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

50

1999

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

当衛生研究所の平成10年度の調査研究についてまとめることができました。それぞれの部所でご活用いただければ幸です。

昨年（平成11年）４月１日から、感染症新法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）が施行され、介護保険や健康危機事例の多発など地域保健をめぐる社会情勢の変化に対応するため、「地域保健問題検討会」での検討をもとに、「地域保健対策の推進に関する基本的な指針」を含め、地域保健全般における見直しが行われようとしています。また、６月には、全国地方衛生研究所設立50周年記念事業が盛大に行われ、21世紀に向けて、行政に科学的根拠を与える衛生研究所の役割の重要性が再認識されました。

感染症では、セラチアの院内感染、サルモネラ・オラニエンブルグ、特養ホームにおけるレジオネラ、高齢者のインフルエンザ、結核の集団発生等の出来事があり、感染症サーベイランスシステムの完成が急がれています。理化学系でも遺伝子組み換え食品やダイオキシン類を含む環境ホルモン（外因性内分泌かく乱化学物質）が問題となり、昨年４月に完成したケミカルハザード実験室での測定も進んでいます。

都民の生命と健康に関する限り、たとえ都財政が厳しくても、やるべき事はやらなくてはなりません。そのために知恵をしぼり努力する中で道は開けて行くものと確信しています。現在の不況も、元はと言えば情報等の科学技術の進歩に遅れたことがそもそもの原因だったように思います。私たちは、当研究所の調査研究について、衛生局との連携を十分図るとともに決して独り善がりにならぬよう、今年度からは外部の方々の評価も取り入れて行こうとしています。衛生研究所の役割である、地域保健の科学的・技術的中核機関としての機能を十分発揮できますよう皆様の更なるご指導、ご鞭撻をお願い申し上げます。

平成12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

東京都内某保育園で発生したソンネ赤痢菌による集団感染事例の疫学的･細菌学的検討
……小西　典子，松下　　秀，甲斐　明美，楠　　淳，諸角　　聖 …… 3

SRSVの関連した小児における集団胃腸炎事例について
……森　　功次，林　　志直，佐々木由紀子，野口やよい，中村　敦子
長島　真美，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正，小久保彌太郎 …… 9

東京都におけるエコー30型ウイルスによる無菌性髄膜炎の流行について
……長谷川道弥，吉田　靖子，田部井由紀子，長島　真美，平田　一郎
関根　大正，小久保彌太郎 …… 12

東京都におけるHIV抗体検査成績（1995年～1998年）
……貞升　健志，中村　敦子，森　　功次，田部井由紀子，新開　敬行
山崎　　清，門間　公夫，関根　整治，吉田　　勲，山田　澄夫
平田　一郎，関根　大正，小久保彌太郎 …… 16

東京都におけるポリオウイルス検出状況（1998年）
……田部井由紀子，吉田　靖子，長谷川道弥，長島　真美，平田　一郎
関根　大正，小久保彌太郎 …… 20

と畜場で捕獲したハエの病原菌保有調査
……飯田　　孝，神崎　政子，細谷　夏美，宮崎　奉之 …… 24

臨床材料からのA型肝炎ウイルス（HAV）検索成績
……新開　敬行，森　　功次，貞升　健志，山崎　　清，中村　敦子
吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正，小久保彌太郎 …… 28

Cryptosporidium muris オーシストの検出および同定法の検討
……鈴木　　淳，村田　理恵，村田以和夫，柳川　義勢，諸角　　聖 …… 33

報文Ⅱ　医薬品等に関する調査研究

タイ産Curcuma属生薬のAnisakis Ⅰ型幼虫に対する運動抑制効果およびその殺線虫成分に関する検討
……鈴木　　淳，村田以和夫，安田　一郎 …… 41

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援　－ステロイドホルモン配合軟膏剤メーカーへの対応－
……岸本　清子，安田　一郎，宮武ノリエ，守安　貴子，中嶋　順一
上村　　尚，大西　和夫，前川　智明，佐々木勇夫，宮城不二男 …… 49

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援　－硫酸銅配合軟膏剤メーカーへの対応－
……中嶋　順一，寺島　　潔，岸本　清子，安田　一郎，宮武ノリエ，
守安　貴子，三宅　啓文，上村　　尚，大西　和夫，高澤　浩一，
瀧　　昭則，香川　一浩，秋山　恵子 …… 55

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援　－漢方及び生薬製剤メーカーへの対応－
……浜野　朋子，瀬戸　隆子，塩田　寛子，安田　一郎，上村　尚
大西　和夫 …… 59

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の表示対象成分及び配合規制成分の同時分析
……横山　敏郎，森　謙一郎，中村　義昭，大貫奈穂美，松島　陽子
藤井　孝 …… 65

キャピラリー電気泳動を用いた化粧品中タール色素の一斉分析
……大貫奈穂美，森　謙一郎，中村　義昭，横山　敏郎，松島　陽子
藤井　孝 …… 70

輸入化粧品中の5－ブロモ－5－ニトロ－1，3－ジオキサンの分析法
……中村　義昭，森　謙一郎，大貫奈穂美，横山　敏郎，松島　陽子
藤井　孝 …… 77

芳香化粧品中のベルガプテンの分析
……森　謙一郎，大貫奈穂美，中村　義昭，横山　敏郎，松島　陽子
藤井　孝 …… 81

家庭用品の衛生化学的研究（第40報）ピアス及びイヤリングの金属組成と金属溶出
……山野辺秀夫，都田　路子，上原　真一，観　照雄，藤井　孝 …… 85

報文Ⅲ　食品等に関する調査研究

魚肉中の一酸化炭素のＧＣによる定量法の検討
……有松　真保，大橋　則雄，天川　映子，鎌田　国広，鈴木　助治 …… 97

茶抽出物を添加した食品中のカテキン類及びメチルキサンチン類の分析
……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 …… 101

いわゆる健康茶類の衛生化学的調査
……中里　光男，牛山　博文，横山　敬子，小林　千種，川合　由華
立石　恭也，小川　仁志，安田　和男 …… 107

輸入魚醤油の衛生化学的調査　―食品添加物の含有量について―
……中里　光男，小林　千種，山嶋裕季子，立石　恭也，大野　郁子
川合　由華，安田　和男 …… 113

ファーストカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる濃縮果汁中の防かび剤の分析
……小沢　秀樹，広門　雅子，井部　明広，島村　保洋
中島　和雄，木村　圭介，安田　和男 …… 119

FPD/GCによる野菜中の有機リン系農薬の一斉分析法
……佐藤　寛，大橋　則雄，天川　映子，荻原　勉，鎌田　国広
鈴木　助治 …… 124

既存公定試験法を応用した農産物中のチフルザミドの分析
……田村　康宏，永山　敏廣，高野伊知郎，小林　麻紀，伊藤　正子
木村奈穂子，北山　恭子，高田千恵子，安田　和男 …… 130

蛍光X線分析法による米中総臭素の定量
……髙田千恵子，高野伊知郎，永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子
田村　康宏，木村奈穂子，北山　恭子，安田　和男 …… 134

