	0.37
	10	ND	0.13	ND	ND	0.03	ND	0.08
	11	ND	ND	ND	0.07	0.17	ND	0.21
	12	ND	ND	ND	0.07	0.28	ND	0.21
	13	ND	ND	ND	ND	0.06	ND	0.11
ブドウ果皮色素	1	ND	0.67	ND	4.2	21	0.49	2.9
	2	ND	0.25	ND	0.59	37	0.10	5.9
	3	ND	1.4	ND	0.54	37	ND	6.0
ベニコウジ色素	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.38
	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.34
	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.47
	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.66
	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.37
	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.37
	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.36
	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.64
	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.43
	10	ND	ND	ND	0.07	ND	ND	0.49
	11	ND	ND	ND	0.86	ND	ND	0.57
	12	ND	ND	ND	0.08	ND	ND	0.57

a：0.01以下，b：0.10以下，c：0.01以下，d：0.05以下，e：0.01以下，f：0.05以下
g：第六版食品添加物公定書の方法に従った．

合成添加物の規格値（カドミウム：米 1.0ppm未満，クロム：食用赤色106号 25μg/g以下，マンガン：食用赤色106号 50μg/g以下）を超えるものはなかった．以上のことから，今回分析した8種類57製品の天然着色料では水銀，鉛，カドミウム，クロム，マンガン，ヒ素について衛生行政上問題となるものはなかった．しかし，一般に天然着色料は化学的合成品に比較して食品への添加量が多いこと，また，低い値であったがアナトー色素1試料より水銀が検出されたことなどから，今後も引き続き調査を行い，安全性を確認していく必要があると考える．

表3．食品用天然着色料における鉛及びヒ素の規格値

種類	規格	規格値	
		鉛	ヒ素
アナトー色素	第七版[*1]予定規格		
	日添協[*2]自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC[*3]規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
	JECFA[*4]規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
ウコン色素	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格	5mg/kg以下	
	JECFA規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
エルダーベリー色素	第七版予定規格		
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格		
	JECFA規格		
コチニール色素	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格		
	JECFA規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
抽出カロテン	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格		
	JECFA規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
トウガラシ色素	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格	5mg/kg以下	
	JECFA規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
ブドウ果皮色素	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格	10mg/kg以下	1mg/kg以下
	JECFA規格	10mg/kg以下	3mg/kg以下
ベニコウジ色素	第七版予定規格	10μg/g以下	4.0μg/g以下[*5]
	日添協自主規格		4μg/g以下[*5]
	FCC規格		
	JECFA規格		

*1：第七版食品添加物公定書
*2：日本食品添加物協会
*3：Food Chemicals Codex
*4：Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
*5：三酸化二ヒ素（As_2O_3）として

まとめ

天然着色料中の重金属類の含有量レベルを調査する目的で，8種類の天然着色料（アナトー色素，ウコン色素，エルダーベリー色素，コチニール色素，抽出カロテン，トウガラシ色素，ブドウ果皮色素，ベニコウジ色素）57製品について水銀，鉛，カドミウム，クロム，マンガン，及びヒ素を定量した．その結果，水銀は全試料中1試料から0.04μg/g検出され，鉛，カドミウム，クロム，マンガン，ヒ素は全試料中最高でそれぞれ1.4μg/g，0.07μg/g，20μg/g，37μg/g，1.5μg/g検出された．これら6元素の含有量を平成10年秋に制定される予定の公定書規格[7]，日本食品添加物協会自主規格[8]，米国のFCC規格[9]，国際的なJECFA規格[10]，食品や合成食品添加物の規格値[11]と比較した．今回調査した6元素の含有量はいずれもこれらの規格値以下であり，衛生行政上問題となるものはなかった．

文献

1）厚生省生活衛生局長通知衛化第56号，5月23日，1996.
2）赤旗，3月24日，1997.
3）日本薬学会編：衛生試験法・注解（付．追補），1990（1995），金原出版，東京.
4）池辺克彦，西宗高弘，田中凉一：食衛誌，**31**，382-393，1990.
5）第六版食品添加物公定書，1992，日本食品添加物協会，東京.
6）西垣　進，田村行弘，真木俊夫，他：東京衛研年報，**24**，231-237，1972.
7）食品添加物公定書第七版各条等検討会報告，4月30日，1998.
8）第一版化学的合成品以外の食品添加物自主規格，1991，日本食品添加物協会，東京.
9）*Food Chemicals Codex 4th ed.*, 1996, National Academy Press, Washington, D. C..
10）*FAO Food and Nutrition Paper*, **52**, 1992, FAO of the United Nations, Rome.
11）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法平成10年版，1997，新日本法規出版，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 168-171, 1998

輸入チーズ中のナタマイシンの検出と確認

藤沼賢司*, 竹葉和江*, 宮崎奉之*

Determination and Confirmation of Natamycin in Imported Cheese

KENJI FUJINUMA*, KAZUE TAKEBA*
and TOMOYUKI MIYAZAKI*

Keywords：ナタマイシン natamycin，ピマリシン pimaricin，抗生物質 antibiotics，チーズ cheese，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 photodiode array detecter

緒　言

ナタマイシンは，1955年に南アフリカ共和国Natal地方のPietermaritzburgの土壌から分離された放線菌 *Streptomyces natalensis* の生産するポリエンマクロライド系抗生物質でピマリシン（Pimaricin）と呼ばれることもある（図1）.

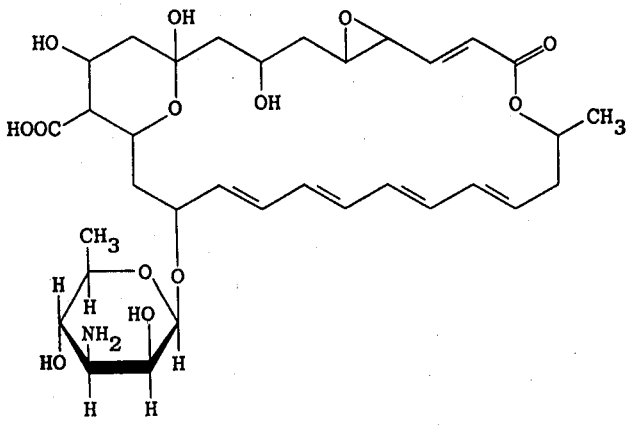


図1．ナタマイシンの構造

ナタマイシンはカビ，酵母などに対して発育阻害作用を有するため，ナチュラルチーズ及びドライソーセージの保存料（成熟中の表面防かび剤）として世界各国で使用されている．例えば，ＥＵでは，チーズの表面処理剤として，表面1 dm^2（100cm^2）当たり2 mgまでの範囲で使用が認められている．しかし，我が国においてはナタマイシンの食品への使用は認められていない.

平成９年９月から同年12月にかけて都内で収去された輸入チーズ44検体について，ナタマイシンを検査したところ，14検体からナタマイシンが検出され，また，ナタマイシン検出チーズを用いて検出値の部位差について検討したところ若干の知見を得たので，併せて報告する.

なお，チーズ中のナタマイシンの分析法については，分光光度法[1-3,7]，高速液体クロマトグラフ法（HPLC）[1,2,4-7]による方法等が報告されているが，著者らは，乳及び乳製品の国際的な標準検査法である国際酪農連盟IDF STANDARD 140：1987「チーズ及びチーズリンド中のナタマイシンの定量法（分光光度法及びＨＰＬＣ法）」[7]に準じ、試験溶液の調製及びHPLCにより分析を行った.

実験方法

1．試料

都内の輸入商社及び乳製品製造業（小分け製造）より食品機動監視班により収去されたチーズ44検体（オランダ産：27，イタリア産：5，スイス産：４，ノルウェー産：３，ドイツ産：２，デンマーク産：２，フランス産：１）を用いた.

2．試薬

１）ナタマイシン標準溶液：Gist Brocades社製ナタマイシン標準品10 mgを精秤後，メタノールに溶解し，全量を20mlとしたものをナタマイシン標準原液とした（500 μg/ml）．用時，標準原液をメタノール・水（２：１）混液で希釈し，2.5，5.0 μg/mlになるように調製したものをHPLC用標準溶液とした.

２）メタノールはHPLC用，酢酸は特級品を用いた.

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

3．装置

1）フォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフ：日本分光製PU-980型ポンプ，同AS-950-10型オートサンプラー，同CO-965型カラム恒温槽，同MD-915型フォトダイオードアレイ検出器，DEC社製Venturis FX-2型パーソナルコンピューター．

2）ホモジナイザー：ストマッカー400型（A. J. Seword. UAC House 社製）．

4．ＨＰＬＣ分析条件

カラム：L-column ODS (4.6 i.d. x 150mm，化学品検査協会製)

移動相：メタノール・水・酢酸（50：50：5，V/V/V）

流速：1.0ml/min

カラム温度：40℃

注入量：10μl

検出波長：304nm

スペクトル測定波長範囲：250 ～ 350 nm

5．試験溶液の調製

ワックスがある場合はそれを取り除いた後，チーズ表面の幅が約１cm以下になるようにチーズを裁断した．そこからチーズの外皮の厚さが５mmになるように製図用のデバイダーを用いて両側にけがきを入れた後，ナイフを用いけがきに沿って厚さ５mmの外皮を切り取った．得られた外皮を細切し，抽出用試料とした．

抽出用試料10gをストマッカー用検体バッグに秤取り，メタノール50mlを加えた後，ホモジナイザー（ストマッカー）を用い５～10分間粉砕抽出した．その後，水25mlを加え，混和した後，-20℃の冷凍庫内に約60分間放置した．冷抽出液をろ紙ろ過し，ろ液（初流の５mlは捨てる）を分取した．さらに，0.45及び0.25μmのメンブランフィルターを用いろ過し，HPLC用試験溶液とした．

結果及び考察

1．輸入チーズの分析結果

平成９年９月から同年12月に都内で収去されたナチュラルチーズ44検体についてのナタマイシンの分析結果を表１及び２に示した．

44検体中14検体から，2.6～35μg/gのナタマイシンが検出された．原産国別では，オランダ産13検体，ノルウェー産1検体から検出され，イタリア産，スイス産，デンマーク産，ドイツ産，フランス産からは検出されなかった（表１）．

チーズはその水分含量によって，超硬質，硬質，半硬質及び軟質に分類される．この分類別にナタマイシンの検出状況を見てみると，検出されたのはすべて硬質タイプであり，その内訳はゴーダチーズ11検体，エダムチーズ２検体，リダーチーズ１検体であった（表２）．

表１．チーズの原産国別に見たナタマイシン検出状況

国　名	検体数	ナタマイシン 検出検体数	ナタマイシン 濃度(μg/g)
イタリア	5	0	
オランダ	27	13	2.6～35
スイス	4	0	
デンマーク	2	0	
ドイツ	2	0	
ノルウェー	3	1	5.8
フランス	1	0	
合　計	44	14	

表２．チーズの分類別に見たナタマイシン検出状況

分　類	検体数	ナタマイシン 検出検体数	ナタマイシン 濃度(μg/g)
超硬質	4	0	
硬　質	36	14	2.6～35
半硬質	3	0	
軟質～半硬質	1	0	
合　計	44	14	

ＥＵにおけるナタマイシンの基準値の単位はmg/dm^{2}であることから，検出値とＥＵの基準値との比較のため，伊藤ら[1]の設定した換算係数16.6を用い，単位変換を行った．μg/g及びmg/dm^{2}単位で表したチーズ中のナタマイシンの分布を図２に示した．

ナタマイシンは，範囲2.6～35μg/g，平均11.1μg/g

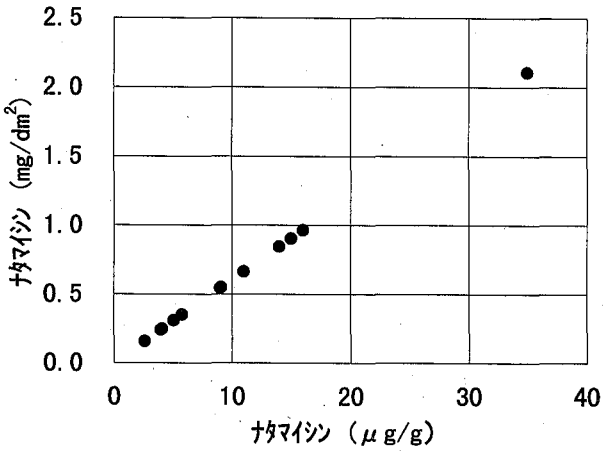


図２．μg/g及びmg/dm^{2}単位で表したチーズ中のナタマイシンの検出値の分布

μg/gからmg/dm^{2}への単位変換は，換算係数16.6[1]を用い計算した．EUにおける基準値：２mg/dm^2．

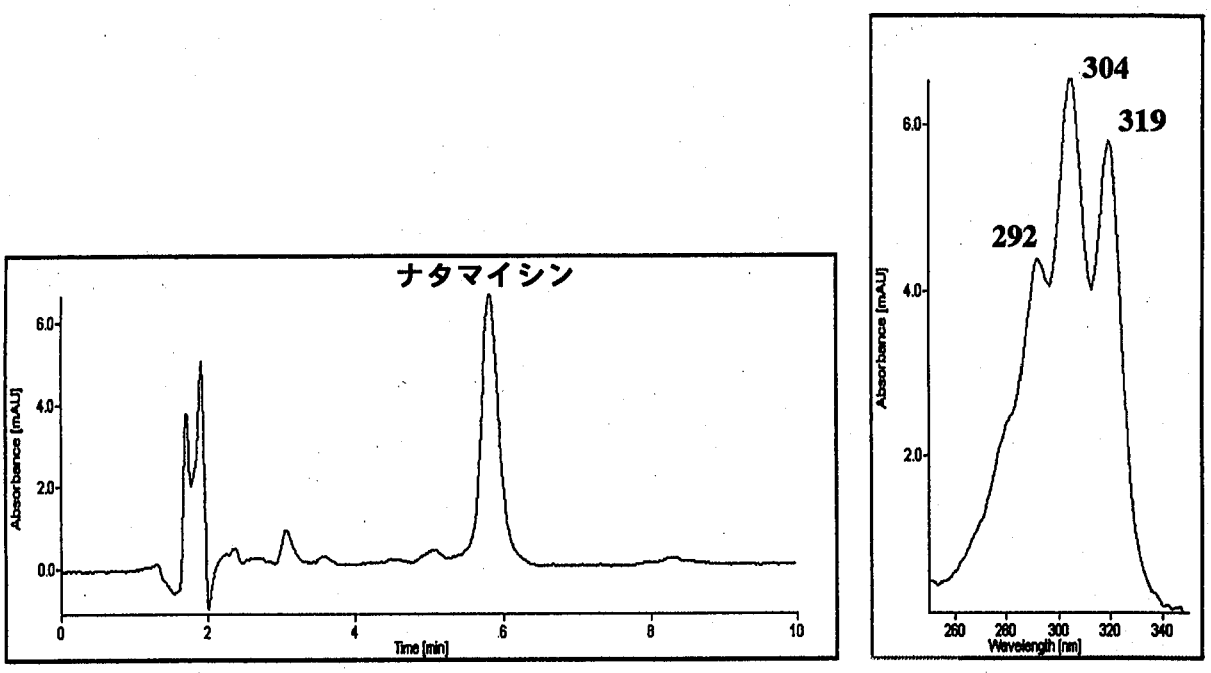


図３．チーズ中のナタマイシンのHPLCクロマトグラム及び吸収スペクトル

で検出され，10μg/g前後のものが最も多かった．さらに，ＥＵの基準値（2 mg/dm²）と比較した場合，基準値の２分の１以下のものがほとんどであったが，35μg/gのナタマイシンが検出されたチーズは2.1mg/dm²となりＥＵの基準値を超えていた．

２．フォトダイオードアレイ検出器によるナタマイシンの確認

チーズ中のナタマイシンのHPLCクロマトグラム及び吸収スペクトルを図３に示した．ナタマイシンは保持時間5.8分で溶出し，共存物質との分離は良好であった．チーズから検出されたナタマイシンについては，すべて，フォトダイオードアレイ検出器により確認を行った．ナタマイシンは，292，304，319 nmに極大吸収を持つ特徴ある吸収スペクトルを示し，標準品のそれと一致した．

なお，本法におけるチーズ中のナタマイシンの確認限界は，2.0μg/gであった．また，ナタマイシンの検出されないことを確認したチーズにナタマイシンを10 μg/gになるように添加した場合の５回試行の回収率は，平均92.4％，標準偏差2.0，変動係数2.1%であった．

３．ナタマイシン検出値の部位差について

ナタマイシンはナチュラルチーズの成熟中に防かびのために表面に塗布するものである．塗布方法については，浸漬法または皮膜剤に溶かして塗布する方法が考えられるが，いずれの方法も表面に均一の濃度で塗布することは困難であると思われる．そこで，今回ナタマイシンが検出されたチーズを用いて，ナタマイシン濃度の部位差について検討した．

直径約25cm，厚さ約10cmの車輪型のゴーダチーズについてラベルのある面をＡとし，図４に示したようにＡ

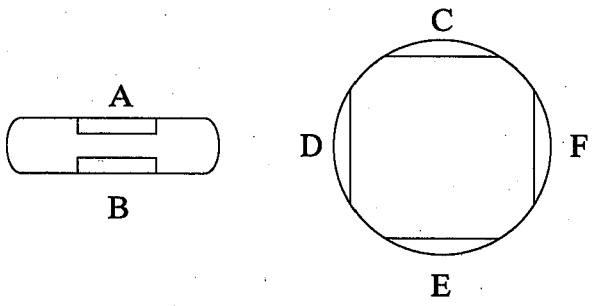


図４．車輪型チーズの部位差測定における試料採取位置

表３．車輪型チーズの各部位のナタマイシン測定結果

試料採取位置	ナタマイシン（μg/g）	
	チーズNo.1	チーズNo.2
A	24.5	50.8
B	35.1	46.8
C	38.8	41.1
D	29.8	34.6
E	20.7	20.3
F	22.6	39.8
平均	28.6	38.9
標準偏差	7.3	10.7
相対標準偏差(%)	25.5	27.5

からFの6ヶ所から試料を取り分析し，その結果を表3に示した．2検体のチーズについてのナタマイシンの検出値の平均値，標準偏差，相対標準偏差はそれぞれ28.6 μg/g，7.3，25.5%，及び38.9 μg/g，10.7，27.5%であり，部位によるばらつきが大きく，部位によっては，EUの基準値2 mg/dm² (33.2 μg/g) を超える場合があった．

以上のことから，チーズの多くがカット販売されていることを考えると，試験品の収去，試料の調製には，慎重な対応が必要であると考える．

なお，我が国では，ナタマイシンの食品への使用は認められていないことから，ナタマイシンの検出されたチーズは，食品衛生法7条（食品等の規格及び基準）違反として取り扱われ，販売禁止となった．

まとめ

輸入チーズ44検体中，14検体から，抗生物質であるナタマイシンが検出された．原産国別では，オランダ産13検体，ノルウェー産1検体であった．タイプ別では，いずれも硬質タイプで，ゴーダチーズ11検体，エダムチーズ2検体，リダーチーズ1検体であった．なお，当該チーズは，食品衛生法7条（食品等の規格及び基準）違反として取り扱われ，販売禁止となった．

また，ナタマイシンの検出された車輪型チーズを用いて，検出値の部位差について調査したところ，相対標準偏差が25.5，27.5%と部位差が非常に大きいことが明らかとなり，試験品の収去，試料の調製には，慎重な対応が必要であることが判った．

文献

1）伊藤誉志男，辻沢　広，横山　剛，他：酪農科学と食品の研究，**34**，A1-A6，1985.

2）De Ruig, W.G., Van Oostrom, J.J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 944-948, 1987.

3）Fletouris, D.J., Botsoglou, N.A., Mantis, A.J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, **78**, 1024-1029, 1995.

4）石川ふさ子，上田　工，嶋村保洋，他：食衛誌，**27**，630-634，1986.

5）丸山　隆，渡辺　緑，戸花洋典，他：食衛誌，**29**，413-418, 1988.

6）日本薬学会第114年会公衆衛生協議会資料，Ⅱ.乳製品試験法，49-50，1994，社団法人日本薬学会，東京.

7）IDF STANDARD (1991年改訂版)，835-845，1991，社団法人日本国際酪農連盟，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 172-178, 1998

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第15報*）
—平成９年度—

牛山博文**, 観公子**, 新藤哲也**, 安田和男**

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (XV*)
— 1997 —

HIROFUMI USHIYAMA**, KIMIKO KAN**, TETSUYA SHINDO**
and KAZUO YASUDA**

Keywords：化学性食中毒 chemical food-poisoning，テトラミン tetramine，カエンタケ *Podostroma cornu-damae*，異臭 offensive smell，イソアミルアルコール isoamyl alcohol，アセトイン acetoin.

著者らはこれまでに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９年度に発生した化学物質による食中毒等の事例のうち，ツブ貝による有症苦情１件，原因物質として不揮発性腐敗アミンが疑われる事例２件，有毒キノコの誤食が原因と思われる事例１件及びプロセスチーズの異臭１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．ツブ貝による有症苦情

事件の概要　平成９年５月30日，武蔵野市在住の男性が，同市内の販売店でツブ貝を購入し，31日自宅で貝を割って身を取り出し中腸線等内蔵を除去した後，煮たものを同日14時妻と共に合わせて６個喫食したところ，食後１時間後の15時頃，二人とも焦点が合わない等の視覚異常の他，めまい，強い脱力感，下肢のしびれ，ふるえ等の症状を呈した．救急車で病院に運ばれたが，16時30分頃症状は軽くなり始めた.

①試料　患者宅で調理した際，除去しておいた貝の内蔵部分.

②原因物質の検索　患者宅に残っていた巻貝は調理の際割られていたため，巻貝約一個分の断片から鑑定を試みた.

貝の断片を組み合わせたところ，殻高は約15cmと推定された．殻は褐色で多数の螺肋があり，肩角の螺肋や殻口内の色調等の特徴はエゾバイ科のエゾボラモドキ *Neptunea intersculpta* とよく類似していたが，形状が完全ではないため断定することはできなかった.

エゾバイ科の巻貝の中には唾液腺にテトラミン[$(CH_3)_4N^+$]を有する種が存在すること[6]，及び苦情者の症状から，原因物質はテトラミンであることが推定された．そこでテトラミンの分析を行った[7].

表１．平成９年度に発生した化学性食中毒等の概要

年	月	発症時間	患者数	喫食者数	原因食品	症状	原因物質
平成９	5	１時間	2	2	ツブ貝	視覚異常,めまい,脱力感,下肢のしびれ,ふるえ	テトラミン
9	7	15分	3	3	ブリ照り焼き	顔面紅潮,動悸,酩酊感,吐き気	不明
9	7	10分	11	1,100	カジキマグロ竜田揚げ	顔面紅潮,頭痛,発しん,動悸	不明
9	10	30分	1	3	カエンタケ	嘔吐,頭痛	毒成分不明
9	11	—	—	—	プロセスチーズ	異臭	イソアミルアルコール,アセトイン

* 第14報，東京衛研年報，**48**，143-147，1997

** 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

試料にメタノール－1N塩酸（30：1）混液を加え，80℃で還流しテトラミンを抽出した．抽出液はセルロースプレートにスポットし，展開溶媒：イソプロパノール－水（3：1）混液で展開後ドラーゲンドルフ試薬で発色した．その結果，巻貝残品から標準品のテトラミンと同様，Rf値0.5の位置に赤色スポットが確認された．

③考察 一般に「ツブ貝」と呼ばれているエゾバイ科巻貝のうちエゾボラ，エゾボラモドキ，ヒメエゾボラ等数種のものは唾液腺にテトラミンを含んでいる[8]．テトラミンはアセチルコリンと類似の構造を有する四級アミンで，副交感神経刺激作用ならびに弱い抑制作用，及びクラーレ様作用を有し，経口中毒量は350～450mgあるいは数十mgと推定されている[8,9]．また，テトラミンは熱に対して安定であるため，加熱調理によって消失することもない．テトラミンは消化管から速やかに吸収され喫食後30～60分で発症する．症状は視覚異常，めまい，頭痛，船酔い感，しびれ，嘔吐等で，通常2～3時間で回復する[8]．ツブ貝ではテトラミンは唾液腺に局在するため，通常は唾液腺を除去して喫食される．しかし唾液腺は外套膜の下，消化管の両側に位置しており，中腸腺等の内臓部分を取り除いただけでは除去することはできない．したがって，テトラミン中毒についての知識がなければ，唾液腺を除去しないで喫食する可能性が高い．

エゾバイ科巻貝中のテトラミンの分析は，唾液腺の部分を試料とすることが一般的であるが，今回の事例では唾液腺は可食部とともにすべて喫食されており，試料は調理の際除去された消化管，中腸腺を含む内臓部分であった．薄層クロマトグラフィーによる分析の結果テトラミンを検出したが，これは唾液腺から分泌されたテトラミンが消化管等の内臓部分に存在したためと思われる．

テトラミンによる症状は一般的に比較的軽く，回復も早いため中毒あるいは有症苦情という形で表面に現れることは少ないものの，現在のツブ貝の販売状況から考えると，テトラミンについてなんら注意がなされていないため，実際にはツブ貝が原因と認識することなく症状をを呈している人は多く存在することが考えられる．視覚異常，めまい等の症状により自動車運転等，場合によっては事故につながる危険性もあると思われる．したがって，ツブ貝を殻付のまま販売する場合は，消費者に唾液腺の除去をうながすような調理上の注意を与えるよう販売者を指導する等，何らかの対策が必要であると考える．

2．不揮発性腐敗アミンが原因物質として疑われる事例

事件の概要 事例1：平成9年7月22日12時45分頃，会社の同僚3名の男性が飲食店でブリの照り焼き定食を喫食したところ，3名全員が15分後の13時から14時45分にかけて，顔面の紅潮，動悸，酩酊感，吐き気，頭痛等のアレルギー様の症状を呈し医療機関で受診し，さらに救急車で別の病院の救急外来に移送され，診察を受けた．抗ヒスタミン剤，ステロイド剤の投与を受け15分程で回復傾向となった．診察にあたった医師より，同日16時20分頃，食品が原因と疑われるアナフィラキシーショック症状を呈した患者を診察した旨保健所に届け出がなされた．

事例2：平成9年7月23日11時30分から13時にかけて社員食堂においてカジキマグロ竜田揚げを喫食した約1,100のうち11人が10分後の11時40分から13時30分にかけて，頭痛，顔面紅潮，発しん，動悸，寒気，腹痛，血圧低下，発熱等の症状を呈し病院で受診した．ステロイド剤の投与を受け，そのうち症状の重い3名が入院した．

①試料 事例1：飲食店に残っていた原材料のブリ切り身．

事例2：検食として保管してあったカジキマグロ竜田揚げ及びその原材料のカジキマグロ切り身．

②原因物質の検索 事例1及び2ともに発症状況及び患者の症状から，原因物質としてヒスタミン等の不揮発性腐敗アミンが疑われた．そこで薄層クロマトグラフィーによりヒスタミン及び不揮発性腐敗アミン類の分析を行った．試料に水を加えホモジナイズし，トリクロロ酢酸で除蛋白を行った後，シリカゲルプレートにスポットした．展開溶媒：アセトン－アンモニア水（9：1），アセトニトリル－アンモニア水（5：1），クロロホルム・メタノール－アンモニア水（2：4：3）でそれぞれ展開した後，フルオレスカミン溶液を噴霧し蛍光スポットの有無を確認し，さらにニンヒドリン溶液を噴霧し赤紫色スポットの確認を行った．その結果，事例1及び2のいずれの試料からも，今回検査対象としたヒスタミン，カダベリン，スペルミジン，チラミン及びプトレシンは検出されず，原因物質を究明することはできなかった．

③考察 アレルギー様食中毒はヒスタミンによって引き起こされる場合が多くみられる．ヒスタミンによる食中毒は，遊離のヒスチジン含量の多い魚種に，ヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌が増殖したときに発生する．ヒスタミンによる中毒最小発症量は文献値では100mg%とされているが，患者の感受性や健康状態，喫食量及び他の不揮発性腐敗アミン含有量等他の因子により影響を

受ける[10]．今回の事例は患者の喫食残品が得られなかったこと，及びいずれの試料からもヒスタミン等不揮発性腐敗アミンは検出さなかったことから，原因物質としてヒスタミンが疑われたものの，明らかにすることはできなかった．

3．有毒キノコの誤食による事例

事件の概要　平成10年10月5日17時30分頃，西多摩郡在住の家族が採取したキノコをバターで炒め試食した．母親がまず試食し，強い苦みのため直ちに吐き出したが，同時に試食した少年は約1cm程を喫食し，30分後から嘔吐，頭痛等の症状を呈した．同日23時病院で受診し，帰宅した後家族に処方されたかぜ薬を服用した．6日13時頃再度かぜ薬を服用し，15時頃顔のむくみ，胸痛等の症状の為病院に入院した．医師の所見は，眼球血脈充血，顔面及び口唇腫脹，咽頭浮腫，呼吸困難等であった．7日においても，しびれ，視覚障害，意識障害，胸痛等の症状があったが，翌8日にはほぼ回復した．

①試料　少年の家族が採取したキノコ（生）

②原因物質の検索　試料のキノコを写真1に示した．試料は茎の直径約5mm長さ5cm程の帯赤橙色棍棒状，内部は白く肉質はややかたく木質であり，ニクザキン科カエンタケ*Podostroma cornu-damae*であると鑑定した．

また，試料をマウスに体重1kgあたり9g相当量を経口投与し24時間観察したが異常は認められなかった．

③考察　カエンタケは子嚢菌亜門核菌綱に属し，高さ3～8cm棍棒状あるいは分枝し手のひら状で，林内の地上にまれに発生する[11]．最近になって有毒であることが判明し，運動，言語に障害が起こるといわれているが毒成分については不明である[12]．

日本には約5,000種のキノコが存在すると考えられているが，分類されていないものも多く，命名されたものはおよそ1,800種といわれている[11,13]．そのうち，中毒例が報告されたものは100種余りである[13]．発生件数の多いものはクサウラベニタケ，ツキヨタケ，カキシメジの3種でキノコ中毒全体の約70%を占める[14]．これらはいずれも胃腸障害を起こすが，ドクツルタケのように致死性の猛毒を有するものも存在する[14]．

今回の事例では患者がアレルギー体質であったこと，患者本人ではなく家族に処方された薬を服用していること等から，いずれの症状がカエンタケによるものかは不明である．キノコによる中毒を防止するためには，山野で採取したキノコを喫食する際は十分な知識と経験を身につけ，食用であると確信できるもの以外は口にしないことが大切で，「食べられるかどうか試してみる．」といった行為は厳に慎むべきである．

4．プロセスチーズの異臭事例

事件の概要　平成9年11月26日，都内の給食センターから「給食に提供したチーズが軟化していて異臭がするとの苦情があり一部が給食センターに返品された．」との届け出が保健所になされた．この給食センターでは11月18日及び21日に1個約5gのプロセスチーズ300g入り72袋を仕入れ，26日1食分あたり1個のチーズを添えた給食530食を4カ所の幼稚園に配達し，そのうち2カ所から苦情がよせられた．

①試料　プロセスチーズ苦情残品及び参考品

②原因物質の検索　苦情品は参考品に比べ柔らかく，異臭が認められた．そこで異臭成分の分析を行った．

試料に水を加えホモジナイズした後蒸留を行い，異臭成分を水で捕集しガスクロマトグラフ（GC）－質量分析計で分析した．なお，捕集液は苦情品と同様の異臭が認められた．GC測定条件は，カラムにDB-WAX（内径0.25μm，長さ30m）を用い，カラム温度は40℃から250℃まで昇温した．その結果苦情品に特有な2つのピークが見いだされ，それらはマススペクトルからイソアミルアルコール［$(CH_3)_2CH(CH_2)_2OH$］及びアセトイン［$CH_3CH(OH)COCH_3$］と推定された．標準品を用いて確認したところ，苦情品由来の2つのピークのリテンションタイム及びマススペクトルは標準品とよく一致した．試料あたりの含有量は，イソアミルアルコールが2μg/g，アセトインが3μg/gであった．

③考察　イソアミルアルコールは，アルコール発酵の際生じるフーゼル油の成分の一つであり，タンパク質が分解して生じたアミノ酸より生成すると考えられる[15]．アセトインはアルコール発酵あるいはブタンジオール発酵で生成され，主として細菌の発酵産物として得られる[15]．以上のことから，異臭の原因物質であるイソアミルアルコール及びアセトインはプロセスチーズに何らかの理由で増殖した細菌が産成したものであると推定された．

以上，平成9年度に発生し原因物質の究明を行った化学性食中毒等のうち，エゾバイ科巻貝のテトラミンによる有症苦情，不揮発性腐敗アミンが原因物質として疑われるブリの照り焼き及びカジキマグロの竜田揚げの事例，カエンタケによる事例及びプロセスチーズの異臭の5事例について報告した．

これらの調査は衛生局生活環境部食品保健課，各関連の保健所と協力して実施したものである．

文　献

1）真木俊夫，観　公子，橋本秀樹，他：東京衛研年報，

44, 162-165, 1993.
2）冠　政光, 観　公子, 橋本秀樹, 他：東京衛研年報, **45**, 111-115, 1994.
3）冠　政光, 観　公子, 橋本秀樹, 他：東京衛研年報, **46**, 115-119, 1995.
4）観　公子, 冠　政光, 新藤哲也, 他：東京衛研年報, **47**, 105-112, 1996.
5）牛山博文, 観　公子, 新藤哲也, 他：東京衛研年報, **48**, 143-147, 1997.
6）日本中毒情報センター編：症例で学ぶ中毒事故とその対策, 215-218, 1995, 薬業時報社, 東京.
7）田村行弘, 真木俊夫, 観　公子, 他：東京衛研年報, **36**, 191-198, 1985.
8）橋本芳郎：魚介類の毒, 24-26, 1989, 学会出版センター, 東京.
9）成田弘子：食衛誌, **26**, 549, 1985.
10）日本薬学会編：衛生試験法・注解, 289, 1990, 金原出版, 東京.
11）今関六也他編：日本のきのこ, 15, 587, 1988, 山と渓谷社, 東京.
12）本郷次雄監修：きのこ, 331, 1994, 山と渓谷社, 東京.
13）山下　衛他編：きのこ中毒, 10-15, 1993, 共立出版, 東京.
14）小山昇平：日本の毒キノコ, 213-216, 1992, ほおずき書籍, 長野.
15）今堀和友他監修：生化学辞典, 31, 1125, 1990, 東京化学同人, 東京.

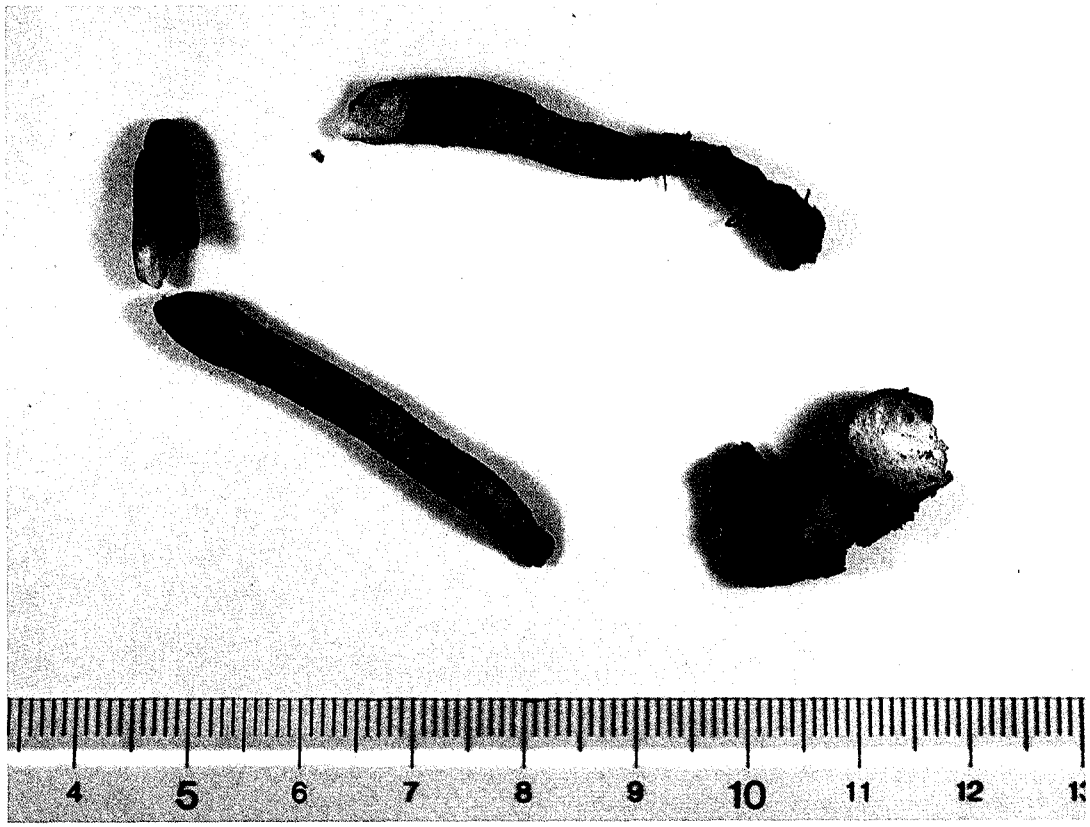


写真１．カエンタケ（*Podostroma cornu-damae*）

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，大気または水環境中の有害化学物質の分析に関する論文３編，農薬や有害化学物質の調査に関する論文４編及び化学物質の生体影響に関する論文３編，計10編が掲載されている．

先ず，大気または水環境中の有害化学物質の分析に関する論文３編を紹介する．瀬戸らは，種々の分野において使用され始めたフラーレンによる環境汚染を予測して，その分析法を検討した．前処理法には逆相系の固相抽出を，分析には紫外検出ＨＰＬＣ及びＨＰＬＣ-ＭＳを採用している．分析を試みた大気浮遊粉塵及びディーゼル排ガス粒子からフラーレンは検出されなかったが，使用済みのフレームレス原子吸光用グラファイトチューブから検出されたことは注目に値する．

中川らは，ＨＰＬＣと誘導結合プラズマ質量分析計を組み合わせた方法を用いて，水中のヒ素化合物について化学形態別分析を行っている．河川水中ではヒ素は５価として，また壕水など藻類が繁殖しやすい環境では３価，５価及びジメチルアルシン酸として，また還元的な状態にある井戸水では，３価のヒ素として存在することが明らかにされている．

小輪瀬らは，ゴムの加硫促進剤として使用されている*N*-t-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド，*N*-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾール-スルフェンアミド，*N,N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾール-スルフェンアミドの３物質について，水及び底質試料中の分析法開発を行っている．ヘキサン抽出，ヘキサン-アセトニトリル分配等の前処理過程を経てＧＣ-ＭＳ分析し，良好な結果を得ている．

次に，農薬や有害化学物質などの調査に関する論文４編を紹介する．斉藤らは，平成５年から８年度までの東京湾のスズキ及びウミネコのモニタリング調査について報告している．調査項目はＰＣＢ，ＰＣＮ，ＤＤＴ，クロルデン，ヘキサクロロベンゼン，アルドリン，ディルドリン，エンドリン，ヘプタクロル及びトリブチルスズ等38物質で，これらのうち，外因性内分泌攪乱化学物質としてリストアップされている26物質については，特に昭和56年度からの濃度推移をまとめている．

近藤らは，東京都多摩地域北部の７市を対象地域として平成５年度より行っている硝酸性窒素による地下水汚染の実態調査について報告している．調査対象とした93浅井戸の硝酸性窒素濃度は多摩地域全体の濃度と比べて高い傾向を示し，特に調査地域の北東部が高く，南西部が低い傾向が示唆された．また，硝酸性窒素濃度が季節変動する井戸が多くみられ，降水量の変動パターンとの相関性が認められたことが考察されている．

鈴木らは，平成２年度から４年度にかけてゴルフ場付近の飲用井戸を対象に調査したゴルフ場関連34農薬について報告している．検出された農薬はシマジンとテルブカルブで，前者は水質目標値の１／10以下であったが，後者は目標値を超えて検出され，残留性の高いことが示されている．同時に，地下水汚染の未然防止を目的として，実態調査に基づく各種モデルを用いて多摩地域における飲用井戸の農薬汚染の可能性を判定している．

坂本らは，Ge半導体検出器を用いた核種分析装置による環境放射能調査（平成２－８年度）について報告している．調査試料は降下物，陸水，土壌，精米，葉菜，根菜，牛乳，日常食，海産生物で，測定核種はセシウム137，ヨウ素131，カリウム40等である．東京都の環境放射能レベルは全国平均と同等か低めに推移していること，また人工放射能の漏洩に由来する変化は観測されていないことが明らかにされている．

最後に，化学物質の生体影響に関する論文３編を紹介する．斉藤らは平成９年４月から10年３月にかけて，都内近郊の住宅で室内空気を採取し，ホルムアルデヒドと揮発性有機化合物（ＶＯＣ）36種及び有機リン系農薬４種について測定した．同時に健康に関するアンケートまたは聴き取り調査を行い，室内で生じる不快な症状とその頻度について調べた．その結果，酢酸エチル，酢酸ブチル，n-ブタノールの３物質については，不快な症状と

の間に有意な相関性が認められることを指摘している．

大山らは，カビ抗原による抗体産生におけるディーゼル粉じんのアジュバンド作用について検討している．カビ抗原とディーゼル粉じんをマウスに２週間に１回の頻度で連続点鼻投与し，毎週採血して血清中IgEを測定した．IgE抗体値は実験開始後10週から上昇し，カビ抗原のみを点鼻したマウスより高い値を示し，ディーゼル粉じんはカビ抗原に対するIgE抗体産生に対してアジュバンド作用があることが示されている．

大澤らは，ディーゼル排ガスの肺への影響を調べることを目的として，５週令の雄フィッシャーラットを，粒子状物質を除いた排ガス暴露群（Ｌ群）および希釈排ガス暴露群（ＮＤ群）に分け，12ヶ月間暴露し，血液ガスと気管支肺胞洗浄液の細胞成分の変化を観察した．動脈血中の酸素分圧はＬ群の12ヶ月暴露で低下したが，有意差は認められなかったこと，12ヶ月暴露のＬ群に好中球の増加傾向が認められたこと等が報告されている．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 181-185, 1998

環境試料中のフラーレンの分析法

瀬戸　博*, 大久保　智子**, 竹内正博*

Determination of C_{60} Fullerene in Environmental Samples

HIROSHI SETO*,TOMOKO OHKUBO** and MASAHIRO TAKEUCHI*

Keywords：フラーレン fullerene，環境汚染 environmental pollution，浮遊粉塵 suspended particulate matter，ディーゼル排気ガス微粒子 diesel particulate matter，高速液体クロマトグラフ-質量分析計 LC-MS

緒　言

第三の炭素物質として1985年にKrotoら[1]によってその存在が確認されたカゴ状の炭素・フラーレンに関する研究は既に基礎科学の段階を超え，応用を意識した材料開発に進んでいる．超伝導体，触媒，半導体，光電素子，潤滑剤さらに抗がん剤，抗エイズ薬等の医薬品分野への応用が展開されつつある[2-6]．フラーレンには炭素数及び形状の相違によっていくつかの種類がある．それらの内，よく研究されているのが炭素数60のサッカーボール型のC_{60}フラーレン（以下，C_{60}と略す，図1）である．

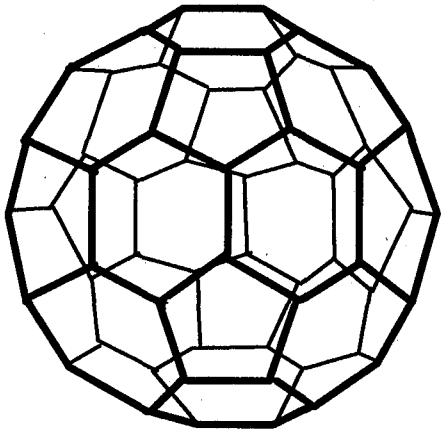


図1．C_{60}フラーレン

C_{60}の毒性については，否定的な論文が多い[7-10]．例えばNelsonら[7]がマウス皮膚に200μgを塗布し，皮下DNA合成とオルニチン脱炭酸活性に影響がなかったと報告している．また，7,12-ジメチルベンズアンスラセンによる腫瘍のプロモーター作用も認められなかったとしている．しかし，最近，腹腔内に注入されたC_{60}は全身に分散し，妊娠マウスでは胚組織に深刻な影響が見られたとする報告[11]もなされている．C_{60}は光照射下で触媒的作用によって活性酸素（一重項酸素）を産生し[12]，サルモネラに対して変異原性を示す[13]．生体影響についてはさらに詳細な研究が必要であろう．

フラーレンは放電により生成したススの中から見い出されている[1]ことから，放電工程，高電圧集塵機や多量のススを扱う労働環境さらには一般環境にも存在する可能性がある．実際，ベンゼンの燃焼炎中に生成したとする報告[14,15]もある．環境中炭素物質のキャラクタリゼーション及び将来予想されるフラーレンの環境への放出に対応することを目的として環境試料，特に浮遊粉塵(SPM)中のC_{60}の分析法について検討したので報告する．

実験方法

試薬：C_{60}：東京化成工業（純度99.9%以上）をトルエンに溶解し，500μg/mLとした．順次ヘキサンにて希釈し，0.1-10μg/mL溶液を調製した．ディーゼル排ガス粒子：NIST（米国商業局技術規格院）製No. 1650．固相抽出剤：バリアン製BOND ELUT C18 500mg．その他の試薬は市販の液体クロマトグラフ用または試薬特級を用いた．

装置：高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析条件－ポンプ：東ソー CCPS，カラム：TSK ODS 80TS 粒径5μm 内径4.6mm 長さ250mm，カラムオーブン：東ソー CO-8020，温度：25℃，検出器：東ソー UV-8020，検出波長：330nm，溶離条件：A法－移動相：ヘキサン，流

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

速：1 mL/min，B法－移動相：50%(V/V)ジクロロメタン／メタノール→20分直線グラジエント→ジクロロメタン（25分間保持），高速液体クロマトグラフ-質量分析計（LC-MS）分析条件－注入法：フローインジェクション法，移動相：ヘキサン，流速：0.5mL/min，MS:フィニガンマット TSQ700，イオン化法：大気圧イオン化法（APCI），コロナ放電電圧：4.47kV，コロナ電流：5μA，霧化温度：500℃，キャピラリ温度：150℃．

C_{60}分析条件の検討：C_{60}のヘキサン溶液のUVスペクトルを測定し，吸収極大波長及び分子吸光係数を求めた．各種溶媒への溶解性を検討するため，飽和溶液を調製し，その濃度を吸光光度法により求めた．溶媒の種類による分子吸光係数の相違は無視した．濃硫酸処理による安定性を検討するため，0.1μg/mLのC_{60}溶液1mLを試験管にとり，同量の濃硫酸を加えて5分間穏やかにかくはんした．60分静置した後，上層をHPLC法(A法)により定量し，回収率を求めた．アルカリ処理による安定性を検討するため，0.1μg/mLのC_{60}溶液1mLをナス型フラスコ（500mL）にとり，乾固後，0.8M 水酸化カリウム／エタノール溶液を200mL加え，1時間環流させた．冷却後，分液ロートに移し，水200mL及びトルエン50mLを加え，しんとう抽出した．水層から再度抽出し，トルエン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，ろ過，ロータリーエバポレータで乾固した．ヘキサンに再溶解し，清浄な窒素ガスを吹き付けて1mLに濃縮し，HPLC用検液とした．

大気浮遊粉塵(SPM)の採取：1994年9月5日から9日まで24時間づつ毎日，当所一号館屋上に設置したハイボリュウムエアサンプラーを用いて，空気を約1800m^3吸引し，あらかじめ恒温・恒湿にし秤量した石英フィルターにSPMを採取した．

ガソリン自動車排気ガスの採取：N社製(1988年型)排気量2000CCのガソリン自動車を使用した．通常走行中に排気口より排ガスの一部をポンプで毎分2Lの速度で120-180L吸引し，粒子を石英フィルター(直径55mm)に捕集した．

結果及び考察

1．C_{60}の物理化学的性質

C_{60}のヘキサン溶液のUVスペクトルは，257nm(ε=183,000)及び327nm(ε=53,000)に吸収極大を示した（図2）．各種溶媒への溶解性について検討した．飽和溶液の濃度は吸光光度法により測定した．表1に示したように，メタノール，アセトニトリルにはほとんど溶解せず，ベンゼン，トルエンには易溶であった．ヘキサンに対しては中程度の溶解性を示した．濃硫酸に対しては，安定でヘキサン層に定量的に転溶されたが，水酸化カリウム処理では回収されず，アルカリに対しては不安定と考えられた．

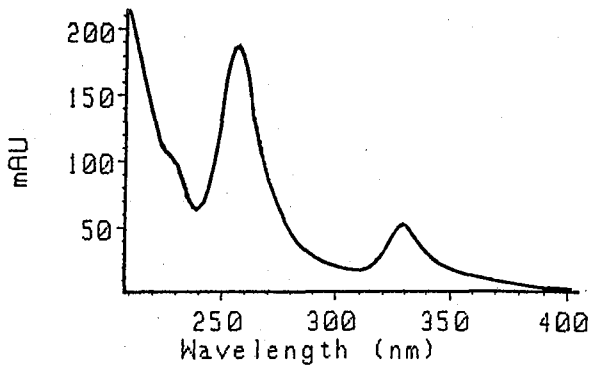


図2．C_{60}フラーレンのUVスペクトル（ヘキサン溶液中）

表1．各種溶媒に対するC_{60}の溶解性

(室温26℃)

溶　媒	飽和溶液濃度(μg/ml)
メタノール	0.035
アセトニトリル	0.087
アセトン	0.39
ヘキサン	35
ジクロロメタン	240
ベンゼン	>500
トルエン	>500

2．固相抽出カラムにおける保持・溶出特性

逆相系の固相抽出カラム(BOND ELUT C18)における保持・溶出特性を検討したところ表2のようにC_{60}はメタノール及びベンゼン／メタノール1：4混液では固相に保持されるが，ヘキサンでほぼ全量回収されることがわかった．

表2．BOND ELUT C18におけるC_{60}の保持・溶出特性

添加量	1μg			0.02μg
溶出溶媒1	B/M(1:4)	B/M(1:2)	B/M(1:1)	M
回収率	0%	2.5%	88.4%	0%
溶出溶媒2	H	H	H	H
回収率	98.5%	89.7%	2.5%	90.1%

B:ベンゼン，M:メタノール，H:ヘキサン．溶媒量は5ml.

3．HPLC分析条件

逆相系のカラムを用いてHPLC分析条件を検討した．ヘキサンを移動相とするA法では，C_{60}のピーク形状はシャープであった（図5A）．しかし，比較的早く(約5分)溶出するため他の妨害物質の影響を受ける恐れがある．

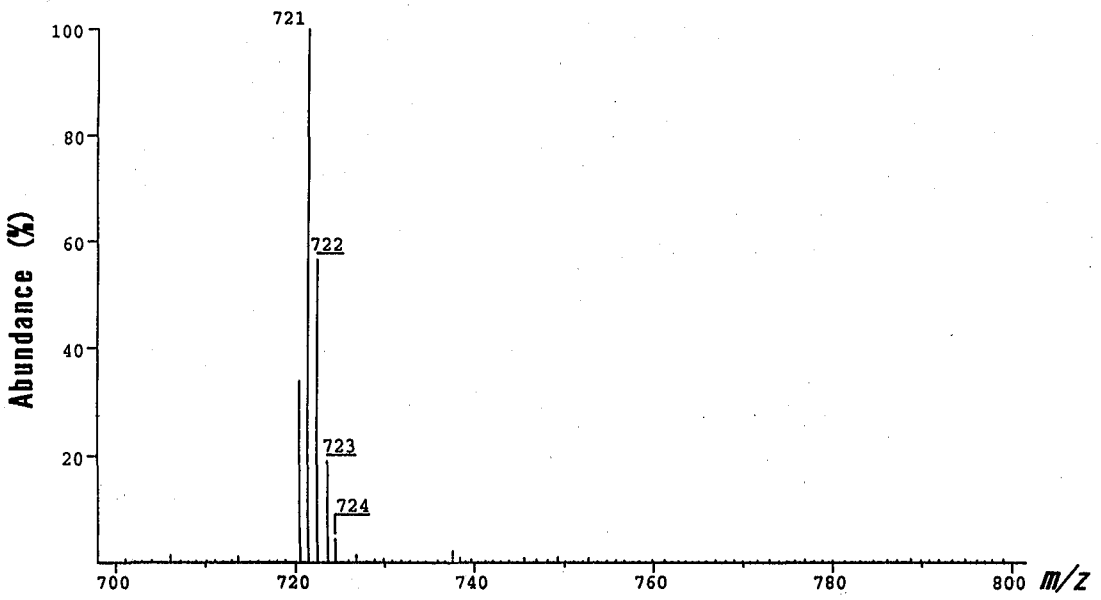


図3．C_{60}フラーレンのマススペクトル（LC-MS APCI法）

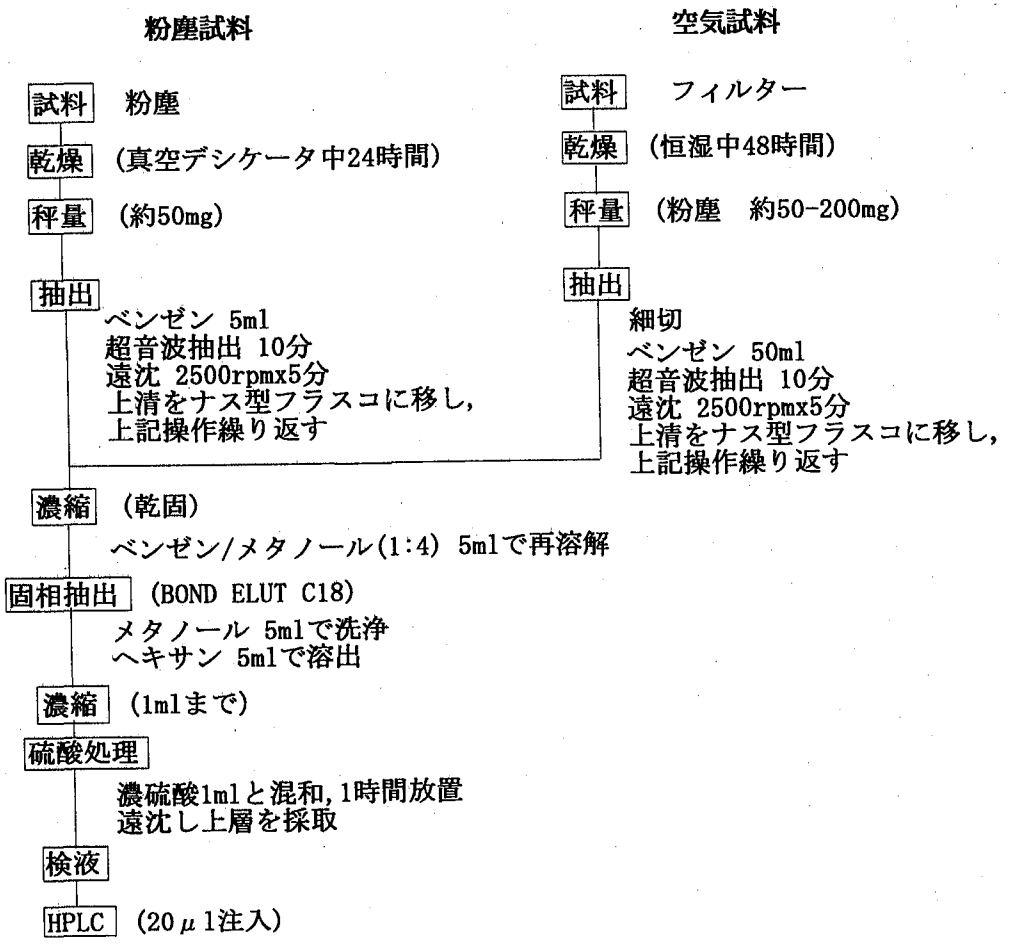


図4．環境試料中のC_{60}フラーレン分析法フローチャート

C_{60}の溶出位置付近の分離拡大を意図し，グラジエント分析を行った．ジクロロメタン／メタノール（50：50）からジクロロメタン100%へのグラジエントによって，C_{60}は約14.7分に溶出した（図6A）．これにより，C_{60}以

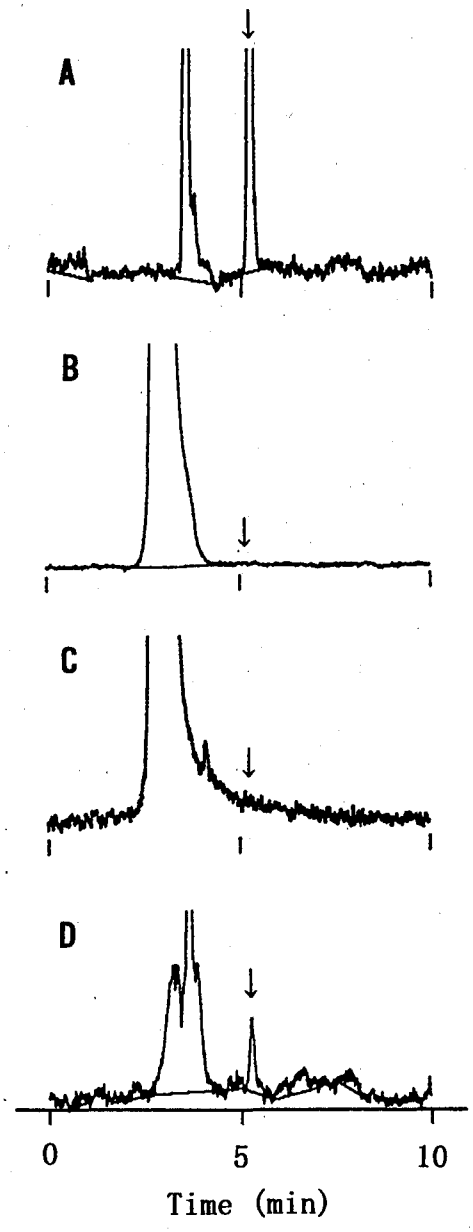


図5．C_{60}フラーレンのHPLCクロマトグラム　I（A法）
A：C_{60} 1 ng，B：大気浮遊粉塵，C：ディーゼル排ガス粒子，D：ガソリン車排ガス粒子

外のフラーレン，例えばカーボンナノチューブ，C_{70}などの分析にも適用できるものと考えられる。

4．C_{60}のLC-MS分析

フローインジェクション法(FIA)によってC_{60}のLC-MS分析を行った．図3に示したように m/z=721にベースピーク$(M+H)^+$が見られた．m/z=720のイオン強度をモニターしながら1-50ngのC_{60}を負荷した時，検出強度はほぼ直線的に増加した．検出感度は，一回の注入当たり1 ng程度であった．HPLC-UVに比較すると感度は高くないが，m/z =720という高質量領域のマススペクトルが特徴的なことから，MSによる選択的検出と定性分析

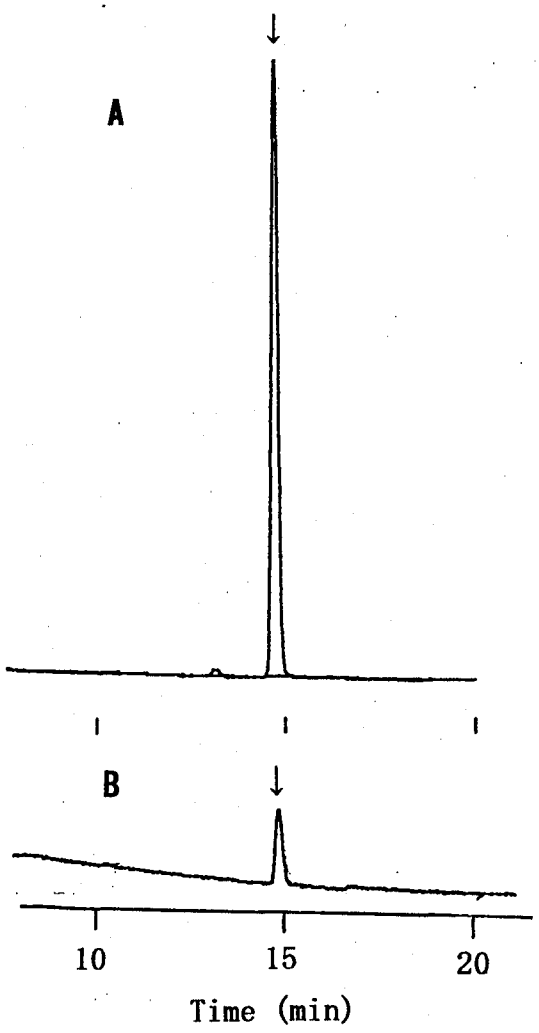


図6．C_{60}フラーレンのHPLCクロマトグラム　II（B法）
A：C_{60} 50ng，B：フレームレス原子吸光装置用グラファイトチューブ（使用済みのもの）

が期待できる．

5．環境試料中のC_{60}の分析法

以上の知見を基に図4のフローチャートに示したような環境試料，特に粉塵を対象とするC_{60}の分析法を考案した．試料重量を Ws(mg)とし，検量線より，注入したC_{60}重量 Wi (ng)を求め，次式により試料粉塵中のC_{60}濃度 C(μg/g)を計算する．

$$C=(Wi*50)/Ws$$

タール分の少ない試料では，濃硫酸処理を省略することが可能である．本分析法によるディーゼル排ガス粒子からのC_{60}の添加回収率は添加濃度によって異なり，11

表3．回収率試験

(n=3)

添加濃度(μg/g)	11	1.0
実測値(μg/g)	9.70	0.603
回収率(%)	88.2	60.3

試料:ディーゼル排ガス粒子

μg/gでは88.2%だが1 μg/gでは60.3%であった（表3）．低濃度域における低回収率の原因は，マトリクスへの吸着が強く，ベンゼンによる抽出が不十分なためと考えられる．C_{60}のHPLC-UVによる検出感度は0.05ng(S/N=3)であった．従って，回収率を考慮しない時の本分析法(A法)の検出限界(S/N=3)は，試料粉塵量50mgの時，重量当たり0.05μg/g，また定量限界(S/N=10)は0.15μg/gであった．

本法による実試料の分析例を図5，6に示した．ガソリン自動車排気ガス及び使用済みのフレームレス原子吸光用グラファイトチューブから微量検出された．各々の検出濃度は 5-17ng/m^3，30ng/チューブ表面　であった．ガソリン自動車は電気火花が，フレームレス原子吸光用グラファイトチューブは大電流電気加熱がそれぞれC_{60}の発生に起因しているものと考えられる．但し，LC-MSで確認できるほどの量ではなかったことから，再度調査し確認する必要がある．一方，大気浮遊粉塵及びディーゼル排ガス粒子試料からはC_{60}は検出されなかった．現在の都市大気中に浮遊する元素状炭素（炭粉）の主たる発生源はディーゼル車である．ディーゼル車が排出する炭粉は燃料の不完全燃焼によって生成するものだが，その際，C_{60}は生成しないものと考えられる．今回の実験の結果によれば，現時点における一般環境中のC_{60}濃度は，検出が困難なほどのかなり低いレベルにあると考えられる．しかし，フラーレンの環境調査はほとんど行われたことがなく，特定の排出源が存在するか否かも不明なことから，定期的な大気のモニタリングや排出源の調査をする必要があろう．

（本研究の概要は第35回大気環境学会年会　平成6年11月で発表した）

文　献

1）Kroto,H.W.：*Nature*, **318**, 14-15, 1985.

2）鈴木敏泰：化学と工業, **47**, 654-656, 1994.

3）Tabata,Y., Murakami,Y. and Ikada,Y.：*Fullerene Sci. Technol.*, **5**, 989-1007, 1997.

4）Shinohara,H., Y., Yagi,K. and Nakamura, J.：*Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, **9** pp, 96143478, 06-04-96, 1996.

5）Nacsa,J., Segesdi,J., Gyuris, A. *et al.*：*Fullerene Sci. Technol.*, **5**, 969-976, 1997.

6）Cagle,D.W., Thrash,T.P., Wilson,L.J. *et al.*：*Proc. Electrochem. Soc.;Recent Advances in the Chemistry and Physics of Fullerenes and Related Materials*, **3**, 854-868, 1996.

7）Nelson,M.A., Domann,F.E., Tim,G. *et al.*: *Toxicol. Ind. Health*, **9**, 623-630, 1993.

8）Moussa, F., Rassat,A. and Szwarc, H.：*Fullerene Sci. Technol.*, **4**, 21-29, 1996.

9）Satoh,M., Matsuo,K., Takanashi,Y. *et al.*：*Gen. Pharmacol.*, **26**, 1533-1538, 1995.

10）Moussa,F., Chretien,P., Dubois,P. *et al.*：*Fullerene Sci. Technol.*, **4**, 21-29, 1996.

11）Tsuchiya,T., Oguri,I., Yamakoshi,Y.N. *et al.*：*FEBS Letters*, **393**, 139-145, 1996.

12）Albogast,J.W., Darmanyan,A.P, Foote,C.S. *et al.*：*J. Phys. Chem.*, **95**, 11, 1991.

13）Sera,N., Tokiwa,H. and Miyata,N.：*Carcinogenesis.*, **17**, 2163-2169, 1996.

14）Howard,J.B., McKinnon,J.T., Makarovsky,Y. *et al.*：*Nature*, **352**, 139-141, 1991.

15）Anacleto,J.F., Perreault,H., Boyd,R.K. *et al.*：*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 214-220, 1992.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 186-190, 1998

水中ヒ素化合物の化学形態

中川順一*, 中神千穂*, 真木俊夫*

Chemical Chracteristics of Arsenic Compounds in Water

JUNICHI NAKAGAWA*, CHIHO NAKAGAMI* and TOSHIO MAKI*

Keywords：ヒ酸 arsenic acid，亜ヒ酸 arsenious acid，ジメチルアルシン酸 dimethylarsinic acid，メチルアルソン酸 methylarsonic acid，地下水 groundwater，河川水 riverwater，誘導結合プラズマ質量分析計 ICP/MS

はじめに

ヒ素のヒトに対する主要な摂取経路は大気，水および食品が考えられる．過去には農薬としてヒ酸鉛，メタンアルソン酸塩類等がかなり大量に使用され,現在では半導体材料(ガリウムヒ素等)，皮革や木材の防腐剤等として使用されていることから，これらの各媒体中のヒ素濃度からヒトへの総暴露量を推察することができ，毒性評価が可能である．

ヒ素は地球上に広範囲に分布する元素である．地殻中には通常1.8mg/kg，土壌には3～10mg/kg，海水には0.00015～0.0050mg/L，湖沼水，河川水には0.0009～0.0013mg/L，大気などに普遍的に存在し，生物圏では特に海洋生物に高く，陸上の動植物には低いことが知られている．従って,ヒ素による健康障害の点からいえば海産生物を重要な食品として摂取しているわれわれ日本人にとっては大きな問題である．しかし，海産物中に多く含まれる有機態ヒ素の毒性は，無機態ヒ素に比べてはるかに低く,これまでにヒ素中毒例は報告されていない．

ヒ素は毒性の強い元素であるが，様々な化学形態を持ち,その毒性は形態に大きく依存する．従って，ヒトへの毒性を評価するにあたっては，単に総ヒ素量を把握するだけでは不十分である．化学形態を解明した上でその毒性,代謝を検討する必要がある．

環境中のヒ素は酸化，還元，メチル化反応を受けることにより，絶えず自然界を循環しており，無機ヒ素は環境中のカビや細菌によりメチル化され,メタンアルソン酸塩，カコジル酸塩，酸化トリメチルアルシン等に変化して環境中に再分布している．またある種の動植物中にはアルセノコリン，アルセノベタイン等の有機態として数10mg/Lのオーダーで含まれていることも知られている．飲料水や環境水中では，ほとんどが亜ヒ酸(As(Ⅲ))あるいはヒ酸(As(V))として存在し，生体内に取り込まれた場合速やかにメチル化され有機ヒ素に変換される．通常はジメチルアルシン酸(DMAA)以上にメチル化が進むことはなく排泄される．有機ヒ素化合物の毒性は無機に比べ低く，As(Ⅲ)のLD50(ラット)が15mg/kgであるのに対しDMAAでは500mg/kgと急性毒性は非常に低い．しかし，有機ヒ素は発ガンのプロモーターとして働くとの報告もあり急性毒性以外の面で問題となっている．

諸外国においては，ヒ素による地下水汚染が深刻化しており，我が国の水道法水質基準やWHOのガイドラインでは総ヒ素量として10ng/L以下であることが定められている．今後さらにヒ素による環境問題がよりクローズアップされるにつれ，水質，土壌管理上のヒ素分析測定は，従来の3価や5価の無機ヒ素とそのイオンのみでなく，環境中に分布する有機ヒ素化合物の形態分析が益々重要視されてくるものと思われる．

そこで今回，液体クロマトグラフィー(HPLC)と誘導結合プラズマ質量分析計(ICP/MS)を組み合わせた方法を用い，都内の地下水中のAs(Ⅲ)，As(V)，MAA及びDMAAの4成分について化学形態別分析を行い若干の知見を得たので報告する．

実験の部

1．試薬

有機ヒ素化合物はトリケミカル研究所製，EDTA(2Na)は同仁化学製,その他の試薬は和光純薬工業製の試薬

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

特級を使用した.

2．装置

装置はヒューレット・パッカード社製のModel HP4500(ICP/MS)とHP1100(LC)を使用した．LCとICP/MSの接続は，LCのカラム出口とネブライザーを内径0.3mmのテフロンチューブで直結した．ネブライザーは同軸型を用いた.

表1．LC-ICP-MS装置条件

液体クロマトグラフ （LC）	
装置	HP1100シリーズ
カラム	Gelpek GL-IC-A15
移動相	2.0mM/Lリン酸緩衝液/0.2mM EDTA pH6.0 (adjust NaOH) 1.0mL/min
カラム温度	室温
注入量	0.05mL
高周波誘導結合プラズマ － 質量分析計 (ICP-MS)	
装置	Model HP4500シリーズ
高周波出力	1400W
プラズマガス流量	15L/min
補助ガス流量	1.0L/min
キャリアーガス量	1.1L/min
サンプリング位置	11.5mm
積分時間	0.5sec
測定質量	75amu

3．分析方法

LCとICP/MSの測定条件は，酒井[1]らの方法に基づき，ヒ素の検出は75amuで積分時間0.5secに設定して測定した.

表1に測定条件をまとめた．また移動相にはpH6.0のリン酸緩衝液(PBS)を用いた.

結果及び考察

1．ヒ素の化学形態

1）地下水

分析方法は酒井[1]らの方法に準じ，検出器としてICP/MSを接続したHPLCで，As(Ⅲ)，As(V)，MAAおよびDMAAの標準溶液(1～100μg/L)で検量線を別途作成し，試料中のそれぞれの形態のヒ素を定量した.

なお，本分析法による定量限界は，いずれの物質も0.05μg/Lである.

地下水は，保健所に井戸水の依頼検体として持ち込れたものについて測定を行い，その結果を表2及び表3に示した．また，地下水及び河川水のクロマトグラムを図1に示した.分析結果からAs(Ⅲ)及びAs(V)は，0.01～5μ

表2．23区のヒ素濃度

採水場所	n		As(Ⅲ)	DMAA	MMAA	As(V)	総ヒ素
江戸川区	5	最高値	5.13	0.00	0.00	2.58	5.52
		最低値	0.09	0.00	0.00	0.00	0.10
世田谷区	4	最高値	2.69	0.00	0.00	0.00	2.69
		最低値	1.25	0.00	0.00	0.00	1.25
中野区	2	最高値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
新宿区	2	最高値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
台東区	3	最高値	0.18	0.00	0.00	0.00	0.18
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09
渋谷区	2	最高値	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
杉並区	10	最高値	0.10	0.00	0.00	0.37	0.45
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
大田区	3	最高値	0.00	0.00	0.00	0.27	0.27
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
北区	1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
豊島区	2	最高値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
板橋区	1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
品川区	6	最高値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12区全体	41	最高値	5.13	0.00	0.00	2.58	5.52
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

μg／L

表3．多摩地区のヒ素濃度

採水場所	n		As(Ⅲ)	DMAA	MMAA	As(V)	総ヒ素
小金井市	1		0.00	0.00	0.00	1.98	1.98
小平市	1		0.00	0.00	0.00	0.14	0.14
立川市	1		0.00	0.00	0.00	0.16	0.16
狛江市	4	最高値	0.00	0.00	0.00	1.21	1.21
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.16	0.16
東久留米市	8	最高値	1.45	0.00	0.00	2.64	4.09
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
調布市	1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
田無市	1		0.00	0.00	0.00	0.09	0.09
清瀬市	1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
町田市	7	最高値	0.00	0.00	0.00	1.91	1.91
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
多摩市	1		0.00	0.00	0.00	tr	tr
日野市	1		tr	0.00	0.00	0.00	tr
青梅市	2	最高値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
福生市	1		0.00	0.00	0.00	0.06	0.06
武蔵野市	1		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
八王子市	5	最高値	0.10	0.00	0.00	0.74	0.84
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
多摩地区	36	最高値	1.45	0.00	0.00	2.64	4.09
		最低値	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

μg／L

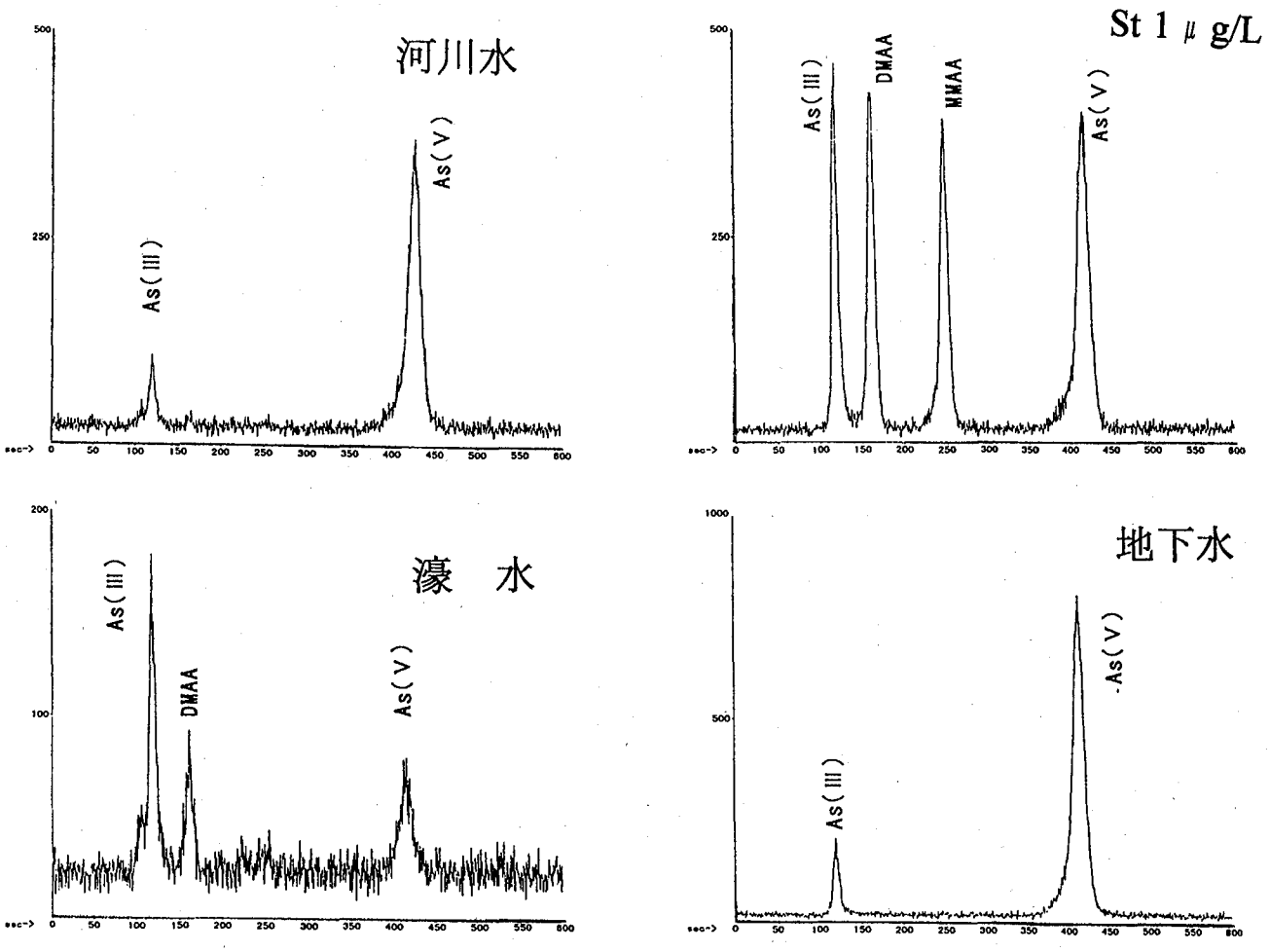


図1．ヒ素化合物のクロマトグラム

g/Lの範囲で検出されたが有機態ヒ素であるMAA及びDMAAについては全く検出されなかった.

1989年に行われた福井県におけるヒ素の地下水調査では,調査地点29地点(浅井戸28地点)のうち0.005mg/L以下が10地点,0.006mg/Lから0.010mg/Lが5地点,0.011～0.050mg/Lが14地点であった.今回の調査では,地下水のヒ素の濃度範囲は,0.00005mg/L以下から0.005mg/Lであったが調査件数が少なく東京都全体を反映していないと考えられる.

2）河川水

ヒ素は自然界に広く分布しており,多くは硫ヒ鉄鉱 FeA_sS, $FeAs_2$として,また火山岩中に脈をなして存在する鶏冠石中にAs_mS_nとして,火山の噴気孔,温泉より出る石黄にAsSとして,その他金属硫化物としてAs_mSの形で存在している.

地表の土壌や河川水などには,これらの風化物および熱水との反応により三価の無機態のヒ素化合物である亜ヒ酸,亜ヒ酸塩及び五価の無機態のヒ酸,ヒ酸塩の形で供給されるものと思われる.また,工業的には鋼鉱石などの精錬の際に煙灰中などからもかなりの量が供給される.

温泉などからの地熱水は多量にヒ素を含み,還元的な雰囲気から出てくるので三価の状態のヒ素の割合が多いとされている.戸田ら[2]は,我が国の温泉水のほとんどがヒ素全体の50%から85%が三価のヒ素であることを報告している.

河川水などの地表水では酸化的雰囲気なのでほとんど五価のヒ酸イオンの形で微量溶存している.微生物が多い水では,これによってメチル化された有機態のヒ素も測定されているが,今回測定した河川水は,As(Ⅲ)0.1～0.2μg/L, As(V)1.2～2.0μg/Lであった.

全国の水道原水,浄水中のヒ素濃度をみてみると,最高値および平均値も原水,浄水共に全データの90%以上が0.005mg/L以下であり,0.051mg/L以上を示した箇所は全データのわずか0.12%であった.原水の種類別に見ると地下水,ダム湖沼水,表流水も測定箇所のほぼ90%以上の地点で0.005mg/L以下であり,0.025mg/L 以下の濃度が数%の箇所で検出されている.

Braman[3]がまとめたアメリカのフロリダにある4ケ所の川,2ケ所の沼,3ヶ所の湖でのヒ素濃度は,1か所の川で五価のヒ素が高かったが,その他は数10ngから0.024ng/dm3であり,原水中から高濃度のヒ素を検出した箇所は少なかったとしている.原水中のヒ素は一般に無機態で存在しており,淡水の一部は生物によりメチル化されたヒ素が存在している.堆積物中にはメチル化態は検出されておらず,還元形のヒ素が硫化物と反応し,メチル化されない硫化ヒ素を形成していると推察している.

田中ら[4]は,1986年利根川流域の29ケ所でヒ素濃度を測定している.それによると総ヒ素濃度は平均で2.24μg/Lで総ヒ素濃度の97%以上は無機態ヒ素であり残りはMAA, DMAAであったと報告している.MAAが高濃度で検出された測定点は農業用水の流入地点であり,DMAAが高い地点は霞ヶ浦(メチル化態は総ヒ素の10%占めている),ここでヒ素が生物によりメチル化されたものと推察している.

3）濠水

表4に皇居外濠の測定結果を示した.その結果As(Ⅲ), As(V),及びDMAAが平均で0.23μg/L, 0.20μg/L, 0.13μg/L,総ヒ素として0.44μg/L存在していることがわかった.またAs(Ⅲ)とDMAAの濃度はほぼ同じ程度であった.またAs(V)については半数近くが0.05μg/L以下であった.ヒ素の供給源については,他から水の流入がほとんどないため,雨水のヒ素も関与していると思われる.雨水中のヒ素濃度については,Andreae[5]が1980年に調査した報告があり,雨水中のヒ素は,無機態ヒ素のみが検出されている.