国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査　－平成10年度－
……伊藤　正子，永山　敏廣，高野伊知郎，小林　麻紀，田村　康宏
木村奈穂子，北山　恭子，高田千恵子，安田　和男 …… 138

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10年度－
……高野伊知郎，永山　敏廣，小林　麻紀，伊藤　正子，田村　康宏，
木村奈穂子，北山　恭子，高田千恵子，安田　和男 …… 145

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10年度―
……小林　麻紀，永山　敏廣，高野伊知郎，伊藤　正子，田村　康宏
木村奈穂子，北山　恭子，高田千恵子，安田　和男 …… 151

都内搬入米におけるカドミウム，銅，ヒ素の含有量について（第２報）　－1981年から1998年までの試験成績の概要－
……小野塚春吉，雨宮　　敬，水石　和子，山野辺秀夫，藤井　　孝
大西　和夫 …… 158

輸入食品中の放射能濃度（第８報）　－平成10年度－
……観　　公子，牛山　博文，新藤　哲也，安田　和男 …… 167

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第16報）　―平成10年―
……牛山　博文，観　　公子，新藤　哲也，安田　和男 …… 175

有機農産物の栄養成分について（第２報）
……牛尾　房雄，齋東　由起，門間　公夫，坂牧　成恵，横山　知子
植田　忠彦，高橋　　巌，府川　則子，増田　智子，小松　博久
川村　眞次，丸田　里江，市川　久次 …… 179

新規市販野菜の栄養成分及びその物性
……菊谷　典久，齋東　由紀，坂牧　成恵，門間　公夫，井口　正雄
牛尾　房雄，早藤知恵子，市川　久次，新井　聡美，帯刀　敏彦 …… 185

バイオ食品添加物α-アミラーゼの品質調査
……広門　雅子，伊藤　弘一，安野　哲子，平田　恵子，植松　洋子
鈴木　助治，安田　和男 …… 189

高速液体クロマトグラフィーによる天然添加物中のN－メチルカルバメート系農薬分析
……萩原　輝彦，安野　哲子，羽石奈穂子，斉藤　和夫 …… 193

ICP発光分光分析法による食品添加物製剤中の無機塩類の分析
……安野　哲子，萩原　輝彦，羽石奈穂子，斎藤　和夫 …… 198

ポリカーボネート製ほ乳びん及び給食器からのビスフェノールＡの溶出
……船山　恵市，渡辺　悠二，金子　令子，樺島順一郎，斎藤　和夫 …… 202

食品用ポリスチレン製器具・容器包装のスチレンダイマー，トリマー残留量及び溶出量調査
……金子　令子，渡辺　悠二，船山　恵市，樺島順一郎，斉藤　和夫 …… 208

台所用抗菌スポンジタワシ中のチアベンダゾールの分析
……青柳　陽子，田口　信夫，大石　充男，鈴木　助治 …… 215

PetrifilmTM Test Kit-HEC をスクリーニングに応用した食肉からの大腸菌O157：H7の検査法
……石崎　直人，金子　誠二，宮崎　奉之 …… 220

（資料）生物農薬の１つであるBacillus thuringiensis（Bt菌）の飲用茶類中での残留（汚染）実態の検討（Ⅰ）
……庭山　邦子 …… 229

報文Ⅳ　生活環境に関する調査研究

住宅の室内ホルムアルデヒド及び揮発性有機化合物濃度の経時変化
……斎藤　育江，瀬戸　　博，多田　宇宏，長嶋　親治，竹内　正博
土屋　悦輝 …… 235

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法
……瀬戸　　博，斎藤　育江，竹内　正博，土屋　悦輝 …… 240

東京都における降下煤塵量の推移1989年から1998年まで
……大澤　誠喜，福田　雅夫，牧野　国義，関　比呂伸，栗田　雅行
大橋　則雄，渡辺　伸枝，竹内　正博 …… 245

水道水および水道水中のホウ素
……栃本　　博，高橋　保雄，中神　千穂，中川　順一，真木　俊夫 …… 249

水素化物発生原子吸光光度法による飲用水中のセレンの分析法の検討
……小西　浩之，五十嵐　剛，矢口久美子，近藤　治美，鈴木　俊也
稲葉美佐子，鈴木　助治 …… 254

生活用水からのレジオネラ属菌の検出状況（平成10年度）
……矢野　一好，保坂　三継，真木　俊夫 …… 259

水環境試料中のクリプトスポリジウムの検出方法並びに検査結果（平成９年度，10年度）
……保坂　三継，矢野　一好，眞木　俊夫，鈴木　　淳，村田　理恵
村田以和夫 …… 264

クリプトスポリジウム添加有機性懸濁質試料水からのオーシストの濃縮・精製法の検討
……村田　理恵，鈴木　　淳，村田以和夫 …… 269

報文Ⅴ　毒性に関する調査研究

酸素ストレスの四逆散連続経口与ラットの抗酸化系におぼす影響
……市川　久次，牛尾　房雄，門間　公夫，植田　忠彦，佐藤　和恵
浦野　四郎 …… 275

マウス腎皮質のミトコンドリアの機能に対するチアベンダゾール（TBZ）の影響
……藤谷　知子，多田　幸恵，米山　允子 …… 280

環境汚染物質の体内動態に関する生理学的シミュレーションモデルによる解析
……深野　駿一 …… 291

電子顕微鏡による精子観察のための基礎的条件の検討
……福森　信隆，青木　直人 …… 296

食品添加物のエームス試験における既知変異原の変異原性に対する影響（第２報）
……藤田　　博，青木　直人 …… 303

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．Ⅲ　しらこたん白抽出物
……小縣　昭夫，安藤　　弘，久保　喜一，青木　直人 …… 308

天然添加物フェルラ酸のラットにおける急性経口毒性
……多田　幸恵，田山　邦昭，青木　直人 …… 311

ヒト病態モデルマウスによる十全大補湯添加飼料投与実験
－自己免疫疾患マウス(MRL/l)における腎糸球体病変の病理組織学的検査結果
……坂本　義光，長澤　明道，矢野　範男，湯澤　勝廣，青木　直人 …… 314

報文Ⅵ　公衆衛生情報に関する調査研究

東京都衛生検査所精度管理調査における1989～1998年度の血液型検査の結果
……大石　向江，蓑輪　佳子，伊瀬　　郁，荻野　周三，川合　由華
神保　勝彦，田村　行弘，町田　勝彦，高木　　康，河野　均也 …… 321

都保健所での健康診断における検査値の実態について
……渡邉　泰男，秋場　哲哉，安部　昭子，磯貝スエ子，廣瀬　英生
前　　潔，山田　澄夫，上木　隆人 …… 326

都保健所健診における女性の貧血と鉄欠乏状況について
……磯貝スエ子，安部　昭子，廣瀬　英生，秋場　哲哉，渡邉　泰男
前　　潔，山田　澄夫，上木　隆人 …… 332

日本における自殺の精密分析
……池田　一夫，伊藤　弘一 …… 337

都保健所のインターネットによるネットワーク化
……池田　一夫，神谷　信行，伊藤　弘一 …… 345

平成10年度東京都食品衛生検査施設GLP内部点検調査報告
……荻野　周三，蓑輪　佳子，大石　向江，伊瀬　　郁，川合　由華
神保　勝彦，田村　行弘，奥澤　康司 …… 350