表4．皇居外濠のヒ素濃度

採水場所	As(Ⅲ)	DMAA	MMAA	As(V)	総ヒ素
外濠A	0.32	0.21	0.00	tr	0.53
外濠B	0.29	0.08	0.00	0.00	0.37
外濠C	0.35	0.11	0.00	tr	0.46
外濠D	0.07	0.09	0.00	0.19	0.35
外濠E	0.24	0.00	0.00	0.21	0.45
外濠F	0.18	0.26	0.00	0.15	0.59
外濠G	0.08	0.08	0.00	0.23	0.39
外濠H	0.30	0.11	0.00	0.00	0.41
最高値	0.35	0.26	0.00	0.23	0.59
最低値	0.07	0.00	0.00	0.00	0.35
平均	0.23	0.12	0.00	0.13	0.44

μg／L

2．試料の保存性

試料採水後のヒ素化合物の安定性を調べるため,河川水,河川水をろ過したもの(河川ろ過水)及び井戸水にヒ素化合物をそれぞれ1,5,10μg/Lになるように調整した試料を室温,冷蔵庫及び冷凍庫(-20℃)に放置し1,3,7,14日後に測定し,試料の保存性を調べた.その結果,経時

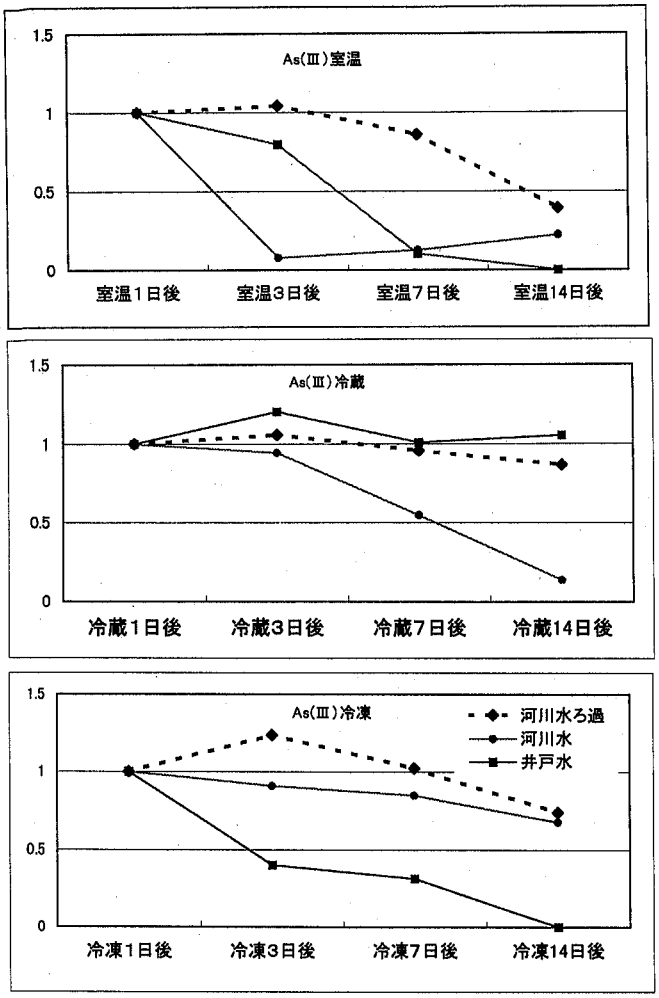


図２．試料水の保存についてAs(3)

的にAs(Ⅲ)は減少しAs(Ⅴ)は増加した．また，MMA及びDMAAはほとんど変化がなかった．図２.に1μg/LおけるAs(Ⅲ)の２週間の経時変化を示した．

室温では河川水，井戸水及び河川水ろ過の順に減少率が大きく，河川水は３日後に井戸水では７日後に80～90%に減少した．河川水ろ過でも14日後には60%減少した．

ま と め

河川水中にはヒ素は５価として，また濠など藻類が繁殖しやすい環境では３価，５価及びDMAAの形態で存在することが分かった．また，還元的な状態にある井戸水では，３価のヒ素として存在することがわかった．

文　献

1）LC-ICP/MSによる環境水中のひ素化合物の形態別測定：酒井徹志，伊達由紀子，井上嘉則その他，日本分析化学会第46年会,1997

2）戸田昭三:環境化学情報－環境汚染物質のキャラクタリゼーション，1982，東大出版会，東京

3）Braman,R,S.:Environmental Reaction and analysis methods, In Fowler, B.A.ed, *Biological and Environmetal Effects of Aresenic*, 141-154, 1983, Elsevier, Amsterdam

4）Tanaka, S., Nakamura, M., Kishi, Y. and Hashimoto, Y.：*Nippon Kagakukaishi*, 727-732, 1986

5）Andreae, M.O.：*J. Geophys. Res.*, **85**, 4512-4518, 1980

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 191-195, 1998

水及び底質中のスルフェンアミド類の分析法の検討

小 輪 瀬 勉*, 岡 本 寛*, 真 木 俊 夫*

A Method for Determination of Sulfenamides in Water and Sediment

TSUTOMU KOWASE*, YUTAKA OKAMOTO** and TOSHIO MAKI*

Keywords：N-*tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド N-tert-butyl-2-benzothiazolyl sulfenamide, N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド N-cyclohexyl-2-benzothiazolyl sulfenamide, N, N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド N, N-dicyclohexyl-2-benzothiazolyl sulfenamide, 加硫促進剤 acceleator of rubber vulcanization, ガスクロマトグラフィー/質量分析計 gas chromatography/mass spectorometry

緒 言

スルフェンアミド類はゴムの加硫促進剤としてかなり広範囲に工業薬品として使用されている．毒性についてはKrystyna[1]らが妊娠したラットを用い実験を行った結果，母親の体重減少，腎臓肥大，脾臓萎縮等が生じ又胎児については体重，身長の減少及び皮下出血等が確認されたとの報告がある．

今回スルフェンアミド類のうちN-*tert*-ブチル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（以下BBSと称す），N-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（以下CBSと称す），N,N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミド（以下DCBSと称す）の3物質（図1）について環境水及び底質からのガスクロマトグラフィー/質量分析計（以下GC/MSと称す）による分析法開発を行い，良好な結果を得たので報告する．

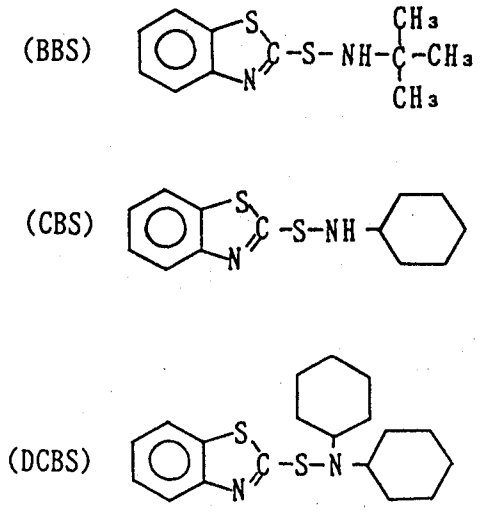


図1．構造図

実験の部

1）試薬

BBS：大内新興化学工業製，CBS：東京化成1級，DCBS：川口化学工業製，クリセンd_{12}：和光純薬，n-ヘキサン，アセトン：残留農薬試験用，ポリエチレングリコール200：試薬1級，無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用，シリカゲル：ワコーゲルC-200，5％含水シリカゲル：ワコーゲルC-200を130℃で16時間加熱活性化し，デシケーター内で放冷する．共栓三角フラスコにこのシリカゲルを19g取り，水1mlを加え1時間振とうし，デシケーター内に保存する．5％含水シリカゲルカラム：内径1cm，長さ30cmのクロマト管に5％含水シリカゲル5gをn-ヘキサンを用いて充填し，上部に無水硫酸ナトリウム2gを積層する．

2）標準液の調整

各スルフェンアミド類をアセトンに溶解し，1,000ppmの混合溶液を作成し標準原液とする．この溶

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所多摩支所 190-0023 東京都立川市柴崎町3－16－25
** Tama Branch laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

液を適宜希釈して0.25～2ppmの濃度系列を調整し，検量線用標準液とする．

3）内標準液の調整

内標準液：クリセンd_{12}の1,000ppmアセトン溶液0.5ml及びポリエチレングリコール200の10,000ppmアセトン溶液10mlを取りアセトンで100mlとし，この溶液をさらに10倍希釈して内標準液とする．

4）GC/MS条件

カラム：DB-1 膜厚0.1 μm，内径0.25mm×長さ30m，カラム温度：50℃（5分保持）-15℃/分-150℃-10℃/分-310℃（5分保持），注入口：250℃，トランスファーライン温度：280℃，注入法：スプリットレス，カラム入口圧：He10pis，イオン源温度：250℃，イオン化電流：300 μA，イオン化エネルギー：70eV，モニターイオン BBS：m/z 182（確認用149，223），CBS：m/z 98（確認用167），DCBS：m/z 180（確認用83，98），内標準物質：クリセンd_{12}（m/z 240）

5）添加回収実験

5)-(1) 水質試料

精製水1Lを2Lの分液ロートに取り，各スルフェンアミド類0.5 μgを添加し，試料濃度が6％となるように塩化ナトリウムを加え，完全に溶解した後n-ヘキサン50mlを加えて30分間振とう抽出し，静置後n-ヘキサン層を分取する．水層に再びn-ヘキサン50mlを加えて30分間振とう抽出を行う．静置後n-ヘキサン層を分取し，先のn-ヘキサン層と合わせて無水硫酸ナトリウムで脱水する．ろ過後ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で3ml位まで濃縮する．さらに窒素気流中で溶媒がわずかに残る程度に濃縮（以下乾固と称す）し，内標準液を1ml加え試料液とする．この溶液1 μlをGC/MSに注入しシングルイオンモニター（以下SIMと称す）で測定する．

なお，精製水の他に海水及び河川水も試料とし，添加濃度も1.0，1.5 μgと変化させ回収実験を行った．

5)-(2) 底質試料

試料10g（隅田川河口の底質を3,000rpmで遠心分離した残査）を共栓付き遠沈管に取り，各スルフェンアミド類5 μgを加え4℃で1晩放置した後，アセトン50mlを加え30分間振とう抽出する，これを3,000rpmで10分間遠心分離しアセトン層を分取する．残査に再びアセトン50mlを加え同じ操作を繰り返して得られたアセトン層を合わせる．アセトン層を6％塩化ナトリウム溶液500mlの入った1Lの分液ロートに入れ，n-ヘキサン50mlを加え30分間振とう抽出を行う．静置後n-ヘキサン層を分取し，6％塩化ナトリウム溶液100mlで洗浄した後，n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水する．ろ過後，ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で10ml位まで濃縮する．

この溶液を100mlの分液ロートに移し，n-ヘキサン飽和アセトニトリル50mlを加え10分間振とうする．静置後アセトニトリル層を300mlの分液ロートに移す．n-ヘキサン層に再びn-ヘキサン飽和アセトニトリル50mlを加え10分間振とうし静置後，先のアセトニトリル層に合わせる．これに水5mlを加え1分間振とうし静置する．アセトニトリル層を6％塩化ナトリウム400mlの入った1Lの分液ロートに入れn-ヘキサン50mlを加え30分間振とうする．静置後n-ヘキサン層を300mlの分液ロートに分取する．水層に再びn-ヘキサン50mlを加え30分間振とう抽出する．静置後先のn-ヘキサン層を合わせる，これに6％塩化ナトリウム溶液100mlを加え振とうし静置する．n-ヘキサン層を分取し無水硫酸ナトリウムで脱水する．ろ過後，ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で2～3ml位まで濃縮し，さらに窒素気流中で乾固しn-ヘキサンを加えて1mlとする．

この濃縮液を5％含水シリカゲルカラムに負荷し，液面をカラムヘッドまで下げてから少量の1％アセトン含有n-ヘキサンで濃縮管を洗い，再びカラムに負荷し，100mlの1％アセトン含有n-ヘキサンで展開する．初流の50mlを捨て，その後の50mlを分取しロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で2～3ml位まで濃縮する．さらに窒素気流中で乾固し内標準液を1ml加え試料液とする．この溶液1 μlをGC/MSに注入しSIMで測定する．

結果及び考察

1）水試料からの抽出溶媒の検討

海水や河川水等の環境水中のスルフェンアミド類の分析法を検討するため，抽出溶媒としてn-ヘキサン，ジクロロメタン，ジエチルエーテル，酢酸エチルを用いて精製水1L中からのスルフェンアミド類の抽出率を求めた． その結果を表1に示した．n-ヘキサンを用いると，スルフェンアミド類の抽出率はいずれも97%以上で定量的に抽出されることがわかった．この結果から抽出溶媒として抽出率の最も高いn-ヘキサンを用いることにした．

表1．各種溶媒による抽出率

抽出溶媒	BBS(%)	CBS(%)	DCBS(%)
n-ヘキサン	97.5	98.7	100.2
ジクロロメタン	72.4	82.2	75.6
ジエチールエーテル	68.1	60.9	71.4
酢酸エチル	40.6	39.6	53.9

2）底質試料におけるシリカゲルカラムによるクリーアップの検討

底質試料については，アセトンで抽出後n-ヘキサンに転溶させ，次いでn-ヘキサンーアセトニトリル分配を行ったが，完全に精製されなかった．そのため，さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ操作が必要であった．そこで5％含水シリカゲルカラム（5g）に対して溶出溶媒として1％アセトン含有n-ヘキサンを用いて各フラクション5mlを取り，スルフェンアミド類の測定を行った．その結果，表2のような溶出分布を示した．スルフェンアミド類はいずれも55～100mlの画分に溶出することがわかったので，カラムによるクリーンアップ操作は初流の50mlを捨て去り，その後の50mlを分取することにした．

なお，溶出溶媒として1％酢酸エチル含有n-ヘキサン及び1％ジエチルエーテル含有n-ヘキサンを用いると，着色物質を取り除くことができず，回収率もBBS，CBSが0％，DCBSが42.1％～56.3％であった．また，1％アセトン含有n-ヘキサンを展開溶媒として，5%含水フロリジルカラム（5g）を用いると回収率が3物質ともに0％，5％含水中性アルミナカラム（5g）を用いるとBBSが15.1％，CBS：0％，DCBS：10.2％であり，このような条件ではスルフェンアミド類の溶出が不充分であることがわかった．

表2．シリカゲルカラムからのスルフェンアミド類の溶出分布

	0～40	40～45	45～50	50～55	55～60	60～70	70～100	100～150(ml)
CBS	0	0	0	0	4.7	53.1	42.2	0 (%)
BBS	0	0	0	0	9.2	67.8	23.0	0 (%)
DCBS	0	0	0	0	12.4	87.6	0	0 (%)

3）その他のクリーンアップ法の検討

底質試料においてアセトニトリル層をn-ヘキサン抽出後，シリカゲルカラム処理の代わりに，より簡便なクリーンアップ操作として塩酸溶液への転溶を検討したが，スルフェンアミド類のn-ヘキサン溶液100ml（10 μg）は0.0001，0.1，1.0，2.0，6.0モル塩酸層に抽出されず，この方法は採用することができなかった．

以上のことからクリーンアップ法として，5％含水シリカゲルカラムで1％アセトン含有n-ヘキサンを展開溶剤として用いることとした．

4）SIMクロマトグラム及び検量線

実験の部の4）の測定条件で得られたBBS，CBS，DCBS及びクリセンd_{12}の標準液1ppmのSIMクロマトグラムを図2に示した．3物質ともに良好なクロマトグラムが得られた．また，0.25～2ppmの範囲における検量線を図3，4，5に示すした．内標準物質クリセンd_{12} 0.5ppmに対する濃度比と面積比により検量線を作成し，いずれも良好な直線性が得られた．

5）回収率

水試料及び底質試料について，本試験法によるスルフェンアミド類の添加回収実験の結果を表3，4，5に示した．この結果から水試料については，回収率93.4～98.1％，変動率1.13～3.20％という良好な結果が得られた．

なお，海水及び河川水等の水試料とも妨害物質は見られないことから，シリカゲルカラムクロマトによるクリーンアップ操作は不要であった．

底質については，回収率69.9～72.9％，変動率2.50～3.51％という結果から，試験法として満足できる値であった．

6）検出限界及び定量限界

検出限界及び定量限界値を表6，7に示した．

なお，この値は環境庁環境保健部調査室発行の「検出限界及び定量限界の算出方法」（平成3年5月）により算出したものである．

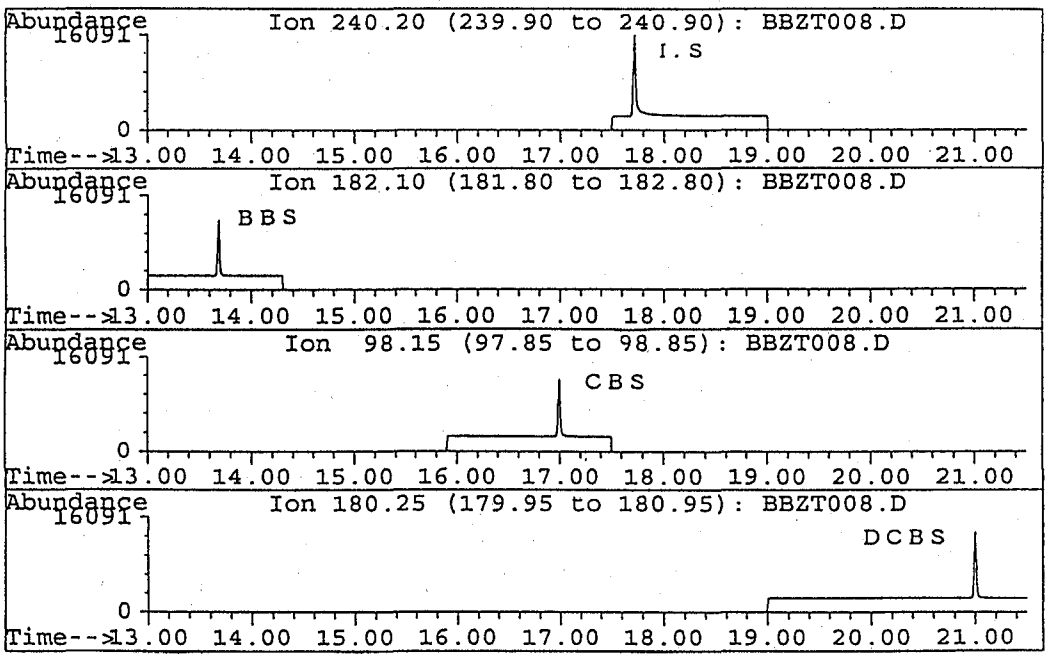


図2．標準液(1 ppm)のSIMクロマトグラム

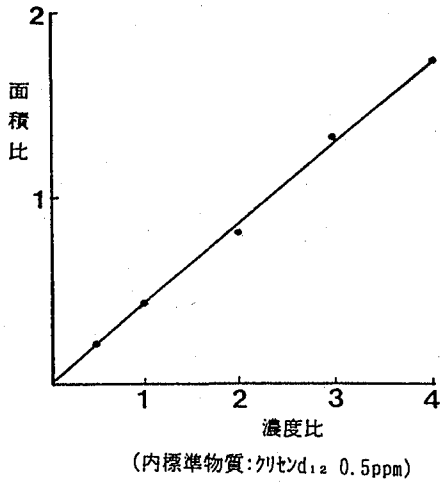


図3．BBS検量線

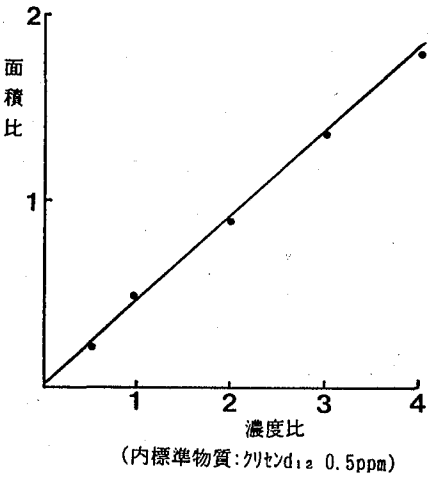


図4．CBS検量線

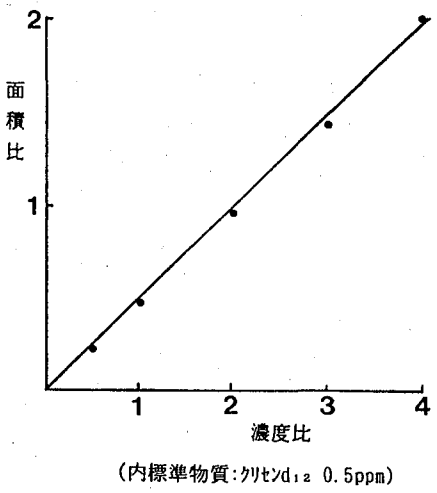


図5．DCBS検量線

表3．BBS添加回収実験結果

試　料	試料量	添加量(μg)	n	平均回収率(%)	変動率(%)
精製水	1L	0.5	4	93.4	2.02
精製水	1L	1	4	96.6	1.63
精製水	1L	1.5	4	98.0	2.17
河川水	1L	1	4	95.8	3.06
海　水	1L	1	4	98.1	2.74
底　質	10g	5	4	70.5	2.50

表4．CBS添加回収実験結果

試　料	試料量	添加量(μg)	n	平均回収率(%)	変動率(%)
精製水	1L	0.5	4	93.6	1.13
精製水	1L	1	4	96.0	3.01
精製水	1L	1.5	4	95.6	2.48
河川水	1L	1	4	94.0	2.46
海　水	1L	1	4	96.1	2.81
底　質	10g	5	4	72.9	3.51

表5．DCBS添加回収実験結果

試　料	試料量	添加量(μg)	n	平均回収率(%)	変動率(%)
精製水	1L	0.5	4	93.9	1.77
精製水	1L	1	4	95.0	2.14
精製水	1L	1.5	4	95.6	2.48
河川水	1L	1	4	93.6	3.20
海　水	1L	1	4	96.6	2.74
底　質	10g	5	4	69.9	2.83

表6．検出限界

試　料	試料量	BBS	CBS	DCBS
水　質	1000ml	0.086μg/l	0.21μg/l	0.26μg/l
底　質	10g	2.31μg/kg	4.97μg/kg	3.30μg/kg

表7．定量限界

試　料	試料量	BBS	CBS	DCBS
水　質	1000ml	0.29μg/l	0.70μg/l	0.86μg/l

ま と め

本試験法によりBBS，CBS，DCBSの3物質を水試料及び底質試料とも12ppbレベルで同時に測定することが可能である．

スルフェンアミド類はゴムの加硫促進剤としてかなり広い範囲で使用されており，今後環境中での汚染が懸念される物質である．

なお，本3物質は，平成10年度の環境庁化学物質環境汚染実態調査の測定対象物質であり，全国調査が予定されている．

文　献

1）Krystyna, S., Bogumila, B. and Bguslaw, B：*Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **16**, 1-6, 1996

2）奥村為男：環境科学，**5**，(3)，575-521，1995

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 196-202, 1998

東京湾の環境汚染モニタリング（13報*）
スズキ・ウミネコ中の内分泌撹乱物質の濃度推移について

斎藤育江**, 瀬戸　博**, 大久保智子***, 竹内正博**

Survey of Chemical Pollutants in Biota from Tokyo Bay (XIII*)
Concentrations of Endocrine Disrupting Chemicals in Japanese Sea Bass and Gull from 1980s.

IKUE SAITO**, HIROSHI SETO**, TOMOKO OHKUBO** and MASAHIRO TAKEUCHI**

Keywords：汚染 pollution，有機塩素系化合物 chlorinated hydrocarbons，内分泌撹乱物質 endocrine disrupting chemicals，スズキ sea bass，ウミネコ gull

緒　言

1978年以来，環境庁の委託による東京湾の環境汚染モニタリングが実施され，スズキ (*Lateolabrax japonicus*) 及びウミネコ (*Larus crassirostris* Vieillot) 中の化学物質濃度の変化及び特徴を報告してきた[1]．

調査対象38物質のうち，熱媒体のポリ塩化ビフェニール（PCB）及びポリ塩化ナフタレン（PCN），有機塩素系農薬であるDDT類，クロルデン類，ヘキサクロロベンゼン（HCB），アルドリン，ディルドリン，エンドリン及びヘプタクロル，船底塗料であるトリブチルスズ化合物（TBT）は，その毒性・残留性及び生物濃縮性から，第１種特定化学物質（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）に指定され，既に製造・販売・使用が禁止されている．

東京湾産魚介類の汚染状況については既に危機的状況を脱し，PCB及びメチル水銀については，魚介類中の暫定基準は十分にクリアーされるようになった[2]．しかし，化学物質による環境汚染の構図そのものが変わった訳ではなく，未規制の物質による汚染の可能性は常に存在している[3]．しかも近年，規制された物質の多くは，極微量でも生物の内分泌機能に対する障害性を持つことが明らかとなり[4,5]，化学物質による環境汚染がこれまで以上に大きな問題となっている．

本報は平成５年度から平成８年度に実施した東京湾スズキのモニタリング調査結果及び平成５年度に実施した東京湾ウミネコのモニタリング調査結果をまとめたものである．また調査対象38物質中，「外因性内分泌撹乱化学物質問題に関する研究班調査報告（環境庁）」においてリストアップされている26物質について，調査開始（昭和56年度）以来のスズキ・ウミネコ中の濃度推移をまとめたので併せて報告する．

試料及び分析方法

試料　スズキは平成５年～平成８年の各年10月に東京湾内で捕獲されたものを用いた．各年度とも20～35尾を体重の順に4～7尾ずつまとめて５検体とした．ウミネコは平成５年６月から７月にかけて羽田空港付近で捕獲された若鳥を採取日の順に８羽ずつまとめて5検体とした．なお，平成６年度以降は，空港の拡張に伴いウミネコの採取が困難となったため，ウミネコの調査は平成５年度で終了した．試料の鑑定及び調製は，前報[1]と同様に行った．試料の概要を表１，２に示す．

分析方法　環境庁で定めた分析法[6]により行った．詳細な操作法，及び分析条件は報告書[7-9]に記載した．

調査対象とした化学物質は38種類であり，前報[1]と同様に略記した．

試薬及び分析装置は，前報と同様のものを使用した．

結　果

1. 平成5年度から8年度までの調査結果

スズキについて　スズキ可食部中の化学物質濃度を測定した結果を表３に示した．PCB濃度は平均0.06～0.25 μg/gで，４年間のうちでは，試料重量の最も少なかった平成７年度に最低の値を示した．PCN及びHCBは検

---

* 第12報，東京衛研年報，45，133-135，1994.

** 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１

*** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1．試料(スズキ)の概要および水分，脂肪分

group No.	体重(g) mean ± S.D.	体長*(cm) mean ± S.D.	水分(%)	脂肪分(%)
平成5年度(1993) (n=4)				
1	868 ± 19	36.9 ± 1.1	75.1	3.59
2	815 ± 6	36.8 ± 0.8	75.9	2.84
3	805 ± 6	36.9 ± 1.6	76.9	2.70
4	778 ± 21	35.8 ± 1.0	76.6	3.03
5	711 ± 30	35.4 ± 1.4	77.4	2.32
mean	795	36.4	76.4	2.90
平成6年度(1994) (n=4)				
1	965 ± 10	40.2 ± 1.3	71.6	4.68
2	938 ± 5	40.0 ± 1.1	73.7	4.29
3	920 ± 8	39.1 ± 1.7	72.5	4.68
4	876 ± 14	38.9 ± 0.7	71.9	4.03
5	818 ± 44	38.0 ± 1.4	73.2	4.08
mean	903	39.2	72.6	4.35
平成7年度(1995) (n=7)				
1	814 ± 46	38.3 ± 0.4	74.8	4.23
2	533 ± 16	32.9 ± 0.9	75.8	3.73
3	499 ± 8	31.2 ± 0.9	75.9	3.23
4	471 ± 10	30.7 ± 0.7	75.5	3.04
5	413 ± 22	29.5 ± 0.6	74.1	3.38
mean	546	32.5	75.2	3.52
平成8年度(1996) (n=6)				
1	735 ± 22	35.6 ± 0.9	71.7	5.19
2	684 ± 19	35.4 ± 1.4	71.8	5.13
3	634 ± 5	34.0 ± 0.6	69.1	4.95
4	598 ± 10	33.9 ± 0.6	71.9	4.66
5	549 ± 24	33.0 ± 0.8	69.6	4.45
mean	640	34.4	70.8	4.88

＊：尾部を除く

表2．試料（ウミネコ）の概要および水分，脂肪分
平成5年度（n=8）

group No.	性別	体重(g) mean ± S.D.	翼長(cm) mean ± S.D.	水分(%)	脂肪分(%)
1	mix	569 ± 68	34.5 ± 2.4	64.9	7.27
2	mix	614 ± 63	36.1 ± 1.1	66.8	7.12
3	mix	570 ± 78	35.7 ± 1.3	64.4	6.62
4	mix	566 ± 61	36.7 ± 1.2	65.0	5.09
5	mix	602 ± 74	36.8 ± 1.6	62.9	5.51
mean		584	36.0	64.8	6.32

出されなかった．ドリン類では，ディルドリンの検出率が平成5，6年度には5/5であったが，7年度には2/5，8年度には1/5と，減少傾向がみられた．アルドリン，エンドリンは検出されなかった．DDT（*o,p'*-DDT,*p,p'*-DDT）は平成6年度には検出されなかったが，その他の年度では平均0.002～0.003 μg/gと低レベルながら検出された．DDTの代謝物であるDDE（*o,p'*-DDE,*p,p'*-DDE）及びDDD（*o,p'*-DDD, *p, p'*-DDD）の濃度合計は平均0.009～0.078 μg/gであり，総DDT濃度（上記6種の合計濃度）は平成5年度に，調査開始以来最も高い値を示した．総クロルデン濃度（*t*-クロルデン，*c*-クロルデン，*t*-ノナクロル，*c*-ノナクロル及びオキシクロルデンの合計濃度）は，平均0.006～0.030 μg/gでPCBと同様，試料重量の最も少なかった平成7年度に最低値を示した．ヘプタクロルは，平成5年度に1検体にのみ検出されたが，それ以外は不検出であった．ヘプタクロルの代謝物であるヘプタクロルエポキシド（HCE）は，検出されなかった．HCH類（α-，β-，γ-及びδ-HCH）も4年間を通じて，不検出であった．塩素化ベンゼン類（ジクロロベンゼン3種：DCB，トリクロロベンゼン3種：TrCB，テトラクロロベンゼン3種：TeCB，ペンタクロロベンゼン：PeCB）ではパラジクロロベンゼン（*p*-DCB）が主に検出され（n.d.～0.14 μg/g），他の物質はほとんど不検出であった．フタル酸エステル類（フタル酸ジ-n-ブチル：DnBP，フタル酸ジ-2-エチルヘキシル：DEHP）及びリン酸トリブチル（TBP）はいずれも検出されなかった．有機スズでは，TBT濃度が平成8年度に平均0.87 μg/gと調査開始（昭和61年度）以来，最高値を示した．トリフェニルスズ化合物（TPT）濃度は平成5，6年度には0.08 μg/gであったが，7，8年度には検出されなかった．

ウミネコについて　ウミネコ胸筋中の化学物質濃度を測定した結果を表4に示した．PCB濃度は平均0.77 μg/gであり，調査開始以来最も低い値であった．PCNは検出されなかった．HCBは，平均0.020 μg/gで前年度の約3倍高値であった．ドリン類では，ディルドリン濃度が平均0.007 μg/gで，前年度とほぼ同程度であった．アルドリン・エンドリンは検出されなかった．DDT類では*p,p'*-DDEのみが検出され，平均0.34 μg/gと前年度と同程度であった．総クロルデン濃度は0.077 μg/gで，前年度に比べると7割程度に減少したが，平成元年度からほぼ同程度の濃度で推移しており[1,11-13]，汚染はいまだに続いている．ヘプタクロルは前年度同様不検出であり，HCE濃度も前年度と同程度（0.003 μg/g）であった．HCH類では，β-HCHのみが検出され，調査開始以来最低の値（0.009 μg/g）を示した．塩素化ベンゼン類では*p*-DCBのみが検出され，検出率は4/5，濃度は0.01～0.02 μg/gであった．フタル酸エステル類，TBP及び有機スズはいずれも検出されなかった．

表3．スズキ可食部中の有害化学物質濃度測定結果

compound	平成5年度 range[a]	平成5年度 mean[a]	平成6年度 range[a]	平成6年度 mean[a]	平成7年度 range[a]	平成7年度 mean[a]	平成8年度 range[a]	平成8年度 mean[a]
PCB*1	0.21 - 0.29	0.25	0.18 - 0.27	0.22	0.04 - 0.08	0.06	0.08 - 0.14	0.12
PCN*2	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
HCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
aldrin	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
dieldrin	0.003 - 0.005	0.004	0.001 - 0.002	0.002	nd - 0.002	-	nd - 0.001	-
endrin	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
o,p'-DDT	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
p,p'-DDT	0.001 - 0.003	0.002	nd	-	0.001 - 0.002	0.002	0.003 - 0.004	0.003
o,p'-DDE	0.009 - 0.018	0.013	0.002 - 0.005	0.003	nd - 0.001	-	nd - 0.002	-
p,p'-DDE	0.032 - 0.070	0.053	0.013 - 0.026	0.018	0.004 - 0.008	0.006	0.008 - 0.012	0.009
o,p'-DDD	0.001 - 0.002	0.002	nd	-	nd	-	nd - 0.002	-
p,p'-DDD	0.006 - 0.013	0.010	0.003 - 0.005	0.004	0.002 - 0.004	0.003	0.003 - 0.006	0.004
t-chlordane	0.002 - 0.004	0.003	0.001 - 0.001	0.001	nd - 0.001	-	0.002 - 0.002	0.002
c-chlordane	0.007 - 0.011	0.009	0.002 - 0.004	0.003	0.002 - 0.003	0.002	0.002 - 0.003	0.003
t-nonachlor	0.008 - 0.014	0.012	0.004 - 0.005	0.004	0.002 - 0.004	0.003	0.003 - 0.004	0.003
c-nonachlor	0.004 - 0.007	0.006	0.002 - 0.003	0.002	0.001 - 0.002	0.001	nd - 0.002	-
oxychlordane	nd - 0.001	-	nd	-	nd	-	nd	-
heptachlor	nd - 0.003	-	nd	-	nd	-	nd	-
HCE	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
α-HCH	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
β-HCH	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
γ-HCH	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
δ-HCH	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
o-DCB*1	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
m-DCB*1	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
p-DCB*1	0.13 - 0.16	0.14	0.10 - 0.19	0.16	0.07 - 0.23	0.14	nd - 0.01	-
1,2,3-TrCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
1,2,4-TrCB	0.001 - 0.002	0.001	nd	-	nd	-	nd - 0.002	-
1,3,5-TrCB	nd	-	nd	-	nd - 0.002	-	nd	-
1,2,3,4-TeCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
1,2,3,5-TeCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
1,2,4,5-TeCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
PeCB	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
DnBP*3	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
DEHP*3	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
TBP*1	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
TBT*4	0.19 - 0.25	0.21	0.12 - 0.17	0.15	0.033 - 0.057	0.047	0.071 - 0.12	0.087
TPT*5	0.062 - 0.095	0.084	0.063 - 0.095	0.079	nd	-	nd	-

a:(μg/g on wet weight basis)

＊1:nd<0.01,＊2:nd<0.02,＊3:nd<0.1,＊4:nd<0.002,＊5:nd<0.005,others:nd<0.001

2．1980年代以降の内分泌撹乱物質の濃度推移

調査開始時からのスズキの体長は平均27.2cm～67.5cmであり，最小と最大で2.5倍の差があった．試料のスズキは20～30cmのものが適当で，採取場所を固定化することとされているが[6]，捕獲を水産業者に依頼する関係上，毎年度大きさ及び採取場所をそろえる事は難しい．その上，採取場所により成育状況が異なることも考えられたため，試料の大きさにばらつきはあるものの，体長あるいは体重による測定値の補正は行わなかった．

ウミネコは翼長が平均で34.8cm～36.2cmと体の大きさによる差は少なかったが，初年度のみ幼鳥ではなく，成鳥であった．しかし，初年度の追加調査で，ウミネコ

表4．ウミネコ胸筋中の有害化学物質濃度測定結果（平成5年度）

compound	rangea[a]	meana[a]
PCB*[1]	0.66 - 0.87	0.77
PCN*[2]	nd	-
HCB	0.006 - 0.067	0.020
aldrin	nd	-
dieldrin	0.006 - 0.009	0.007
endrin	nd	-
o,p'-DDT	nd	-
p,p'-DDT	nd	-
o,p'-DDE	nd	-
p,p'-DDE	0.22 - 0.52	0.34
o,p'-DDD	nd	-
p,p'-DDD	nd	-
t-chlordane	nd	-
c-chlordane	0.004 - 0.007	0.005
t-nonachlor	0.037 - 0.056	0.043
c-nonachlor	0.011 - 0.023	0.016
oxychlordane	0.012 - 0.016	0.013
heptachlor	nd	-
HCE	0.003 - 0.003	0.003
α-HCH	nd	-
β-HCH	0.008 - 0.010	0.009
γ-HCH	nd	-
δ-HCH	nd	-
o-DCB*[1]	nd	-
m-DCB*[1]	nd	-
p-DCB*[1]	nd - 0.02	-
1,2,3-TrCB	nd	-
1,2,4-TrCB	nd	-
1,3,5-TrCB	nd	-
1,2,3,4-TeCB	nd	-
1,2,3,5-TeCB	nd	-
1,2,4,5-TeCB	nd	-
PeCB	nd	-
DnBP*[3]	nd	-
DEHP*[3]	nd	-
TBP*[1]	nd	-
TBT*[4]	nd	-
TPT*[5]	nd	-

a:(μg/g on wet weight basis)
＊1:nd<0.01,＊2:nd<0.02,＊3:md<0.1,
＊4:nd<0.002,＊5:nd<0.005,others:nd<0.001

の年齢と翼長および汚染物質濃度との関係を調べたところ，翼長は2才以降あまり変化しないが，汚染物質濃度は年齢により大きく変動することがわかった[14]．したがって，年度ごとの試料の変動を少なくするため，次年度からは成鳥ではなく幼鳥（2，3才）を試料として用いた．また幼鳥は羽の色が成鳥と異なり外見から区別がつきやすいため，捕獲時にも好都合であった．

調査対象38物質のうち，環境庁が内分泌撹乱物質としてあげているのは，PCB，HCB，ドリン類3種，DDT類6種，クロルデン類5種，ヘプタクロル，HCE，HCH類4種，フタル酸エステル類2種，トリブチルスズ及びトリフェニルスズの26物質である．調査開始から1996年（平成8年）度までのスズキ可食部中のこれらの濃度推移及び3年ごとの移動平均値を図1に，同じく1993年（平成5年）度までのウミネコ胸筋中の濃度推移と移動平均値を図2に示した．

PCB濃度については，スズキ・ウミネコともに，調査を開始した1981年度から1983年度までは急速な減少が見られた．その後数年は，同程度のレベルで推移していたが，1990年度前後に再び増加を示した．この推移状況は，スズキ・ウミネコともにほぼ共通しており，濃度が増加した時期には何らかの汚染があったものと考えられた．ウミネコのPCB濃度は調査期間を通じて，スズキに比べて約10倍高いレベルであった．調査期間中の濃度範囲は，スズキ0.04-0.75μg/g，ウミネコ0.66-8.9μg/gであった．

HCBはスズキではあまり検出されず，検出率が5/5だったのは，1983年度と1989年度の2回で，いずれも低値であった．一方，ウミネコでは，毎年検出され，調査開始時（1982年度）に比べると1992年度には約1/4に減少していたが，1993年度には，再び調査開始時のレベルまで上昇した．調査期間中のHCBの濃度範囲は，スズキn.d.-0.009μg/g，ウミネコ0.005-0.067μg/gであった．

ドリン類のうちアルドリン及びエンドリンは，スズキ・ウミネコともにほとんど検出されなかった．ディルドリンはスズキでは年度ごとに微小な増減を繰り返しながら，1994年度までは同程度の濃度で推移していたが，1995年度以降は検出率も低くなり，減少がみられた．ウミネコでは調査開始から2年間で大幅に減少し，以来ゆるやかな減少傾向がみられ，1993年度には調査開始当初の約1/10に減少していた．調査期間中のディルドリンの濃度範囲は，スズキn.d.-0.005μg/g，ウミネコ0.006-0.12μg/gであった．

DDT類は6種の合計である総DDT濃度をグラフにした．スズキでは，調査開始から2年間は急速に減少し，その後数年は同レベルで推移していたが，再び増加して1993年には調査開始時と同濃度が検出された．6種の合計に占めるDDTの割合は低く（19%以下）代謝物であるDDE及びDDDがその大半を占めていた．一方ウミネコでは，1989年度までは減少傾向がみられたが，以降は1993年度までほとんど変わらぬ濃度で推移していた．6

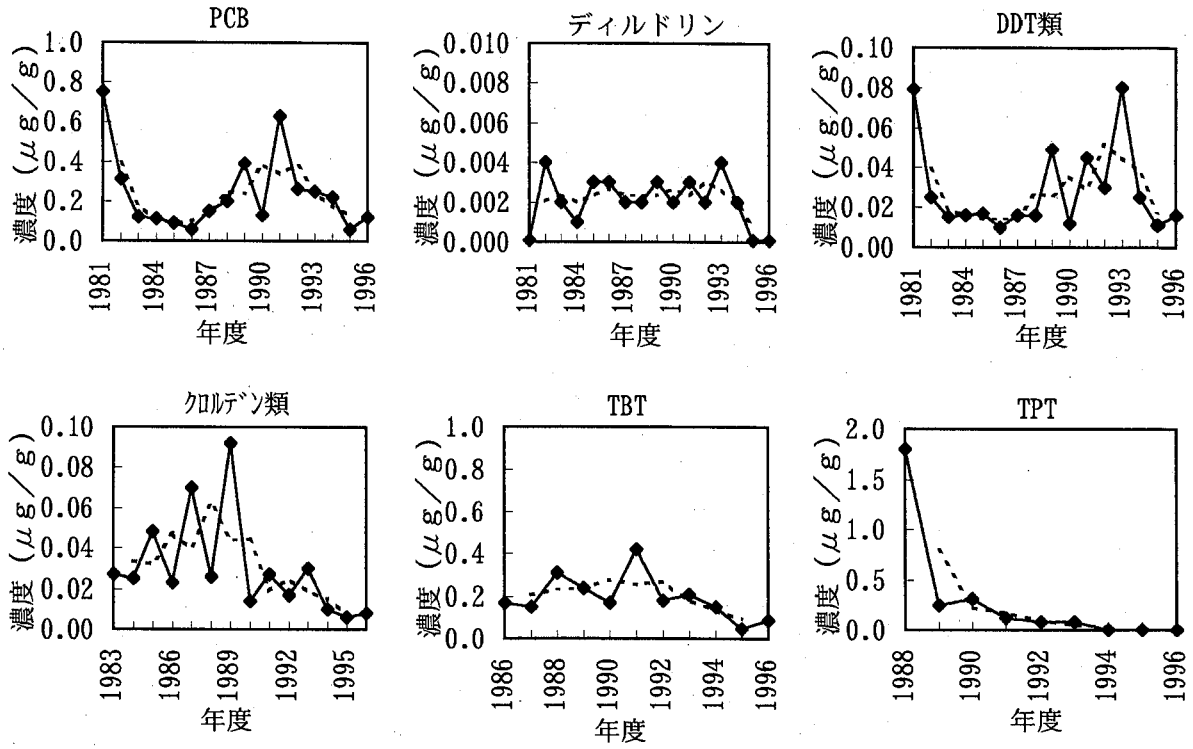


図１．スズキ可食部中の内分泌撹乱物質濃度推移
—◆— 実測値，---- 移動平均値

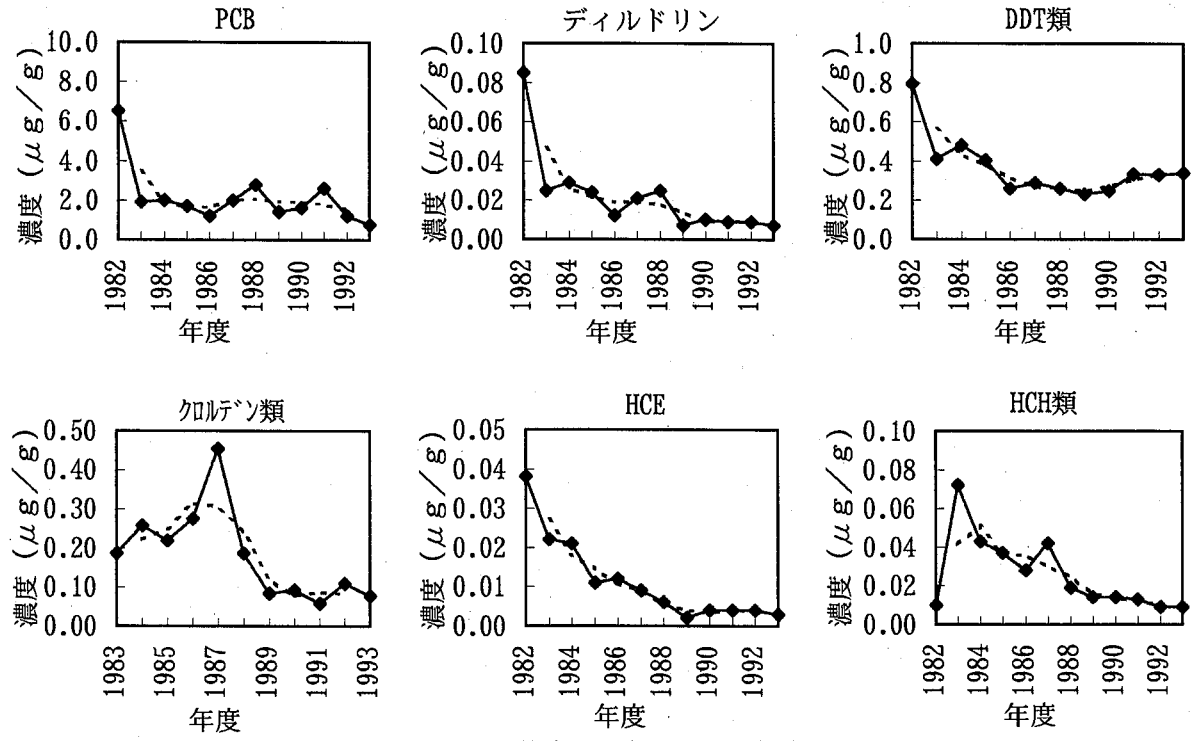


図２．ウミネコ胸筋肉中の内分泌撹乱物質濃度推移
—◆— 実測値，---- 移動平均値

種のDDT類のうち主に検出されたのはp,p'-DDEであった．調査期間中の総DDTの濃度範囲は，スズキ0.007-0.14μg/g，ウミネコ0.15-0.81μg/gであった．

クロルデン類は５種の合計である総クロルデン濃度をグラフにした．スズキ・ウミネコともに調査開始時から次第に増加し，スズキでは1989年度，ウミネコでは1987年度に最高値を示した．以降はゆるやかに減少している．５種のクロルデン類のうち，スズキではオキシクロルデンはあまり検出されず，クロルデンとノナクロルではノナクロルのほうが若干高い傾向が見られた．これに対してウミネコではノナクロルが５種合計の約8割を占めていた．調査期間中の総クロルデンの濃度範囲は，スズキ

0.005-0.133μg/g，ウミネコ0.045-0.68μg/gであった．

ヘプタクロルはスズキ・ウミネコともにほとんど検出されず，代謝物であるHCEは，スズキでは調査開始後5年間は検出されたが，いずれも検出限界（0.001μg/g）に近い低値であった．ウミネコではHCEは毎年度検出されたが，年とともに減少し，1993年度には調査開始時の約1/10になった．調査期間中のHCEの濃度範囲は，スズキn.d.-0.003μg/g，ウミネコ0.001-0.047μg/gであった．

HCH類は4種の異性体の合計濃度をグラフにした．スズキでは1990年度までしばしば検出されたが，それ以降は検出されなかった．ウミネコではHCH類4種のうち，β-HCHのみが検出されたがその濃度は次第に減少していた．調査期間中のHCH類の濃度範囲は，スズキn.d.-0.019μg/g，ウミネコ0.007-0.103μg/gであった．

フタル酸エステル類については，スズキ・ウミネコともに，調査開始以来一度も検出されなかった．

有機スズについては，TBTが1986年度から，TPTが1989年度から調査項目に追加された．スズキでは，TBTは1991年度に最高値を示し，1993年までは増減を繰り返していたがその後は減少傾向がみられた．TPTは調査開始直後に急激に減少し，以降はゆるやかに減少していた．ウミネコではTBTは検出されず，TPTは調査開始後2年間だけ検出された．調査期間中のTBTの濃度範囲は，スズキ0.033.-0.57μg/g，TPTの濃度範囲は，スズキn.d.-2.3μg/g，ウミネコn.d.-0.005μg/gであった．

考　察

米国の五大湖では，湖周辺の住民と魚の摂取に関する報告があり，魚を多食していた住民の血液中[15]及び母親の母乳中の汚染物質濃度が高いことや[16]，その母乳を飲んだ乳児は免疫力が低く，細菌感染の確率が高いこと[17]などが報告されている．また湖でとれたコイを混ぜた餌で飼育したミンクでは，生まれた子供の体重が有意に低かったとの報告もある[18]．これらの報告は1995～1996年のものであり，参考として1993年に報告された五大湖のスズキ類中の汚染物質濃度[19]を東京湾の同時期のものと比較すると，DDT類およびクロルデン類は，東京湾のスズキの方が若干高濃度であった．また，五大湖のウナギやマスは，スズキ類に比べてPCBで約2倍，DDT類で10倍以上高濃度を示し[19]，魚種によってはスズキよりも汚染度の高いものがあることがわかっている．これらのことから，東京湾の汚染状況が徐々に好転しているとは言っても，内分泌撹乱物質作用に関する新たな問題については楽観できず，より一層の汚染防止対策を進める必要があると考えられる．

ここ数年，スズキ中の汚染物質濃度は減少しており，日本人の脂肪組織中のPCB及び有機塩素系化合物についても，それらが使用禁止になった後は減少している[20]．これらのデータは，行政による禁止措置が汚染物質濃度の低減に有効であることを示しているが，東南アジアの発展途上国では，現在でもマラリア対策や害虫対策のために，有機塩素系の農薬を使用している国がある[21]．これら熱帯地方で散布された農薬は，高温により気化し[21]気流に乗って広がり，地球環境規模での汚染を引き起こしている．したがって，スズキ中のこれらの物質濃度は低レベルではあるものの，今後も注意深く推移を見守っていく必要がある．

文　献

1）大久保智子，瀬戸博：東京衛研年報，**45**，133-135，1994.

2）竹内正博：都薬雑誌，**15**，18-23，1993.

3）瀬戸博：都薬雑誌，**16**，55-60，1994.

4）Colborn,T.,Dumanoski,D.and Myers,J.P.,長尾力訳：奪われし未来，1997，翔泳社，東京.

5）Cadbury,D.,井口泰泉監修・解説，古草秀子訳：メス化する自然，1998，集英社，東京.

6）環境庁編：生物モニタリング調査マニュアル，昭和62年5月.

7）東京都立衛生研究所：平成5年度生物モニタリング結果報告書，1994.

8）東京都立衛生研究所：平成6年度生物モニタリング結果報告書，1995.

9）東京都立衛生研究所：平成7年度生物モニタリング結果報告書，1996.

10）東京都立衛生研究所：平成8年度生物モニタリング結果報告書，1997.

11）大久保智子，瀬戸博：東京衛研年報，**44**，199-201，1993.

12）大久保智子，瀬戸博，加納尭子：東京衛研年報，**43**，175-178，1992.

13）大久保智子，瀬戸博，加納尭子：東京衛研年報，**42**，210-213，1991.

14）未発表データ

15）Humphrey, H. E. and Budd, M.L.: *Toxicol. Ind. Health*, **12**, 499-505, 1996.

16）Newsome, W. H., Davies,D.and Doucet, J.: *Chemosphere*, **30**, 2143-2153, 1995.

17）Tryphonas,H.: *Environ. Health. Perspect.*, **103**, 35-

46, 1995.

18) Heaton, S.N., Bursian, S.J., Giesy, J.P., *et al.*: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 334-343. 1995.

19) Newsome,W.H.and Andrews,P. :*J.AOAC Int.*, **76**, 707-710, 1993.

20) Loganathan, B.G., Tanabe,S., Hidaka, Y, *et al.*: *Environmental Pollution*, **81**, 31-39, 1993.

21) Kurunthachalan, K., Tanabe, S.and Tatsukawa, R.: *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1673-2683, 1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 203-209, 1998

多摩地域北部における地下水中の硝酸性窒素の調査

近藤治美*, 矢口久美子*, 鈴木俊也*, 稲葉美佐子*,
小西浩之*, 五十嵐剛*, 鈴木助治*

Survey of Nitrate-Nitrogen in Groundwater in the North of Tama District,Tokyo

HARUMI KONDO*,KUMIKO YAGUCHI*, TOSHINARI SUZUKI*, MISAKO INABA*,
HIROYUKI KONISHI*, TSUYOSHI IGARASHI* and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：硝酸性窒素 nitrate-nitrogen, 地下水 groundwater, 多摩地域 Tama district

緒　言

硝酸性窒素（NO_3-N）は胃液の分泌の少ない乳児及び胃を摘出した人などの体内で，亜硝酸性窒素（NO_2-N）に還元され，メトヘモグロビン血症をひきおこすといわれており，水道法により水質基準値が10mg/L以下（NO_3-N及びNO_2-Nの合量として）と定められている[1]．環境庁が1982年に行った全国15都市の地下水水質汚染調査では，NO_3-N及びNO_2-Nが水質基準値を超えた井戸は浅井戸では11％であったと報告されている[2]．

現在，東京都多摩地域の水道普及率はほぼ100％[3]であるが，区部と比較して家庭用の井戸も数多く，井戸水は災害時緊急飲料水としても見直されてきている．当所では東京都多摩地域における地下水のNO_3-N汚染の実態を把握するため，多摩地域北部を調査対象として，1993年4月より10年間の予定で，4保健所（保健所の組織改正により現在は3保健所）と共同して，NO_3-N濃度の調査を行っている．今回は1997年度までの調査結果を報告する．

調査方法

調査は，NO_3-N濃度の長期間の推移等を把握する目的での長期変動調査，及び季節変動等短期間の変動を把握する目的での短期変動調査の2種について行った．

1．調査地域及び対象井戸

調査は多摩地域北部の7市（保谷，田無，清瀬，東久留米，東村山，東大和，小平の各市）を調査地域として，深さ30m以内の井戸水（浅井戸）について行った（図1）．調査地域を1kmメッシュに区切り，各メッシュ毎に1浅井戸を選定し，93井戸を調査対象とした（図2）．

1）長期変動調査

93井戸のすべてを対象とした．

2）短期変動調査

93井戸のうち，各市から2～4井戸を選定し，計23井戸（図2のA～W）を対象とした．

2．調査期間及び時期

1）長期変動調査

1993年～1997年までの5年間，毎年1回，5月に調査を行っている．なお，1998年以降さらに5年間継続調査を行う予定である．

2）短期変動調査

1993年4月～1996年3月までの3年間，毎月1回調査した．

3．調査項目

1）長期変動調査

93年度：NO_3-N，塩素イオン（Cl^-），硫酸イオン（SO_4^{2-}），pH.

94～97年度：93年度の項目及び炭酸水素イオン（HCO_3^-），カルシウムイオン（Ca^{2+}），マグネシウムイオン（Mg^{2+}），ナトリウムイオン（Na^+），カリウムイオン（K^+）

2）短期変動調査

NO_3-N，Cl^-，SO_4^{2-}，pH.

4．測定方法および使用機器

測定方法は上水試験方法[4]に準じた．測定方法及び使

* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科　190-0023　東京都立川市柴崎町3－16－25
* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

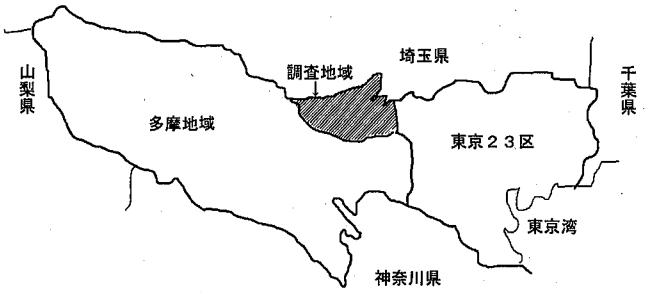


図１．調査地域

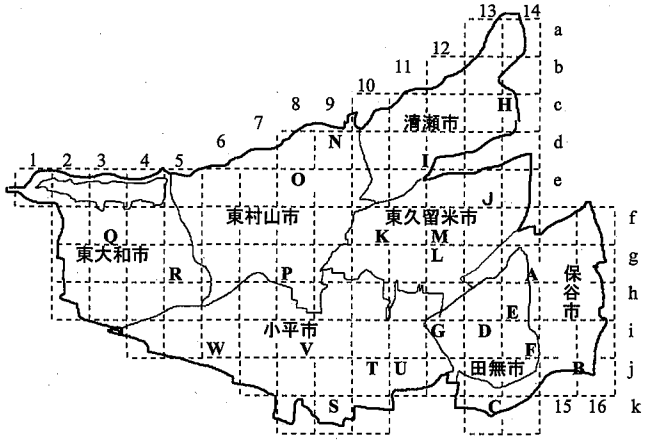


図２．長期変動調査のﾒｯｼｭと短期変動調査井戸(A～W)

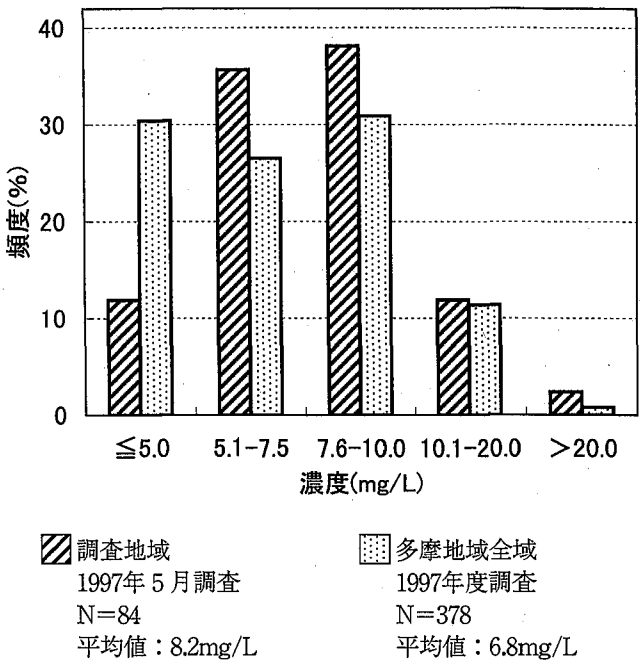


図３．調査地域及び多摩地域全域におけるNO_3-N濃度の分布

表１．多摩地域北部地下水中のNO_3-N及びその他の無機イオン類の濃度と標準偏差

		NO_3-N	Cl^-	SO_4^{2-}	pH	HCO_3^-	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+
	平均値	8.4	19.3	22.6	6.1					
1993年	標準偏差	4.1	6.9	10.4	0.2					
(N=90)	最大値	37.0	51.4	68.0	7.0					
	最小値	1.5	5.6	2.1	5.6					
	平均値	8.5	21.0	26.1	6.2	47.6	18.7	9.8	15.2	1.40
1994年	標準偏差	3.2	7.0	10.4	0.2	13.1	4.0	2.5	4.2	1.9
(N=89)	最大値	23.9	69.7	72.8	7.2	94.0	33.6	18.4	35.0	11.5
	最小値	1.1	7.1	3.5	5.8	15.9	6.0	4.7	7.3	0.13
	平均値	8.0	19.9	26.6	6.1	45.0	19.3	9.9	15.5	1.67
1995年	標準偏差	2.8	5.0	10.0	0.2	12.7	4.1	2.2	3.9	2.5
(N=91)	最大値	23.7	38.6	63.4	6.8	83.0	29.2	17.5	36.5	12.9
	最小値	3.0	8.9	9.4	5.8	17.1	7.4	5.0	8.0	0.17
	平均値	8.0	21.7	29.8	6.2	47.6	19.4	10.1	15.8	1.60
1996年	標準偏差	3.9	8.7	13.5	0.2	20.3	5.3	3.1	6.1	2.0
(N=77)	最大値	25.2	67.6	82.6	6.9	146.5	44.5	26.0	45.8	12.9
	最小値	0.1	7.1	10.1	5.9	14.2	7.5	4.6	6.9	0.25
	平均値	8.2	20.4	29.8	6.2	45.1	19.6	10.0	16.1	1.63
1997年	標準偏差	4.0	6.0	12.5	0.2	18.4	5.9	2.5	5.9	2.1
(N=84)	最大値	32.1	44.3	72.0	6.8	156.2	47.7	21.8	42.6	12.8
	最小値	2.5	9.9	4.9	6.0	8.5	3.5	3.2	6.5	0.10

平均値，最大値，最小値の単位はmg/L，ただしpHを除く．

用機器は以下の通りである．NO_3-N，Cl^-，SO_4^{2-}：イオンクロマトグラフ法，ダイオネクス社2010i（93～96年度）及びDX-500（97年度）．pH：比色法またはガラス電極法，堀場製作所pH METER M-13．HCO_3^-：総アルカリ度法．Ca^{2+}，Mg^{2+}：原子吸光光度法（94～96年度）及びイオンクロマトグラフ法(97年度)，IL社ビデオ-22(94～95年度)，パーキン・エルマー社3300フレーム（96年度)，ダイオネクス社DX500（97年度)，Na^+，K^+：炎光光度法（94～96年度）及びイオンクロマトグラフ法(97年度)，機器はCa^{2+}等と同じ．

結果及び考察

1．調査地域と多摩地域全域のNO_3-N濃度の比較

図１に示した多摩地域北部を調査地域として1997年５月に行った浅井戸84カ所の測定結果のヒストグラムを図３に示した．また，図３には1997年度１年間にわたって調査した多摩地域全域の浅井戸378カ所の測定結果を同様に示した．調査地域において水道法水質基準値（10 mg/L）を超えていた井戸は84井戸中12井戸（14.3%）であり，多摩地域全域での12.2%よりも高かった．また，図３に示すように調査地域では7.6-10.0mg/Lの濃度範囲の井戸が最も多く，半数以上が7.6mg/L以上の井戸であった．さらに，調査地域の平均値8.2mg/Lは多摩地域全域の6.8mg/Lより高い値であった．これは図３の濃度分布からみて，低濃度の井戸が少ないことが原因であり，多摩地域全域と比較すると調査地域でのNO_3-N濃度は明らかに高い傾向にあると考えられる．

そこで，次に５年間にわたって毎年１回５月に測定を行った長期変動調査の結果についてこのような高濃度傾向があるかどうかを考察した．

2．長期変動調査の結果

1）NO_3-N濃度の経年平均値の比較

1993年から1997年までの長期変動調査結果を表１にまとめた．５年間のNO_3-N濃度の平均値は8.0-8.5mg/Lの範囲内にあり，顕著な経年変化はみられなかったが，これらの平均値は前述と同様にいずれも多摩地域全域より高い濃度傾向を示した．その他の項目では，５年間でSO_4^{2-}が増加傾向を示した以外は特に経年的に大きな増減は認められなかった．

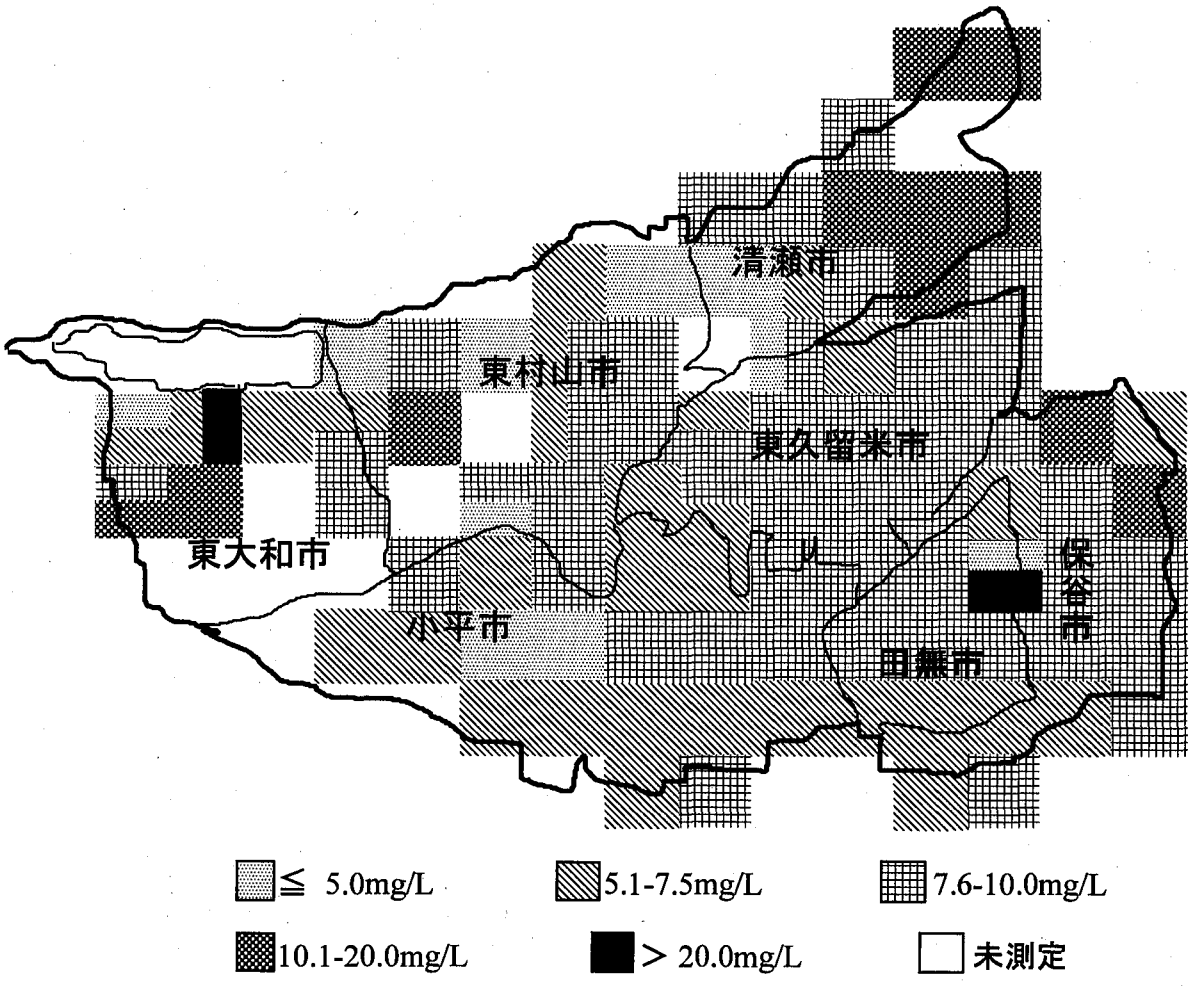


図４．調査地域におけるメッシュ毎のNO_3-N濃度

2）メッシュ毎のNO_3-N濃度の地域分布

5年間にわたる平均値において調査地域のNO_3-N濃度が高い傾向が認められたので，調査地域内の濃度分布を検討した．長期変動調査井戸を対象に，各井戸の5年間のNO_3-N濃度の平均値を5階層に分類し，その井戸の存在するメッシュ毎のNO_3-N濃度の分布図として図4に示した．ただし，途中で調査井戸を変更したメッシュは3年以上測定した井戸の平均値を採用した．また，1メッシュに選定井戸が2井戸あり，それぞれ3年以上測定した場合にはメッシュを2分割して示した．

NO_3-Nが20mg/Lを超えた高濃度井戸は東大和市と田無市の2カ所に認められた．しかし，田無市の同一メッシュ内において他の井戸数カ所を調査したが，それより100m以内にある井戸では2～3 mg/L程度の低い濃度であり，また，東大和市の場合も同様に約700mに位置する井戸で5 mg/L程度であった．したがって，2市の高濃度井戸については極めて局所的な汚染といえる．このように選定した井戸の測定値が必ずしもそのメッシュの代表値とはいえないが，図4は90カ所以上のメッシュの調査結果をまとめたものであり，上記2市の高濃度井戸以外はこの調査地域の全体の濃度傾向を示しているものと考えられる．図4に示すように7.6-10.0 mg/Lと10.1-20.0mg/Lのメッシュを観察すると，NO_3-N濃度は概ね保谷市，東久留米市，清瀬市の北東部において高い傾向があり，田無市の南部，小平市の南部及び西部において低い傾向がみられ，かなり明確な地域特性があることがわかった．

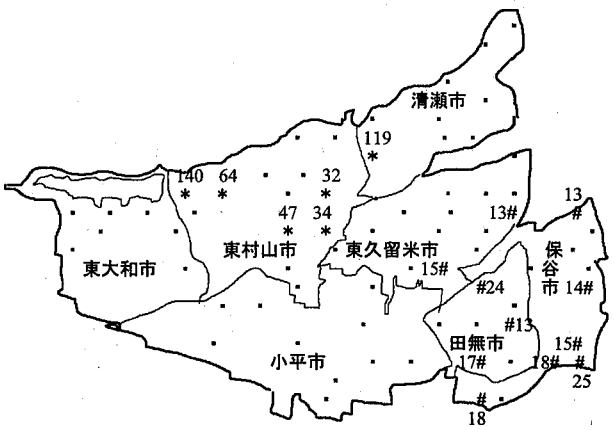
3）同一井戸におけるNO_3-N濃度の経年変化

4年以上5年間にわたって測定した同一井戸について，NO_3-N濃度の経年変化を観察し，その結果を図5に示した．図中の・は経年変化が認められなかった井戸，＊は濃度の増加が認められた井戸，＃は濃度の減少が認められた井戸を示した．また，数値は調査期間においてそれぞれ初年度の測定値に対する最終年度の測定値の増加率または減少率を示した．個別の井戸の経年変化を観察すると，東村山市においては増加傾向の井戸が5カ所，保谷市と田無市においては減少傾向の井戸が9カ所みられ，井戸によっては経年的なNO_3-N濃度の増減が認められた．

そこで，次に3年間にわたって毎月1回測定した短期変動調査の結果についてこのようなNO_3-N濃度の経時的変動や地域差があるかどうかを考察した．

3．短期変動調査の結果

図2に示したA～Wの23井戸を選定し，これらの井戸



＊：増加した井戸　＃：減少した井戸　・：変化のなかった井戸
（数値は増加率または減少率を表す）

図5．NO_3-N濃度の経年変化

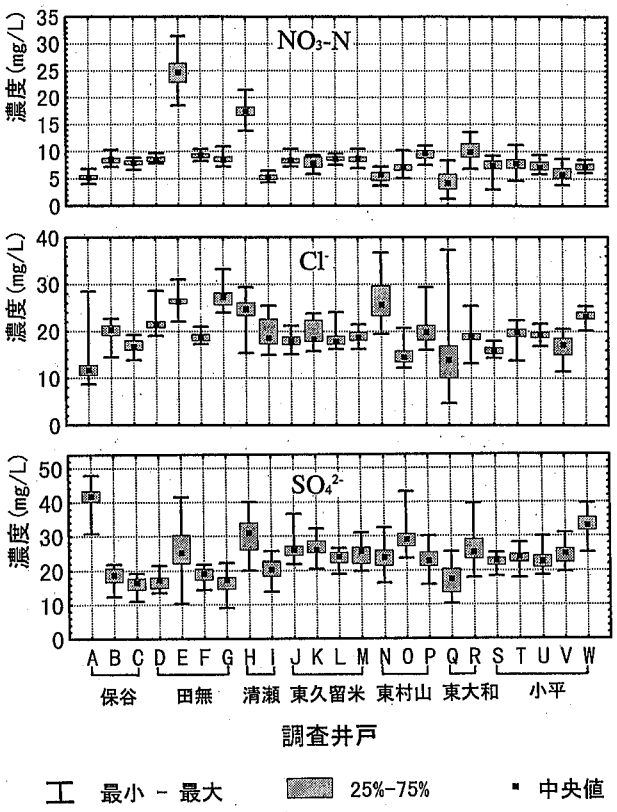


図6．短期変動調査における調査対象井戸の陰イオン濃度

について1993年4月から1996年3月までの3年間にわたって毎月の経時変化を観察した短期変動調査の結果を図6及び7にまとめた．各井戸のNO_3-N，Cl^-及びSO_4^{2-}濃度の調査期間における中央値，最大値，最小値，25%－75%値を図6に示した．また，各井戸の調査期間中の上記陰イオン濃度の変動と降水量を図7に示した．図7は，地域別に3グループに分けA～Gは保谷市及び田無市の井戸，I～Pは清瀬市，東久留米市及び東村山市の井戸，Q～Wは東大和市及び小平市の井戸を表す．また，田無市のEと清瀬市のH井戸はNO_3-Nが高濃度であったため

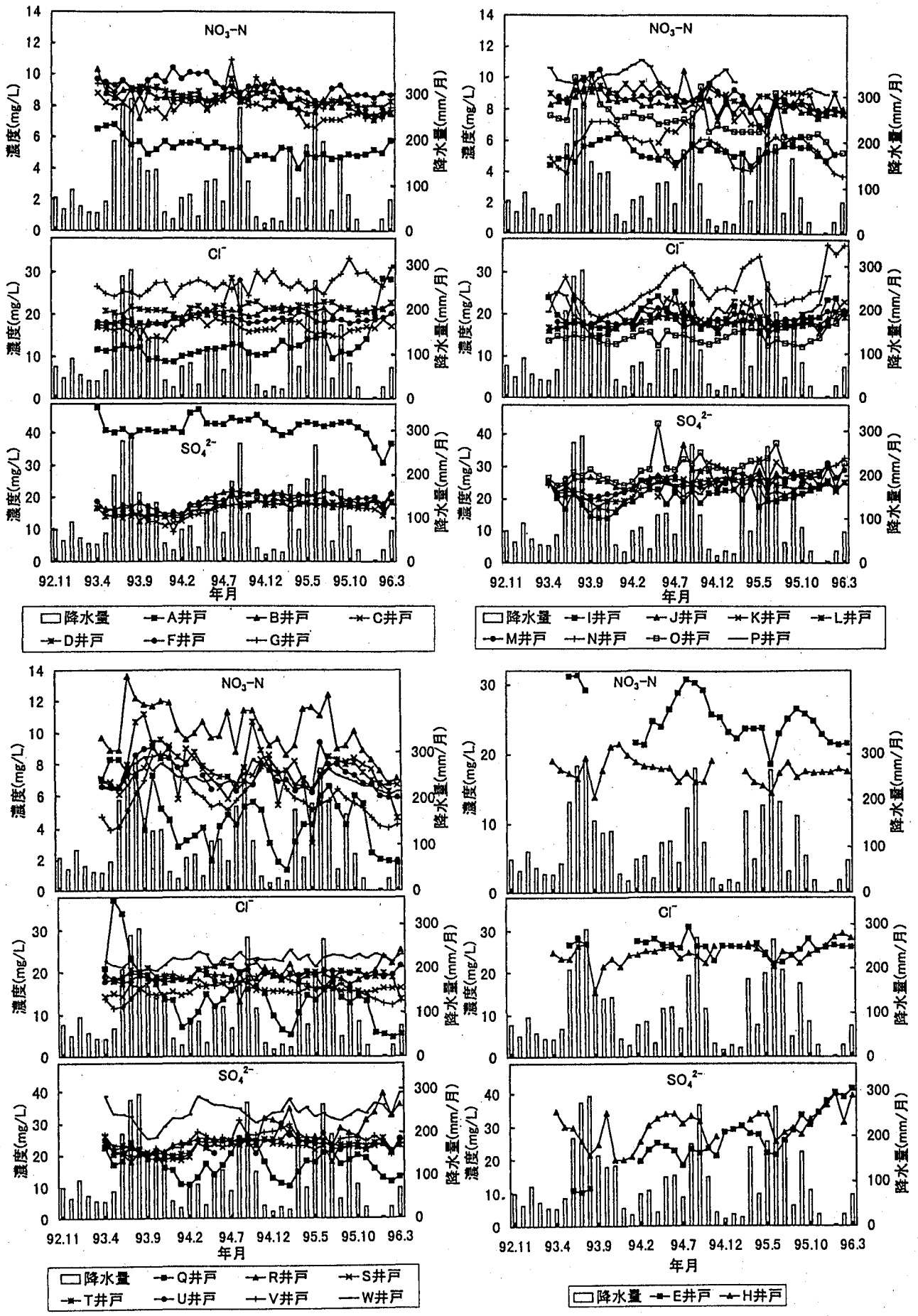


図７．短期変動調査における陰イオン濃度と降水量

別グループとし，NO_3-N濃度のスケールが他の3グループと異なっている．

図6に示すように調査期間中，水道法水質基準値（10 mg/L）を常に超えていた井戸はEとHの2カ所であった．これらは最大値と最小値の差（変動幅）および測定値のバラッキが大きかった．さらに，測定値の一部が基準値に前後していた井戸はB，F，G，J，M，O，P，R，Tの9カ所であったが，これらを含めてほとんどの井戸は概ね5～10mg/L の濃度範囲内であった．しかし，これらの変動幅及びバラッキの大きさは，井戸によってかなりの違いが認められ，地域別にみても保谷市，田無市の井戸では変動幅が小さく，これに対して東村山市，東大和市，小平市では変動幅が比較的大きいことがわかった．したがって，後者の場合は変動幅の大きさから測定値のバラッキ以外に季節による変動が考えられる．

図7に示すように変動は23井戸中18カ所の井戸で認められ，A，B，G，L，Oの5カ所では変動は認められなかった．変動が認められた18井戸中C，D，F，J，Mの5カ所の井戸では季節的な規則性は小さかったが，E，H，I，K，N，P，Q，R，S，T，U，V，Wの13カ所では比較的規則性のある季節変動が観察された．それらの季節変動は，3～6月に濃度の低くなる井戸が最も多くH，I，K，N，S，T，U，V，Wの9カ所であり，12～3月に低くなる井戸がE，Q，Rの3カ所であった．また，7～9月に低くなる井戸がPの1カ所で認められた．このような季節変動は概ね降水量の変動パターンに相関し，降水のピーク時より約3～4カ月遅れてNO_3-N濃度が規則的な変動している井戸が多く観察された．

これに対してCl^-及びSO_4^{2-}濃度の変動幅は図6に示すようにNO_3-Nに比べて著しく大きいが，図7に示すようにH，KとQ井戸に降水量の変動パターンに相関して季節変動がみられた以外は，大部分の井戸で季節変動は認められず，ほぼ一定の変動パターンを示した．特にSO_4^{2-}は土壌への吸着性やCa^{2+}と結合して硫酸カルシウムの形で沈殿する場合があり[5]，地下水への流入時期等がNO_3-Nと異なり，季節変動が少ないものと思われる．

以上の結果より，多摩地域北部における地下水中のNO_3-N濃度は高い傾向にあり，井戸によってはNO_3-N汚染が推測された．また，調査地域において地域特性や季節変動があることがわかった．

NO_3-Nの汚染源としては，窒素肥料，生活排水，畜産廃棄物等が考えられている．このうち生活排水については，調査地域での下水道普及率がほぼ100%（東大和市，清瀬市が99%，その他が100%）であること[6]から考えにくい．窒素肥料については，肥料の施肥量が多いといわれている畑及び樹園地面積が，表2に示すように調査地域には比較的多いことがNO_3-N汚染の一因として考えられる．また，調査地域内においても清瀬市，東久留米市の畑及び樹園地面積率が高いことが，NO_3-N濃度が北東部に高く，南西部に低いという地域特性に対して影響を与えていると思われる．

野中らは砂丘畑地土壌でのライシメーターを用いた実験より，施肥窒素成分はNO_3-Nとして溶脱し，地表下6mの地下水のNO_3-N濃度は，1ヵ月100mm以上の積算水量（灌水量，降水量）で増加し，それ以下では低下した．また，施肥後3週間で地下水に溶脱したが，アンモニア性窒素は土壌中に保持された後，降水量の増加とともにNO_3-Nとして溶脱すると報告している[8]．調査地域はローム層の下に砂礫層があり，浅井戸はそのどちらかの層中に滞水していること[9]から，土壌中の窒素成分の溶脱には，砂丘土壌の場合より多くの降水量と長い期間を要し，季節変動を与えるものと考えられる．したがって，多量の降水の後，一定期間後にNO_3-N濃度の上昇がみられる井戸では，近接した土壌が窒素成分に汚染されている可能性があり，それが降水の浸透と共に溶脱してきたためと考えられる．

表2．調査地域の市別土地利用状況[7]（平成4年調査）

	面積(ha)	田(%)	畑(%)	樹園地(%)	放牧地(%)	農用地計(%)	宅地(%)	公園･運動場(%)	道路等(%)	森林(%)
小平市	2025.1	0.00	10.2	5.2	0.00	15.4	53.5	7.1	13.5	2.7
東村山市	1712.3	0.11	12.5	4.6	0.01	17.2	48.7	6.0	14.3	5.0
田無市	724.2	0.01	13.7	1.2	0.00	14.9	58.3	4.2	13.9	0.6
保谷市	899.0	0.00	10.7	4.1	0.11	15.0	54.7	4.8	14.9	2.2
東大和市	1285.5	0.00	6.3	4.2	0.00	10.5	36.0	7.7	12.2	15.1
清瀬市	1036.1	0.00	25.4	2.6	0.25	28.2	42.2	2.8	12.9	5.7
東久留米市	1242.2	0.01	13.6	5.9	0.13	19.6	48.8	3.4	14.1	3.5
多摩地域全域	82877.1	0.66	6.6	2.7	0.04	10.0	30.1	4.8	9.8	31.5

ま と め

1）NO_3-Nによる地下水汚染の実態を把握するため，東京都多摩地域北部の7市を調査地域として，浅井戸（深さ30m以内）の水質調査を実施した．その結果，調査地域のNO_3-N濃度は多摩地域全体と比較して明らかに高かった．

2）NO_3-N濃度の長期間の推移等を把握するための長期変動調査は93井戸を対象に，1993年度より10年間の予定で毎年5月に行っている．NO_3-N濃度は平均値では5年間でほとんど変化しなかったが，井戸毎に比較すると，増加傾向の井戸と減少傾向の井戸が認められた．また，調査地域内の濃度分布は，北東部に高く，南西部に低いという地域的な傾向も示唆された．

3）NO_3-N濃度の短期間での変動を把握するための短期変動調査では，23井戸を対象に1993年4月より3年間，毎月1回調査を行った．その結果，NO_3-N濃度が季節変動する井戸がかなり多くみられ，降水量の変動パターンと相関している場合が認められた．

4）調査地域においてNO_3-N濃度が高く，地域差や季節変動がみられるのは，土地利用上，その地域における畑や樹園地の面積が多いために窒素肥料の使用量が高くなることがその原因の一つとして推測された．

謝　辞　本調査は多摩東村山保健所，多摩小平保健所及び村山大和保健所の生活衛生課環境衛生係と共同で行っている．本調査にあたり，多くの貴重なご意見を頂いたことに深謝します．

（本調査の一部は，第37回及び38回全国衛生化学技術協議会年会（1995年及び1996年）で発表した．）

文　献

1）国包章一：水環境学会誌，**19**, 965-968, 1996.

2）杉戸大作：水道協会雑誌，**589**, 53, 1983.

3）東京都衛生局生活環境部：東京都の水道，平成9年版.

4）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.

5）土壌分析・測定法委員会：土壌分析・測定法，140-141, 1986, 博友社，東京.

6）東京都下水道局：事業概要，平成9年版.

7）東京都都市計画局地域計画部土地利用計画課：東京の土地利用，平成4年東京都多摩・島しょ地域.

8）野中昌法，阿部良悦，加村宗雄：日本土壌肥料学雑誌，**67**, 633-639, 1996.

9）細野義純：山本荘毅教授退官記念論文集「日本の水収支」，174-188, 1978, 古今書院.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 210-217, 1998

多摩地域における地下水中の農薬の汚染実態調査

鈴木俊也*, 稲葉美佐子*, 近藤治美*, 矢口久美子*, 鈴木助治*

Monitoring of Pesticides in Shallow Groundwater of Tama Region in Tokyo

TOSHINARI SUZUKI*, MISAKO INABA*, HARUMI KONDO*, KUMIKO YAGUCHI* and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：農薬 pesticide, 地下水 groundwater, 汚染 pollution, 調査 monitoring

緒　言

昭和62年頃から，農薬による河川水や地下水等の環境水汚染が社会問題になった．平成元年には，北海道のゴルフ場で使用されていた農薬（オキシン銅）の河川への流出により養魚が大量に死亡し，これを契機に，ゴルフ場使用農薬の問題が一段とクローズアップされるようになった．平成２年５月に厚生省と環境庁はそれぞれゴルフ場使用農薬21種類について水道水の暫定水質目標値[1]とゴルフ場排水の暫定指導指針値[2]を設定すると共に，各農薬の分析法を公表し[3,4]，翌年には９種類の農薬が追加された[5,6]．以後，農薬汚染の実態調査が全国各地で盛んに行われている[7-10]．さらに，平成４年には水道法水質基準が改正され，ゴルフ場使用農薬のみならず畑や水田で使用される農薬の一部が基準項目や監視項目に取り入れられることとなった[11]．

多摩地域には農薬を使用するゴルフ場，水田，畑等が都区部に比べ多く存在し，それらの周辺の地下水は個人用の飲用井戸水や専用水道の原水として，また，水道局に統合されていない都内の水道事業体における水道水の原水として利用されている[12]．我々はこれら飲用される地下水の安全性を確保するために，平成２年度から農薬による汚染実態調査を行っており，今回はこれまでの調査結果を報告する．さらに，この実態調査を基に地下水汚染を引き起こす可能性を持つ農薬を予測するための判定基準を検討したのでその結果を報告する．

調査方法

１．調査地点

①多摩地域におけるゴルフ場付近の飲用井戸水中の農薬調査

都内には24カ所のゴルフ場があるが，その内多摩地域にある10カ所のゴルフ場付近の井戸水を対象に調査を行った．水試料の採水は平成２年度には15カ所の井戸から６，７，９月の３回，平成３年度には11カ所の井戸から５，７，９，11月の４回，平成４年度には10カ所の井戸から５，７，９，11月の４回行った．測定対象とした農薬は表１に示すように暫定水質目標値が定められている農薬30項目およびフェノキシ系除草剤である2,4-D, MCPA, MCPB, 2,4,5-Tの合計34種類である．

②多摩地域における飲用井戸水中の農薬調査

調査対象の井戸水は多摩地域にある深さ約30m以内の浅井戸の水であり，調査期間は平成５年度～９年度の５年間である．測定対象とした農薬は表２に示すように新水道法の基準項目および監視項目の合計15種類である．

２．農薬の分析

井戸水中のゴルフ場使用農薬の分析は平成２年および３年に厚生省から出された試験法[3,4,6]に準じて行った．すなわち，水試料１Lからの農薬の抽出はジクロロメタンを用いた液－液抽出法により行い，脱水後，ロータリーエバポレーター（40℃）により１mLに濃縮した．得られた試料はECD，NPD又はFPD付GCで分析した．また，フェノキシ系除草剤は抽出後，9-アンスリルジアゾメタンによる蛍光誘導体化を行い，逆相HPLCで測定した[13]．

基準項目および監視項目の農薬の分析は上水試験方法[14]に準じて行った．すなわち，1,3-ジクロロプロペンはパージ＆トラップ濃縮装置付きGC-MSにより測定した[15]．それ以外の農薬は，水試料500mLからセップパックPS-2（ウォーターズ社製）を用いて抽出し，ジクロロメタン又はアセトニトリルで溶出し，脱水後窒素ガス気流下で１mLに濃縮した．得られた試料中のチウラムは逆相

* 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科　190-0023　東京都立川市柴崎町３―16―25
* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, 3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo 190-0023 Japan

表1．ゴルフ場付近の飲用井戸水における農薬の調査結果[1)]

農薬名	検出限界 (ppb)	平成2年度 検体数	検出数[2)]	検出濃度(ppb)	平成3年度 検体数	検出数[2)]	検出濃度(ppb)	平成4年度 検体数	検出数[2)]	検出濃度(ppb)
殺菌剤										
1 イソプロチオラン	4	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
2 イプロジオン	30	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
3 オキシン銅	4	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
4 キャプタン	30	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
5 クロロタロニル	4	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
6 チウラム	0.6	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
7 トルクロホスメチル	8	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
8 フルトラニル	20	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
9 エトリジアゾール	0.4	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
10 クロロネブ	0.5	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
11 ペンシクロン	4	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
12 メプロニル	10	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
殺虫剤										
13 イソキサチオン	0.8	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
14 イソフェンホス	0.1	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
15 クロルピリホス	0.4	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
16 ダイアジノン	0.5	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
17 トリクロルホン	3	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
18 フェニトロチオン	1	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
19 ピリダフェンチオン	0.2	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
除草剤										
20 アシュラム	20	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
21 シマジン	0.02	45	7(3)	0.08-0.30	44	6(3)	0.02-0.20	40	4(2)	0.02-0.17
22 ナプロパミド	3	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
23 ブタミホス	0.4	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
24 プロピザミド	0.8	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
25 ベンスリド	10	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
26 ペンディメタリン	5	45	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
27 テルブカルブ	2	—	—	—	44	2(1)	22, 32	40	4(1)	24-36
28 ベンフルラリン	8	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
29 メコプロップ	0.5	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
30 メチルダイムロン	3	—	—	—	44	0	ND	40	0	ND
31 MCPA	0.5	36	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
32 MCPB	0.5	36	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
33 2,4-D	0.5	36	0	ND	44	0	ND	40	0	ND
34 2,4,5-T	0.5	36	0	ND	44	0	ND	40	0	ND

1）—，未測定．ND，検出限界未満．検出濃度，最小濃度－最大濃度．平成2，3及び4年度の調査井戸数はそれぞれ15，11及び10カ所で，調査回数はそれぞれ3，4及び4回．

2）カッコ内は農薬が検出された井戸数．

HPLCで，その他の農薬はGC-MS法により測定した．

結果および考察

1．ゴルフ場付近の飲用井戸水中の農薬の調査結果

平成2年度～4年度にかけて行った調査の結果を表1に示す．殺菌剤の12農薬および殺虫剤の7農薬はいずれの井戸水からも検出されなかった．除草剤の15農薬の中で井戸水から検出された農薬はシマジンとテルブカルブであった．シマジンは平成2年度と3年度には3カ所の井戸水から検出され，平成4年度には2カ所の井戸水から検出された．井戸水中のシマジンの濃度は0.02～0.30 ppbであり，この値は水質目標値 3ppbの1/10以下であった．一方，テルブカルブは平成3年度に1ヵ所の井戸

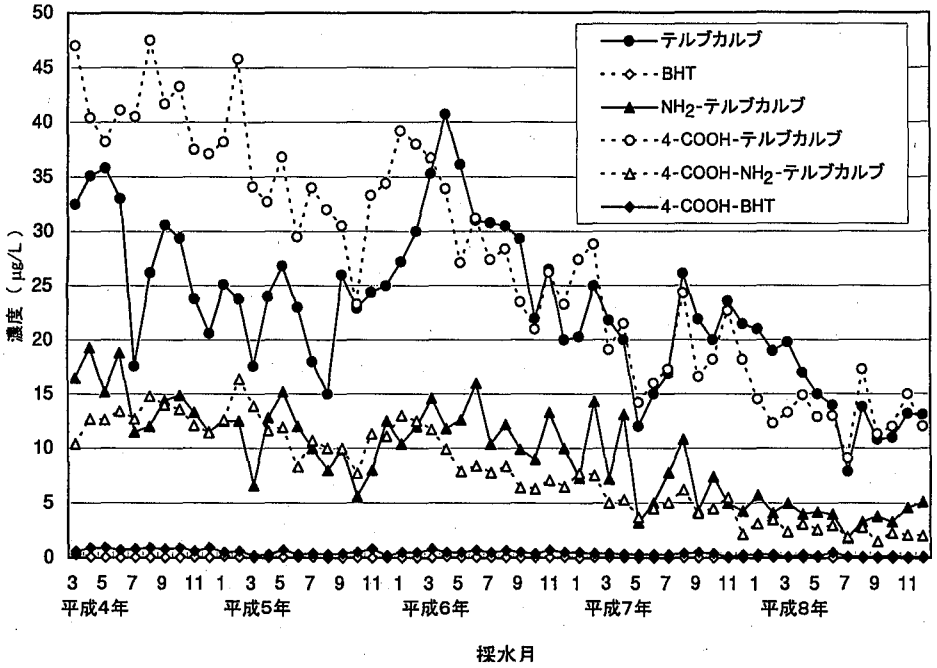


図１．ゴルフ場付近の井戸水中テルブカルブとその分解物濃度の経月変化

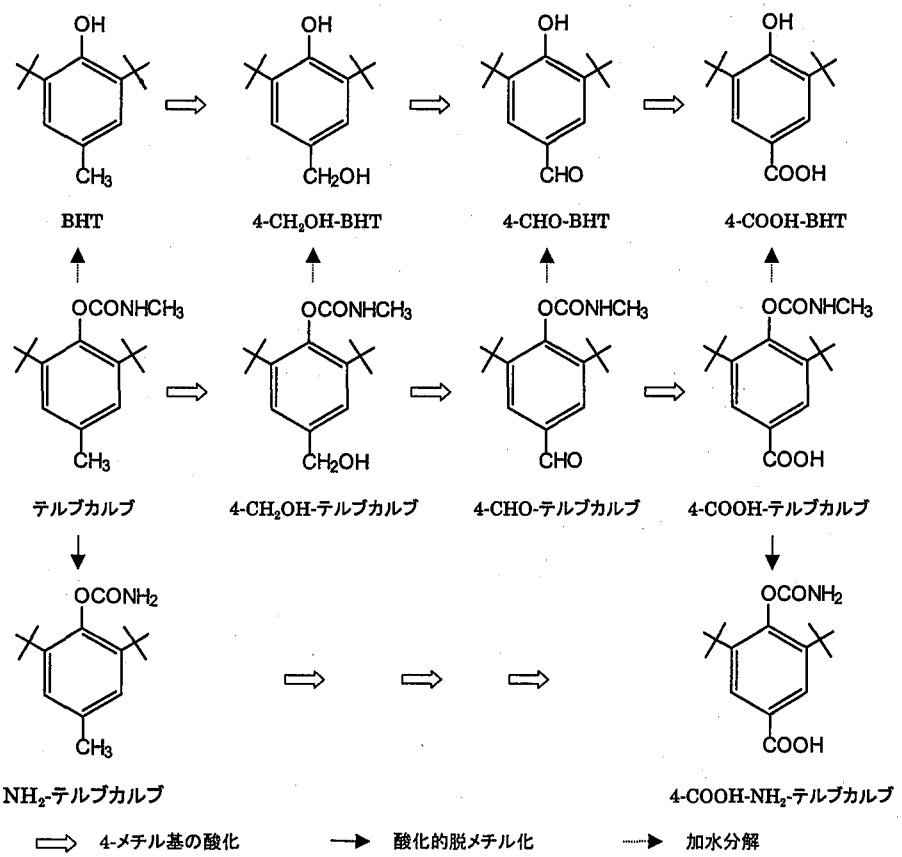


図２．テルブカルブのゴルフ場土壌中での推定分解経路

水から２回検出され，その濃度は22ppbと32ppbであり，水質目標値の20ppbを超えていた．このテルブカルブが検出された井戸はゴルフ場のフェアウェイから約30m離れた所にあり，調査した井戸の中で最もゴルフ場に近接していた．平成４年度にはこの井戸水について年４回調査したところ24～36ppbで，４回とも目標値を超えて検出された．これらの結果を踏まえて，東京都では平成４年度から都内のゴルフ場に対してテルブカルブの使用を自粛するように指導している．

テルブカルブが検出された井戸水について平成４年３月～８年12月まで継続調査を行った結果を図１に示す．この井戸に隣接するゴルフ場はテルブカルブを平成２年

表2．多摩地域の飲用井戸水における農薬の調査結果[1)]

農薬名	検出限界	平成5年度			平成6年度			平成7年度		
	(ppb)	検体数	検出数	検出濃度(ppb)	検体数	検出数	検出濃度(ppb)	検体数	検出数	検出濃度(ppb)
基準項目										
1 1,3-ジクロロプロペン	0.1	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
2 チオベンカルブ	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
3 シマジン[2)]	0.01	80	0	ND	85	4	0.01-0.16	89	5	0.06-0.20
4 チウラム	0.6	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
監視項目										
5 イソキサチオン	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
6 ダイアジノン	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
7 フェニトロチオン	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
8 イソプロチオラン	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
9 クロロタロニル	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
10 プロピザミド	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
11 ジクロルボス	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
12 フェノブカルブ	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
13 クロルニトロフェン	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
14 イプロベンホス	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND
15 EPN	0.05	80	0	ND	85	0	ND	89	0	ND

農薬名	検出限界	平成8年度			平成9年度			土壌中半減期[3)]	土壌吸着平衡定数[3)]
	(ppb)	検体数	検出数	検出濃度(ppb)	検体数	検出数	検出濃度(ppb)	($t_{1/2}$, 日)	(Koc, cm^3/g)
基準項目									
1 1,3-ジクロロプロペン	0.1	120	0	ND	138	0	ND	10	20
2 チオベンカルブ	0.05	120	0	ND	138	0	ND	40	580
3 シマジン	0.01	120	8	0.03-0.05	138	7	0.01-0.12	30	30
4 チウラム	0.6	120	0	ND	138	0	ND	15	383
監視項目									
5 イソキサチオン	0.05	120	0	ND	138	0	ND	5	14568
6 ダイアジノン	0.05	120	0	ND	138	0	ND	8	640
7 フェニトロチオン	0.05	120	0	ND	138	0	ND	4	1717
8 イソプロチオラン	0.05	120	0	ND	138	0	ND	160	528
9 クロロタロニル	0.05	120	0	ND	138	0	ND	30	1200
10 プロピザミド	0.05	120	0	ND	138	0	ND	57	800
11 ジクロルボス	0.05	120	0	ND	138	0	ND	8	1048
12 フェノブカルブ	0.05	120	0	ND	138	0	ND	14	50
13 クロルニトロフェン	0.05	120	0	ND	138	0	ND	73	1600
14 イプロベンホス	0.05	120	0	ND	138	0	ND	15	90
15 EPN	0.05	120	0	ND	138	0	ND	16	1327

1）－，未測定．ND，検出限界未満．検出濃度，最小濃度－最大濃度．

2）平成5年度の検出限界，0.3ppb．

3）シマジン，イソキサチオン，ダイアジノン，フェニトロチオン，イソプロチオラン及びジクロルボスについては文献18，その他の農薬については文献28参照．

5月以後散布していないにもかかわらず，テルブカルブは6年後の平成8年においても検出されており，極めて残留性が高いことがわかった．さらに，テルブカルブが検出される井戸水についてその分解物の調査を行ったところ，図2に示すように9種類の分解物が検出されており[16)]，これら9種類の分解物の残留性も親化合物のテルブカルブと同様に残留性が高かった．また，図1に示すように井戸水中のこれら分解物の濃度は4-COOH-テルブカルブ＞4-COOH-NH_2-テルブカルブ，NH_2-テルブカルブ＞BHTおよび4-COOH-BHTの順で高かったことから，ゴルフ場土壌中でテルブカルブは主に4-メチル基の酸化と脱メチル化により分解されると推察された[17)]．

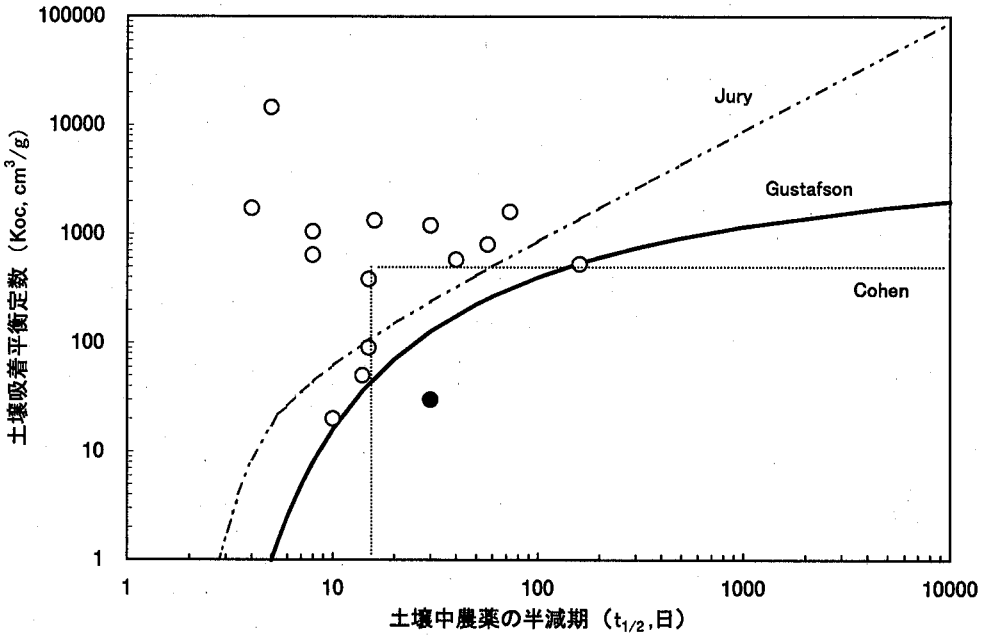


図３．地下水汚染を引き起こす農薬を予測するための判定基準
○は井戸水から検出されなかった農薬　●は井戸水から検出された農薬
Gustafsonの基準：$2.8<(4\text{-}\log Koc)\times \log t_{1/2}$　Juryらの基準：$Koc<5.8\times t_{1/2}\text{-}2.7$
Cohenらの基準：$t_{1/2}$は２週間以上かつKocは500cm³/g以下

この井戸水から検出される農薬は過去に散布したテルブカルブとその分解物であり，これまでに当該のゴルフ場で使用されていたイソプロチオラン，メプロニル，フルトラニル等の他の農薬は全く検出されなかった．

テルブカルブの残留性の原因を明らかにするために，農薬のゴルフ場フェアウェイの土壌中濃度の測定をしたところ，テルブカルブはイソプロチオラン，メプロニル，フルトラニル等の農薬と異なり土壌深層部に蓄積することがわかった．一方，土壌中での移動性を予測するための土壌カラムによる溶出実験では，テルブカルブとそれらの農薬の移動性は殆ど同じであった．これらのことから，テルブカルブが井戸水から長期にわたって検出されるのは土壌の深層部での分解性が低いため深層部に長期間残留することが原因であると考えられた[18]．

２．飲用井戸水中の農薬の調査結果

平成５年度～９年度にかけて行った調査の結果を表２に示す．基準項目の４農薬と監視項目の11農薬の中で，井戸水から検出されたのは除草剤のシマジンのみであり，検出率は毎年５％前後であった．この農薬は米国の浅層地下水[19]やフランスの農耕地の地下水[20]をはじめ諸外国の地下水から検出されることが既に報告されている．今回の調査ではシマジンの検出濃度は0.01 ～ 0.20 ppbであった．これら値は基準値３ppbの1/10以下であり，これまでに問題となるような高濃度の汚染は認められていない．しかし，シマジンは近年問題となっている外因性内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）のリストに挙げられていることから[21]，今後もこの農薬については監視して行く必要があると考えられる．

３．地下水汚染を引き起こす可能性を持つ農薬の判定基準

平成５年度の多摩地域における基準・監視項目関連の農薬の使用量を表３に示す．1,3-ジクロロプロペン（D－D）の使用量はシマジンよりも高かったが，表２に示す実態調査では井戸水から検出されておらず，使用量の多い農薬が必ずしも井戸水から検出されるとは限らない．そこで，農薬を使用して環境中へ放出する前に，地下水を汚染するか否かを図３に示すような室内実験結果を利用して予測することが地下水保全を図る上で有効な手段となると考えられる．地下水汚染を引き起こす可能性を持つ農薬を予測するための判定基準は①農薬の土壌中残留性と移動性を主パラメーターに用いた汚染実態調査に基づくモデル[22-24]と②複数のパラメーターを用いるコンピューターシミュレーションモデル[25-27]の２つに大別される．今回，我々は①のモデルを用いて多摩地域の飲用井戸水の農薬汚染の可能性を検討した．モデルとしてこれまでに報告されているGustafson[2]，Juryら[23]及びCohenら[24]の３つの判定基準（図３）を採用し，これらを比較検討した．これら判定基準はいずれも米国の農耕

表3．畑および水田等で使用される農薬の地域別の出荷量（平成5年度）[1]

成分名	区分[3]	商品名（例）	出荷量（農薬成分,kg）[2]			
			多摩地域	区	島しょ	合計
1,3-ジクロロプロペン（D-D）	虫	DD55	33,611	1,591	312	35,514
クロルピクリン	菌	ドクロール	15,919	4,665	2,192	22,776
臭化メチル	菌	クノヒュームクラウン	2,832	671	8,774	12,276
マシン油	虫	機械油乳剤95	9,424	185	57	9,666
塩素酸ナトリウム	草	クロレートS粒剤	2,277	4,852	90	7,219
炭酸カルシウム	菌	粉末生石灰	5,142	61	200	5,403
全硫化態硫黄	菌	石灰硫黄合合剤	3,263	478	47	3,788
ダゾメット	菌	ガスタード微粒剤	1,499	912	257	2,668
トリクロルホン（DEP）	虫	ディプテレックス乳剤	923	562	946	2,431
キトゼン（PCNB）	菌	コブトール粉剤	346	338	1,690	2,373
フェニトロチオン（MEP）	虫	スミチオン乳剤	1,194	534	303	2,031
ジネブ	菌	ダイファー水和在	1,324	193	238	1,755
ネマモール（DCIP）	虫	ネマモール粒剤	928	702	17	1,647
ジクワット	草	プリブロックスL	1,083	314	166	1,563
エチルチオメトン	虫	ダイシストン粒剤	933	311	305	1,548
硫黄	菌	硫黄粉200mesh	1,125	76	288	1,489
ダイアジノン	虫	ダイアジノン粒剤5	1,131	97	206	1,434
ダルホシネート	草	バスタ液剤	1,075	167	26	1,268
ジクロルボス（DDVP）	虫	DDVP乳剤50	722	149	114	985
シマジン	草	シマジン水和剤	490	246	43	778
クロロタロニル（TPN）	菌	ダコンール1000	499	114	116	728
イソキサチオン	虫	カルホス乳剤	237	162	56	455
EPN	虫	EPN乳剤	196	14	72	282
クロルニトロフェン（CNP）	草	MO乳剤	269	0	0	269
ベンチオカーブ	草	ウルフエース粒剤	237	0	0	237
イプロベンホス（IBP）	虫	キタジンP粉剤30DL	127	0	0	127
イソプロチオラン	菌	フジワン粒剤	110	5	0	115
チウラム	菌	チウラム80	64	1	3	68
フェノブカルブ	虫	マイトサイジンB乳剤	43	0	0	43

1）平成5年度東京都経済農業協同組合連合会の農薬出荷量から算出.
2）出荷量合計が1,000kg以下の場合には基準・監視項目の農薬のみ表示.
3）虫：殺虫剤，菌：殺菌剤，草：除草剤

地に適用するために作成されたもので，図中の基準線より右下にプロットされる農薬は地下水を汚染する可能性を持つと判定される．表2に示す各農薬の土壌中半減期と土壌吸着平衡定数を用いて農薬の地下水汚染の可能性を検討した．Gustafson の判定基準では汚染の可能性ありと判定されるのはシマジンのみであった．一方，JuryらやCohenらの判定基準ではシマジン以外の農薬も汚染の可能性ありと判定された．表2の汚染実態調査で井戸水から検出された農薬は図3の黒丸で示すシマジンのみであったことから，多摩地域における農薬の地下水汚染の実態に最も適合した判定基準はGustafsonのものであった．すなわち，この地域での汚染の可能性を予測する上ではGustafsonの基準の適用が最も妥当であると考えられる．なお，ゴルフ場付近の井戸水から検出されたテルブカルブの土壌吸着平衡定数及び土壌中半減期はそれぞれ180cm^3/g及び200日であり，この農薬はGustafsonの基準線よりも右側に位置することから，ゴルフ場周辺についてもGustafsonの判定基準が適用できると考えられる．しかし，地下水汚染の可能性を予測する際には，他の判定基準との併用は当然必要と思われる．

現在，地下水保全に関する行政の取り組みは，地下水を汚染することが確認された時点で汚染物質の使用自粛または禁止を指導している．しかし，今後は今回検討したような判定基準を適用し，農薬等の化学物質による地下水汚染を未然に防止すべきであると考えられる．

ま と め

1．平成2年度～4年度にかけて多摩地域におけるゴルフ場付近の飲用井戸水を対象にゴルフ場で使用される34農薬の調査を行った．井戸水から検出された農薬はシマジンとテルブカルブであった．シマジンの検出濃度は水質目標値の1/10以下であった．一方，テルブカルブは水質目標値を超えて検出され，その残留性は非常に高いことがわかった．

2．平成5年度～9年度にかけて多摩地域の飲用井戸水を対象に水道法の基準・監視項目関連の15農薬の調査を行った．シマジンのみが毎年約5％の井戸水から検出された．しかし，検出濃度はいずれの井戸水ついても基準値の1/10以下であった．

3．農薬の調査結果に基づき，多摩地域において地下水汚染を引き起こす可能性を持つ農薬を予測するための判定基準を検討した．米国の農耕地用にGustafsonが設定した基準GUS＞2.8が多摩地域の場合にも適用できることがわかった．

文　献

1）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：ゴルフ場使用農薬に係る水道水の安全対策について，衛水第152号，平成2年5月31日．

2）)環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値について，環水土第77号，平成2年5月24日．

3）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：ゴルフ場使用農薬に係る検査法について，衛水第153号，平成2年5月31日．

4）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：ゴルフ場使用農薬に係る検査法について，衛水第37号，平成3年2月28日．

5）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：ゴルフ場使用農薬に係る水道水の安全対策について，衛水第192号，平成3年7月30日．

6）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：ゴルフ場使用農薬に係る検査法について，衛水第193号，平成3年7月30日．

7）辻　正彦，中野　武，奥野年秀：環境化学，1，71-75，1991.

8）伏脇裕一，浜村哲夫，長谷川敦子，他：衛生化学，39(6)，543-548，1993.

9）堀　秀朗，加藤充哉，塚林　裕：水環境における農薬流出に関する研究報告（国立環境研究所研究報告第133号）海老瀬潜一編集，p17-30，1994，環境庁国立環境研究所，茨城．

10）須戸　幹，国松孝男：環境科学会誌，8，264-274，1995.

11）厚生省生活衛生局水道環境部長通知：水道水に関する基準の制定について，衛水第264号，平成4年12月21日．

12）東京都衛生局生活環境部環境指導課：東京都の水道（平成9年版），平成10年2月，東京都衛生局生活環境部環境指導課．

13）Suzuki, T. and Watanabe, S.: *J. Chromatogr.*, 541, 359-364, 1991.

14）社団法人日本水道協会：上水試験方法（1993年版）厚生省生活衛生局水道環境部監修，p325-375，1993，社団法人日本水道協会，東京．

15）矢口久美子，鈴木俊也，近藤治美，他：東京衛研年報，47，274-280，1996.

16）Suzuki, T., Yaguchi, K., Ohnishi, K., *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1712-1717,1995.

17）Suzuki, T., Yaguchi, K., Nishima, T., *et al.*: *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1599-1602, 1996.

18）Suzuki, T., Kondo, H., Yaguchi, K., *et al.*: *Environ. Sci. Technol.*, 32, 920-929, 1998.

19）Kolpin, D.W., Barbash, J.E., Gilliom, R.J.,: *Environ. Sci. Technol.*, 32, 558-566, 1998.

20）Garmouma, M., Blanchard, M., Chesterikoff, A., *et al.*: *Water Res.*, 31, 1489-1503, 1997.

21）日本環境化学会：環境中の「ホルモン様化学物質」に関する講演会（第22回日本環境化学会講演会予稿集），p1-9，1997，日本環境化学会，茨城．

22）Gustafson, D.I.: *J. Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 339-357, 1989.

23）Jury, W.A., Focht, D.D., Farmer, W.J.: *J. Environ., Qual.*, 16, 422-428, 1987.

24）Cohen, S.Z., Creeger, S.M., Carsel, R.F., *et al.*: *In Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*; Krueger, R.F., Seiber, J.N., Eds, p297-325, 1984, American Chemical Society, Washington, DC.

25）Mullins, J.A., Carsel, R.E., Scarbough, J.E., *et al.*: *PRIZM-2: A Model for Predicting Pesticide Fate in the Crop Root and Unsaturated Zones: User Manual for Release 2.0*, EPA/600/R-93/046, 1993, U.S.Environmental Protection Agency, Athens, Geogia.

26）Wagenet, R.J., Hutson, J.L.: *LEACHM: A Finite*

Difference Model for Simulating Water, Salt and Pesticide Movement in the Plant Root, Zone. Continuum Vol.2, ver. 2.0, 1989, New York State Water resources Inst., Cornell Univ. Ithaca, New York.

27) Leonard, R.A., Knisel, W.G., Still, D.A.: *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 30, 1403-1418, 1987.

28) 金沢　純，農薬の環境特性と毒性データ集，1996，合同出版，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 218-224, 1998

Ge半導体検出器を用いた核種分析による環境放射能調査 —平成2年度から平成8年度—

坂本朋子*, 鈴木秀雄*, 真木俊夫*

Environmental Radioactivity Level Survey in Tokyo by γ-Ray Spectrometry with Ge detector —Apr.1990 ~ Mar.1996—

TOMOKO SAKAMOTO*, HIDEO SUZUKI* and TOSHIO MAKI*

Keywords：環境放射能 environmental radioactivity, 核種分析 radionuclide analysis, ゲルマニウム半導体検出器 Ge gamma-ray spectrometer, セシウム-137 Cesium-137

はじめに

1940年代に開始された大気中の核実験が次第に拡大し1950年代には日本でもその影響が観測されるようになった[1]. 50年代後半に日本における環境放射能調査網の整備が行われ，これを受けて当研究所においては1957年より天水等の飲料水，牛乳などの食品を対象にGM管方式による全ベータ放射能の測定を開始した[2,3]. 1960年代始めには放射能汚染の増大が確認され，環境放射能調査網が拡大された.

核爆発量の大きい核実験は1954年～1958年，1961年～1962年に行われている[4]. 1963年に大気中の核実験部分停止条約が締結され，米ソによる大気圏核爆発実験は終了し，日本における人工放射性降下物量も60年代後半には減少の傾向を示している[5]. 以降世界各国で原子力の平和利用を目的とした種々の試みがなされている. 原子力利用施設における安全性の確保また施設外への放射能漏洩監視に関しても環境放射能調査，研究は重要となってきている.

1986年，旧ソ連のチェルノブイル原子力発電所で爆発事故が発生し大量の放射性物質が環境中に放出された[6]. この事故に際し検出された放射性核種の状況は従来の核実験の場合と異なり[5]，核種分析の重要性が確認された. 以降全国47都道府県で環境放射能調査が行われることになった. 当研究所においても1989年度末からGe半導体検出器を用いた核種分析が開始された.

今回は東京都における1990年度から1996年度までのGe半導体検出器を用いた核種分析による調査結果について検討した. 対象とした核種は人工放射性核種の主にセシウム-137及びヨウ素-131等，並びに同時に検出された天然放射性核種のカリウム-40であった. また同様の調査を実施している全国47都道府県の同時期の測定結果との比較も含め検討したので報告する.

実験方法及び材料

科学技術庁による放射能測定調査委託実施計画書及び各種放射能測定マニュアルに準拠した.

1．試料の採取，前処理等.

1）降下物：当研究所3号館屋上に設置した大型水盤（受水面積5000 cm^2）に降下物を受けて毎月1回採取し，この全量をビーカーにて加熱，蒸発濃縮した. 濃縮試料をスチロール製測定容器（U-8容器）に移し赤外線電球を用い更に蒸発濃縮乾固し，これを測定試料とした.

2）陸水：上水・源水，上水・蛇口水ともK浄水場にて年2回採取した. 採取試料各100Lを降下物と同様にU-8容器に蒸発乾固し測定試料とした.

3）土壌：土壌は東京都K町で年に1回採取した. 採取深度の異なる0-5cmの土壌と5-20cmの土壌を採取し，これを105℃で乾燥後，2mmのふるいで篩過し得られた乾燥細土をU-8容器に分取し測定試料とした.

4）穀類（精米）：毎年，収穫期にS区内にて購入した新米（消費地）は生のまま2kgをマリネリビーカに分取し測定試料とした.

5）牛乳（原乳,市販乳）：原乳は年4回H町にて採取し市販乳は年2回S区内で購入した. いずれも生のまま2Lをマリネリビーカに分取し測定試料とした.

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

6）野菜類：S区内にて収穫期に購入した大根（根部），ホウレン草（葉茎部）の可食部分を石英製蒸発皿に入れ，まずゆっくり炭化し，次いで450℃で約24時間灰化，放冷した．灰試料は0.35mm程度のふるいを通しU-8容器に詰めて測定試料とした．

7）日常食（5人分・日）：年に2回6月と12月に試料採取を行っている．S区内及びH町において平日の食事を対象として陰膳方式で1日分の朝，昼，夕食及び間食，飲物をすべて集めた．各地区5人分を全部まとめて1試料とした．可食部を対象に野菜類と同様に処理し測定試料とした．

8）海産生物（ムロアジ）：毎年漁獲期にM村に水揚げされたムロアジを購入し，この魚の筋肉部を日常食と同様に処理し測定試料とした．

2．測定方法

調製した試料を核種分析装置により測定した．

核種分析装置：東芝NAIG社製　S-12

機器の性能と設定条件：FWHM　1.9 Kev，P/C　40/1，

相対効率　16%，印可電圧　3000 V，

測定室：室温23±2℃，湿度：～60%，

測定時間：70,000秒，

スペクトル解析プログラム：TOSHIBA NLAB-GAMMA

測定操作：予め，JRIA製多核種混合容積線源を用いエネルギー校正及び効率校正を行ったGe半導体検出器を用いて各試料を計測した．後にこの計測値にバックグラウンド補正，さらに減衰補正等の解析を行い，各核種の定性定量分析を行った．

計数値がその計数誤差の3倍を下回るものについてはN.Dと表示した．全国の平均についてはN.Dのものを除いて集計した[7]．

結果と考察

表1～2に東京都における1990～1996年度の各試料の測定結果を示した．

降下物：東京都のK-40の測定値は表1に示すように全般に低い濃度又はN.Dであり，最大値は2.92 MBq/km^{2}であった．この期間に全国で測定された値[7]はK-40の件数が3,804件，N.Dの件数は1,136件で平均は6.98，最大値は1,840MBq/km^{2}であった．Cs-137は東京都において，この期間を通じて3回のみ検出しているが，何れの値も全国の平均と同等かやや低めであった．これらの測定値は当研究所旧5号館の撤去工事，近隣における広範な住宅の建て替え工事の時期と一致しており，その際の建材及び土壌粉塵の影響が考えられた．全国の平均は0.098，最大値は1.21MBq/km^2，総件数に対するN.Dの割合は約90%であった．

陸水（水道源水）：K-40は表1に示すように東京都では，全例から検出されており，ほぼ全国の平均74.3，最大値178mBq/Lと同レベルであった．

Cs-137は東京都で1回検出例があった．都道府県の報告中にCs-137の検出例が散見され，東京都の検出例は全国の値と比較して大差なかった．

陸水（蛇口水）：K-40は，東京都では表1に示すように全例から検出されており全国の平均値と同様か多少高めの傾向であった．K-40は全国の平均52.7，最大値260mBq/Lである．Cs-137は東京都で検出例はない．都道府県の報告中にCs-137の検出例が散見された．

土壌：東京都における各深度の土壌中のK-40とCs-137の経年変化を図1及び2に示す．K-40に関しては両方の深度に差は認められないがCs-137は表層の方が若干高めの値を示した．また各層毎のCs-137の測定値につき全国の平均，最大値の経年変化と東京都における測定値を比較した．各層ともに東京都の測定値は全国の平均より低いレベルで推移していた．

精米：表2に示すようにK-40の東京都での測定値は全国値の平均と同等かやや低い値を示した．全国値は平均26.0，最大値200Bq/kg生であった．Cs-137は東京都では検出されていない．全国では平均0.11，最大値0.57 Bq/kg生であったが，N.Dの割合は全件数の約90%程度であった．

野菜類：東京都の測定値は表2に示すように大根，ホウレン草はK-40のみが検出されておりその値は全国の平均と同レベルであった．大根の全国の平均71.0，最大値270Bq/kg生であり，ホウレン草の全国の平均217，最大値879Bq/kg生であった．東京都ではCs-137の検出例はなかったが，全国の大根のCs-137は平均0.084，最大値0.83Bq/kg生，N.Dの割合は全体の約80%であり，ホウレン草中のCs-137は平均0.14，最大値0.69Bq/kg生，N.Dの割合は全体の約85%であった．畑の土質，用いられる肥料，採取作物の成長段階並びに野菜の採取部位なども核種の検出に関与していると思われる．

牛乳（原乳）：東京都のK-40の測定値を表2に示す．これらは全国の平均よりやや低い値を示していた．全国の平均49.3，最大値160Bq/Lであった．図3に東京都に於けるCs-137とK-40の測定値の年度推移を採取月別に示した．原乳中の測定値は減少の傾向が認められた．全国のCs-137の値は，平均0.14，最大値0.91Bq/Lであり，東京都の測定値は全国の平均と同等か或いは低めのレベルであると考えられる．

表1．東京都における降下物，陸水，土壌の測定値

採取月	1990年度	1991年度	1992年度	1993年度	1994年度	1995年度	1996年度
降下物 MBq/km²・月							
K-40							
4	N.D	1.45±0.34	1.51±0.37	2.92±0.36	1.28±0.31	1.50±0.27	N.D
5	N.D	1.34±0.38	1.06±0.32	N.D	0.96±0.25	1.43±0.29	N.D
6	N.D	N.D	N.D	N.D	0.88±0.24	N.D	N.D
7	1.58±0.32	1.00±0.29	N.D	0.80±0.25	0.85±0.25	N.D	N.D
8	1.64±0.34	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.97±0.29
9	1.57±0.41	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
10	1.00±0.31	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.92±0.30
11	1.12±0.32	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	1.25±0.28
12	N.D	N.D	N.D	1.00±0.26	N.D	N.D	N.D
1	N.D	N.D	1.05±0.27	N.D	N.D	N.D	N.D
2	1.20±0.36	N.D	1.05±0.27	0.90±0.26	0.96±0.26	0.91±0.25	N.D
3	1.06±0.33	0.83±0.29	2.08±0.31	1.25±0.28	N.D	1.88±0.31	N.D
Cs-137							
4	N.D	N.D	N.D	0.09±0.02	0.04±0.01	N.D	N.D
5	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
6	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
7	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
9	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
12	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
1	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
3	N.D	N.D	0.06±0.02	N.D	N.D	N.D	N.D
陸水・源水 mBq/L							
K-40							
6	97.2±3.91	83.7±3.82	69.2±3.41	54.6±2.85	86.6±3.87	86.6±3.88	69.3±3.51
12	71.9±3.47	81.0±3.97	87.0±3.55	73.8±3.61	122±5.07	110±3.99	97.7±3.92
Cs-137							
6	ND	ND	ND	ND	ND	0.52±0.10	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
陸水・蛇口水 mBq/L							
K-40							
6	97.4±4.22	78.4±3.51	43.0±2.69	53.1±2.92	75.8±3.52	56.4±3.13	58.6±3.20
12	68.3±3.51	58.3±2.79	59.7±2.96	70.7±3.46	102±4.12	98.3±3.76	94.6±3.69
Cs-137							
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
土壌(0-5cm) Bq/kg乾土							
K-40							
6	309±7.91	395±9.00	375±9.41	365±9.16	364±9.35	338±9.57	346±9.46
Cs-137							
6	1.07±0.20	3.20±0.27	2.62±0.31	3.10±0.28	1.04±0.26	4.34±0.34	3.04±0.27
土壌(5-20cm) Bq/kg乾土							
K-40							
6	388±9.39	336±9.41	376±9.42	380±9.72	362±9.41	320±8.48	334±8.84
Cs-137							
6	1.35±0.23	2.20±0.30	1.14±0.25	1.93±0.27	0.69±0.20	1.84±0.26	1.36±0.21

計測値±計測誤差　計測値がその計数誤差の3倍を下回る場合はN.D

表2．東京都における精米，野菜類，牛乳，日常食，海産生物の測定値

採取月	1990年度	1991年度	1992年度	1993年度	1994年度	1995年度	1996年度
精米 Bq/kg生							
K-40							
10	26.6±0.88	19.6±0.76	21.9±0.80	24.6±0.85	22.7±0.78	23.5±0.81	23.3±0.81
Cs-137							
10	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
野菜（大根） Bq/kg生							
K-40							
11	70.7±0.52	74.9±0.52	62.6±0.48	70.7±0.52	67.7±0.47	62.9±0.48	80.7±0.55
Cs-137							
11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
野菜（ホウレン草） Bq/kg生							
K-40							
11	193±1.07	269±1.39	241±1.31	239±1.22	221±1.16	269±1.41	217±1.16
Cs-137							
11	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
原乳（H町） Bq/L							
K-40							
5	39.4±1.02	37.4±1.00	35.6±1.03	45.2±1.07	47.1±1.12	40.6±1.05	45.0±1.09
8	39.4±1.02	41.6±1.05	38.2±1.01	44.5±1.14	46.5±1.19	44.6±1.19	48.3±1.14
11	39.0±1.02	37.0±1.00	37.9±3.00	38.6±1.00	43.7±1.09	44.9±1.07	44.8±1.07
2	42.3±1.07	36.1±1.02	37.7±0.41*	42.7±1.05	44.3±1.12	45.4±1.09	44.2±1.09
Cs-137							
5	0.29±0.03	0.19±0.02	0.09±0.02	0.08±0.02	0.09±0.02	N.D	N.D
8	0.21±0.03	0.08±0.02	N.D	0.08±0.02	0.09±0.03	N.D	N.D
11	0.12±0.03	0.20±0.03	N.D	0.10±0.02	0.37±0.04	0.08±0.02	N.D
2	0.28±0.03	0.07±0.02	0.06±0.01*	N.D	0.11±0.02	N.D	N.D
市販乳（S区） Bq/L							
K-40							
8	44.6±1.09	42.2±1.09	47.5±1.23	47.7±1.12	48.8±1.12	48.9±1.12	45.4±1.09
2	44.3±1.09	42.5±1.07	42.2±1.08	50.2±1.14	48.0±1.12	47.8±1.14	45.9±1.09
Cs-137							
8	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.08±0.02
2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.10±0.02
日常食（S区） Bq/人・日							
K-40							
6	43.3±0.43	37.1±0.40	47.1±0.47	54.6±0.51	64.5±0.56	51.7±0.49	55.9±0.51
12	42.5±0.45	46.3±0.46	50.7±0.47	55.3±0.50	60.2±0.54	45.6±0.47	61.1±0.55
Cs-137							
6	0.06±0.01	0.05±0.01	0.03±0.01	0.04±0.00743	0.05±0.01	0.07±0.01	0.03±0.01
12	0.02±0.01	0.06±0.01	0.04±0.01	0.09±0.0079	0.04±0.01	0.02±0.01	0.04±0.01
日常食（H町） Bq/人・日							
K-40							
6	55.0±0.52	45.1±0.46	44.1±0.44	50.4±0.52	51.8±0.52	48.9±0.52	47.7±0.48
12	44.7±0.46	57.1±0.54	56.1±0.54	57.8±0.54	49.0±0.48	65.6±0.59	50.9±0.53
Cs-137							
6	0.09±0.01	0.06±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01
12	0.07±0.01	0.10±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.07±0.01	0.04±0.01
海産生物（ムロアジ） Bq/kg生							
K-40							
10	92.2±0.72	92.2±0.77	49.3±0.42	104±0.77	49.6±0.42	96.9±0.79	89.8±0.73
Cs-137							
10	0.17±0.01	0.13±0.01	0.08±0.01	0.15±0.01	0.07±0.01	0.16±0.01	0.11±0.01

計数値±計数誤差，　計測値がその計数誤差の3倍を下回る場合はN.D　*灰化物（4l）

牛乳（市販乳）：表2に東京都の市販乳中のK-40を示す．これらの測定値は全国の平均と同様か又はやや低い傾向であった．K-40は全国の平均48.1，最大値140Bq/Lであった．東京都のCs-137については1995年度までN.Dであった．

1996年度の購入品にCs-137が検出された．この年は従

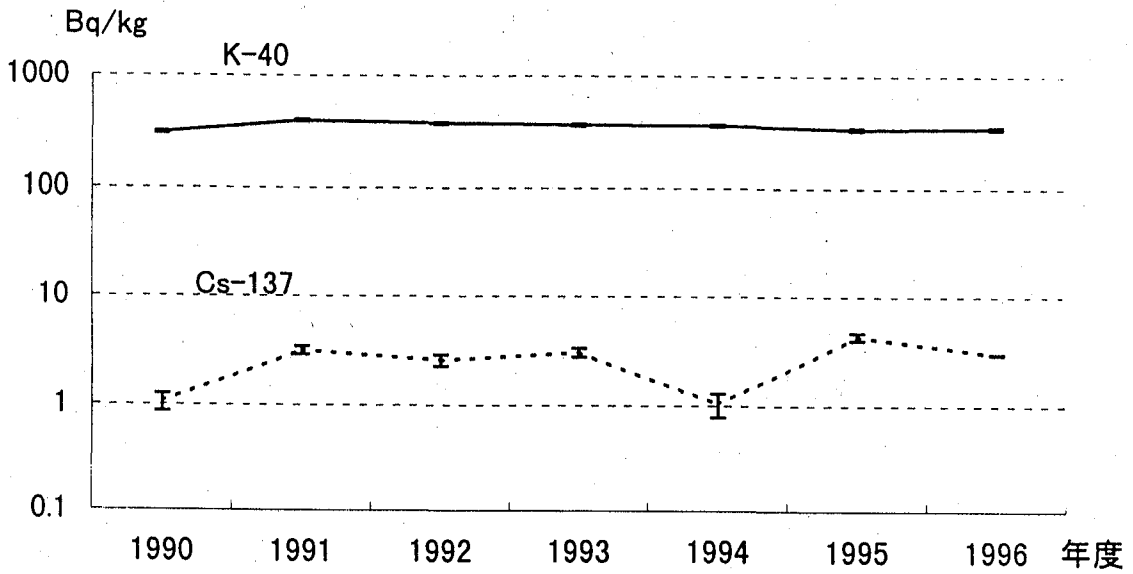


図１．東京都における0～5cmの深さの土壌中Cs-137とK-40の年度推移

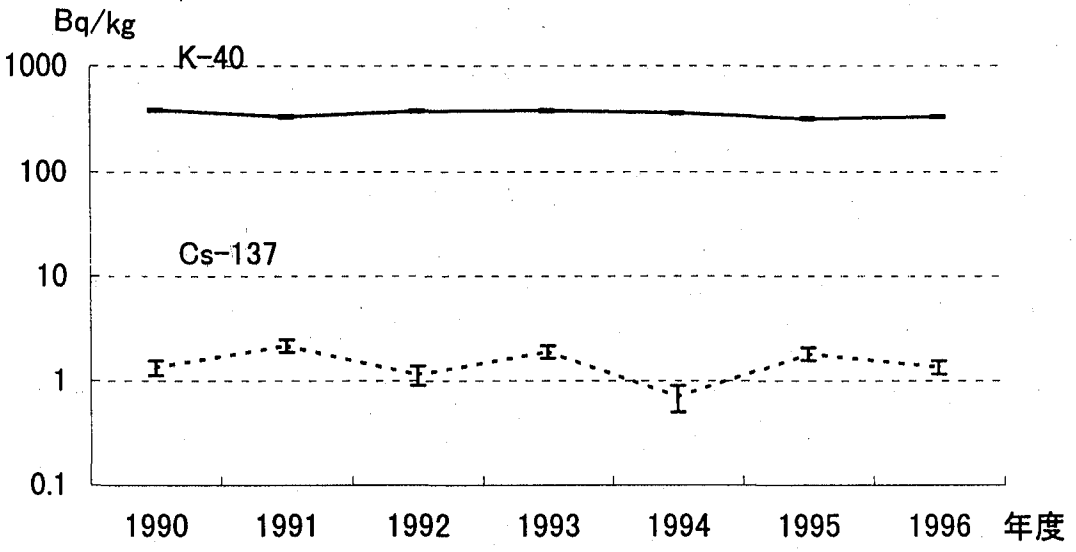


図２．東京都における５～20cmの深さの土壌中Cs-137とK-40の年度推移

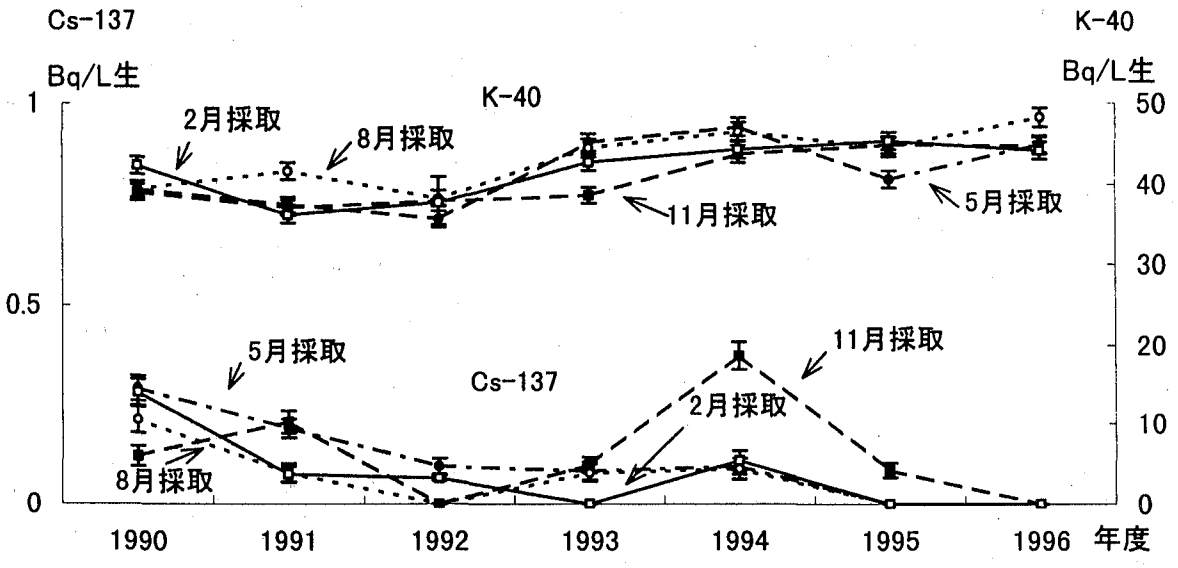


図３．東京都における原乳中Cs-137とK-40の採取月別年度推移

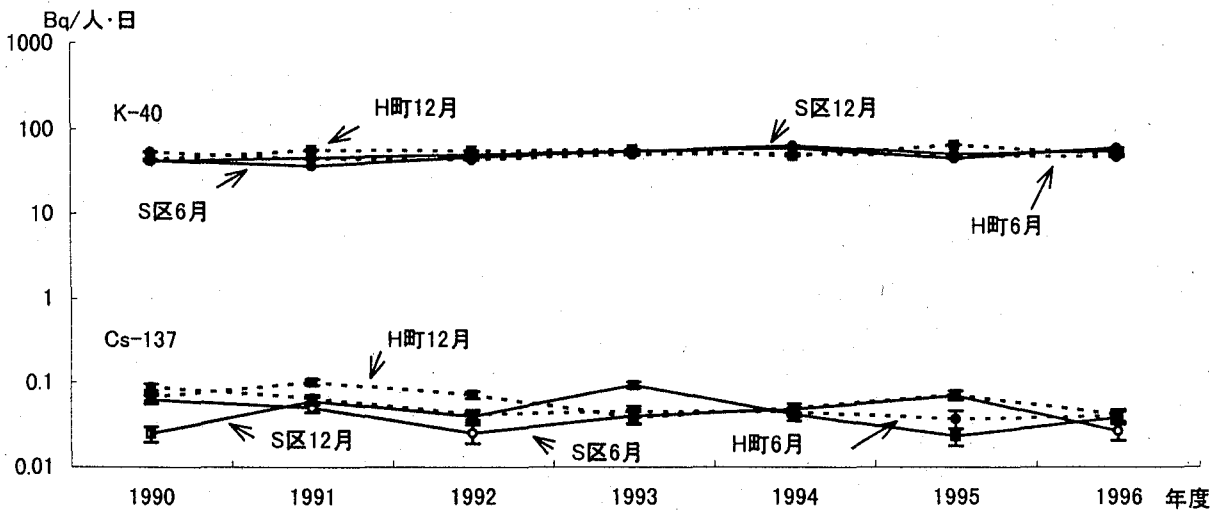


図４．東京都における日常食中Cs-137及びK-40の採取月別,採取地別の年度推移

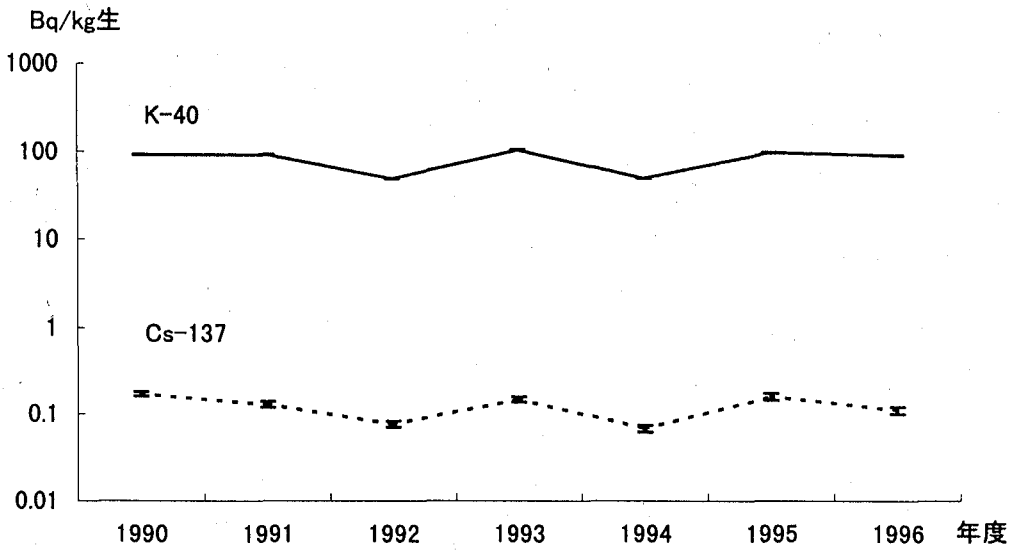


図５．東京都における海産物中Cs-137とK-40の年度推移

来購入していた同一メーカーの購入が不可能となったので別メーカーの牛乳に変更，購入した．全国の平均0.06，最大値0.26Bq/Lであり，この牛乳の検出値は全国の平均値に酷似していた．東京都，全国の牛乳中からは全例にわたり，I-131は検出されなかった．微量ながら牛乳中に検出された物質は乳牛が牧草等を食べたときに摂取され，母乳中に移行したと考えられので飼料や飼育環境に大きく影響されると思われる．

日常食：図4に東京都のK-40，Cs-137の年度推移を採取月別，地域別に示した．これによると季節変化，地域特性などは認められず，測定値に変化がなかった．東京都に於けるK-40，Cs-137のレベルはおおむね平均的な値であった．全国における日常食のK-40は平均59.8，最大値287 Bq/人・日であった．全国のCs-137測定値は平均0.059，最大値0.34Bq/人・日であった．またこの期間中，全国のN.Dの割合は1990年度に約15%だったが1996年度には約37%となり，全国の年度推移でCs-137の低下が認められた．

海産物（ムロアジ）：図5に東京都におけるK-40とCs-137の測定値の年度推移を示す．K-40とCs-137の挙動が同調しているのが認められる．元来カリウムは地殻中に多く存在する．またカリウムの同位体存在比は0.0117%である．従ってK-40は壊変系列を構成しない天然放射性核種の内でも環境中に普遍的に存在する核種である．これに対し人工放射性核種のCs-137はかつての大気圏内核爆発実験や原子力発電所の事故などの際に環境中に放出された核種であるが，半減期が30年と長く，地球上に広く分布している．双方ともに１価のアルカリ金属であり同一挙動を示し，生物の筋肉等に存在する．魚試料のCs-137は，魚が生息している環境の海水の放射能レベルを反映していると言われている[8]．魚に関しては年令により魚体の大きさも異なるなど試料の均一化が困

難であるにもかかわらず，図5に示すようにK-40とCs-137の測定値は同じ挙動を示しているのでムロアジが海水の放射能レベルの指標となることが解った．東京都のCs-137のレベルは全国の魚類の平均よりやや低めを推移していた．全国のK-40測定値は平均108，最大値208Bq/kg生であった．全国のCs-137測定値は平均0.16，最大値0.48 Bq/kg生であった．

東京都の全調査試料についてI-131及び他の人工放射性核種は検出されなかった．他の自治体の水道源水，蛇口水からI-131の検出例が報告されており，このI-131は医学利用由来であると報告されている[9]．しかしこの検出例のほかに全国的に検出された例はない．

東京都内で消費されている食物は主として消費地に集まってきた食品と考えられ東京都の生産品としての特性を示さない．流通の至便さを考え合わせたとき，東京都の環境放射能レベルは日本全国又は世界各地の生産地の環境放射能レベルを反映する可能性も考えられる．

環境放射線調査は過去においては大気圏内核爆発実験からの放射能汚染を対象に行われてきたが現在では原子力施設及びその周辺地域の放射能監視が主な目的に成ってきている．またこの様な調査において現在では，環境レベルの，低い濃度の試料を調査対象としておりデータの精度の高いことが重要であり精度管理事業への参加が不可欠である．

近年ロシアによる核廃棄物の海洋投棄が問題となり，また旧ソ連の核廃棄物は今や地球規模の惨事を引き起こすと言われている．人間活動に伴う放射能をどう管理していくかは，人類にとっては今後の重大な課題である．未だに世界の各地で行われている核実験や原子力利用施設の放射能事故を鑑み，またこれらの緊急事態への対応のためにも，この種の環境放射能調査は今後も継続していく必要性が高いと思われる．

ま と め

科学技術庁委託による東京都における環境放射能調査を実施した．Ge半導体検出器を用いた核種分析による，1990年度から1998年度の東京都における人工放射能及び自然放射能の測定結果について全国の測定結果との比較も含め検討した．環境試料として降下物，水道源水，蛇口水，土壌，また飲食物として精米，ホウレン草，大根，牛乳（原乳，市販乳），日常食（陰膳方式），ムロアジを測定した．測定核種はセシウム-137，ヨウ素-131等人工放射性核種，カリウム-40等天然放射性核種を対象とした．

東京都における各試料中セシウム-137及びカリウム-40の測定値の年度推移は横這いかやや下降傾向を示している．全国値との比較によれば東京都の各試料のレベルは平均的レベルと同等か又は多少低目に推移している．他に人工放射性核種はヨウ素-131を含め検出されていない．

今回の測定期間を通じて東京都での測定結果からは人工放射能の放出，漏洩に由来する変化は観測されていない．従って原子力発電施設を域内に有しない自治体における平常時の環境放射能レベルが把握できた．

謝　辞

本報告をまとめるに当たりご指導頂き，全国のデータを提供戴きました科学技術庁原子力安全局防災環境対策室並びに（財）日本分析センターに深謝します．本調査遂行に当たり試料採取等様々なご協力を頂きました東京都の関係機関，並びに日常食試料提供にご協力頂いた東京都民の皆様に深謝します．

文　献

1）三宅泰雄:海洋における人工放射性物質の挙動,堀部純男,海水の化学,海洋科学基礎講座10,216-228,1970,東海大学出版会,東京.

2）長尾元雅,三村秀一:東京衛研年報,**10**, 94-97, 1959.

3）松井多一,西垣 進,直井家寿太 :東京衛研年報,**10**,98-104,1959.

4）環境放射線モニタリング:41,実務テキストシリーズ,No.4, 昭和62年,環境放射線モニタリングテキスト編集委員会,（財）原子力安全研究協会.

5）阿部信彦,樋口英雄,吉清水克己,他：*Jap. Chem. Anal. Center*, No.12, 42,1986.

6）市川龍資,稲葉次郎:放射性物質の検出,寺島東洋三,市川龍資編,チェルノブイリの放射能と日本,45-51,東海大学出版会,1989,東京.

7）科学技術庁監修環境放射線資料,（財）日本分析センター編,千葉,1998.

8）Tateda,Y.,Koyanagi,T.: *J.Radiat Res*,**37**(2),71-79, 1996.

9）渡辺 功,肥塚利江,鵜川昌弘:大阪府立公衛研年報,**35**, 147-156,1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 225-231, 1998

室内空気中化学物質が原因とみられる健康阻害の事例について

斎藤育江*, 瀬戸博*, 竹内正博*

Some cases of health complaints related to indoor air chemicals

IKUE SAITO*, HIROSHI SETO* and MASAHIRO TAKEUCHI*

Keywords：ホルムアルデヒド formaldehyde，揮発性有機化合物 volatile organic compounds，有機リン系農薬 organophosphorus pesticides，室内空気 Indoor air，健康阻害 health complaints

緒　言

「化学物質過敏症」や「シックハウス症候群」といった空気中の化学物質による健康阻害について社会的関心が高まっている今日，室内空気に関する検査依頼は年々増加をたどっている．そうした中で，家を新築あるいはリフォームしたことが原因と考えられる健康阻害の事例が昨年度１年間に10件以上あった．

室内のホルムアルデヒド濃度については，昨年，厚生省から指針値（30分平均値で0.1ｍｇ／m^3以下）が出されたため[1]，建築業界では建材由来のホルムアルデヒドの低減に向けた動きも盛んである．また，パラジクロロベンゼンについては，マウスに対する発ガン性のある[2]ことから耐容平均気中濃度0.1ppmが提案された[3]．しかし，その他の揮発性有機化合物（以下ＶＯＣと略す）については，いまだ室内濃度に関する基準のないのが現状であり，これらによる健康阻害は今後も大きな問題と考えられる．

本報では，健康上の障害がみられた事例のうち８件について紹介するとともに，室内で生じる不快な症状の頻度と室内ＶＯＣ濃度との関連について得られた知見を報告する．

実験材料及び方法

１．調査方法

1997年４月～1998年３月にかけて東京近郊の住宅を対象として，室内空気中のホルムアルデヒド，ＶＯＣ及び有機リン系農薬の調査を行った．同時に健康に関するアンケートまたは聞き取り調査を行い，室内に居て起こる不快な症状とその頻度について調べた．

２．測定方法

１）ホルムアルデヒド

パッシブＡＨＭＴ法[4]により測定した

２）VOC

調査物質　ヘキサン，ヘプタン，オクタン，ノナン，デカン，ウンデカン，ドデカン，トリデカン，テトラデカン，ペンタデカン，ヘキサデカン，2,4－ジメチルペンタン，ベンゼン，トルエン，エチルベンゼン，*m*-キシレン，*p*-キシレン，*o*-キシレン，スチレン，1,3,5-トリメチルベンゼン，1,2,4-トリメチルベンゼン，1,2,3-トリメチルベンゼン，α-ピネン，リモネン，トリクロロエチレン，テトラクロロエチレン，クロロホルム，1,1,1-トリクロロエタン，1,2-ジクロロエタン，1,2-ジクロロプロパン，*p*-ジクロロベンゼン，四塩化炭素，酢酸エチル，酢酸ブチル，メチルエチルケトン，メチルイソブチルケトン，n-ブタノール　以上37物質

捕集管　ORBO™－91　Tube，Large 200＋100mg (SUPELCO)

装置　吸引ポンプ：BUCK　I. H.　PUMP（A. P. BUCK，INC），ガスクロマトグラフー質量分析計（以下ＧＣ－ＭＳと略す）：5890　SERIESⅡ－5971Ａ（HP社）

操作及び分析方法　試料の採取は吸引ポンプを用い，流量約100ml/minで24時間行った（吸引空気量：110～150L）．試料採取後の捕集管は両端を専用の汚染防止キャップで密栓して活性炭入りの共栓付きガラス試験管に入れ，更にデシケータに入れて分析直前まで室温で保存した．捕集管をカットして捕集剤（Carbosieve S-Ⅲ）

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

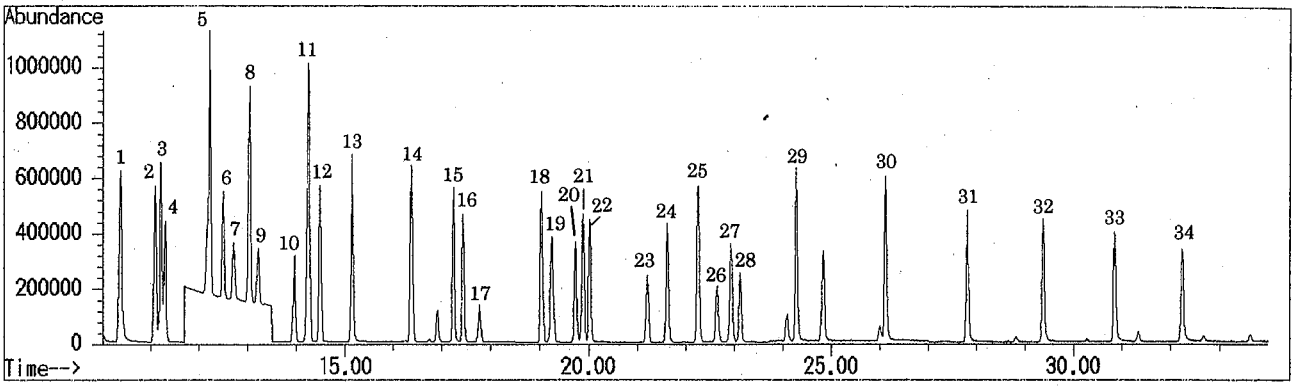


図1．GC－MSのクロマトグラム

1：メチルエチルケトン，2：酢酸エチル，3：ヘキサン，4：クロロホルム，5：2,4-ジメチルペンタン，1,2-ジクロロエタン，6：1,1,1-トリクロロエタン，7：ブタノール，8：ベンゼン，9：四塩化炭素，10：1,2-ジクロロプロパン，11：トリクロロエチレン，12：ヘプタン，13：メチルイソブチルケトン，14：トルエン，15：酢酸ブチル，16：オクタン，17：テトラクロロエチレン，18：エチルベンゼン，19：*p*-キシレン，*m*-キシレン，20：スチレン，21：*o*-キシレン，22：ノナン，23：α-ピネン，24：1,3,5-トリメチルベンゼン，25：1,2,4-トリメチルベンゼン，デカン，26：*p*-ジクロロベンゼン，27：1,2,3-トリメチルベンゼン，28：リモネン，29：ウンデカン，30：ドデカン，31：トリデカン，32：テトラデカン，33：ペンタデカン，34：ヘキサデカン

表1．GC－MSの分析条件

カラム	：DB-1(60m×0.25mmi.d. 1μm)
カラム温度	：40℃(5min)-10℃/min-300℃(3min)
注入口温度	：250℃
キャリアーガス	：He(カラムヘッド圧100kpa)
注入量	：2μl(スプリット注入法)
イオン源温度	：250℃(インタ-フェ-ス温度)
EMvolt	：2000
検出法	：SIM （モニターイオンは表4参照）

表2．GC－FPDの分析条件

カラム	：DB-17(15m×0.53mmi.d. 1μm)
カラム温度	：70℃(2min)-20℃/min-170℃ -10℃/min-250(10min)
注入口温度	：250℃
キャリアーガス	：He(カラムヘッド圧70kpa)
注入量	：2μl(スプリットレス注入法)
検出器温度	：250℃

表3．GC－MSの分析条件

カラム	：Uitra#1(12.5m×0.2mmi.d. 1μm)
カラム温度	：60℃(2min)-20℃/min-200℃ -10℃/min-250℃(6min)
注入口温度	：250℃
キャリアーガス	：He(カラムヘッド圧70kpa)
注入量	：2μl(スプリット注入法)
イオン源温度	：250℃(インタ-フェ-ス温度)
検出法	：SCAN

をSPCガラス試験管に移し，二硫化炭素（作業環境測定用）1mlを加えて泡が出なくなるまで振り混ぜた後，時々振とうしながら1時間かけて抽出した．その後，抽出液に内部標準としてトルエン－d_8を0.1ppmの濃度になるように添加し，GC－MS用検液とした．空試験については，未使用の捕集管を用い，同様の溶出操作を行った．GC－MSの分析条件を表1に示す．

定量　検量線は，調査物質37種類の混合標準液を二硫化炭素で希釈して0.1-5.0μg/mlの標準系列を作り，それぞれに内部標準のトルエン－d_8を0.1ppmになるように加えて，2μlをGC－MSに注入し，得られたピーク面積比と濃度により作成した．クロマトグラムを図1に示す．検量線より抽出液中の各VOC量を求め，吸引空気量で除して空気中の濃度を求めた．

3）有機リン系農薬

調査物質　DDVP，ダイアジノン，フェニトロオン，フェンチオン

捕集管　Sep-pak　Plus　PS－2（waters）

装置　吸引ポンプ：BUCK　I. H.　PUMP（A. P. BUCK，INC），炎光検出器付きガスクロマトグラフ（以下GC－FPDと略す）：5890　SERIESⅡ（HP社），GC－MS：GC－17A－QP5000（島津）

操作及び分析方法　試料の採取は吸引ポンプを用い，流量約100ml/minで24時間行った（吸引空気量：110～150L）．試料採取後のカートリッジは両端に専用の汚染防止キャップをはめ，ガラスの密封容器に入れて分析直前まで室温で保存した．抽出溶媒にはジクロロメタン

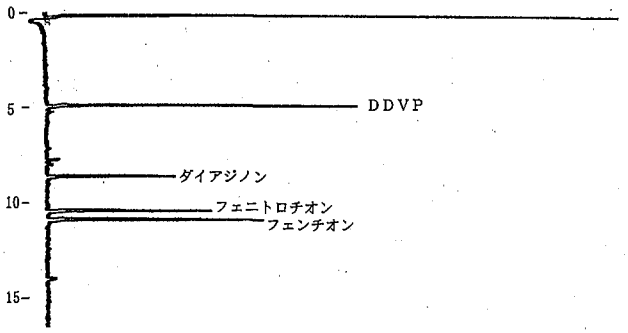


図2．ＧＣ－ＦＰＤのクロマトグラム

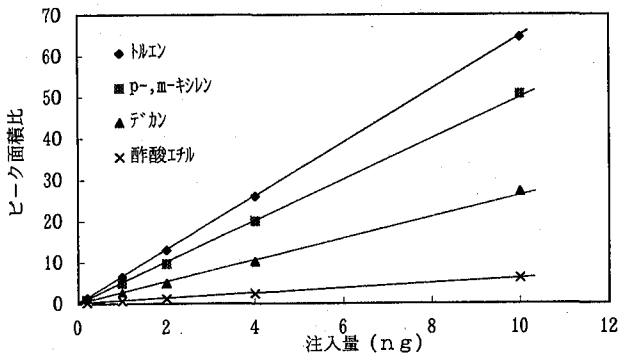


図3．VOCの検量線（ＧＣ－ＭＳ）

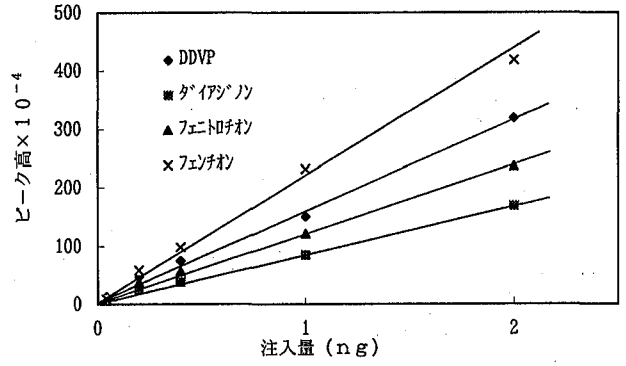


図4．有機リン系農薬の検量線（ＧＣ－ＦＰＤ）

（残留農薬分析用）５mlを用い，注射筒を使って１分以上かけて溶出した．溶出液は窒素気流下で0.2mlに濃縮し，ＧＣ－ＦＰＤ及びＧＣ－ＭＳ用の検液とした．空試験については未使用の捕集管を用い，同様の溶出操作を行った．なお，ＰＳ－２カートリッジは，あらかじめ20mlのジクロロメタンで洗浄し，純窒素で乾燥させてから使用した．ＧＣ－ＦＰＤの分析条件を表２に示す．ＧＣ－ＭＳによる分析は物質の確認のために行った．分析条件を表３に示す．

定量　検量線は，調査物質４種類の混合標準液をヘキサンで希釈して0.02-1.0μg/mlの標準系列を作り，2μlをＧＣ－ＦＰＤに注入し，得られたピーク高と濃度により作成した．クロマトグラムを図２に示す．検量線より溶出液中の各有機リン農薬量を求め，吸引空気量で除して空気中の濃度を求めた．

結　　果

１．検量線

ＧＣ－ＭＳによるトルエン，*p*-,*m*-キシレン，デカン及び酢酸エチルの検量線を図３に示す．これら以外の物

表４．ＶＯＣの添加回収率（ｎ＝６）

物質名	モニターイオン m/z	回収率（%）
ヘキサン	57	95.3 ± 11.25
ヘプタン	43	88.1 ± 2.44
オクタン	43	87.6 ± 4.73
ノナン	43	89.8 ± 7.91
デカン	43	88.2 ± 10.37
ウンデカン	57	91.7 ± 16.48
ドデカン	57	95.9 ± 16.01
トリデカン	57	82.9 ± 17.51
テトラデカン	57	91.8 ± 26.03
ペンタデカン	57	85.7 ± 16.52
ヘキサデカン	57	94.1 ± 20.33
2,4-ジメチルペンタン	43	86.0 ± 6.29
ベンゼン	78	99.7 ± 5.15
トルエン	91	90.3 ± 4.73
エチルベンゼン	91	95.1 ± 7.79
p-,*m*-キシレン	91	92.2 ± 8.39
o-キシレン	91	83.0 ± 8.58
スチレン	104	17.2 ± 5.81
1,3,5-トリメチルベンゼン	105	98.9 ± 13.74
1,2,4-トリメチルベンゼン	105	88.0 ± 13.29
1,2,3-トリメチルベンゼン	105	86.7 ± 13.14
α－ピネン	93	101.3 ± 11.08
リモネン	68	96.9 ± 16.41
トリクロロエチレン	130	98.0 ± 2.56
テトラクロロエチレン	166	100.1 ± 5.76
クロロホルム	83	93.7 ± 9.28
1,1,1-トリクロロエタン	97	94.5 ± 5.59
1,2-ジクロロエタン	62	89.6 ± 6.10
1,2-ジクロロプロパン	63	89.1 ± 3.25
p-ジクロロベンゼン	146	68.6 ± 9.68
四塩化炭素	117	99.5 ± 4.19
酢酸エチル	61	87.4 ± 8.57
酢酸ブチル	43	87.4 ± 3.94
メチルエチルケトン	43	71.3 ± 10.47
メチルイソブチルケトン	43	87.9 ± 3.81
ブタノール	56	52.5 ± 4.71

表5．有機リン系農薬の添加回収率（n＝3）

物質名	回収率（%）
DDVP	104.7 ± 7.4
ダイアジノン	81.2 ± 3.5
フェニトロチオン	88.2 ± 5.7
フェンチオン	52.0 ± 16.4

表6．VOCの検出限界

物質名	検出限界（$\mu g/m^3$）
ヘキサン	3.4
ヘプタン	0.10
オクタン	0.13
ノナン	0.20
デカン	0.26
ウンデカン	0.11
ドデカン	0.14
トリデカン	0.14
テトラデカン	0.15
ペンタデカン	0.15
ヘキサデカン	0.21
2,4-ジメチルペンタン	0.07
ベンゼン	0.84
トルエン	0.14
エチルベンゼン	0.04
p-,*m*-キシレン	0.06
o-キシレン	0.05
1,3,5-トリメチルベンゼン	0.05
1,2,4-トリメチルベンゼン	0.05
1,2,3-トリメチルベンゼン	0.06
α－ピネン	0.02
リモネン	0.09
トリクロロエチレン	0.04
テトラクロロエチレン	0.07
クロロホルム	0.31
1,1,1-トリクロロエタン	0.05
1,2-ジクロロエタン	0.02
1,2-ジクロロプロパン	0.07
p-ジクロロベンゼン	0.06
四塩化炭素	0.05
酢酸エチル	0.10
酢酸ブチル	0.11
メチルエチルケトン	0.09
メチルイソブチルケトン	0.09
ブタノール	0.41

質についても濃度とピーク面積との間に原点を通る直線関係が得られた．

GC－FPDによるDDVP，ダイアジノン，フェニトロオン，フェンチオンの検量線を図4に示す．4物質の検量線はいずれも濃度とピーク高との間に原点を通る直線関係が得られた．

表7．有機リン系農薬の検出限界

物質名	検出限界（$\mu g/m^3$）
DDVP	0.004
ダイアジノン	0.006
フェニトロチオン	0.004
フェンチオン	0.002

2．添加回収率及び破過試験

VOC37種類の混合標準溶液(各100μg/ml)をORBOチューブに5μl添加し，清浄空気を10秒間通気した後，二硫化炭素1mlで1時間かけて抽出した．その後，抽出液に内部標準を0.1ppmになるように添加し，GC－MS用検液とした．添加回収実験の結果を表4に示す．n-ブタノールと*p*-ジクロロベンゼンについては，回収率が70%に満たなかったので，測定値を回収率で補正し，スチレンについては，回収率が17.2%と低いため，この方法での測定値は採用しないこととした．これら以外の物質については，測定値の回収率による補正は行わなかった．またチューブを直列に2本つないで純窒素を100ml/minで24時間（吸引空気量160L）通気したところ，この条件では後段に破過しないことが確認された．

有機リン系農薬の混合標準溶液（各100μg/ml）をPS－2カートリッジに10μl添加し，純窒素を300ml/minで9時間通気した後（吸引空気量160L），ジクロロメタン5mlで溶出して，GC－FPD用検液とした．添加回収実験の結果を表5に示す．また，カートリッジを直列に2本つないで通気したところ，この条件では後段に破過しないことが確認された．

3．検出限界

空試験を行った際に調査物質が検出された場合は，6本のチューブについて操作ブランク値を求め，気温20℃，気圧1013hpa，吸引空気量144Lとして求めた濃度の標準偏差の10倍を検出限界とした．

空試験で検出されなかったものについては，物質ごとに，S／N比3から検出限界を求めた．

各物質の検出限界を表6及び表7に示す．

4．事例及び測定結果

築後6カ月以内の新築住宅8件と中古住宅11件について測定した室内ホルムアルデヒド及び36種のVOC濃度の幾何平均値と幾何標準偏差を表8に示す．測定値を評価するにあたって，ホルムアルデヒドについては，厚生省の指針値（100μg/m³）を判断基準とした．VOCについては国内の基準値が無いため，表8の幾何平均値を

表8．住宅の室内ホルムアルデヒド及びＶＯＣ濃度
(n=19)　単位：μg/m³

物質名	G.M.	G.S.D.
ホルムアルデヒド	45.0	2.04
ヘキサン	7.8	3.52
ヘプタン	1.8	2.70
オクタン	1.1	2.67
ノナン	2.4	2.20
デカン	4.5	2.55
ウンデカン	3.4	2.98
ドデカン	2.7	3.37
トリデカン	2.6	3.00
テトラデカン	2.7	2.85
ペンタデカン	1.4	2.86
ヘキサデカン	0.87	2.85
2,4-ジメチルペンタン	0.40	2.70
ベンゼン	3.3	2.80
トルエン	64.9	3.86
エチルベンゼン	21.0	5.33
p-,*m*-キシレン	24.3	5.02
o-キシレン	9.1	5.24
1,3,5-トリメチルベンゼン	1.7	3.65
1,2,4-トリメチルベンゼン	5.9	3.52
1,2,3-トリメチルベンゼン	1.5	3.06
α－ピネン	4.3	6.60
リモネン	6.5	4.39
トリクロロエチレン	2.0	1.84
テトラクロロエチレン	1.2	2.39
クロロホルム	0.69	3.84
1,1,1-トリクロロエタン	0.27	3.08
1,2-ジクロロエタン	0.24	2.54
1,2-ジクロロプロパン	0.16	2.88
p-ジクロロベンゼン	27.0	4.21
四塩化炭素	0.12	3.22
酢酸エチル	11.2	2.91
酢酸ブチル	3.9	5.11
メチルエチルケトン	3.8	3.23
メチルイソブチルケトン	2.3	4.49
ブタノール	9.7	4.06

G.M.：幾何平均値　　G.S.D.：幾何標準偏差
数値は20℃，1013hpa時を基準とした

通常の室内濃度と考え，この平均値の２倍を越えるものを高値とした．

＜ホルムアルデヒドが原因と考えられた事例＞

事例１：築後１年５カ月の木造一戸建て．依頼者は５０代の男性で，新築時に目の痛みを感じたが，１年経って再び夏に目の痛みを感じた．測定結果は，ホルムアルデヒド濃度が259μg/m³であった．

事例２：築後２年の鉄筋集合住宅．リフォーム後２カ月経っているが，その間，空室となっており閉め切りの状態であった．依頼者は40代の女性で，入居準備のため２時間ほど室内に入ったところ，頭痛，目・喉の痛み，咳，のどの乾き，吐き気，しびれを感じた．測定結果は，ホルムアルデヒド濃度が200μg/m³であった．

事例３：築後１カ月の木造一戸建て．依頼者は３０代の男性で，入居直後から頭痛，目・喉の痛み，咳，倦怠感を感じた．測定の結果，ホルムアルデヒド濃度は320μg/m³であった．この住宅ではＶＯＣ濃度も高く，酢酸エチルは平均値の５倍(58.5μg/m³)，酢酸ブチルは約30倍(111μg/m³)であった．

＜ＶＯＣが原因と考えられた事例＞

事例４：築後20年の木造一戸建て．依頼者は60代の女性で，リフォーム直後から頭痛，めまい，喉の痛み，皮膚のかゆみを感じた．リフォーム後５カ月経って依頼があり，測定したところ，ホルムアルデヒドは低かった（19.6μg/m³）が，ＶＯＣは酢酸エチルが平均値の８倍（88.6μg/m³），テトラクロロエチレンが平均値の４倍（5.1μg/m³）であった．

事例５：築後８年の鉄筋集合住宅．依頼者は40代の女性で，リフォーム直後から頭痛，目・喉の痛みを感じた．リフォーム後10日経って測定したところ，ホルムアルデヒドは低かった（42.8μg/m³）が，ＶＯＣはウンデカンが平均値の４倍（13.3μg/m³），n-ブタノールが平均値の４倍（39.5μg/m³）であった．

事例６：築後30年の鉄筋の小学校．床の研磨，壁・床の塗装工事をしたところ，280名の生徒のうち，約４割の生徒が頭痛，吐き気，鼻水，鼻・目・喉の痛みを訴えた．本件は住宅についての事例ではないが，室内環境ということで，前述の住宅の平均値を用いて評価を行った．測定の結果，工事を行った教室では，ホルムアルデヒドは低かった（12.7μg/m³）が，ＶＯＣではノナンが平均値の140倍（336μg/m³），デカンが242倍（1088μg/m³），ウンデカンが196倍（666μg/m³），エチルベンゼンが138倍（2,891μg/m³），キシレン類が108倍（3,599μg/m³）トリメチルベンゼン類が155倍（1,415μg/m³）と脂肪族炭化水素類及び芳香族炭化水素類の濃度が非常に高かった．

＜農薬が原因と考えられた事例＞

事例７：築後１年８カ月の木造一戸建て．依頼者は４０代の女性で，新築直後から頭痛，目の痛み，鼻づまり，くしゃみ，耳鳴りを感じた．測定の結果，ホルムアルデヒドは低かった（53.8μg/m³）が，ＶＯＣではα-ピネンが平均値の５倍（23.1μg/m³），ヘキサンが４倍

(32.0 $\mu g/m^3$) であった．依頼者から，畳の部屋で異臭がするとの訴えがあったため，畳由来の化学物質（防ダニ用）として考えられるナフタレン及び有機リン系農薬を測定した．ナフタレンはパッシブガスチューブによる方法[5]により測定した．畳を発生源としていることを確認するため，畳からの高さ1.5mに設置したものと，畳に接して置き，上からアルミ箔でおおいをしたもので比較した．その結果，ナフタレンは，畳付近の空気から室内濃度の180倍検出された．有機リン系農薬では，室内空気中からダイアジノンが検出された (0.28 $\mu g/m^3$)．

事例８．築後16年の鉄筋集合住宅．依頼者は60代の女性で，畳にダニが発生したため，業者に薬剤駆除を依頼．その後頭痛，目・鼻・喉の痛みを感じた．ＶＯＣでは，*p*-ジクロロベンゼンが平均値の40倍 (1080 $\mu g/m^3$) 高かった．有機リン系農薬を測定したところ，ＤＤＶＰ(0.28 $\mu g/m3$)，フェンチオン (0.02 $\mu g/m3$)，フェニトロチオン (0.04 $\mu g/m^3$) が検出された．

５．室内VOC濃度と健康阻害について

健康に関する調査結果が得られた住宅について(n=18)，築後年数と室内ＶＯＣ36物質の濃度合計値との関係を図５に示す．新築住宅では，高濃度を示す場合も多いが，ＶＯＣ合計値の低い住宅でも，不快な症状を訴えるケースが多くみられた．そこで，不快な症状がどの物質によって引き起こされたのかを明らかにするため，それらの症状の頻度と個々のＶＯＣ濃度との関連について解析を行った．不快な症状の頻度を「症状なし・たまにある・ときどきある・いつもある」の４段階に分け，各ＶＯＣ濃度と無相関の検定を行った．その結果，有意な相関がみられたのは，酢酸エチル($p<0.01$)，酢酸ブチル($p<0.05$)，n-ブタノール($p<0.05$)の３物質であった．有意ではなかったが，相関係数$r>0.36$で症状との関連が疑われたのは，トルエン，メチルエチルケトン，メチルイソブチルケトンの３物質であった（表９）．

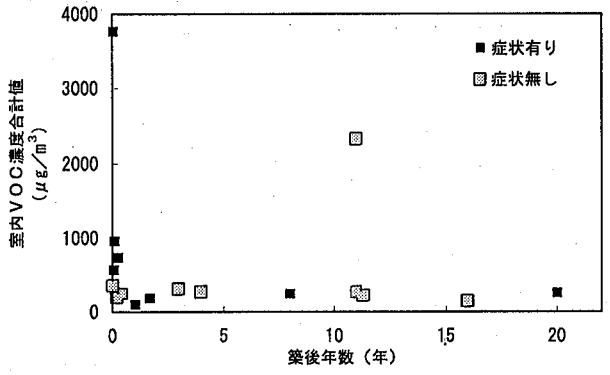


図５．築後年数と室内ＶＯＣ濃度合計値

表９．症状と室内ＶＯＣ濃度との相関

	物質名	
症状の頻度と有意な相関がみられた物質	酢酸エチル	(r=0.5913,p<0.01)
	酢酸ブチル	(r=0.4712,p<0.05)
	ｎ－ブタノール	(r=0.4949,p<0.05)
症状との関連が疑われた物質	トルエン	(r=0.4658)
	メチルエチルケトン	(r=0.3659)
	メチルイソブチルケトン	(r=0.4285)

６．米国ガイドラインとの比較

ＶＯＣについては，ＡＩＨＣ（American Industrial Hygiene Conference）が室内濃度についてのガイドラインを提案しており[6]，その値はＶＯＣ合計値（Total VOC，TVOC）と族性ごとの合計値の２本立てで設けられている．更に個々の化合物濃度は，それらが該当する族性の全濃度の50%を越えてはならない，かつ，TVOC濃度の10%を越えてはならないとしている．ただし，このガイドラインは新築の住宅は適用外で，築後６週間以降の住宅に適用される．

表10．住宅の室内ＶＯＣ濃度測定結果についてのＡＩＨＣガイドラインによる評価

項目	提案値 ($\mu g/m^3$)	適合件数	適合割合（%）
ＴＶＯＣ	300	10/18	55.6
アルカン族	100	15/18	83.3
芳香族	50	1/18	5.6
テルペン族	30	12/18	66.7
ハロカーボン	30	10/18	55.6
エステル	20	12/18	66.7
アルデヒド・ケトン*	20	13/18	72.2
アルコール	50	14/18	77.8

備考：TVOCは36物質の合計値，各族性の数値は36物質を族性別に合計した数値を用いて評価した

*：ホルムアルデヒドを除く

今回，我々が測定した１８件の住宅には築後６週間以内のものが４件あったが，それらも含めてこのガイドラインに基づいて評価を試みた．数値は，36種のＶＯＣ合計値をTVOCとし，36物質をそれぞ族性別に合計した値を用いた．結果を表10に示した．

TVOCが提案値(300 $\mu g/m^3$) 以下だったのは18件中10件，そのうち族性ごとの合計値もすべて提案値以下だったのは１件だけであった．族性ごとの合計値では，芳香族の基準値を満たすものの割合が最も低かった．

考　察

ＡＩＨＣの基準を満たしている住宅が少ない原因の１つとして，住宅の耐用年数の問題があげられる．詳しい資料は無いが，日本の住宅の耐用年数は17年とも23年ともいわれ，外国に比べて耐用年数が短いといわれている．そのため，築後年数の短い住宅の割合が多く，建材由来の室内ＶＯＣ濃度が高い傾向にあることが考えられた．

我々がこれまでに測定した事例をまとめると，室内空気中の濃度が，酢酸エチルは89 $\mu g/m^3$，ブタノールは40 $\mu g/m^3$で，それらの物質が原因と考えられる不快な症状がみられており，これらの物質は比較的低濃度でも症状を引き起こすことが推察された．一方，トルエンは890 $\mu g/m^3$，キシレン類は1,100 $\mu g/m^3$でも症状がみられなかった事例があり，また，トルエンについては，臭気閾濃度が0.92ppm（3470 $\mu g/m^3$）というデータ[7]もあることから，これらの物質はある程度高濃度になってはじめて自覚症状が現れるものと考えられた．

化学物質による健康阻害の程度には，個人差が大きいことが知られており[8]，少数の事例から健康阻害を起こす閾濃度を求めることは難しい．しかし，こうした事例研究の積み重ねにより，室内空気中化学物質濃度と健康阻害の状況を明らかにしていくことは，快適で健康な居住環境を確保する上で重要と考えられた．

まとめ

1997年４月～1998年３月に東京近郊の住宅で室内空気を採取し，ホルムアルデヒド，36種類のＶＯＣ及び４種の有機リン系農薬濃度を測定した．同時に健康に関するアンケートまたは聞き取り調査を行い，室内にいて起こる不快な症状とその頻度について調べた．

不快な症状としては，頭痛，目・鼻・喉の痛みが多くあげられ，それらの頻度と室内ＶＯＣ濃度との関連について解析を行った結果，有意な相関がみられたのは，酢酸エチル($p<0.01$)，酢酸ブチル($p<0.05$)，n-ブタノール($p<0.05$)の３物質であった．有意ではなかったが，相関係数$r>0.37$で症状との関連が疑われたのは，トルエン，メチルエチルケトン，メチルイソブチルケトンの３物質であった．

文　献

1）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：快適で健康的な住宅に関する検討会議　健康住宅関連基準策定専門部会化学物質小委員会報告書，1997年6月

2）Loeser, E., Litchfield, M.H.：*Fundam. Chem. Toxocol.*, **21**, 825-832, 1983.

3）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：パラジクロロベンゼンに関する家庭用品専門家会議（毒性部門）報告書，1997年８月

4）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏他：東京衛研年報，**48**, 250－254，1997.

5）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏他：東京衛研年報，**48**, 255－260，1997.

6）American Industrial Hygiene Conference,IAQ,International Sympo., May, 21-26, St. Louis, 1989.

7）Hoshika,Y., Imamura, T., Muto, G., *et al.*：*Environmental Research*, **61**, 78-83, 1993.

8）石川哲，宮田幹夫：あなたも化学物質過敏症？，1993，（社）富山漁村文化協会，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 232-236, 1998

マウスのカビ抗原による抗体産生に及ぼすディーゼル粉じんのアジュバント作用

大山謙一*, 田口和美**, 鈴木孝人***

Adjuvant Activity of Diesel Exhaust Particles in Production of Specific Antibodies to Fungi Allergen in Mice

KEN-ICHI OHYAMA*, KAZUMI TAGUCHI** and TAKAHITO SUZUKI***

Ajuvant activity of diesel exhaust particles (DEP) was investigated on production of specific IgE antibody to fungi allergen in mice. Mice were devided into two groups, and immunized with 30 μg of fungi (*Alternaria kikuchiana*) alone as the contol and a mixture of 30 μg of fungi and 100 μg of DEP intranasally ten times at two week intervals. The specific IgE antibody responses in the mice immunized with *Alternaria* were enhanced after ten weeks in the both groups. However, the specific IgE antibody titers in the mice immunized with the mixture of *Alternaria* and DEP were always higher than those in the mice immunized with *Alternaria* alone. Moreover, significant increases of IL-2 and IL-4 secretion from splenic lymphocytes by addition of *Alternaria in vitro* were observed in the mice immunized with the mixture of *Alternaria* and DEP compared with the mice immunized with *Alternaria* alone. These results suggest that DEP have an adjuvant activity on the production of specific IgE antibodies to *Alternaria* antigen.

Keywords：ディーゼル排気粉じん Diesel Exhaust Particles, マウス mice, アルテリナリア *Alternaria*, IgE

緒　言

著者らはディーゼル粒子（DEP）の吸入により，卵白アルブミン[1]やスギ花粉抗原[2]及びダニ抗原[3]に対するIgE抗体産生が上昇することを報告してきた.今回はカビ抗原に対するIgE抗体産生に及ぼすDEPの影響について検討した.

カビは近年の密閉性のよい住宅において，室内環境汚染の一因となってきている．理由として室内の過湿があげられるが，こうした環境の住宅で増殖するカビの一つである*Alternaria*は代表的吸入性アレルゲンであり，枯草熱の起因原としても知られている[4].

カビ抗原による抗体産生におけるディーゼル排気粉じんのアジュバント作用について検討するために，カビ（*Alternaria kikuchiana*）抗原30 μgとDEP 100 μgをマウスに2週間隔で連続点鼻投与し，血清中の抗カビIgE抗体を経時的に計測した．また，血清中の抗カビIgG1抗体および感作マウスの脾臓リンパ球から放出されるinterleukin-2 (IL-2)とinterleukin-4 (IL-4)の分泌量についても測定した.

材料と方法

(1) DEP

DEPはディーゼルエンジン（NS40CGE型，ヤンマーディーゼル社）から暴露用チャンバーに導入した希釈排気ガスをハイボリュームエアサンプラー（HV-1000型，柴田科学機械工業）を用いて1000L/min流量で3時間吸引し，フィルター（2500QAT-UP, Pallflex Products Co.）上に採取した．採取したDEPは生理食塩水に10 mg/mlの濃度で浮遊させた.