著書及び他誌発表 …… 355
学会発表 …… 363

CONTENTS

REPORTS I PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Epidemiological and Bacteriological Investigation on the Outbreak of Shigella sonnei Occurred at a Nursery School in Tokyo
……N. Konishi, S. Matsushita, A. Kai, J. Kusunoki and S. Morozumi …… 3

SRSV-Related Community Gastroenteritis in Infants
……K. Mori, Y. Hayashi, Y. Sasaki, Y. Noguchi, A. Nakamura, M. Nagashima,
Y. Yoshida, I. Hirata, H. Sekine, Y. Kokubo …… 9

Outbreak of Aseptic Meningitis Caused By Echovirus30 in Tokyo
……M. Hasegawa, Y. Yoshida, Y. Tabei, M. Nagashima, I. Hirata,
H. Sekine and Y. Kokubo …… 12

The HIV test result in Tokyo (1995-1998)
……K. Sadamasu, A. Nakamura , K. Mori , Y. Tabei, T. Shinkai, K. Yamazaki,
K. Monma, S. Sekine, I. Yoshida, S. Yamada, I. Hirata, H. Sekine and Y. Kokubo …… 16

Surveillance of Polio virus in Tokyo, 1998
……Y. Tabei, Y. Yoshida, M. Hasegawa, M. Nagashima, I. Hirata,
H. Sekine and Y. Kokubo …… 20

Examination of pathogenic bacteria from flies captured in a slaughterhouse
……T. Iida, M. Kanzaki, N. Hosoya, T. Miyazaki …… 24

Detection of Hepatitis A virus from clinical samples
……T. Shinkai, K. Mori, K. Sadamasu, K. Yamazaki, A. Nakamura, Y. Yoshida,
I. Hirata, H. Sekine and Y. Kokubo …… 28

A Method for Detection and Identification of Cryptosporidium muris
……J. Suzuki, R. MurataUrata, I. Murata, Y. Yanagawa, S. Morozumi …… 33

REPORTS Ⅱ PAPERS ON PHARMACEUTICAL HYGIENE

Inhibitory Effects of Thai Curcuma spp. on Mevement of Anisakis, simplex and Larvicidal Compound
……J. Suzuki, I. Murata, I. Yasuda …… 41

Technical Support of Validation Process for Pharmaceutical Factories in Tokyo
– Steroid Hormone Ointment Factory–
……K. Kishimoto, I. Yasuda, N. Miyatake, T. Moriyasu, J. Nakajima, H. Kamimura
K. Onishi, T. Maekawa, I. Sasaki and F. Miyagi …… 49

Technical Support of Validation Process for Pharmaceutical Factory in Tokyo
–Cupric Sulfate Ointment Factory–
……J. Nakajima, K. Terajima, K. Kishimoto, I. Yasuda, N. Miyatake, T. Moriyasu,
H. Miyake, H. Kamimura, K. Onishi, K. Takazawa, A. Taki, K. Kagawa and K. Akiyama …… 55

Technical Supports of Validation Process for Pharmaceutical Factories in Tokyo
—Herbal Medicines—
……T. Hamano, T. Seto, H. Sioda, I. Yasuda, H. Kamimura and K. Onishi …… 59

Simultaneous Determination of Indicative Ingredients and Restrictive Ingredients in Cosmetics by HPLC
……T. Yokoyama, K. Mori, Y. Nakamura, N. Ohnuki, Y. Matushima and T. Fujii …… 65

Simultaneous Analysis of Tar Dyes in Cosmetics by Capillary Electrophoresis
……N. Ohnuki, K. Mori, Y. Nakamura, T. Yokoyama, Y. Matushima and T. Fujii …… 70

Determination of 5-Bromo-5-nitro-1,3- dioxane in an Imported Cosmetic
……Y. Nakamura, K. Mori, N. Ohnuki, T. Yokoyama, Y. Matushima and T. Fujii …… 77

Determination of Bergapten in Fragrant Preparations
……K. Mori, N. Ohnuki, Y. Nakamura, T. Yokoyama,
Y. Matsushima and . Fujii …… 81

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXX)Studies on Metal Allergy to Ear piercings and Earrings:
the Relationship between Metal Composition and Metal Release
……H. Yamanobe, M. Miyakoda, S. Uehara, T. Kan and T. Fujii …… 85

REPORTS Ⅲ PAPERS ON FOOD HYGIENE

Studies on Determination of Carbon Monoxide in Fish Meat by GC
……M. Arimatsu, N. Ohashi, E. Amakawa, K. Kamata and S. Suzuki …… 97

Analysis of Catechins and Methylxanthins in Foods Added Tea Extracts
……C. Kobayashi, M. Nakazato, Y. Yamajima, Y. Kawai, Y. Tateishi and K. Yasuda …… 101

Hygienic Studies on Health Foods Using Dried Leaves of Plants
……M. Nakazato, H. Ushiyama, K. Yokoyama, C. Kobayashi, Y. Kawai, Y. Tateishi,
H. Ogawa and K. Yasuda …… 107

Hygienic Studies on Imported Fish Sause —Contents of Food Additives—
……M. Nakazato, C. Kobayashi,Y. Yamajima, Y. Tateishi, I. Ohno, Y. Kawai and K. Yasuda …… 113

Determination of Fungicides in Fruit Juice Coucentrates by High Performance Liquid Chromatography
equipped with the Fast Column
……H. Ozawa, M. Hirokado, A. Ibe, Y. Shimamura, K. Nakajima, K. Kimura and K. Yasuda …… 119

Simultaneous Determination of Organophosphorous Pesticide Residues in Vegetables by FPD/GC
……H. Satoh, N. Ohashi, E. Amakawa, T. Ogiwara, K. Kamata and S. Suzuki …… 124

Determination of Thifluzamide in Agricultual Products by using the Examination Method Shown in
Japanese Food Sanitation Law
……Y. Tamura, T. Nagayama, I. Takano, M. Kobayashi, M. Ito, N. Kimura,
K. Kitayama, C. Takada and K. Yasuda …… 130

X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Total Bromide in Rice
……C. Takada, I. Takano, T. Nagayama, M. Kobayashi, M. Ito, Y. Tamura,
N. Kimura, K. Kitayama and K. Yasuda …… 134

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Fruits —Apr. 1998～Mar.1999—
……M. Ito, T. Nagayama, I. Takano, M. Kobayashi, Y. Tamura, N. Kimura,
K. Kitayama, C. Takada and K. Yasuda …… 138

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organophosphorus and Organonitrogen pesticides)
—Apr.1998 ～ Mar.1999—
……I. Takano, T. Nagayama, M. Kobayashi, M. Ito, Y. Tamura, N. Kimura,
K. Kitayama, C. TakadaA and K. Yasuda …… 145

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organochlorine, N-methyl carbamate and the other pesticides)
—Apr.1998.～Mar.1999.—
……M. Kobayashi, T. Nagayama, I. Takano, M. Ito, Y. Tamura, N. Kimura, K. KITAYAMA,
C. Takada and K. Yasuda …… 151