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京家政大学家政学部環境情報学科　173-0003　東京都板橋区加賀1－18－1
** Tokyo Kasei University 18－1, Kaga, 1-chome, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0003 Japan
*** 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

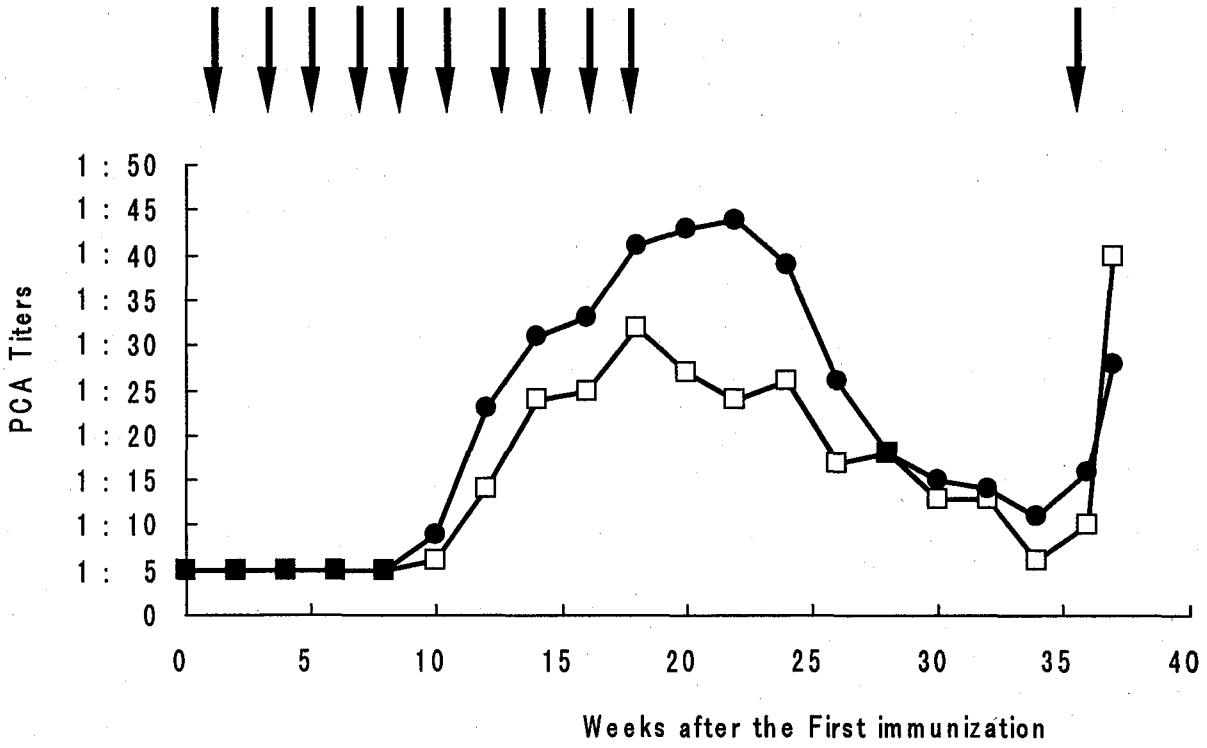


Fig. 1. Anti-Fungi IgE Antibody Responses in Mice. ↓ ; Immunization,
-□- ; Fungi (30 μg) alone, -●- ; Fungi (30 μg) plus DEP (100 μg)

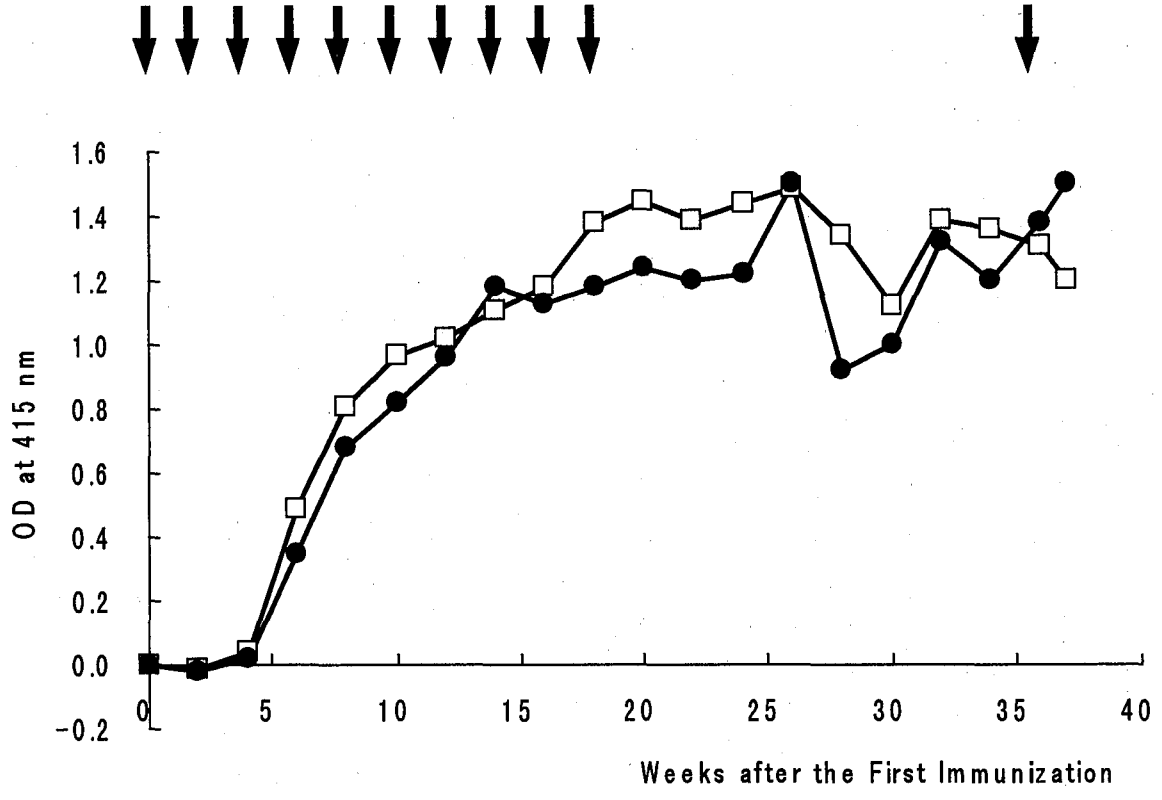


Fig. 2. Anti-fungi IgG1 Antibody Responses in Mice. ↓ ; Immunization,
-□- ; Fungi (30 μg) alone, -●- ; Fungi (30 μg) plus DEP (100 μg)

(2) 動　物

抗原感作動物としてBALB/Cマウス（日本チャールスリバー社）6週齢の雄を使用し，また，ウィスター系の雄ラットをIgE抗体価測定に用いた．

(3) 感作抗原

感作抗原として*Alternaria kikuchiana*抽出物（鳥居薬品供与）を使用し，蛋白濃度3 mg/mlになるように生理食塩水又はDEP浮遊液に溶解して感作抗原液とした．なお、抗原の蛋白濃度はmicro bicinchonic acid (BCA) protein assay reagent kit (Pierce Co., IL, USA)を用いて求めた。

(4) 抗原の感作方法

動物を30 μg抗原単独投与群（9匹）と30 μg抗原＋100 μg DEP投与群（8匹）に分けた．2週間隔で連続して18週目まで合計10回，感作抗原液10 μlをマウスの鼻孔に滴下した．なお，各群共に感作開始後36週目に30 μg抗原単独でブースターをかけた．

(5) マウス血清のIgE抗体価測定

マウスの眼窩静脈から経時的に採血し，遠心分離して抗血清を得た．抗原に特異的なIgE抗体価はラットの背側表皮を用いる受身皮膚アナフィラキシー（passive cutaneous anaphylaxis, PCA）反応によって測定した[5]．PCA抗体価は各マウスの抗血清を皮内投与後，約48時間後に400 μg抗原と1 % Evans blue/0.9% NaClの1 mlを静脈内投与して，1時間後に背中の表皮に現われるブルーのスポットが5 mm以上の場合を陽性とし，その時の抗血清の最大希釈倍数をIgE抗体価として示した．

(6) マウス血清のIgG1抗体価測定

抗原特異的なIgG1抗体価は，前報[3]に述べたようにenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法で測定した．IgG1抗体価は感作前の各マウスの血清（0週）を用いた時の比色度を差し引いた比色度で表示した．

(7) マウス脾臓リンパ球の放出するIL-2及びIL-4測定

感作したマウスから脾臓を摘出し，Hanks' balanced salt solution(HBSS)を滴下しながら，ステンレス製メッシュ(#75)を用いて，ヘラで脾臓をつぶして得られたリンパ球は前報[3]の如くLympholyte^{R}-Mを用いて分離後，HBSSで洗浄した．リンパ球をRPMI 1640（5% FCS, 7% $NaHCO_3$, 100units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin）に1 x 10^6 cells/ml濃度に再浮遊させ，その1 mlを24 well microplateの各wellに分注した。更に、最終濃度が30 μg/mlになるように抗原を加えて5日間37℃，5 % CO_2 インキュベーター中で培養し，この培養液をIL-2 ELISA kitとIL-4 ELISA kit（Endogen Inc., Ma, US）を用いて測定した．

結　果

(1) IgE抗体価

図1に示したように，抗*Alternaria* IgE抗体価は，抗原単独投与群および抗原＋DEP投与群で共に抗原感作開始後，10週目から上昇しはじめ，感作終了以降徐々に下降していった．しかし，感作開始後10週目から26週目までのIgE抗体価は，抗原＋DEP投与群のマウスの方が抗原投与群よりも高い値を示した．また，ブースターをかけた翌週の感作開始後の37週目では両群共に抗体価の上昇が認められた．

(2) IgG1抗体価

図2に示したように，両群共に感作開始後6週目で抗カビIgG1抗体価の上昇が見られ，感作終了後も同程度の抗体価を維持する傾向にあった．また，それぞれの群における抗体価に差は認められなかった．

(3) 脾臓リンパ球からのIL-2分泌

図3に示したように，抗原単独投与群のマウス脾臓リンパ球からのIL-2分泌量よりも抗原＋DEP投与群のマウス脾臓リンパ球からのほうがIL-2を有意に多く分泌した．

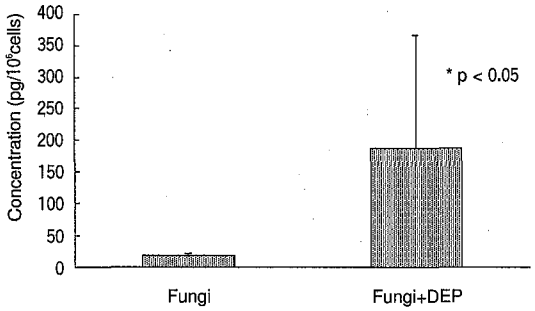


Fig. 3. Secretion of IL-2 from Spleen Lymphocytes in Mice Treated with Immunization. I; Standard Deviation, p; t-test.

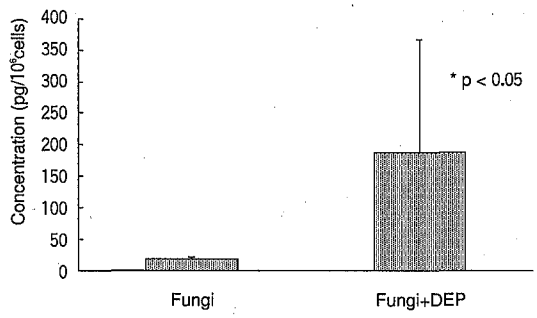


Fig. 4. Secretion of IL-4 from Spleen Lymphocytes in Mice Treated with Immunization. I; Standard Deviation, p; t-test.

(4) 脾臓リンパ球からのIL-4分泌

抗原単独投与群のマウス脾臓リンパ球からのIL-4分泌量よりも抗原＋DEP投与群のマウス脾臓リンパ球のほうがIL-2を有意に多く分泌していた（図4）.

考　察

抗原として使用した*Alternaria*は，スギ花粉やダニと同様に環境中に存在している．1967年から1987年までの都内の某病院に受診または入院したアレルギー患児の約15％が皮内反応で陽性を示す報告[6]があり，中でも*Alternaria*等のカビは喘息の原因抗原として重要視されている[7].

今回の実験から抗原30 μg 10回の投与でIgE抗体価の上昇が見られたが，抗原＋DEP投与群のほうがより高い抗体価を示したことから，*Alternaria*抗原によるIgE抗体産生において，DEPがアジュバント作用を示すことがわかり，*Alternaria*によるIgE抗体産生亢進によるI型アレルギーをDEPは増強させるものと考えられる.

前報[2]では，抗原提示細胞であるマクロファージをDEPで刺激して培養すると用量依存的にIL-1分泌量の増加が認められ，また，ダニ抗原とDEPで感作されたマウスの脾臓リンパ球からのIL-4分泌量はダニ抗原単独で感作されたものより増加が認められている[3]．図3と図4に示すように，*Alternaria*に感作されたマウスでも，DEPを加えて感作したマウスの脾臓リンパ球のほうが抗原単独刺激によるものよりIL-2とIL-4分泌量が有為に多く認められた．IL-1はヘルパーT細胞を活性化し[8,9]，ヘルパーT細胞から産生されるIL-4は抗体を産生するB細胞の分化・増殖に重要な働きを示すこと[10,11]，また，IL-2とIL-4がT細胞の増殖に関与すること[12]が報告されている．今回の*Alternaria*の感作の場合でも，DEP添加によってマクロファージのIL-1分泌量の亢進した可能性が高く，また，リンパ球からのIL-2とIL-4分泌量の亢進が認められていることから，IL-4を産生するT細胞の増殖増進とIL-4などによるB細胞の増殖・分化を促進したものと考えられ，IgE抗体産生においてDEPのアジュバント作用を示しているもの思われる．また，Sanchez *et al.*[13]はヒトの鼻粘膜にDEPを投与して，鼻腔洗浄細胞におけるIL-2やIL-4などの産生に関与するmRNAの発現を検討したところ，明らかなmRNA発現の増加が認められたことを報告していることから，今回も抗原と共に添加されたDEPによって，IL-2やIL-4などを産生するmRNA発現が促進された可能性も考えられる.

一方，図2に示すように，抗*Alternaria* IgG1抗体産生においては，両群ともIgG1抗体の産生はIgE抗体産生された時期より早期に出現しているが，DEPの添加による明らかなアジュバント作用は認められなかった．この結果は，ダニを抗原に用いた時の抗体産生の結果[3]とは異なっている．この現象は恐らくIL-4によるIgG1とIgE抗体産生における制御が異なるためによるものと思われる．即ち，マウスのB細胞をIL-4で刺激した場合に，IgE抗体の産生に必要なIL-4濃度レベルはIgG1抗体産生に必要なIL-4濃度レベルより100倍以上であること，更に，IL-4添加でIgE産生の開始より早期にIgG1抗体産生が開始することが報告[10]されていることから考えると，IgG1抗体は低レベルのIL-4分泌で産生されるが，DEP添加群では図4に示すように，IL-4分泌量における標準偏差値が大きいことから見て，両群で差が明確にならなかったものかも知れない.

感作36週目にかけたブースターにより37週目に抗*Alternaria* IgE抗体価の上昇が見られたことから，感作に用いた*Alternaria*抗原を記憶しているメモリーT細胞の存在が推測される.

以上の結果から，DEPはこれまでに報告したスギ花粉抗原，ダニ抗原ばかりでなく，カビ抗原を感作した場合にも明らかにIgE抗体産生の亢進をもたらしたことから，喘息やアレルギー性鼻炎などのI型アレルギーにおける憎悪因子として働くものと思われる.

文　献

1）Suzuki, T., Kanoh, T., Kanbayashi, *et al*：*Jpn. J. Allergol.*, **42**, 963-968, 1993.

2）Kanoh, T., Suzuki, T., Ishimori, M., *et al*：*J. Clin. Lab. Immunol.*, **48**, 133-147, 1996.

3）Suzuki, T., Kanoh, T. Ishimori, M., *et al*：J. *Clin. Lab. Immunol.*, **48**, 187-199, 1996.

4）信太隆夫：アレルギー，**41**，1441-1448，1992.

5）Ovary, Z., Caiazza, S. S. and Kojima, S.：*Inter. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **48**, 16-21, 1975.

6）山口博明：アレルギー，**42**，830-839，1993.

7）可部順三郎：アレルギーの臨床，**9**，785-786，1989.

8）Lichtman, A. H. Chin, J., Schmidt, J. A. and Abbas, A. K.：*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9699-9703, 1988.

9）Araneo, B. A., Dowell, T., Moon, H. B. and Daynes, R. A.：*J. Immunol.*, **143**, 1737-1744, 1989.

10）Snapper, C. M., Finkelman, F. D. and Paul, W. E.：*J. Exp. Med.*, **167**, 183-196, 1988.

11）Coffman, R. L., Seymour, B. W. P., Lebman, D. A., *et*

al. : *Immunol. Rev.*, **102**, 5-28, 1988.

12) Spits, H., Yssel, H., Takebe, Y., *et al.* : *J. Immunol.*, **139**(4), 1142-1147, 1987.

13) Sanchez, D. D., Tsien, A., Casillas, A., *et al.* : *J. Allergy Clin. Immunol.*, **98**, 114-123, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 237-241, 1998

ディーゼル排ガス暴露ラットにおける血液ガス変化と気管支肺胞洗浄液の細胞成分の変動

大澤誠喜[*1], 池田眞悟[*1], 渡邊伸枝[*1], 竹内正博[*1], 慶長直人[*2], 藤沢道夫[*2], 三野健[*3], 森憲二[*3]

Effect of Diesel Exhaust on Changes of Arterial Blood Gases and Broncho Alveoar Lavage Fluid of Rats

MASANOBU OHSAWA[*1], SHINGO IKEDA[*1], NOBUE WATANABE[*1], MASAHIRO TAKEUCHI[*1], NAOTO KEICHOH[*2], MITHIO FUJISAWA[*2], KEN SANNO[*3] and KENJI MORI[*3]

Male Fischer rats, 5 weeks old, were exposed to diesel engine exhaust (DE) for 12 months in order to examine changes in blood gas and the cell components of Broncho-Alveolar-Lavage-Fluid(BALF).

The animals were divided into 3 groups; L group [particles : 0.41±0.19mg / m^3, NO_2 : 0.44±0.08ppm], ND group [particles : 0.02mg / m^3 under, NO_2 : 0.02±0.02ppm].

The animals were anesthetized intra-peritoneally with Nembutal and the arterial blood was obtained via the right femoral artery for blood gas analyses and the BALF was prepared from lung excised after sacrifice by incision of abdominal aorta.

The arterial PO_2 was lowered after 12 months exposure for the L group, but not significant.

The increased tendency of neutrophils in BALF in the L group was also observed after 12 months exposure.

The results suggest that these changes might be induced due to the particles in DE in a dose or duration-dependent way as in the H group in the former report.

Keywords：ディーゼル排ガス diesel engine exhaust,ラット rat，血液ガス arterial blood gas，気管支肺胞洗浄液(BALF)broncho-alveolar-lavage-fluid，マクロファージ macrophage，好中球 neutrophil，粒子成分 particles of DE

はじめに

ディーゼル排ガス（以下DE）の肺への影響について，従来から長期間に亘る排ガス暴露をされたラットを用いて実施してきた．その中で暴露によって気道粘膜や肺胞細胞への傷害作用により，ガス交換変化と気道分泌物中の遊走細胞の変動が観察され，呼吸機能障害と気道肺胞系における免疫機能障害を明らかにすることができた[1,2,3,4]．

すなわち，これまでの研究からディーゼル排ガスの粒子状成分が，主として体重変化や成長といった代謝系全体への障害を及ぼし，ガス状成分は主として気道粘膜細胞や遊走細胞系に対して傷害作用を及ぼすことが明らかになった．そこで，次の段階としてはこれまでより低濃度のディーゼル排ガス濃度と，その脱粒子成分条件とを設定し，同様の動物実験での短期長期暴露の観察結果を通して実際のディーゼル排ガス環境下にある都市の環境へ一層近づけることでその影響を考察することができると考えた．

今回の報告はラットをこれまでより低い濃度のディー

＊1 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊1 The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊2 東京大学医学部第3内科
＊3 東邦大学医学部大橋病院呼吸器診断部

Table 1. Experimental Conditions of Diesel Engine Exhausts

	NO(ppm)	NO_2(ppm)	SPM(mg/m^3)
C	0.68±0.14	0.02±0.02	<0.02
ND	4.61±1.34	0.41±0.17	<0.02
L	3.98±6.52	0.44±0.19	0.41±0.08

(mean±SD)

Rats were exposed for 7 hours a day in each 5 days a week for 3, 6 and 12 months. The condition of 3 groups were following; L for diluted gas of whole exhausts, ND for non-dust filtered with HEPA-filter and C for room air.

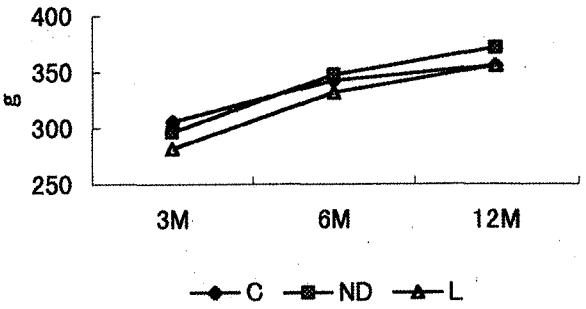


Fig. 1. Changes of Body Weights of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months
There were no significance between each group in each duration.

Table 2. Whole Data of Changes of Body Weights of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months.

	3M	6M	12M
C	305.7±16.6	341.9± 9.9	355.6±18.2
ND	296.8± 9.8	347.2±21.9	371.1±31.5
L	281.7± 6.9	331.5± 5.9	355.3±21.4

(mean±SD)

There were no significance between each group in duration.

ゼル排ガス条件下に12ヶ月暴露してその体重変化からみた成長への影響，血液ガス変化，および気管支肺胞洗浄液（BAL液）の細胞成分の変化を検討したものである．

方　法

1．実験動物と暴露条件

実験動物はF-344/DuCrjフィッシャーラット雄，4週令45匹（日本チャールスリバーK.K)を1週間の予備飼育

Table 3. Whole Data of Changes of Blood Gas of Rats Exposed to Diesel Exhausts for 3, 6 and 12 Months

		PO_2(mmHg)	pH	PCO_2(mmHg)	HCO_3(mmol/l)	BE(mmol/l)	$AaDO_2$(mmHg)
3M	C	84.8±11.1	7.43±0.01	41.6±1.7	26.6±1.1	2.5±1.0	16.8±6.6
n=5	ND	80.5± 2.7	7.45±0.03	40.6±3.3	27.2±1.7	3.6±1.6	18.8±6.5
	L	82.0± 7.7	7.43±0.03	44.2±3.2	28.5±1.6	4.0±1.5	12.8±6.9
6M	C	77.3± 5.8	7.44±0.04	41.0±3.9	27.4±2.7	3.6±2.8	21.5±2.9
n=5	ND	83.9± 1.6	7.45±0.03	42.7±4.3	28.7±2.1	4.7±1.8	12.8±5.3
	L	81.1± 4.6	7.45±0.01	44.6±4.4	30.0±3.1	5.8±2.5	12.3±6.8
12M	C	79.9±10.4	7.41±0.02	45.2±3.0	27.9±2.5	3.1±2.4	13.5±7.3
n=5	ND	78.2± 6.4	7.42±0.03	45.9±2.3	28.5±1.4	3.6±1.6	14.6±7.0
	L	77.1± 5.0	7.43±0.02	46.2±1.9	29.9±1.5	5.3±1.5	15.1±4.1

There were no significance between each group in each duration. (Mean±SD)

Table 4. Whole Data of Changes of BALF of Rats Exposed to Diesel Exhausts for 3, 6 and 12 Months

		Total(×10^4)	Macrophages(×10^4)	Neutrocytes(×10^4)	Lymmphocytes(×10^4)
3M	C	46.18± 5.70	43.40± 5.66	0.10±0.20	0.40±0.40
n=5	ND	53.94±25.62	53.40±25.20	0.02±0.04	0.52±0.61
	L	39.00±18.81	38.68±18.69	0	0.20±0.39
6M	C	8.34± 6.08	7.58± 5.60	0.14±0.11	0.05±0.05
n=5	ND	27.25±15.07	23.93±14.56	0.95±0.48	0.75±0.29
	L	13.14±22.85	9.70±16.34	0.58±0.91	0.50±0.95
12M	C	88.00± 9.35	78.80± 8.46	2.36±2.20	3.54±0.66
n=5	ND	53.04±14.35	48.12±13.55	1.24±0.62	1.54±0.75
	L	87.20±54.39	76.92±48.92	3.04±3.83	6.46±6.97

There were no significance between each group in each duration. (Mean±SD)

の後，対照群（C群），粒子状物質を除いた低濃度除塵群（ND群）及び全排ガスを希釈した全ガス低濃度暴露群（L群）の3群に分けて暴露を行った(表－1)．動物は，容積1.6m³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した．なお，飼料（NMF繁殖用，オリエンタル酵母K.K）及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排気量309ccのディーゼルエンジン（NFAD6型ヤンマーディーゼルK.K）を用い，燃料は軽油（JIS2号相当，日本石油K.K）を，潤滑油はCC級（日本石油K.K）を使用，暴露時間は1日7時間，週5日間とした．

暴露ガスはL群においては圧縮空気で希釈し直接チャンバー内に導入した，ND群はHEPAフィルター（0.05μ 99.9998%カット　日本無機）を用い粒子状成分を除いたガス体のみを導入，C群はHEPAフィルターを通した室内気をソーダライム（和光純薬）と2種類の活性炭(HC-6，SX，ツルミコールK.K）層を通過させ，更にHEPAフィルターを通してチャンバー内に導入した．

チャンバー内の暴露ガス濃度測定は窒素酸化物測定器(8440 Monitor Lab.Co.)，及び粉塵濃度計（β線式質量濃度計ＢＡＭ-102　柴田科学機器KK）を用いた．窒素酸化物濃度及び粉塵濃度の平均値を表1に示した．

2．血液ガス測定

動物にネンブタール（アボットラボラトリース0.5ml/kg）を腹腔内に投与，深麻酔下で仰臥位固定した．大腿部の小切開によって大腿動脈を露出させて併走する股静脈と大腿神経とを分離した．採血は1cc注射器に25ゲージ針を装着，筒内の死腔を充たす程度のヘパリンを加え，注意深く気泡を除き，拡大鏡下に動脈血0.5ccの採血を行い10分以内に全自動動脈血ガス分析器(Corning175）にてガス分圧を測定した．測定値はpH，酸素分圧(PaO_2)，炭酸ガス分圧($PaCO_2$)，重炭酸イオン(HCO_3)，過剰塩基（BE）についてヒト血に準じて得られた測定値をそのまま使用した.また肺胞気動脈血ガス分圧較差（$AaDO_2$）は次の計算によって得られた値を使用した．

$AaDO_2=[150-(PaCO_2/0.8)]-PaO_2$

なお測定値はすべて37℃に自動補正されている．

3．BAL液採取とその細胞分析

動物を腹腔深麻酔後，腹部正中切開によって，腹部大動脈より脱血死させた後，胸郭の正中切開により頚部気管と心肺とを迅速に摘出した．気管に金属カニューレを装着した注射器外筒を挿入，カニューレを結紮固定し生理的食塩水8mlを静かに注入する．注入後カニューレ

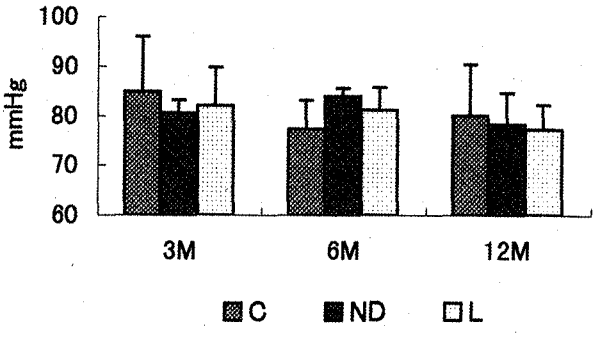


Fig. 2. Changes of PO_2 of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months PO_2 was decreased in L dompared with C at 3 months or 12 months but with no significance.

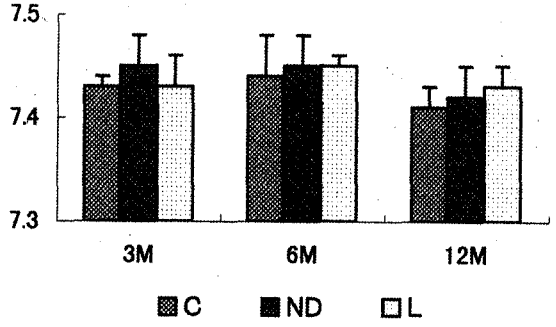


Fig. 3. Changes of pH of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months

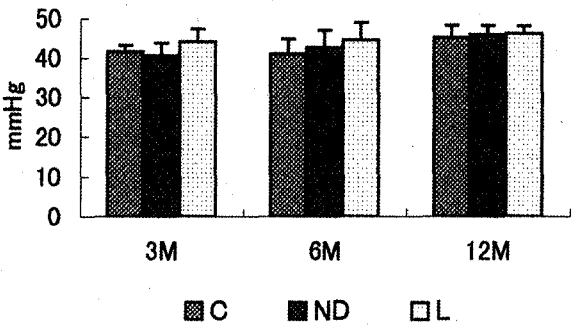


Fig. 4. Changes of PCO_2 of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months

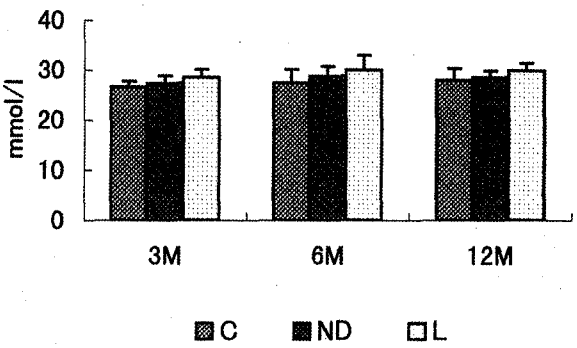


Fig. 5. Changes of HCO_3 of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months

から外筒を外し，内筒を装着しカニューレにつなぎ静かに吸引し，生理食塩水を回収，採取する．この操作を3回繰り返して得た液をすべて混和して室温下に静置し約6時間以内に分析に供した[2]．

採取したBAL液を500rpm，5分間遠沈し，沈査の細胞成分を脱脂乾燥したスライドグラスに塗抹固定し，ギムザ染色を施した後，細胞分画をカウントした．又，BAL液の粘液成分を血球計算盤に導入してFuchs-Rosenthal法によってカウントした．

結　果

1．体重変化

3ケ月，6ケ月，12ケ月目における各群の体重変化はL群の3ケ月目においてやや低下の傾向を示したほかは各暴露期間において有意な差は認められなかった．（表2，図1）

2．動脈血ガス分圧

PO_2は3ヶ月暴露においてND群だけが低い傾向，更に12ケ月においてもND，L群がC群に比べてそれぞれ低下の傾向を示したが，6ケ月においては不定の結果を示した（図2）．pH（図3）や$PaCO_2$（図4）は有意な差を示さずHCO_3（図5），BE（図6）においても正常範囲内での値を示した．

一方$AaDO_2$（図7）は12ケ月においてL群が低下の傾向を示したが有意な差は認められなかった．

3．BALFの細胞分析

細胞数（図8）の変化は各群において6ケ月が3ケ月よりも総数は少なく，12ケ月では3ケ月よりも再び増加を示していた．しかし各暴露期間における各群の比較では，細胞総数では特に暴露群において増加を示すとはいえなかった．

細胞成分の変動では，BAL液の細胞の中でマクロファージが90%以上を占めることにかわりはないが，その暴露における変動からみると各暴露期間においても12ケ月になるとND群がL群やC群よりも低い他は特に差が見られなかった（図9）．

一方好中球(図10)とリンパ球（図11）との変動についてはそれぞれ暴露期間が増加すると細胞分画も増加すること，特に12ケ月では増加を示すが，C群でも期間によって増加を示した．

考　察

体重の変動 及び短期暴露（3ケ月と6ケ月）の血液ガスの変動に有意な差を認められず，又，12ケ月の長期暴露においてもND群やL群で低い傾向を示すものの有意な差とは言えず，更に例数と期間とを延長して観察し

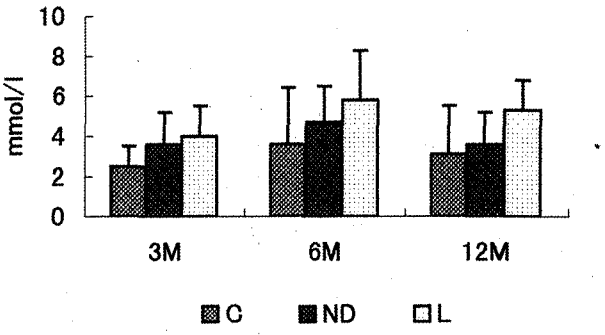


Fig. 6. Changes of BE of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months

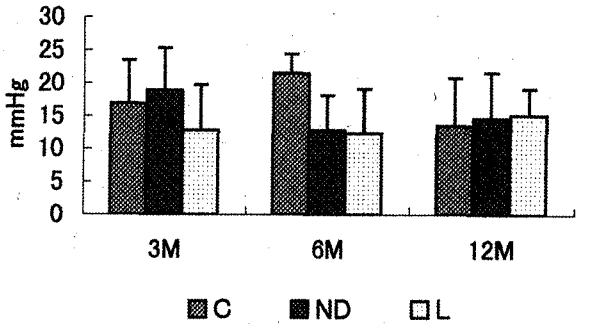


Fig. 7. Changes of $AaDO_2$ of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months

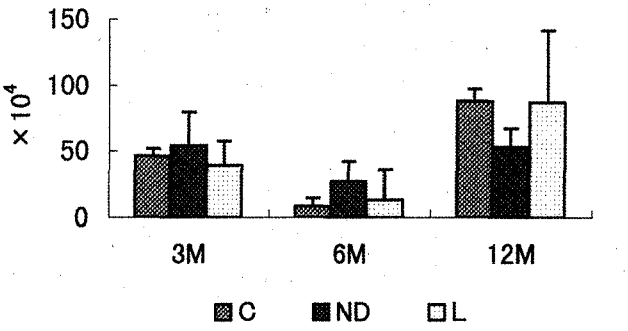


Fig. 8. Changes of the Cell of BALF of Rats Exposed for 3, 6 and 12 Months The cell counts of 12 months were increase about twice as 3 months

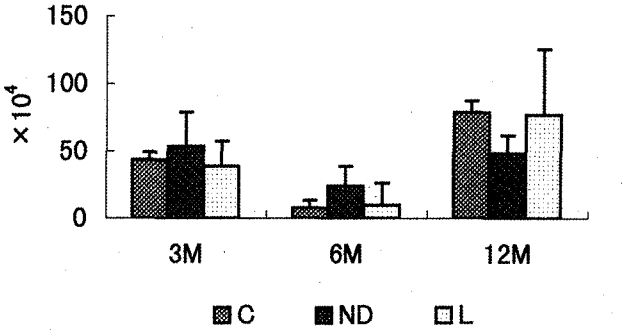


Fig. 9. Changes of Body Weights of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months Changes of Macrophage of BALF of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months Macrophage was over 90 percent of total cell counts of BALF in each group

ていくべきものと考えられた．$AaDO_2$においても同様であった，この点は従来の高濃度群での差異からガス交換障害は粒子成分に依存することを示唆していると考えられる．

BAL液の細胞数と細胞分画は6ケ月を除き暴露期間と共に増加を示したが，C群においても12ケ月ではほぼ2倍に増加した．それを考えるとマクロファージをはじめリンパ球，好中球の増加もそれに応じた変化とみなすことができそうである．

前報[4]の細胞数の成績でも12ケ月と24ケ月とではC群で2倍に増加している（12ケ月:179.8±20.7，24ケ月：341.3±15.2）なかで、マクロファージの変動は余り見られず、そのかわり好中球がH群（24ケ月）で増加を示した．それから考えても今回の観察で細胞数は12ケ月で増加し，かつ好中球がL群でやや増加が目立ったことは暴露の粒子成分が何らかの炎症性変化をもたらすことを示す観察所見と考えられる．濃度依存性か期間依存性かについても今後さらに観察をすすめることが必要と考えられた．

ま と め

ラットにディーゼル排ガスの低濃度条件下で12ケ月間まで暴露して得られた観察結果は次の通りであった．

1．ガス交換障害は12ケ月でL群で低下の傾向を示すものの有意な変動を示さなかった．

2．BAL液の細胞成分分析では，細胞数が対照群でも期間と共に増加する中で，分画ではマクロファージの変動が細胞数増加と並行して増加を示した．又，好中球増加がL群で12ケ月にやや目立つことが注目された．

以上の観察結果から12ケ月でのL群においてPaO_2が低い傾向が，また同じくBAL液中の好中球が増加している傾向がみられることから，低濃度のディーゼル排ガスの粒子状成分がガス交換障害を示す可能性，又，何らかの炎症性影響がBAL液の成分変動を与えている可能性が示唆された．今後はこれらの影響が更に長期暴露によって期間依存性にも影響を与えるかについて今後の検討課題を残した．

謝 辞

本研究を進めるにあたり，血液ガス測定に便宜を与えていただいた，東邦大学大橋病院臨床検査医学教室（橋詰直孝主任教授）の検査室諸氏の御協力，及びBAL液の細胞分析と染色とにおいて株式会社三菱化学ビーシーエルの御協力を得たことに対して感謝致します．

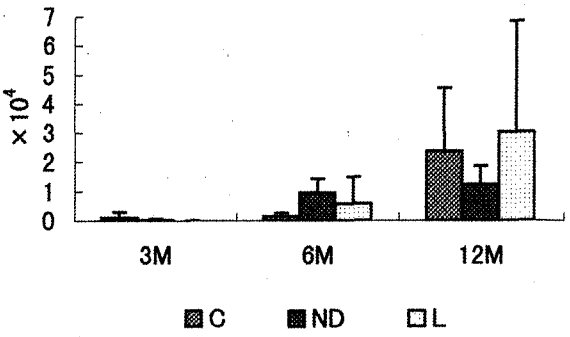


Fig. 10. Changes of Neutrophil of BALF of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months Neutrophil was less than 10 percent of BALF but increased in L group after at 12 months exposure without any significance.

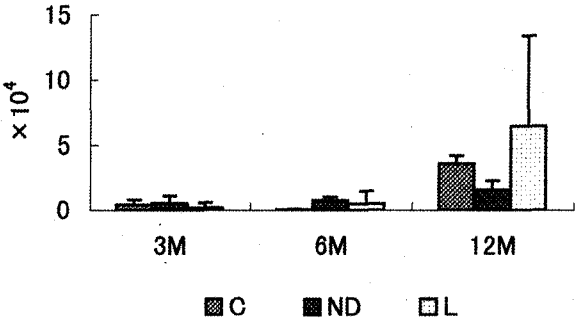


Fig. 11. Changes of Lymphocyte of Rats Exposed to DE for 3, 6 and 12 Months Lymphocyte was less than 5 percent of BALF but increased in L group after at 12 months exposure without any significance.

文 献

1）東京都衛生局編：大気汚染健康対策に係る基礎的実験的研究報告書(平成8年)，1996.

2）大澤誠喜，池田真悟，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：東京都衛研年報，**47**，248-251，1996

3）大澤誠喜，池田真悟，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：東京都衛研年報，**47**，244-247，1996

4）大澤誠喜，池田真悟，渡辺伸枝，土屋悦輝，鈴木孝人，根本今日子，三野 健，森憲二：東京都衛研年報，**48**，261-265，1997

5）金子 保：呼吸，3，720-725，1984

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

毒性に関する研究報告として10編が掲載されており，その内訳は，食品添加物や天然添加物の投与による13週間の亜慢性毒性試験が３編，食品添加物投与による発生毒性試験が１編，食品添加物または天然添加物による染色体異常と変異原性に関するものが３編，防黴剤・保存剤による細胞毒性についてが１編，天然添加物による催奇形性に関するものが１編，電子顕微鏡観察の改良法についてが１編が含まれている．

発芽防止剤のクロルプロファム（0.75，1.5，３%濃度）を含む餌で雌雄のラットを13週間飼育したところ，投与群の雌雄のラットに，顕著な脾臓肥大と肝臓肥大，血液毒性（赤血球数，血小板数，ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低下と白血球数及びメトヘモグロビン値の上昇等）が濃度依存的に認められた．病理学的には，脾臓に顕著な鬱血，ヘモジデリン沈着と髄外造血の増加が見られ，また，骨髄に造血細胞の過形成が認められている．即ち，クロルプロファムの亜慢性混餌投与により，主に，血液に毒性作用を及ぼすことが報告されている．

天然添加物のラック色素（0.313，0.625，1.25，2.5，５%濃度）を雌雄のラットに混餌投与法によって13週間飼育したところ，血液，血清生化学検査及び臓器重量に変化は見られないが，組織学的には耳下腺の肥大と耳下腺腺房細胞の腫大等，また，腎臓の尿細管での石灰沈着等の変化が雌雄のラットで濃度依存的に見られることを報告している．

天然添加物のしらこたん白（0.625，1.25，2.5，５%濃度）を雌雄のラットに混餌投与法によって13週間飼育したところ，白血球数の減少，血清中の酵素活性の低下や脂質濃度の減少，肝重量の減少，肝細胞の萎縮等が認められたが，それらは比較的軽度の変化であり，今回の実験条件下では顕著な毒性は認められなかったことが報告されている．

食品添加物の防黴剤であるイマザリル（0.024，0.06，0.15%濃度）を混餌法により，妊娠マウスに対して４日齢から18日齢までのあいだ投与後に解剖し，着床数，吸収胎仔数，生存及び死亡胎仔数を計測したところ，異常胎仔数は中濃度投与群で増加が見られ，また，内反足及び内反手の胎仔数も中・高濃度投与群で増加が見られたが，これらの外表奇形の発現頻度は自然発生率の範囲内であり，また，その他の測定項目にイマザリルによる影響は見られなかったことが報告されている．

ハムスター由来のCHO-K1細胞を用いて，食品添加物であるピペロニルブトキシドのDNAへの傷害作用と細胞毒性を検討したところ，0.25mMまたは0.3mM濃度で３時間処理すると，DNAの傷害を示す姉妹染色体分体交換の頻度は増加したが，染色体異常は認められなかった．また，ピペロニルブトキシドは0.3mM濃度以上でコロニー形成能における細胞増殖能は強く抑制され，それらの細胞ではアポトーシスを示す像が認められることが報告されている．

９種類の天然添加物（オリゴガラクチュロン酸，くん液，コウジ酸，セイヨウワサビ抽出物，タンニン酸，チャ抽出物，モウソウチク乾留物，モウソウチク抽出物，ユッカフォーム抽出物）を500，1,000，2,000mg濃度でハムスターにそれぞれ単回の経口投与後，24時間目と48時間目に屠殺し，骨髄細胞の染色体異常の誘発の有無を検討したところ，いずれの場合も染色体異常の誘発性が認められなかったことが報告されている．

11種類の天然添加物についてエームス試験を実施したところ，コウジ酸，ベニバナ黄色素，オリゴガラクチュロン酸，カラシ抽出物，セイヨウワサビ抽出物，チャ抽出物，モウソウチク乾留物，モウソウチク抽出物での８種類の天然添加物に変異原性が認められたが，くん液，タンニン抽出物及びユッカフォーム抽出物の３種類には変異原性が認められなかったことを報告している．

防黴剤・保存剤のp-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類（パラベン）のラットの遊離肝細胞に及ぼす作用を検討している．プロピルパラベンは濃度（0-2mM）と反応時間（0-3時間）に依存して細胞死をもたらすこと，更に，肝細胞に各種のパラベンを２mM濃度で１時間反応させて，細胞死，ＡＴＰ濃度，アデニンヌクレオチド濃度及びミトコンドリア膜電位を指標にしてパラベンの作用を検討したところ，エチル化体とメチル化体は比較的毒性が弱く，プロピル化体，ブチル化体及びイソプロピル化体は強い毒性を示した．即ち，パラベンは肝細胞のＡＴＰ濃度，アデニンヌクレオチド濃度，ミトコンドリア膜電位の低下を伴う細胞死を誘導し，その毒性の強さはアルキル側鎖の延長と相関することを報告している．

天然添加物のムラサキトウモロコシ色素による催奇形性の有無について全胚培養法を用いて，マウスの胚子に及ぼす影響について検討している．妊娠８日目に子宮から胚子を摘出し培養を開始した．24時間後にムラサキトウモロコシ色素（125，250，500μg/ml濃度）を投与して，24時間後または48時間後に発育の指標となる卵黄嚢径，卵黄嚢血液循環，胚子頭臀長，胚子体節数，心拍数及び胚子の型について観察したところ，卵黄嚢径，胚子体節数，胚子頭臀長及び胚子の型では対照群と比べて有意な差は認められなかったが，500μg/ml投与群で卵黄嚢血液循環良好の胚子と心拍数の減少傾向が見られた．また，異常胚子はいずれの群でも認められなかった．即ち，高濃度の投与ではマウス胚子に発育遅延を起こすが，催奇形性作用は認められなかったことを報告している．

透過電顕の観察には，通常は試料を載せるための格子状のグリッドを使用するが，この格子が観察部位の妨害や有効視野を狭くすることがある．この様なことを避けるために数種類の特殊な単孔グリッドを利用して観察すると，広視野で良好な透過電顕像と走査電顕像が得られたことが報告されている．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 49, 245-254, 1998

クロルプロファム（CIPC）のラットにおける亜慢性毒性試験

藤谷知子*, 多田幸恵**, 野口アパレシータ千歳*, 米山允子*

Subchronic Toxicity of Chlorpropham(CIPC) in F344 Rats

TOMOKO FUJITANI*, YUKIE TADA**, APARECIDA TITOSE NOGUCHI* and MASAKO YONEYAMA*

Sub-chronic toxicity of Chlorpropham (CIPC), a widely used sprout suppressant, was investigated in F344 rats. Male and female rats were given diet containing 0 (control), 0.75, 1.5 or 3.0% of CIPC for 91 days. In male and female rats given CIPC, the marked splenomegaly and hepatomegaly, the decrease of red blood cell count, hemoglobin concentration, hematocrit or mean corpuscular hemoglobin concentration and the increase of methemoglobin level, mean corpuscular volume or mean corpuscular hemoglobin were dose-dependently observed. White blood cell count was significantly increased in male and female rats given 3.0% CIPC in the diet. Platelet count was significantly decreased in male and female rats given 1.5 or 3.0% CIPC in the diet. In the red pulp of the spleen of male and female rats given CIPC, a marked congestion was observed and hemosiderin deposition and extramedullary hematopoiesis were increased. Also, fibrosis in the capsular and subcapsular area and atrophy of lymphoide were dose-dependently observed in the spleen of male and female rats given CIPC. In the femoral bone marrow of male and female rats given CIPC, hematopoietic cell hyperplasia was observed.

The subchronic administration of CIPC in the diet may have toxic effects on erythrocytes of male and female rats.

Keywords：クロルプロファム Chlorpropham, 亜慢性毒性 subchronic toxicity, ラット rats, 血液毒性 hemotoxicity

緒　言

クロルプロファム［Isopropyl-N-（3-chlorophenyl）carbamate：CIPC］は，諸外国で，ポストハーベスト農薬として貯蔵中の馬鈴薯の発芽防止に用いられ，馬鈴薯へのクロルプロファムの残留が報告されている[1-6]．我が国における残留基準は，馬鈴薯で50ppm，その他の農産物で0.05から0.50ppm，一日許容摂取量は0.1mg/kg体重である．

クロルプロファムの経口半数致死量（LD50）は，ラットで3.3－4.4g/kg体重，マウスで3.7－4.5g/kg体重である[7]．クロルプロファムは，ラット・犬[8]・ハムスター・マウス[9]において，発ガン性は認められていない．クロルプロファムの代謝・体内分布・排泄については，ラットで報告されている[10-12]．樺島らは，経口半数致死量の報告と併せて，クロルプロファムの急性経口投与後2週間で，ラットの肝臓と脾臓が腫大し，赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値が減少したと報告している[7]．

クロルプロファムの経餌亜慢性毒性の詳しい報告あるいは亜慢性投与による血液学的変化についての報告は，いまだ無いので，ラットを用いて13週間の経餌亜慢性毒性試験を，血液学的変化に重点を置いて行った．

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科

Table 1. Food and chemical consumption of male and female rats given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

	Male				Female			
CIPC in diet	0%	0.75%	1.5%	3.0%	0%	0.75%	1.5%	3.0%
Daily food consumption(g/rat)								
on week 1	10.7±1.2	11.3±1.7	10.8±0.6	11.1±2.5	10.1±0.6	9.8±0.4	9.7±0.8	9.4±0.4
3	12.6±2.3	13.2±2.2	13.4±1.7	12.2±1.4	8.7±0.9	8.2±1.0	7.7±1.0	9.8±0.8
5	11.6±2.5	13.4±1.1	13.9±1.9	13.2±2.3	8.8±0.8	9.2±0.3	8.7±1.3	8.1±1.3
7	13.3±1.7	14.9±1.2	14.1±1.9	14.5±1.0	8.7±0.3	9.2±0.5	9.1±1.6	8.5±1.5
11	14.0±1.1	14.8±0.7	16.3±1.0**	15.4±1.2	8.0±0.7	8.5±0.8	8.1±1.3	8.8±2.1
Total food consumption(g/rat)								
	1060±135	1259±84	1284±106	1248±108	807±26	821±26	813±70	782±95
Total chemical consumption(g/rat)								
		7.94±3.61	19.26±1.59	37.43±3.25		6.16±0.20	12.19±1.05	23.47±2.87

Values are mean±SD for 6 rats in each group and those marked with asterisks differ significntly from those of the corresponding control(0%) group (** $P<0.01$).

実験材料と方法

被検物質と実験飼料：保土ヶ谷化学㈱より購入したクロルプロファム（lot No.1334）は，純度99.7%以上で，高速液体クロマトグラフィー分析では，3-クロロアニリンを含まなかった．クロルプロファムは，標準粉末飼料（ＣＥ－２/日本クレア㈱製）に加えて良く混和した後，固形成形した．その他の試薬は，可能な限り特級品を用いた．

実験動物および飼育環境：日本チャールスリバー（株）より雌雄のフィッシャーラット（F344/DuCrj）を４週令で購入し，１週間の予備飼育後，すなわち５週令で実験に用いた．飼育室の条件は，多田ら[13]と同じである．

試験方法：ラットは，雌雄各10匹を含む４群に分け，クロルプロファムを，0%（対照群），0.75%，1.5%あるいは3.0%含む実験飼料で13週間飼育した．すべてのラットの，死亡の有無の観察を毎日，症状観察を毎週，体重測定を０，１，２，３，５，７，９，11および13週目に行った．また，各群６匹のラットについて，摂餌量の測定を１，３，５，７，11週目に行った．

投与期間終了時に，ラットは，エーテル麻酔下で頚静脈より採血した後，断頭屠殺し，解剖した．肝臓・腎臓・脾臓・胸線・心臓・肺・すい臓・副腎・胃・脳・膀胱・精巣・前立腺・卵巣・子宮・大腿骨を摘出し，肉眼で大きさに変化のあった肝臓・腎臓・脾臓・胸腺の重量を測定し，摘出した全ての臓器を10%中性ホルマリン緩衝液で固定した．

血液学的検査：新鮮なエチレンジアミン四酢酸二カリウム塩処理血を用いて，Sysmex Ｅ－4000（東亜医用電器㈱）で，Table 4にあげた指標を測った．メトヘモグロビン量は，Harrison and Jollow[14]の方法で測定し，総ヘモグロビン量中のメトヘモグロビンの百分率（%）で表した．赤血球像・白血球像および白血球百分比を，メイーグリュンワルト・ギムザ染色した血液塗末標本で観察した．

血漿生化学検査：ヘパリン処理血より分離した血漿を－80度で保存した後，日立自動分析機7150で，Table 5にあげた指標を測定した．

病理学的検査：臓器は定法に従って処置し，ヘマトキシリン・エオジン染色後，光学顕微鏡で観察した．脾臓・肝臓・腎臓に沈着した色素の同定のためには，Schmorl法とベルリンブルー法で染色した．

統計解析：対照（０%）群と投与群間の有意差の検定には，Scheffeの多重比較検定[15]を用いた．

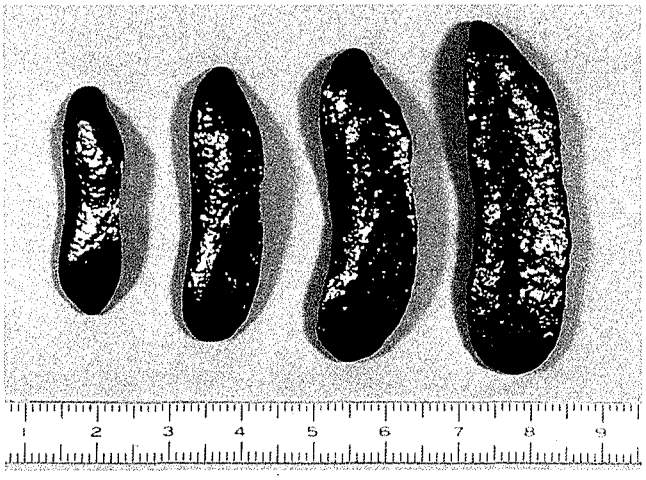


Fig. 1. Photograph of spleens of male rats given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

From left, spleen of male rat in the 0%(Control), 0.75%, 1.5% or 3.0% group. Dose-dependent splenomegaly in treated rats was observed.

Table 2. Body weight gain of male and female rats given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

	Male				Female			
CIPC in diet	0%	0.75%	1.5%	3.0%	0%	0.75%	1.5%	3.0%
body weight(g)								
on days 0	94±4	95±4	94±4	94±4	79±4	80±4	80±3	80±2
7	120±8	121±8	117±5	100±4**	96±5	97±5	95±3	85±3**
14	145±11	148±13	142±8	123±7**	109±6	108±7	108±5	105±3
21	166±14	171±18	166±11	144±12**	123±5	122±7	120±6	115±4**
36	198±20	205±20	206±19	179±19	135±4	135±8	132±8	127±6*
49	221±23	232±20	234±19	209±22	144±5	144±11	142±7	137±8
63	249±20	254±19	260±15	232±20	152±4	155±6	150±7	144±7
77	269±17	271±17	275±12	251±17*	158±5	164±7	156±8	150±5
91	286±18	288±17	292±8	268±12*	162±5	167±6	160±8	153±5*

Values are mean±SD for 10 rats in each group and those marked with asterisks differ significantly from those of the corresponding control(0%) group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Table 3. Organ weight of male and female rats given Chlorpropham (CIPC) in the diet for 13 weeks.

CIPC in die		0%	0.75%	1.5%	3.0%
Male					
Liver	(g)	9.06±0.63	10.89±0.75**	12.86±0.35**	13.65±0.83**
	(g/100g b.w.)	3.17±0.10	3.78±0.13**	4.40±0.16**	5.12±0.14**
Kidney	(mg)	1848±187	1794±129	1965±111	1866±141
	(mg/100g b.w.)	645±36	623±26	672±34	699±32**
Spleen	(mg)	521±24	964±78	1489±59**	1968±125**
	(mg/100g b.w.)	182±8	335±16	509±18**	738±37**
Thymus	(mg)	202±34	189±28	202±33	171±30
	(mg/100g b.w.)	71±13	66±9	69±11	64±12
Female					
Liver	(g)	4.86±0.22	5.77±0.46**	6.12±0.51**	6.70±0.32**
	(g/100g b.w.)	2.99±0.11	3.45±0.22**	3.83±0.18**	4.38±0.13**
Kidney	(mg)	1040±56	1083±83	1065±68	1074±43
	(mg/100g b.w.)	641±34	647±44	667±22	702±34**
Spleen	(mg)	343±22	745±44	1139±63**	1386±96**
	(mr/100g b.w.)	211±10	445±20	714±31**	906±54**
Thymus	(mg)	159±17	167±23	165±41	131±14*
	(mg/100g b.w.)	98±10	100±11	104±28	85±9

Values are mean±SD for 10 rats in each group and those marked with asterisks differ significantly from those of the corresponding control(0%) group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

結　果

摂餌量・体重・症状

一日摂餌量・総摂餌量と総化合物摂取量をTable 1 に示した．餌の中のクロルプロファム濃度に依存した摂餌量の減少はなかった．

投与期間中の体重の推移をTable 2 に示した．雌雄の3.0%群で，対照群より有意に低い体重が観察された．

投与期間中，雌雄の3.0%群は，対照群に比べて，耳や尾が青白かった．

解剖所見

雌雄の全投与群で，黒味を帯びた血液，および，黒味を帯び，表面が凸凹し腫大した脾臓（Fig. 1）が見られた．また，雌雄の1.5%群と3.0%群で肝臓の腫大が見られた．雌雄の3.0%群では，盲腸の腫大，および，すい臓の浮腫様変化が軽度に見られた．

臓器重量

臓器重量をTable 3 に示した．最も顕著だったのは，脾臓の実重量・相対重量の増加で，3.0%群では対照群の約4倍にもなっていた．次に変化の大きかったのは，肝臓の実重量・相対重量の増加で，雌雄の全投与群で有意差があった．また，雌雄の腎臓の相対重量の増加と雌の胸腺の実重量の低下が，3.0%群で見られた．

Table 4. Hematological changes in male and female rats given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

CIPC in diet	0%	0.75%	1.5%	3.0%
Male				
Red blood cell count($\times 10^6$/ul)	9.24±0.16	8.02±0.14**	7.53±0.15**	6.77±0.15**
Hemoglobin concentration(mg/dl)	16.7±0.78	15.1±0.3	14.8±0.3*	14.5±0.3**
Hematocrit(%)	47.2±1.1	43.5±1.0**	43.1±0.7**	42.6±0.6**
Mean corpuscular volume(fl)	51.1±1.0	54.3±0.6**	57.3±1.0**	62.9±1.5**
Mean corpuscular hemoglobin(pg)	18.2±0.3	18.8±0.2**	19.7±0.5**	21.4±0.4**
Mean corpuscular hemoglobin concentration(g/dl)	35.8±0.5	34.6±0.4**	34.4±0.4**	33.9±0.6**
Methemoglobin(%)	1.2±0.3	5.9±1.4	7.6±1.9**	12.6±1.4**
White blood cell count($\times 10^3$/ul)	6.5±0.3	6.9±0.8	5.2±0.6	23.5±3.6**
Neutrophil(%)	17.9±5.6	15.0±5.6	13.2±5.3	15.0±4.3
Lymphocyte(%)	80.4±5.7	84.1±5.7	85.3±5.6	83.5±4.0
Monocyte(%)	0.7±1.0	0.4±0.5	1.0±0.9	0.7±0.5
Eosinophil(%)	1.0±0.9	0.5±0.7	0.5±0.9	0.8±0.8
Platelet($\times 10^3$/ul)	641±45	657±35	567±35**	496±33**
Female				
Red blood cell count($\times 10^6$/ul)	8.88±0.16	7.48±0.23**	6.93±0.15**	6.35±0.19**
Hemoglobin concentration(mg/dl)	16.6±0.3	14.8±0.3**	14.4±0.4**	13.9±0.4**
Hematocrit(%)	49.2±1.1	44.7±1.2**	43.8±0.9**	43.7±1.7**
Mean corpuscular volume(fl)	55.3±0.6	59.9±1.2**	63.3±1.2**	68.8±1.6**
Mean corpuscular hemoglobin(pg)	18.7±0.2	19.8±0.4	20.8±0.5**	22.0±0.2**
Mean corpuscular hemoglobin concentration(g/dl)	33.7±0.5	33.2±0.4	33.0±0.3*	31.9±0.5**
Methemoglobin(%)	0.8±0.2	6.8±1.3	10.6±2.7**	14.3±1.2**
White blood cell count($\times 10^3$/ul)	5.8±1.1	6.9±0.6	14.9±7.3	27.2±3.2**
Neutrophil(%)	13.4±5.1	9.9±3.8	11.3±5.0	7.6±2.8*
Lymphocyte(%)	84.9±5.2	88.9±3.7	87.0±5.5	91.5±3.0**
Monocyte(%)	1.0±1.1	1.0±0.9	0.9±1.0	0.8±0.8
Eosinophil(%)	0.7±0.8	0.2±0.6	0.8±0.6	0.1±0.3
Platelet($\times 10^3$/ul)	712±50	694±38	535±36**	475±23**

Values are mean±SD for 10 rats in each group and those marked with asterisks differ significantly from those of the corresponding control(0%) group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

血液学的変化

血液学的変化をTable 4 に示した.

顕著な変化が赤血球系の指標に見られ，雌雄のほとんど全ての投与群で，赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値・平均血球ヘモグロビン濃度が低下し，メトヘモグロビン値・平均血球容積・平均血球ヘモグロビン量が上昇した．また，雌雄の3.0%群で赤血球大小不同・多染性赤血球・変形赤血球が見られた.

雌雄の3.0%群の白血球数が上昇し，特に雌で好中球の百分比上昇とリンパ球の百分比低下が見られた．白血球像は，対照群と投与群で変化はなかった.

雌雄の1.5%群･3.0%群で血小板数が低下していた.

血漿生化学的変化

血漿生化学検査結果をTable 5 に示した.

雌雄の投与群で，AST・ALT・TGの低下とgGGT・AMY・CHO類・PL・NEFA・UA・TP・ALB・A/Gの上昇が見られ，AST/ALT・GLU・CRE・UNは変化がなかった.

病理学的変化

病理学的変化をTable 6 に示した.

脾臓では，赤脾髄におけるうっ血・髄外造血の増加・ヘモジデリン沈着の増加，および白脾髄と白脾髄周囲の辺縁洞の萎縮が，全投与群で観察された（Fig. 2）．特に1.5%群と3.0%群では，赤脾髄のるい洞は大量の赤血球に占められ，白脾髄周囲の辺縁洞は赤脾髄に溶け込むように不明瞭になっていた．マクロファージが黄褐色の色素を含有しているのが，全投与群で見られ，それらは，ヘモジデリンであることが確認された．さらに，皮膜と

Table 5. Changes in plasma clinical chemistry in male and female rats given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

CIPC in diet	0%	0.75%	1.5%	3.0%
Male				
AST(IU/l)	63±10	59±6	51±8	43±3*
ALT(IU/l)	35±6	32±3	28±3	27±3*
AST/ALT	1.8±0.2	1.9±0.2	1.8±0.3	1.6±0.2
GGT(IU/l)	2.1±0.3	1.9±0.3	1.9±0.6	4.2±0.6**
AMY(IU/l)	6992±313	7420±823	7271±294	7951±620**
TCHO(mg/dl)	50±3	54±4	68±4**	79±5**
FCHO(mg/dl)	10±1	10±1	13±1**	15±4**
ECHO(mg/dl)	40±2	44±3	55±3**	64±7**
PL(mg/dl)	102±17	109±8	132±8**	146±10**
TG(mg/dl)	101±27	74±31	43±9*	12±2**
NEFA(mg/dl)	627±107	602±55	578±77	398±52**
GLU(mg/dl)	165±14	167±13	159±8	153±7
UA(mg/dl)	0.76±0.12	1.07±0.21	1.19±0.29**	1.34±0.37**
CRE(mg/dl)	0.43±0.04	0.47±0.04	0.44±0.02	0.47±0.03
TP(g/dl)	5.5±0.4	6.0±0.2	6.5±0.2**	6.8±0.3**
ALB(g/dl)	2.3±0.2	2.6±0.1**	2.9±0.1**	3.1±0.1**
A/G	0.70±0.03	0.75±0.04**	0.78±0.02**	0.83±0.03**
UN(mg/dl)	20.7±1.9	21.9±1.6	21.0±1.0	22.5±1.2
Female				
AST(IU/l)	68±6	58±5**	59±8**	51±8**
ALT(IU/l)	31±5	27±3	27±4	22±1**
AST/ALT	2.2±0.2	2.2±0.2	2.2±0.2	2.3±0.4
GGT(IU/l)	1.5±0.5	2.2±0.4	1.7±0.7	4.2±1.8**
AMY(IU/l)	4530±587	4483±412	5334±536**	5719±358**
TCHO(mg/dl)	70±5	78±8	93±8*	108±9**
FCHO(mg/dl)	19±2	21±3	25±3**	28±3**
ECHO(mg/dl)	51±3	57±5*	68±5**	79±7**
PL(mg/dl)	120±7	125±13	151±16**	169±14**
TG(mg/dl)	65±15	61±25	53±16	36±15**
NEFA(mg/dl)	254±55	312±74	402±88**	430±107**
GLU(mg/dl)	140±20	146±11	148±5	138±10
UA(mg/dl)	0.96±0.21	1.27±0.37	1.55±0.65**	2.12±0.65**
CRE(mg/dl)	0.45±0.03	0.49±0.07	0.46±0.04	0.49±0.04
TP(g/dl)	5.8±0.2	5.8±0.4	6.4±0.3**	6.6±0.3**
ALB(g/dl)	2.5±0.1	2.6±0.1	3.0±0.2**	3.2±0.1**
A/G	0.77±0.03	0.82±0.03**	0.88±0.04**	0.96±0.04**
UN(mg/dl)	25.1±2.1	25.0±1.6	24.5±0.8	24.6±1.1

Abbreviations; AST=L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, ALT=L-alanine :2-oxoglutarate aminotransferase, GGT=γ-glutamyltranspeptidase, AMY=amylase, TCHO=total cholesterol, FCHO=free cholesterol, ECHO=esterized cholesterol, PL=phospholipids, TG=triglycerides, NEFA=non-esterized fatty acids, GLU=glucose, UA=uric acid, CRE=creatinine, TP=total protein, ALB=albumin, A/G=albumin-to-globulin ratio, UN=urea nitrogen.

Values are mean±SD for 10 rats of each group and those marked with asterisks differ significantly from those of the corresponding control(0%) group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

皮膜下の繊維化が全投与群で見られ（Fig.2），特に1.5%群・3.0%群で顕著で，3.0%群では，赤脾髄にまで及んでいる個体もあった．

骨髄では，造血細胞の増殖が投与量に相関して観察された（Fig.3）．増殖は，赤血球系と白血球系の両方にみられたが，赤血球系でより顕著であった．

肝臓では，クッパー細胞とマクロファージへのヘモジデリン沈着・肝細胞の腫大・好酸性の細胞質顆粒の増加

Table 6. Histopathological changes in male and female rats given Chlorpropham in the diet for 13 weeks.

		Male				Female			
CIPC in diet		0%	0.75%	1.5%	3.0%	0%	0.75%	1.5%	3.0%
Number of rats examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Spleen									
Congestion	+	0#	10	0	0	0	10	0	0
	++	0	0	10	10	0	0	10	10
Increased extramedullary hemopoiesis	+	0	0	0	0	0	9	3	0
	++	0	10	10	10	0	1	7	10
Increased hemosiderindeposition	+	0	10	10	10	0	10	10	10
Lymphoid atrophy	+	0	9	0	0	0	10	0	0
	++	0	1	10	10	0	0	10	10
Fibrosis	+	0	8	2	0	0	5	2	0
	++	0	0	8	10	0	0	8	10
Bone marrow									
Hemopoietic cell hyperplasia	+	0	9	10	1	0	10	10	0
	++	0	0	0	9	0	0	0	10
Liver									
Hemosiderin deposition	+	0	10	10	10	0	10	10	10
Kidney									
Hemosiderin deposition	+	0	0	10	10	10	9	4	0
	++	0	0	0	0	0	1	6	10
Increased lipofuscin deposition	+	0	0	9	0	0	10	4	0
	++	0	0	0	10	0	0	6	10
Atrophy of renal tubules	+	0	0	6	3	0	0	0	1
Fibrosis	+	0	0	4	4	0	0	0	1
Basophilic changes in renal tubules	+	10	10	8	7	0	2	1	2
	++	0	0	2	3	0	0	0	0
Pancreas									
Focal atrophy of acinal cells	+	0	0	1	0	0	1	0	2

number of rats with lesions in 10 rats of each group.
Grade of change; + slight, ++ marked.

が投与量に相関して観察された.

腎臓では，近位尿細管細胞のヘモジデリン沈着の増加・リポフスチン沈着の増加に加え，腎尿細管の萎縮・繊維化・塩基性変化が見られた.

すい臓では，アシナール細胞の萎縮が時折見られた.

その他の臓器（胸線・心臓・肺・副腎・胃・脳・精巣・前立腺・卵巣・子宮・膀胱）には，クロルプロファムの投与に関連した変化は見られなかった.

考　察

クロルプロファムを投与したラットで，メトヘモグロビン血症が見られた．メトヘモグロビン血症は，アニリン・アミノフェノール・パラクロロアニリンのようなアミノ化合物に暴露された実験動物に見られる血液毒性の一つである[14),16-18)]．Wangら[19)]は，フェニルウレア系の三種の除草剤の経餌投与によりラットに見られたメトヘモグロビン血症には，それらの除草剤から代謝酵素によって遊離されたアニリンあるいはハロゲン化アニリンが関与していると推察している[19)]．また，アリルアミド系除草剤であるプロパニールにより実験動物にひきおこされるメトヘモグロビン血症においても，プロパニールから3,4-ジクロロアニリンへの代謝的加水分解が必要な過程であると推測されている[20-22)]．本実験で観察されたメトヘモグロビン血症も，同様な機序による可能性が考えられる．ラットに経口投与されたクロルプロファムが，中間代謝物として3-クロロアニリンやアミノクロロフェノールを生じる[11-13)]という報告は，これを支持している.

脾臓の主な機能は，老化した，あるいは傷害された赤血球を血流から取り除く事である[24)]ので，投与群の脾臓の顕著な腫大とうっ血は，傷害された赤血球の血流から

の隔離と崩壊が増加した結果と考えられる．また，脾臓のみならず肝臓・腎臓にまでヘモジデリン沈着が見られたことは，赤血球の不足に対する生理的反応である[23] 骨髄の造血細胞の増殖とともに，赤血球の崩壊が増進した事を示している．脾臓の髄外造血の増加は，骨髄での造血が赤血球の崩壊に対して不十分である事を示唆しており，さらに，未成熟な赤血球の血流への放出を意味する平均血球容積の増加は，造血よりも赤血球の崩壊が勝った結果であろう．これらの事から，投与群で見られた貧血（赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値の減少）は，溶血性貧血と考えられる．

肝臓の腫大と血漿生化学変化は，肝細胞の傷害を示唆しているが，病理学的変化は軽度であった．

本実験によって，クロルプロファムがラットに対して，主に赤血球に毒性効果をもたらすことが示された．しかし，いずれの投与濃度においても赤血球毒性が示され，最大無作用量を確認するに至らなかった．この点については，今後の検討課題であろう．

謝辞

この試験を始めるにあたって，予備実験にご助力くださいました栄養研究科長市川久次先生に心から感謝いたします．

参考文献

1) Vojinovic,V., Peric,Z. and Neskovic,N.：*Zastita bilja*, **36**, 209-214, 1985.
2) Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. and Gunderson, E.L.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 842-861, 1985a.
3) Gartrell, M.J., Craun, J.C., Podrebarac, D.S. and Gunderson, E.L.：*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 862-875, 1985b.
4) Worobey, B.L. and Sun,W.-F.,：*Chemosphere*, **16**, 1457-1462, 1987.
5) Beernaert,H. and Hucorne,P.,：*Z. Lebesm. Unters. Forsch.* **193**, 433-435, 1991.
6) Nagayama, T., Kikugawa,K.：*Jpn. J. Environ. Health*, **38**, 78-83, 1992.
7) 樺島順一郎，市川久次：東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **44**, 288-293, 1993
8) Larson, P.S., Crawford, E.M. et al.：*Toxic. Appl. Pharm.*, **2**, 659-673, 1960.
9) Van Esch, G.J., Kroes, R.：*Fd. Cosmet. Toxicol.*, **10**, 373-381, 1972.
10) Grunow, W., Boehme, C., Budczies, B.：*Fd. Cosmet. Toxicol.*, **8**, 277-288, 1970.
11) Bobik, A., Holder, G.M., Ryan, A.J.：*Fd. Cosmet. Toxicol.*, **10**, 163-170, 1972.
12) Fang, S.C., Fallin, E., Montgomery, M.L., Freed, V.H.：*Pesticide Biochemistry and Physiology*, **4**, 1-11, 1974.
13) 多田幸恵，池田虎雄，高橋 博，他；東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **49**, 267-276, 1998.
14) Harrison, J.H.Jr., Jollow, D.J.：*J. Pharm. Exp. Ther.*, **238**, 1045-1054, 1986.
15) Gad, S.C., Weil, C.S.：Statistics for toxicologists. In:A. Wallace Hayes（Ed）, *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press, New York, pp.273-320, 1982.
16) Kiese,M.,： The biochemical production of ferrihemoglobin forming derivatives from aromatic amines and mechanisms of ferrihemoglobin formation. *Pharmacol. Rev.* **18**, 1091-1161, 1966.
17) Beutler, E.：Chemical Toxicity of the Erythrocyte. In:R.D. Irons（Ed）, *Toxicity of the Blood and Bone Marrow*, Raven Press, New York, pp39-49, 1985.
18) Chhabra,R.S., Thompson,M., Elwell,M.R., Gerken, D.K.,：*Food Chem. Toxicol.* **28**, 717-722, 1990.
19) Wang,S.-W., Chu,C.-Y., Hsu,J.-D., Wang,C.-J.:*Fd. Chem. Toxic.*, **31**, 285-295, 1993.
20) Chow,A.Y.K. and Murphy,S.D., 1975.：*Toxicol. Appl. Phermacol.* **33**, 14-20, 1975.
21) Singleton,S.D. and Murphy,S.D.,：*Toxicol. Appl. Pharmacol.* **25**, 20-29, 1973.
22) McMillan,D.C.,Freeman,J.P., Hinson,J.A.,：*Toxicol. Appl. Pharmacol.* **103**, 90-101, 1990.
23) MacKenzie,W.F., and Eustis,S.L.,：Bone marrow. In:Boorman, G.A., Eustis,S.L., Elwell,M.R., Montgomery, C.A.Jr., MacKenzie,W.F.（Eds）, *Pathology of the Fischer Rat Reference and Atlas*. Academic-press, San Diego, pp. 395-403, 1990.
24) Stefanski, S.A., Elwell, M.R. and Stromberg, P.C.：Spleen, lymphnodes, and thymus. In:G.A.Boorman, et al.（Ed）, *Pathology of the Fischer Rat Referance and Atlas*, Academic Press, San Diego, pp369-393, 1990.

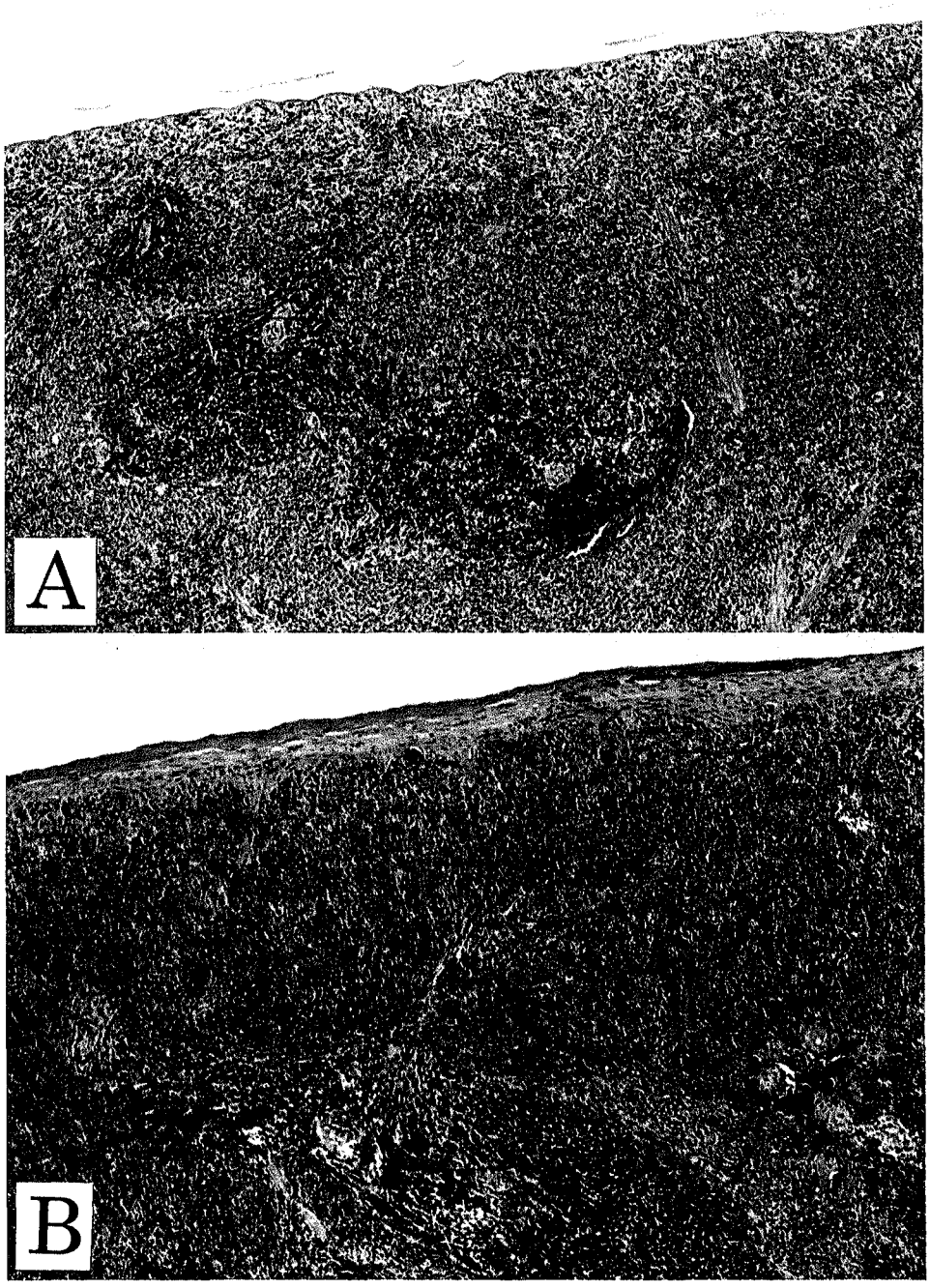


Fig. 2. Photomicrograph of spleen from male rat given Chlorpropham(CIPC) in the diet for 13 weeks.

The congestion, increased extramedulary hematopoiesis or increased hemosiderin deposition in red pulp, the atrophy of white pulp with indistinct marginal zones blending into red pulp and the fibrosis in subcapsular area were observed in spleen(B) of male rats in 3.0% group compared with spleen(A) of male rat in 0%(Control) group. Hematoxylin and eosin ×90.

Table 1. Mean Body Weights Changes in Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male						
Weeks	(10)[a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
0[b]	101± 4[c]	100± 9	102± 4	103± 4	101± 4	100± 6
1	127± 5	126± 5	128± 7	128± 5	124± 5	126± 7
2	152± 7	151± 7	153± 9	151± 7	145± 6	150± 9
3	176± 9	175± 8	176±11	172±10	166± 8	172±12
4	196±10	192± 9	195±12	190±10	182±10	192±12
5	211±11	207±10	211±12	203±13	195±12*	208±11
6	223±12	219±11	223±13	215±13	206±12*	220±12
7	232±13	228±12	234±14	225±14	216±13*	230±13
8	241±15	237±12	243±15	234±15	223±14*	240±14
9	250±15	246±12	252±17	243±15	232±14	249±13
10	255±18	253±14	261±17	249±16	239±15	254±15
11	261±17	260±16	268±19	254±16	244±15	260±14
12	268±16	265±16	274±20	260±17	250±15	266±14
Final[d]	268±17	264±15	274±19	260±16	251±15	267±14
Female						
Weeks	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
0	81± 4	81± 4	81± 4	82± 4	80± 3	80± 3
1	96± 6	96± 5	96± 5	95± 5	95± 3	95± 5
2	111± 6	108± 6	109± 5	107± 4	108± 3	108± 6
3	121± 6	118± 6	118± 5	116± 5	118± 3	118± 7
4	128± 7	125± 6	124± 5	122± 5	125± 3	123± 6
5	134± 8	130± 8	129± 6	126± 6	130± 3	128± 7
6	138± 9	135± 7	134± 5	131± 6	135± 3	133± 8
7	142±10	139± 7	136± 6	133± 8	137± 3	136± 8
8	145±10	142± 7	140± 8	137± 7	140± 3	139± 7
9	148±12	144± 7	142± 8	139± 8	143± 3	143± 7
10	149±12	147± 7	145± 9	141± 7	145± 3	143± 7
11	151±13	150± 7	148±11	144± 8	148± 4	146± 6
12	153±14	153± 8	150±10	146± 9	151± 4	149± 6
Final	154±13	153± 8	149±10	146± 9	151± 4	148± 7

a) Number of rats. b) Weight at the start of the experiments. c) Mean±SD (g). d) Weights at the day of the autopsy.
*: Significantly different from control. $p<0.05$

ゼ(LDH)を測定した.

解剖，病理学的検査：諸臓器は肉眼的に観察した後，脳，心，肝，腎，肺，脾，副腎，精巣，前立腺，子宮，卵巣については重量および体重比重量を測定し，以上の秤量臓器に加えて下垂体，耳垢腺，眼球，ハ-ダ-腺，唾液腺，甲・副甲状腺，気管，縦隔，食道，胃，小・大腸，膵臓，精巣上体，精嚢，膀胱，大腿骨，骨格筋について10%緩衝ホルマリン固定後，パラフィン包埋切片を作製しHE染色を行なった．また必要に応じてPAS染色を行なった.

統計学的処理：体重，摂餌・摂水量，血液・血清学的検査および臓器重量等の測定値の検定は，Bartlett検定を用い，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検定及びSheffe型の順位和検定を行った．危険率は全て5%においた.

結　果

一般状態および死亡動物：実験期間中に雌雄各群で死亡例は認められず，また一般状態においても被験物質に起因すると思われる異常は認められなかった.

体重：Table 1に投与開始時より1週間毎の体重を示

Table 2. Food Intake in Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male						
Weeks	10) [a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1	12.7±0.8 [b]	12.0±0.7	11.7±1.6	12.2±0.8	11.6±4.0	13.6±1.1
2	13.4±0.6	12.6±0.8	13.3±0.9	13.0±0.7	13.5±0.7	13.9±1.1
3	14.6±1.3	14.1±1.0	13.9±1.0	13.9±1.4	14.0±1.1	15.1±1.4
4	14.4±1.2	14.2±0.9	14.3±1.1	13.8±1.0	13.9±1.2	15.0±1.1
5	14.6±0.9	13.8±1.0	14.3±1.1	13.7±1.2	14.1±1.1	15.2±1.1
6	14.5±1.3	14.0±1.2	14.6±0.7	13.9±1.3	14.7±1.1	15.6±1.0
7	13.9±1.0	13.7±1.2	14.1±0.5	13.6±1.2	14.0±1.0	15.5±1.4
8	13.8±1.2	13.3±0.9	13.6±0.8	13.3±0.9	13.3±0.5	14.8±1.0
9	13.6±0.9	13.4±1.3	13.6±1.4	13.2±1.1	13.5±1.1	14.6±0.9
10	13.7±1.0	13.7±6.5	13.9±5.9	14.7±6.0	13.6±0.9	14.4±1.8
11	12.8±1.9	13.4±1.0	13.7±1.0	12.8±1.2	13.1±1.1	14.2±1.0
12	13.4±1.0	13.7±1.1	13.7±1.2	13.3±1.1	13.7±1.2	14.0±0.7
13	13.8±1.2	13.5±1.2	13.6±1.4	13.1±0.9	13.3±0.9	14.2±0.7
Female						
Weeks	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1	10.2±0.5 [b]	9.3±0.5	9.5±0.7	9.0±1.8	10.7±0.8	10.9±0.8
2	10.4±0.5	9.7±1.2	10.0±0.5	9.9±0.7	10.9±0.7	10.8±0.8
3	0.3±1.5	10.2±0.9	10.5±0.7	10.3±0.7	10.4±1.2	11.2±0.7
4	10.5±0.4	10.0±0.9	10.0±0.4	9.7±0.7*	10.8±0.6	10.3±0.7
5	10.3±0.6	9.6±0.8	10.2±0.7	9.7±0.8	10.7±0.8	10.5±0.7
6	10.4±0.7	10.0±0.9	10.1±0.4	9.5±1.0	10.7±0.5	10.6±0.9
7	9.8±0.8	10.0±1.8	9.4±0.6	9.1±1.0	10.1±0.8	10.3±0.7
8	9.6±0.7	9.3±0.7	9.1±0.8	9.0±0.9	9.5±0.7	10.0±0.6
9	9.1±1.3	9.1±1.2	8.9±0.7	9.0±0.5	9.9±0.9	9.7±0.8
10	9.9±1.3	9.0±0.6	9.2±0.9	9.0±0.5	9.7±0.8	9.6±0.7
11	9.3±0.9	9.2±0.8	9.1±0.8	8.7±1.0	9.9±1.0	9.7±1.1
12	9.5±1.1	9.6±0.6	9.3±0.9	9.1±0.8	9.8±0.6	9.8±0.5
13	9.6±0.6	9.3±0.8	8.9±0.7	9.1±0.9	9.6±0.6	10.0±0.8

a) Number of rats. b) Mean ±SD (g/ rat /day)

した.雄の投与群のうち2.5%群で投与6～9週目で対照群に比べ増加抑制が認められたが，その後差はなくなった．雌の各投与群では実験期間を通して対照群と差がなかった.

摂餌・摂水量：Table 2,3に示すように摂餌，摂水量とも雌雄で実験期間を通して対照群と比べ差は認められなかった．また高濃度群での飼料に対する忌避によるこぼし量の増加もなく，被験物資であるラック色素の摂取量も設定濃度に比例していた.

血液学的検査：Table 4に示すように雌雄の各投与群で対照群に比べ変動のある項目は認められなかった.

血清生化学検査：雌雄の各値をTable 5,6に示した.雄ではCHEが2.5，5.0%群で，Kが0.625%群で増加，またGLUが0.625%群，TPが0.625，2.5%群，Caが2.5%群で減少が認められた．これらの変動にはいずれも色素濃度との関連はなかった．雌ではAMYが2.5，5.0%群で，GGT，CHO及びKが2.5%群で増加した．このうちAMYは用量に相関する傾向が認められた．その他の変動を示した項目には用量との関連は認められなかった.

臓器重量：雌雄の各実重量及び相対重量をTable 7,8に示した．雄では1.25%群で腎実重量及び相対重量が，2.5%群で腎実重量の減少が認められた．また雌2.5%群で脾相対重量の減少が認められた.