The Contents of Cadmium, Copper and Arsenic in Rice Carried into Tokyo (Ⅱ)
—An Analysis of Examination Results from 1981 to 1998—
……H. Onozuka, T. Amemiya, K. Mizuishi, H. Yamanobe, T. Fujii and K. Onishi …… 158

Radioactive Contamination in Imported Foods(Ⅷ) — Apr.1998～Mar.1999 —
……K. Kan, H. Ushiyama, T. Shindo and K. Yasuda…… 167

Outbreaks of Food Poisoning of Chemical and Naturally Occurring Toxicants in Tokyo (ⅩⅥ) —1998—
……H. Ushiyama, K. Kan, T. Shindo and K. Yasuda…… 175

Study on Nutritional Components in Some Vegetables Produced by Organic Cultivation (Ⅱ)
……F. Ushio, Y. Saitoh, K. Monma, N. Sakamaki, T. Yokoyama, T. Ueta,
I. Takahashi, N. Fukawa, T. Masuda, H. Komatsu, S. Kawamura,
S. Maruta and H. Ichikawa …… 179

Nutrient Compositions and Physical Properties of Commercial Vegetables newly introduced in the Japanese Market
……N. Kikutani, Y. Saitoh, N. Sakamaki, K. Monma, M. Iguchi, F. Ushio, C. Hayafuji,
H. Ichikawa, S. Arai and T. Tatewaki …… 185

Survey on the Quality of Food Additive's α-Amylase Derived from Genetically Modified Organisms
……M. Hirokado, K. Ito, T. Yasuno, K. Hirata, Y. Uematsu, S. Suzuki and K. Yasuda …… 189

Analysis of N-methyl Carbamate Pesticide Residues in Natural Food Additives by High-Performance Liquid Chromatography
……T. Hagiwara, T. Yasuno, N. Haneishi and K. Saito …… 193

Determination of Inorganic Salts in Food Additive Preparations by Inductively Coupled Plasma
Atomic Emission Spectrometry
……T. Yasuno, T. Hagiwara, N. Haneishi and K. Saito …… 198

Migration of Bisphenol A from Nursing Bottles and Tableware for Meal Service Made of Polycarbonate
……K. Funayama, Y. Watanabe, R. Kaneko, J. Kabashima and K. Saito …… 202

Survey of Styrene Dimers and Trimers in Polystyrene Equipment and Packages for Food
……R. Kaneko, Y. Watanabe, K. Funayama, J. Kabashima and K. Saito …… 208

Determination of Thiabendazole for Antimicrobial Agent in Sponge Brushes Used as Kitchen Ware
……Y. Aoyagi, N. Taguchi, M. Oishi and S. Suzuki …… 215

Detection of Escherichia coli O157 from Meat using Petrifilm™ Test Kit-HEC for Screening
……N. Ishizaki, S. Kaneko, T. Miyazaki …… 220

A Survey of Residues (Contamination) of Bacillus thuringiensis (Bt), a Microbial Pesticide, in Tea and blend Tea (I)
……K. Niwayama …… 229

REPORTS Ⅳ PAPERS ON ENVIRONMENTAL HYGIENE

The Relationship between Concentration of Indoor Air Chemicals and The Age of Houses
……I. Saito, H. Seto, T. Tada, C. Nagashima, M. Takeuchi and Y. Tsuchiya …… 235

Passive Sampling and Analysis of Indoor Volatile Organic Compounds Using a Diffusive Sampling Tube and Thermal Desorption GC/MS
……H. Seto, I. Saito, M. Takeuchi and Y. Tsuchiya …… 240

Changes of the Amount of Fall Dust in Tokyo Area (1989－1998)
……M. Ohsawa, M. Fukuda, K. Makino, H. Seki, M. Kurita, N. Ohashi, N. Watanabe and M. Takeuchi …… 245

Boron in Raw Water and Finished Water
……H. Tochimoto, Y. Takahashi, C. Nakagami, J. Nakagawa and T. Maki …… 249

Study on Determination Method of Selenium in Drinking Water by Hydride-Generation Atomic Absorption Spectrometry
……H. Konishi, T. Igarashi, K. Yaguchi, H. Kondo, T. Suzuki, M. Inaba and S. Suzuki …… 254

Distribution of *Legionella* Species in Domestic Water
……K. Yano, M. Hosaka and T. Maki …… 259

Survey of *Cryptosporidium* Oocysts in Environmantal Water Samples (Apr. 1997～Mar. 1998)
……M. Hosaka, K. Yano, T. Maki, J. Suzuki, R. Murata and I. Murata …… 264

Evaluation on Several Methods of Concentration and Purification for Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts from the Water, Prepared with Organic Suspended Solids
……R. Murata, J. Suzuki and I. Murata …… 269

REPORTS Ⅴ PAPERS ON TOXICOLOGY

Effects of Oxygen Stress on the Antioxidative System in the Rat Given Shigyaku-san
……H. Ichikawa, F. Ushio, K. Monma, T. Ueta, K. Satoh and S. Urano …… 275

Effects of Thiabendazole (TBZ) on Mitochondrial Function in the Renal Cortex of ICR Mice
……T. Fujitani, Y. Tada, M. Yoneyama …… 280

Toxicokinetics of Environmental Pollutants Based on Physiological Pharmacokinetic Model
……S. Fukano …… 291

A Comparison of Basic Conditions for Electron Microscopic Observations of Spermatozoa
……N. Fukumori and N. Aoki …… 296

Modulation of Mutagenic Actibity of the Known Mutagens by Food Additives in the Ames Test (II)
……H. Fujita and N. Aoki …… 303

Effects of Natural Food Additive on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method. III. Milt Protein
……A. Ogata, H. Ando, Y. Kubo and N. Aoki …… 308

Acute Oral Toxicity of Ferulic Acid, Natural Food Additive, in Rats
……Y. Tada, K. Tayama, N. Aoki …… 311

Study on the Effect of Jyuzen-Taiho-to using Experimental Model Mice for Human Disease—Histological Findings in Renal Glomerular Lesions in Autoimmune MRL/lpr Mice
……Y. Sakamoto, A. Nagasawa, N. Yano, K. Yuzawa and N. Aoki …… 314

REPORTS VI PAPERS ON PUBLIC HEALTH INFORMATION

The External Quality Assessment for Blood Groups Tests at the Registered Clinical Laboratories in Tokyo in 1989-1998
……H. Oishi, K. Minowa, I. Ise, S. Ogino, Y. Kawai, K. Jimbo, Y. Tamura, K. Machida, Y. Takagi and K. Kawano …… 321

The Evaluation of Laboratory Value of Clinical-Biochemical Tests in Medical Care in Tama,Tokyo
……Y. Watanabe, T. Akiba, A. Abe, S. Isogai, H. Hirose, K. Mae, S. Yamada and T. Ueki …… 326

Anemia and Iron Deficiency of Female in Tama ,Tokyo
……S. Isogai, A. Abe, H. Hirose, T. Akiba, Y. Watanabe, K. Mae, S. Yamada and T. Ueki …… 332

Precise Analysis of Suicide in Japan
……K. Ikeda and K. Ito …… 337

Studies on Proper Network System of Public Health Centers in Tokyo via Internet
……K. Ikeda, N. Kamiya and K. Ito …… 345