解剖所見：雌雄の投与群で耳下腺の肥大及び舌根部表面の暗紫色の着色が認められた．いずれも2.5%群から肉眼的に明らかな変化を示す例が散見され，5.0%群で

Table 3. Water Consumption in Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

	Dose level (%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male						
Weeks	(10) [a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1	15.4±1.2[b]	15.6±0.7	15.1±2.1	15.9±1.1	15.7±1.0	16.2±1.3
2	15.8±1.2	16.2±0.8	16.5±1.1	16.2±1.2	16.3±1.0	17.2±1.4
3	17.1±1.9	17.6±1.0	18.1±3.3	17.1±1.6	17.1±1.6	17.9±1.4
4	17.4±2.2	18.5±0.9	18.7±3.4	17.4±1.7	17.2±1.8	18.6±1.5
5	17.7±1.5	18.4±2.1	18.9±1.4	17.7±1.6	17.2±2.2	18.4±1.8
6	17.3±2.3	18.9±2.2	19.4±3.9	17.7±1.3	17.7±2.0	18.4±1.3
7	16.8±2.1	17.2±2.1	18.9±4.1	16.9±1.3	17.0±2.0	18.0±1.5
8	16.8±2.0	16.7±1.6	17.2±1.9	16.7±1.4	15.3±1.4	16.8±1.2
9	16.1±1.7	17.0±1.2	18.0±3.7	16.9±1.9	15.8±1.8	16.9±1.4
10	15.5±1.6	16.3±1.2	17.1±1.6	16.5±1.9	14.8±1.0	15.7±1.8
11	15.8±1.9	17.4±2.4	17.5±2.1	15.7±1.6	15.7±2.1	15.8±1.2
12	16.2±2.0	16.9±2.0	17.5±3.1	16.3±1.7	15.7±1.6	16.0±1.0
13	16.2±3.0	17.0±2.2	17.7±3.0	15.8±1.7	15.1±1.4	15.4±1.1
Female						
Weeks	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1	13.5±1.2	12.7±0.7	13.1±0.7	12.3±2.6	13.3±1.2	13.2±2.3
2	14.2±1.3	13.6±2.4	13.4±0.9	14.4±0.8	14.5±1.2	14.9±1.6
3	13.3±4.6	14.6±1.1	14.4±0.8	14.5±1.0	14.5±1.7	15.1±1.3
4	14.4±1.5	14.9±2.0	14.2±1.3	14.4±1.3	14.8±1.3	14.6±1.2
5	14.2±1.2	14.6±1.4	14.3±1.1	14.0±1.9	14.8±1.5	14.4±2.1
6	13.9±1.0	14.2±1.4	14.2±0.8	13.8±2.0	14.0±1.3	14.2±1.5
7	13.9±1.5	15.2±4.0	13.7±1.1	13.5±3.2	13.8±1.1	14.0±1.8
8	13.1±1.3	13.5±1.5	13.5±1.7	13.6±2.6	14.0±2.0	13.3±1.4
9	12.6±1.7	12.8±1.6	13.9±3.0	13.7±2.2	13.4±0.8	13.4±1.8
10	12.5±2.0	13.5±1.8	12.9±1.8	12.4±1.7	13.6±1.8	13.0±2.1
11	12.9±1.3	13.4±2.0	12.6±1.3	12.6±2.0	12.9±1.4	13.3±1.8
12	13.4±1.3	14.1±2.6	13.8±1.5	13.0±2.7	13.5±1.8	12.9±1.6
13	13.1±1.3	12.6±1.4	12.2±1.5	12.6±2.6	12.9±1.7	12.9±1.4

a) Number of rats. b) Mean±SD (g/ rat /day)

は雌雄の全例で観察された.

組織所見：ラック投与群で肉眼所見に一致して耳下腺腺房細胞の腫大が認められた. 変化を示す腺房では正常組織に比べ細胞質はエオジン染色性が低下し, 好塩基性の微細泡沫状または顆粒状で, PAS染色では正常細胞で見られる陽性顆粒が腫大の程度に伴い減少していた. 雌雄の5.0%群では全例でPAS陽性顆粒は消失していた. 核は対照群とほぼ同様の大きさで, 核小体が大きいものが多かった. また腫大の程度が顕著な細胞ではやや小形で核質が濃縮傾向にあるものも見られた. この様な変化を示す腺房は雌雄ともに1.25%群から認められ, 腫大の程度は用量に伴って増加し, より高濃度群では組織全体に亘ってびまん性に認められた (Fig.1-A,B). いずれも炎症性の変化は認められなかった. 各群における肥大の程度を一定面積当たりの腺房細胞の核数で示した. 核数の測定は倍率400倍で, 1例, 1切片当たり5ヵ所の100×100 μm^2の面積について行い, その平均値を個々の動物の核数とした. 各群10例について以上の測定を行い, その平均値を求めた. Table 9に示すように, 雌雄ともに対照群に比べ1.25%群より用量に相関して有意に核数が減少した. 耳下腺では以上の変化の他に好塩基性, 局所性肥大 (Basophilic hypertropic focus)[6]が雄の対照群, 0.313, 0.625, 1.25%群に1または2例, 雌0.625, 1.25%群に各1例認められた. この変化は前者に比べ細胞質や核がより大きく, また細胞基底部及び核周囲の好塩基性領域も多く, また変化を示す腺房が数個に限られ組織の

Table 4. Hematological Examination in the Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Item		Dose level (%) 0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male		(10)[a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
WBC	$x10^3$	4.9±0.4[b]	4.8±0.7	4.8±0.5	5.0±0.7	4.5±0.5	4.7±0.5
RBC	$x10^6$	9.55±0.16	9.43±0.18	9.42±0.18	9.43±0.21	9.40±0.19	9.56±0.14
Hgb	gm	16.3±0.2	16.3±0.3	16.4±0.3	16.3±0.3	16.3±0.51	6.3±0.3
Hct	%	47.8±0.8	47.6±0.8	47.6±0.9	47.5±1.0	47.5±1.3	47.6±0.9
PLT	$x10^3$	669±41	662±49	710±28	692±72	700±45	652±51
MCV	μ^3	50.0±0.5	50.5±0.5	50.5±0.5	50.4±0.6	50.5±0.6	49.8±0.4
MCH	$\mu\mu g$	17.1±0.1	17.3±0.3	17.4±0.3	17.3±0.2	17.3±0.4	17.1±0.2
MCH	%	34.2±0.3	34.3±0.5	34.5±0.4	34.4±0.4	34.3±0.5	34.4±0.4
Female							
WBC	$x10^3$	4.6±1.4	4.5±0.8	4.5±1.0	4.2±1.1	4.5±0.9	4.2±1.2
RBC	$x10^6$	8.98±0.13	9.05±0.26	9.15±0.15	9.11±0.19	9.02±0.10	9.07±0.25
Hgb	gm	16.4±0.3	16.6±0.4	16.7±0.3	16.5±0.4	16.2±0.3	16.4±0.4
Hct	%	47.2±0.9	47.7±1.4	48.0±0.8	47.8±1.0	47.1±0.7	47.3±1.2
PLT	$x10^3$	676±63	681±46	675±61	720±41	691±46	655±63
MCV	μ^3	52.6±0.4	52.8±0.5	52.4±0.3	52.5±0.2	52.2±0.5	52.1±0.3
MCH	$\mu\mu g$	18.2±0.2	18.3±0.2	18.2±0.3	18.1±0.2	18.0±0.2	18.1±0.3
MCHC	%	34.7±0.3	34.7±0.3	34.7±0.5	34.6±0.3	34.5±0.3	34.7±0.5

a) Number of rats examined. b) Mean±SD

* Significantly different from control group ($P<0.05$).

一部に局在していることなど，色素投与と関連したびまん性の変化とは性状が異なっていた．またいずれも軽度であり,その発現率には用量相関がなく，今回の耳下腺の組織評価からは除外した．また耳下腺以外の唾液腺では特に変化は見られなかった．その他の臓器で投与によって発現頻度及び程度が増加した変化は腎臓の皮髄境界部の尿細管の鉱質（石灰様物質）沈着であった．沈着物は微少顆粒状から層状構造の小貝殻片様で，その部位では沈着物により圧迫,変形した尿細管や上皮細胞の編成,脱落によって生じた空洞構造が認められた．個々の動物について変化の程度をその存在数及び範囲に基づき－～+++ に分類した．程度の強い例では沈着物を伴った空洞構造が皮髄境界部に沿って帯状に隙間なく配列しさらに変化を示す部位が被膜方向に広がっていた（Fig.2-A,B）．Table 10に示すようにこの変化は雄対照群では見られないが雌では軽度な変化として認められ，いずれも投与に伴い頻度や程度が増加した．雄に比べ雌で強く見られた．そのほか肝の細胞浸潤，肺血管壁の石灰沈着等が各群の動物に見られたが濃度との関連は認められなかった．剖検時暗紫色の着色が見られた舌では組織学的には対照群と差はなかった．

考　察

天然着色料のラットによるラック色素の混餌投与による13週間毒性試験を行った．投与と関連した変化として組織学的に耳下腺の肥大及び腎における石灰沈着が見られた他は特に体重，摂餌・摂水量，血液学的検査，血清生化学的検査結果，臓器重量に特に顕著な変化は認められず，今回の実験条件下でのラック色素の作用は弱いものと考えられた．体重は2.5%群で試験期間中増加抑制が認められたが終了時には対照群と差はなく，また最高濃度群及び雌で変化がなかったことから2.5%群における体重変化は投与と関連のない偶発的なものと考えられた．

血清生化学検査において雌2.5，5.0%群でアミラーゼ(AMY)の増加が認められた．AMYは膵，耳下腺に多く含まれ，また血清中のAMYの変動は膵炎や耳下腺炎等の場合に測定の意義があると言われている[7,8]．耳下腺の組織変化の程度は雌雄で同様であったが，雄の血清AMYの増加の程度は雌に比べ低く，雌の血清AMYの増加が耳下腺の変化を反映しているかどうかは明らかでない．また血清中のAMYは尿中へ排泄されることが知られている[8]．雌では腎における鉱質沈着が雄に比べ顕著であった．この病変による腎機能の低下が血清AMYの排泄を障害した結果，耳下腺の変化により増加傾向にあ

Table 5. Blood Biochemical Examination in Male Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Item	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
	10) [a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
ALP(IU/l)	458± 34[b]	458± 23	454± 30	462± 40	451± 34	461± 28
ALT(U/l)	54± 10	56± 7	54± 8	53± 9	50± 6	56± 11
AMY(IU/l)	1818± 56	1745± 79	1761± 90	1793± 317	1872± 83	2255± 566
AST(U/l)	114± 33	114± 20	117± 24	113± 21	116± 17	126± 36
CHE(ΔpH)	0.14±0.02	0.15±0.03	0.17±0.03	0.17±0.04	0.19±0.03*	0.20±0.03*
GGT(U/l)	0.4± 0.2	0.5± 0.2	0.5± 0.2	0.5± 0.3	0.6± 0.2	0.5± 0.2
LAP(IU/l)	66± 3	68± 3	67± 3	68± 2	66± 2	68± 2
LDH(IU/l)	1261± 452	1192± 326	1303± 368	1202± 412	1195± 214	1290± 473
ALB(g/dl)	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.6± 0.1	2.6± 0.1	2.7± 0.1
A/G	0.78±0.03	0.79±0.03	0.79±0.03	0.77±0.05	0.79±0.04	0.77±0.03
BIL(mg/dl)	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04± 0.0	0.05±0.01
CHO(mg/dl)	80± 6	80± 5	79± 5	80± 8	80± 4	86± 6
CRE(mg/dl)	0.49±0.05	0.48±0.04	0.47±0.03	0.49±0.05	0.49±0.05	0.50±0.05
GLU(mg/dl)	175± 5	174± 9	166± 7*	174± 6	170± 6	176± 7
PL(mg/dl)	162± 13	160± 11	157± 13	161± 14	160± 8	167± 10
TG(mg/dl)	97± 36	84± 37	88± 38	79± 20	76± 22	74± 25
TP(g/dl)	6.2± 0.1	6.1± 0.1	6.0±0.1*	6.1± 0.2	5.9±0.1*	6.1± 0.2
UA(mg/dl)	1.7± 0.3	1.6± 0.4	1.5± 0.3	1.7± 0.3	1.5± 0.3	1.6± 0.4
UN(mg/dl)	20.2± 1.1	20.1± 1.1	20.0± 1.5	20.1± 1.2	19.4± 1.1	20.1± 2.0
Ca(mg/dl)	10.3± 0.2	10.2± 0.2	10.1± 0.2	10.2± 0.1	10.0±0.1*	10.2± 0.3
Na(mEq/l)	142.8± 2.2	143.1± 1.2	142.2± 1.6	142.8± 1.0	142.7± 1.0	142.8± 1.0
K(mEq/l)	5.34±0.36	5.43±0.24	5.68±0.30*	5.35±0.27	5.58±0.12	5.51±0.31
Cl(mEq/l)	99.1± 1.6	99.3± 0.9	98.9± 1.5	99.3± 0.9	99.9± 0.8	99.1± 1.0

a) Number of rats examined. b)Mean±SD

＊: Significantly different from control group ($p<0.05$).

る血清AMYが雌ではより顕著に検出された可能性も考えられることから，その由来についてアイソザイムの測定などの検討が必要である．臓器重量では雄で腎重量の減少が1.25，2.5%群で認められたが，明らかな用量相関や特徴的な組織変化がないことから体重の変動等に伴った二次的な変化と考えられた．また雌2.5%群で脾相対重量の増加が認められたが特に組織変化もないことからの偶発的なものと考えられた．組織学的に耳下腺腺房細胞のびまん性の肥大と腎の鉱質沈着が投与に関連した変化として認められた．ラック色素による耳下腺の変化については過去に報告はない．同様な変化を起こす薬物として抗ヒスタミン薬のドキシラミン (Doxylamine) が知られているがその毒性的意義や作用機構については明らかにされていない[9]．唾液腺の機能は食物の組成や湿潤性などの外的要因の影響やホルモンや自律神経系などの生理学的な要因の支配を受けている．今回観察された変化の発現には明らかな用量相関がありラック色素の作用の可能性が示唆されるが，唾液腺のうちで耳下腺のみにどのような原因で起こるかは今までのところ不明である．長期投与試験によってこの変化の経過を観察する必要があると思われる．腎の鉱質沈着はF344系ラットの雌に特徴的に見られる自然発生病変で，その発生にはホルモンや飼料中のカルシウム等のミネラルのバランスが関与していることが知られている[10-12]．雌高濃度群ではその程度は強く現れたが体重の変化や血清学的に腎機能に関連した測定項目の変動は認められず，動物の成育に影響する性質のものではないと考えられた．ラック色素の作用に関して，肝機能に対する作用の観察を目的としたラットによる投与実験[13,14]では障害作用は報告されていない．また今回の実験では一般状態や体重や摂餌，摂水量は対照群と顕著な差がなくラック色素の毒性は低いものと思われるが，2.5%群で体重の抑制傾向や耳下腺の肥大が認められていることからラック色素の作用については，現在実施中である慢性投与試験において確認したい．

謝　辞

被験物質および試験飼料中のラッカイン酸の分析に関

Table 6. Blood Biochemical Examination in Female Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Item	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
	10)[a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
ALP(IU/l)	388± 42[b]	409± 45	387± 25	399± 28	396± 47	415± 40
ALT(U/l)	48± 9	50± 8	51± 6	50± 6	57± 8	55± 10
AMY(IU/l)	1205± 96	1214± 137	1193± 138	1240± 56	1447± 174*	1568± 280*
AST(U/l)	116± 31	111± 25	123± 30	115± 29	121± 20	119± 35
CHE(ΔpH)	1.07±0.08	1.04± 0.10	1.06± 0.08	1.06± 0.09	0.99± 0.08	1.04±0.08
CPK(IU/l)	5633±2208	4938±1419	4757±1509	4234±1509	3868±1178	4569±1726
GGT(U/l)	1.0± 0.3	1.0± 0.3	1.0± 0.2	1.2± 0.2	1.6± 0.4*	1.2± 0.2
LAP(IU-l)	68± 4	71± 4	71± 3	70± 3	70± 4	70± 4
LDH(IU/l)	1149± 427	1083± 432	1258± 400	1151± 426	1031± 255	1023± 405
ALB(g/dl)	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.7± 0.1	2.7± 0.1
A/G	0.86±0.03	0.87± 0.05	0.87± 0.03	0.86± 0.05	0.85± 0.03	0.85±0.03
BIL(mg/dl)	0.05±0.01	0.05± 0.01	0.05± 0.01	0.04± 0.01	0.05± 0.01	0.05±0.01
CHO(mg/dl)	84± 6	87± 6	84± 5	82± 4	91± 7*	89± 3
CRE(mg/dl)	0.47±0.11	0.46± 0.04	0.47± 0.05	0.46± 0.03	0.45± 0.02	0.44±0.04
GLU(mg/dl)	169± 13	166± 10	163± 14	162± 10	161± 11	160± 12
PL(mg/dl)	165± 13	167± 15	160± 10	162± 10	174± 14	170± 8
TG(mg/dl)	34± 20	38± 16	30± 11	33± 22	37± 32	29± 14
TP(g/dl)	5.7± 0.2	5.8± 0.3	5.7± 0.2	5.8± 0.2	5.8± 0.2	5.8± 0.2
UA(mg/dl)	1.6± 0.4	1.7± 0.4	1.6± 0.2	1.6± 0.4	1.6± 0.3	1.5± 0.4
UN(mg/dl)	18.8± 1.3	19.6± 1.6	19.3± 1.6	19.8± 1.3	19.5± 2.2	19.3± 2.0
Ca(mg/dl)	9.7± 0.3	9.8± 0.3	9.6± 0.2	9.7± 0.3	9.8± 0.3	9.6± 0.2
Na(mEq/l)	140.8± 1.2	141.7± 1.5	141.8± 2.0	142.2± 1.4	141.8± 1.4	141.7± 1.5
K(mEq/l)	4.86±0.31	5.12± 0.28	5.16± 0.24	5.16± 0.40	5.29± 0.24*	5.07±0.22
Cl(mEq/l)	98.8± 1.9	99.6± 1.5	99.6± 1.3	99.9± 1.9	99.9± 1.1	99.9± 1.6

1) Number of rats examined. 2)Mean±SD

*: Significantly different from control group ($p<0.05$).

してご協力いただいた当所食品添加物研究科の平田恵子氏に感謝致します.

文　献

1）化学的合成品以外の食品添加物リスト注解書，129，平成3年度版，食品添加物協会

2）藤井正美，清水重孝，中村幹雄：概説食用天然色素，63-66，1993，㈱光琳，東京

3）藤田　博，広門雅子，平田恵子，他：東京衛験年報，**47**，309-313,1996

4）小縣昭夫，安藤　弘，久保喜一，他：東京衛験年報，**48**，309-311，1997

5）Chkravarty, I and Roy, B. R.: Indian shellac, ed. by Majumder, S 6-11, 1982

6）Neuenschwander, S. B and Elwell, W.R.: Salivary glands. In Boorman, G.M., et. al. (eds.), Pathology of the Fischer rats, 31-43, 1990, Academic Press, San Diego

7）谷本義文：実験動物の血液・尿生化学，101，1988，ソフトサイエンス，東京

8）馬場忠雄，石塚義之：検査値のみかた，臨床医，19，増刊号，144-145，1993

9）Jackson, C.D.and Blackwell, B.N.: Fund.Appl. Toxicol., 10, 243-253, 1988

10）Iwata, H., Hirouch, Y., Inoue, H. and Enomoto, M: Exp. Anim. 35, 299-305, 1986

11）Armstong, W. G.and Horsley, H. G.: Nature, 21, 980, 1966

12）Peter, C. P., Burek, J.D. and van Zwieten, M. J.: Toxicol. Path., 14, 91-100, 1986

13）Gosh, A and Chkravarty, I: J. Fd. Sci. Tecnol. 25, 94 -96, 1988

14）Gosh, A and Chkravarty, I: The Ind. J. Nutr. Dietet. 17, 147-1530, 1980

Table 7. Organ Weights of Male Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Item	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
	10) [a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Brain(mg)	1924± 34[b]	1929± 41	1936± 40	1914± 80	1918± 39	1932± 31
	(721± 42)[c]	(732± 42)	(709± 46)	(739± 28)	(767± 40)	(726± 35)
Liver(g)	8.10±0.91	7.93± 0.60	8.20± 0.69	7,62± 0.69	7.80± 0.51	7.94±0.52
	(3.02±0.19)	(3.00± 0.10)	(2.99± 0.11)	(2.93± 0.11)	(3.11± 0.10)	(2.98±0.10)
Heart(mg)	761± 59	741± 36	763± 35	714± 61	707± 48	760± 44
	(284± 14)	(281± 10)	(279± 9)	(275± 16)	(282± 10)	(285± 16)
R-Kidney(mg)	789± 51	761± 36	780± 57	726± 62*	726± 44*	744± 46
	(295± 8)	(288± 10)	(285± 15)	(279± 9)*	(290± 10)	(279± 9)
L-Kidney(mg)	773± 51	760± 40	773± 88	741± 66	715± 36	761± 41
	(292± 8)	(288± 10)	(282± 24)	(285± 13)	(285± 11)	(286± 7)
Spleen(mg)	564± 94	543± 37	573± 48	542± 55	526± 35	541± 29
	(210± 27)	(205± 7)	(209± 17)	(209± 19)	(210± 6)	(203± 6)
Lung(mg)	849± 47	863± 37	863± 53	846± 76	808± 53	839± 45
	(318± 14)	(327± 17)	(315± 15)	(326± 17)	(323± 15)	(315± 14)
R-Testis(mg)	1478± 48	1489± 43	1500± 39	1472± 76	1450± 60	1483± 42
	(553± 30)	(564± 19)	(549± 36)	(568± 23)	(579± 28)	(558± 32)
L-Testis(mg)	1506± 49	1546± 42	1549± 43	1512± 75	1501± 64	1517± 74
	(564± 27)	(586± 27)	(568± 43)	(583± 24)	(600± 26)	(570± 37)
Prostate(mg)	231± 46	245± 47	230± 50	229± 48	205± 39	206± 25
	(87± 14)	(93± 16)	(84± 16)	(88± 17)	(82± 13)	(77± 9)
R-Adrenal(mg)	15.4± 1.7	14.6± 1.2	15.2± 1.4	13.8± 1.5	14.5± 1.4	14.2± 1.7
	(5.8± 0.9)	(5.5± 0.5)	(5.6± 0.3)	(5.3± 0.5)	(5.8± 0.5)	(5.3± 0.6)
L-Adrenal(mg)	16.9± 0.9	17.5± 1.6	16.7± 1.7	15.5± 1.1	15.9± 1.9	16.7± 2.5
	(6.3± 0.6)	(6.6± 0.6)	(6.1± 0.4)	(6.0± 0.3)	(6.4± 0.8)	(6.3± 0.8)
Thymus(mg)	161± 17	158± 19	161± 18	155± 14	149± 14	162± 26
	(60± 3)	(60± 7)	(59± 5)	(60± 8)	(60± 7)	(61± 9)

a) Number of rats examined. b) Absoluteweight(mean±SD).

c) Relative weight(mg or g/100g body weight, mean±SD).

* Significantly different from control group($p<0.05$).

Table 8. Organ Weights of Female Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Item	Dose level(%)					
	0 (Control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
	10) [a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Brain(mg)	1799± 29[b]	1785± 40	1785± 24	1763± 36	1775± 26	1778± 39
	(1178± 88)[c]	(1171± 64)	(1200± 74)	(1213± 69)	(1177± 29)	(1199± 40)
Liver(g)	4.56±0.63	4.58± 0.32	4.24± 0.41	4.22± 0.49	4.55± 0.44	4.35±0.42
	(2.96±0.22)	(3.00± 0.15)	(2.83± 0.14)	(2.89± 0.22)	(3.02± 0.27)	(2.93±0.25)
Heart(mg)	503± 48	496± 27	477± 34	463± 38	475± 22	482± 31
	(328± 21)	(325± 15)	(320± 21)	(317± 18)	(315± 12)	(325± 18)
R-Kidney(mg)	515± 51	505± 24	495± 23	491± 33	498± 28	524± 39
	(335± 19)	(331± 15)	(332± 17)	(337± 18)	(331± 21)	(353± 24)
L-Kidney(mg)	514± 47	506± 30	490± 25	490± 35	495± 28	513± 35
	(335± 16)	(332± 22)	(329± 15)	(336± 17)	(328± 20)	(346± 19)
Spleen(mg)	347± 32	347± 22	335± 26	328± 21	360± 19	338± 17
	(226± 11)	(227± 12)	(224± 8)	(225± 4)	(239± 10)*	(228± 11)
Lung(mg)	624± 40	630± 41	612± 44	608± 37	619± 35	602± 24
	(407± 24)	(412± 12)	(410± 12)	(417± 17)	(411± 20)	(406± 17)
R-Ovary(mg)	28.7± 7.1	27.5± 5.2	26.6± 4.3	28.3± 6.5	25.8± 4.4	25.6± 2.6
	(18.6± 3.7)	(18.0± 3.4)	(17.8± 2.6)	(19.3± 3.7)	(17.1± 2.8)	(17.2± 1.7)
L-Ovary(mg)	25.9± 4.2	27.2± 5.2	26.1± 2.6	24.1± 3.6	25.8± 5.5	25.7± 6.2
	(16.8± 1.9)	(17.7± 2.8)	(17.3± 2.0)	(16.5± 2.0)	(17.1± 3.6)	(17.3± 4.1)
Uterus(mg)	441± 62	416± 98	410± 99	383± 89	386± 74	400± 80
	(289± 44)	(271± 59)	(276± 70)	(262± 56)	(256± 49)	(271± 65)
R-Adrenal(mg)	19.9± 1.8	19.1± 1.9	18.0± 2.3	17.7± 1.8	20.4± 2.0	17.7± 2.5
	(13.0± 1.5)	(12.5± 1.4)	(12.1± 1.3)	(12.1± 1.0)	(13.5± 1.2)	(11.9± 1.5)
L-Adrenal(mg)	21.6± 2.1	21.7± 2.8	21.3± 2.2	20.9± 4.6	21.4± 2.3	20.3± 2.7
	(14.1± 1.3)	(14.2± 1.7)	14.3± 1.4)	(14.4± 3.5)	(14.8± 1.4)	(13.6± 1.7)
Thymus(mg)	131± 15	140± 14	135± 12	134± 12	136± 10	132± 10
	(85.5± 6.9)	(91.5± 6.6)	(90.7± 6.2)	(91.8± 8.5)	(90.0± 6.4)	(89.2± 7.1)

a) Number of rats examined.b) Absoluteweight(mean ± SD).

c) Relative weight(mg or g/100g body weight,mean ± SD).

* Significantly different from control group($p<0.05$)

Table 9. Number of Nuclei of Acinar Cells per $10^4 \mu m^2$ in Parotid Gland of Rats Fed Diets Containing Lac Colour for 13 Weeks

Sex	Dese level (%)					
	0 (control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male	45.4±3.1[a]	45.4±3.4	43.2±2.8	40.2±4.3*	23.7±4.2*	13.2±1.9*
Female	50.8±3.5	50.9±3.3	48.4±2.9	42.7±5.3*	28.5±5.3*	17.5±4.1*

a) Values are mean±SD. One slide per rat was used to count No.of nuclei/100×100 μm^2 of acinar cells, and for each slide, 5 areas were counted. Values, thus, represent means for 10 rats in each group.

* : Sgnificantly different from control ; $p<0.05$

Table 10. Incidence and Severity of Mineralisation in Kidney of Rats Fed Diet Containig Lac Colour for 13 Weeks

		Des level (%)					
Sex		0 (control)	0.313	0.625	1.25	2.5	5.0
Male		(10)[a]	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	−[b]	10	10	10	9	0	0
	±	0	0	0	1	3	3
	+	0	0	0	0	7	5
	++	0	0	0	0	0	2
Female		(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
	−[b]	0	0	0	0	0	0
	±	9	1	0	0	0	0
	+	1	5	8	5	0	0
	++	0	4	2	5	8	4
	+++	0	0	0	0	2	6

a) Number of rats examined.

b) Severity : − ; no changes, ± ;very slight, +; slight, ++: moderate
+++; severe

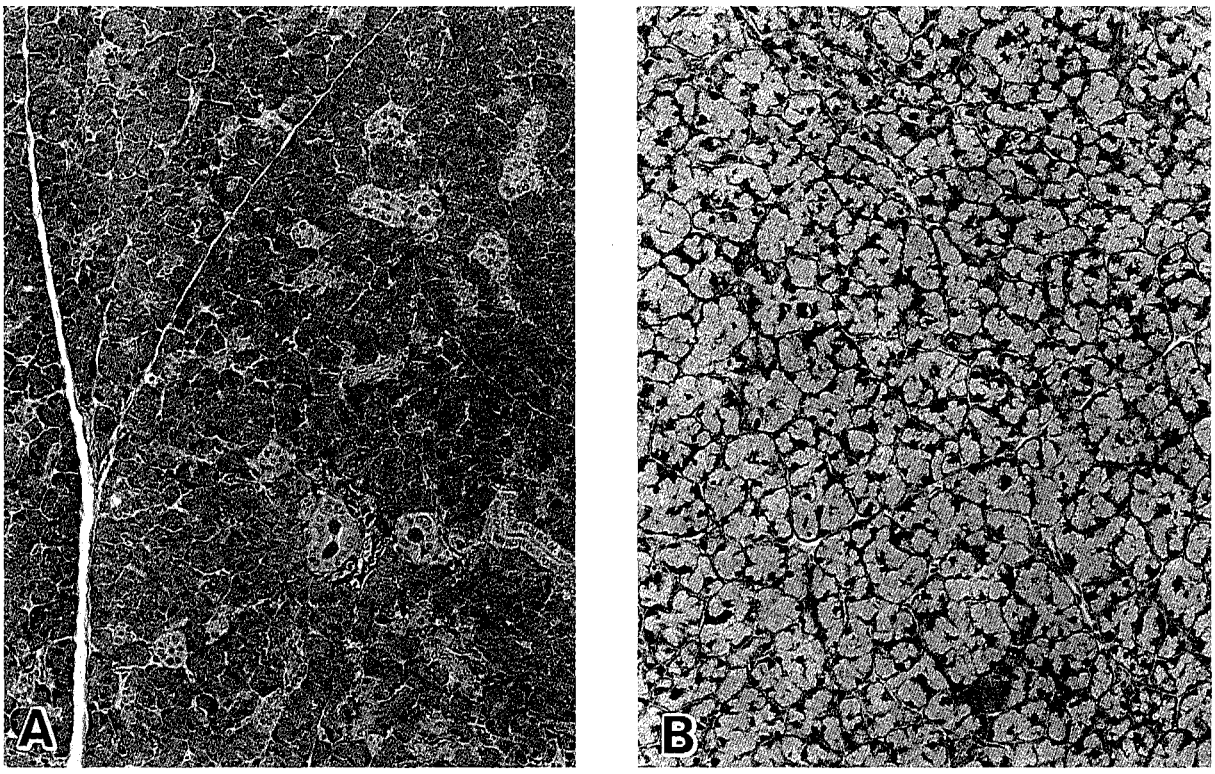


Fig. 1. Parotid gland of male rats fed the diets containing lac colour for 13 weeks.
(A) Control group. (B) 5.0% group ; diffuse hypertrophy of acinar cells.(H&E, ×120)

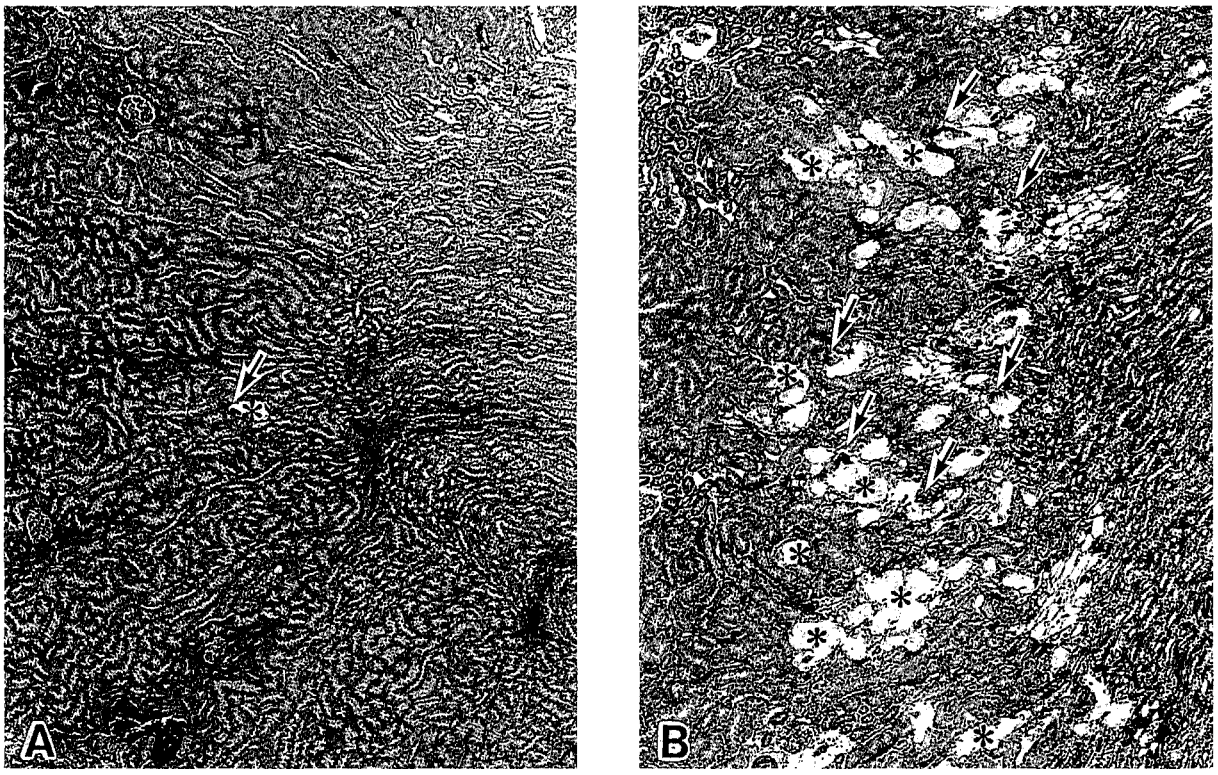


Fig.2. Kidney of female rats fed diets containig lac colour for 13 weeks.
(A) Control group. (B) 5.0% group ; marked mineralisation at cortico-medullary junction. Arrows indicate the mineral doposit and Asterisks indicate the artificial defectcs during the process of preparing tissue sections due to the mineral deposit and desquamation of epithelium.(H&E, ×48)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 267-276, 1998

天然保存料しらこたん白のラットによる亜慢性毒性試験

多田幸恵*, 池田虎雄*, 高橋　博*, 矢野範男*, 湯澤勝廣*
長澤明道*, 坂本義光*, 福森信隆*, 三栗谷久敏*, 田山邦昭*
青木直人*, 佐々木美枝子**

Subchronic Toxicity Test of Natural Preservative, Milt Protein, in Rats by Dietary Administration

YUKIE TADA*, TORAO IKEDA*, HIROSHI TAKAHASHI*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA*
AKEMICHI NAGASAWA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA*
KUNIAKI TAYAMA*, NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI**

Keywords：しらこたん白 milt protein, プロタミン protamine, ラット rat, 亜慢性毒性 subchronic toxicity, 天然保存料 natural preservative

緒　言

平成7年（1995）の食品衛生法等一部改正により，厚生大臣の指定制の範囲が，天然香料等を除くすべての添加物に拡大された．本改正に伴い，化学的合成品以外の添加物（天然香料等を除く，以下天然添加物という）については経過措置として，その範囲を既存添加物名簿に確定した上で販売・製造・輸入等を引き続き認めることとした．しかしながらこの既存添加物名簿（厚生省告示120号）[1]に掲げられた天然添加物は，各品目ごとに安全性のチェックがなされているものではなく，広く消費者等からその安全性の確認が求められている．本報告は当所のプロジェクト研究「天然添加物の品質に関する研究」の一環として行った天然保存料しらこたん白の亜慢性試験の結果である．しらこたん白は,鮭,鰊などの精巣（しらこ）中の核酸と結合した塩基性たん白を酸で分解後，中和したもので成分は塩基性たん白（プロタミン）である．プロタミンは1870年にMieschерにより発見され[2]，1896年にKosselにより抗菌作用が明らかにされた[3]．グラム陽性菌に対する抗菌性が強く[4]，熱に安定である．また中性域で抗菌効果が高く，食品の風味を損なわない等の利点を有することから，水産練り製品，総菜類等に保存料として用いられる．食品への使用濃度は700～1000ppmである．

実験方法

実験試料：製造メーカーより入手したしらこたん白抽出物（以下しらこたん白）を実験試料とした．今回用いたしらこたん白は鰊の精巣より抽出された淡黄色の粉末で，プロタミン含有量は77.5%[5]であった．

実験動物及び飼育環境：日本チャールスリバー㈱より雌雄のF344/DuCrjラットを4週齢で購入し，1週間予備飼育後，5週齢で実験に用いた．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ケージに1匹ずつ収容し，室温22～24℃，湿度50～60%，照明12時間，換気回数毎時10回のバリアー飼育室にて飼育した．

投与方法：しらこたん白の投与濃度は栄養学的に添加可能な5.0%を最高濃度とし，2.5，1.25，0.625%，の4段階とした．またしらこたん白が塩化ナトリウム(NaCl)を含有することから，しらこたん白5.0%添加時のNaCl量に相当するNaCl 0.3%群を設け，しらこたん白及びNaCl無添加の対照群を含めた6群を設定した．試料はそれぞれ各設定濃度で粉末基礎飼料CE-2（日本クレアKK）に添加した後，固形化した．

雌雄のラットを5週齢時に体重測定し，ランダム方式により各群10匹の6群に分け，対照群には基礎飼料CE-2を，投与群には添加飼料を，水道水（細菌濾過器を経由）と共に13週間自由に摂取させた．

一般症状の観察及び体重・摂餌量・摂水量の測定：試験期間中，瀕死，死亡，異常行動の有無，被毛及び可視粘

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 同所毒性部薬理研究科

Table 1. Body Weight Changes in F344 Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

Dose level(%)	Milt protein 0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	NaCl 0.3
Males						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
1 wk	104.7±6.5	104.3±6.1	103.8±4.7	104.5±4.4	104.0±6.6	104.5±5.7
2	128.5±8.3	127.9±8.5	129.5±5.3	130.4±7.8	130.9±9.8	130.7±7.4
3	154.7±11.4	153.8±12.5	156.3±8.6	158.3±10.7	160.6±13.6	157.6±8.8
4	180.2±13.9	178.5±12.6	180.2±11.9	183.0±15.2	183.8±17.3	182.4±9.6
5	200.1±15.0	199.6±12.0	200.4±14.5	201.8±17.6	201.8±19.2	202.4±10.2
6	217.8±15.6	216.4±12.1	217.3±17.3	219.2±17.3	218.6±20.8	219.6±9.1
7	230.5±15.7	228.4±12.2	228.0±17.7	233.2±17.0	231.2±21.2	232.4±9.0
8	240.6±18.0	239.1±12.8	236.7±18.5	242.9±16.5	240.6±21.9	243.2±8.8
9	249.3±19.6	249.1±14.0	247.9±19.0	253.3±17.7	250.2±23.0	252.9±8.5
10	257.2±21.2	257.5±14.9	256.1±20.6	262.7±17.9	257.9±24.1	261.8±9.6
11	262.7±22.9	264.6±14.7	261.1±21.7	268.0±17.6	263.8±24.8	266.9±7.7
12	268.7±23.4	270.4±14.9	268.5±22.1	276.4±18.5	269.9±24.3	273.8±6.6
13	274.3±22.9	278.5±14.7	273.2±21.8	281.5±18.0	275.0±24.5	280.1±7.0
Females						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
1 wk	83.5±3.0	84.2±2.8	84.0±3.6	84.3±4.2	83.9±3.5	84.3±3.5
2	97.8±4.0	99.3±3.7	100.0±3.0	99.0±5.7	99.0±3.8	98.7±3.8
3	110.4±5.3	111.5±4.2	113.7±3.8	111.8±6.7	112.7±5.0	112.1±4.3
4	118.4±6.8	121.2±4.9	123.6±5.1	122.0±7.9	123.0±5.7	122.6±4.3
5	125.3±7.9	128.9±5.4	130.5±5.5	129.9±8.6	129.4±6.4	130.5±4.7
6	130.5±7.4	135.0±6.0	137.7±5.4	136.1±8.7	135.4±7.6	137.0±6.8
7	135.2±8.2	139.2±6.1	142.5±5.4	140.9±9.0	139.6±7.6	141.8±6.6
8	138.9±9.3	142.2±6.9	146.0±6.3	143.8±10.1	142.2±7.6	145.8±7.5
9	140.9±9.9	144.4±7.0	150.0±6.9	146.8±10.3	145.2±9.0	146.8±7.4
10	142.5±10.6	145.9±6.7	152.2±8.9	149.0±11.3	147.0±8.1	149.0±8.1
11	144.7±11.4	148.5±7.0	153.9±9.8	151.0±12.0	148.8±8.4	151.5±8.3
12	147.6±11.1	150.6±6.9	155.7±9.3	153.7±12.2	150.8±7.3	153.5±9.1
13	149.4±11.6	151.6±8.4	158.0±10.3	154.9±13.5	153.0±7.5	156.4±9.0

Values are means±SD.

膜の状態等ラットの一般症状の観察を1日1回行った．また体重，摂餌量及び摂水量の測定を1週間に1回行った．

尿検査：投与期間終了時に，エームスの尿検査試験紙N-マルチスティックス（バイエル三共KK）を用い尿検査を行った．呈色の判定には尿分析装置クリニテック200＋（マイルス三共KK）を使用した．

血液検査：投与期間終了後，エーテル軽麻酔下で頸静脈より採血し，EDTA-2K処理したポリプロピレン試験管に血液を採取した．多項目自動血球計数装置E-4000（東亜医用電子KK）を用い，Table 6に示した項目につき測定を行った．またMay-Glünwald-Giemsa染色した血液塗沫標本により赤血球，白血球，血小板の形態を顕微鏡観察し，白血球百分率を算出した．

血清生化学検査：エーテル軽麻酔下で，大腿動脈及び大腿静脈切開により採血し，3000rpm10分間遠心分離した血清で，日立自動分析装置Automatic Analyzer 7150を用い，Table 7に示した項目につき測定を行った．

病理検査：採血後，ラットを解剖，肉眼観察し，Table 8に示した器官を摘出後，重量測定し，体重100gあたりの体重比重量を算出した．この他，下垂体，甲状腺，リンパ節，顎下腺，舌下腺，耳下腺，食道，胃，大腸，小腸，膵臓，膀胱，包皮腺，陰核腺，乳腺，皮膚，筋肉及び大腿骨を摘出し，10%中性緩衝ホルマリン液で固定後，定法に従いパラフィン包埋し，薄切後H&E染色し，光学顕微鏡で観察した．

統計学的分析：測定値の統計学的分析は，Scheffeの多重比較検定[6]を用いて行った．

Table 2. Food Consumption in F344 Male Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

	Milt protein					NaCl
Dose level(%)	0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	0.3
No. of rats	10	10	10	10	10	10
1 wk	9.8±0.7a)	10.9±1.0	11.4±1.2*	10.7±0.6	10.0±0.8	10.1±0.7
	2.4±0.4b)	2.1±0.7	2.2±0.9	2.1±0.3	1.8±0.7	2.3±0.5
2	11.8±0.8	11.5±1.1	11.6±0.9	12.0±0.8	11.9±0.8	11.8±0.9
	2.5±0.5	2.4±0.6	1.9±0.6	2.1±0.5	1.8±0.7*	2.5±0.5
3	12.5±1.3	12.5±1.1	12.6±1.0	13.1±1.3	12.5±1.0	12.6±0.8
	2.7±0.8	2.5±1.0	2.0±0.5	2.6±0.8	2.3±0.5	2.5±0.8
4	13.2±0.9	12.9±0.9	13.2±1.3	13.3±1.4	13.0±1.2	13.1±0.9
	2.6±0.7	2.6±0.9	1.7±0.6*	2.0±0.6	1.6±0.7*	2.1±0.6
5	13.2±0.8	13.5±1.3	12.9±1.3	13.1±1.3	12.6±1.0	13.1±1.1
	2.4±0.7	2.4±0.7	1.8±0.5	1.9±0.8	1.9±0.6	2.3±0.7
6	13.0±1.1	13.1±0.9	12.8±1.4	13.1±1.2	12.8±1.2	12.7±0.7
	2.5±0.6	2.5±0.6	1.6±0.7*	1.9±0.5	1.8±0.6*	2.4±0.5
7	12.7±0.8	12.7±0.8	12.5±0.9	12.8±1.0	12.6±1.5	12.5±0.7
	2.8±0.9	2.5±0.6	1.8±0.5*	2.2±0.8	2.1±0.8	2.4±0.7
8	12.3±0.9	12.2±1.3	12.6±1.3	12.3±1.1	12.4±1.2	12.3±0.4
	2.3±0.9	2.2±0.5	1.7±0.6	2.0±0.8	1.8±0.5	2.2±0.7
9	12.6±1.2	12.6±0.8	12.7±0.9	12.8±1.1	12.7±0.8	12.5±1.0
	3.3±1.1	2.3±0.8	1.7±0.4*	2.2±0.6	2.0±0.7*	2.5±0.5
10	12.9±0.9	12.9±1.0	12.6±1.3	12.6±0.9	12.5±1.1	12.7±0.8
	2.8±0.6	2.5±0.7	1.9±0.6*	1.8±0.7*	2.0±0.5*	2.4±0.6
11	12.0±1.1	12.4±0.6	11.9±1.6	12.1±0.8	12.3±0.9	12.1±0.4
	2.4±1.1	1.9±0.4	1.6±0.6	1.9±0.6	2.0±0.8	1.9±0.7
12	12.8±1.6	12.6±0.7	12.5±1.1	12.6±0.8	12.1±1.2	12.3±0.8
	2.4±0.9	2.5±0.9	1.4±0.6*	2.1±0.5	2.0±0.6	2.0±0.5
13	12.1±1.1	12.7±0.8	12.8±1.1	12.4±0.7	12.0±0.9	12.2±0.7
	2.3±0.6	2.3±0.6	1.9±0.4	1.9±0.6	1.8±0.8	2.2±0.5

Values are means ±SD. *$p<0.05$ *v.* controls (Scheffe's test).

a) Food consumption (g/rat/day) b) Weight of broken food in a dish under a cage (g/rat/day)

結　果

一般症状：投与期間中，全群に死亡例はなく，また症状観察で異常な所見を示した個体はなかった．

体重，摂餌量及び摂水量：平均体重をTable 1に，摂餌量をTable 2, 3に示した．体重及び摂餌量はしらこたん白あるいはNaCl投与により明らかな変化を示さなかった．

摂水量をTable 4に示した．雌雄のしらこたん白投与群(以下しらこ群)で，投与開始時より，用量相関性に摂水量の有意な増加がみられた．雌雄のNaCl投与群（以下

Table 3. Food Consumption in F344 Female Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

	Milt protein					NaCl
Dose level(%)	0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	0.3
No. of rats	10	10	10	10	10	10
1 wk	7.1±0.5a)	8.9±2.3*	8.9±0.3*	8.1±0.7*	7.6±0.4	7.1±0.8
	1.7±0.4b)	2.1±0.8	1.2±0.4	1.5±0.6	1.3±0.6	2.1±1.1
2	8.5±0.8	8.5±1.0	9.3±0.5	8.8±1.1	9.1±0.5	8.8±0.4
	1.6±0.3	1.4±0.4	1.6±0.6	1.7±0.7	1.4±0.5	2.3±1.2
3	8.6±0.6	8.9±0.2	9.1±0.5	8.9±0.5	9.1±0.7	8.9±0.3
	1.9±0.5	1.7±0.3	1.9±0.7	1.8±0.3	1.8±0.8	2.2±1.0
4	8.6±0.8	9.2±0.8	9.3±0.5	9.2±0.5	9.1±0.7	9.2±0.5
	1.8±1.1	1.7±0.6	1.6±0.6	1.9±0.9	1.3±0.7	2.1±0.7
5	8.7±0.7	9.2±0.5	9.0±0.7	9.0±0.6	9.0±0.6	8.7±0.6
	1.8±0.6	2.0±0.6	1.6±0.6	1.5±0.6	1.6±0.6	2.2±0.9
6	8.9±0.7	8.9±0.6	8.9±0.8	8.9±0.5	8.7±0.9	9.2±0.8
	2.0±0.6	2.1±0.5	1.5±0.5	1.5±0.6	1.5±0.6	2.3±0.7
7	8.2±0.8	8.7±0.8	9.0±0.7	8.8±0.8	8.4±0.8	8.7±0.6
	1.6±0.5	1.6±0.3	1.5±0.5	1.8±0.6	1.3±0.4	2.1±0.6
8	8.2±0.9	8.1±0.5	8.5±0.7	8.3±0.8	8.4±0.7	8.3±0.9
	1.6±0.7	1.4±0.8	1.6±0.9	1.8±0.7	1.3±0.5	2.0±0.5
9	8.1±0.9	8.2±0.8	8.6±0.6	8.1±0.8	7.7±0.7	8.2±0.4
	1.7±0.7	1.4±0.6	1.4±0.4	1.4±0.6	1.1±0.6	1.8±0.5
10	8.2±0.8	8.0±0.8	8.4±0.8	8.6±0.4	8.2±0.6	8.4±0.7
	1.7±0.4	1.6±0.7	1.3±0.6	1.2±0.4	0.9±0.4*	1.9±0.9
11	8.1±0.7	8.0±0.6	8.3±1.0	8.3±0.9	8.0±0.6	8.2±0.7
	1.6±0.7	1.1±0.4	1.3±0.5	1.3±0.6	1.0±0.3	1.9±1.2
12	8.3±1.2	8.2±1.1	9.0±0.9	8.3±0.8	8.0±1.3	8.3±0.4
	1.8±0.7	1.3±0.5	1.5±0.5	1.4±0.6	1.6±1.7*	1.9±0.8
13	8.5±0.7	7.4±0.9*	8.5±0.9	7.9±1.0	8.0±0.6	8.5±0.6
	1.9±0.6	1.2±0.5*	1.1±0.4*	1.3±0.8	1.1±0.7*	1.6±0.6

Values are means±SD. *$p<0.05$ *v.* controls (Scheffe's test).

a) Food consumption (g/rat/day) b) Weight of broken food in a dish under a cage (g/rat/day)

NaCl群）は対照群に比較しやや高い値を示したが，有意差は認められなかった．

尿検査：尿検査結果をTable 5に示した．しらこたん白及びNaCl投与による明らかな変化はみられなかった．

血液検査：血液検査の結果をTable 6に示した．雌雄のしらこ群でWBCの減少，雄のしらこ群でPlの増加がみられた．白血球百分率は，雌雄のしらこ群で，好中球の比率が高く，リンパ球の比率が低い値を示した．白血球百分率より好中球数及びリンパ球数を算出すると，好中球数は対照群としらこ群でほぼ近い値を示したのに対し，

Table 4. Water Consumption in F344 Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

Dose level(%)		Milt protein 0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	NaCl 0.3
Males							
No. of rats		10	10	10	10	10	10
1	wk	16.0±1.3a)	15.7±1.8	16.6±1.1	18.1±1.7	18.2±2.3	16.6±1.1
2		15.9±1.2	15.2±1.3	15.5±1.6	19.5±8.8	19.0±2.0*	16.2±1.4
3		15.9±1.8	16.8±1.5	17.0±1.6	19.1±2.2*	19.6±2.6*	16.6±1.2
4		17.1±1.1	17.0±1.1	18.3±2.3	19.4±2.3	20.2±2.8*	17.4±1.5
5		17.1±1.8	18.0±1.8	17.8±2.7	18.7±2.5	20.2±2.7*	17.5±1.7
6		17.0±1.6	17.8±1.7	18.1±3.1	18.6±2.5	19.6±2.7	17.7±1.4
7		16.5±1.4	18.0±1.6	18.3±4.3	18.5±2.1	19.4±2.6*	17.0±0.5
8		15.8±1.3	16.7±1.9	18.1±3.7	17.5±2.5	19.1±2.7*	16.0±0.7
9		15.9±1.1	17.4±1.4	16.8±1.7	17.5±2.0	18.4±2.5*	16.9±1.3
10		15.2±0.8	16.7±0.9	16.9±1.6	16.9±2.1	18.5±3.2*	16.2±1.4
11		15.6±1.6	16.9±1.4	16.4±2.2	17.7±2.4	18.2±2.1*	16.5±1.0
12		15.7±1.2	17.5±0.7	16.8±2.1	17.9±3.0	18.0±2.4	16.1±0.9
13		15.2±1.9	17.7±1.9*	16.6±1.3	17.4±2.0	18.2±2.9*	16.1±1.1
Females							
No. of rats		10	10	10	10	10	10
1	wk	12.8±1.1a)	13.8±0.6	14.6±1.0*	14.4±1.0*	15.6±1.2*	14.2±1.7
2		12.7±1.6	12.7±2.0	14.9±1.0*	14.1±1.5	15.9±1.3*	13.6±1.0
3		13.5±1.4	13.1±1.1	14.8±1.5	15.1±1.1*	16.3±1.4*	14.6±1.1
4		13.8±1.8	14.1±1.4	15.0±1.4	15.7±1.9	15.8±1.9	14.8±1.3
5		13.0±1.6	13.8±1.1	14.7±1.6	14.0±0.8	15.4±2.1*	14.1±1.1
6		13.7±2.4	13.3±1.2	14.4±1.7	15.1±1.9	15.1±1.6	14.1±1.2
7		12.7±2.0	12.6±1.5	13.7±1.0	14.4±2.1	14.3±2.0	13.9±1.7
8		12.8±1.9	12.5±1.1	13.5±1.8	13.7±1.7	14.0±2.0	13.7±1.6
9		12.7±1.5	12.0±1.6	14.0±3.8	13.3±1.2	13.3±1.5	13.9±3.0
10		12.7±2.2	12.2±1.7	14.1±3.7	13.9±2.0	13.7±1.3	13.2±1.5
11		12.8±1.5	11.8±1.2	12.6±1.9	13.3±1.7	13.3±1.0	12.7±1.2
12		13.0±1.6	12.4±1.8	14.8±4.3	13.8±2.4	13.7±1.5	13.4±1.3
13		13.6±2.3	11.5±1.3	13.1±2.2	13.6±2.9	13.4±1.7	13.5±1.7

Values are means ± SD. *$p<0.05$ *v.* controls(Scheffe's test).
a) Water consumption(g/rat/day)

リンパ球数は，しらこ群で低い値を示した．雌雄のNaCl群でもWBCの減少が見られたが，軽度な変化であった．赤血球，白血球及び血小板の形態に，変化はみられなかった．

血清生化学検査：生化学検査の結果をTable 7に示した．対照群と比較し有意な増加が認められたのは，雌雄のしらこ群のNa，雄のしらこ群及びNaCl群のCl，雌のしらこ5.0%群のUNであった．有意な減少あるいは活性の低下が認められたのは，雌雄のしらこ群のALP, AST, CA, F-CHO, GGT, GLU, LDH, PL, UA, 雄のしらこ群のALT, LAP, TG, K, 雄のNaCl群のAST, CA, F-CHO, 雌のNaCl群のIPであった．

病理検査：最終体重及び器官重量をTable 8に示した．対照群と比較し，雌雄のしらこ群で肝臓の絶対重量及び相対重量の低下が認められた．また雌雄のしらこ5.0%群で，腎臓の絶対重量及び相対重量の増加が，雄のしらこ群で胸腺の相対重量の増加が認められた．解剖時の肉眼検査では，雌雄のラット数例の肝臓正中葉に肝組織の小隆起が認められた．また雌のラット数例の子宮に軽度な腫脹が認められた．これらの変化はしらこたん白及びNaClの投与に関連無く対照群にも観察された．

顕微鏡による組織検索では，投与に関連した変化として，雌雄の2.5及び5.0%しらこ群で肝細胞の軽度な萎縮，それに伴う類洞の拡張がみられた．重量測定で増加が認められた雌雄のしらこ5.0%群の腎臓，雄のしらこ群の胸腺では，変化が認められなかった．しらこたん白及び

Table 5. Urinalysis for F344 Rats fed Milt Protein(Protamine) for 13 weeks

		Males						Females					
		Milt protein					Nacl	Milt protein					NaCl
Dose level(%)		0	0.625	1.25	2.5	5.0	0.3	0	0.625	1.25	2.5	5.0	0.3
No. of rats		10	10	10	10	9	10	10	10	9	9	10	10
PH	5.5							1					
	6.0							4			1		2
	6.5	1	1	3	2	1	3	2	2	1	3	1	2
	7.0	5	7	4	6	4	4	2	6	6	2	5	5
	7.5	3	1	3	1	4	1	1	2	2	3	4	1
	8.0	1	1		1		2						
Protein	−						1			3		1	2
	±				1				3			2	1
	+	7	6	5	4	2	4	10	7	6	9	7	7
	++	3	4	5	5	7	5						
Glucose	−	10	10	10	10	9	10	10	10	9	9	10	10
Bilirubin	−	10	9	10	9	9	10	8	10	9	8	9	9
	+		1		1			2			1	1	1
Ketones	−	2	1	3			2	7	6	7	9	10	8
	±	7	6	6	8	7	4	3	4	2			2
	+	1	3	1	2	2	4						
Occult blood	−	7	9	8	9	8	10	10	10	9	9	10	10
	±	3	1	1	1	1							
	+			1									

Values are numbers of mice

NaClの投与に関連無く見られた変化として，雌雄の肝臓に細胞浸潤及び肝細胞の小増生巣，雄の腎臓に尿細管の好塩基性化，雌の腎臓に石灰沈着等，自然発生病変が認められた．

考　察

今回の試験期間中，全群で死亡例はなく，一般症状においても異常は見られなかった．今回の投与条件下でしらこたん白に致死作用はないと考えられる．

摂水量測定の結果，雌雄のしらこ群で用量相関性に摂水量の増加が認められた．今回試料として用いたしらこたん白には，NaClが含有されていたため，摂水量の増加はNaClが原因であろうと思われたが，NaCl群では摂水量の増加が顕著でなく，対照群との比較で有意差がみられなかった．しらこ群での摂水量の増加は食塩の影響ばかりでなく，しらこたん白自体の影響によるものと考えられる．

今回の尿検査ではしらこたん白投与による尿中成分の変化は見られず，腎臓の糸球体及び尿細管の変化も観察されなかった．摂水量の増加に伴う尿量の変化，24時間尿における尿中成分の変化を観察するためには，代謝ケージを用いた検討が必要であろうと思われる．

血清生化学検査で，雌雄のしらこ群のALP, AST, GGT及びLDHの活性に有意な低下がみられた．これらの酵素活性は，心臓，肝臓，筋あるいは骨等の障害時に上昇を示すことが知られているが，今回のように活性低下を示すのは興味深い．これらの酵素活性低下の原因として，しらこたん白による酵素の合成阻害，酵素活性の阻害あるいは補酵素の阻害等が考えられるが，しらこたん白がどの段階に作用したかは明らかでない．また雌雄のしらこ群のF-CHO，PL及びTGに有意な減少が認められ，しらこたん白が脂質代謝に影響を与えたことを示唆していた．

雌雄のしらこ群で肝臓の絶対重量及び相対重量の低下がみられ，肝臓の組織検索で，肝細胞の軽度な萎縮及び

Table 6. Hematological Findings for F344 Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

Dose level(%)	Milt protein 0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	NaCl 0.3
Males						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
RBC($x10^6/\mu l$)	9.79±0.27	9.77±0.18	9.89±0.21	9.73±0.19	9.90±0.14	9.59±0.27
Hgb(g/dl)	16.7±0.4	16.7±0.2	16.8±0.3	16.7±0.3	17.0±0.2	16.6±0.3
PCV(%)	49.1±1.5	48.6±0.6	48.9±1.0	48.2±0.8	49.2±0.5	48.2±1.4
MCV(fl)	50.2±0.3	49.7±0.5	49.5±0.3*	49.5±0.4*	49.6±0.5*	50.2±0.5
MCH(pg)	17.1±0.2	17.1±0.2	17.0±0.2	17.2±0.2	17.1±0.2	17.4±0.2*
MCHC(g/dl)	34.1±0.5	34.4±0.4	34.4±0.3	34.7±0.4*	34.6±0.1*	34.6±0.4*
Plt($x10^3/\mu l$)	564±67	568±65	660±54*	655±52*	637±38*	547±64
WBC($x10^3/\mu l$)	8.1±1.0	6.2±0.6*	5.5±0.9*	5.5±0.7*	5.5±0.6*	6.8±0.9*
WBC differentials						
Neutrophils(%)	12.3±4.4	19.0±4.6*	17.0±4.1	17.6±6.0	19.0±6.9*	10.5±3.9
Lymphocytes(%)	86.4±4.9	78.6±5.8*	81.2±3.7	81.0±6.7	79.1±6.6*	87.4±4.2
Monocytes(%)	0.6±0.8	1.3±1.0	1.2±0.8	1.1±1.0	1.3±1.0	1.6±2.8
Eosinophils(%)	0.7±0.7	1.1±1.5	0.6±0.8	0.3±0.7	0.6±0.7	0.5±0.7
Basophils(%)	0	0	0	0	0	0
Females						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
RBC($x10^6/\mu l$)	9.28±0.18	9.09±0.18	9.11±0.16	9.10±0.16	9.24±0.18	8.93±0.11*
Hgb(g/dl)	16.9±0.2	16.6±0.4	16.6±0.3	16.6±0.3	16.8±0.2	16.6±0.3
PCV(%)	49.0±0.8	47.8±1.0	47.7±0.8	47.5±0.7*	47.8±0.9	47.3±0.7*
MCV(fl)	52.8±0.3	52.5±0.3	52.4±0.3	52.2±0.4*	51.8±0.5*	52.9±0.2
MCH(pg)	18.2±0.2	18.2±0.2	18.3±0.2	18.3±0.1	18.2±0.3	18.6±0.2*
MCHC(g/dl)	34.5±0.3	34.7±0.5	34.8±0.5	35.0±0.3	35.1±0.5	35.1±0.5
Plt($x10^3/\mu l$)	625±60	595±106	682±50	665±49	658±54	634±42
WBC($x10^3/\mu l$)	7.3±1.0	5.3±0.6*	6.4±1.1	6.1±1.1	5.6±0.5*	6.3±0.9
WBC differentials						
Neutrophils(%)	13.0±3.3	16.3±4.3	20.1±4.0	13.8±6.1	15.9±5.3	15.1±5.4
Lymphocytes(%)	85.5±3.6	81.6±5.0	78.9±4.4	84.7±6.3	82.5±6.0	83.3±5.6
Monocytes(%)	1.1±1.0	1.3±1.1	0.9±0.7	0.9±0.6	0.8±0.8	0.6±0.7
Eosinophils(%)	0.4±0.7	0.8±0.9	0.1±0.3	0.7±0.7	0.8±1.3	1.0±1.1
Basophils(%)	0	0	0	0	0	0

Abbreviations:RBC=red blood cells; Hgb=hemoglobin; PCV=packed cell volume; MCV=mean corpuscular volume MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC=white blood cells Plt=platelets.

Values are means±SD. *$p<0.05$ *v.* controls(Scheffe's test).

類洞の拡張が認められた．これらの所見はしらこたん白による肝臓の機能低下を示唆していた．しかしながら肝臓で合成されるALB, CHE, CRE及びTPに変化がみられなかったことから，しらこたん白が肝臓に与えた影響は軽度な変化であったと思われる．

しらこたん白の主成分であるプロタミンは，食品添加物として用いられるだけでなく，医薬品としても使用されており[7]，プロタミンの生体に及ぼす影響に関してはいくつか報告がある[8-15]．Messinaらはラットの腎臓に硫酸プロタミンを灌流し，糸球体上皮細胞足突起の変化及びタンパク尿を観察し[8]，Jaquesはイヌ，ネコ，ウサギ，モルモットにプロタミンを静注し，血圧の降下及びWBC, Plの減少を報告した[10]．これらの実験は医薬品としてのプロタミンの適用法に基づいた実験であり，投与経路は静脈内投与がほとんどである．これに対し今回のしらこたん白（プロタミン）の投与試験は添加物としての摂取経路である経口投与を用いて行った実験である．これまでに報告されたタンパク尿，肺への影響あるいはPlの減少等は認められなかった．プロタミンによる生体影響は，投与経路により異なることが考えられる．

Table 7. Serum Chemistry for F344 Rats fed Milt Protein (Protamine) for 13 weeks

Dose level(%)	Milt protein 0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	NaCl 0.3
Males						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
ALB(g/dl)	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1
ALP(IU/l)	577±45	553±40	498±35*	511±47*	498±48*	549±40
ALT(IU/l)	77±19	67±16	55±9*	59±15*	55±8*	68±9
AMY(IU/l)	1576±42	1538±81	1628±150	1592±92	1608±146	1530±129
AST(IU/l)	151±23	117±23*	102±16*	100±19*	96±13*	126±14*
BIL(mg/dl)	0.04±0	0.04±0	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.04±0
CA(mg/dl)	10.3±0.2	9.9±0.2*	9.6±0.2*	9.8±0.2*	10.0±0.1*	10.0±0.1*
CHE(ΔpH)	0.12±0.03	0.10±0.03	0.11±0.02	0.11±0.02	0.10±0.02	0.12±0.02
T-CHO(mg/dl)	59±5	55±3	56±6	56±4	54±3	56±3
F-CHO(mg/dl)	14±2	11±1*	10±1*	9±1*	8±1*	12±1*
CRE(mg/dl)	0.51±0.03	0.51±0.02	0.54±0.03	0.52±0.06	0.53±0.04	0.50±0.03
GGT(IU/l)	5.4±0.6	4.1±1.0*	3.8±0.5*	3.4±0.5*	3.5±0.5*	5.2±0.6
GLU(mg/dl)	191±15	186±10	181±8	174±7*	186±8	180±15
IP(mg/dl)	6.4±0.7	6.2±0.3	6.2±0.6	6.1±0.3	6.5±0.4	6.0±0.3
LAP(GR-U)	193±12	184±4	185±8	179±5*	184±7*	187±7
LDH((IU/l)	1560±242	1000±317*	1048±246*	893±93*	867±117*	1166±186
PL(mg/dl)	152±9	142±10	125±13*	122±6*	124±8*	144±8
TG(mg/dl)	153±28	112±38*	61±31*	63±13*	74±18*	150±26
TP(g/dl)	6.4±0.2	6.3±0.2	6.3±0.2	6.2±0.1	6.3±0.1	6.3±0.1
UA(mg/dl)	1.6±0.4	1.0±0.1*	1.2±0.3	0.9±0.1*	1.1±0.2*	1.3±0.3
UN(mg/dl)	24.5±1.3	23.4±1.0	24.4±1.9	24.6±2.2	26.2±2.3	24.2±1.8
Cl(mEq/l)	101.6±1.0	103.2±0.8*	104.4±1.2*	104.6±0.9*	105.1±1.4*	103.1±0.8*
K(mEq/l)	5.22±0.35	4.80±0.36*	5.09±0.25	4.93±0.12	4.76±0.25*	5.02±0.31
Na(mEq/l)	138.6±1.6	140.3±2.5	140.6±1.1*	140.4±0.5*	141.7±1.0*	139.1±1.0
Females						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
ALB(g/dl)	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.7±0.1
ALP(IU/l)	487±69	480±40	453±39	447±43	423±44*	455±39
ALT(IU/l)	51±8	46±6	51±9	51±8	47±3	58±8
AMY(IU/l)	1100±134	1131±115	1076±85	1064±85	1094±96	1089±154
AST(IU/l)	120±30	95±10	92±14*	101±28	88±5*	128±16
BIL(mg/dl)	0.05±0.01	0.04±0	0.04±0	0.04±0.01	0.04±0	0.04±0.01
CA(mg/dl)	10.1±0.2	10.0±0.2	9.7±0.2*	9.5±0.3*	9.4±0.1*	10.0±0.1
CHE(ΔpH)	0.91±0.17	0.97±0.11	0.94±0.10	0.88±0.10	0.89±0.15	0.98±0.08
T-CHO(mg/dl)	69±6	67±3	66±4	62±4*	65±4	68±3
F-CHO(mg/dl)	15±2	13±1*	14±1	12±2*	13±1*	15±1
CRE(mg/dl)	0.49±0.06	0.50±0.03	0.49±0.02	0.52±0.05	0.52±0.10	0.52±0.03
GGT(IU/l)	3.3±0.5	2.5±0.2*	2.8±0.2	2.7±0.4	2.1±0.5*	3.0±0.3
GLU(mg/dl)	181±9	178±6	162±7*	173±9*	164±6*	181±4
IP(mg/dl)	5.5±0.4	4.9±0.5*	6.2±0.6*	5.6±0.6	5.6±0.4	4.9±0.5*
LAP(GR-U)	193±13	189±14	187±9	188±9	187±8	185±6
LDH(IU/l)	1318±459	819±190*	852±164*	993±402	761±70*	1249±211
PL(mg/dl)	151±10	149±9	138±8*	132±8*	146±9	147±9
TG(mg/dl)	44±21	33±11	20±4*	31±12	60±22	36±19
TP(g/dl)	5.9±0.1	6.0±0.1	6.1±0.2*	5.9±0.2	5.9±0.1	6.1±0.2*
UA(mg/dl)	1.5±0.3	1.2±0.2	1.0±0.2*	1.2±0.4	0.9±0.1*	1.5±0.3
UN(mg/dl)	22.6±1.9	22.0±1.7	21.8±2.0	23.3±2.7	27.7±4.7*	22.2±1.5
Cl(mEq/l)	106.3±1.5	107.5±1.3	106.8±1.0	107.4±1.4	107.0±1.4	107.4±0.9
K(mEq/l)	4.53±0.22	4.44±0.22	4.62±0.20	4.50±0.40	4.35±0.17*	4.68±0.29
Na(mEq/l)	141.7±1.2	142.4±1.3	142.4±1.0	142.1±1.4	143.2±1.6*	141.4±0.8

Abbreviations:ALB=albumin; ALP=alkalinephosphatase; ALT=L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase AMY=amylase; AST=L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase; BIL=bilirubin; CA=catecholamine; CHE=cholinesterase; T-CHO=total cholesterol; F-CHO=free cholesterol; CRE=creatinine; GGT=γ-glutamyl transpeptidase; GLU=glucose; IP=inorganic phosphate; LAP=leucine aminopeptidase; LDH=lactic dehydrogenase; PL=phospholipids; TG=triglycerides; TP=total protein; UA=uric acid; UN=urea nitrogen; Cl=chlorine; K=kalium; Na=natrium.
Values are means±SD. *$p<0.05$ *v.* controls(Scheffe's test).

Table 8. Final Body and Organ Weights for F344 Rats fed Milt Protein(Protamine) for 13 weeks

Dose level(%)	Milt protein 0(cont.)	0.625	1.25	2.5	5.0	NaCl 0.3
Males						
No. of rats	10	10	10	10	10	10
Final body weight(g)	278±24	281±15	274±23	285±18	277±25	283±9
Absolute organ weights						
Brain(mg)	1941±42	1901±48	1924±27	1946±32	1944±54	1920±39
Heart(mg)	782±53	821±46	779±63	794±70	777±67	808±40
Lung(mg)	862±53	860±49	869±46	871±74	844±66	852±44
Thymus(mg)	145±25	162±18	157±24	172±18	168±16	162±18
Spleen(mg)	536±40	563±30	553±49	602±138	542±57	552±35
Liver(g)	9.35±0.89	9.26±0.78	8.16±0.69*	8.70±0.67	8.53±1.03	9.40±0.57
Kidneys(mg)	1726±137	1766±96	1720±112	1804±131	1845±182	1752±74
Adrenal gl.(mg)	37±3	37±2	36±2	36±3	36±3	38±4
Testes(mg)	2883±78	2931±66	2944±105	2952±159	2898±120	2897±110
Prostate gl.(mg)	272±69	286±39	265±19	261±48	245±45	293±53
Relative organ weights(/100g body weight)						
Brain(mg)	702±56	678±37	706±60	684±35	706±56	679±22
Heart(mg)	282±10	292±11	285±13	278±14	281±13	285±11
Lung(mg)	310±15	306±14	318±15	305±20	305±16	301±15
Thymus(mg)	52±7	58±5	57±5	60±4*	61±3*	57±6
Spleen(mg)	193±8	201±13	202±8	209±34	196±6	195±10
Liver(g)	3.36±0.16	3.29±0.18	2.98±0.07*	3.05±0.11*	3.07±0.16*	3.32±0.15
Kidneys(mg)	620±18	627±15	629±34	634±47	666±21*	619±21
Adrenal gl.(mg)	13±1	13±1	13±2	13±1	13±1	13±1
Testes(mg)	1042±80	1045±54	1080±79	1037±56	1051±62	1024±43
Prostate gl.(mg)	98±24	102±13	97±11	91±16	88±11	104±19
Females						
No.of rats	10	10	10	10	10	10
Final body weight(g)	150±11	151±9	159±9	155±13	153±8	157±9
Absolute organ weights						
Brain(mg)	1785±31	1776±27	1781±31	1794±29	1775±32	1799±33
Heart(mg)	497±29	490±31	513±33	493±47	507±29	505±29
Lung(mg)	644±30	608±31	654±27	630±47	617±30	648±29
Thymus(mg)	125±9	125±11	133±18	137±16	134±11	131±15
Spleen(mg)	361±31	355±19	404±37*	374±30	363±18	363±22
Liver(g)	4.61±0.28	4.61±0.33	4.55±0.31	4.40±0.52	4.23±0.57	4.85±0.31
Kidneys(mg)	1084±31	1069±63	1078±54	1114±90	1195±93*	1076±38
Adrenal gl.(mg)	41±3	44±5	43±2	43±4	42±4	43±7
Uterus(mg)	419±79	455±114	480±90	443±74	408±102	429±89
Ovaries(mg)	57±8	51±4	59±9	61±7	55±5	56±4
Relative organ weights(/100g body weight)						
Brain(mg)	1194±82	1182±73	1124±72	1162±87	1162±66	1151±67
Heart(mg)	332±18	326±22	323±16	317±11	332±24	323±21
Lung(mg)	430±25	404±26	412±20	407±21	404±26	415±23
Thymus(mg)	84±9	83±7	84±9	88±6	88±7	84±10
Spleen(mg)	240±9	235±6	254±18	241±10	237±14	232±12
Liver(g)	3.08±0.19	3.05±0.09	2.86±0.11*	2.83±0.14*	2.76±0.34*	3.09±0.14
Kidneys(mg)	725±47	709±23	679±37	718±16	782±64	688±27
Adrenal gl.(mg)	27±3	29±3	27±2	28±2	27±2	28±4
Uterus(mg)	279±46	301±73	302±55	287±54	268±70	274±58
Ovaries(mg)	38±4	34±3	37±5	39±4	36±4	37±2

Values are means±SD. *$p<0.05$ *v.* controls(Scheffe's test).

今回，しらこたん白の経口投与により摂水量の増加，WBCの減少，血清中の酵素活性の低下及び脂質濃度の減少，肝重量の減少，肝細胞の萎縮，それに伴う類洞の拡張等が認められた．今回観察されたしらこたん白投与による生体の反応は，比較的軽度な変化であった．

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) Miescher, F: *Hoppe-Seylers Medic-Chem*, Unter Suchungen Berlin, S441, 1870.
3) Kossel, A: *Z. Physiol.Chem.* **22**, 176, 1896.
4) Miller, B.F. et al.: *Science*, **86**, 428, 1942.
5) 広門雅子, 平田恵子, 植松洋子他：東京衛研年報, **47**, 175-181, 1996.
6) Gad S.C. and Weil C.S.：Statistics for toxicologists, Hyes A.W., *Principles and Methods of Toxicology*, 273-320, 1982, Raven Press, New York.
7) 野崎一彦：プロタミンの性状と応用, 別冊フードケミカル5保存料総覧, 77-78, 1993, 食品化学新聞社.
8) Messina, A., Davies, D.J. and Ryan, G.B.: *J.Pathol.*, **158**, 147-156, 1989.
9) Saitou,T., Yamakage,K., Kurosawa,K. *et al.*: *Tohoku J.Exp.Med.*, **136**, 461-462, 1982.
10) Jaques,L.B.: *Br.J.Pharmacol.*, **4**, 135-144, 1949.
11) Mondhiry, A.H., Pierce, W.S. and Basarab, R.M.: *Thromb. Haemost.*, **53**, 60-64, 1985.
12) Horrow, J.C.: *Anesth. Analg.* **64**, 348-361, 1985.
13) Alvarez, E.J. and Villar, L.J.M.: *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.*, **33**, 349-355,1986.
14) Koslow, A.R., DeFour, D.O., Farid, M.D. *et al.*: *Curr.Surg.*, **44**, 219-224, 1987.
15) Wang, Z., Liu,Z., Zhang, X. et al.: *Hua. Hsi. I.Ko. Ta. Hsueh. Pao.*, **23**, 272-275, 1992.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 277-280, 1998

マウスを用いた混餌法によるイマザリルの発生毒性試験

田中豊人*, 高橋　省*, 大石眞之*

Developmental Toxicity Study of Imazalil Administered to Mice in the Diet

TOYOHITO TANAKA*, OSAMU TAKAHASHI*, and SHINSHI OISHI*

Imazalil was given in the diet to provide levels of 0 (control), 0.024, 0.06, 0.15 % from 4 to 18 days of gestation in pregnant mice, and the females were killed on day 18 of gestation. The dams were examined for the number of implantation and resorption sites, and foetuses. The total number of anomalous foetuses was significantly increased in the middle-dose group, and the number of foetuses with talipes varus or manus vara was significantly increased in the middle- and high-dose groups. Nevertheless, the spontaneous incidence of these malformations is similar in background data. Imazalil produced no adverse effects on other maternal or foetal parameters.

Keywords：イマザリル imazalil, エニルコナゾール enilconazole, 発生毒性 developmental toxicity, 外表奇形 external malformation, マウス mice

緒　言

防カビ剤1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(propenyloxy) ethyl]-1-*H*-imidazole別名1-[β-(alloxy)-2,4-dichlorphenylethyl]-imidazoleは，農薬としてはイマザリルという名前で，動物用医薬品ではエニルコナゾールという名前で知られている[1]．イマザリルは各種果実・野菜・穀類に対する使用が登録されており，収穫後使用と貯蔵用として用いられている．日本におけるイマザリルの残留基準量は，穀類で0.01から0.05ppm，柑橘類果実で5.00ppm，仁果果実で5.00ppm，熱帯産果実で2.00ppm，その他の果実で2.00ppm，ジャガイモで5.00ppm，うり科野菜で0.50から2.00ppm，なす科野菜で0.50ppm，綿実で0.05ppmと定められている．イマザリルは日本では食品添加物としても登録されており，その最大許容残留量は柑橘類果実で5.00ppm，バナナで2.00ppmとなっている．またWHOが定めるイマザリルの1日当たりの許容摂取量(ADI)は体重1kg当たり0.03mgとなっている[2]．

イマザリルの毒性に関しては，Van HeckeとDe Vosがエニルコナゾールがヒトに急性の湿疹様接触性皮膚炎を起こすことを報告している[3]．また，Thienpontらは急性・亜急性および慢性毒性試験において，ラット及びイヌがイマザリルに対して充分な耐性を示すことを見いだした[4]．さらに彼らはイマザリルが変異原性を示さず，ラットとマウスにおいて発癌性が見られなかったこと，ラットにおいて受胎能力および繁殖能力の低下が見られず，胚子毒性及び催奇形性が見られなかったなどを報告している．しかしながら，著者らはイマザリルのマウスを用いた2世代毒性試験において，イマザリル投与群で繁殖及び行動発達のいくつかの項目が抑制されることを確認した[5]．

そこで，今回はイマザリルのラット以外の動物を用いた発生毒性試験の報告がほとんどないことから，マウスを用いた混餌法による発生毒性試験の結果について報告する．

材料と方法

試料

イマザリル（ロット番号33370）は，ドイツのRiedel-de Haën社から購入し，その純度は99%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）からCrj：CD-1 (ICR)の妊娠4日齢の雌を購入し，一般状態の良好

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

Table 1. Average Daily Food and Chemical Intake of Female Mice Administered Imazalil in the Diet from 4 to 18 Days of Gestation in Developmental Toxicity Study.

	Dose Level (%)			
	0	0.024	0.06	0.15
Food intake (g/kg/day)				
pregnant day 4-11	153.3±14.75	158.3±14.20	158.9±18.51	139.2±15.52*
pregnant day 11-18	140.2± 9.42	137.4± 9.27	132.7±10.31*	138.8±20.64
pregnant day 4-18	146.7± 8.21	147.9±10.09	145.8±11.80	139.0±14.11
Chemical intake (mg/kg/day)				
pregnant day 4-11	−	38.0±3.41	95.3±11.11	208.7±23.28
pregnant day 11-18	−	33.0±2.23	79.6± 6.19	208.1±30.96
pregnant day 4-18	−	35.5±2.42	87.5± 7.08	208.4±21.17

Each value represents the mean±SD. Significantly different from controls: *P<0.05.

Table 2. Summary of Maternal and Foetal Data of Mice Administered Imazalil in the Diet from 4 to 18 Days of Gestation in Developmental Toxicity Study.

	Dose Level (%)			
	0	0.024	0.06	0.15
No. of females examined	20	20	20	20
No. of pregnant females	20	20	20	20
No. of dams	20	20	20	20
No. of dams with viable foetuses	20	20	20	20
Maternal body weight gain (g)	34.65±4.96	33.19±4.29	33.66±3.68	32.91±3.67
Total implantation sites	300	277	273	282
No. of implantaion sites/litter	15.00±2.22	13.85±1.90	13.65±2.25	14.10±2.20
Total resorption sites	12	14	9	6
No. of resorption/litter	0.60±0.94	0.70±1.08	0.45±0.76	0.30±0.47
Total resorption rate (%)	4.00	5.05	3.30	2.13
No. of viable foetuses	288	263	264	276
Sex ratio (male/female)	0.95	1.05	1.32	1.00
No. of viable foetuses/litter	14.4±2.62	13.2±2.23	13.2±2.38	13.8±2.12
male foetuses	7.0±2.05	6.8±2.02	7.5±1.88	6.9±2.36
female foetuses	7.4±2.48	6.4±2.28	5.7±2.15	6.9±2.00
Foetal body weight/litter (g)	1.38±0.064	1.42±0.087	1.40±0.072	1.41±0.097
male foetuses	1.42±0.068	1.45±0.088	1.43±0.086	1.43±0.099
female foetuses	1.35±0.066	1.39±0.090	1.36±0.071	1.37±0.102

Each value represents the mean±SD.

なものを実験に供した．妊娠マウスは温度24±1℃・相対湿度55±5%に調整された飼育室でポリカーボネート製の平底ケージで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

イマザリルを混餌法により，妊娠マウスを1群20匹ずつ0.024，0.06，0.15%の濃度で，妊娠4日齢から妊娠18日齢までの間投与した．対照群として，妊娠マウスを20匹実験期間中に標準飼料（日本クレア（株）CE-2）を投与した．各妊娠マウスの摂餌量を，妊娠4日齢から妊娠11日齢までの期間と妊娠11日齢から妊娠18日齢までの期間の2回に分けて測定した．

妊娠18日齢時に，妊娠マウスを外見の異常の有無を確認した後に頸椎脱臼により屠殺解剖した．開腹後，子宮内の着床数・吸収胎仔数・生存および死亡胎仔数を計測した．子宮より取り出した各胎仔の体重を測定し，雌雄の判定を行なった後に外表奇形の有無を検査した．

統計解析

Table 3. Summary of the Incidence of External Malformation of Mice Administered Imazalil in the Diet from 4 to 18 Days of Gestastion in Developmental Toxicity Study.

	Dose Level (%)			
	0	0.024	0.06	0.15
No. of dams with viable foetuses	20	20	20	20
No. of viable foetuses	288	263	264	276
No. of dams with anomalous foetuses	5 (25.00)	2 (10.00)	8 (40.00)	8 (40.00)
No. of anomalous foetuses	5 (1.74)	2 (0.76)	14 (5.30)*	10 (3.62)
External malformation				
Talipes varus	2 (0.69)	2 (0.76)	1 (0.38)	9 (3.26)*
Manus vara	2 (0.69)	0 (0.00)	9 (3.41)*	0 (0.00)
Kinky tail	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (1.14)	1 (0.36)
Exencephaly	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.38)	0 (0.00)
Open eyelid	1 (0.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

Each value represents number of foetuses; percentage in parentheses. Significantly different from controls: *P<0.05.

妊娠マウスの摂餌量・体重増加量・着床数・吸収胎仔数・生存仔数・胎仔体重は，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，Bonferroniの多重比較検定により解析した．総胎仔吸収率及び性比は，χ^2検定により解析し，異常胎仔保有母マウス及び異常胎仔・外表奇形発現率は，Fisherの正確確率検定により解析した．用量反応効果の検定には，Jonckheereの順位の傾向検定または頻度の傾向検定である累積χ^2検定を用いた．

結　果

飼料及び薬物摂取量

妊娠期間中の飼料摂取量は，妊娠4～11日齢の期間に高濃度投与群で抑制され，妊娠11～18日齢の期間に中濃度投与群で抑制された(Table 1)．しかしながら，妊娠4～18日齢の期間の平均摂取量は各群で差が見られなかった．したがって，薬物摂取量は妊娠期間中，投与群で用量依存的に増加した．

妊娠マウスの影響

全ての雌マウスは妊娠が成立し，妊娠期間中の流産などは観察されなかった．妊娠マウスの平均体重増加量は，各群において差が見られなかった．

胎仔の影響

一腹当たりの平均着床数及び吸収胎仔数は，各群で差が見られなかった(Table 2)．平均生存仔数及び性比についても，投与によると思われる影響は観察されなかった．また，一腹を基準にした平均胎仔体重は，雌雄共に各群において差が見られなかった．外表奇形は各群で観察され(Table 3)，異常胎仔数は中濃度投与群で有意に増加した．内反足の胎仔数は，高濃度投与群で有意に増加し，内反手の胎仔数は，中濃度投与群で有意に増加した．

考　察

本実験において，イマザリルはマウスの発生に対していくつかの影響を及ぼした．内反足及び内反手の胎仔数は中・高濃度投与群で増加したが，これらの奇形の発現頻度は，背景データ[6-10]における自然発生率の範囲内であった（例えば，CD-1マウスで0～3.92%[7]，CD-1マウスで0.46～2.74%[10]）．また，本実験において，これらの影響に用量反応性は認められなかった．したがって，これらの奇形の発生はイマザリル投与の影響ではなく，自然発生によるものと思われる．

日本における食物の最大残留基準量を基に計算されたイマザリルの概算最大摂取量は，一日当たりおよそ0.01mg/kgと推定される．また伊藤らは，イマザリルの残留量はグレープフルーツの全果で0.02～1.9ppm，果肉で0.05～0.07ppm，レモンの全果で0.30～1.4ppm，果肉で0.03～0.15ppm，オレンジの全果で0.02～0.55ppm，果肉で0.02ppmであり，輸入品のみから検出したと報告している[11]．さらに，Matsumotoらはイマザリルの実際の摂取量は，一日の食品当たり0.0059ppm（およそ大人一人当たり11.2μg）であると報告している[12]．これらの残留量はADI値(0.03mg/kg/day)よりも少なく，本実験の投与濃度と比べるとはるかに少ない．したがってイマザリルは，実際の摂取量では人間の発生にはほとんど影響を及ぼさないであろう．

文　献

1) Van Leempt, L., Swysen, E., Woestenborghs, R., *et al.*: *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **18**, 313-320, 1989.

2) Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR): *Pesticide Residues in Food-1991, Evaluations 1991 Part II- Toxicology*, 283-285,

1992, World Health Organization, Geneva.
3) Van Hecke, E. and De Vos, L.: *Contact Dermatitis*, **9**, 144, 1983.
4) Thienpont, D., Van Cutsem, J., Van Cauteren, H., *et al.*: *Arzneim.-Forsh./Drug Res.*, **31**, 309-315, 1981.
5) Tanaka, T.: *Reprod. Toxicol.*, **9**, 281-288, 1995.
6) Palmer, A. K.: *Adv. Exp. Biol. Med.*, **27**, 45-60, 1972.
7) Perraud, J.: *Lab. Anim. Sci.*, **26**, 293-300, 1976.
8) Fritz, H., Grauwiler, H., Hummler, H., *et al.*: *Arzneim.-Forsh./Drug Res.*, **28**, 1410-1413, 1978.
9) 亀山義郎，谷村　孝，安田峯生 編：先天異常，**20**, 25-106, 1980.
10) Morita, H., Ariyuki, F., Inomata, N., *et al.*: *Cong. Anom.*, **27**, 147-206, 1987.
11) 伊藤正子，永山敏廣，橋本常生　他：東京衛研年報 **47**, 141-147, 1996.
12) Matsumoto, H., Murakami, Y., Kuwabara, K., *et al.*: *Toxicol. Environ. Chem.*, **42**, 99-106, 1994.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 281-288, 1998

ピペロニルブトキシドのCHO-K1細胞による細胞毒性試験及び細胞遺伝学的試験

田 山 寿美子*, 中 川 好 男*

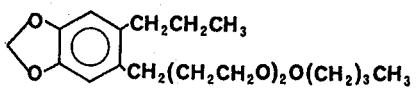
Cytotoxic and Genotoxic Effects of Piperonyl butoxide in CHO-K1 Cells

SUMIKO TAYAMA and YOSHIO NAKAGAWA

Keywords：ピペロニルブトキシド piperonyl butoxide, CHO-K1 細胞 CHO-K1 cells, 染色体異常 chromosome aberration, 姉妹染色分体交換 sister-chromatid exchange, コロニー形成能 colony forming ability, アポトーシス apoptosis

ピペロニルブトキシド（PB, 図1）はピレスリン系の殺虫剤の共役剤として開発され，我が国では1955年に食品添加物として穀類への使用が認められた．最近までPBには発癌性[1,2]，催奇形性[3,4]は認められておらず，遺伝子毒性に関しても，サルモネラ[5]や大腸菌[6]を用いた微生物レベルでのテストでは変異原性は検出されず，培養細胞（CHO細胞）を用いたテストでも，S9による代謝活性化の有無に関わらず姉妹染色分体交換（sister-chromatid exchange, SCE）及び染色体異常（chromosome aberration, CA）誘発は見られないと報告されている[7]．このようにPBは，これまで発癌性も変異原性も無い物質であるとされて来たが[8]，最近本所においてPBが雌雄のF344ラット及び雄マウスの肝臓に腫瘍を誘発すること[9,10]，さらにマウスに催奇形性があること[11]が見いだされた．またL5178Y tk^+/tk^- mouse lymphoma cellでのForward mutation assayで，S9無しで明確な陽性の結果の報告がなされ[12]，human RSa細胞でも突然変異の誘発が見いだされている[13]．これらのことから我々もCHO-K1細胞を用いて，PBのSCE及びCA誘発作用を調べ，遺伝子傷害性の有無を検討し，さらに細胞死に関してアポトーシス誘発の可能性についても調べたので報告する．

PB



Mol. wt: 338.4

図1．ピペロニルブトキシド(PB)の化学構造

材料及び方法

材料：PBは東京化成工業，シクロホスファミド（CP）及びマイトマイシンC（MMC）はICN Pharmaceuticals Inc.より購入した．前の2つはジメチルスルホキシド（DMSO）に溶かし，MMCは蒸留水に溶かし，いずれも溶媒濃度1％で培地に加えた．S9はAmesらの方法[14]に従い雄のSprague-DawlyラットにAroclor-1254（PCB）を注射し酵素誘導した肝臓より作成し，-80℃で凍結保存したものにNatarajenらの方法[15]で補酵素等を加え，mixtureとしたものを用いた．S9 mix中のS9量は30％であり，S9中の蛋白量はローリー法で25.3mg/mlであった．

培養条件：CHO-K1細胞はHamのF-12培地に，10％牛胎児血清，ペニシリン（100 unit/ml）及びストレプトマイシン（100 μg/ml）を加えた培地で，37℃インキュベーター内でガラス角瓶中で培養した．

コロニー形成能による細胞増殖阻害試験：培地3.9 mlの入った直径6 cmのプラスチックペトリ皿に，1.5×10^3個/mlの細胞浮遊液0.1mlを加え，24時間CO_2インキュベーター内で培養した後，種々の濃度のPBを各濃度それぞれ4枚宛で加え，3時間あるいは24時間処理した．その後,正常培地で5日間培養し，Dulbeccoのリン酸緩衝液（Ca, Mg-free, pH 7.3）で洗浄の後メタノールで固定し，2％ギムザ液で染色してコロニー数をコロニーカウンターで数え，溶媒対照に対する割合を求めた．コロニー数はそのサイズにより2通り計測した．

* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

アポトーシスの検索：培養面積約12cm²のLab-Tek Chamber slideに細胞を2×10⁵個播種し，CO_2インキュベーター内で24時間培養し，培地を換えてPBを加え，6時間あるいは24時間培養した．6時間処理のものは正常培地に戻してさらに18時間培養した．アポトーシス細胞は，新たに生成した断片化DNAの遊離3'-OH末端の標識部分を，TUNEL法（TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method；アポトーシス検出キット，宝酒造K.K）により組織化学的に染色し，確認した．

遺伝子傷害試験：各培養瓶に6×10⁵個の細胞を播種し，48時間培養後培地を交換し，薬物を加えて3時間培養した．代謝活性化のためには，薬物添加の15分前にS9 mixを培地の5-30%濃度で加えた．処理終了後，処理液を捨て瓶をアルミ箔で覆い，5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BUdR, Sigma Co., 0.5μg/ml）の入った培地を各10ml加え，さらに27時間培養した．S9処理をしたものは，処理液をHPLCにかけ，代謝状況を調べた．培養終了2時間前に分裂中期細胞を集めるため，紡錘体形成阻害剤，コルセミド（0.1μg/ml）を加えた．中期細胞は瓶を軽く振とうして遠沈管に集め，先に報告した方法[16]で低張，固定し，スライドに細胞浮遊液を滴下して染色体標本を作成した．SCE検索のための染色体の分染はFPG（fluorescence plus giemsa）法に基づいた先の方法[16]に従って行い，光学顕微鏡（DMLB, Lica K.K.）で細胞当たりのSCE数を数えた．CAについては，染色体あるいは染色分体のgap（間隙），break（切断）及び染色体内あるいは染色体間のexchange（交換）の異常に分類し，異常保有細胞を集計した．SCE, CA, endoreduplication（ERD, 染色体の核内倍加）及び分染された染色分体を持つ細胞の割合（DSC, differential staining sister chromatids）の4項目をそれぞれ50, 100, 200及び100個の中期細胞について調べ，SCEについてはKrushkal Wallis test及び distribution free multiple comparison test，その他はχ^2 testにより有意差検定した．

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）：薬物処理後，試料はただちに氷中に移し，その5μlを直接ODS 120Tカラム（4.6mm, 25cm）を装着したHPLC（model HPLC-837クロマトグラフ，東洋ソーダKK.）に注入し，PB及び代謝物を290nmの波長で測定した．移動層はメタノール/精製水（4：1，pH 3.0：リン酸で調整），流速は1 ml/min.とした．代謝物の同定はしなかったが，クロマトグラフにおいて代謝物に相当する各ピークの面積の合計の増減を，PBの残存量とともに代謝量の指標として用いた．

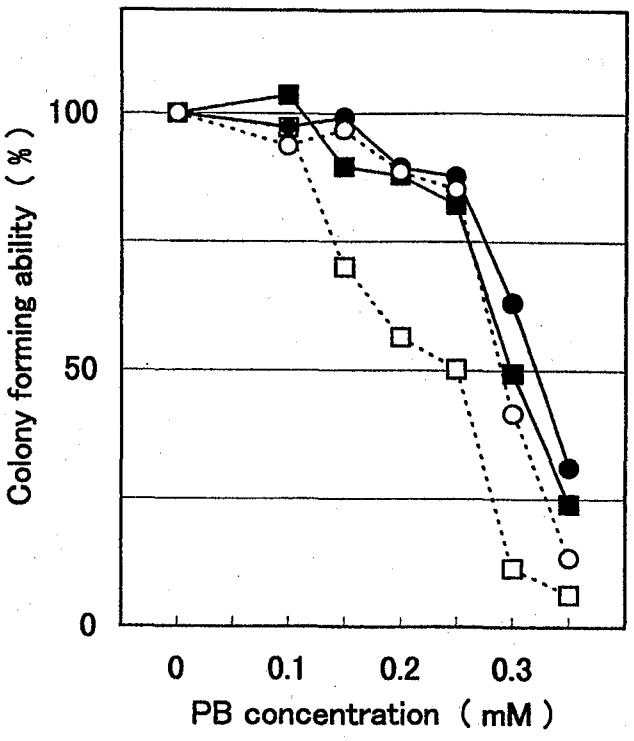


図2．コロニー形成能によるPBのCHO-K1細胞への細胞毒性

PBを3時間（●,○ ——）あるいは24時間（■,□－－）細胞に曝露し，5日間培養の後，出現コロニー数をコロニーカウンターでそのサイズにより，標準的大きさ以上のものの数（白抜き）と小さいものも含めた数（黒塗り）の2通り数えた．各濃度のコロニー形成能は，溶媒対照を100%とした時のそれぞれの百分率で示した

結　果

細胞毒性試験：コロニー形成能によりPBのCHO-K1細胞への増殖抑制作用を調べた結果を図2に示す．PB処理群の間でコロニーの大きさに明らかな違いが見られたので，コロニー数の集計はそのサイズにより，標準的な大きさ以上のものと小さいサイズまで含めたものの2通り行った．溶媒対照群における微小コロニーの出現割合は，3時間処理で6.0%，24時間処理で7.3%であった．PBは処理時間の違いにより出現コロニー数に大きな差は示さなかったが，24時間処理のものでは標準的な大きさのコロニーは，0.15mMの低濃度からその数を急激に減らし，コロニーサイズの顕著な縮小が認められ，細胞増殖の抑制を示した．出現コロニー数はPB 0.3mMから両処理群とも急激に低下し，PB 0.35mMでは対照群の15-30%まで下がった．

TUNEL法によるアポトーシスの検出は，断片化DNA

表1．PBのCHO-K1細胞へのSCE，CA及びERD誘発作用

Chemical	Dose (mM) (μg/ml)[a]	Cells with CAs/100 metaphases[1]	ERD (%)	SCEs/cell[2] Mean ± S.E.	SCEs/cell[2] Range Min.-Max.	DSC[3] (%)
PB	0	2 (0)[4]	0	5.5±0.30	1-11	97
	0.1	5 (2)	0	6.1±0.36	2-14	94
	0.2	3 (3)	0.5	6.9±0.39	3-14	85**
	0.25	5 (3)	4.5*	7.4±0.33**	2-12	65**
	0.3	6 (5)	2.5	7.6±0.39**	3-14	13**
	0.35	N.M.[5]	—	—	—	—
MMC	0.04[a]	8 (4)	0	19.7±0.62	12-27	87

** $p < 0.01$

1）100個の中期細胞当たりの染色体異常保有細胞.

2）1用量当たり50個の中期細胞を数えた.

3）分染されている姉妹染色分体(differential staining sister chromatids)を持つ細胞.

4）gapを除いた異常保有細胞.

5）分裂細胞無し(no metaphases).

の遊離3'-OH末端の標識部分をジアミノベンチジン(DAB）で茶色に発色させた後，光学顕微鏡での観察によりなされた．対照群及び増殖抑制がほとんど見られない低濃度群には，アポトーシスを示す茶色に染まった細胞は全く観察されず，24時間処理のものは0.15mMから，6時間処理のものは0.2mMからその出現が認められた(図3）.

細胞遺伝学的試験：CHO-K1細胞におけるS9添加なしでの結果を表1に示す．溶媒対照のSCE，CA値は通常の実験値の範囲内であった．PBは3時間の処理で0.2mM以上の濃度では細胞周期の遅れ（DSCの減少）を引き起こし，0.35mMでは細胞は萎縮し，分裂細胞は得られず染色体の観察はできなかった．SCEは0.25mM（7.4 SCEs/cell）及び0.3mM（7.6 SCEs/cell）において対照群（5.5 SCEs/cell）との間に有意差を示した．しかしその値は陽性対照のMMC（0.04μg/mlで19.7 SCEs/cell）に比べかなり低かった．CAについては著しい細胞周期の遅れを示したPBの高い濃度（0.3mM）でも，対照群との間に有意差を示さなかった．G2期ブロックによるとされるERD（染色体の核内倍加）は0.25あるいは0.3mMの高用量群でやや増加し，0.25mMでは対照群との間に有意差を示した.

0.3mM PBに各濃度のS9を添加して代謝活性化を計った試験の結果を表2に示す．対照群には各パラメーターにおいてS9添加による影響は見られなかった．ただSCEについては，S9添加はその頻度を幾分増やしたが，無添加群との間に有意な差はなかった．PBにS9を添加した場合には，S9無しの0.3mM PBが引き起こしたERD及び細胞周期の遅れは全く見られず，溶媒対照群と有意差はなかったがgap及び切断型，交換型の異常として若

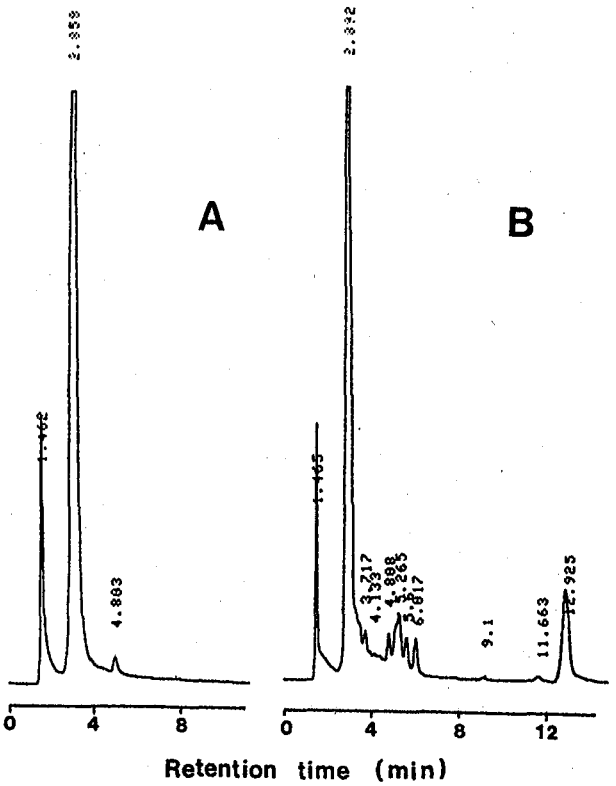


図4．S9を加えてインキュベーションしたPBのHPLCのクロマトグラフ
A：4.5% S9+1% DMSO，B：4.5% S9+0.3mM PB．Retention time 12.9min.のピークはPB 0.11mM (B)，5.3，5.6及び6.0min.の小ピークは，同定されなかったがPBの代謝物に相当するものとして，その面積を集計し，PBの残存量とともにPB代謝の指標とした.

表2．PB 0.3mMのS9添加CHO-K1細胞へのSCE，CA及びERD誘発作用

Chemical	S9 (%)	Cells with CAs/100 metaphases[1]	ERD (%)	SCEs/cell[2] Mean±S.E.	SCEs/cell[2] Range Min.-Max.	DSC[3] (%)	Analizes of incubation media PB (mM)	Analizes of incubation media M.A[4]
PB (0.3mM)								
	0	8 (6)[5]	7.0**	8.4±0.62	3-16	22**	0.23	
	1.5	1 (1)	1.0	8.8±0.74	2-18	98	0.18	1.00
	3.0	2 (0)	0.5	9.2±0.53	5-15	99	0.13	1.85
	4.5	3 (2)	1.0	8.7±0.49	2-12	98	0.11	2.25
	6.0	4 (3)	1.0	8.9±0.52	3-13	97	0.07	2.31
	9.0	2 (1)	0.5	8.6±0.62	4-15	97	0.02	1.94
Control								
	0	1 (0)	0	5.6±0.48	1-11	99		
	1.5	1 (1)	0.5	6.4±0.55	2-11	98		
	3.0	2 (2)	0	6.8±0.49	4-15	97		
	4.5	3 (0)	0	7.2±0.63	2-14	99		
	6.0	2 (1)	0	7.4±0.56	3-13	99		
	9.0	2 (0)	0.5	7.6±0.45	4-12	98		
CP (0.009 mM)								
	4.5	8 (6)	0.5	37.2±1.69	21-66	91		

** $p<0.01$

1）100個の中期細胞当たりの染色体異常保有細胞．

2）1用量当たり25個の中期細胞を数えた．

3）分染されている姉妹染色分体(differential staining sister chromatids)を持つ中期細胞．

4）PBの代謝物の相対量．HPLCのクロマトグラフの代謝物に相当するピークの面積の合計値の比較．PB＋1.5% S9の値を基準にした．

5）gapを除いた異常保有細胞．

干出現したCAもこれを超えた頻度では起こされなかった．PBの代謝に関しては，HPLCのクロマトグラフは，S9添加によりPBのピーク（retention time 12.9min.）の他にいくつかのピーク（retention time 5-6min.）を現して，確かに代謝物が生成していることを示す（図4）．そしてS9量の増加（1.5-9.0%）に伴いPBの残存量は減少し，代謝物の相対量は増加した．これはS9量の増加に伴い代謝量も確かに増えている事を示す．また陽性対照のCPも4.5%S9添加で代謝活性化して高いSCEを誘発した．以上の事はPBは S9によりいくつかの代謝物に代謝されるが，これら代謝物はこの生成量では遺伝子傷害に起因するSCE及びCAを誘発しないことを示している．

考　察

PBはCHO-K1細胞に対し，0.3mM濃度でそのコロニー形成能を約50-60%に急激に落とし，これには処理時間（3時間及び24時間）による差はあまり見られない．この濃度はSCE及びCA検索テストで分裂細胞が得られる最高用量である．しかし24時間処理のものにはコロニーサイズから見ると，0.15mMから矮小化コロニーの増加が見られ，細胞周期の遅れによる強い増殖阻害が起こっていると推測される．またTUNEL法による細胞DNAの断片化の存在は，アポトーシスがPBの増殖阻害濃度で誘導されることを示唆し，矮小コロニーに関して，アポトーシス等による細胞死が連続的に起こっているとも考えられる．近年ネクローシスによる死に対して，この遺伝子に支配された細胞死の存在が見いだされ，γ線やX線，過酸化水素あるいはある種の薬物がこれを引き起こすことが報告されている[17-19]．活性酸素あるいは細胞内の酸化的代謝による刺激がこの誘発に関わっていると言われ[20]，没食子酸及びそのプロピル誘導体（食品添加物：抗酸化剤）も活性酸素の放出によりこの作用を持つことが報告された[21,22]．PBのアポトーシス誘発作用が強く疑われるが，これを結論するためにはアガーロースゲル電気泳動でDNAラダーのパターンを調べる等，さらなる実験が必要とされる．

PBはCHO-K1細胞に，代謝活性化無しで0.25及び0.3mM 3時間の処理で細胞周期の遅れを伴いながらわずかではあるがSCEを誘発した．0.3mMではG2期阻止に

起因するとされるERDもわずかに増やしたが，CAの誘発は起こさなかった．PBはその代謝において，メチレンジオキシ環の開裂と側鎖の修飾[23]によりいくつもの代謝物を生成すると思われ，実際ラットにおいてそれらの生成が認められている[24,25]．CHO-K1細胞においても，本試験で0.3mM PBとS9とのインキュベーションにより，いくつかの代謝物を示唆するクロマトグラフが得られ，代謝物は同定されなかったがS9量の増加と共に残存PB量は減少し，反対に代謝物に当たる各ピークの面積は増加して，代謝量が増えている事が示された．PBの代謝物のあるものはチトクロームP-450と比較的安定した複合体を作り，薬物代謝を阻害したりPBの更なる代謝を抑制する[26,27]とされるが，S9量を増やすことで，PB濃度は9%S9濃度ではS9無しの場合の約1/10に，また代謝物の面積は1.5%S9濃度におけるそれの約2倍となった．ところがCHO-K1細胞への作用は，S9添加でかえって弱まった．S9無しの場合に見られた細胞周期の遅れ（22% DSC），及びERDの誘発（7%）は，低濃度のS9（1.5%）の添加で完全に抑えられ，S9の濃度の増加により代謝量が増えてもSCE, CAの誘発は見られなかった．このことからS9により生成したPBの代謝物は，細胞毒性，遺伝子傷害性共にPBに比べかなり弱い事が推測される．

PBの構造類似物質で弱い肝臓への発癌作用が知られているサフロール（SF）はその代謝物1'-HydroxysafroleがDNAと結合し[28]，さらに代謝物1'-Hydroxysafrole-2'-3'-oxideは変異原性を有し，マウス皮膚にパピローマを作ることが報告されており[29]，これらが肝臓の発癌に関わっているだろうと推測される．先の実験[30]では，SFはCHO-K1細胞にS9無しで細胞分裂可能な最高濃度のみでSCEを誘発するが，S9とのインキュベーションによりS9量と明らかな用量相関を持って，細胞毒性（細胞周期の遅れ）及びSCEを引き起こしている．PBにおいては，S9添加でSCEもCAも誘発せず，S9無しで示されたERD及び細胞毒性を示す細胞周期の遅れもかえって抑制され，遺伝子傷害性を有する代謝物の生成は示されなかった．従って，PBの肝臓への発癌作用を考える場合，SFと異なり代謝物の関与の可能性は少ないと推測される．本試験ではPBにより，CHO-K1細胞においてS9無しの場合にわずかだがSCEの誘発を認めた．しかしGallowayらによるSCE，CAを調べたCHO細胞でのスクリーニングテスト[7]では，S9添加，無添加の両方の場合においてPBは陰性である．彼らのプロトコールは我々と異なっており，そのSCEテストでは低容量（0.05mM）で長時間処理（28.5-37.3時間）が行なわれている．このようなプロトコールの違いが結果の違いにも影響しているのかもしれない．

PBの突然変異原性に関しては，バクテリアレベルではこれまで陰性の報告のみであるが，細胞レベルのテストでは，L5178Y tk^+/tk-mouse lymphoma cellでのForward mutation assayで，S9無しで明確な陽性の結果が報告され[12]，また human RSa細胞でも突然変異の誘発が見いだされている[13]．我々のCHO-K1細胞でのテストにおいても，弱いがSCEの誘発が認められた．PBの構造類似物質である，遺伝子傷害性の無い肝臓への発癌物質，ピペロニルスルホキシドの発癌作用は，これまで発癌性も変異原性も無いとされて来たPBとの比較から，そのメチレンジオキシフェニル構造とは無関係だろうと考えられた[31]．PBがピペロニルスルホキシドのような遺伝子傷害性の無い肝臓への発癌物質であるかどうか，肝臓への発癌作用とそのメチレンジオキシフェニル構造との関係など今後さらに検討する必要がある．

要　旨

ピペロニルブトキシド（PB，食品添加物）のCHO-K1細胞への細胞毒性及び遺伝子毒性作用を調べた．PBは3時間の処理で，0.25及び0.3mMの高い用量においてわずかだがDNAへの傷害を示唆するSCE（sister-chromatid exchange，姉妹染色分体交換）の頻度を上げた．しかしCA（chromosome aberration，染色体異常）の誘発は見られなっかた．0.3mMのPBに種々の濃度でS9を加えて代謝活性化を計った実験では，PBの代謝量はS9の濃度に相関して増えたが，SCE及びCAの誘発は起こらなかった．これらの事は，代謝物よりPB自体にわずかだがSCE誘発作用がある事を示唆している．コロニー形成能により調べたPBの細胞増殖抑制作用は，3時間あるいは24時間処理で0.3mMから急激に強まり，0.35mMでは検出コロニーは対照群の15-30%にまで減少した．コロニー数の減少を起こした高濃度群で，TUNEL法により染まったアポトーシスを示唆する像が認められた．

文　献

1）Cardy, R.H., Renne, R.A. Warner, J.W. *et al.*：*J. Natl. Cancer Inst.*, **62**, 569-578, 1979.

2）Maekawa, A., Onodera, H, Furuta, K. *et al.*：*Fed. Chem. Toxic.*, **23**, 675-682, 1985.

3）Kennedy, G.L.Jr, Smith, S.H., Kinoshita, F.K. *et al.*：*Fed Cosmet. Toxicol.*, **15**, 337-339, 1977.

4）Khera, K.S., Whalen, C., Angera, G. *et al.*：*Toxicol.*

Appl. Pharmacol., **47**, 353-358, 1979.

5) White, T.J., Goodman, D., Shulgin, A.T. *et al.* : *Mutaion Res.*, **56**, 199-202, 1977.

6) Ashwood-Smith, M.J., Trevino, J. and Ring, R. : *Nature*, **240**, 418-420, 1972.

7) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Rouben, C. *et al.* : *Environ. Mol. Mutagen.*, **10** (Suppl. 10), 1-35, 1987.

8) Rosenkranz, H.S., Ennever, F.K. and Klopman, G. : *Mutagenesis*, **5**, 559-571, 1990.

9) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T. *et al.* : *Fundam. Appl. Toxicol.*, **22**, 293-303, 1994.

10) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T. *et al.* : *Arch Toxicol.*, **68**, 467-469, 1994.

11) Tanaka, T., Fujitani, T., Takahashi, O. *et al.* : *Toxicol. Lett.*, **71**, 123-129, 1994.

12) McGregor, D.B., Brown, A., Cattanach, P. *et al.*, : *Environ. Mol. Mutagen*, **12**, 85-154, 1988.

13) Suzuki, H. and Suzuki, N. : *Mutatuin Res.*, **344**, 27-30, 1995.

14) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. : *Mutatuin Res.*, **31**, 347-364, 1975.

15) Natarajan, A.T., Tates, A.D., Van Buul, P.P.W. *et al.* : *Mutatuin Res.*, **37**, 83-90, 1976.

16) Tayama-Nawai, S., Yoshida, S., Nakao, T. *et al.* : *Mutation Res.*, **156**, 123-127, 1984.

17) Shinoda, K., Mitsumori, K., Yasuhara, K. *et al.* : *Arch Toxicol.*, **72**, 296-302, 1998.

18) Kaufmann, S.H. : *Cancer Res.*, **49**, 5870-5878, 1989.

19) Sellins, K.S. and Cohen, J.J. : *J. Immunol.*, **139**, 3199-3206, 1987.

20) Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. : *Immunol. Today*, **15**, 7-10, 1994.

21) Serrano, A., Palasios, C., Roy, G. *et al.* : *Arch, Biochem. Biophysics*, **350**, 49-54, 1998.

22) Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T. *et al.* : *Biochem. Boiphys. Res. Commun.*, **204**, 898-904, 1994.

23) Casida, J.E., Engel, J.I., Essac., E.G. *et al.* : *Science*, **153**, 1130-1133, 1966.

24) Fishbein, L., Falk, H.L., Fawkes, J. *et al.* : *J. Chromatogr.*, **41**, 61-79, 1969.

25) Kamienski, F.X. and Casida, J.E. : *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 91-112, 1970.

26) Franklin, M.R. : *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 3287-3299, 1972.

27) Franklin, M.R. : *Xenobiotica*, **2**, 517-527, 1972.

28) Phillips, D.H., Miller, J.A., Miller, E.C. and Adams, B. : *Cancer Res.*, **41**, 2664-2671., 1981.

29) Wislocki, P.G., Borchert, P., Miller, J.A. and Miller, E.C. : *Cancer Res.*, **37**, 1883-1891, 1977.

30) Tayama, S. : *Mutation Res.*, **368**, 249-260, 1996.

31) Ashby, J. : *Mutation Res.*, **248**, 221-231, 1991.

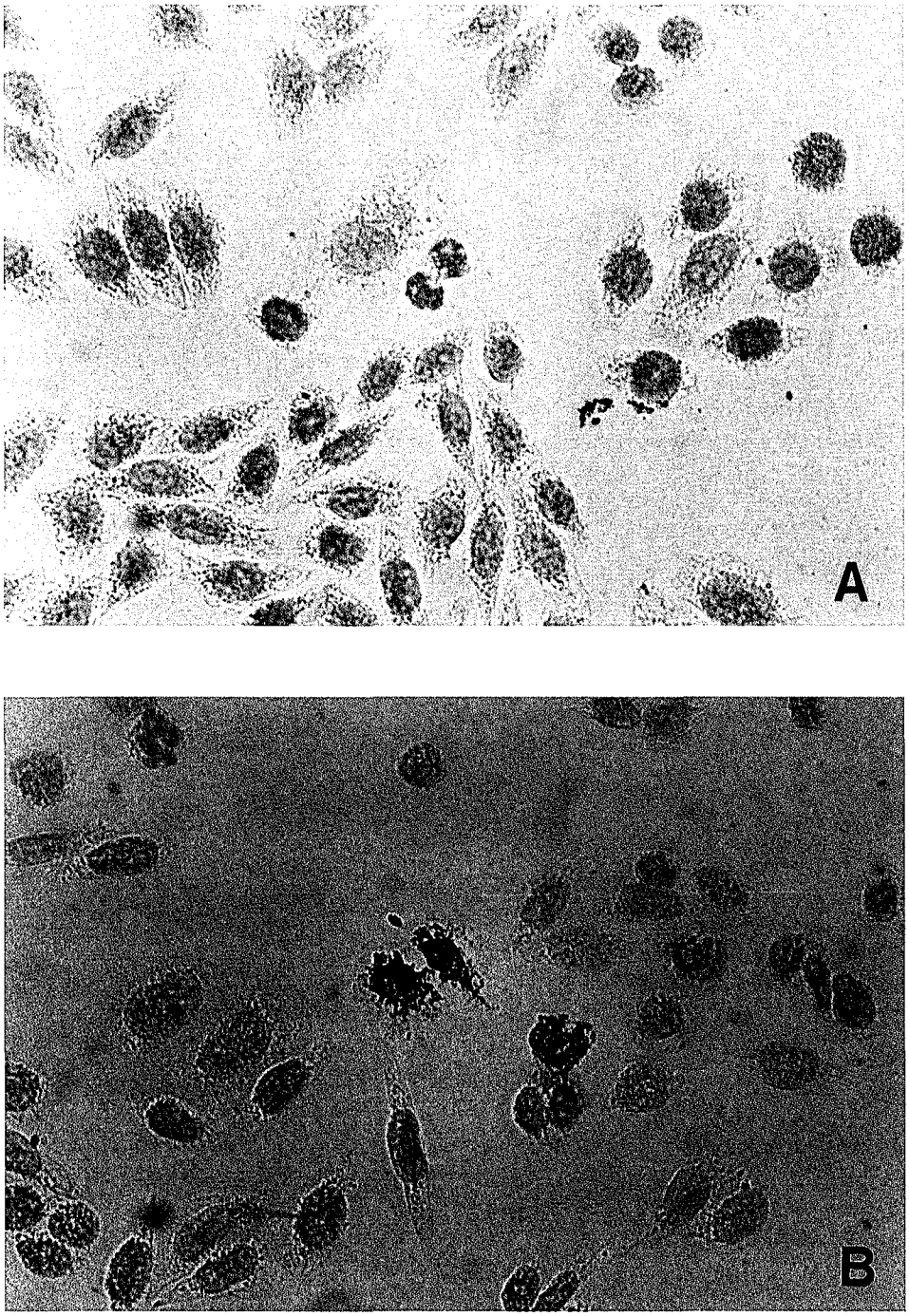


図3．TUNEL法によるCHO-K1細胞のアポトーシス像（×500）

A：溶媒対照，B：PB 0.15mM，24時間曝露

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 289-290, 1998

天然食品添加物のチャイニーズハムスターにおける染色体異常誘発性の検討（2*）

吉田誠二**, 青木直人**

Cytogenetic Studies of Natural Food Additives in Chinese hamsters (2)

SEIJI YOSHIDA and NAOTO AOKI**

Keywords：染色体分析 chromosome analysis，天然食品添加物 natural food additives，チャイニーズハムスター Chinese hamsters

近年，食品添加物においても天然食品添加物が多く用いられるようになったが，小縣ら[1]は，天然保存料であるヒノキチオールの催奇形性を明らかにしており，天然添加物の安全性に関して早急な検討が必要となった．

我々は，天然食品添加物の安全性を検討する一環として，これまでに天然着色料および天然保存料についての染色体異常誘発性の有無をチャイニーズハムスターを用いた試験で調べてきた[2]．

今回，天然食品添加物として広く使用されている製造用剤の染色体への影響をチャイニーズハムスターを用いて調べ，その染色体異常誘発性の有無の検討を行ったので報告する．

実験材料及び方法

試料　試料選定にあたっては，使用頻度，使用量，成分分析，毒性に関する情報等を参考に，以下に示す9種の天然製造用剤を日本食品添加物協会より入手し試料とした．

天然製造用剤：オリゴガラクチュロン酸（青森県オリゴ糖利用研究開発共同組合），くん液（萬有栄養㈱），コウジ酸（興人製品㈱，Lot No.KC950824），セイヨウワサビ抽出物（山忠わさび㈱），タンニン酸（大日本製薬㈱，Lot No.100121）チャ抽出物（三共農林㈱，Lot No.960826），モウソウチク乾留物（白井松新薬㈱，Lot No.090325A），モウソウチク抽出物（日本油脂㈱），ユッカフォーム抽出物（丸善製薬㈱，Lot No.90401011）の計9種を以下の試験に用いた．

染色体試験 本試験に供した全てのチャイニーズハムスターは当部動物舎において繁殖させたものであり，試験時に12-14週令になるよう調整した雄を用いた．

試料の全てを蒸留水にて溶解し，試料濃度は各試料共に最高濃度を2000mg/kgとし，以下，1000mg/kg，500mg/kgの3段階を設け，各群4匹の動物に単回経口投与を行った．陰性対照は蒸留水のみを投与したものとした．

投与後，24，48時間目に動物をと殺し，常法[3]により染色体標本を作製し，一匹について50個の分裂細胞の染色体分析を行った．

結果及び考察

供試天然製造用剤を3段階の濃度で投与した時の染色体分析の結果を表1に示す．

オリゴガラクチュロン酸，くん液，コウジ酸，セイヨウワサビ抽出物，タンニン酸，チャ抽出物，モウソウチク乾留物，モウソウチク抽出物，ユッカフォーム抽出物の24時間及び48時間投与のいずれにおいても染色体異常細胞の出現率は各濃度段階において3%もしくはそれ以下であった．また，観察された異常細胞も殆どがクロマチッドタイプのギャップと軽度のものであった．同様に，染色体異常の重要な指標となる交換型異常及び染色体の数的変化についても2種の陰性対照を含む全投与群で一例も観察されなかった．また，表1には示していないが連続摂取が予想されるチャ抽出物については，通常の基礎飼料にチャ抽出物を混じた添加飼料で2週間および4週間連続摂取させたチャイニーズハムスターの染色体分析も行っているが，いずれの用量，摂取期間においても染色体異常細胞の顕著な増加は全く見られなかった．また，重篤な異常である交換型異常や数的変化を示す細胞も一例も観察されなかった．

これらの結果により，今回用いた9種の天然製造用剤

＊第二報　東京衛研年報，48，342-344，1997

＊＊東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1

＊＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1．天然製造用剤の染色体試験

試料名	用量 (mg/kg)	24時間処理 異常%	24時間処理 判定	48時間処理 異常%	48時間処理 判定
オリゴガラクチュロン酸	2000	2.0	(−)	1.0	(−)
	1000	2.0	(−)	2.0	(−)
	500	1.0	(−)	1.0	(−)
	0	2.0	(−)	1.0	(−)
くん液	2000	2.0	(−)	2.0	(−)
	1000	1.0	(−)	2.0	(−)
	500	1.0	(−)	1.0	(−)
	0	1.0	(−)	2.0	(−)
コウジ酸	2000	1.0	(−)	2.0	(−)
	1000	3.0	(−)	2.0	(−)
	500	2.0	(−)	1.0	(−)
	0	2.0	(−)	2.0	(−)
セイヨウワサビ抽出物	2000	2.0	(−)	1.0	(−)
	1000	2.0	(−)	2.0	(−)
	500	2.0	(−)	2.0	(−)
	0	1.0	(−)	1.0	(−)
タンニン酸	2000	1.0	(−)	1.0	(−)
	1000	1.5	(−)	0	(−)
	500	1.0	(−)	1.0	(−)
	0	2.0	(−)	1.0	(−)
チャ抽出物	2000	1.0	(−)	1.0	(−)
	1000	1.0	(−)	1.5	(−)
	500	2.0	(−)	1.0	(−)
	0	2.0	(−)	1.5	(−)
モウソウチク乾留物	2000	2.0	(−)	1.0	(−)
	1000	2.0	(−)	2.0	(−)
	500	0	(−)	2.0	(−)
	0	1.0	(−)	1.0	(−)
モウソウチク抽出物	2000	1.0	(−)	1.0	(−)
	1000	1.0	(−)	1.0	(−)
	500	2.0	(−)	1.0	(−)
	0	1.0	(−)	2.0	(−)
ユッカフォーム抽出物	2000	2.0	(−)	1.0	(−)
	1000	1.0	(−)	1.0	(−)
	500	1.0	(−)	1.5	(−)
	0	2.0	(−)	1.0	(−)

には染色体異常誘発性はないものと思える．

藤田ら[4]は上記9種の変異原性についてAmes試験を行い，コウジ酸の陽性，また，オリゴガラクチュロン酸，モウソウチク乾留物，モウソウチク抽出物の3種の変異原性を示唆する報告を行っている．

染色体異常誘発性に関しては培養細胞を用いた試験においてコウジ酸の染色体異常誘発性を示す報告[5]があるが，今回の我々の結果においてはいずれも陰性であり，その染色体異常誘発性は検出し得なかった．

染色体異常誘発性試験は癌原性および遺伝的傷害の誘因となる変異原を検出する為の一方法であり，種々の培養細胞を用いる*in vitro*試験と，ほ乳動物を用いて行うin vivo試験に大別され，*in vitro*試験は*in vivo*試験に比べ感受性が高いとされている．これは，細胞内DNAに試験物質が到達しやすいと考えられており，試験物質のスクリーニングに適しているが，反面，代謝物質の検出には若干の問題があるように思える．同様に，*in vivo*試験も標的臓器である骨髄細胞への試験物質の到達が問題であり，複数の試験系による判断が必要と思われる．

ま と め

9種の天然製造用剤について染色体試験を行ったが，いずれも陰性の結果であり，染色体異常誘発性はないものと思える．

文　献

1）小縣昭夫ら：第75回日本食品衛生学会学術講演会要旨，1998

2）吉田誠二，青木直人：東京衛研年報，**48**，342-344，1997

3）Seller，M.J.,and A.A.Mends：*Stain Technol.*, 46, 285，1971

4）藤田　博，植松洋子，平田恵子：東京衛研年報，**49**，1998

5）石館　基：染色体異常試験データ集，リアライズ社，1983

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 291-296, 1998

天然食品添加物のAmes試験における変異原性(第2報*)

藤田　博*2, 植松洋子*3, 平田恵子*3,
広門雅子*4, 安田和男*4, 青木直人*2

Mutagenicity of Natural Food Additives in the Ames *Salmonella*/Microsome Test (II*)

HIROSHI FUJITA*2, YOKO UEMATSU*3, KEIKO HIRATA*3
MASAKO HIROKADO*4, KAZUO YASUDA*4 and NAOTO AOKI*2

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，合成による添加物と合成によらない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，既存添加物名簿を作成し，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ことが義務づけられた．しかし，名簿に収載されたものでもその安全性が不確かなものもあるため，厚生省は，それら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．従って，毒性情報が十分ではない天然添加物については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，遺伝子に対する影響を調べるために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．この試験法は，化学物質が微生物に突然変異を起こすかどうかを調べることにより，遺伝毒性あるいは発がん性を有する化学物質を検出するスクリーニングの方法として用いられてきた．しかし，この方法だけでは検出できない発がん性物質が見られることから，培養細胞を用いた染色体異常試験やin vivo小核試験などの試験を組合わせることにより発がん物質の検出が行われている[4]．

前報[5]に10種の天然添加物についてのAmes試験を実施した結果を報告したが，更に今年度は，着色料(1種)，製造用剤(10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　試験物質は，着色料1種(ベニバナ黄色素)，製造用剤10種(オリゴガラクチュロン酸，カラシ抽出物，くん液，コウジ酸，セイヨウワサビ抽出物，タンニン抽出物，チャ抽出物，モウソウチク乾留物，モウソウチク抽出物，ユッカフォーム抽出物)で，各試料に関する成分については表1に示した[6]．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[7]，TA98[1-3]，TA100[1-3]及びTA102[8,9]を普通ブイヨン(Nutrient broth No. 2，OXOID)で一夜培養し用いた．菌株は，B. N. Ames教授(カリフォルニア大)より分与を受けた．これらの菌株は，DNAの傷害を修復する遺伝子が欠損していると

---

* 第1報　東京衛研年報，**47**，309-313，1996
*2 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
*2 The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
*3 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科
*4 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

表1．試験に用いた試験物質の成分

試験物質名	形態	成　分
着色料		
ベニバナ黄色素	粉末	ベニバナ黄色素40%　デキストリン60%
製造用剤		
オリゴガラクチュロン酸	粉末	オリゴガラクチュロン酸60%以上
カラシ抽出物	液体	主成分　イソチオシアン酸アリル
くん液	液体	水分　99.5%
コウジ酸	粉末	コウジ酸　99.5%
セイヨウワサビ抽出物	液体	主成分　イソチオシアン酸アリル
タンニン抽出物	粉末	タンニン酸　ほぼ100%
チャ抽出物	粉末	チャ抽出物100%（カテキン66.2%）
モウソウチク乾留物	液体	モウソウチク乾留物100%，エタノール含むことあり
モウソウチク抽出物	粉末	モウソウチク抽出物25%，デキストリン75%
ユッカフォーム抽出物	粉末	ユッカフォーム抽出物70%，デキストリン30%

ともに突然変異を高頻度に起こす遺伝子が導入されている．そのため野生株に比べると非常に突然変異を起こしやすく，変異原に高感受性菌となっている[3]．

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[3,10]により行った．代謝活性化には，アロクロール1254(ジーエルサイエンス)により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット(Crj:CD　日本チャールス・リバー)の肝臓ホモジネートから調製したS9[3]を用いた．S9mix[3,10]中のS9量は，10%(50μl/プレート)とした．

試料溶液0.1mlを小試験管に入れ，代謝活性化する場合にはS9mix 0.5ml，代謝活性化しない場合にはリン酸緩衝液(pH 7.4)0.5mlを加え，更に，一夜培養した菌液を0.1ml加え，37℃で20分間のプレインキュベーションを行った．これに45℃に保温した軟寒天[3]2mlを加え混合後，最少グルコース寒天培地[3]に重層した．37℃で2日間培養後，プレートに生じた復帰コロニーを自動コロニーカウンターで計数した．

各濃度にプレート3枚を用い，結果は，平均値で示した．統計解析は，Kruskal-Wallis検定[11]を行い，更に，Mooreら[12]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

11種の天然添加物の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，試料中の添加物原体が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，試験菌株の増殖が認められる濃度を調べた．抗菌性が見られた試験物質では，コウジ酸が5mg/プレート，タンニン抽出物及びチャ抽出物が1mg/プレート，カラシ抽出物及びセイヨウワサビ抽出物が0.1mg/プレートを本試験の最高濃度とした．

コウジ酸は，4菌株においてS9の添加に関わらず復帰コロニー数が増加した．菌株により異なるが，対照群の2-5倍の増加であり，変異原性は陽性と判断した．S9無添加の5mg/プレートでは抗菌性が見られ，lawnの減少とともに復帰コロニー数も1mg/プレートと同じかむしろ減少した．一方，S9添加の場合には，S9を添加することにより抗菌性が抑制され，高い復帰コロニー数の増加となった．

ベニバナ黄色素は，4菌株のS9無添加において復帰コロニー数に増加が見られた．この増加は対照群の2倍前後と少ないものであったが再現性があり，用量相関も見られることから，陽性と判断した．ただし，陽性物質などの既知変異原に比べると30mg/プレートと非常に高用量であることからその変異原性は弱いものである．更に，この変異原性は，S9を添加することにより活性が失われる性質のものであった．

更に，6種の試験物質で1-2種の菌株に復帰コロニー数の増加が見られた．オリゴガラクチュロン酸は，TA100のS9無添加，カラシ抽出物は，TA97のS9無添加，セイヨウワサビ抽出物は，TA97のS9無添加，チャ抽出物は，TA100のS9無添加，モウソウチク乾留物は，TA100のS9無添加及びTA102のS9添加及び無添加，モウソウチク抽出物は，TA97のS9無添加及びTA102のS9無添加及びS9添加の場合であった．この6種の試験物質に見られた復帰コロニー数の増加は非常にわずかであり2倍には達していないが，再現性が見られ，統計的には有意であることから変異原性は陽性と判断した．ただし，その変異原性は，比較的高用量で，かつ復帰コロニー数の増加もごくわずかであることから非常に弱い変異原性

表2-1．天然食品添加物のAmes試験における変異原性[1)]

試験物質名	溶媒	用量 (mg/プレート)	TA97		TA98		TA100		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
着色料										
ベニバナ黄色素	DW	30	348*	154	47*	36	238*	192	346*	342
		20	276	164	29	24	175	161	337	316
		10	141	146	25	38	134	143	269	335
		5	128	129	22	27	129	131	247	299
		1	136	157	21	28	120	148	182	287
		0	115	154	20	22	111	135	189	244
製造用剤										
オリゴガラクチュウロン酸	DW	10	150	150	25	30	177*	136	166	313
		5	122	152	19	30	152	114	189	274
		1	126	129	14	24	138	124	153	269
		0.5	113	146	18	25	121	115	182	250
		0.1	106	143	15	24	112	125	163	236
		0	116	154	18	22	122	135	166	244
カラシ抽出物	DMSO	0.1	97	145	12	25	120	131	103	247
		0.05	158*	121	20	18	142	130	112	304
		0.01	126	136	15	26	124	137	139	334
		0.005	123	141	14	26	119	115	165	360
		0.001	121	154	15	22	111	109	181	350
		0	117	147	13	21	111	127	171	315
くん液	DW	10	141	164	12	29	93	105	199	267
		5	156	163	17	17	82	107	182	269
		1	143	180	16	19	87	101	210	273
		0.5	126	162	13	22	102	107	190	309
		0.1	137	154	15	24	97	125	188	310
		0	146	167	24	21	112	119	196	307
コウジ酸	DW	5	257*	843*	25*	69*	282*	614*	205*	1448*
		1	371	452	29	35	260	274	344	747
		0.5	209	255	19	28	161	140	196	482
		0.1	108	162	13	22	106	117	211	339
		0.05	128	162	18	26	112	132	212	282
		0	128	159	17	24	107	122	173	276
セイヨウワサビ抽出物	DMSO	0.1	67	134	11	23	95	125	66	183
		0.05	166*	143	22	21	149	107	97	258
		0.01	108	157	18	25	115	106	111	298
		0.005	118	148	14	38	108	106	140	323
		0.001	117	170	15	28	120	107	162	311
		0	108	147	13	36	111	127	171	315
タンニン抽出物	DW	1	112	120	15	19	134	132	131	232
		0.5	126	118	14	22	124	118	163	302
		0.1	134	119	14	28	145	125	166	295
		0.05	119	135	18	30	129	122	191	348
		0.01	119	165	17	26	125	112	197	308
		0	128	159	17	24	107	122	173	276

表2-2．天然食品添加物のAmes試験における変異原性[1)]

試験物質名	溶媒	用量 (mg/プレート)	TA97		TA98		TA100		TA102	
			−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
チャ抽出物	DW	1	115	148	15	20	207*	141	207	364
		0.5	111	134	13	23	152	132	193	322
		0.1	161	168	27	29	116	137	191	368
		0.05	143	154	18	24	128	136	185	333
		0.01	124	179	17	32	128	130	197	299
		0	123	192	22	23	141	125	168	247
モウソウチク乾留物	DW	10	162	191	18	34	191*	128	390*	487*
		5	144	184	17	27	145	134	297	402
		1	124	185	14	25	105	113	225	338
		0.5	132	163	15	20	111	114	198	333
		0.1	126	181	21	20	118	120	189	330
		0	146	167	24	21	112	119	196	307
モウソウチク抽出物	DW	40	189*	164	24	27	201	181	313*	437*
		20	168	154	26	26	173	157	268	440
		10	129	123	29	27	125	133	211	344
		5	107	149	23	32	131	146	211	370
		1	104	171	22	26	146	130	203	310
		0	104	169	29	23	131	133	168	309
ユッカフォーム抽出物	DW	20	0	55	24	27	140	155	109	282
		10	77	140	22	27	133	166	186	309
		5	108	139	17	28	124	157	176	320
		1	103	151	17	25	136	134	168	295
		0.5	107	171	18	24	135	144	204	304
		0	114	169	18	23	131	133	208	309
陽性対照										
9-アミノアクリジン(−S9)	DMSO	50 μg	702±134(n=8)[2)]							
2-ニトロフルオレン(−S9)	DMSO	5 μg			648±139(n=7)		750±38(n=7)			
3-マイトマイシンC(−S9)	DMSO	0.5 μg							2273±294(n=8)	
2-アミノアントラセン(+S9)	DMSO	5 μg		2227±548(n=6)		3161±579(n=7)		3600±744(n=6)		981±394(n=6)

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）．

であると考えられる．

今回試験した11種の天然添加物の変異原性に関する報告について見てみると，コウジ酸では，Shibuyaら[13)]及びWeiら[14)]によるTA98及びTA100で陽性の結果が報告されている．今回の試験において新たにTA97及びTA102においても変異原性が検出された．また，培養細胞に染色体異常及びSCEを誘発する[14)]が，チャイニーズハムスターのin vivo染色体異常試験[15)]やマウスを用いた優性致死試験[13)]では陰性の結果が報告されている．更に，コウジ酸にはラットで甲状腺腫瘍のプロモーター作用を示すとの報告[16)]も見られる．しかし，コウジ酸は，エビ，カニ及び野菜などの褐変防止作用の他にも様々な作用を有しており[17)]，今後も利用が継続されると思われる．変異原性に関する結果をまとめてみるとin vitroでは陽性ではあるが，in vivoでは遺伝毒性は示さないように考えられるが，今回の試験においてS9の添加により変異原性は不活性化されないこと，プロモーター作用も見られることを考慮すると他の試験系を含めた詳細な毒性の検討を行う必要があるのではないかと考えられる．

ベニバナ黄色素[18,19)]，くん液[19)]及びチャ抽出物[20)]には，TA98，TA100などの菌株で陽性の報告が見られた．くん液については，峰谷らの報告では試料によって変異原性が陰性のものも報告されている[19)]．今回の試験物質は陰性であり，製品により変異原性の違いがあると考えら

れることから，原材料及び製造法の違う製品の変異原性を比較検討する必要があると思われる．ベニバナ黄色素及びチャ抽出物については，今回の試験でも弱い変異原性が検出され，一致する結果であった．植物は種々のフラボノイド類を含んでおり，Ames試験で陽性を示すものが見いだされている[21]．また緑茶浸出液を加水分解あるいはヘスペリジナーゼ分解することにより，多くのフラボノイド類が遊離の形となり，高い変異原性を示すことが報告されている[22]．これらのことからベニバナ黄色素及びチャ抽出物に見られた変異原性は，成分中のフラボノイド類によるものと推察される．

カラシ抽出物についてはTA1535でのみ陽性[23]と数種のTA株で陰性[18]の報告が見られた．また，カラシ抽出物の主成分であるイソチオシアン酸アリルについての試験結果として，基本的なAmes試験では陰性であるが，代謝活性化のプレインキュベーション時間を20分以上にした場合にTA100に変異原性を見いだしている報告[24]が見られた．更に，我々も陰性の報告[25]を行っている．全体的には陰性かある条件の下でのみ陽性を示すようであり，今回の我々の試験においてもTA97においてのみ2倍に満たない非常に弱い変異原性であった．従って，カラシ抽出物の変異原性は非常に弱く，高感度の試験系においてのみ検出できるものなのであろうと思われる．また，今回，セイヨウワサビ抽出物にも弱い変異原性がカラシ抽出物と同じくTA97においてのみ検出された．主成分が同じであることからカラシ抽出物に見られた変異原性と同一のものであろうと考えられる．

今回，天然添加物11種について試験を実施した．前回の試験[5]とあわせて21種の試験を行ったことになるが，4菌株に対する比較的明瞭な変異原性を示した試験物質は，ペクチン分解物，ムラサキトウモロコシ色素，コウジ酸及びベニバナ黄色素の4種であった．更に，一部の菌株に対してわずかに復帰コロニーが増加する弱い変異原性を示した試験物質が10種であった．これは試験を行った試験物質の3分の2にAmes試験において何らかの変異原性が見られたことになる．天然添加物中に変異原性を有するものがかなり見られることから，すべての天然添加物について試験結果を確認できるように今後も多くの天然添加物についてAmes試験を実施する必要がある．天然添加物の多くは，多種類の化学物質が混合したものであることから，変異原性が検出された場合，その実体である化学物質の同定も重要である．これらの変異原の実体の解明についても検討を行う予定である．

まとめ

11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．コウジ酸及びベニバナ黄色素では4菌株に変異原性が見られた．オリゴガラクチュロン酸，カラシ抽出物，セイヨウワサビ抽出物，チャ抽出物，モウソウチク乾留物及びモウソウチク抽出物では1-2菌株において弱い変異原性が見られた．その他の3種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）石館 基：変異原性の役割，石館 基編，変異原性，遺伝毒性，1-6，1991，地人書館．
5）藤田 博，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**47**，309-313，1996.
6）平田恵子，広門雅子，植松洋子，他：東京衛研年報，**48**，178-184，1997.
7）Levin, D. E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **94**, 315-330, 1982.
8）Levin, D. E., Hollstein, M., Ames, B. N., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7445-7449, 1982.
9）Levin, D. E., Marnett, L. J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4457-4461, 1984.
10）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**，1178-1189，1975.
11）石居 進：生物統計学入門，133-137，1975，培風館．
12）Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
13）Shibuya, T., Murota, T., Sakamoto, K., *et al.*: *J. of Toxicol. Sciences*, **7**, 255-262, 1982.
14）Wei, C. I., Huang, T. S., Fernando, S. Y., *et al.*: *Toxicol. Letters*, **59**, 213-220, 1991.
15）吉田誠二，青木直人：東京衛研年報，**49**，289-290，1998.
16）小野寺博志，三森国敏，竹川 清，他：日本癌学会第56回大会抄録，**86**，1997.
17）斉藤 晋，青柳吉紀：*New Food Industry*, **37**, 1-9,

1995.

18) 安井陽子，武田信幸，逸見希子，他：食品衛生学雑誌，**23**，86-90，1982.

19) 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**，91-105，1985.

20) 祖父尼俊雄，宮部正樹，石崎睦雄，他：変異原性試験，**2**，19-28，1993.

21) Sugimura, T., Nagao, M.,Matsushima, T., *et al.*: *Proc. Japan Acad.*, **53**, SerB, 194-197, 1977.

22) Uyeta, M., Taue, S. and Mazaki, M: *Mutation Res.* **88**, 233-240, 1981.

23) Soudamini, K. K., Unnikrishnan, M. C., Sukumaran, K., et al: *Indian J Phisiol.Pharmacol.*, **39**, 347-353, 1995.

24) Neudecker, T. and Henschler, D.: *Mutation Res.*, **156**, 33-37, 1985.

25) 藤田　博，佐々木美枝子：東京衛研年報，**38**，423-430，1987.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 297-301, 1998

p-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類はラット遊離肝細胞においてミトコンドリア機能障害による細胞毒性をおこす

中川好男*, 田山寿美子*, 鈴木孝人*, 佐々木美枝子*

p-Hydroxybenzoate Alkylesters cause Cytotoxicity via Mitochondrial Dysfunction in Isolated Rat Hepatocytes

YOSHIO NAKAGAWA*, SUMIKO TAYAMA*, TAKAHITO SUZUKI* and MIEKO SASAKI*

Keywords：*p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類 *p*-hydroxybenzoate alkylesters, パラベン paraben, 細胞毒性 cytotoxicity, ミトコンドリア機能障害 mitochondrial dysfunction, 肝細胞 hepatocytes

緒　言

p-ヒドロキシ安息香酸のアルキルエステル類は通称パラベンとも呼ばれ，防黴剤，保存料として医薬品，化粧品，加工食品等に広く使用されている．パラベンの毒作用については，急性及び長期試験[1-3]，発がん性試験[4,5]，催奇形性試験[6]，変異原性試験[7],刺激性及び感作性試験[3,8]等の*in vivo*と*in vitro*実験系で検討されている．これらの試験結果に基づき，パラベンは比較的毒性の低いクラスに入る化合物であると推察される.一方，パラベンは組織，細胞機能に種々の作用を及ぼすことが報告されている．例えばパラベンは，(a)ウサギ及びヒト赤血球を溶血させ[9]，(b)マウス胎仔線維芽細胞及び微生物において核酸の合成を抑え[10,11]，(c)イヌにおいて低血圧症を伴った急性の心筋運動を低下させ[1],(d)モルモットの気管において毛様体の活性を抑え[12]，(e)末梢神経細胞において電圧ゲートと配位子ゲート機能を変調させる[13],等である．

パラベンの体内動態は上記の毒性試験と同様に種々の実験動物で検討されている[3]．経口投与されたパラベンは消化管から速やかに吸収され，肝，腎等のエステラーゼで酵素的に加水分解をうけたのち，グルクロナイド，硫酸抱合体，馬尿酸抱合体等として尿中に排泄される．このようにパラベンについては毒性及び動態について多数の情報があるが，細胞傷害と標的部位ついての報告は極めて少ない．そこでこの実験では,遊離肝細胞に及ぼすパラベンの作用について検討し，この化合物の毒性発現の機序を考察した．

実験材料および方法

試薬　*p*-ヒドロキシ安息香酸及びこのアルキルエステル類；メチルエステル，エチルエステル，プロピルエステル，イソプロピルエステル，ブチルエステル，イソブチルエステルは（各純度＞99%）は東京化成工業㈱製，ローダミン123,アデニンヌクレオチドはSigma Chemicals製を用いた．このほかの試薬は市販の特級規格以上を使用した．

遊離肝細胞の調製と反応　遊離細胞は雄性F344/DuCrj系ラット（240-280g; 日本チャールズ・リバー）の肝臓をMoldeusら[14]のコラゲナーゼ還流法により用時調製し，実験に用いた．肝細胞は12.5mM Hepesと0.1%アルブミンを含有したKrebs-Henseleit緩衝液(pH 7.4)に分散（10^6細胞/ml）させた．加湿した95%酸素５%二酸化炭素気流下，37℃に加温した細胞浮遊液にジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した各種パラベンを加えて反応を開始した．加えたDMSOの終濃度は0.5%以下とした．反応開始10分前，細胞浮遊液の一部にローダミン123（終濃度1μM）を加え予備加温した．パラベンの反応開始後，定時に細胞死,細胞内ATPとアデニンヌクレオチド濃度,ミトコンドリア膜電位(ΔΨ)について測定した．

肝ミトコンドリアの調製とミトコンドリア酸素消費速度の測定　ミトコンドリアは雄性F344/DuCrjラットの肝より定法に従い分別遠心法により調製した[15]．ミトコンドリアの酸素消費速度はClark型酸素電極（5300型，Yellow Springs Instrument)を用い，25℃においてADP（50μM）の添加により測定した[15]．呼吸基質として5mM

* 東京都立衛生研究所毒性部　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* Department of Toxicology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 3－24－1, Hyakunincho, Sinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

表1．*p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類の遊離肝細胞に及ぼす毒作用

処置 (2 mM)	細胞死 (%)	ATP (nmol/10^6細胞)	アデニンヌクレオチド (nmol/10^6細胞)	ミトコンドリア ΔΨ (%)
無処置	21±4	15.1±0.9	20.7±3.5	100
p-ヒドロキシ安息香酸	23±8	14.1±1.5	19.9±3.1	96.3
メチルパラベン	29±5	11.0±2.6*	19.3±1.9	93.3
エチルパラベン	32±6	9.7±2.0*	15.7±2.8*	91.5
プロピルパラベン	50±4*	2.1±0.3*	15.7±3.0*	48.4
イソプロピルパラベン	47±7*	3.3±0.6*	16.6±2.4*	55.1
ブチルパラベン	88±4*	0.3±0.2*	7.1±1.8*	39.3
イソブチルパラベン	98±2*	0.2±0.1*	7.1±0.7*	37.1

遊離肝細胞浮遊液（10^6細胞/ml）にパラベン類（2 mM）を加え37℃，60分間反応させた．
細胞死，ATP濃度とアデニンヌクレオチド濃度の数値は3例の平均値±標準誤差値，ΔΨ数値は2例の平均値を示す．
＊無処置群からの有意差（$p<0.05$）

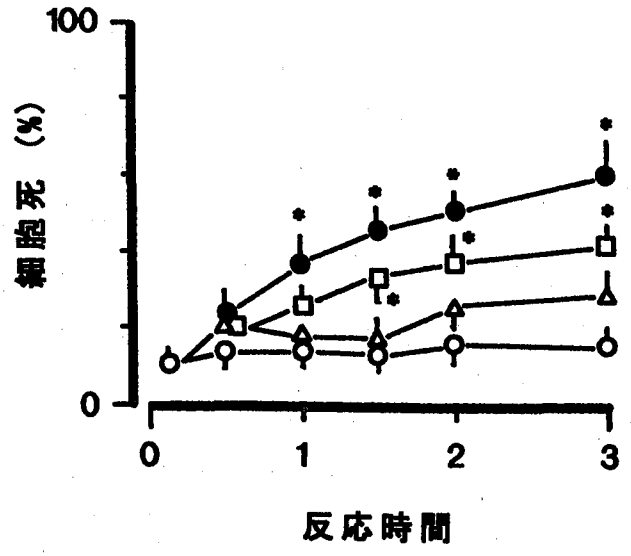


図1　プロピルパラベンの遊離肝細胞に及ぼす毒性
遊離肝細胞（10^6細胞/ml）はKrebs-Henseleit緩衝液(pH 7.4)に懸濁浮遊させ，パラベン（○無処置；△0.5mM; □1.0mM；●2.0mM）を加え3時間反応させた．
結果は3例の平均値±標準誤差値を示す．
＊無処置群からの有意差（$p<0.05$）

ピルビン酸-0.5mMリンゴ酸，5 mMコハク酸-1 μMロテノン，1 mMアスコルビン酸-50 μMテトラメチル-*p*-フェニレンジアミン(TMPD)の3種を用いた．なおここで用いたミトコンドリアの蛋白質濃度は1 mg/ml，反応緩衝液(3 ml)の組成は0.2M蔗糖，20mM塩化カリウム，3 mM塩化マグネシウム，5 mM燐酸カリウムであった．呼吸調節率(RCI)は"state 3"呼吸速度/"state 4"呼吸速度の比で表現した．なお"state 3"とは基質添加後のADP燐酸化反応に共役した酸素消費の状態を，また"state 4"とはADP燐酸化完了後の酸素消費の状態を意味する．

ミトコンドリア膜電位の測定　肝細胞のミトコンドリア膜電位(ΔΨ)はローダミン123を用いて測定した[16]．ローダミン123は正常な膜電位をもつミトコンドリアのマトリックスに選択的に取り込まれそこに留まる性質を持つ蛍光プローブである．ローダミン123 (1 μM) はパラベン暴露10分前に細胞浮遊液に加えた．パラベン反応後，肝細胞は60g，5分間の遠心分離で集めた．ついでこの細胞は0.1%トリトンX-100含有のKrebs-Henseleit緩衝液に10分間懸濁し，再度1600g, 5分間で遠心分離した．得られた上清画分のローダミン123濃度は蛍光プレートリーダー（励起波長485nm，蛍光波長530nm; Cyto Fluor4000, PerSeptive Biosystems）で定量した．ΔΨは無処置群のミトコンドリア内ローダミン123濃度(100%)に対する各処置群ミトコンドリアのローダミン123濃度を%で表現した．

アデニンヌクレオチドの測定　細胞内ATP, ADP, AMP濃度はJonesら[17]によるHPLC法で定量した．

細胞死の測定　細胞死は光学顕微鏡下0.16%トリパンブルーの排除能で確認し計数した．なお調製直後の肝細胞の生存率は約90%以上であった．

統計解析　対照群と各処置群間の有意差はDunnettの多重比較法で検定した．

結　果

(1) パラベンのラット肝細胞に及ぼす毒作用

プロピルパラベンは遊離肝細胞に対して濃度(0-2mM)及び時間（-3時間）に相関した細胞死を惹起した（図1）．

表1は各種パラベン（2 mM,60分間暴露）の肝細胞に及ぼす作用を細胞死,細胞内ATPとアデニンヌクレオチド濃度,ミトコンドリアΔΨの変化により比較検討した．*p*-ヒドロキシ安息香酸とその低分子アルキルエステル体であるメチルパラベンとエチルパラベンはほかのパラベ

表2．ミトコンドリアの基質特異的酸素消費に及ぼすプロピルパラベンの影響

基質		"state 3"呼吸活性（ng酸素/mg蛋白質/分）		
		無処置	プロピルパラベン（0.5mM）	%阻害
ピルビン酸（5 mM）-リンゴ酸（0.5mM）	(site Ⅰ)	53.0±2.9	33.9±2.1＊	36.1
コハク酸（5 mM）	(site Ⅱ)	76.3±6.0	54.4±2.5＊	28.7
アスコルビン酸（1 mM）+TMPD（50 μM）	(site Ⅲ)	41.7±1.8	39.2±1.5	6.0

ミトコンドリア（1 mg蛋白質/ml）は各基質を含む25℃の緩衝液（3 ml）に懸濁し，1.5分後にプロピルパラベン（0.5 mM）を，さらに1.5分後にADP（50 μM）を加えて酸素消費速度を測定した．TMPD；テトラメチル-*p*-フェニレンジアミン
数値は3例の平均値±標準偏差値を示す．
＊無処置群からの有意差（$p<0.05$）

表3．ミトコンドリア呼吸に及ぼす*p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類の影響

処置	濃度 (mM)	ミトコンドリア呼吸 (ng 酸素/mg 蛋白質/分) state 4	state 3	RCI*
無処置	0	23.8±0.9	77.3±4.0	3.24
p-ヒドロキシ安息香酸	0.5	22.5±1.6	63.1±1.9	2.80
	1.0	28.7±1.4	64.8±2.3	2.26
メチルパラベン	0.50	31.8±3.0	69.0±3.0	2.17
	0.75	31.5±1.6	66.9±2.4	2.12
	1.00	35.2±1.3	63.7±2.3	1.81
エチルパラベン	0.50	34.8±1.1	62.7±2.5	1.80
	0.75	34.6±2.5	60.3±2.8	1.74
	1.00	38.6±2.0	58.7±1.6	1.52
プロピルパラベン	0.10	28.5±1.7	67.8±3.3	2.38
	0.25	28.9±1.9	64.6±1.7	2.24
	0.50	40.3±2.6	55.4±2.0	1.37
イソプロピルパラベン	0.10	29.9±0.8	66.3±3.1	2.21
	0.25	31.4±1.2	58.0±2.4	1.85
	0.50	37.3±1.5	48.8±0.9	1.31
ブチルパラベン	0.05	30.3±1.7	57.9±1.7	1.91
	0.10	29.8±0.6	63.5±1.4	2.13
	0.25	50.4±2.2	50.4±1.8	1.00
イソブチルパラベン	0.05	32.4±1.8	69.4±3.1	2.14
	0.10	36.4±0.6	63.8±1.5	1.75
	0.25	58.9±2.0	58.7±2.0	1.00

ミトコンドリア(1 mg蛋白質/ml)は基質としてコハク酸(5 mM)とロテノン(1 μM)を含む25℃の緩衝液（3 ml）に懸濁し，1.5分後にパラベン類を，さらに1.5分後にADP（50 μM）を加えて酸素消費速度を測定した．
＊RCI（呼吸調節率）は"state 3"呼吸速度/"state 4"呼吸速度の比で表現した．
数値は2例の平均値±標準偏差値を示す．

ンに比べ毒作用が弱く，両パラベンでATP量がわずかに減少した．プロピルパラベンとイソプロピルパラベンは約50%の細胞死を誘導し，同時にATPとアデニンヌクレオチド濃度，ΔΨの低下を伴った．さらにプロピル体に比べブチルパラベンとイソブチルパラベンはより強い細胞毒性を生じた．なお，*n*-アルキルエステル体及び*iso*-アルキルエステル体のいわゆる連鎖異性体間において，毒性の強さに著しい差はなかった．

(2) パラベンの肝ミトコンドリアに及ぼす作用

表2は3種の特異的呼吸基質によるミトコンドリア酸素消費（"state 3"呼吸）に及ぼすプロピルパラベンの影響を示す．0.5mMプロピルパラベンはNAD基質 (site I) のピルビン酸-リンゴ酸による酸素消費速度及びFAD基質 (site II) のコハク酸による酸素消費速度に対して各々36%と29%の抑制を示した．これに対して同パラベンはsite IIIのアスコルビン酸-TMPDによる酸素消費速度に顕著な影響を及ぼさなかった．

表3はsite IIの呼吸基質であるコハク酸によるミトコンドリア酸素消費（ADP存在時の"state 3"呼吸とADP消費時の"state 4"呼吸）に及ぼすパラベン類の作用を示す．得られた結果を要約すると，一般的にパラベン類は濃度依存的に"state 4"呼吸の亢進と"state 3"呼吸の抑制を誘導し，これに伴い呼吸調節率 (RCI) を減少させた.パラベンのエステル側鎖の延長はミトコンドリア酸素消費に強く影響したが，連鎖異性体間での作用に有意な差がなかった．

考　察

ここで得られた結果は，プロピルパラベンが濃度及び反応時間に依存した急性の肝細胞死を惹起することを示している．またパラベンは肝細胞内のATP濃度,アデニンヌクレオチド濃度及びミトコンドリアΔΨの低下を伴う細胞死を誘導し，毒性の強さはアルキル側鎖の延長と相関した．

パラベンがミトコンドリア呼吸系を阻害させる事実は，同器官がパラベンの標的部位であることを示している．表1-3の結果は,パラベンが(1)酸化的燐酸化に対して脱共役的に作用する,(2)site I及びsite IIに係わる電子伝達系を阻害する,(3)ミトコンドリア膜電位差を低下させる等複数の部位に作用することを示す．ほかの組織細胞と同様に肝細胞のミトコンドリアは酸化的燐酸化に依存したエネルギー生産の重要な器官であり，その不可逆的機能障害はATP合成の速度を低下させ，結果的に細胞内アデニンヌクレオチド量を枯渇させる．ミトコンドリア機能障害とそれに引き続く細胞障害は,低酸素処理[18]及びフェノール性化合物等[19-21]による毒性発現において見いだされる現象のひとつである．

パラベンによる細胞毒性の強さは，*p*-ヒドロキシ安息香酸のカルボキシル基にエステル結合したアルキル側鎖の延長に相関した．アルキル側鎖の導入は親物質*p*-ヒドロキシ安息香酸の疎水性を著しく高める．25℃の水において，メチル－，エチル－，プロピル，イソプロピル，ブチル－，イソブチル-パラベンの溶解度は順に16.4, 10.2, 2.70, 4.88, 1.03, 1.80mMであり，また*p*-ヒドロキシ安息香酸の溶解度は53mMである[22]．この事実は長鎖アルキルエステルが細胞膜内部の疎水相に容易に分布することを示唆している．フェノール性抗酸化剤のブチルヒドロキシトルエンとブチルヒドロキシアニソールによる細胞毒性は，(1)両化合物の細胞膜疎水相への浸透分布及び，(2)両化合物による膜機能の障害とミトコンドリア呼吸阻害により惹起されることが報告されている[23].パラベンの分子構造-活性相関は,側鎖アルキル基の存在とパラ位水酸基が抗菌作用の発現に必須であることを示している[24]．一方，Shiralkarら[10]は，エステラーゼの添加がパラベンのエステル結合の水解を促し，結果的に微生物の生存率を高めることを報告した．これらの観察及び結果は，パラベンのフェノール性水酸基がミトコンドリア呼吸阻害に必須であり，さらにアルキル基の導入による疎水性効果がパラベンの標的部位への親和性を高め，結果的に毒性を増強したものと思われる．

要　旨

ラット遊離肝細胞において，*p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステルはミトコンドリア機能障害，それに引き続く細胞内ATPの枯渇を誘導した，ATP供給の不足はエネルギー反応に依存する細胞内諸反応を抑制し，最終的にネクローシスを惹起することが考察された．

文　献

1) Matthew, C., Davidson,J., Bauer, E., *et al.*: *J. Am. Pharm. Assoc.*, **45**, 260-267, 1956.
2) Sado, I.: *Nippon Eiseigaku Zasshi*, **28**, 463-476, 1973.
3) Final report on the safety assessment of methylparben,ethylparaben,propylparaben and butylparaben. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **3**, 147-209, 1984.
4) Homburger, F.: National Technical Information Service,PB No.183027, 1986.
5) Inai, K., Aoki, Y., Akamizu, H.,*et al.*: *Food Chem.Toxicol.*,**23**, 575-578, 1985.
6) Food and Drug Research Laboratories,US NTIS PB

Report(PB-221,785),1972.

7) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135-5139, 1975.

8) Sokol, H.: *Drug Stand.*, **20**, 89-106, 1952.

9) Ausel, H.C. and Cadwallader, D.F.: *J.Pharm. Sci.*, **53**, 169-172, 1964.

10) Shiralkar, N.D., Rege, D.V.and Manjrekar, S.P.: *In dian Food Packere*, **32**, 34-41, 1978.

11) Kraize, S.and Fital, B.: *Mitt. Geb. Labensmittelun ters Hyg*, **62**, 359-367, 1971.

12) Mostow, S.R., Dreisin, R.B., Manawadu, B.R.: *Laryngoscope*, **89**, 1697-1701, 1979.

13) Inoue, K., Nakazawa, K., Inoue, K. *et al.*: *Neuropharmacol.*, **33**, 891-896, 1994.

14) Moldeus, P., Hogberg, J.and Orrenius, S.: *Methods Enzymol.*, **52**, 60-71, 1964.

15) Snell, K. and Mullock, B.: *Biochemical Toxicology, A Practical Approch*, 217-254, 1987, IRL Press, Oxford.

16) Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Chacon, E., *et al.*: *Mitochondrial Dysfunction*, 404-415, 1993, Academic Press, San Diego.

17) Jones, D.P.: *J.Chromatogr.*, **225**, 446-449, 1981.

18) Kehre, J.P., Jones,D.P., Lemasters, J.J., *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 165-178, 1990.

19) Nakagawa,Y.,Nakajima,K.,Moore,G., *et al.*: *Eur. J. Pharmacol.*,**270**, 341-348, 1994.

20) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S., *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1021-1027, 1995.

21) Nakagawa,Y.,Moore,G.and Moldeus,P.: *Toxicology*, **114**, 135-145, 1996.

22) Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Hecklman, P.E. and Kinneary, J.E., *The Merck Index*, 12th ed., Merck & Co.Inc., 1996, Rahway.

23) Thompson, D.and Moldeus, P.: *Biochem,Pharmacol.*, **37**, 2201-2207, 1988.

24) Gottfried, N.S., *Am. J.Hosp. Pharm.*, **19**, 310-314, 1962.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 302-304, 1998

全胚培養法を用いた天然添加物のマウス胚子に及ぼす影響 II
ムラサキトウモロコシ色素

小縣昭夫*, 安藤　弘*, 久保喜一*,
青木直人*, 佐々木美枝子*

Effects of Natural Food Additive on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method II. Purple corn Color

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*, YOSHIKAZU KUBO*,
NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

To study the effects of purple corn color(PC) on mouse embryos, the whole embryo culture was carried out. On day 8 of gestation(plag 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), 125, 250,500 μg/ml of PC.

Yolk sac diameter, blood circulation of yolk sac, crown-rump length of embryo, number of somites, heart beats and the shape of embryos were used as parameters for the development of conceptus including the embryo. No significant difference was observed between the control and the exposed groups in the mean diameter of yolk sac, crown-rump length, the number of somites and the shape of embryos. However, a decreased number of embryos with good development of blood circulation of yolk sac and decreased mean number of heart beats was noticed in the group given 500 μg/ml PC. Anomalous embryos were not observed in any groups treated with PC. These results suggest that PC has no teratogenic effects on mouse embryos, though high doses of PC may cause developmental retardation of mouse embryos.

Keywords：マウス mouse，全胚培養 whole embryo culture，天然添加物 natural food additive，ムラサキトウモロコシ色素 purple corn color

はじめに

近年，自然・天然志向を背景に食品添加物についても天然添加物の利用，開発が進んでいる．しかしながら，その安全性に関しては長い使用経験に基づくものであり，科学的根拠を有するものは少なく，とりわけ次世代に及ぼす影響についての情報は殆どないのが現状である．

一方，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で行う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要請されている．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 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る[1)]．

今回，天然添加物の次世代に及ぼす影響，特に催奇形性の有無を検討するにあたり，できるだけ多くの被検物質をとりあげることを前提に，in vitroでの全胚培養法による試験を行った．

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1．ムラサキトウモロコシ色素のマウス胚子に及ぼす影響

投与量(μg/ml)	0	125	250	500
観察胚子数*	14	13	13	13
		培養開始時（妊娠8日）		
卵黄嚢径(mm)*	1.9±0.4	2.2±0.5	2.2±0.5	2.3±0.4
心拍数／分*	28.8±6.7	32.8±13.3	32.6±9.4	32.3±11.8
		開始24時間後（妊娠9日）		
卵黄嚢径*	3.4±0.6	3.7±0.4	3.7±0.5	3.8±0.5
心拍数*	124.6±21.1	121.2±19.9	118.8±21.7	111.9±17.3
卵黄嚢血液循環	+	+	+	+
		開始48時間後（妊娠10日）		
卵黄嚢径*	5.3±0.4	5.5±0.5	5.5±0.6	5.6±0.6
胚子頭臀長(mm)*	5.0±0.3	5.0±0.3	5.1±0.4	5.1±0.3
心拍数*	108.7±25.7	97.8±23.5	122.0±32.6	80.4±17.7
体節数*	30.4±1.8	31.5±1.6	31.7±1.7	31.0±1.4
卵黄嚢血液循環	−(1)	−(3)	−(2)	−(3)
	±(5)	±(2)	±(2)	±(7)
	+(8)	+(8)	+(9)	+(4)
胚子型	G	G	G	G

＊平均±S.D.

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)マウスを日本チャールスリバー㈱より購入，実験に供した．動物は解剖直前まで換気毎時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剥離除去し，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0.45μm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

実験に用いたムラサキトウモロコシ色素は日本食品添加物協会より入手し，分析値色価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%の粉末のものを使用した．ムラサキトウモロコシ色素は62.5,125,250mg/mlの割合で滅菌蒸留水に溶解し，その5μlを培養瓶に滴下した．したがって培養液1ml当たりのラック色素量は125，250，500μgとなり，これを培養開始24時間後から終了時までの24時間暴露した．

4．観察方法

胚子の観察及び測定は全て実体顕微鏡下にて行った．卵黄嚢径と心拍数の測定は培養開始時（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，妊娠9日に被検物質を投与，24時間暴露後の妊娠10日に結果を観察した．結果を表1に示した．妊娠10日齢のin vivoで正常に発育した胚子は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る．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．

ムラサキトウモロコシ色素を投与した今回の試験では胚子発育の指標となる卵黄嚢径，胚子頭臀長，体節数において対照群（蒸留水のみ投与）と比べ何れの投与群にも顕著な遅延は認められなかった．しかしながら，最高濃度の500μg/ml投与群では推計学的に有意ではなかったが心拍数が対照群に比べやや少なく，また卵黄嚢血液循環の良好な個体が減少した．胚子の外表異常では対照群と処置群の何れにも異常の発現を認めなかった．胚子の生死の判定の基準は，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，ムラサキトウモロコシ色素投与群の何れの群にも死亡胚子を認めなかった．

本試験に入る前に行った投与濃度決定のための予備試験において，500μg/mlより大量の投与ではムラサキトウモロコシ色素が完全に血清に溶解せず正確な投与量を明確にできなかったため，本試験での最高濃度群を500μg/mlに設定した．その際，予備試験での大量投与の胚子の形態観察においても外表異常は認められなかった．

岩瀬ら[2]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を用いた全胚培養を行い，その結果を，in vivo試験での結果と比較している．その中で，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%と，in vivoと全胚培養法との結果に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と述べている．

今回，われわれはマウスを用いた全胚培養法によりムラサキトウモロコシ色素の催奇形性について検討した．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[3]の中で，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，既知催奇形性物質であるurethan，all-trans retinoic acidでも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ている．

一方，本実験から得られた結果はムラサキトウモロコシ色素の催奇形性を疑わせるものではなく，500μg群で見られた心拍数の若干の低下と卵黄嚢血液循環良好な胚子の減少はムラサキトウモロコシ色素高濃度投与に起因した若干の発育不良によるものと考えられた．

ムラサキトウモロコシ色素は天然添加物のアントシアニン系の野菜色素として分類されている．ムラサキトウモロコシ色素の催奇形性を含む生殖毒性に関する報告はないが，Pourratら[4]はアントシアニン配糖体（カラント，ブルーベリー，エルダーベリーの抽出物）の1.5，3，あるいは9g/kgをラット，マウス，ウサギに3世代にわたって摂取させた実験で催奇形性を示さなかったことを報告している．

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ムラサキトウモロコシ色素の妊娠マウスに対する催奇形性の可能性は少ないことを示唆した．

文　献

1）東海林隆次郎：毒性試験講座11，発生毒性，1991，地人書館，東京
2）岩瀬隆之，水野英子，池田保男：Mitsubishi Kasei R & D Review，**5**(1)，92-99，1991
3）Nakashima K：AATEX, vol.**3**，9-16，1995
4）H. Pourrat, P. Bastide, P. Dorier, A. Pourrat and P. Tronche：Chim. Ther.，**2**(1)，33-38，1967

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 305-310, 1998

単孔グリッドの電子顕微鏡観察への応用

福森信隆*, 青木直人*, 佐々木美枝子*

Applications of Single Hole Grid for Electron Microscopic Observations

NOBUTAKA FUKUMORI*, NAOTO AOKI* and MIEKO SASAKI*

Keywords：単孔グリッド single hole grid，応用 application，電子顕微鏡観察 electron microscopic observation

緒　　言

透過型電子顕微鏡（透過電顕と略す）で試料を観察する時には，支持台となる格子目のグリッドが必要である．電子線に対して試料の微動や損傷を防ぐために，通常はこのグリッド上に支持膜を作製してその上に試料を載せて観察する．また電子線に安定した試料では，支持膜を張らないで粘着処理を行って直接グリッドに張り付ける方法がある．一般のグリッドは，メッシュと呼ばれる網目状の穴のあいた銅やニッケル，金等の金属でできている．メッシュは，１インチの長さでの穴の数で表し，150メッシュを標準として使用している．グリッドは，格子の数つまり網目の大きさによって100から400メッシュの種類が市販されている．バクテリアやウィルス等の微小物の観察では，試料のドリフトを少なくするために，細かな網目のグリッドを使用したほうが観察及び写真撮影に良好な結果が得られることが知られている[1,2]．

しかし，実験動物の病的器官の病理組織学的検索や飲料水及び食品あるいは環境中の異物の識別検査等については，グリッドの格子構造が試料の検索目的とする部分の視野を妨害していることが多い．このことからできるだけ広い視野を確保する必要性がある検索のためには，格子のないグリッドを使用するのが適当である．以前から，格子構造を有しない穴のあいたグリッドが市販されていたが，試料を載せた時電子線に対する支持膜の強度が弱く，試料が壊れてしまうことが多かった．そのためにこの単孔グリッドは，使用が限られほとんど普及されず，その利用方法の報告もなかった．今回，この単孔グリッドを用いて広視野観察や異物検査への応用について鏡検可能な条件を検討した．あわせて光学顕微鏡（光顕と略す）及び走査型電子顕微鏡（走査電顕と略す）との関連についても比較した．

実験方法

１．広視野観察のための単孔グリッド

試料を載せる単孔グリッドは，ベコー社（オランダ）の孔径1.0mmの銅製ホールタイプ（図１のｃ）及び長さ2.0mm，幅1.0mm（図１のｂ）と長さ1.5mm，幅0.2mm（図１のｄ）の銅製スロットタイプを使用した．あわせて通常使用している150メッシュの標準グリッド（図１のａ）と比較した．更に支持膜を張りその上に試料を載せたグリッドと，支持膜を張らずに粘着剤で試料を固定したグリッドとの差異について比べた．支持膜は，クロロホルムに溶解させた0.3％のフォルムバール液にスライドグラスを浸し，取り出して乾燥させた．この操作を３回繰り返してフォルムバール液を完全に乾燥させた後，スライドグラスの端をカミソリ刃で切り，蒸留水中にフォルムバール膜を浮かせた．グリッドを並べたスライドグラスを蒸留水中に沈めて，浮いているフォルムバール膜を下からすくい上げて膜をグリッドに張り付けた．グリッドが載っているスライドグラスは，そのまま乾燥させ，使用時に周囲の膜を剥がして支持膜とした．また支持膜を張らないグリッドの粘着処理は，トルエンに溶解させた0.2％のネオプレンW液にグリッドを浸してろ紙の上で乾燥させた．

観察のための試料は，特定部位の所見を得るために腎臓の皮質部を，また組織を広く全体的に検索する目的で心臓を選んだ．組織の固定は，2.5％グルタールアルデヒドと1％オスミウム酸で二重固定を施し，常法に従ってエタノール脱水を行い，エポン樹脂に包埋した．トルイジンブルーで光顕用に染色した準超薄切片から，腎臓は糸球体を中心に約0.6mm四方にトリミングを行った．

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073, Japan

心臓は，比較的に血管の多い部を同様な大きさで選択した．グリッドに積載する切片は，約80nmの厚さとし，酢酸ウランとクエン酸鉛の二重電子染色を施した．鏡検は，加速電圧75kVの透過電顕（日立，H-7000)を用いて，ロウマグモード及びズームモードで観察した．

2．異物等の識別のための単孔グリッド

広視野で異物等の試料を観察するには，強度の強い支持膜が必要である．そこで孔径の異なる単孔グリッドに張った厚さの違う支持膜の強度を調べた．グリッドは，実験1で用いたcのホールタイプ及びb，dの孔径の異なるスロットタイプの3種類の単孔グリッドを使用した．支持膜の厚さは，実験1の0.3%のフォルムバール液に浸積する回数を1，3，5回に分けて比較した．はじめに，試料を載せないで支持膜のみで電子線に対する強度を調べた．その後，吹き付け建材として施工されたアスベストを試料に用い，支持膜上に載せた．塊状のアスベストは，蒸留水の中で超音波装置により懸濁分散を行った後，5μlの懸濁液を支持膜の張られている径3mmの単孔グリッド上に滴下した．乾燥後，電顕観察の際支持膜から試料が飛散しないようにカーボン蒸着を行った．

また銅製のグリッドの他に，試料の組成元素を調べるために孔径1.0mmの炭素でできているカーボンホールグリッドを使用した．このグリッドは，微小部X線分析装置（Kevex-7500，EDXと略す）でエネルギー分散分析を行うために，浸積回数5回の厚めの支持膜を張り使用した．さらに通常の格子構造を持つ200メッシュのナイロン製グリッドの適用について検討した．これは，軟らかいナイロンのため加工しやすく簡単に適当な大きさの穴を作製できるという長所があり，加えて金属製でないため元素分析ができるということから，浸積5回の支持膜を張って使用した．

観察は，試料を載せたグリッドをスライドグラスの上に置いて，はじめ光顕で観察した．次に，透過電顕で50倍の低倍率から徐々に高倍へと拡大して検索を行った．更に，同一のグリッドでEDX装置を用いて元素分析を行い，構成元素を調べた．続いて試料の立体構造を把握するために，単孔グリッドを走査電顕用の試料台に接着させて，イオンスパッターで白金・パラジウムの金属蒸着を施し，加速電圧15kVの走査電顕（日立，S-800）で観察を行った．

実験結果

1．広視野観察のための単孔グリッド

図1に今回使用したグリッドの形状を表した．通常のグリッドはaで示したように，密な格子構造を持っているため，薄切した切片のかなりの部分が格子の陰になり視野が妨害された（図2）．これを避けるためにb，c，dの単孔グリッドを用いた．0.3%フォルムバール液に3回浸積した支持膜を張ったグリッドは，その上に切片を載せてもb，c，dの3種類とも破れることはなかった．しかし，孔径の大きなb，cのグリッドでは，支持膜で補強されているにもかかわらず試料のドリフトが認められた．この動きは電子線を強くするほど大きくなり，写真撮影が困難であった．また支持膜を張ったグリッドは，試料のコントラストを低下させたり，染色液の汚れが多く付着していた．

支持膜を張らないで粘着処理を行い直に切片を載せたグリッドは，bでは直ちに破れて鏡検できなかった．穴の丸いcでは，弱い電子線の時には観察が可能であるが，少し明るくすると試料のドリフトが起こり同様に破壊してしまった．細長いdのグリッドは，試料に対して比較的に安定しており，ドリフトや破壊が認められず充分に観察が可能であった．これらの現象に関しては，腎臓と心臓の差はみられなかった．図3は，dのグリッドを用いて左右にグリッドの端がかかるほどの極低倍率で撮影した腎臓の皮質部の透過電顕像を示した．中央に糸球体の全体像が格子による妨害なく表されている．その一部を拡大して図4に示した．図5は，組織の広視野を観察する目的で心臓の低倍像を示した．かなり広い範囲で観察が可能であり，多くの組織変化の所見が得られることがわかった．同様に図6では，図5の心筋の強拡大像を表した．細長いdの単孔グリッドが，支持膜を張らなくとも切片の広視野観察に充分に使用できた．

2．異物等の識別のための単孔グリッド

異物等の試料を検索するためには支持膜が必要であり，その際に膜の強度が大切である．単孔グリッドのb，c，dに支持膜を張るためのフォルムバール液の浸積回数を1，3，5回とした．はじめ試料を載せないで支持膜のみの強度を検討すると，bの大きな単孔グリッドでは浸積1回で破れてしまったが3回及び5回では膜が保持されていた．孔径の小さいcとdのグリッドでは，すべての浸積回数で支持膜は破壊されていなかった．なお，浸積回数が多くなるほど電子線の透過は悪くなった．

支持膜の上に試料としてのアスベストを積載した単孔グリッドでは，bが浸積回数の全部で膜が試料ごと破壊されていた．丸いcのグリッドでは，浸積回数1回と3回で破れ，5回の厚い膜が残った．細長いdのグリッド

は，浸積１回で破れたが，３回及び５回では支持膜が残存していた．実際の試料を載せた状態では，ｄのグリッドは薄い支持膜でも破壊されないが検索視野がかなり狭かった．生物切片と異なり，このような異物検査では試料のコントラストを必要としないため，浸積回数５回の厚い強固な支持膜を張った孔径1.0mmのｃのグリッドが適当であった．

グリッドの材質は，一般的には銅やニッケルが普通であるが，EDX装置による分析ではグリッド自体の素材元素を検出してしまうため，カーボングリッドが推奨される．図７は，孔径1.0mmのカーボンホールグリッドに浸積回数５回の厚い支持膜を張ったグリッドで，ａ図では単孔の全体像を示した．この低倍像は，グリッドをスライドグラスに置いて光顕でも良好に観察できた．透過電顕では，そのままｂ図のように高倍率に拡大でき，試料の内部構造が容易に把握できた．更にｃ図では，試料の構成元素を検出して組成成分を明らかにした．続いて，走査電顕で試料の表面構造を立体的に観察し，ｄ図に示した．単孔グリッドを使用することによって，光顕から元素分析を含めた透過電顕での観察，更に進んで走査電顕での観察へと同一の試料で検索範囲が広がった．

ナイロングリッドは，カミソリ刃で容易に切断加工ができるため，丸く開けた穴に支持膜を張って観察したところ，試料を積載していないにもかかわらず，グリッドの格子が電子線で変形してきた．そのために支持膜は破れ，引きちぎれた様態を呈した．

考　　察

透過電顕の観察には，試料を載せる径３mmのグリッドが必要である．その形状は，一般に格子状で支持膜や試料を保持しているが，その格子構造が観察を行うにあたり視野を妨害することが多い．細かな格子は，支持膜の破壊を防ぎ，あるいは試料のドリフトを防止するために重要な役割を担っている．良好な写真撮影を行うためには，このドリフト現象を避けなければならない．それには，網目を細かくして試料全体に弱い電子線を照射して，クッキング操作を行うことが大切である[3]．しかし細かな網目は，試料を観察する際に目的とする部位を隠したり，試料の有効視野を狭くする場合がみられる．今回，このような視野妨害を避けるために特殊な単孔グリッドを使用し，電子顕微鏡の試料作製の基礎的方法の一環として検討を加えた．

フォルムバールを支持膜として用い，浸積回数によって膜の厚さを加減したが，真の膜厚は明らかでなかった．しかし，実験２で試料を載せた時浸積回数の多いほど強度が増し，異物等の検査には実用的であることがわかった．生物切片では，支持膜が試料のコントラストを低下させ，汚れの原因となる可能性が高いため，支持膜を張らずに直に切片を載せた方法が良い結果を得た．その際，粘着剤で切片を固定し，若干厚めに薄切した切片を載せると細長いｄの単孔グリッドで充分に観察が可能であった．将来的にはｃの孔径1.0mmのグリッドに積載し，電顕観察が可能となるように検討したい．腎臓の試料のように糸球体全体を検索したい時には，通常のグリッドでは格子の妨害が避けられない．このような場合に広い視野を鏡検できることは，多くの価値ある所見が得られると思われる．例えば器官の組織構造が大きな脳や血管，精巣等の広視野観察に活用できると考えられる．

異物等の識別では，ｄのグリッドはスロット幅が狭すぎるため広視野が確保できない．更にまた，支持膜に試料を載せた状態では支持膜単独に比べて非常に破れやすいことがわかった．そこで，浸積回数５回の厚い支持膜をｃの孔径1.0mmのグリッドに張ってみたところ，電子線の透過を妨げることなく，良好な観察ができた．孔径の大きなｂのグリッドは，電子線に対して極めて弱く容易に支持膜を破壊させたため，使用できなかった．

光顕像と電顕像との対応は，一般に準超薄切片から目的とする部位をトリミングし，そこの超薄切片を作製して比較することができる．しかし像の一致が大変困難であるため，電顕用の超薄切片を作製してから後で光顕用の準超薄切片を薄切したり，準超薄切片をそのまま電顕用に再包埋して超薄切片を得たりする[4]．以前から試料作製に関して光顕と電顕との関連が論じられてきたが，今回単孔グリッドを使用して異物等の識別に応用した．支持膜に試料を載せた同一のグリッドから，はじめ光顕で全体像を観察し，その後透過電顕を用いて高倍率で鏡検して，併せて組成元素を分析した．続いて走査電顕で試料の立体構築の検索が可能になった．このことは，鏡検のためにそれぞれの試料作製をする必要がなく，効率化に寄与していると考えられる．

結　　語

透過電顕の広視野観察及び異物等の識別に単孔グリッドを使用して，試料作製法を検討した．広視野を得るための生物切片では，細長いスロットタイプのグリッドに支持膜を張らずに粘着処理で直に固定する方法が良好であった．異物等の検査には，厚い支持膜を張った孔径1.0mmのホールタイプのグリッドが適当であった．この時，光顕から高倍率の透過電顕及び組成元素の分析，更に走査電顕による立体像の観察が同一試料から一貫して

可能であった.

文　献

1）松本　明，東　昇：電子顕微鏡研究の実際，29-201，1979，近代出版，東京.

2）水平敏知：電子顕微鏡-医学生物学への応用，61-80，1971，医歯薬出版，東京.

3）日本電子顕微鏡学会関東支部：医学・生物学電子顕微鏡観察法，81-157，1982，丸善，東京.

4）Mayahara, H.：*Electron Microscopy*, **11**，82-88，1976.

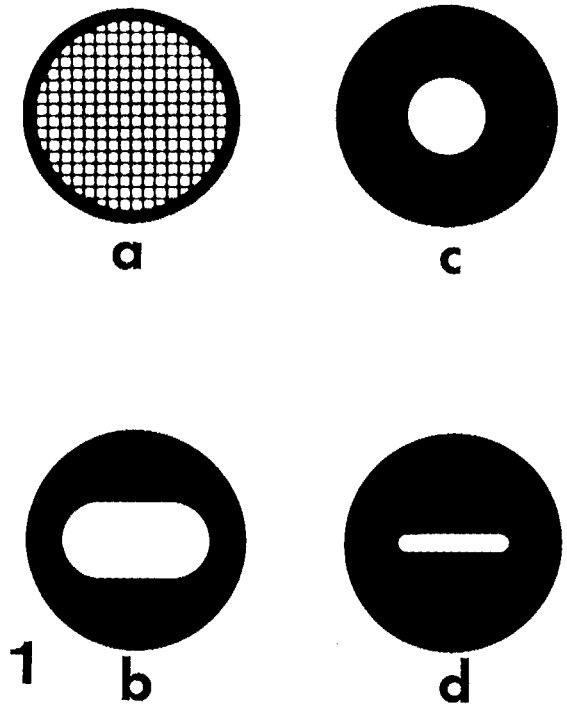


図1．標準グリット(a)とホールタイプ(c)及びスロットタイプ(b, d)の単孔グリットを示す．

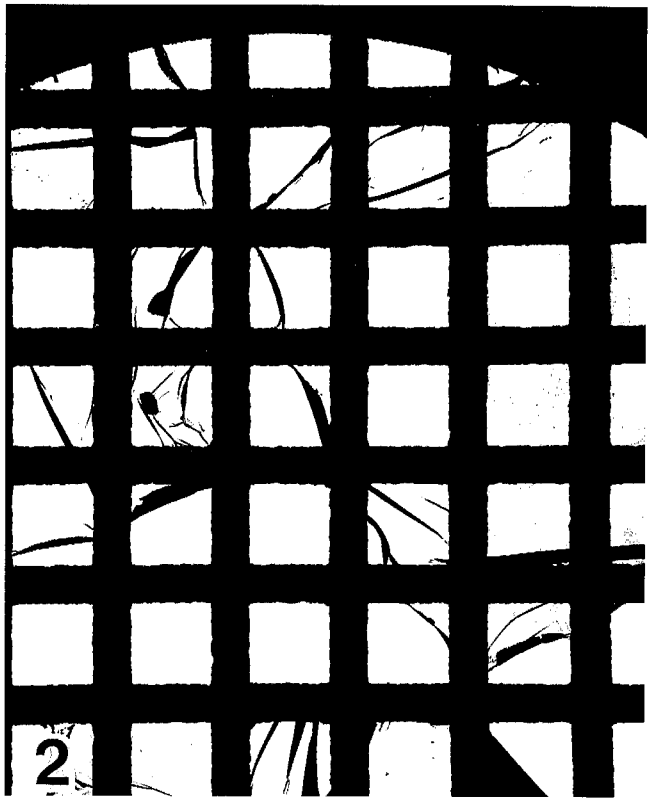


図2．超薄切片を標準グリットに積載した時，観察部位が格子構造で妨害されることが多い．X80

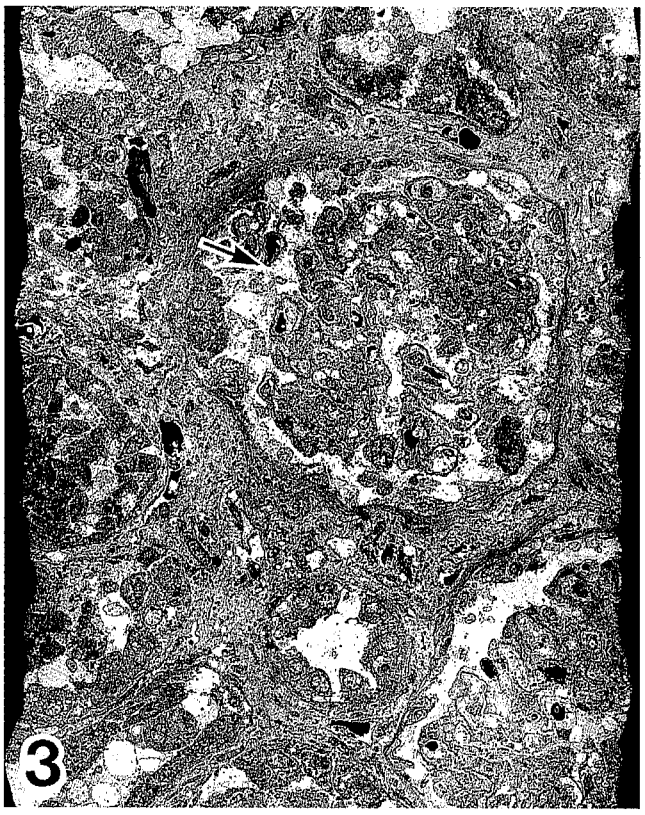


図3．図1のdのグリットに支持膜を張らないで腎皮質部の切片を載せた時,中央に糸球体の全体像が観察される（矢印）．X360

図4．図3の糸球体の部分拡大像を示しており,支持膜を張らなくてもドリフトが認められず,高倍率の観察が可能である．X1,500

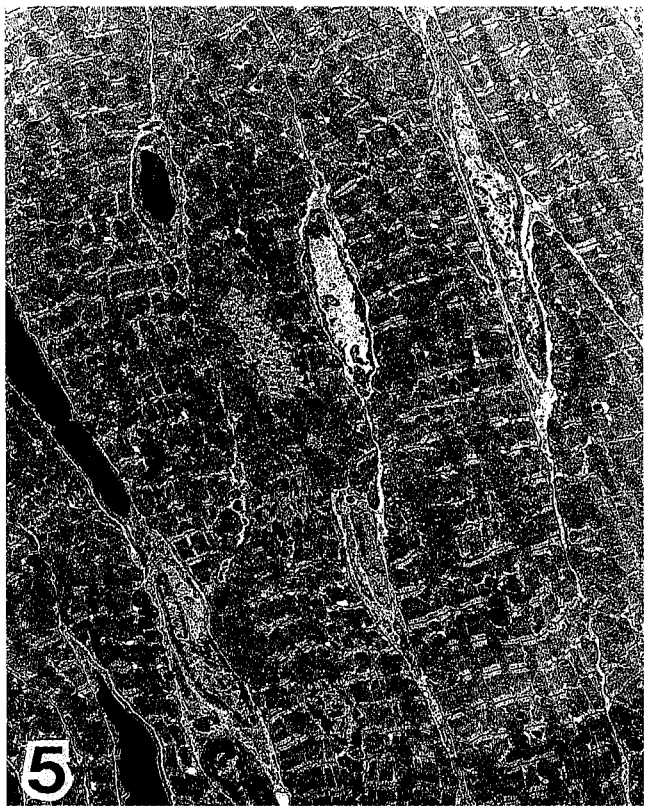
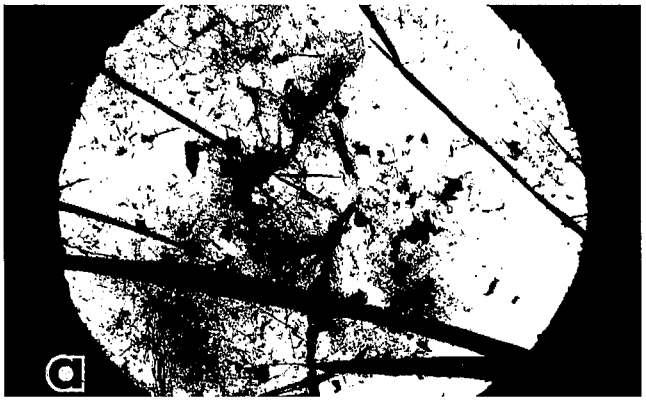
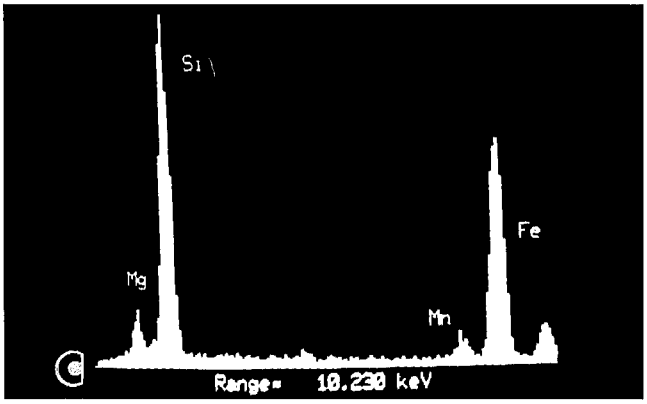


図５．広範囲の視野観察を目的とした心臓の低倍像を示す．X1,600

図６．図５の心筋の強拡大像を示した.線維の間に多数のミトコンドリアが認められる（矢印）．X9,400





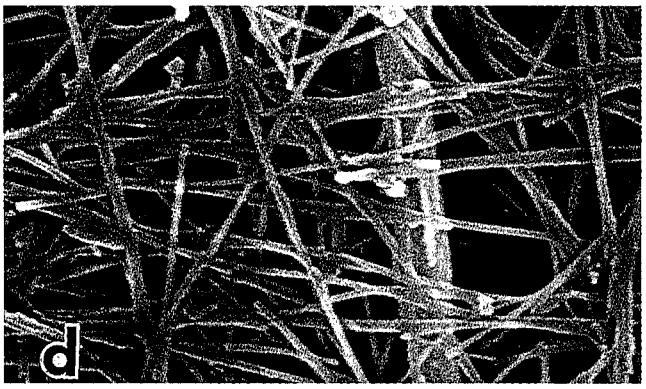


図７．異物等の識別に支持膜付きのホールタイプのグリットを使用した．試料にアスベストを用い，a 図は極低倍像で光顕観察が可能である．X70　透過電顕の高倍（b 図，X37,000）及び走査電顕（d 図，X14,500）で繊維構造が明瞭に観察される．組成元素の分析も同時に検出できる（c 図）．

報　　文 Ⅵ

公衆衛生情報に関する調査研究

REPORTS Ⅵ

PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION

Ⅵ　公衆衛生情報に関する調査研究

公衆衛生情報に関する調査研究として，本年度は５編の報告を掲載することとなった．その内容は，臨床試験の外部精度管理に関するものが１編，健康診断の手法に関するものが１編，コンピュータ情報を利用した公衆衛生情報の活用に関するものが３編である．

東京都立衛生研究所精度管理室では昭和59年度から都区の保健所及び衛生試験所の生化学検査室を対象とした精度管理調査を実施してきたが，本報告は酵素活性測定を取り上げ，酵素標準物質を用いて，ＧＯＰ，ＧＰＴ及びγ－ＧＴの酵素活性標準化に関わる問題点について述べている．調査対象施設は都区保健衛生連絡協議会の精度管理調査に参加した都立，区立の保健所及び衛生試験所で，昭和59年度から平成９年度まで延べ596施設に達する．また平成９年度には，標準物質で検量線の補正のできる自動分析機を使用している施設については常用標準血清による検査値補正の検討を追加し，この調査には自動分析機を使用する25施設のうち23施設が任意参加した．被検試料としては正常域と異常域に値をもつ市販の酵素活性測定用凍結乾燥血清を，また標準化血清としては目標値が予め値付けされた酵素活性測定用常用標準血清を分析機器の較正用血清として用いた.結果の項では，第１回の調査からの測定機器の推移や測定手法の変化についても触れ，平成９年度の測定結果から分析手段が自動機器使用に統一されれば測定値のばらつきは小さくなるであろうと推察している．また自動分析機器を使用している施設では標準化血清による較正により施設間のばらつきがさらに小さくなることが判った．結論として，ＧＯＰとＧＰＴに関しては自動機器を用いた標準化が進んでおり，すでに各施設とも正確さは許容範囲ないにあったが，γ－ＧＴではなお施設間の検査値のばらつきが大きいため，さらに標準化への取組が必要であるとしている．

健康診断手法に関する報文は，LDL-コレステロール測定法について述べたものである．LDL-コレステロールは血清脂質の指標として動脈硬化疾患との関係が示唆されているが，これまで簡易で適正な検査方法がなかったために一般健康診断の場では測定されないことが多かった．著者らは1997年に汎用自動分析装置を用いてLDL-コレステロールを直接測定することが可能な検査試薬が開発されたことから，1997年12月から1998年３月までに多摩地区保健所において一般健康診断及び小規模企業健康診断を受けた7,500人から無作為に抽出した1,177人（男594人，女583人）を対象として自動分析によるLDL-コレステロールの測定を行い，この方法による測定と従来法による測定とを比較している．また高脂血症の指導対象者は，健康診断にLDL-コレステロールの測定を追加することによりさらにきめ細かな指導を受けられるようになると指摘している．

コンピュータ情報を利用した報告には，死亡特性の分析，健康危機管理システム，及びWWWサーバとデータベースの連携の３編がある．死亡特性の分析は，1899年からわが国で実施されている人口動態統計を利用した約100年にわたる日本人の死亡現象を解析したものである．東京都立衛生研究所で開発された疾病動向予測システム（ＳＡＧＥ）を用いて，疾病別死亡動向の推移を分析するとともに，今後の動向予測を行っている．取り上げられた死因は，総死亡，全事故と自動車事故，自殺，全結核，脳血管疾患，虚血性心疾患と心不全，肝硬変と肝がん，腎疾患と糖尿病，悪性新生物，乳がんと子宮がん，結腸がんと直腸がん，肺がんの12項目で，各々についてその年次推移をグラフ化して示し，社会的背景も踏まえた考察を行っている．また，ＳＡＧＥを利用することである地域の特性を他地域と比較することも容易であり，地域における保健医療の向上に貢献できることに言及している．健康危機管理システムに関する報文は，Ｏ－157食中毒やＴＶのアニメーションによる光感受性発作など，予期せぬ健康被害を未然に防止するための情報交換の必要性とそこでの地方衛生研究所の果たすべき役割について述べている．情報交換の手段としてはインターネットとパソコン通信をあげ，両者を比較してインター

ネット利用の可能性の高さを示し，行政機関，保健所と衛生研究所など地域内の情報交換や，さらに広い範囲での情報伝達の手段について具体的に示している．

WWWサーバとデータベースの連携では，保健衛生に関する様々な情報がインターネットのWWW (World Wide Web) サーバで提供されている現状から，データベース化された情報を提供するためのWWWサーバとデータベースの連携の必要性について報告している．その内容は，苦情食品に関するデータベースを具体的な事例として，データベースに蓄積されている情報の検索にWWWブラウザを利用することにより，ユーザが使用しているコンピュータ機種やOS (Operating System) に依存することなく情報を入手する方法について述べている．システムの概要は文中に分かりやすく図解されているが，利用者はHTTP (Hypertext Transfer Protocol) と呼ばれるプロトコルでWWWサーバに接続することによりデータベースの各種情報を入手することができる．報告はコンピュータ画面を具体的に示しながら，苦情食品のデータベースから求める情報を手にいれるための詳しい解説を行っている．また，システムの効果と問題点としては，衛生研究所が長年にわたって蓄積してきた検査・研究情報をデータベース化して提供するためには，この例に示されたような，利用者の必要とする内容を随時作成、変更して利用者に返すような動的コンテンツが有効であること，また複数の個別に作成されたデータベースをある事象に対する多面的な情報として利用するためには，各データベースをリンクさせてゆく総合的なネットワークシステムの構築が必要があることを考察している．このようなある一つの事象を様々な分野から多面的に取り扱うことが可能となれば，衛生研究所が持っている微生物学，医学，化学，毒性学等のデータを一つの「事件」について総合的に利用することにより，一面的な見方とは違った新しい局面が開け，行政をこれまで以上に支援する情報提供が可能であろうと結論している．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 313-316, 1998

酵素活性測定標準化の試み —東京都・特別区衛生検査機関における生化学精度管理調査より—

大石向江*, 池田正幸*2, 渡邊泰男*3, 菅野修一郎*4, 諸角聖*5,
蓑輪佳子*, 伊瀬郁*, 神保勝彦*, 田村行弘*

An Approach of the Evaluation of Serum Enzyme Analysis in External Quality Assessment of Inter-laboratories in Tokyo

Hisae Oishi*, Masayuki Ikeda*2, Yasuo Watanabe*3, Shuichiro Kanno*4, Satoshi Morozumi*5,
Keiko Minowa*, Iku Ise*, Katsuhiko Jinbo* and Yukihiro Tamura*

Keywords：精度管理調査 external quality assessment，保健所health center，酵素活性測定 enzyme activity measurement，標準化 standardization

緒　言

臨床検査の外部精度管理は，検査機関の検査精度の向上を基盤として，検査の標準化を図ることにより検査機関の検査結果の較差をなくすことを最終目的とする．すなわち，精度の高い検査結果は正確な疾病診断には欠くことができないものであり，検査機関の較差のない検査結果は受診機関を変更するたびに要求されていた再検査の必要性も解消する．そのため，検査機関の検査結果較差をなくすいくつかの提唱と試みがなされてきた[1~3]．

我々は都内の公立衛生検査機関（都立，区立の保健所及び衛生試験所）の生化学分野の検査精度向上を目的とし，昭和59年度から血清の生化学的検査について精度管理調査を都区保健衛生連絡協議会の精度管理事業の一環として実施してきた．一方，平成10年４月１日には地域保健法が改正・施行され，地域住民に対する健康・福祉政策のより一層の充実が求められている．公立衛生検査機関においても検診業務を通して直接住民に関係するため，検査に対する責任は大きく，検査精度の確保のためには担当者の日常の研鑽が重要となる．

そこで今回，従来から調査対象としてきたGOT及びGPT，ならびに平成７年度から調査に取り入れたγ-GTの３項目について，日常検査法で測定した値と，常用標準血清で較正を行った機器で測定した値の比を比較し，施設間較差是正の可能性を検討した．また，施設間較差と測定機器及び測定方法の関係を知るため，これまでに実施した14回にわたる調査結果を基に，各施設で使用している測定機器と測定方法の推移についても併せて検討したので報告する．

調査対象及び方法

１．調査及び対象施設

都区保健衛生連絡協議会の精度管理調査に参加した都立，区立の保健所及び衛生試験所の生化学検査室を対象とした．

調査は昭和59年度から平成９年度まで年一回，合計14回実施し，参加施設数は合計596であった．

なお，平成９年度の調査では標準物質で検量線の補正のできる自動分析機を使用している施設については，常用標準血清による検査値補正の検討を追加した．この調査には，自動分析器を使用する25施設のうち23施設が任意参加した．

＊東京都立衛生研究所精度管理室　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊2中野区衛生試験所　164-0001　中野区中野２－17－４
＊3東京都立衛生研究所多摩支所　190-0023　東京都立川市柴崎町３－16－25
＊4荒川区荒川保健所　116-0002　荒川区荒川２－12－５
＊5東京都立衛生研究所細菌第一研究科　169-0073　東京都新宿区百人町３－24－１

2．各施設で使用している測定機器と測定法の推移

精度管理調査に参加した各施設でGOT及びGPTの測定に用いられる機器及び方法について，アンケート方式による調査を毎年実施した．

3．調査項目

血清・生化学的項目のうちGOT及びGPT，ならびに平成7年度から調査に取り入れたγ-GTの3項目を調査対象とした。

4．試料

①被検用血清：正常域と異常域に値をもつ市販の酵素活性測定用凍結乾燥血清を被検用血清として用いた．

②常用標準血清：日本臨床化学会（以下，JSCCと略）の勧告法により，血清製造会社で目標値が予め値付けされた酵素活性測定用常用標準血清を較正用血清として用いた．

5．精度管理調査方法

各施設において日常実施している方法により被検血清試料2種を測定し，その回答を求めた．

他方，平成9年度については，自動分析機を使用している施設ではこれを較正前の測定値とし，さらに，較正用血清の目標値を予め機器に登録した．ついで，較正用血清を実測して得られた値を目標値に合わせることで機器を較正し，被検用血清を再測定した．これらから得られた値と較正前の測定値の比を常用標準血清による測定値の補正効果の評価資料とした．

6．調査結果の集計方法

平成9年度の精度管理調査で得られたGOT，GPT及びγ-GTの各測定値について，それぞれ測定機器別に変動係数（以下，CVと略）を求め，機種ごとのばらつきを評価した．

結果及び考察

1．測定機器の推移

第1回からの測定機器の推移をみると，図1に示すように平成7年度からは用手法（測定器として分光光度計を使用）が，また，平成9年度からは簡易測定器（ラバシステム）がそれぞれ使用されなくなった．現在は自動分析器と乾燥試薬フィルムを用いるドライ方式の測定器（以後，ドライケミストリーと略）の2種のみが使用されている．

2．測定方法の変化

GOT及びGPTの測定方法は図2及び3に示したように，GOTにおいてはJSCC勧告法に準拠したリンゴ酸脱水素酵素法（malic dehydrogenase法．以下，MDH法と略），GPTにおいては乳酸脱水素酵素法（lactate dehydrogenase法．以下，LDH法と略）を含めた4法により検査が行われていたが，平成6年度以降はGOTの測定法はMDH法とPOD法，GPTの測定法はLDH法とPOD法となり，測定方法が統一されつつあることがわかった．また，平成7年度から調査に取り入れたγ-GTの測定方法も図4に示すようにJSCCの勧告法に準拠した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）を含めた4法で検査が行われていたが，平成8年度以降はγ-グルタミル（3-C-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）はなくなり，3法へと変化した．

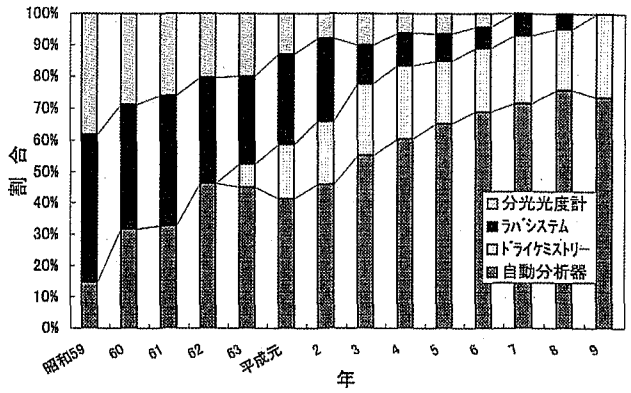


図1．測定機器の使用割合の推移

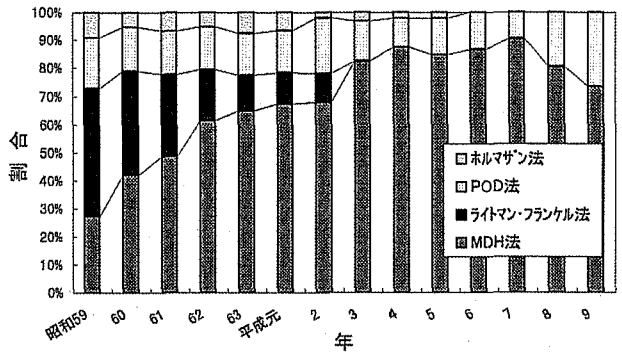


図2．測定方法の推移（GOT）

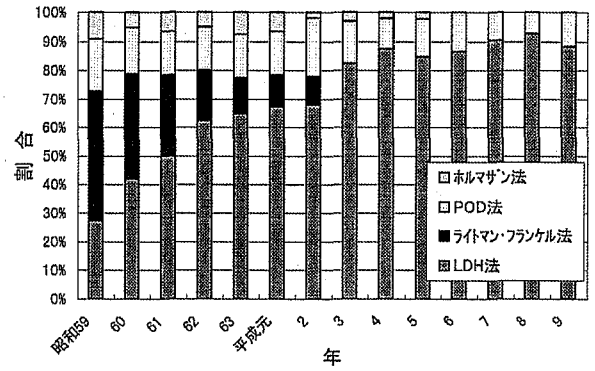


図3．測定方法の推移（GPT）

表１．平成９年度の精度管理調査におけるGOT，GPT及びγ－GTの変動係数

		正常域試料			異常域試料		
		GOT	GPT	γ-GT	GOT	GPT	γ-GT
変動係数(%)	全　　体	10.2	14.1	19.4	9.9	7.2	18.1
	自動分析器	3.4	5.2	13.7	2.8	4.4	13.9
	ドライケミストリー	6.9	20.3	27.2	7.5	11.6	25.1

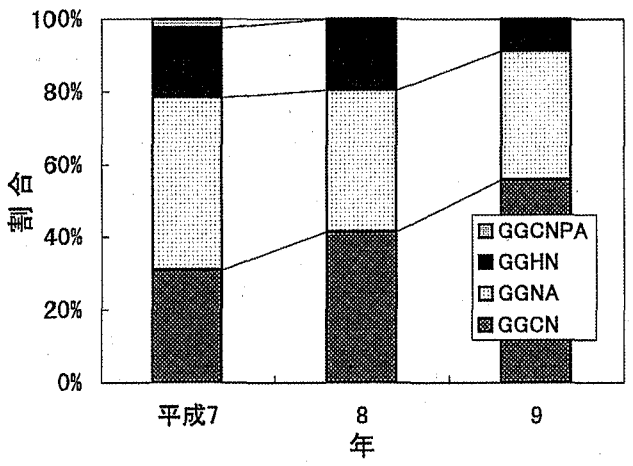


図４．測定方法の推移（γ-GT）

GGCN：γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法
GGNA：γ-グルタミル-p-ニトロアニリドor-4-ニトロアニリド基質法
GGHN：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
GGCNPA：γ-グルタミル(3-C-4-N,N-ジ-n-プロピルアミノ)アニリド基質法

３．GOT，GPT及びγ-GTのCV

平成９年度の精度管理調査における各施設のGOT，GPT及びγ-GTのCVを表１に示した．各項目，各試料ともドライケミストリーを使用した測定値のCVは自動分析器を用いた施設のCVより大きくなった．これはドライ方式によりマトリックス効果が生じたことで測定値のCVが大きくなったことが考えられる．このことから，分析手段が自動機器使用に統一されれば，測定値のばらつきは縮小すると推察される．

４．較正前の機器と較正後の機器における測定値の比

自動分析器の較正前の測定値と，常用標準血清を用いて較正した後の測定値の比を図５及び６に記した．GOT及びGPTの測定値はほとんどの施設が「勧告法による目標値±10%」以内に収まっており，各施設の検査値は酵素測定における正確さの許容範囲内[4,5]であった．これは，先に挙げた測定法の収束とJSCC準拠試薬の使

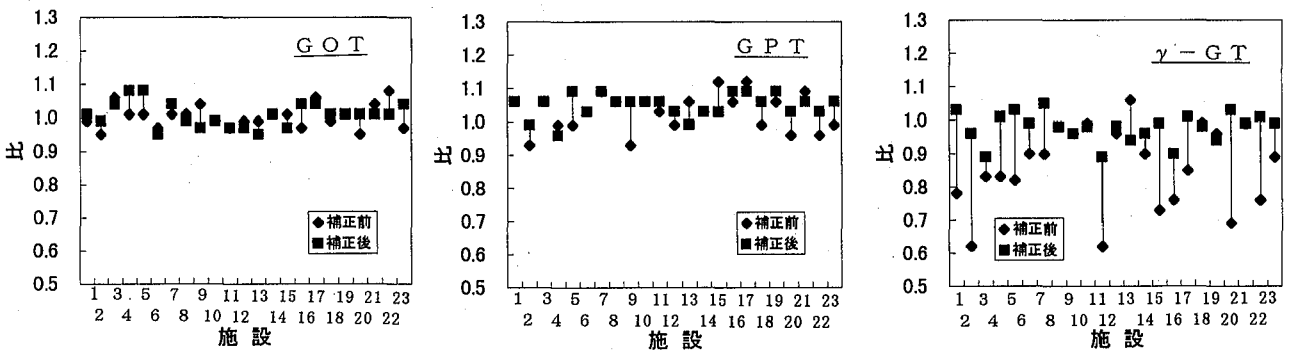


図５．目標値に対するGOT，GPT及びγ-GTの測定値の比（正常域試料）

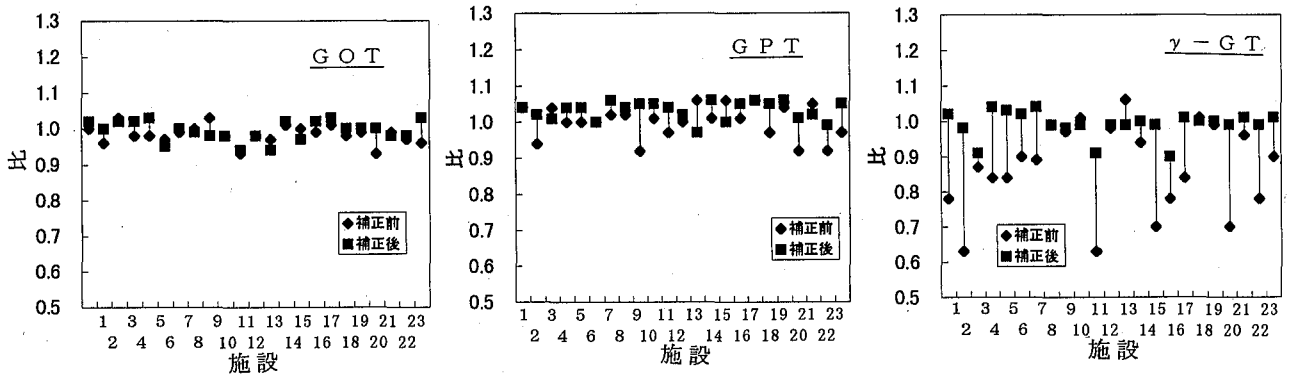


図６．目標値に対するGOT，GPT及びγ-GTの測定値の比（異常域試料）

用が進んだ（平成6年度：GOT，GPTとも；45.8%，9年度：GOT，GPTとも；78.3%）ことにより測定値が収束してきたものと考えられる．また，較正前後の値を比較すると，較正した機器を用いた測定値は各施設間のばらつきはさらに小さく，測定値の施設間差が縮小することがわかった．他方，各施設間におけるγ-GTの測定値のばらつきは較正により小さくなり，施設間差の収束が明確に観察された．しかし，補正前の測定値からみて，現在各施設で採用している測定法の間にはまだ系統誤差が大きくみられ，施設間差是正に向けて改善する必要があると考えられる．すなわち，その改善手段として，現在γ-GTの測定法として47.8%が採用しているJSCC勧告法への統一，勧告法に対応した試薬の使用等の対応策が考えられる．さらに，標準物質を使用して機器を較正することによって施設間差の解消が進むものと考えられる．

なお，施設3，11及び16におけるγ-GTの比は他の施設に比較して低かった．この理由として，施設11は濃縮試薬のみを使用する分析機器を用いて測定していることに起因するマトリックス効果の影響と考えられる．また，JSCC勧告法でないγ-グルタミル-3-ヒドロキシメチル-4-ニトロアニリドを基質に用いた測定法（以下，GGHN法と略）では勧告法との間に基質の違いによる反応性の差が現れるため，較正しきれないことが確かめられている[6]．今回，同法で測定した施設3及び16の結果が低かった理由は，基質の違いによる反応性の差によるものと考えられる．

なお，今回の試みにおいて，従来の内部精度管理においては判明し得なかった機器の初期設定ミスも担当技師によって発見され，その改善により精度の向上を図ることのできた施設があり，この点からも標準物質を用いた精度管理と機器補正の必要性が示唆された．

すでに正確さの許容限界内にあるとみなされるGOTおよびGPTに対してはもとより，そうでない場合には更に，今後標準物質を用いた内部精度管理をより充実させることで，偶発誤差等の施設内変動を防止して現在の水準を保ち，検査値の施設間差是正を図ることが各施設に求められている．検体数が少なく，検査頻度の少ない施設においてこそ，常に検査精度を高い水準に保持していく努力がより一層必要であろう．こうした努力により検査施設間差が解消されれば，地域住民の保健・福祉の増進に寄与できるものと考える．

ま と め

1．都内の衛生検査機関においては，自動機器を用いたGOT及びGPTの測定は標準化が進んでおり，すでに各施設とも正確さ（バイアス）の許容範囲内にあった．

2．GOT及びGPTにおいて較正前後の値を比較すると，較正した機器による測定値は施設間におけるばらつきがさらに小さくなり，施設間差が縮小することがわかった．

3．γ-GTは現状では施設間差（系統誤差）が大きく，改善の余地のあることが判明した。

4．γ-GTでは標準物質を用いて規準化を行った結果，測定値の施設間差は著しく小さくなった．

5．以上のことから，γ-GTではなお施設間での検査値のばらつきが大きいため，さらに標準化へ向けた取り組みを進めるとともに，各施設では内部精度管理を十分に行って偶発誤差を生じないように努力する必要がある．

(付記：本研究の概要は衛生局学会第100回1998年5月で発表した.)

文 献

1）千葉正志：医学検査，**46**，735-743，1997.
2）岡田 健：医学検査，**46**，879-883，1997.
3）菅野剛史：医学検査，**46**，1413-1414，1997.
4）桑 克彦：臨床検査，**39**，519-524，1995.
5）桑 克彦：平成8年度精度管理「生化学」講演会資料（臨床化学検査における新しい外部精度評価－EQA－と熟練度試験－PT－の方法，1996.
6）小山 宏：医学検査，**47**，1203-1208，1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 317-320, 1998

LDL-コレステロール値の検討と健康診断への応用について

秋場哲哉*, 渡邉泰男*, 安部昭子*, 磯貝スエ子*
入倉善久*, 前　潔*, 山田澄夫*, 上木隆人*

Estimation and Application to the Medical Examination of Low Density Lipoprotein Cholesterol

TETSUYA AKIBA*, YASUO WATANABE*, AKIKO ABE*, SUEKO ISOGAI*,
YOSHIHISA IRIKURA*, KIYOSHI MAE*, SUMIO YAMADA* and TAKATO UEKI*

Keywords：LDL-コレステロール low density lipoproteincholesterol，高脂血症 hyperlipemia，動脈硬化症 arteriosclerosis

はじめに

総コレステロール（以下T-C）値は，動脈硬化症や冠動脈硬化症の原因の一つとされる高脂血症の診断に広く用いられてきた[1-3]．しかし，厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班による昭和61年度報告書[4]，及び1997年に日本動脈硬化学会が発表した高脂血症診療ガイドライン[5]（以下ガイドライン）等では，T-C値よりもLDL-コレステロール（以下LDL-C）値の方が動脈硬化性疾患との関係が深く，今後は血清脂質の指標としてLDL-C値を重視すべきであるとしている．

LDL-C値の測定法としては，超遠心法やFriedewald（以下FW）計算式[6]により推定する方法等があるが，基準法とされる超遠心法は，特殊な装置と長時間を必要とするため実用的ではない．一般的に広く用いられているFW計算法は，超遠心法による値とよく近似した値が得られるものの，食事等の影響により容易に変動するトリグリセライド（以下TG）値を式中に含むため，空腹時採血を徹底することが困難な健康診断の場では正確な値を得ることが難しい．また，FW計算式はTG値が400 mg/dlを超えると誤差が大きくなる点や，式中のTG/5という部分が日本人にはTG/4の方が適しているのではないかといった指摘もある[7]．

一方，保健所等における健康診断では，LDL-Cについては超遠心法はもちろんのこと，前述のFW計算式を用いるためHDL-C検査を追加することも少なく，多くの場合血清脂質の検査は労働安全衛生法に含まれるT-CとTGの２項目で行われ，食事等の影響による高TG値が考えられる時にはT-C値のみを基に判断されているのが現状であろう．

1997年，汎用自動分析装置を用いてLDL-Cを直接測定可能な検査試薬が開発され，多くの検査機関において容易にLDL-Cを測定することが可能となった．今回，本法によるLDL-C実測値を求めFW計算値との比較を行うとともに，LDL-C検査を行った場合の指導対象者の変化を確認し，健康診断の場における本法の有用性を検討した．

材料及び方法

１．検査対象者

1997年12月から1998年３月までの４ヶ月間に，都内多摩地区保健所における一般健康診断及び小規模企業健診を受診した7,500人の中から無作為に抽出した1,177人（男594人、女583人）を対象とした．その年齢構成を男女別に表１に示した．

２．LDL-C実測値測定法

LDL-C測定用試薬はコレステストLDL（第一化学薬品）を使用し，自動分析装置は日立7170にて測定した．測定にあたっては，対照としてLDLコレステロール標準試料（福祉医療技術振興会）を用い，その測定値が常に標準試料表示値の±３％以内であることを確認した．本試薬は，異なった働きの２種類の界面活性剤を時間をずらして作用させることで，まず血清中のLDL-C以外のコレステロールを反応，消去し，次の反応で残されたLDL-Cを

* 東京都立衛生研究所多摩支所　190-0023　東京都立川市柴崎町３－16－25
* Tama Branch Laboratory, The Tokyo Metoropolitan Research Laboratory of Public Health
3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

表１．対象者の年齢分布

年齢区分(才)	男性	女性
15～19	16	14
20～24	111	116
25～29	96	81
30～34	88	48
35～39	44	54
40～44	45	60
45～49	43	76
50～54	55	62
55～59	35	42
60～64	35	18
65～75	26	12
計	594	583

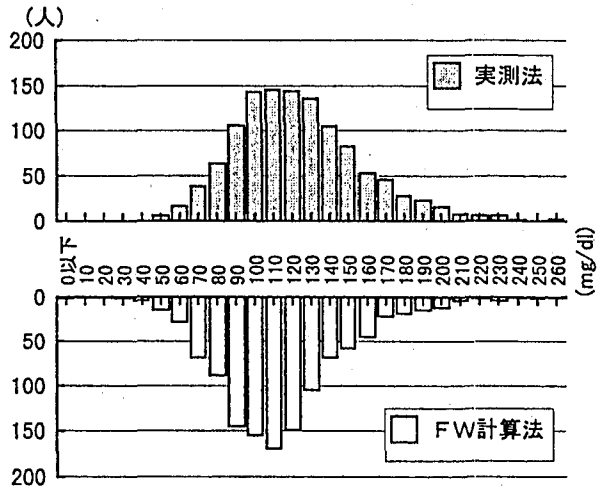


図１．LDL-C値分布

測定するというものであり，その基礎的検討は菅野ら[8]により行われ，超遠心法との一致性や同時再現性，直線性等に優れた精度を有するとの報告がなされている．

３．FW計算値算出法

Friedewaldの報告[6]に準じて，T-C値，TG値，HDL-コレステロール（以下HDL-C）値の３項目を測定し，下記のFW計算式により算出した．

FW計算式：LDL-C＝（T-C）－(HDL-C)－(TG/5)

４．統計的処理方法

LDL-C実測値とFW計算値を比較するに当たっては，t検定によって統計学的有意差を検討した．

結果及び考察

１．LDL-C実測値とFW計算値の比較

図１は，LDL-C実測値とFW計算値について，対象者全体の分布状況を10mg/dl間隔ごとにみたものである．FW計算値の平均値は108.2mg/dlであったのに対し，実測値は118.6mg/dlであり，FW計算値は実測値に比べ約10mg/dl低値を示した．また，標準偏差はそれぞれ32.3mg/dlと33.7mg/dlであった．実測法と計算法の相関をみると，図２に示したようにｒ＝0.972と良好であった．

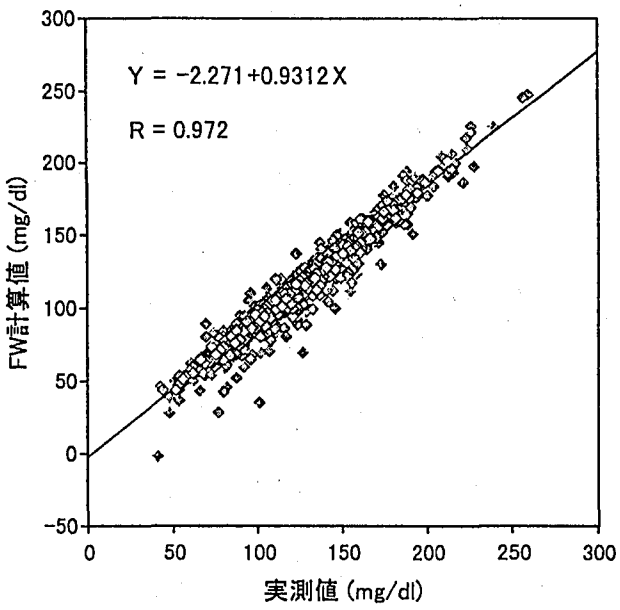


図２．LDL-C実測値とFW計算値の関係

２．TG値とLDL-C値の関係

次に，TG値がLDL-C値に与える影響を見るため，TG値を100mg/dl間隔ごとに５段階に分け，それらに含まれる対象者のLDL-C実測値とFW計算値の比較を行った．その結果，表２に示したように，対象者の89％はTG値200mg/dl以下であり，残り131人のうち17名が400mg/dl以上であったが，全てのグループでFW計算値は実測値に対し危険率１％以下で有意に低値を示した．FW計算式は，TG値が400mg/dl以下で使用可能とされているが[6]，今回の検討ではその範囲内であっても有意に低値を示す結果となり，TG値の高低にかかわらず，FW計算値が食事等による影響を受けていることが推測できた．したがって，病院における入院患者のように食事や飲酒，あるいは採血時間等が一定条件に管理されている場合には，FW計算式を用いてLDL-C値を推測することは可能と思われたが，健康診断時に一律にFW計算式を用いることは信頼性に対し不安を残すことが示唆された．また，表２をグラフにすると興味ある成績が得られた（図３）．すなわち，TG値の上昇に伴いLDL-C値は増加するが，TG値300mg/dlをピークにその後は減少に転じた．T-C値やHDL-C値がTG値300mg/dl以上でも大きな変化がなかったことから考えると，このLDL-C値の減少分は内因性のTGの輸送形であるVLDL-コレステロ

表2．ＴＧ値区分によるＬＤＬ－Ｃ値

ＴＧ値	人　数	実　測　値		ＦＷ計算値		(a)-(b)	
		平均(a)	ＳＤ	平均(b)	ＳＤ		
～ 99	663	109.3	29.9	102.0	28.8	7.3	*
100～199	383	129.0	33.1	116.7	32.6	12.3	*
200～299	86	144.2	37.6	126.6	38.3	17.6	*
300～399	28	122.8	36.1	99.5	33.9	23.3	*
400～	17	114.7	29.5	79.8	32.9	34.9	*
全　体	1,177	118.6	33.7	108.2	32.3	10.4	*

＊危険率1%以下で有意差あり

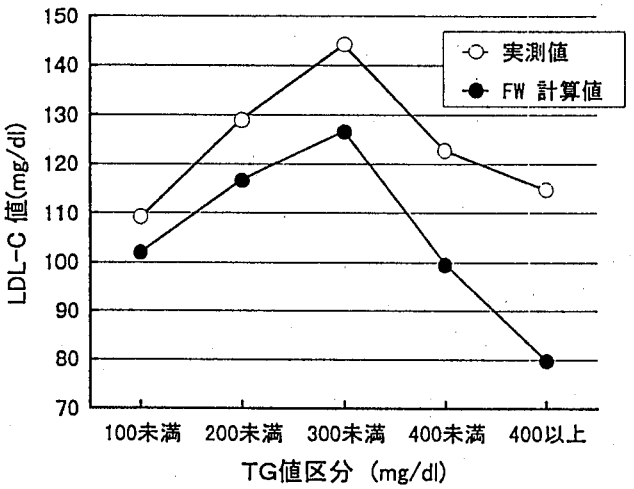


図３．TG値区分によるLDL-C値

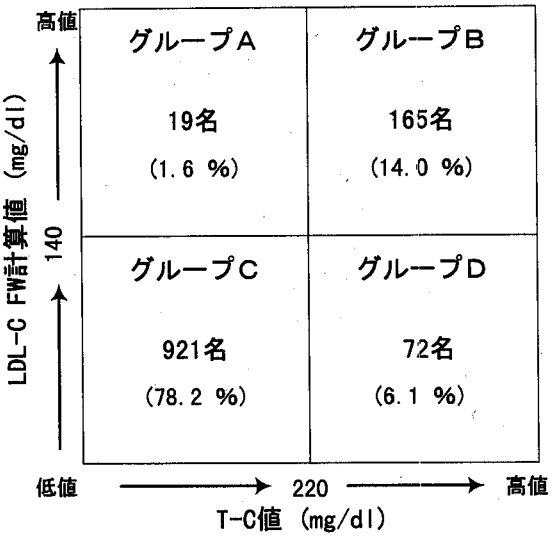


図４．高コレステロール血症区分（１）

ール等が増加するものと思われる．したがって，TG値が300mg/dlを超えるような上昇は，食事等による一過性のものよりも主に体内合成によると思われ，この中にはＷＨＯによる高脂血症の分類Ⅳ，Ⅴ型に該当する者も含まれているのではないかと考えられる．

3．診断基準値による高コレステロール血症者の分類

被検者群における高コレステロール血症の分類を行うために，ガイドラインによるT-C診断基準値(220mg/dl)に加え，LDL-C診断基準値（140mg/dl）を基に対象者のグループ分けを行い，各グループの該当者数を算出した．図４はT-C値とFW計算値，図５はT-C値とLDL-C実測値を用いて高コレステロール血症区分を表したものである．Ａ区分はT-C値は基準値未満だがLDL-C値が基準値以上のグループ，Ｂ区分はT-C値，LDL-C値ともに基準値以上，Ｃ区分はどちらも基準値未満の指導対象外とされる群，Ｄ区分はT-C値が基準値以上でLDL-C値が基準値未満のグループである．各図のＢ及びＤ区分に含まれる者は，これまでのT-C値によって高コレステロール血症者として認識されていたグループで，その数は237人（20.1%）であった．LDL-C値を指標に加えることにより，グループＡが新たに指導対象者として把握された．FW計算値ではグループＡに含まれる高LDL-C者は19人（1.6%）であるが，実測値では80人（6.8%）が対象者と

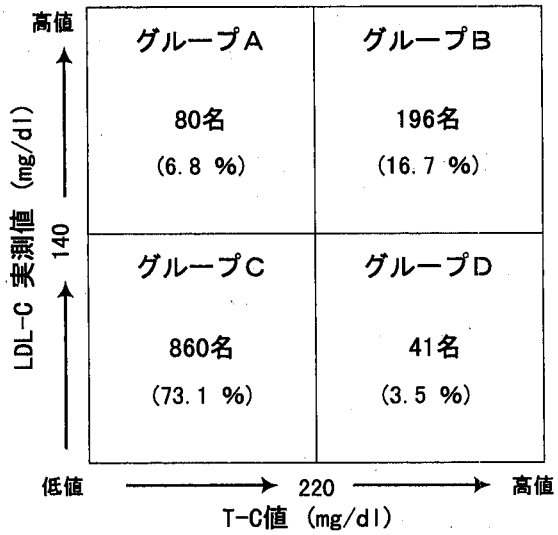


図５．高コレステロール血症区分（２）

なり61人増であった．この差は，FW計算値が実測値に対して低値を示すことによって，図4ではこの61人がグループCに含まれるためである．また，これまで対象者とされていた高コレステロール血症者の内，LDL-Cが基準値140mg/dl未満のD区分に含まれる者の存在が明らかとなった．D区分にはFW計算値では72名，実測値では41名が含まれ，本来指導を必要としない者や，グループBとは別の視点から診断されるべき高HDL-C血症者等のグループであることが明らかにされた．このように，健康診断における新たな診断指標としてLDL-C実測法を加えることで，動脈硬化疾患のハイリスクグループを正確かつ詳細に把握することが可能となる．

4．T-C値及びLDL-C値の年齢による変化

T-C値及びLDL-C実測値の年齢による変化を性別に検討した成績を図6に示した．男性は35歳までT-C値，LDL-C値とも上昇したが，それ以降はほとんど変化がなく診断基準値を超えることはなかった．また，ガイドラインによって男性の動脈硬化危険因子とされる45歳以上についても，その前後の数値に大きな変化は見られなかった．一方女性においては，両測定値とも加齢とともに徐々に増加する傾向が見られ，55歳以上で診断基準値を超えた．この年齢55歳はガイドラインにより女性の危険因子とされた閉経期56歳によく一致していた．女性におけるT-C値の加齢による上昇は従来より知られているが，LDL-C値についても加齢とともにT-C値にほぼ平行して上昇しており，その数値の判断にあたってはT-C値と同様，年齢を大きなファクターとして考慮する必要性が確認できた．

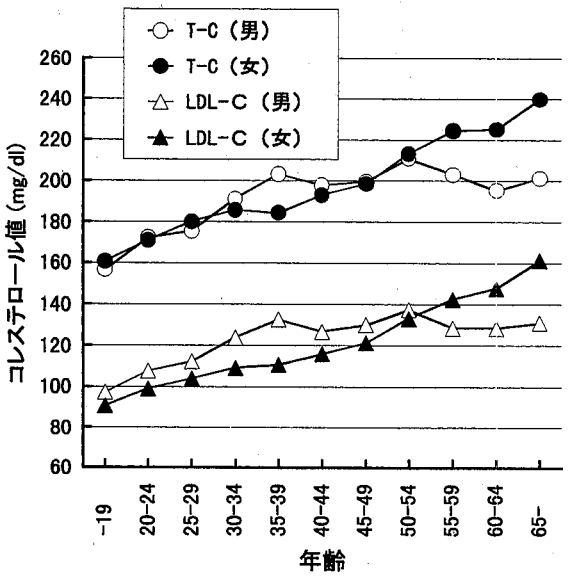


図6．年齢区分による値の変動

上述のごとく，T-C値に加えLDL-C値を判断基準に加えることで，より動脈硬化症と関係の深い高コレステロール血症指導対象者を選択，把握することが可能となる．この時，FW計算法が食事等の影響で低値を示すことを考慮すると，空腹時採血が守られがたい健康診断の場においては，実測法によるLDL-C検査の導入が生活習慣病予防の有効な対策となろう．他方，高コレステロール血症者の分類にあたり用いたLDL-C診断基準値（140mg/dl）は，実測値による診断基準値が示されていないため日本動脈硬化学会がFW計算値から求めたものを使用した．今回我々は実測値からガイドラインと同様の方法によりLDL-C診断基準値を求め，それがガイドラインとほぼ一致することを確認した．LDL-C実測法の診断基準値としてガイドライン値を用いることは問題ないと思われるが，実測法における診断基準値の設定については今後臨床の場を中心にさらに検討を進めることが必要であろう．

文　献

1）小西正光，飯田　稔，内藤義彦，　他：地域・職域別にみた血清総コレステロール値の動向と循環器疾患との関連．動脈硬化，**15**：1115-1123，1987

2）Kitamura A,Iso H,Naitou Y, et al： High-densitylipoprotein cholesuterol and premature coronary heart disease in urban japanese men. *Circulation*, **89**：2533-2539，1994

3）文部省班研究（班長　大島研三）：健常日本人の血清コレステロールおよびトリグリセライド値に関する研究．動脈硬化研究会誌，101-108，1974.

4）垂井清一郎：厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班．昭和61年度研究報告書．1987.

5）秦　葭哉，馬渕　宏，齋藤　康，　他：高脂血症診療ガイドライン検討委員会報告（1）．動脈硬化，**25**(1・2)：1-34，1997.

6）Friedewald,W.T.,Levy,R.I.,and Fredrickson,D.S.：Estimation of the concentration of low-density lipoplotein cholesterol in plasma,without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* **18**：499-502，1972.

7）秦　葭哉，中島久美子：血清脂質に対するFriedewald　LDL-コレステロール式の妥当性について．脂質生化学研究所，**27**：123-126，1972

8）菅野剛史，櫻林郁之介，齋藤　康，　他：新しく開発されたLDL-コレステロール測定試薬の評価．医学と薬学，**37**：635-644，1997.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 49, 321-328, 1998

日本における死亡特性の分析

池田一夫*, 上村尚*

Studies on Charactaristics of Cause of Death in Japan

KAZUO IKEDA* and HISASHI KAMIMURA*

Keywords：人口動態統計 vital statistics，死因 cause of death，年次推移 a yearly trend，ＳＡＧＥ　SAGE

研究目的

わが国では，1899年から中央集査による人口動態統計が実施されている（1944年から1946年を除く）．この情報を利用することにより約100年にわたる日本人の死亡現象を解析することが可能である．厚生省大臣官房統計情報部では，カラーグラフによる図表を中心にして，わかり易く解説した冊子「最近の人口動態」を毎年発行している．この冊子は出生・死亡・婚姻など人口動態統計全般を包括するものであるため，死亡事象についての分析が十分であるとはいえない．そこで，主要死因別年次推移の分析をとおし，日本における死亡特性を明らかにするために本研究を実施した．

研究方法

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（ＳＡＧＥ）[1-4]を用い，疾病別死亡動向の推移を分析すると共に今後の動向予測を示す．

結果および考察

1　総死亡（図1の1）

人口動態統計が開始された1899年において，男子476,249名，女子455,828名であった．以後ゆるやかな増加で推移するが，1918年に至って突如激増し男女とも70万を越える．疫学史上に名高いスペインかぜである．1925年頃からは60万前後の水準が定着して太平洋戦争に突入する．敗戦前後の混乱期における過剰死亡は，優に300万を越えるともいうが，実態は1944～46年のデータ欠損のために不明である．

戦後の死亡数の減少は劇的である．終戦前後，男女とも年間50万台を数えた死亡数は，ほぼ10年を経て30万台へと激減し，漸増しながら1996年の男子488,605名，女子407,606名となる．今後も漸増を続け2010年頃には男子は60万台，女子は40万台半ばまで増加するであろう．

2　全事故と自動車事故（図1の2及び3）

全事故による死亡はいずれの年次においても女子1に対し概ね男子2～3強となっている．男子の事故死で特徴的なのは1970年代前半に激減していることである．これは自動車事故による死者の激減によるものである．1950年には2,247人で全事故死（23,783人）の1割にも満たなかった自動車事故死は，1970年には16,540人と全事故死（33,112人）の5割にも達した．しかし，この直後から急激な減少が始まり，わずか5年ほどでほぼ半減した．その後ふたたび緩やかに増加しはじめ1990年頃から10,000人前後となり，1996年には10,170名となっている．

自動車事故死の世代マップを詳細に検討してみると

(1) 20歳前後の青年期をピークとし中年後期までに広がる高値域が1959～73年の期間に存在する

(2) 1950年代から現在まで一貫して20歳前後に死亡数のピークが存在する

ことなどがわかる．1970年頃は団塊の世代が，そして1990年頃には団塊の世代の子供たち（第二次ベビーブームの世代）がちょうど20歳前後にさしかかっている．それが，1970年頃と1990年頃に死亡数のピークが現れた一因である．今後，青年期人口が減少し続けることから，交通事故死は漸次減少を続けていくであろう．ただし，高齢者人口の増加にともない，75歳前後の死亡が増加する可能性が高い．早急に，高齢者対策を講じていく必要があろう．なお，全事故における1995年のピークは阪神大震災によるものである．

3　自殺（図1の4）

終戦直後の1947年から急速な増加が始まり，1958年には男女各13,895名，9,746名に達する．その後減少に転じ1967年の男女各7,940名，6,181名を最後にまたも増加に転じた．男子は1983年の16,876名がピークとなり1990年

* 東京都立衛生研究所環境保健部　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

に12,316名と極小を示した後，再度増加に転じ1996年には14,853名に達した．女子では，男子に比してその増減は緩やかであり，1996年には7,285名となっている．ＳＡＧＥで得られる世代マップで分析すると，1958年においては男女とも自殺のピーク年齢が20代であったのに対し，1967年の男子のそれは50歳前後となっており，58年と67年いずれにおいてもピークを構成しているのは昭和ヒトけた世代であることがわかる．1990年以降の自殺の増加は年齢的な特徴を持ち，ピークの中心は50歳前後となっている．

4　全結核（図１の５）

結核に代表される感染症による死亡は戦後激減した．結核死は1950年の男女各65,089名，56,680名から激減し1996年にはそれぞれ2,064名，794名になっている．今後も順調に減少し2010年頃には男子1,300名，女子500名程度になることが予測される．

5　脳血管疾患（図１の６）

これには，脳内出血，脳梗塞，くも膜下出血，その他の脳血管疾患が含まれる．1950年の死亡数は男女それぞれ42,668名と45,752名，以後，男子は1970年の96,910名，女子は1973年の86,009名までほぼ単調に増加し，以後はほぼ単調に減少して男子は1993年に55,279名，女子は1992年に62,627名と極小を示した．1996年には男子66,479名，女子73,887名となっている．今後は，多少の増減を示しながらもこの程度の死亡が続くであろう．なお，1994年から1995年にかけての急増は国際疾病分類（ICD:International Classification of Disease）の変更によるものと考えられる．

6　虚血性心疾患と心不全（図１の７及び８）

虚血性心疾患と心不全の双方に，1993年から1994年にかけて大きな不連続が観測される．心不全による死亡は1968年以降漸次増加し1993年には男子51,362名，女子57,103名とピークを示した後，1994年には，男子37,536名，女子42,266名と突如激減し，1996年には，男子18,076名，女子21,851名となっている．それに対し，1993年において男子27,416名，女子24,498名であった虚血性心疾患は，1994年には，男子30,906名，女子26,975名と突如一割強も増加し，1996年には，男子38,364名，女子33,520名と激増している．これは，厚生省が死亡診断書を改訂し原死因として「心不全」を原則として認めなくなったことによるものである[5]．いずれにせよ，心疾患による死亡は21世紀初頭まで激増することが予測される．経過の追跡と有効な対策の立案が急務と思われる．

7　肝硬変と肝がん（図１の９及び図３の21）

肝疾患の終末病像として，肝硬変と並んで重視されるのが肝がんである．Ｂ型やＣ型の肝炎ウイルスの感染は，慢性肝炎を経て肝硬変に発展し，さらに進めば肝がんに至るといわれる．肝硬変と肝がんをまとめて見てみる．

1950年の肝硬変による死亡は男子3,299名，女子2,379名と男子が女子の約1.5倍弱であった．死亡数は男女ともおおむね単調に増加するが，その速度は男子の方が急で，1970年代前半には女子の2.5倍にまでなった．しかし，増加も1970年後半までで終わり，男子では1985年には12,054名を示した後1996年には11,198名まで減少している．女子も1992年の5,538名をピークに漸減し1996年には，5,319名となっている．

これに対し，肝がんの死亡数は，独立して記載されるようになった1968年に男女各5,468名，3,544名だったのが，男女とも一貫して増加し1996年には男女各22,904名，9,271名となっている．

肝硬変の死亡者数が今後も順調に減少していくのに対し，肝がんによるそれは2010年には現在の1.5倍，男子で30,000人，女子で15,000人程度になろう．

8　腎疾患と糖尿病（図２の10と11）

腎疾患と糖尿病にも，虚血性心疾患と心不全でみられた死亡数の急激な変動が1978年から1979年にかけて観測できる．

1950年の糖尿病死亡は男子1,005名，女子1,029名である．その後漸次増加を続け1978年には，男女それぞれ4,632名，5,053名に達する．だがこの傾向は翌1979年に至って突然頓挫する．男子3,839名，女子4,205名およそ15%の減少である．それ対し，1950年に男子12,224名，女子14,754名から始まり順調に減少を続け1978年に男女それぞれ3,338名，3,294名となった糖尿病死亡が，1979年には男女各4,671名，4,593名と突如40%程度増加した．

これは，1979年にICDがⅧからⅨに改正されたためである．このようにICDが改正された時点での死亡数の大きな変動は我が国のみならず，アメリカやヨーロッパ諸国でも観測できる[6]．人口動態統計で年次推移の不連続が現れた時には，その年にICDの改正が実施されたかどうか十分注意する必要がある．

1995年にICDがⅨからⅩに改正されたため，1995年以降の人口動態統計を用いる場合，その点に十分考慮を払う必要があろう．厚生省では，「第10回修正死因統計分類（ICD-10）と第9回修正死因統計分類（ICD-9）の比較」をインターネットのホームページで公開している（アドレスは，http://www.mhw.go.jp/toukei/toukeihp/icd.html）．

これを参考にするとよいであろう．

1994年から95年にかけて糖尿病死亡が突然増加している．これもICDの変更によるものであろう．

9 悪性新生物（図2の12）

悪性新生物すなわちがんによる死亡者数は，1950年の男子32,670名，女子31,758名に始まり，増加を続け1996年には男女それぞれ164,824名，106,359名に達し，今後もさらに増加し2010年には男子で20万人を越え，女子でも12万人を越えることが予測される．

この悪性新生物による死亡者数増加を詳細に観測すると，興味深い事実がわかる．年齢区分を15歳刻みに，すなわち0-14，15-29，30-44，45-59，60-74，75歳以上と6つに分け，各々の年齢階級における男子の死亡率を計算して年次比較してみる．すると

(1)44歳以下の年齢階級ではいずれも1970年頃，45-59歳では1960年頃にピークを示し，現在は漸減傾向にある

(2)60-74歳では1970年頃にピークを示し，増減を繰り返しながらも幾分低下傾向を示している

(3)75歳以上では，1950年の649名（対10万人）から増加し1996年では2,307名（同上）となっている

ということがわかる．女子についても同様の傾向が見られる．つまり，悪性新生物の増加とは主として75歳以上の年齢層の問題であることがわかる．今後の対策が期待される．

10 乳がんと子宮がん（図2の13及び14）

戦前の一時期(1937～43年)，年間7,000名台だった子宮がん死亡は1950年には8,783名となり，これをピークとして以後着実に減少していた．1970年代後半には5,000名台となり，1994年には4,445名と極小を示した．しかし，1995年4,865名，1996年4,963名と微増傾向を示している．今後の動向に十分払う必要があろう．

子宮がんの減少とは対照的に，同時期に新たな問題が進行を始めていた．乳がんである．乳がんによる死亡は戦前（1937～43年）で年間900名台，1955年の時点でも1,572名と子宮がんの1/5程度に過ぎなかった．しかしそれがほぼ単調に増加し，1985年には減少してきた子宮がんと交差する．1996年には7,900名に達している．このままの状況で推移すれば2010年には1万人を越える可能性も否定できない．特に，千葉・東京・神奈川・大阪・福岡などの大都市圏において乳がんの死亡率が高いことから，その動向に注意する必要があろう．

11 結腸がんと直腸がん（図2の17及び18）

1955年における結腸がんの死亡数は男子723名，女子905名，直腸がんでは男子1,356名，女子1,255名であった．双方ともおおむね単調に増加するが，結腸がんの方の伸びが著しく女子で1970年代前半，男子で1980年前後に直腸がんを追い越す．差は徐々に開き，1996年には男女それぞれ結腸がんが11,055名と10,327名，直腸がんが7,048名と4,200名になっている．結腸がんと直腸がんは今後も増大する傾向にあるため注意を要する．

12 肺がん（図3の22）

1958年に男女それぞれ2,919名と1,352名であった死亡数は，その後ひたすら増加を続け1996年には33,389名と12,356名に達し，30年間で男子は11倍，女子で9倍になっている．男子では，胃がんによる死亡32,384名を越え悪性新生物の中で首位を占めている．

肺がんによる死亡の中心は戦後一貫して70歳前後であるため，高齢化の進展する将来は一層増加することが予測される．2010年には，男子で5万人台，女子で2万人台の死亡が予測される．

結　論

死因別死亡数を年次別に分析し日本の死亡特性を検討した結果，肺がん・結腸がん・肝がん・乳がんの今後の推移に注意すべきこと，人口動態統計を利用する際には，死亡診断書の改訂やICDの使用変更年次に注意すべきこと，などが明らかとなった．年次推移の他，ＳＡＧＥで得られる年齢調整死亡率や世代マップなどを利用すると死因分析をより精密に行うことができることが明らかとなった．

「地方衛生研究所の機能強化について」（厚生事務次官通達，平成9年3月14日厚生省発健政第26号）の中で，「地方衛生研究所は，公衆衛生に関する国，都道府県・指定都市，地方衛生研究所，保健所，市町村のネットワークの中の地方拠点として業務を実施するとともに，得られた情報から地域に密着した公衆衛生に関する新たな課題を発掘し，またその解決のための研究を企画・実施する」ことが求められている．

地域の問題を発掘するには，当該地域の状況を他地域と比較することが重要である．東京都を他の道府県と比較し分析することも，都二次医療圏ごとに比較分析することもＳＡＧＥならば簡単である．ＳＡＧＥを利用して精密な地域分析を実施し，地域における保健の向上に貢献していきたいと考えている．

文　献

1）池田一夫，竹内正博，鈴木重任：疾病構造データベース，東京衛研年報，**46**，293-299，1995

2）池田一夫，上村尚，竹内正博，鈴木重任：疾病動向システムによる行政支援，東京衛研年報，**47**，362-

367, 1996
3）池田一夫，上村尚，竹内正博：行政施策と肝硬変死亡，東京衛研年報，**48**，354-359，1997
4）倉科周介，池田一夫，平山雄，西岡久壽彌：肝硬変と肝癌の時空間分布，肝臓胆，**29**，197-214，1994
5）厚生省大臣官房統計情報部人口動態統計課：死亡診断書等の改訂（案）について，厚生の指標，**41(4)**，20-25，1994
6）倉科周介：疾病対策の構造(4)病気を数える，公衆衛生，**58**，880-883，1994

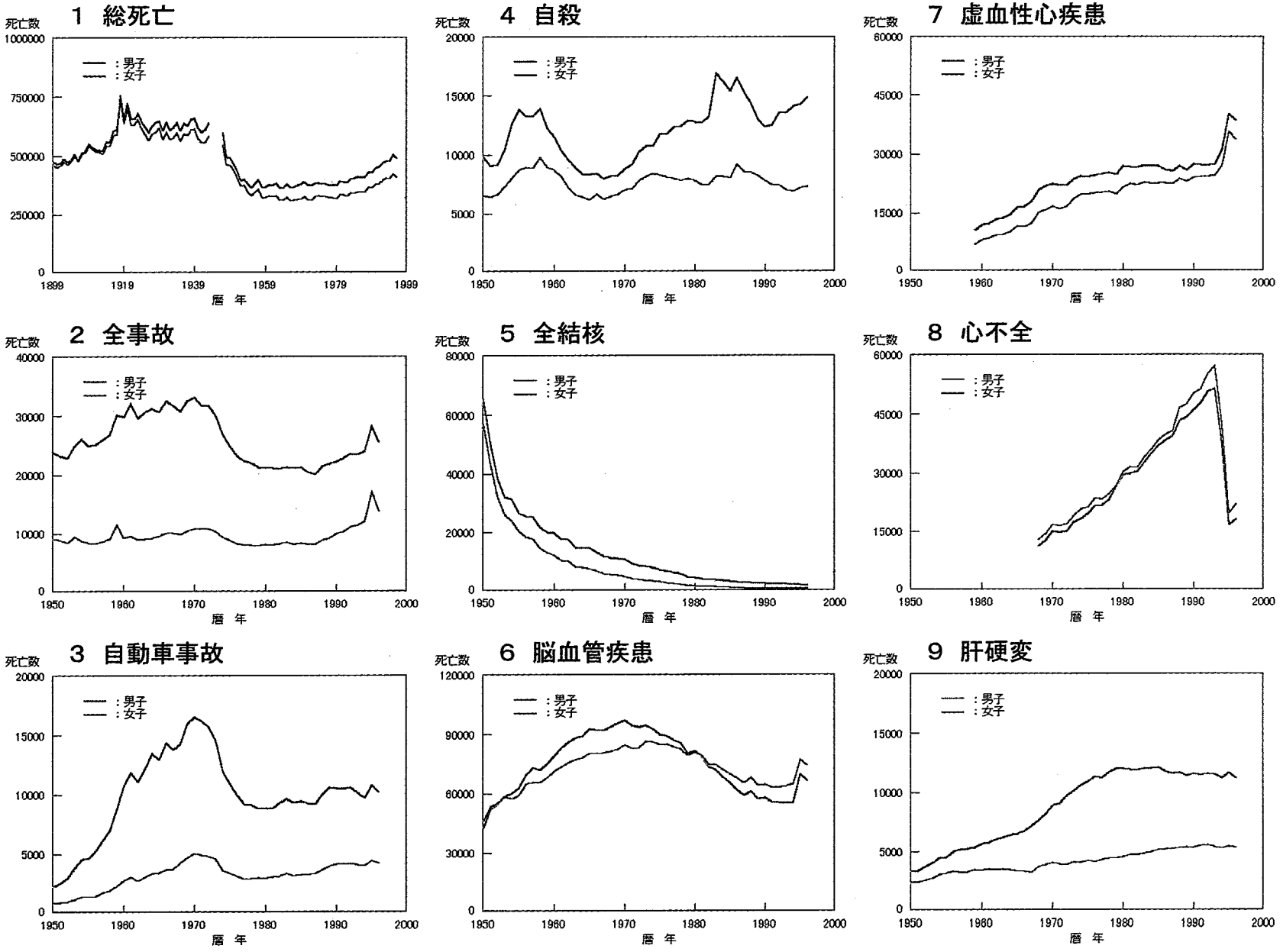


図1．疾病別死亡数の年次推移　その1

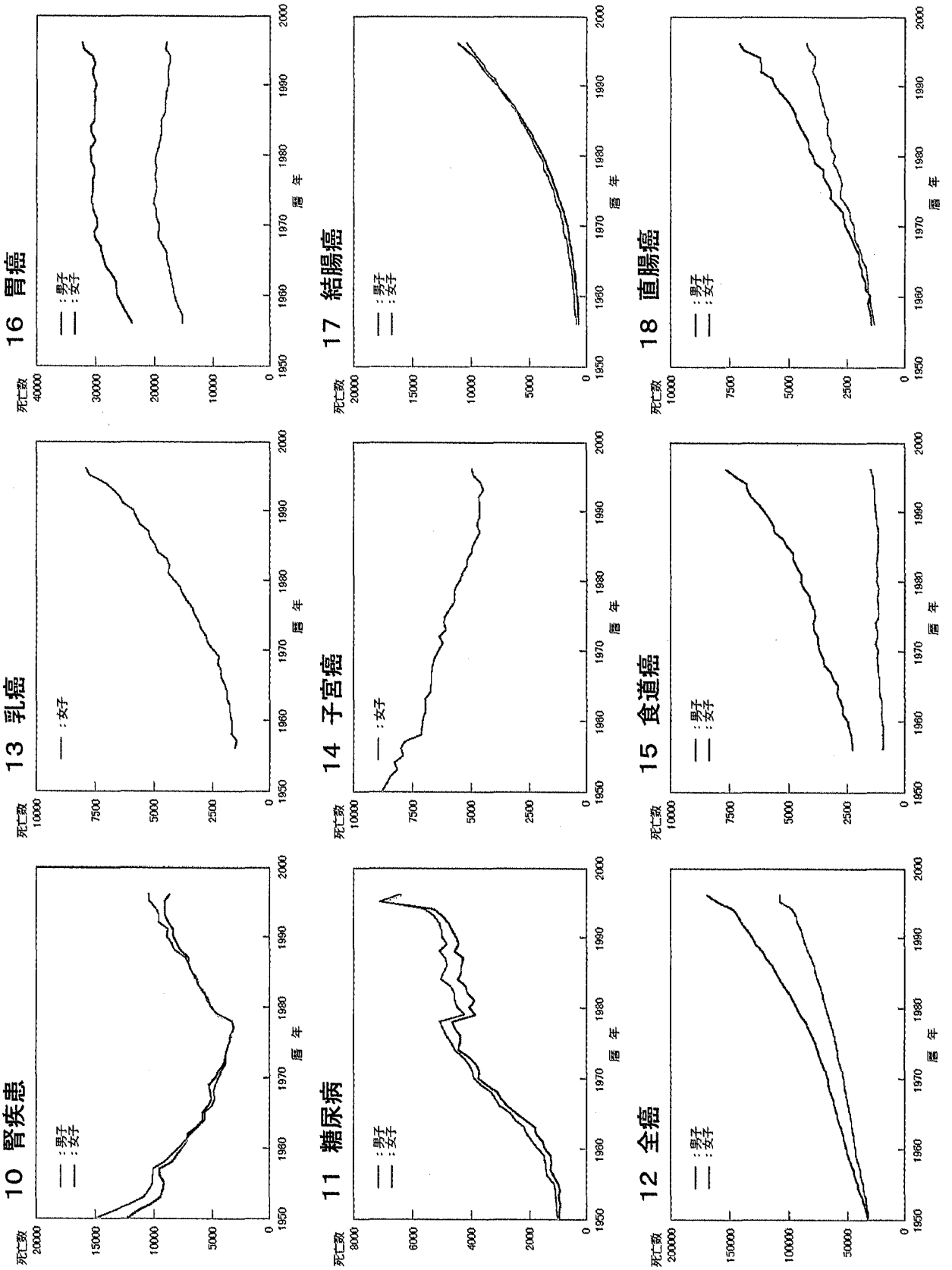


図２．疾病別死亡数の年次推移　その２

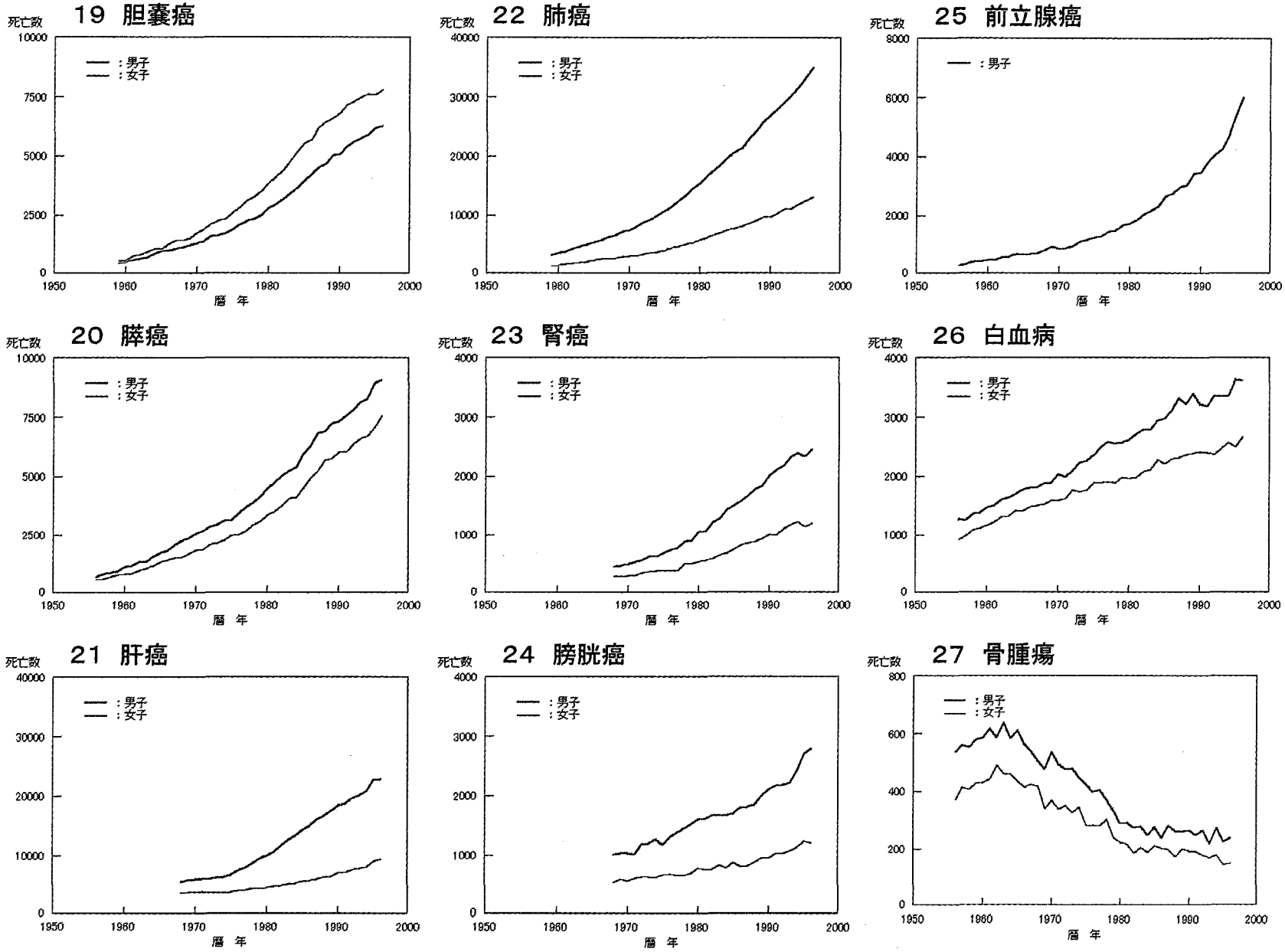


図3．疾病別死亡数の年次推移　その3

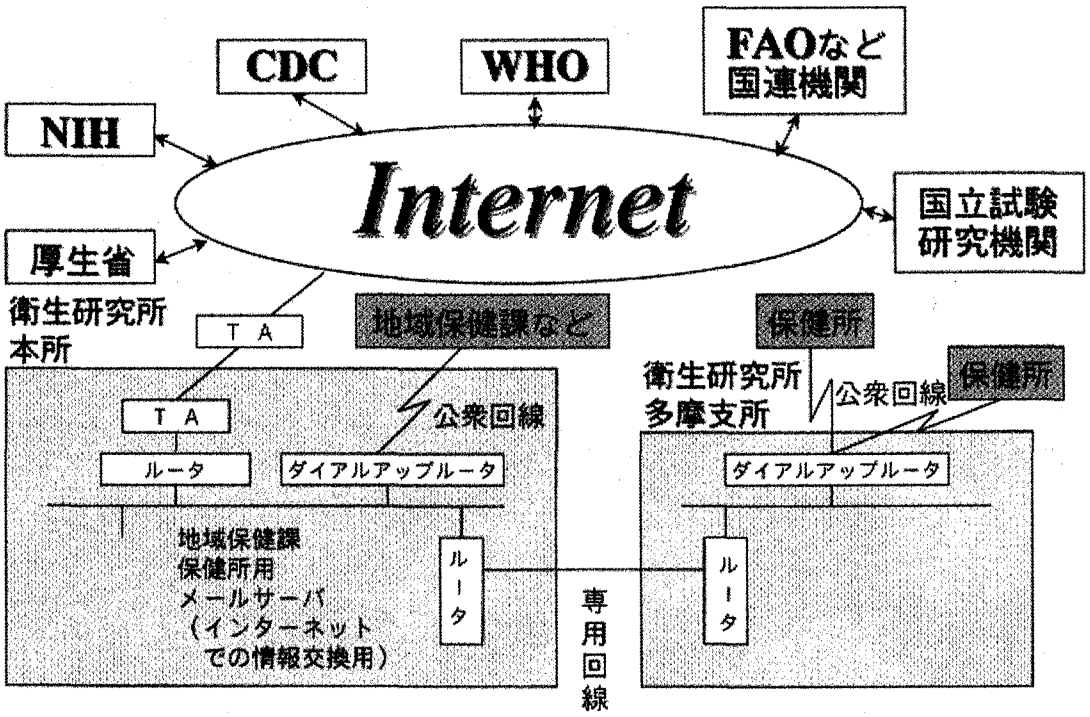


図１．地域保健情報ネットワーク概念図

ない．電話，ＦＡＸ，パソコン通信，汎用大型コンピュータとパソコン端末を専用線で結んだ閉鎖型のネットワークなど，色々なネットワークシステムがある．これらのシステムはインターネットを基盤としたシステムの機能を補うことはできても，代替えはできない．