Report of Internal Audits for GLP in 1998
……S. Ogino, K. Minowa, H. Oishi, I. Ise, Y. Kawai, K. Jimbo, Y. Tamura, K. Okuzawa …… 350

PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS …… 355
THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS …… 363

報　　文　I

感染症等に関する調査研究

REPORTS　I

PAPERS ON INFECTIOUS DISEASES AND OTHERS

Ⅰ　感染症等に関する調査研究

医学・医療技術の進歩，衛生水準の向上，国民の衛生意識の向上などにより，かつて猛威をふるった腸チフス，赤痢などの伝染病の発生は激減した．しかし，その反面MRSA，VREなど耐性菌の出現による院内感染症や弱毒菌による日和見感染症が増加の傾向を見せている．また，1970年以降，エボラ出血熱，エイズ，病原大腸菌O157等これまで知られていなかった新興感染症が少なくとも30種類以上出現するとともに，近い将来克服されると思われていた結核やマラリアなどの感染症が再び，再興感染症として注目されるなど，近年の感染症の様相は大きく変化してきている．

このような感染症の変化を踏まえて，100年来の伝染病予防法が廃止され，新たに「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（感染症新法）が制定され，1999年４月１日より施行されるに至った．感染症新法では，患者の人権という観点から入院や診断において，迅速で正確な検査が求められている．また，感染症発生動向調査と積極的疫学調査が法に盛り込まれており，衛生研究所の役割は益々重要のものとなってきている．当所でも，現在感染症新法に対応するために，検査法の開発や調査研究が進められており，その成果が期待されるところである．

本章には感染症に関する８編の論文が掲載されている．うち６編は疫学調査結果を，２編は検査法の開発・応用に関する検討結果をまとめたものである．

疫学的なものとしては，まず，1998年に東京都内の保育園や幼稚園を中心に発生したソンネ赤痢菌による集団感染事例及び小型球形ウイルス（SRSV）による集団胃腸炎事例の報告があげられる．前者では園児，家族，親戚合わせて10名の患者が確認された．患者から分離されたソンネ赤痢菌10株は，すべてコリシンタイプ６型のTC・SM・ST・NA４剤耐性菌であり，これまでに検出報告の少ない菌株であることを明らかにしている．また，プラスミドプロファイル，RAPD法，PFGE法によるDNA解析でも同一パターンであることを示した．しかし，保育園の検食及び原材料89件，調理場とペット水槽の水４件からはソンネ赤痢菌は検出されず，本事例は飲食物に起因するものではなく，患者あるいは保菌者から二次感染的に広がったものと推定している．後者は，SRSVによる小児の胃腸炎集団発生５事例について疫学調査をした報告で，いずれの事例も食中毒様事例として当所に検査依頼されたものである．通常SRSVによる食中毒は，SRSVに汚染された生カキの喫食によることが圧倒的に多い．しかし，これら５事例はいずれの場合も，生カキに起因するものではなかった．５事例うち２事例はヒトからヒトへの二次感染が疑われ，SRSVに汚染された生カキなどの食品を喫食しなくても，ヒトからヒトへの二次的な伝播で，ウイルス性胃腸炎の集団例が起こりうることが示唆されたとしている．

また，1998年はエコー30型ウイルス（E30）による無菌性髄膜炎が全国的に大流行した年でもある．東京都内における無菌性髄膜炎流行の疫学調査では，患者332名について検査を実施した．４月下旬に初めてE30が分離されてから，７月の74名をピークに12月まで合計147名（43.9%）からE30が分離された．年齢別のE30検出状況は，６歳をピークに３歳から７歳までが87%を占め，検体別にはふん便からの検出が69%と最も多く，次いで咽頭拭い液51.4%，髄液33.6%の順であったと報告している．　最近マスメディアであまり話題にされなくなったエイズではあるが，1995年から1998年の東京都におけるHIV抗体検査では，４年間で49,954件を検査し，そのうち181件（陽性率0.362%）がHIV-1抗体陽性であった．検査数は年々減少しているものの，抗体陽性数は逆に上昇の傾向にあることを明らかにしている．また，受診者数はマスメディアの影響により変動し，男女ともに20～30才代の年齢層が多く，その割合は男性では69.0%，女性では76.7%を占めていること，抗体陽性者のHIV-1サブタイプ型別では，77.3%がサブタイプＢであり，同性間感染が多いことが推察されたことも報告している．

ポリオ流行地からのポリオウイルス野生株の侵入を監視し，ポリオの流行を予防する目的で実施された東京都内の健康小児のポリオウイルス保有状況調査では，134名中8名の健康小児のふん便からポリオウイルスが分離された．分離されたポリオウイルスはすべてワクチン株由来であったが，本調査ではワクチン接種株による不顕性感染の発生がみられたことにより，ワクチン未接種者で抗体を保有していない人がポリオウイルスに感染する可能性が示唆されたとしている．その他の疫学調査としては，と畜場で捕獲したハエの病原菌保有調査がある．ハエ70匹，と畜場の下水4件を対象に病原菌検査を実施した．その結果，ハエからは大腸菌群，腸管出血性大腸菌O45，黄色ブドウ球菌及びリステリアが検出されたが，下水からは病原菌は検出されず，と畜場における病原菌の伝播はハエによる可能性が高いことを明らかにしている．

検査法の開発・応用について検討した報告としては，ウイルスと原虫に関するものをそれぞれ1編掲載している．ウイルスに関するものは，実験的に検討したA型肝炎ウイルス（HAV）の各種検査法を臨床材料からのHAV検出に応用し，その有用性を検討したものである．これまでHAVの検査では，抗原検査はほとんど実施されていないのが現状である．本研究では，PCR法，細胞培養法及びELISA法を用いて，患者ふん便30件を対象に抗原検査を行ったところ，PCR法で17件（56.7%），細胞培養法で16件（53.3%），ELISA法で8件（23.3%）からHAV抗原が検出され，HAV抗原検査にはPCR法と細胞培養法が有用であったとしている．原虫については，感染症新法で新たに対象疾病となったクリプトスポリジウム感染症の検査に関するものである．最近ヒトへの感染が報告された*Cryptosporidium muris*についての検査法を検討し，*C. parvum*の蛍光抗体検出キットで *C. muris* も検出できることを明らかにした．また，低真空走査型電子顕微鏡を用いた検査法では，5,000倍で*C. muris*のシスト壁及びスポロゾイドの微細構造を観察することにより，*C. muris*オーシストを鑑別・同定できることを報告している．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 3-8, 1999

東京都内某保育園で発生したソンネ赤痢菌による集団感染事例の疫学的・細菌学的検討

小西典子, 松下 秀, 甲斐明美,
楠 淳, 諸角 聖

Epidemiological and Bacteriological Investigation on the Outbreak of *Shigella sonnei* Occurred at a Nursery School in Tokyo

NORIKO KONISHI, SHIGERU MATSUSHITA, AKEMI KAI,
JUN KUSUNOKI and SATOSHI MOROZUMI

Keywords：ソンネ赤痢菌 *Shigella sonnei*, 集団事例 outbreak, コリシン型 colicine type, 薬剤感受性試験 antimicrobial susceptibility test, プラスミドプロファイル plasmid profile, RAPD-PCR, PFGE