したがって，健康危機管理の情報基盤はインターネットを基盤として構築されなければならない．

2　地域内行政機関のネットワーク化

インターネットを通し，地域内の行政機関同士が情報交換を行うには，各々の機関がインターネットに接続し，電子メールを交換できる体制を整えることが必要となる．本庁や衛生研究所・保健所をインターネットに接続するには，

①民間のインターネットプロバイダに接続する
②県庁のインターネットに接続する
③第三セクターのインターネットに接続する
④ＩＰ接続している衛生研究所に接続する

の４種の方法が考えられる．どの様な形態で接続するかは，当該地域の実情に応じて決定する必要がある．

東京都立衛生研究所は，厚生省の地域保健推進特別事業費で，1994年11月インターネットに接続し，1995年11月にはWWWサーバを用いた情報提供を開始した．その際，地域保健関連機関との情報交換を目的として，電話回線を利用してインターネットに接続できる機器も同時に導入した．この機器の導入により，地域におけるプロバイダとしての機能を有するに至った．さらに，衛生研究所では調査研究業務の高度化を図るため，本所（新宿区）と多摩支所（立川市）を専用回線で結んでいる．そこで，多摩地域の保健所については多摩支所に接続するだけでインターネットへの接続ができるという利点も有する（図１）．現時点では，衛生研究所をプロバイダとして機能させ行政機関をインターネットに接続することが現実的であると考える．

3　ネットワーク化の経費

衛生研究所を介し，本庁や保健所を接続するには，

①ＩＰ接続
②ダイアルアップ接続

の２つの方法が考えられる．

ＩＰ接続するには，接続する機関にルータを設置すると共にISDN回線を引くことが必要となる．本庁や保健所等がどの程度インターネットを利用するか未知の場合，最初からＩＰ接続することは合理的ではない．当初は，ダイアルアップ接続（図２）でインターネット接続し，利用状況を勘案し，ＩＰ接続するか否かを決定すべきである．

東京都では，本庁と保健所等には既に事務用パソコンが導入されている．そこで，このパソコンにモデムを付置し，ダイアルアップする形態が最良であると考えられる．これに要する経費は，外付けモデムの場合約１万５千円，内蔵カードモデムの場合約２万円である（表１）．

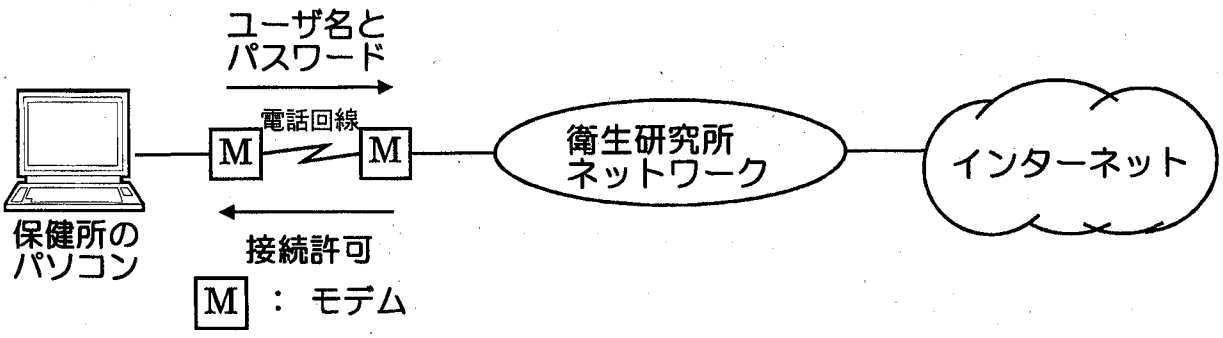
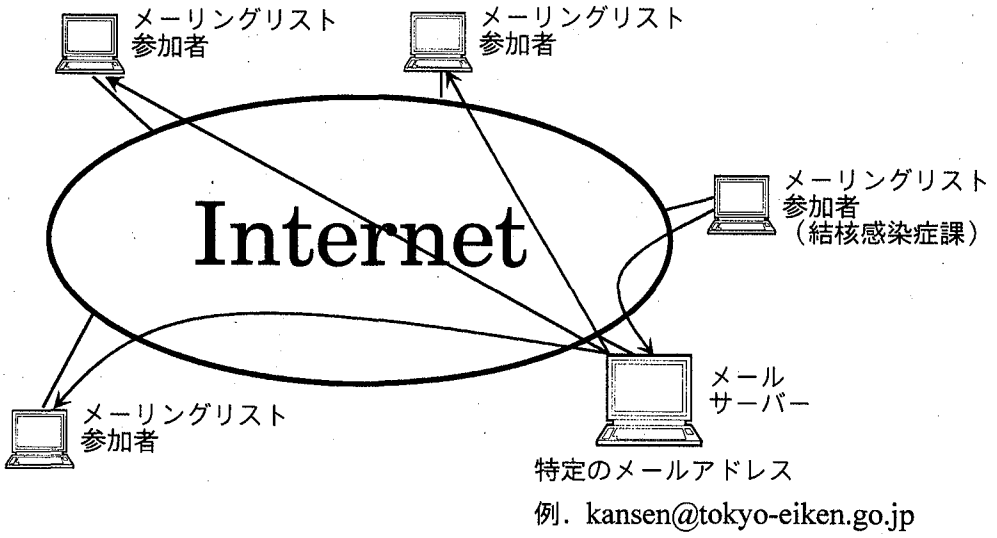


図2．ダイアルアップ接続概念図



特定のメールアドレスに電子メールを送ることにより、
参加者全員に同文のメールを同時に送付できる。
緊急時の同時連絡や日常の情報交換に利用できる。

図3．メーリングリスト概念図

表1．ネットワーク化の経費

ウインドウズ95の動作するパソコン	モデム (28,800bps以上)	電話回線
約20万円	カードモデム約20,000円 外付けモデム約15,000円	衛生研究所本所又は多摩支所までの電話料

パソコンとモデムを接続しダイアルアップする場合には，パソコンとモデムとの相性が重要となってくる．一般に，外付けモデムの方が，内蔵モデムカードよりパソコンとの相性が良いようである．

4 地域内情報交換ーメーリングリストー

衛生局各課・保健所・衛生研究所間の情報交換は，主として会議・電話・ＦＡＸで行われている．これらの手段は有効ではあるが，情報ネットワークを利用することにより，情報交換が一層効果的になることが期待される．そこで，インターネットを利用した情報交換について検討した．

情報交換に非常に簡単に利用できるのがメーリングリストである（図3）．O157による食中毒の発生や感染症情報など周知したい情報を，予め登録してあるメンバー（本庁や保健所など）に電子メールとして自動的に配信するシステムである．参加メンバーが電子メールを特定のメールアドレスに送信すれば，そのメールがメーリングリスト参加者全員に自動的に配信されるというものである．

衛生研究所に設置されているメールサーバを利用すれば，メーリングリストの利用は非常に簡単である．

5 WWWサーバによる情報提供

特定メンバー間での情報交換ならば，メーリングリストで十分である．しかし，住民の健康を守るためには，健康維持に関する情報を住民に広く提供していく必要が

都民のくらしと健康を守ることが私たちの使命です

● English version is here.　　東京都 東京都ホームページ

● 東京都衛生局各課提供情報

● 「食品衛生の窓」 Update (生活環境部 食品保健課) (98/07/17)
最近のトピック、プレス発表情報、食中毒予防、食品衛生豆知識など

● 医療福祉部 結核感染症課ホームページ Update (98/06/22)
海外渡航者のための感染症予防ガイドブック、予防接種と子供の健康など

● ＡＩＤＳニューズレター Update (医療福祉部 エイズ対策室) (98/07/06)

● 花粉一口メモ（平成１０年版） (医療福祉部 環境公害保健課) (98/01/07)

● 東京都立衛生研究所提供情報

● トピックス

● 腸管出血性大腸菌 O157　　● クリプトスポリジウム集団下痢症 (98/04/21)

● レジオネラの情報　　● インフルエンザ情報 (98/03/20)

● 環境ホルモンリンク集（国立衛研）　● ダイオキシン関連情報サイト集（国立衛研）

● 東京都微生物検査情報 Update (98/07/06)

● 東京都立衛生研究所について　　● 衛生研究所刊行物目録

● ＳＡＧＥ(疾病動向予測システム)について (97/11/21)

● ＳＡＧＥ（ＳＡＧＥビューア版） (97/06/27)
本所でご提供するソフトをパソコンにインストールすることにより、
日本各地域のみならず各国の疾病の状況を自由にご覧いただけます。

● 食品添加物の変異原性試験結果　エームス試験による検討（英語版のみ）

● 地方衛生研究所の情報 Update (98/06/16)

● 関連サーバ情報 (98/04/03)

● アクロバット・リーダー日本語版ダウンロード(Windows95版 : 3.0aJ) Get Acrobat Reader
このサーバーには、アドビ社のアクロバットで作成した文書があります。
この文書を読むためには、アクロバット・リーダーが必要です。

更新日：１９９８年７月１７日

169-0073　東京都新宿区百人町３－２４－１
電　話　０３－３３６３－３２３１
ＦＡＸ　０３－３３６８－４０６０
info@tokyo-eiken.go.jp

このサーバに関してご意見などがございましたら　ここ　をクリックしてください。

図４．東京都立衛生研究所ホームページ

ある．住民への情報提供も，健康危機管理において重要な側面である．

広く住民に情報提供するために，東京都では報道機関に対するプレス発表や，テレビによる情報提供，パンフレットやビデオなどの作成など多方面での広報活動を実施している．これを補完するものとしてインターネットの活用が考えられる．

インターネットのWWWサーバを利用すれば，迅速に正確な情報を住民に伝えることができる．東京都立衛生研究所において，O157が猛威を振るった平成８年７月，

O157情報の提供を開始すると，公共機関・会社・都民から，7月だけで1万1千件ほどのアクセスがあった．また，生活環境部食品保健課と衛生研究所が協力して平成10年4月，食品に関する情報提供を目的として「食品衛生の窓」を開始すると，これも4月だけで1万1千件，5月には2万件とアクセスが大幅に増加している．

都立衛生研究所の協力の下，結核感染症課，エイズ対策室，環境公害保健課もWWWサーバを利用した都民への情報提供を実施している（図4）．迅速で効果的な都民への情報提供手段としてWWWサーバを大いに利用していく時期であると考える．

結　論

新しい地域保健体制で第一に求められているのは保健所の地域医療計画策定などにおける企画調整機能であり，その保健所を支援し，健康状態や保健政策の評価に関する調査研究を実施することが衛生研究所の新しい使命である．そのためには，要求される機能や目的を明確にした上で，地域保健情報ネットワークとデータベースを構築していくことがぜひとも必要である．

健康危機管理の面からも，インターネットとWWW技術を基盤とするコンピュータネットワークを整備することが必要である．国立研究機関や大学，地方衛生研究所や海外の研究機関，国際機関とのネットワークも構築していく必要があろう．

地域保健情報ネットワーク構築の第一歩として，衛生研究所にWWWサーバとメールサーバを設置し，インターネットに接続することが必要である．保健所等に関しては，まず最初に衛生研究所にダイアルアップできる環境を整えることが必要である．その後の充実については，技術の進歩をふまえ，一歩一歩着実に進めていく必要があろう．

(本研究は，平成9年度厚生科学特別研究事業で実施したものである．)

参考文献

1）神沼二眞：行政の健康危機管理に対応した研究情報基盤の構築について，「地域における保健医療福祉の連携を支援するための保健情報ネットワークの構築とその効果的な運用に関する研究」研究報告書（主任研究者：鈴木重任），29-38，1998

2）田中敦子，池田一夫，野口映子　他：保健所はあなたの情報バンク，平成9年度プロジェクト研修「地域保健サービス」（長期）研修報告書，東京都衛生局総務部職員課，1998

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **49**, 334-338, 1998

WWWサーバとデータベースの連携

神谷信行*, 池田一夫*, 上村尚**,
佐々木美枝子***

Developing Database for the World Wide Web

NOBUYUKI KAMIYA*, KAZUO IKEDA*,
HISASHI KAMIMURA** 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，データベース Data Base

緒　言

近年，情報システムの急速な整備が進み，化学物質，食品，飲料水，環境，感染症，食中毒など保健衛生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，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．

インターネットはここ数年地球規模で急速に普及した情報ネットワークであり，当初は大学や国公立の試験研究機関を中心に拡大した．最近では行政機関や民間企業から個人までその利用者は急激に増加し，情報を提供するWWW（World Wide Web）サーバの数も増える一方である．

当所においても平成7年，WWWサーバを設置して情報提供を開始し[1]，現在では月間40,000件におよぶアクセス数が記録されている．

蓄積された情報のなかにはデータベース化されたものもあり，このような情報を提供するためにWWWサーバとデータベースシステムの連携が必要となる．ここでデータベースに集積されている情報の検索にWWWブラウザを利用することは，インターネットに接続できるユーザが使用しているクライアント（ブラウザを使用している端末ユーザ）の機種やOS（Operating System）などのコンピュータシステムに依存することなく情報を入手することが可能となり，ユーザにとってより利用のしやすいシステムとすることができる．そこで苦情食品の事例をデータベース化し，その情報をWWWブラウザ上で検索条件を入力することにより情報を表示するシステムを構築した．

システムの概要

1．システムの概要

システムの概要を図1に示した。インターネットの急速な普及はWWWサービスの提供があげられる。クライアントはブラウザソフトを使用してHTTP（Hypertext Transfer Protcol）と呼ばれるプロトコルで，WWWサーバに接続することにより容易に各種情報を入手することができる。

HTML（Hypertext Markup Language）ドキュメントと呼ばれるテキスト，画像，動画，音声を含むデータを同時に参照できることが大きな特徴である。これらの情報はコンテンツと呼ばれ静的コンテンツと動的コンテンツに大別される。静的コンテンツは，作成したときの内容がそのまま変わらない情報であり，当所のWWWサーバで提供している情報もこの静的コンテンツである。動的コンテンツはユーザの要求によって内容を随時作成，変更するタイプのコンテンツで，ユーザの求める情報をより的確に提供することができる。WWWとデータベー

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科　169-0073　東京都新宿区百人町3－24－1
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
*** 東京都立衛生研究所毒性部

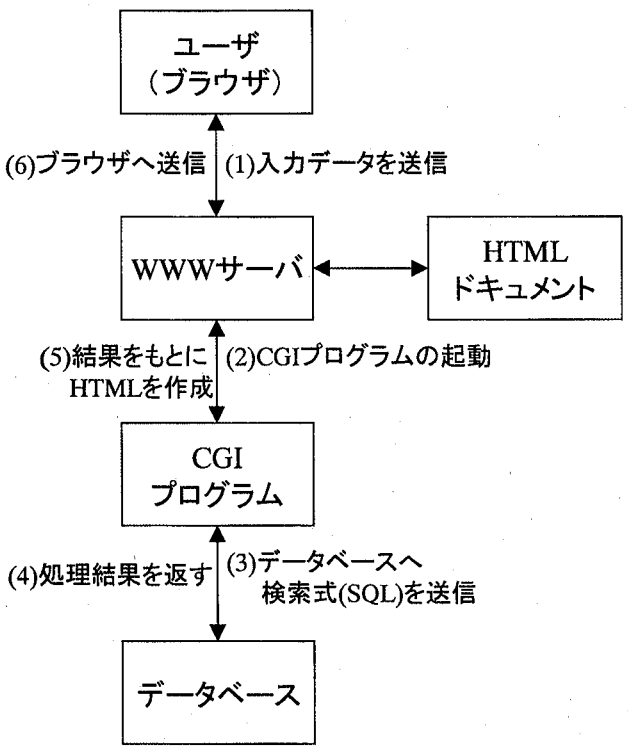


図1．WWWサーバとデータベースの連携モデル

スの連携はこの動的コンテンツの一例である。ユーザはクライアントのブラウザで必要なキーワードを入力するか，WWWサーバからの問い合わせに回答を入力する。WWWサーバはその情報をもとにデータベースからデータを取得し，CGI（Common Gateway Interface）プログラムを介して動的にHTMLを作成しユーザのブラウザに返す。このようにしてユーザは必要な情報を簡単に得ることができる。

2．システムの構成

機器構成は情報提供を行うWWWサーバにPrioris MX(DEC)とRevolution Q-SMP（ALR）を，データベースサーバにExpress5800（日本電気）を使用した．

OSはWindowsNT Server4.0，WWWサーバソフトはIIS（Internet Information Server，Microsft）4.0と3.0，データベースはSybaseをそれぞれ使用した．CGIプログラムの作成にはPerl for Win32（Free Software)を使用した。

3．データベースの構成

食品の分類，食品名，キーワードの3つの項目から事例の内容が検索できるようにデータベースを構築した。データベースのテーブル構造を図2に示した。food_itemには苦情品名，food_ichiranには分類名，food_qaには苦情事例の内容，food_keywordには検索時に使用するキーワード，food_keyrelには苦情品名，キーワード，事例内容を関連づけをそれぞれ格納した。同名のカラムでリレーションを行っている。

4．システムの機能

ユーザは，ブラウザで参照したい文書をURL（Uniform Resource Locator）で指定し，その送信をサーバに要求する。このときブラウザからの検索条件などの入力データがあれば同時にサーバに送られる。WWWサーバでは，要求が静的コンテンツの場合そのファイルを読み込みブラウザに送信して処理は終了する。ブラウ

テーブル名：food_item

カラム名	データ型	説明
classify_id	int	分類ID
ite	int	苦情品ID
item_name	char(80)	苦情品名
item_pron	char(80)	苦情品名(フリガナ)

テーブル名：food_ichiran

カラム名	データ型	説明
classify_id	int	分類ID
classify_name	char(30)	分類名
classify_sample	char(40)	分類サンプル

テーブル名：food_qa

カラム名	データ型	説明
qa	int	Q&A ID
ite	int	苦情品ID
question	text	質問文
answer	text	回答
ref	char(255)	参考文献

テーブル名：food_keyword

カラム名	データ型	説明
key_id	int	キーワードID
key_name	char(40)	キーワード名
key_pron	char(40)	キーワード名(フリガナ)

テーブル名：food_keyrel

カラム名	データ型	説明
ite	int	苦情品ID
key_id	int	キーワードID
qa	int	Q&A ID

図2．データベースのテーブル構造

ザから指定されたURLがCGIプログラムを参照している場合，すなわちデータベースの情報を検索するような場合は，指定されたCGIプログラムが起動される。ブラウザからの入力内容はCGIプログラムへ引き渡され，CGIプログラムはデータベースを起動する。データベースは検索などの処理を行い，結果をCGIプログラムへ返送する。CGIプログラムはその結果をHTMLドキュメントに構築してWWWサーバに送り返し，WWWサーバが最終的に形を整えブラウザに送信する。このようにしてユーザは利用しているコンピュータ環境の如何に関わらず必要とする情報をブラウザで表示することが可能となる。

ユーザが食品の苦情内容を検索する場合，既に得ている情報から，食品分類，食品名，キーワードのどの項目で検索するかを選択する。項目を指定すると右側にその結果が表示される（図3）。

システムの効果と問題点

微生物，医薬品，食品，環境化学物質など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．これらの情報量は増加する一方であり，静的なコンテンツとして提供することは，ユーザが情報を取得する際の労力は相当のものになると推察できる。CGIプログラムを使用して動的コンテンツを作成することにより，データベースの検索システムを提供することは，ユーザがより容易にデータを入手することができる．同時に写真などの画像情報もデータベース化して取り扱うことも可能となる．また，ブラウザさえあれば，ユーザの使用しているクライアント（端末）のコンピュータ環境に関わらず1つのプログラムでデータベースの検索が可能になることから，衛生研究所の情報提供の機能をより高めることになる．

しかし，CGIプログラムはサーバで動作することからユーザからのアクセス数が増加するとサーバへの負荷がかかりレスポンスが悪くなる．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，この問題を解決することは技術的にそれほど難しいことではないであろうが，改善には今しばらく時間がかかると思われる．

また，これらのデータベースは個別に構築されることが多く，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．

結　　語

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．

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．

（本研究は，平成9年度厚生省科学特別研究事業の一環として実施したものである）

文　　献

1）神谷信行，池田一夫，上村尚，佐々木美枝子:衛生研究所からの情報提供，東京衛研年報，**47**，369-374，1996.

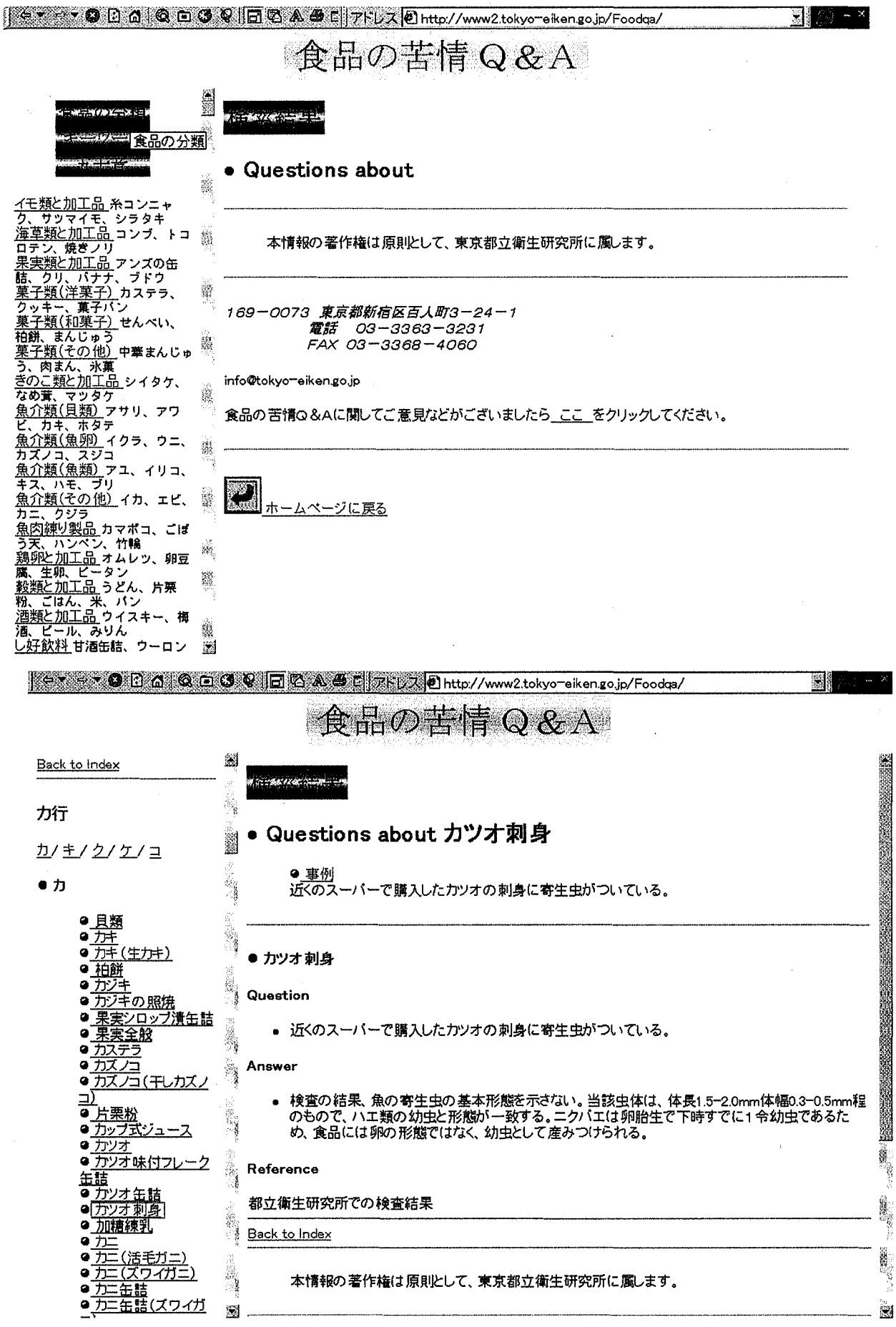


図3．食品の苦情事例のデータベース検索例

著書

伊藤　武，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157感染症**，疫学ハンドブック－重要疾患の疫学と予防，1997.

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌感染症の世界の現状**，医学微生物学の最先端，1997.

甲斐　明美：**O157家族内感染の予防**，質疑応答による消化管疾患，1997.

諸角　聖：**カビおよび酵母，抗菌のすべて**，繊維社，1997.

小久保彌太郎：**HACCPの基礎と実際：HACCP方式の適用及び作成の手順**，中央法規出版，1997.

小久保彌太郎：**HACCP－衛生管理計画の作成とその実践**，中央法規出版，1997.

小久保彌太郎：**HACCP管理実用マニュアル：HACCPプランによる衛生管理の実際**，サイエンスフォーラム，1998.

小久保彌太郎，他：**食中毒予防必携－リステリア・モノサイトゲネス**，日本食品衛生協会，1998.

村田以和夫，藤田紘一郎，(編・著)影井　昇，篠永哲(共著)：**食品寄生虫ハンドブック**，株式会社サイエンスフォーラム，1997.

安田　一郎：**離弁花植物亜門**，鉱物生薬，生薬学，南江堂，1998.

三好　彰，吉川　翠，他：**鼻アレルギー**，135pp，1998，日本評論社，東京，1998,

西川勢津子，吉川　翠：**害虫追い出し百科**，223pp，1997，近代文芸社，東京，1997.

竹内　正博：**有機金属化合物，中村洋編，最新の分離・精製・検出法**，913-920，1997，エヌ・ティ・エス，1997.

竹内　正博：**検出器，日本分析化学会GC研究懇談会編，キャピラリーガスクロマトグラフィー**，38-49，1997，朝倉書店，1997.

竹内　正博：**食品分析，日本分析化学会GC研究懇談会編，キャピラリーガスクロマトグラフィー**，113-123，1997，朝倉書店.

中村　洋，竹内　正博：**検出器，農薬分析**，1997.

牧野　国義：**環境と保健の情報学**，南山堂，1997.

池田　一夫，飛田　豊隆，若山芳三郎：**情報ネットワークとインターネット**，日本理工出版会，1997.

他誌発表論文

伊藤　武：**除菌不成功例および菌再出現例に対しておこなうべき検査法－耐性菌モニタリングと再治療の考え方**，Helicobacter Research，**1**，37-43，1997.

伊藤　武：**腸管出血性大腸菌O157の対策：感染経路とその対策**，Infection Control，**7**，42-47，1998.

伊藤　武：**微生物の病原因子**，栄養と健康のライフサンエンス，**2**，478-485，1997.

伊藤　武：**食品と感染**，健康と環境，**13**，78-89，1998.

伊藤　武：**腸管性出血性大腸菌の食品および環境中における抵抗性**，獣医畜産新報，**50**，246-249，1997.

伊藤　武：**人畜共通感染症としての腸管出血性感染症**，小児内科，**30**，740-744，1998.

伊藤　武：**我が国における細菌食中毒の発生動向**，食品衛生学雑誌，**38**，158-166，1997.

伊藤　武：**食品の微生物危害と実態**，食品機械装置，**34**，48-60，1997.

伊藤　武：**学校給食における安全性確保**，食料・栄養・健康，**18**，14-22，1997.

伊藤　武：**食器の洗浄・消毒**，日本医事新報，**37**，96，95，1997.

伊藤　武：**鶏卵とS.Enteritidis食中毒**，日本食品保全研究会報，**3**，30-37，1997.

伊藤　武：**新しい細菌食中毒とその制御**，乳業技術，1997.

伊藤　武：**らせん状菌 Campylobacter jejuni/coli.**，防菌防黴，**25**，711-718，1997.

伊藤　武：**腸管出血性大腸菌O157感染症**，予防医学，**39**，5-11，1997.

伊藤　武，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌感染症の疫学**，化学療法の領域，**13**，6，55-63，1997.

伊藤　武，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157**，食肉の科学，**38**，1，37-45，1997.

伊藤　武，甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157感染症と食品**，食品衛生学雑誌，**38**，5，275-285，1997.

伊藤　武，甲斐　明美，尾畑　浩魅，貫名　正文，黒木　学，仲西　寿男：**食品からの腸管出血性大腸菌O157検出法**，日本食品微生物学会雑誌，**13(4)**，205-219，1997.

伊藤　武，新垣　正夫，只野　敬子，甲斐　明美，高橋　信一，二宮　英彦，星谷　聡，増淵　尚子：**Helicobacter pylori除菌薬の副作用と耐性菌の出現**，Helicobacter Research 別冊，**1**，1，56-62，1997.

伊藤　武，只野　敬子：**カンピロバクター**，Infection Control，**6**，170-175，1997.

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌の臨床材料および食品からの分離・同定法**，日本細菌学雑誌，**52**，4，747-799，1997.

甲斐　明美，畠山　薫，尾畑　浩魅，五十嵐英夫，伊藤　武：**臨床材料を対象とした腸管出血性大腸菌（Vero毒素産生性大腸菌）の検査法**，日本臨床微生物学雑誌，**8**，1，70-78，1997.

甲斐　明美，尾畑　浩魅，畠山　薫，五十嵐英夫，

伊藤　武，工藤　泰雄：**ラテックス凝集反応法によるVero毒素産生性大腸菌の同定ー大腸菌ベロトキシン検出用試薬の評価**，感染症学雑誌，**71**，3，248-254，1997.

高橋　信一，増淵　尚子，渡辺　一宏，徳永　健吾，伊藤　武：**Helicobacter pylori感染と酸分泌ーin vitroでの成績ー**，Helicobacter Research，**1**，226-231，1997.

諸角　聖：**食品製造におけるカビ汚染防止対策**，防菌防黴，**5(6)**，355-361，1997.

松下　秀，野口やよい，柳川　義勢，五十嵐英夫，他：**Vibrio cholerae non-01による散発下痢症例と分離株の諸性状**，感染症学雑誌，**71**，1204-1209，1997.

松下　秀，野口やよい，柳川　義勢，小林　一寛，中矢　秀雄，五十嵐英夫，工藤　泰雄：**新血清型のShigella dysenteriaeと考えられる輸入下痢症例由来株について**，感染症学雑誌，**71**，412-416，1997.

楠　淳，甲斐　明美，柳川　義勢，門間　千枝，新垣　正夫，尾畑　浩魅：**東京都におけるサルモネラ血清型Enteritidis ファージ型4による集団下痢症の発生状況と疫学マーカーによる解析**，感染症学雑誌，**71**，730-737，1997.

楠　淳：**微生物検査における現状**，食品衛生学雑誌，**38**，J259-261，1997.

鈴木　秀和，関塚　永一，森　三樹二，鈴木　雅之，甲斐　明美，秋葉　保忠，他：**ヘリコバクターピロリ感染による胃粘膜微小循環障害**，Ulcer Research，**24**，1，20-23，1997.

鈴木　淳，村田以和夫，村田　理恵，諸角　聖，鈴木　武雄：**低真空走査型電子顕微鏡（低真空SEM）によるクリプトスポリジウム・オーシストの簡易同定法について**，日本食品微生物学会誌，**14**，187-191，1998.

山崎　清，佐々木由紀子，長島　真美，森　功次，平田　一郎，関根　大正：**1992〜1993年にかけて流行したインフルエンザー東京都内のインフルエンザ検索成績ー**，日本胸部臨床，1997.

森　功次，貞升　健志，田部井由紀子，門間　公夫，平田　一郎，関根　大正：**HTLV-Iの母子感染初期にみられた血中IL-2およびsIL-2Rの増加について**，感染症学会誌，1997.

瀬戸　隆子，塩田　寛子，佐藤かな子，浜野　朋子，大西　和夫：**いわゆる健康食品からのセンナ及びダイオウの検出について**，日本薬学会第118会年会，1998.

福田　達男，中嶋　順一，安田　一郎，荒金真佐子，吉沢　政夫，鈴木　幸子，清水　虎雄：**オオバナオケラAtractylodes ovataの栽培に関する研究（第4報）外部形態の個体変異と生育量および成分含量の個体差について**，Natural Medicines，**51(5)**，420-426(1997)，1997.

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：**オオバナオケラAtractylodes ovataの栽培に関する研究（第5報）生育および化学成分の含量に及ぼす摘蕾および摘花の影響について**，Natural Medicine，**51(5)**，427-430(1997)，1997.

竹重　都子，飯田　孝：**と畜場におけるStaphylococcus aureusの検出および分離菌株の性状**，日本獣医師会雑誌，**50**，45-47，1997.

飯田　孝：**血清型別，Listeria monocytogenes**，臨床と微生物，**123**，699-701，1996.

Toshihiro.Nagayama：**Transference of Organophosphorus Pesticides to Wine from Fruits during the Process of Making Fruit Wine**，食品衛生学雑誌，**38**，270-274，1997.

安田　和男，横山　敬子，牛山　博文，小川　仁志，川合　由華：**アロエ含有食品中のバルバロイン含有量及びその安定性**，食品衛生学雑誌，**38**，(5)，335-340，1997.

永山　敏廣：**輸入野菜中の残留農薬**，冷凍，**72**，1133-1138，1997.

永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子，田村　康宏，塩田　寛子，友松　俊夫：**市販の無農薬及び減農薬栽培表示農産物の農薬残留実態（1988～1994年度）**，食品衛生学雑誌，**38**，464-469，1997.

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：**HPLCによる農産物中のメタベンズチアズロンの分析法**，食品衛生学雑誌，**38**，351-357，1997.

広門　雅子：**天然添加物の品質調査**，FFIジャーナル，No.172，29-36，1997.

広門　雅子：**わが国のカラメル色素の品質及びその試験法から天然添加物のGLPを考える**，月刊フードケミカル，Vol.13，No.4，33-38，1997.

広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，貞升　友紀，伊藤　弘一，鈴木　助治：**市販食品製造用αアミラーゼ製品の統一活性測定法の検討**，食品衛生学雑誌，Vol.38，No.5，October，1997.

植松　洋子：**HPLCによるオレンジⅡ及びオレンジRNの分析法**，食品衛生学雑誌，J-219，1997.

植松　洋子，広門　雅子，平田　恵子，貞升　友紀，安田　和男，鈴木　助治：**食品添加物製剤中のグリセリン脂肪酸エステル及びプロピレングリコール脂肪酸エステルの非誘導体化GC分析**，食品衛生学雑誌，**38**，248-258，1997.

植松　洋子，貞升　友紀，平田　恵子，広門　雅子，安田　和男，鈴木　助治：**GC及びGC/CI-MSによる食品香料製剤中の中鎖トリグリセリドの分析**，食品衛生学雑誌，**38**，140-144，1997.

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GC及びGC/MSによる分析**，食品衛生学雑誌，**38**，452-459，1997.

植松　洋子，貞升　友紀，平田　恵子，広門　雅子，安田　和男，鈴木　助治：**ヘッドスペースGCによる食品香料製剤中の残留溶剤の分析**，食品衛生学雑誌，**38**，97-104，1997.

植松　洋子，平田　恵子，広門　雅子，伊藤　弘一，鈴木　助治：**クチナシ色素製剤中のゲニポシドの含有量調査（1988，1996年）**，食品衛生学雑誌，**39**，46-50，1998.

萩原　輝彦，安野　哲子，船山　惠市，鈴木　助治：**Determination of Lycopene, α-Carotene and β-Carotene in vegetable juice by LC/APCI-MS**，日本食品衛生学会，38，211-218，1997.

平田　恵子，広門　雅子，植松　洋子，貞升　友紀，安田　和男，風間　成孔，鈴木　助治：**クロロフィル色素製剤中のクロロフィル分解物の測定**，日本食品衛生学雑誌，**38**，155-160，1997.

大島 晴美, 佐野 満昭, 牛尾 房雄, 河村 典久, 山田 貞二, 斎藤 勲, 早川 順：**吸光光度法による食品中のヘム鉄の分析**, 衛生化学, 1997.

関 比呂伸：**都会のハト：その2－多環芳香族炭化水素及び炭粉汚染，アスベスト汚染，ハトからの感染症，駆除方法について**, ペストコントロール, **100**, 63-68, 1997.

関 比呂伸：**都会のハト：その1－ハトと鉛汚染**, ペストコントロール, **99**, 34-42, 1997.

吉川 翠：**新省エネ住宅内でのダニ相変化（第1報)**, 日本公衆衛生学雑誌, **44**, 1420, 1997.

牧上久仁子, 荒井香代子, 吉川 翠, **区立特別養護老人ホームにおけるカイセン対策－γ-BHCの使用と実施まで**, 東京都衛生局学会誌, **99**, 336-337, 1997.

牧野 国義：**慢性呼吸器症状の個人危険指標について**, 日本公衛誌, **45**, 175-180, 1997.

高橋 保雄, 森田 昌敏：**水道水中のハロゲン化消毒副生成物の多成分系統分析法**, 環境化学, **7**, 495-506, 1997.

高橋 保雄, 西尾 高好, 森田 昌敏：**水道水中の消毒副生成物と排水の消毒副生成物生成能**, 環境化学, **7**, 489-494, 1997.

矢野 一好：**水中ウイルスからみた水環境と浄水処理**, バイオサイエンスとインダストリー, **55(7)**, 461-466, 1997.

矢野 一好：**水環境のウイルス汚染と食品衛生**, 月刊フードケミカル, **9**, 29-36, 1997

佐藤かな子, 長井二三子, 瀬戸 隆子, 牛山 慶子, 大久保智子, 濱野 朋子, 塩田 寛子, 大西 和夫, 山内 浩, 加納 いつ：**胃疾患に繁用される漢方方剤および構成生薬エキスのH, K-ATPase活性におよぼす影響**, 和漢医薬学雑誌, **14**, 370-371, 1997.

Hiroshi Fujikawa and Takeshi Itoh：**Thermal Inactivation Kinetics of Escherichia coli beta-Galactosidase**, Biocontrol Science, **2(1)**, 1-6, 1997.

Hiroshi Fujikawa and Takeshi Itoh：**Differences in the thermal inactivation kinetics of Escherichia coli beta-galactosidase in vitro and in vivo**, Biocontrol Science, **2(2)**, 73-78, 1997.

Mikiji Mori, Hidekazu Suzuki, Masayuki Suzuki, Akemi Kai, 他：**Catalase and Superoxide Dismutase Secreted from Helicobacter pylori**, HELICOBACTER, **2**, 2, 100-105, 1997.

M.Takasaki, T.Konoshima, I.Yasuda,T.Hamano, H.Tokuda：**Inhibitory Effects of Shouseiryu-to on Two-Stage Carcinogenesis Ⅱ.Anti-tumor-promoting Activities of Lignans from Asiasarum heterotropoides var. mandshuricum**, Biol. Pharm. Bull 20, 776-780, 1997.

Kouichi Kurose, Masahiro Tohkin, FusaoUshio and Morio Fukuhara：**Cloning and Characterization of Syrian Hamster Testosterone 7α-Hydroxylase, CYP2A9**, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998.

Marie-Helene Bani, Morio Fukuhara and Fusao Ushio：**Modulation of Snake Hepatic Cytochrome P450 by 3-Methylcholanthrene and Phenobarbital Compative,** Bichemistry and Physiology, 1998.

Hiroshi Fujikawa, Takeshi Itoh : **Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms ans enzymes**, International Journal of Food Microbiology, **31**, 263-271, 1996.

M.Koga, N.Yuki, M.Takahashi, K.Saito, K.Hirata : **Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent Campylobacter jejuni infection in Guillain-Barre and Fisher's syndroms**, J Neuroimmunol, 1998.

N.Yuki, M.Takahashi, Y.Tagawa, K.Kashiwase, K.Tadokoro, K.Saito : **Association of Campylobacter jejuni serotype with antiganglioside antibody in Guillan-Barre syndrom and Fisher's syndrom**, Ann Neurol, 1997.

M.Takahashi, K.Kamata, M.Nagashima, S.Shigeoka, M.Nishijima : **Determination of atropine in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with fluorescence detection**, Journal of Chromatography A 775, 137-141, 1997.

Misako Takahashi, Kunihiro Kamata, Kiyoshi Terashima, M.Nishijima : **Separation of carnitine enantiomers as the 9-anthroylnitrile derivatives and high-performance liquid chromatographic analysis on an ovomucoid-conjugated column**, J. of Pharmaceutical and Biomedical Ana. 14, 1579-1584, 1996.

K. Mizuishi, M. Takeuchi, T. Hobo : **Effect of hydrogen bromide doping on capillary gas chromatographic analysis of tributyltin and triphenyltin halides**, Analyst 123, 329-335, 1998.

K. Mizuishi, M. Takeuchi, T. Hobo : **Direct GC Determination of Methylmercury Chloride on HBr-Methanol-Treated Capillary Columns**, Chromatographia 44, 386-392, 1997.

K. Mizuishi, M. Takeuchi, T. Hobo : **Trace analysis of tributyltin and triphenyltin compounds in sea water by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry**, Jounal of Chromatography A 800, 267-273, 1998.

Ichiro Takano, Ichiro Yasuda, Motohiro Nishijima, Yukiko Hitotsuyanagi, Koichi Takeya, Hideji Itokawa : **Modification of the Skeleton of Homoharringtonine through Unusual Rearrangements**, The Journal of Organic Chemistry, **62**, 8251－8254, 1997.

Keiji Wakabayashi, Yukari Totsuka, Kazuo Fukutome, Hirofumi Ushiyama : **Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic β-carbolines**, Mutation Research 376, 253-259, 1997.

Toshihiro.Nagayama : **Decrease in Organic Solvent Extractable Ethion by Grapefruit Pectin during Processing**, J.Agric.Food Chem, **45**, 4856-4860, 1997.

市瀬　孝道, 山主　智子, 瀬戸　　博, 嵯峨井　勝 : **Oxygen radicals in lung carcinogenesis accompanying phagocytosis of diesel exhaust particles**, Intenational J. Oncology, 11, 571-575, 1997.

Tomoko.Okubo, Fumiko.Nagai : **DNA cleavage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation caused by tamoxifen derivatives in vitro**, Cancer Letters, **122**, 9-15, 1998.

Yoshio.Nakagawa, Kuniaki.Tayama : **Acute hepatotoxic potential ofimazalil fungicide in rats**, Bull.Environ.Contam.Toxicol, **58**, 402-407, 1997.

Yoshio.Nakagawa, Peter.Moldeus, Gregory.Moore : **Propyl gallate-induced DNA fragmentation in isolated rat hepatocytes**, Arch.Toxicol, **72**, 33-37, 1997.

Osamu.Takahashi, Shinsi.Oishi, Tomoko.Fujitani, Toyohito.Tanaka, Masako.Yoneyama : **Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: Induction of hepatocellular carcinoma**, Toxicology 124, 95-103, 1997.

Takahito.Suzuki, Takako.Kanoh, Mako.Ishimori, Shingo.Ikeda, Hisashi.Ohkuni : **Adjuvant activity of diesel exhaust particulates (DEP) in production of anti-IgE and anti-IgG 1 antibodies to mite allergen in mice**, J.Clin.Lab.Immunol, **48**, 187-199, 1996.

Toyohito.Tanaka, Tomoko.Fujitani, Osamu. Takahashi, Shinshi.Oishi, Masako. Yoneyama : **Developmental toxicity of chlorpropham in mice**, Reproductive Toxicology, **11(5)**, 697-701, 1997.

Toyohito.Tanaka : **Reproductive and neurobehavioral effects of chlorpropham administered to mice in the diet**, Toxicology and Industrial Health 13(6), 715-726, 1997.

Tomoko.Fujitani, Yukie.Tada, Aparecida. Titose.Noguchi, Masako.Yoneyama : **Hemotoxicity of Chlorpropham (CIPC) in F344 rats**, Toxicology 123, 111-124, 1997.

Kikukawa M, Aoki N, Mori M : **A case of myelodysplastic syndrome with an intronic point mutation of the p53 tumour suppressor gene at the splice donor site**, Br J Haematol, **100**, 564-566, 1998.

Toshinari.Suzuki, Kumiko.Yaguchi, Tetsuya.Suga, Yoshio.Nakagawa : **Cytotoxic effects of 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenyl N-methylcarbamate (terbutol) herbicide on hepatocytes and mitochondria isolated from male rats**, Environmental Toxicology and Pharmacology 3, 167-173, 1997.

Sumio Yamada, Shigeru Matsushita, Surang Dejsirilert, Yasuo Kudoh : **Incidence and clinical symptoms of Aeromonas-associated traveller's diarrhoea in Tokyo**, Epidemiology Infection 119, 121-126, 1976, 1997.

Kunihiro Kamata, Noboru Motohashi, Masami Kawase : **NITROSATION OF 1-(2-CHLOROETHYL)-3-(2-CHLORO-10H-PHENOTHIAZIN-10-YL) PROPYLUREA AND HPLC SEPARATION OF TWO NITROSATED ISOMERS**, Heterocyclic Communications, **3**, 545-548, 1997, 1997.

Shuko Nojiri, Kunihiro Kamata, Motohiro Nishijima : **Fluorescence detection of biotin using post-column derivatization with OPA in high performance liquid chromatography**, J.Pharm. Biomed. Anal., **16**, 1357-1362, 1998, 1998.

総 説 ・ 解 説

森 謙一郎：**プロペラント含有率の高いエアゾル製品中のメタノール分析**，衛生化学，44，42-48，1998.

中村 義昭，大貫奈穂美，小田 陽子，藤井 孝：**プロペラント含有率の高いエアゾル製品中のメタノール**

分析，日本薬学会，1998.

岡　尚男，加賀美忠明，猪飼　誉友，竹葉　和江：**移動相溶出を用いるイオン交換カートリッジ精製法の食品分析への応用（第2報）**，日本食品衛生学会，1997.

福島　成彦，吉田　精作，堀　伸二郎，西宗　高弘，小町　嘉男，牛尾　房雄：**ヒト糞便中の遊離胆汁酸の分析方法の検討**，大阪府立公衆衛生研究所報，1997.

工藤　泰雄，甲斐　明美：**カンピロバクタージェジュニ腸炎**，小児内科，29，9，1219-1222，1997.

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157の検査法ーなぜ食品からの検出が難しいのかー**，現代化学，**318**，58-63，1997.

甲斐　明美，尾畑　浩魅，伊藤　武：**わが国における腸管出血性大腸菌による食中毒の発生状況**，INFECTION CONTROL，**6**，2，19-23，1997.

諸角　聖：**食品のカビ汚染源としての空気環境，月刊フードケミカル**，**9**，24-28，1997.

小久保彌太郎：**食肉及び食肉製品の微生物管理**，ミートジャーナル，**34(12)**，88-94，1997.

小久保彌太郎：**食品媒介病原菌と食肉衛生**，日本食品保全研究会報，**3(1)**，18-29，1997.

小久保彌太郎：**今，注目のヒトと動物の感染症：リステリア**，臨床獣医，**15(8)**，31-36，1997.

松下　秀：**旅行者下痢症**，総合臨床，**46(5)**，1613-1615，1997.

藤川　浩：**加熱殺菌の数学モデル**，日本防菌防黴学会，**25(9)**，519-533，1997.

楠　淳：**東京都における1996年のサルモネラ食中毒発生状況**，月刊HACCP，**3（10）**，30-33，1997.

村田以和夫：**近年増加傾向にある寄生虫（症）**，食品衛生学雑誌，**38**，5，J291-304，1997.

関根　大正，佐々木由紀子：**食品と小型球形ウイルス感染症**，日本食品微生物学会雑誌，1997.

安田　一郎：**現場に役立つ生薬情報「柴胡」**，Pharmacy and Medicine，**2**，21-23，1997.

安田　一郎：**現場に役立つ生薬情報「桂皮」**，Pharmacy and Medicine，**2**，42-45，1997.

安田　一郎：**現場に役立つ生薬情報「人参・黄耆」**，Pharmacy and Medicine，**3**，4-7，1998.

宮崎　奉之，橋本　常生：**GC/MSによる食品分析（その2）**，月刊フードケミカル9月号，1997.

堀井　昭三：**食品中の動物医薬品の残留について一食肉及び魚介類中の残留抗菌性物質**，都薬雑誌，19，47-54，1997.

橋本　常生，宮崎　奉之：**GC/MSによる食品分析（その1）**，月刊フードケミカル8月号，1997.

吉川　翠：**建築環境の近代化とダニ群集の変化，クリーンテクノロジー，8**，56-59，1998.

吉川　翠：**室内に潜むダニがもたらす病気と対策(1)**，セイフティダイジェスト，**43**，3-12，1997.

吉川　翠：**室内に潜むダニがもたらす病気と対策(2)**，セイフティダイジェスト，**43**，5-9，1997.

吉川　翠：**害虫駆除と快適な住まい，ファーマウィーク，7824**，11-12，1998.

吉川　翠：**ダニによるアレルギー問題**，公衆衛生研究，**47**，7-12，1998.

吉川　翠：**身近な害虫①ー蚊**，日本農業新聞，**12335**，8，1997.

吉川　翠：**身近な害虫②ーツメダニ**，日本農業新聞，**12342**，8，1997.

吉川　翠：**身近な害虫③ーダニⅠ**，日本農業新聞，**12349**，8，1997.

吉川　翠：**身近な害虫④-ダニⅡ**，日本農業新聞，**12356**，8，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑤-家畜とダニ**，日本農業新聞，**12363**，8，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑥ーダニⅢ**，日本農業新聞，12370，**8**，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑦ー蛾類**，日本農業新聞，12377，**8**，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑧ーゴキブリ**，日本農業新聞，**12385**，10，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑨ーアリ**，日本農業新聞，**12398**，10，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑩ーツツガムシ**，日本農業新聞，**12405**，10，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑪ーダニⅣ**，日本農業新聞，**12412**，10，1997.

吉川　翠：**身近な害虫⑫ーシラミ**，日本農業新聞，**12419**，10，1997.

Osamu.Takahashi，Shinsi.Oishi，Masako.Yoneyama，Toyohito.Tanaka，Tomoko.Fujitani：**Mouse liver nodules induced by piperonyl butoxide，a mixed-function oxidase inducer**，Toxicologic Pathology，**26(2)**，301-303，1998.

行　政　報　告

土屋　悦輝，瀬戸　博，斎藤　育江：**平成9年度生物モニタリング結果報告書**（平成9年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書），1998.

牧野　国義：**居住環境の安全性に関するアンケート総合解析**，プロジェクト研究報告書，1997.

坂本　朋子，鈴木　秀雄，竹内　正博：**東京都における放射能調査ー第38回環境放射能調査研究成果論文抄録**

集（平成7年度），科学技術庁，1996.

坂本　朋子，鈴木　秀雄，竹内　正博：**東京都における放射能調査ー第39回環境放射能調査研究成果論文抄録集（平成8年度）**，科学技術庁，1997.

高橋　保雄，土屋　悦輝：**水道水中のハロゲン化消毒副生成物の多成分系統分析法**，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，1997.

高橋　保雄，土屋　悦輝：**水道水中の消毒副生成物と排水の消毒副生成物生成能**，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，1997.

鈴木　重任，佐々木美枝子，上村　　尚，神谷　信行，池田　一夫：**地域における保健医療福祉の連携を支援するための保健情報ネットワークの構築とその効率的運用に関する研究**，厚生科学特別研究事業報告書，1998.

佐々木美枝子，神谷　信行，池田　一夫：**地方衛生研究所の機能強化に関する研究，地方衛生研究所の情報関連機能の強化に関する研究，インターネットによる地方衛生研究所からの情報発信**，厚生科学研究報告書　1998年3月，1998.

佐々木美枝子，神谷　信行，池田　一夫：**地域における保健医療福祉の連携を支援するための保健情報ネットワークの構築とその効率的運用に関する研究：第２回インターネット研究会報告（分担研究報告）**，厚生科学研究報告書　1998年3月，1998.

藤井　　孝，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道，多田　幸恵，福森　信隆，池田　虎雄，高橋　　博，佐々木美枝子：**六味丸の長期毒性試験，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，141-146，1998，東京都衛生局

藤井　　孝，坂本　義光，三栗谷久敏，矢野　範男，湯澤　勝廣，長澤　明道，多田　幸恵，福森　信隆，池田　虎雄，高橋　　博，佐々木美枝子：**十全大補湯の短期毒性試験，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，147-149，1998，東京都衛生局

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：**自己免疫疾患マウス(MRL/1)による六味丸の13週間投与試験　腎糸球体病変の発現に及ぼす影響，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，150-153，1998，東京都衛生局

市川　久次，植田　忠彦，佐藤　和恵，浦野　四郎：**酸化ストレスによる抗酸化系の変動に及ぼす十全大補湯の影響，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，154-157，1998，東京都衛生局

小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，青木　直人，佐々木美枝子：**全胚子培養法を用いた当帰芍薬散のマウス胚子に及ぼす影響，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，158-160，1998，東京都衛生局

牛山　慶子，大久保智子，長井二三子，加納　いつ，横山　嘉子，加納　和孝：**十全大補湯、構成生薬のDNA傷害作用および細胞毒性と地黄のDNA傷害作用機構の検討，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**，161-165，1998，東京都衛生局

大久保智子，長井二三子，牛山　慶子，加納　いつ：**牡丹皮および芍薬のDNA切断抑制作用，東洋医学事業研究報告書　第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋**

医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー, 166-169, 1998, 東京都衛生局

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エキスのNa,K-ATPaseおよびH,K-ATPase活性に及ぼす影響, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 170-172, 1998, 東京都衛生局

佐藤かな子, 長井二三子, 牛山 慶子, 加納 いつ：**白朮の主成分アトラクチロンの細胞膜酵素(Na,K-ATPase)に対する影響, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 173-177, 1998, 東京都衛生局

鈴木 英子：**培養ヒト細胞RSaにおけるK-rasコドン12突然変異の十全大補湯による誘発, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 178-180, 1998, 東京都衛生局

藤田 博：**十全大補湯のエームス試験における変異原性について, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 181-184, 1998, 東京都衛生局

伊藤 武, 柳川 義勢, 新垣 正夫, 只野 敬子, 瀬戸 隆子：**生薬・漢方方剤のHelicobacter pyloriに対する抗菌活性に関する研究, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 185-188, 1998, 東京都衛生局

鈴木 淳, 村田以和夫, 安田 一郎：**寄生虫に対する漢方薬の有効性に関する研究, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 189-192, 1998, 東京都衛生局

浜野 朋子, 安田 一郎, 瀬戸 隆子, 羽石奈穂子, 西島 基弘, 高野伊知郎：**市場品ケイヒの品質評価, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 193-196, 1998, 東京都衛生局

安田 一郎, 浜野 朋子, 渡辺四男也, 関根 大正, 木島 孝夫, コセンチーノマーク, リークオシオン：**ソウキョウ（皂莢）中の抗HIV作用物質とその作用発現部位, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 197-200, 1998, 東京都衛生局

瀬戸 隆子, 安田 一郎, 浜野 朋子, 佐藤かな子, 塩田 寛子, 大西 和夫, 渡辺四男也, 砂金 信義, 宇留野 強：**木防已湯の心機能亢進作用について, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 201-204, 1998, 東京都衛生局

中里 光男, 牛山 博文, 永山 敏廣, 觀 公子, 田端 節子, 友松 俊夫, 上村 尚, 田村 行弘：**原料生薬に含まれる有害物質の実態調査ー甘草についてー, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 205-209, 1998, 東京都衛生局

高野伊知郎, 長嶋真知子, 上村 尚, 早野 公美, 西島 基弘：**漢方方剤及び生薬中に残留する臭素化合物に関する研究, 東洋医学事業研究報告書 第Ⅲ期（平成6年度から平成7年度）ー東洋医学医療の適用による生体の反応機構の解析研究ー**, 210-213, 1998, 東京都衛生局

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1997.4－1998.3)

学会発表

畠山　薫, 久保田泰一郎, 広嶋　実, 松尾　克徳, 伊藤　武：**愛がん用家兎にみられた破傷風例**, 平成9年度日本獣医公衆衛生学会・年次大会, (1998, 2).

宮尾　陽子, 伊藤喜久治, 平山　和宏, 甲斐　明美, 伊藤　武, 松井　高峯：**無菌マウスを用いたベロ毒素産生性大腸菌（VTEC）の病原性の比較**, 第123回日本獣医学会, (1997, 4).

甲斐　明美：**食品からのベロ毒素産生性大腸菌の検出法**, 衛生微生物技術協議会第18回研究会, (1997, 7).

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157食中毒とその発生要因**, 第18回日本食品微生物学会学術総会, (1997, 12).

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157感染症の疫学と検査上の問題点**　第1回衛生薬学フォーラム, (1997, 10).

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157の検査法**, 第30回中国四国臨床衛生検査学会, (1997, 10).

尾畑　浩魅, 甲斐　明美, 松下　秀, 五十嵐英夫, 伊藤　武, 太田　建爾, 工藤　泰雄：**腸炎ビブリオ血清型O3：K6の出現推移と溶血毒素産生性**, 第31回腸炎ビブリオシンポジウム, (1997, 11).

門間　千枝, 甲斐　明美, 柳川　義勢, 五十嵐英夫, 伊藤　武, 中井　定子, 長　則夫, 古宮　営三：**易熱性芽胞形成ウエルシュ菌による食中毒事例と分離菌株の性状について**, 第18回日本食品微生物学会・学術総会, (1997, 12).

甲斐　明美, 上村　尚, 矢野　一好, 石井　営次, 他：**微生物試験法・腸管出血性大腸菌O157**, 日本薬学会第118年会, (1998, 3).

甲斐　明美, 畠山　薫, 尾畑　浩魅, 五十嵐英夫, 伊藤　武：**東京都内における腸管出血性大腸菌O157下痢症患者の発生状況と分離菌株の疫学マーカーによる解析**, 第2回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, (1997, 8).

甲斐　明美, 尾畑　浩魅, 畠山　薫, 五十嵐英夫, 太田　建爾, 伊藤　武, 工藤　泰雄：**東京都内で分離された腸管出血性大腸菌O157のパルスフィールド電気泳動法による疫学的解析**, 第71回日本感染症学会総会, (1997, 4).

畠山　薫,, 尾畑　浩魅, 横山　敬子, 門間　千枝, 新垣　正夫, 甲斐　明美, 五十嵐英夫, 伊藤　武：**食肉におけるベロ毒素産生性大腸菌の分布と食肉を原因とした食中毒事例について**, 日本食品衛生学会・第73回学術講演会, (1997, 5).

畠山　薫, 甲斐　明美, 尾畑　浩魅, 五十嵐英夫, 太田　建爾, 伊藤　武, 工藤　泰雄：**わが国で分離された腸管出血性大腸菌O157の薬剤感受性の推移**, 第71回日本感染症学会・総会, (1997, 4).

小久保彌太郎：**HACCPとはーその出現の経緯と導入のための基本的考え方**, 日本家禽学会, (1998, 3).

小久保彌太郎：**HACCPとその前提となる一般的衛生管理プログラム（最近の話題）**, 日本獣医公衆衛生学会, (1998, 2).

松下　秀, 野口やよい, 柳川　義勢, 五十嵐英夫, 他：**Vibrio cholerae non-01 による散発下痢症例と分離株の諸性状**, 第31回腸炎ビブリオシンポジウム,

(1997, 11).

松下　秀，野口やよい，柳川　義勢，五十嵐英夫，他：**新血清型のA群赤痢菌と考えられる海外旅行者下痢症例由来株について**，第71回日本感染症学会総会，(1997, 4).

松下　秀，野口やよい，柳川　義勢，五十嵐英夫，他：**Vibrio cholerae non-01による国内散発事例と分離株の諸性状**，第71回日本感染症学会総会，(1997, 4).

新垣　正夫，只野　敬子，甲斐　明美，伊藤　武，星谷　聡，二宮　英彦，高橋　信一：**マイクロプレート法によるHelicobacter pyloriの薬剤感受性試験の検討**，第71回日本感染症学会総会，(1997, 4).

森田　耕司，渡辺　登，松下　秀，山田　澄夫，柴田　幹良，島田　俊雄，工藤　泰雄：**Plesiomonas shigelloidesβ溶血株の性状**，第78回日本細菌学会関東支部総会，(1997, 10).

森　伴雄，小野　由可，長沢　光章，結城　篤，甲斐　明美，五十嵐英夫：**腸管出血性大腸菌O157用分離培地の比較検討**，第9回日本臨床微生物学会総会，(1998, 1).

只野　敬子，甲斐　明美，門間　千枝，尾畑　浩魅，新垣　正夫，畠山　薫，楠　淳，五十嵐英夫，太田　建爾，伊藤　武，寺嶋　淳：**死者の発生をみたSalmonella Enteritidisの食中毒事例について**，第71回日本感染症学会総会，(1997, 4).

藤川　浩，伊藤　武，高橋　克忠，他：**予測微生物学への熱測定法応用の試み**，第24回日本防菌防黴学会，(1997, 5).

藤川　浩，和宇慶朝昭，井部　明広，諸角　聖，森　治彦：**食品用離型油使用食品に発生した糸状菌による香粧臭の発生事例**，第18回日本食品微生物学会，(1997, 12).

藤川　浩，和宇慶朝昭，五十嵐英夫，伊藤　武：**糸状菌Aspergillus niger胞子の熱死滅パターンにおける肩およびテーリング（第3報）**，第24回日本防菌防黴学会，(1997, 5).

藤川　浩，和宇慶朝昭，諸角　聖，伊藤　武，丸山　文一：**色素基質培地クロモアガーカンジダを用いた生ドレッシング汚染酵母の増殖挙動の解析**，第24回日本防菌防黴学会，(1997, 5).

楠　淳，高橋　由美，関口　恭子，甲斐　明美，五十嵐英夫，太田　建爾，伊藤　武，寺嶋　淳，中村　明子：**東京都におけるS.Enteritidis食中毒発生状況と分離株の細菌学的検討**，第77回日本細菌学会関東支部総会，(1997, 6).

楠　淳：**シンポジウム　食品検査データの信頼性確保　微生物検査における現状**，日本食品衛生学会第73回学術講演会，(1997, 5).

尾畑　浩魅，畠山　薫，小西　典子，門間　千枝，新垣　正夫，横山　敬子，甲斐　明美，松下　秀：**腸炎ビブリオ血清型O3：K6による食中毒事例と分離株の溶血毒産生性について**，第18回日本食品微生物学会・学術総会，(1997, 12).

横山　敬子，尾畑　浩魅，畠山　薫，新垣　正夫，甲斐　明美，森本　敬子，楠　淳，五十嵐英夫，伊藤　武：**1997年に都内で発生したS.Corvallisによる集団下痢症2事例の疫学的・細菌学的検討**，第18回日本食品微生物学会・学術総会，(1997, 12).

横山　敬子，尾畑　浩魅，畠山　　薫，新垣　正夫，門間　千枝，小西　典子，甲斐　明美，森本　敬子，楠　淳，五十嵐英夫，伊藤　　武：**Salmonella Corvallisによる集団下痢症事例と分離菌株のパルスフィールド電気泳動法による解析**，第10回地研全国協議会関東甲信静支部・細菌研究部会総会，(1998，2)．

楠　　淳，甲斐　明美，高橋　由美，五十嵐英夫，太田　建爾，伊藤　　武，中村　明子：**S.Enteritidis PT1 食中毒由来株の細菌学的検討**，第123回日本獣医学会，(1997，4)．

門間　千枝，柳川　義勢，横山　敬子，尾畑　浩魅，新垣　正夫，甲斐　明美，五十嵐英夫，伊藤　　武：**食中毒由来Bacillus cereus培養液のカエルを用いた嘔吐活性**，日本食品衛生学会・第73回学術講演会，(1997，5)．

門間　千枝，柳川　義勢，甲斐　明美，五十嵐英夫，伊藤　　武，金原　博子，麻生誠二郎，大川　澄夫：**自家製野菜スープが原因と推定される乳児ボツリヌス症**，第71回日本感染症学会・総会，(1997，4)．

門間　千枝，柳川　義勢，甲斐　明美，五十嵐英夫，伊藤　　武：**自家製野菜スープが原因と推定された乳児ボツリヌス症**，衛生微生物技術協議会第18回研究会，(1997，7)．

高野　弘紀，柴田　　実：**乾燥血液ろ紙を用いた感染症マス・スクリーニングの試み**，日本マス・スクリーニング学会，(1997，9)．

柴田　　実，服部　絹代，安部　昭子，高野　弘紀：**アミノ酸分析器によるアミノ酸代謝異常症スクリーニングの検討**，日本マス・スクリーニング学会，(1997，9)．

岩堀　禎広，岡田　嘉仁，奥山　　徹，佐々木由紀子，関根　大正：**海藻成分の抗ウイルス活性**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

岩堀　禎広，佐々木由紀子，関根　大正，岡田　嘉仁，奥山　　徹：**Studies on antivir activities of seaweed**，第44回日本生薬学会年会，(1997，9)．

吉田　靖子，新開　敬行，平田　一郎，関根　大正：**継代細胞を用いての日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況**，日本脳炎ウイルス生態学研究会，(1997，6)．

佐々木由紀子，中村　敦子，門間　公夫，長島　真美，森　　功次，吉田　靖子：**東京都におけるPCR検査法の実状（SRSV検査の問題点）**，第12回関東甲信静微生物協議会ウイルス研究会，(1997，10)．

新開　敬行，森　　功次，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正，伊藤　　武，藤田　　満，小川　恭正，寺村　　渉：**二枚貝におけるウイルス分布**，第18回日本食品微生物学会，(1997，12)．

森　　功次，新開　敬行，吉田　靖子，田部井由紀子，貞升　健志，関根　整治，平田　一郎：**伝染性紅斑の集団発生事例について**，第12回関東甲信静微生物協議会ウイルス研究会，(1997，10)．

味澤　　篤，今村　顕史，根岸　昌功，増田　剛太，貞升　健志，関根　大正：**Indinavirの副作用および治療上の問題点に関する臨床的検討**，第11回日本エイズ学会総会，(1997，12)．

安田　一郎，大西　和夫：**東京都における無承認無許可医薬品試験の問題点について**，第34回全国薬事指導協議会総会，(1997，10)．

外尾　英隆，伊藤　　恵，前川　智明，堀　　渉，

鰍澤　照夫，浜野　朋子，安田　一郎，大西　和夫：**東京都における中小企業への医薬品バリデーション支援事業**，第30回日本薬剤師会学術大会，(1997，9)．

関田　節子，鎌倉　浩之，佐竹　元吉，安田　一郎，浜野　朋子：**生薬に含まれるAristolochic acidsについて**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

宮武ノリヱ，安田　一郎，守安　貴子，中嶋　順一，寺島　　潔，岸本　清子，大西　和夫：**キャピラリー電気泳動による光学異性体を有する医薬品の分析**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

守安　貴子，安田　一郎，宮武ノリヱ，中嶋　順一，寺島　　潔，岸本　清子，大西　和夫：**LC/MSによるノコギリヤシ含有健康食品中の脂肪酸の分析**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

谷　　賢志，香川　一浩，大野　孝義，鰍澤 照夫，安田　一郎，塩田　寛子，大西　和夫：**食欲抑制剤（フェンフルラミン）を含有した健康食品の調査結果について**，第99回東京都衛生局学会，(1997，11)．

中嶋　順一，安田　一郎，寺島　　潔，宮武ノリヱ，岸本　清子，守安　貴子，大西　和夫：**健康食品に含まれるイチョウ葉エキスの試験法について**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会，(1998，2)．

木島　孝夫，高崎みどり，徳田　春邦，西野　輔翼，安田　一郎，浜野　朋子：**細辛含有成分の発癌抑制作用**，第11回天然薬物の開発と応用シンポジウム，(1997，8)．

山野辺秀夫，都田　路子，上原　真一，觀　　照雄，藤井　　孝：**ピアス・イヤリングの金属組成**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

小田　陽子，森　謙一郎，中村　義昭，大貫奈穂美，横山　敏郎，藤井　　孝：**界面活性剤含有化粧品の色素分析**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

上原　真一，都田　路子，山野辺秀夫，觀　　照雄，藤井　　孝：**ピアスから人工汗への金属溶出**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

上原　真一，都田　路子，山野辺秀夫，觀　　照雄，藤井　　孝：**ピアス，イアリングの金属組成と金属溶出**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

横山　敏郎，森　謙一郎，中村　義昭，大貫奈穂美，小田　陽子，藤井　　孝：**液体クロマトグラフィーによる化粧品中表示対象成分及び配合規制成分の同時分析**，日本薬学会，(1998，3)．

水石　和子，竹内　正博，保母　敏行：**固相マイクロ抽出／キャピラリーガスクロマトグラフィーによる底質中のTBT及びTPTの定量**，Separation Science'97，(1997，7)．

竹内　正博，水石　和子，保母　敏行：**マルチキャピラリーカラムによるECD-GCの応答特性の研究**，Separation Science'97，(1997，7)．

竹内　正博，水石　和子，保母　敏行：**キャピラリーガスクロマトグラフィーにおけるトリブチルスズハライドのオンカラムハロゲン交換**，日本分析化学会第46年会，(1997，10)．

中村　義昭，大貫奈穂美，森　謙一郎，横山　敏郎，小田　陽子，藤井　　孝：**蛍光X線分析法による医薬部外品中のジンクピリチオンの定量**，第34回全国衛生化学協議会年会，(1997，11)．

大貫　奈穂美，中村　義昭，森　謙一郎，横山　敏郎，小田　陽子，藤井　　孝：**キャピラリーゾーン電気泳動を用いたパーマネント・ウェーブ用剤の分析**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

都田　路子，山野辺秀夫，上原　真一，觀　　照雄，藤井　　孝：**規制対象外家庭用品中のホルムアルデヒドの実態調査**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会，(1998，2)．

牛山　慶子，大久保智子，長井二三子，加納　いつ：**地黄およびその分画物質によるDNA傷害作用**，第56回日本癌学会総会，(1997，9)．

石崎　直人，金子　誠二，仲真　晶子，小久保彌太郎：**Petrifilm TM Test Kit-HECを用いた食肉からの大腸菌O157:H7のスクリーニング**，日本食品衛生学会第73回学術講演会，(1997，5)．

平井　昭彦，神保　勝彦，宮崎　奉之，小久保彌太郎：**畜水産食品中の抗菌性物質残留実態調査（1987年から1996年の調査成績）**，平成9年度日本獣医公衆衛生学会年次大会，(1998，2)．

金子　誠二，石崎　直人，宮崎　奉之，小久保彌太郎：**Yersinia enterocolitica 血清型O3生物型3および4の分子疫学的解析**，第124回日本獣医学会，(1997，10)．

竹葉　和江，藤沼　賢司，宮崎　奉之，岡　　尚男，中澤　裕之：**高速液体クロマトグラフィーによる畜産食品中のベンズイミダゾール系寄生虫駆除剤の同時分析**，日本食品衛生学会，(1997，10)．

宮川　弘之，堀井　昭三，橋本　秀樹，高橋　　巖，井草　京子，笹本　剛生，宮崎　奉之，他：**アカガイに使用された天然着色料の同定**，第98回東京都衛生局学会，(1997，5)．

高野伊知郎，安田　一郎，西島　基弘，一柳　幸生，竹谷　孝一，糸川　秀治：**本邦産イヌガヤに含有される抗腫瘍性 Cephalotaxus アルカロイドの構造と骨格変換反応**，第39回天然有機化合物討論会，(1997，8)．

小沢　秀樹，井部　明広，田端　節子，宮川　弘之，貞升　友紀，友松　俊夫：**玄米中のアクリルアミドモノマー分析法の検討**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

小林　千種，中里　光男，山嶋裕季子，川合　由華，立石　恭也，友松　俊夫：**GC及びGC-MSによる輸入乾燥果実中のサイクラミン酸の分析**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

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：**野菜加工品中の残留農薬**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

新藤　哲也，牛山　博文，觀　　公子，安田　和男，友松　俊夫：**キノコ中のシアン含有量及び調理による消長**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

新藤　哲也，牛山　博文，觀　　公子，冠　　政光，真木　俊夫，安田　和男，友松　俊夫：**バイオテクノロジー応用食品の安全性評価に関する衛生化学的調査（その2）**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

田端　節子，井部　明広，小沢　秀樹，鈴木　公美，木村祐起子，上村　　尚，他：**濃縮リンゴ果汁から検出されたパツリンについて**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

田端　節子，上村　　尚，田辺　信三：**アフラトキシンB1の亜硫酸水素ナトリウムによる変換生成物に関する検討**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

嶋村　保洋，木村　圭介，小澤　マリ，鈴木　忍，中村　昌道，川名　清子，嶋村　保洋，友松　俊夫，西島　基弘：**HPLCによるコウジ酸分析法の市販食品への適用**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

鈴木　敬子，勝木　康隆，小川　仁志，松本ひろ子，鈴木　　仁，友松　俊夫：**ビール中の異物について**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

鈴木　　仁，勝木　康隆，小川　仁志，鈴木　敬子，松本ひろ子，友松　俊夫：**HPLCによるカットキャベツに使用された亜塩素酸ナトリウムの分析法**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

金子　令子，渡辺　悠二，樺島順一郎，鈴木　助治：**食品用ゴム製器具の衛生学的調査**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

植松　洋子，広門　雅子，平田　恵子，伊藤　弘一，鈴木　助治：**LC/LC蛍光検出器による魚缶詰中のビスフェノールAジグリシジルエーテルの分析**，日本食品衛生学会第73回学術講演会，(1997，5)．

船山　恵市，安野　哲子，萩原　輝彦，鈴木　助治：**亜硝酸塩を含有する食品添加物製剤中のアスコルビン酸の分析法**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

萩原　輝彦，安野　哲子，船山　恵市，伊藤　弘一，鈴木　助治：**LC/APCI-MSによるコントロール血清中のリコピン，α-カロテンおよびβ-カロテンの定量**，日本ビタミン学会，(1997，5)．

平田　恵子，広門　雅子，植松　洋子，鈴木　久美，安野　哲子，伊藤　弘一，安田　和男，鈴木　助治：**HPLCによるラック色素製剤中の色素成分の分析**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1997，10)．

井口　正雄，坂牧　成恵，菊谷　典久，市川　久次，渡辺　悠二，早矢仕祐子，上村　恵彬：**FT-IRによる油脂製品中のトランス酸の分析**，第34回全国衛生化学技術協議会年会，(1997，11)．

坂牧　成恵，菊谷　典久，井口　正雄，市川　久次，芝田　智子，吉澤満里子：**東京都における有害金属および有機塩素系農薬摂取量調査**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会，(1998，2)．

植田　忠彦，牛尾　房雄，横山　知子，市川　久次，五十嵐　脩：**食品中に添加された合成型ビタミンEの分析法**，日本栄養食糧学会，(1997，5)．

早藤知惠子，市川　久次，鈴木とし子，長野みさ子，江島　有紀，城所　俊英：**骨密度及び骨代謝に影響する因子**，日本公衆衛生学会総会，(1997，10)．

関　比呂伸：**アスベストの環境汚染とドバト**，第68回日本衛生学会総会，(1998，3)．

佐藤　泰仁：**室内環境におけるアスベスト汚染の追跡調査**，日本公衆衛生学会，(1997，10)．

斎藤　育江，瀬戸　　博：**室内VOC測定用パッシブサンプラーの比較検討**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第10回理化学研究部会，(1998，2)．

斎藤　育江，瀬戸　　博，多田　宇宏，土屋　悦輝：**東京都内の一般住宅およびビルの室内ホルムアルデヒド・揮発性有機化合物濃度について**，第38回大気環境学会，(1997，9)．

瀬戸　　博，斎藤　育江，多田　宇宏，土屋　悦輝：**加熱脱着チューブを用いるパッシブサンプリングによる室内揮発性有機化合物の分析**，第38回大気環境学会，

(1997, 9).

大山 謙一, 土屋 悦輝, 鈴木 重任, 飯田 靖雄, 泉川 碩雄, 伊藤 隆明, 蟹沢 成好：**大気汚染物質による肺腫瘍発生に関する研究（第5報）ーDEP気管内注入による肺腫瘍発生とNO2暴露の影響についてー**, 第38回大気環境学会, (1997, 9).

牧野 国義, 佐藤 泰仁：**沿道周辺の浮遊粒子状物質の変動について**, 第38回大気環境学会, (1997, 9).

牧野 国義, 佐藤 泰仁, 長嶋 親治：**疫学調査のための環境モニタリングについて**, 第56回日本公衆衛生学会, (1997, 10).

矢野 一好, 古畑 勝則, 竹内 正博, 鈴木 淳, 村田 理恵, 村田以和夫：**水中微生物のリスク評価ー最小感染単位の微生物を検出するにはー**, 第99回東京都衛生局学会, (1997, 11).

大垣真一郎, 山本 和夫, 平田 強, 矢野 一好, 大瀧 雅寛：**膜ろ過技術によるウイルスの除去**, 第1回浄水技術セミナー, (1997, 9).

大瀧 雅寛, 矢野 一好, 大垣真一郎, 唐澤 祥嗣：**膜処理プラントにおける高濃度ウイルス・ファージの除去特性に関する研究**, 水道研究発表会, (1997, 6).

高橋 保雄, 竹内 正博, 森田 昌敏：**水道水中のハロゲン化消毒副生成物の多成分系統分析法**, 日本環境化学会, (1997, 6).

高橋 保雄, 竹内 正博, 森田 昌敏：**中空糸膜付活性炭型浄水器によるハロゲン化消毒副生成物の除去（漏出）**, 日本環境化学会, (1997, 6).

高橋 保雄, 竹内 正博, 森田 昌敏：**屋内プール水中のハロゲン化消毒副生成物**, 日本水環境学会, (1998, 3).

平田 強, 大垣真一郎, 矢野 一好：**膜ろ過法のクリプトスポリジウム除去性能評価実験**, 第1回浄水技術セミナー, (1997, 9).

矢野 一好：**水と食品を介したウイルスの感染リスク**, 第1回衛生薬学フォーラム, (1997, 10).

古畑 勝則, 矢野 一好, 竹内 正博：**水環境からのレジオネラ属菌の検出状況**, 第56回日本公衆衛生学会, (1997, 10).

古畑 勝則, 矢野 一好, 竹内 正博：**レジオネラ属菌の飛散に関する実験的検討**, 日本防菌防黴学会第24回年次大会, (1997, 5).

脇山 博之, 奥村 敦, 深沢 昌史, 四ノ宮成祥矢野 一好：**野外飲料用大量処理水の微生物的水質評価**, 第13回日本環境感染学会, (1998, 2).

脇山 博之, 大山さおり, 田中 良弘, 児玉 芳夫矢野 一好：**ウイルスを指標とした野外飲料用処理水の微生物学的水質評価**, 第43回防衛衛生学会, (1998, 2).

脇山 博之, 大山さおり, 田中 良弘, 児玉 芳雄, 矢野 一好：**野生型大腸菌ファージを指標とした野外飲用用処理水の微生物学的水質評価**, 第43回防衛衛生学会, (1998, 2).

大久保智子, 長井二三子, 牛山 慶子, 加納 いつ：**抗酸化剤TBHQによるDNA切断に対するボタンピ, シャクヤクの抑制作用**, 第56回日本癌学会, (1997, 9).

佐藤かな子，長井二三子，瀬戸　隆子，牛山　慶子，大久保智子，浜野　朋子，塩田　寛子：**胃疾患に繁用される漢方方剤および構成生薬エキスのH,K-ATPase活性におよぼす影響**，第14回和漢医薬学会，(1997，8)．

中川　好男，田山寿美子：**没食子酸プロピルの肝細胞代謝とアポトーシス**，第12回日本薬物動態学会，(1997，11)．

深野　駿一，平野晴史郎，遠山　千春：**薬物動態予測プログラムの開発とその応用 (3) —2-Chlorodibenzofuranの体内動態—**，第11回日本代替法学会，(1997，11)

小縣　昭夫，高橋　博，安藤　弘，久保　喜一，湯澤　勝廣，長澤　明道，矢野　範男，三栗谷久敏，坂本　義光，青木　直人：**SCIDマウス移植ヒト神経芽細胞腫細胞(IMR-32)に対するレチノイン酸の作用の検討**，第86回日本病理学会総会，(1997，6)．

坂本　義光，青木　直人，東丸　貴信：**血管内局所療法による内膜肥厚抑制とその機序**，第86回日本病理学会，(1997，6)．

尾形　和恵，片山佳奈子，林　志直，吉田　勲，山城　恵美，加藤　玲，伊藤　忠彦，山田　澄夫：**多摩地区の下痢症に関する感染症サーベイランス**，地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第10回研究会，(1998，2)．

大石　充男，小笠原裕樹，石井　一行，田辺　信三：**HPLCによるニコチンアミドデアミダーゼ活性測定法の開発及び食肉分離菌への応用**，日本薬学会第118年会，(1998，3)

野尻　宗子，斉藤　和夫，田口　信夫，大石　充男，藤井　孝，田村　行弘，真木　俊夫：**HPLCによる食品中の糖アルコールの分析法**，日本食品衛生学会第74回学術講演会，(1998，10)．

鈴木　俊也，近藤　治美，矢口久美子，眞木　俊夫：**ゴルフ場で使用される農薬の環境水汚染の可能性評価**，日本水環境学会，(1998，3)．

鈴木　俊也，矢口久美子，中川　好男，須賀　哲弥：**雄性ラット遊離肝細胞および肝ミトコンドリアに対する除草剤ターブトールの毒性**，日本薬学会第118年会，(1998，3)．

Akemi Kai，Hiromi Obata，Kaoru Hatakeyama，Hideo Igarashi，他：**A 13-YEAR STUDY OF ENTEROHAEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI(EHEC) INFECTIONS IN TOKYO(1984-1996)**，3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN PRODUCING ESCHERICHIA COLI INFECTIONS，(1997，12)．

Akemi Kai，Hiromi Obata，Kaoru Hatakeyama，Hideo Igarashi，他：**Epidemiological and bacteriological aspects of enterohaemorrhagic Escherichia coli infections in Tokyo**，Thirty-third Joint Conference on Cholera and Related Diarrheal Diseases，(1997，12)．

H.Suzuki，M.Mori，M.Suzuki，M.Nakamura，Y.Akiba，A.Kai，S.Miura 他：**ETHANOL INTAKE PRECEDING H.PYLORI INOCULATION ACCELERATES GASTRIC MUCOSAL INJURY IN MONGOLIAN GERBILS**，Annual Meeting of:American Gastroenterological Association and American Association for the Study of Liver Diseases，(1997，5)

Takeshi Itoh，Akemi Kai，Kaoru Hatakeyama，Hiromi Obata，他：**TREND IN ANTIMICROBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROHAEMORRHAGIC**

ESCHERICHIA COLI O157 ISOLATED IN JAPAN, 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON SHIGA TOXIN PRODUCING ESCHERICHIA COLI INFECTIONS, (1997, 6).

Akemi Kai : **EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON ENTEROHAEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI INFECTIONS IN JAPAN**, The 6th China-Japan International congress of Microbiology, (1997, 8).

M.Takasaki, T.Konoshima, H.Tokuda, I.Yasuda : **Cancer Chemopreventive Activities of Lignans fromAsiasarum heterotropoides**, International Symposium Anti-tumour Products from Higher Plants, (1998, 1).

K.Mizuishi, M.Takeuchi, T.Hobo : **Determination of tributyltin and triphenyltin compounds in sediment as halides by SPME and GC/NICI-MS**, 19th International symposium on capillary chromatography, (1997, 5).

C.Kiyose, K.Kaneko, T.Ueda and O.Igarashi : **Determination of α-tocopherylquinone stereoisomers in rat tissues administered 2-ambo-α-tocopherol intravenously**, Internatinal Congress of Nurition, (1997).

M.Takeuchi, K.Mizuishi, T.Hobo : **Application of multicapillary column to the estimation of electron capture response**, 19th International symposium on capillary chromatography, (1997, 5).

Tomoko.Okubo, Fumiko.Nagai, Keiko.Ushiyama, Takako.Seto, Kanako.Satoh, Itsu.Kano : **The inhibitory effects of Moutan Cortex and Paeoniae Radix on oxidative DNA damage by t-butylhydroquinone, phenolic antioxidant.**, 第7回国際環境変異学会, (1997, 9).

Osamu.Takahashi, Shinshi.Oishi : **Measurement of liver weight: The simplest method of prediction of hepatocarcinogenicity**, 第1回アジアトキシコロジー国際会議, (1997, 6).

Tomoko.Fujitani, Yukie.Tada, Y.Saitou, K.Imai, Masako.Yoneyama : **Nephrotoxicity of thiabendazole; structural and functional alterations in renal mitochondria in ICR mice**, 第7回欧州獣医学薬理毒性国際学会, (1997, 7).

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	真　木　俊　夫
関　根　大　正	鈴　木　孝　人
藤　井　　孝	鈴　木　助　治
宮　崎　奉　之	山　田　澄　夫
竹　内　正　博	大　澤　俊　雄

1999年1月発行

登録番号10(10)

東京都立衛生研究所研究年報第49号

編集発行：東京都立衛生研究所
〒169-0073 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
〒131-0033 東京都墨田区向島3－35－9
電話03（3625）7481（代）