緒　言

細菌性赤痢は，我が国では戦前・戦後を通じて最も重要な消化器系伝染病であり，1960年代中頃までは水系感染等をはじめとする集団事例や散発例が多発し，患者数も毎年10万人にも及ぶものであった[1, 2]．しかし下水道の普及に代表される生活環境の向上，抗生物質の開発・普及などによる予防・治療医学の進歩などに伴い，患者数は激減し，1970年代半ば頃には年間1,000人前後の患者数となった．しかし，それ以降減少傾向が止まり，横ばい，あるいは漸増傾向になった．これはこの頃より我が国の海外旅行者数が急増し始め，旅行者が旅先で感染して国内に持ち込む輸入事例が増加したためである[3]．

東京都内での細菌性赤痢の感染者は1989年以来10年間，毎年200～300人前後であり，この内約85%が輸入例，残りは海外旅行とは直接関係のない国内感染例である[3]．一方，集団発生は，東京都内では1992年に3事例確認されて以降5年間報告されていなかった[4]．しかし，1998年に2事例の集団発生があった．これらはいずれも保育園で発生したもので，そのうちの1事例では園児，家族，親戚合わせて10名の患者が確認された．この事例について，その発生状況と分離株の細菌学的・分子疫学的解析成績を報告する．

材料と方法

1．供試材料

本事例患者10名より分離されたソンネ赤痢菌10株を供試した．これらの菌株は担当保健所で分離後，当研究所に送付されたものである．また感染源調査のため保育園で提供された給食の検食及び原材料89件，調理場の水1件，ペット飼育用水槽の水3件についても検査を行った．

2．食品及び水の赤痢菌検査

検食及び原材料45 gを滅菌ストマッカー袋に秤りとり，リン酸緩衝生理食塩水を等量加えストマッカー処理を行い試料乳剤とした．調製した試料をSS寒天平板2枚に直接塗抹後，37℃一晩好気培養した．また増菌培養として，試料5 mlを2倍濃度に調製したノボビオシン加Shigella broth[5]（通常濃度は1L当たりTryptone 20g, K_2HPO_4 2g, KH_2PO_4 2g, NaCl 5 g, ブドウ糖1 g, Tween 80 1.5ml, ノボビオシン5 mg, pH 7.0±0.2）5 mlに加え，44℃一晩嫌気培養を行なった後，SS寒天培地2枚に分離した．出現した集落について常法[6]により赤痢菌を同定した．水槽の水には，2倍濃度のノボビオシン加Shigella brothを等量加え，食品と同様の培養，分離を行った．

3．生化学的性状試験

赤痢菌の各種生化学的性状試験は常法[6]に基づいて実施した．アミノ酸分解試験はメラーの培地（DIFCO）に各アミノ酸を1%の割合で加えたものを用い，37℃で4日間観察した．また，糖分解試験はアンドレイドペプトン水（OXOID）に各糖を1%の割合で加えたものを用い，37℃で14日間観察した．

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

4．コリシン型別試験

ソンネ赤痢菌分離株のコリシン型別は，13種類の指示菌を用いてAbbot & Shannonの画線培養法[7]に準拠し実施した．

5．薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会（NCCLS）の抗菌薬剤感受性試験実施基準[8]に基づき，ディスク法（センシディスク，BBL）で実施した．供試薬剤はクロラムフェニコール（CP），テトラサイクリン（TC），ストレプトマイシン（SM），カナマイシン（KM），アンピシリン（ABPC），スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤（ST），ナリジクス酸（NA），ホスホマイシン（FOM），ノルフロキサシン（NFLX）の9薬剤である．

6．プラスミドプロファイル

分離された菌株のLB培地（ダイゴ）37℃，一夜培養菌液からKadoらの変法[9]に準じてプラスミド抽出した．抽出したプラスミドを0.7%アガロースゲル（LO3，TAKARA）.でTBE（Tris-borate EDTA）bufferを用いて100V，120分電気泳動後，エチジウム・ブロマイド染色を行い，紫外線照射下，写真撮影した．

7．Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）法によるDNA解析

森田ら[10]が報告したプライマーRPKM-1（5'-AAGCCGGTGAGTTATCTGGCC）又はRPKM-2（5'-CGTAACCGGACTGGGGCGTGT）を用いRAPD法を行った．反応は前熱変性（94 ℃ 5 min）後，94℃，42℃，72℃各30秒を35サイクルで行った．増幅産物は2.4%アガロースゲル（LO3，TAKARA）でTBE bufferを用いて100 V30分電気泳動後エチジウム・ブロマイド染色を行い，解析した．

8．パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法によるDNA解析

Torypticase Soy Broth（BBL）で37℃，18～20時間培養した菌を用い，アガロースブロックを作製した[11]．次いで溶菌，DNA抽出，除蛋白，Proteinase Kの不活化を行い，PFGE分析用DNAブロックとした．得られたDNAブロックを制限酵素*Xba* Iで37 ℃4時間処理した後，1%アガロース（PFC Agarose，Bio-Rad）でTBE（× 0.5）用いてCHEF Mapper（Bio-Rad）でPFGEを行った．泳動条件は6 V/cm，パルス角度120°，スイッチタイム0.47秒～44.69秒（リニア）である．泳動後，エチジウム・ブロマイド染色を行い紫外線照射下，写真撮影をして解析した．

成　績

1．発生状況

本事例は1998年8月14日～9月9日にかけて，園児100名，職員34名の都内某保育園で発生した（表1）．菌検出者は合計10名で，その内訳はT組（1歳児クラス）2名，S組（2歳児クラス）2名，5歳児クラス1名及び園児関係者5名であった．園児関係者の中には別の保育園に通う園児とその家族が含まれている．

表1．都内某保育園で発生したソンネ赤痢菌による集団事例

発生年月日	1998年 8月14日～9月9日		
発生場所	保育園	園児数	100名
		職員数	34名
菌検出者数	T組（1才児クラス）		2名
	S組（2才児クラス）		2名
	5才児クラス		1名
	園児関係者		5名

発生状況は図1に示したとおり，園児A（T組）が8月14日から水様性の下痢症状を訴た後，24日にソンネ赤痢菌が検出された．そして8月28日現在T組14名中8名，S組17名中3名に下痢，軟便が認められ，検査の結果，更にT組のB及びS組のC，Fからソンネ赤痢菌が検出された．この内，園児A，Bの家族は健康であったが，Cの家族であるD（同保育園5才児クラス）とその母親Eは下痢を呈した後，その後の検査でソンネ赤痢菌が検出された．また，Fの両親（G，H）からも同菌が検出された．一方，別の保育園に通う園児Iとその母親Jからソンネ赤痢菌が検出されたことが，東京都衛生局に報告された．その後の調査でIとJはC，D，Eの親戚であり，8月21日に接触があったことが判明した．最終的には9月2日までに合計10名からソンネ赤痢菌が検出された．

菌検出者の主症状は，水様性下痢1名，下痢7名，軟便2名で，重症者はいなかった．

2．食品及び水の赤痢菌分離成績

8月10日～22日までに保育園で給食として提供された食事の検食及び原材料89件，調理場内の水1件及びペット飼育用水槽の水3件を検査した結果，そのいずれからも赤痢菌は検出されなかった．

3．分離菌株の諸性状

1）生化学的性状

10人から分離されたソンネ赤痢菌10株の生化学的性状は表2に示したとおりである．オキシダーゼ，VP，シモ

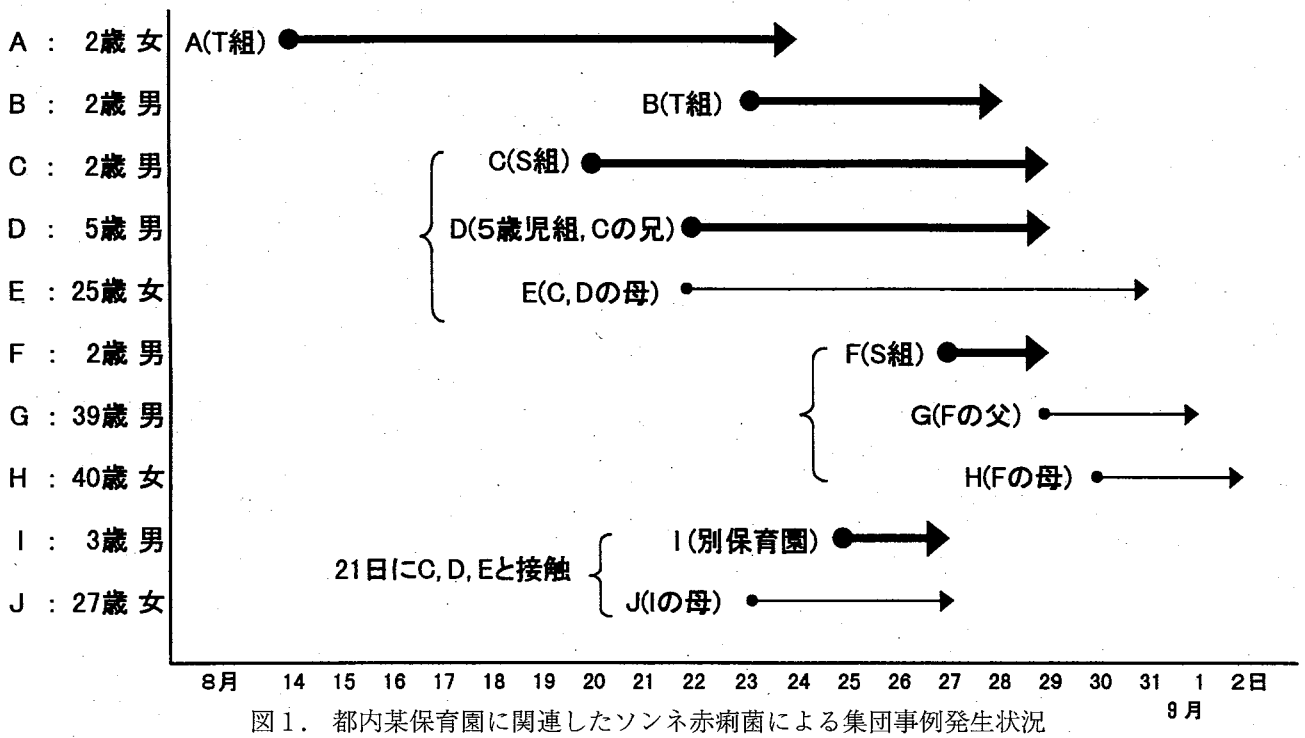


図１．都内某保育園に関連したソンネ赤痢菌による集団事例発生状況
有症者／在籍者数：T組　８名／14名，　S組　３名／17名
●：発病日，▶：菌検出日

表２．集団事例由来ソンネ赤痢菌10株の生化学的性状

性　　状	陽性%	性　　状	陽性%
オキシダーゼ	0	乳糖	100 (5-11)
VP	0	マンニトール	100 (1)
クエン酸(クリステンゼン)	0 (7)	白糖	50 (6-14)
クエン酸(シモンズ)	0 (7)	サリシン	0 (14)
酢酸塩	0 (7)	ズルシトール	0 (14)
粘液酸	0 (14)	イノシトール	0 (14)
マロン酸	0 (2)	アドニトール	0 (14)
インドール(SIM)	0	ラフィノース	100 (4-8)
H_2S(TSI)	0	ソルビトール	0 (14)
ウレア（クリステンゼン）	0 (7)	アラビノース	100 (1)
PPA(SIM)	0 (2)	ラムノース	100 (4-12)
リジン	0 (4)	キシロース	0 (14)
オルニチン	100 (1)	トレハロース	100 (1)
アルギニン	100 (4)	イヌリン	0 (14)
ONPG	100	グリセロール	100 (4-7)
運動性	0	セロビオース	0 (14)
ブドウ糖	100 (1)	マルトース	100 (2)
ブドウ糖(ガス)	0 (14)	マンノース	100 (1)

（　）：最終判定までの培養日数

ンズのクエン酸，酢酸塩，粘液酸，ウレアがいずれも陰性，アミノ酸はリジン陰性，オルニチン，アルギニンは陽性であり，典型的なソンネ赤痢菌の生化学的性状であった．糖の分解性では，19種類のうち白糖で５株が遅分解，５株が陰性であったことを除くと，他はすべて一致していた．

2）コリシン型

分離されたソンネ赤痢菌10株のコリシン型はいずれも近年の分離株では出現頻度の高い６型であった（表3）．

3）薬剤感受性

薬剤感受性試験の結果，10株すべてがTC·SM·ST·NAの４薬剤に耐性，その他の５剤に対しては感受性であった（表３）．

表3．集団事例由来ソンネ赤痢菌10株の分子疫学的解析成績

No.	薬剤耐性パターン*	コリシン型	プラスミドプロファイル	RAPD	PFGE
A	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
B	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
C	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
D	TC·SM·ST·NA	6	A´	1	I
E	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
F	TC·SM·ST·NA	6	A"	1	I
G	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
H	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
I	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I
J	TC·SM·ST·NA	6	A	1	I

＊供試薬剤：CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFLX

4）プラスミドプロファイル解析

分離された10株についてそのプラスミドプロファイルを調べた結果，いずれも約＞200，11.5，6.4，3，2.3 kbのプラスミドを保有しており，ほぼ一致したパターンを示した（写真1，表3）．しかし園児D由来株（No. D）は約90kbを，園児F由来株（No. F）は約135kbのプラスミドを保有している点で他の株と一部異なっていた．なお，同年に埼玉県及び東京都内（八王子）で発生した集団事例との関連を調べる目的で，由来株のプラスミドプロファイルを比較した結果，本事例由来株とは明らかに異なっていた．

5）RAPD法によるDNA解析

分離された10株について，RAPD法によるDNA解析を行った結果，プライマーRPKM-1，RPKM-2のいずれを用いて検討した場合も全株が一致した．プライマーRPKM-1で解析した結果を写真2および表3に示した．本事例由来株は，プラスミドプロファイルと同様に，埼玉県及び八王子集団事例由来株とは全く異なっていた．

6）PFGE法によるDNA解析

分離された10株のPFGE法によるDNA解析では，全株が同一パターンを示した（写真3，表3）．しかし，埼玉県及び八王子集団事例由来株や1992年に都内で発生した集団事例由来株とは異なっていた．

考　察

過去10年間（1989年～1998年）の細菌性赤痢の発生状況[12]をみると，毎年全国で約1,000人前後，東京都でも200～300人前後の患者の発生がある．そのほとんどがアジア地域（インド，インドネシア，タイ等）で感染した海外感染例であり，国内感染例は15%前後を占めるのみであった．しかし，それまで横ばいあるいは漸増傾向にあった患者数が1998年には全国で1,597名報告され，

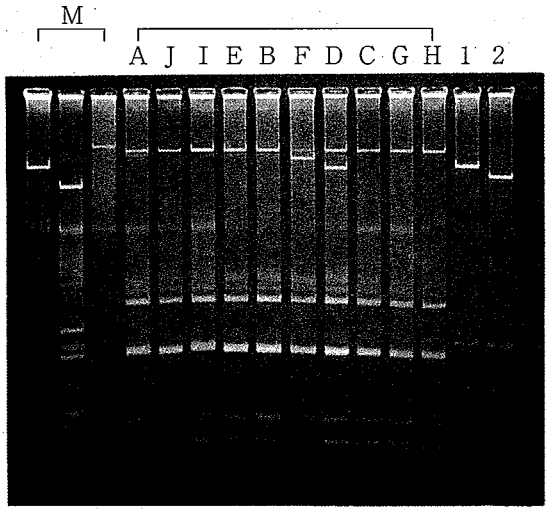


写真1．プラスミドプロファイル
A～H　本事例由来株
1　埼玉県集団事例由来株
2　東京都（八王子）集団事例由来株

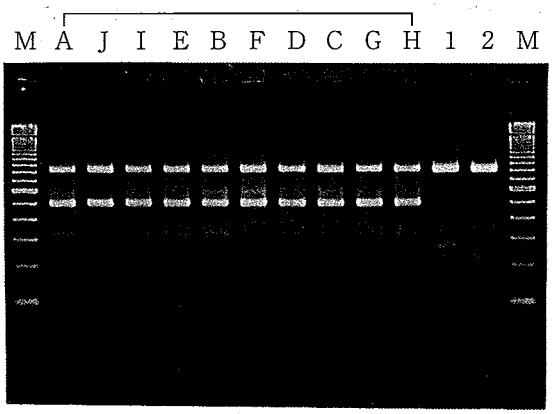


写真2．RAPD法による解折（プライマー：RPKM－1）
A～H　事例由来株
1　埼玉県集団事例由来株
2　東京都（八王子）集団事例由来株

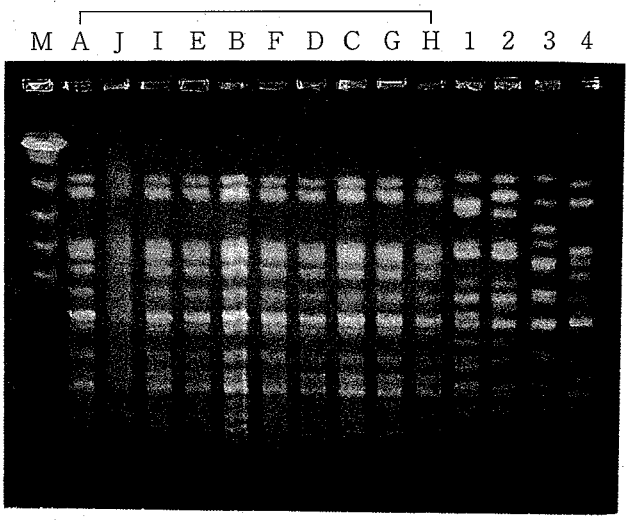


写真3．ＰＦＧＥによる解折
A～H　事例由来株
1　埼玉県集団事例由来株
2　東京都（八王子）集団事例由来株
3　1992年集団由来株（92－272）
4　1992年集団由来株（92－356）

1996年の1,063名，1997年の1,112名と比べて1.5倍の増加であった．特に国内感染例の著しい増加が目立った．国内で発生した集団例をみても1996年には2件，1997年には1件報告されたのみであったが，1998年は9例報告されている[13]．1998年に発生した9事例の原因施設は保育園が3例と最も多く，次いで飲食店が2例，旅館，養護施設，大学，不明が各1例であった．過去10年間（1985年～1994年）の統計[14]でも国内集団事例35件中，幼稚園・保育園及び小学校での発生が16件，養護あるいは福祉施設が5件，宿泊施設関連及び飲食店関係が各2件，地域発生，その他の発生が10件であることから，幼稚園・保育園・養護施設での集団発生が相変わらず多い事が分かる．腸管出血性大腸菌感染症[15]も，保育園等で多く発生しており，保育園における感染症予防対策が今後の大きな課題である．

1998年に発生した9集団事例[13]の原因菌の血清型はソンネ赤痢菌が7例で主体であるが，フレキシネル3a，フレキシネル2aによるものもそれぞれ1例あった．感染源は長崎市の大学で発生した事例で井戸水と推定された以外はすべて不明であり，感染源の特定は依然として困難である．

本事例は8月14日～9月9日にかけて発生し，ソンネ赤痢菌が合計10名から検出された．本菌検出状況をみると，検出者は①保育園の中で複数のクラスにまたがっている．②園児の家族からも同菌が検出された．③本保育園園児の従兄弟で別の保育園に通う園児とその家族からも同菌が検出された．という特徴があった．そこで感染源と発生状況を追求するために疫学マーカーを用いた疫学解析を行った結果，分離菌株の糖分解性とプラスミドプロファイルでは菌株による差が少し見られたが，コリシン型，薬剤感受性，RAPD-PCR法，PFGE法ではすべて同一パターンであり，検出された菌株は同一の起源であることが推定された．

本事例由来の薬剤耐性パターンはTC・SM・ST・NAであった．著者らが調べた成績[16]では，過去8年間に分離した国内事例由来ソンネ赤痢菌94株中84株（89.4%）がいずれかの薬剤に耐性であったが，本事例と同じ4剤耐性パターンを示した株は，2株（共に1996年分離株）のみであった．また，輸入事例由来株では247株中211株（85.4%）が耐性株であったが，同一パターンは2株（1992年インド，1996年香港旅行者より分離）のみであった．この様に本事例由来株の薬剤耐性パターンを示す株は過去にも少なく，特徴あるものであった．

コリシン型別法は，ソンネ赤痢菌を細分類するのに有効な方法であり，現在13種類の指示菌で20型に型別されている．著者らのこれまでの成績[16]では国内事例由来株では8型（29.8%），O型（24.5%），6型（22.3%），輸入事例由来株では6型（31.4%），O型（21.4%），8型（16.4%）の検出頻度が高い．本事例由来株のコリシン型は6型であり，国内事例での検出頻度は3位であるが，輸入事例では最も多く検出される型であった．薬剤耐性パターンやコリシン型から推定すると，本事例由来株の起源は海外である可能性も否定できない．

本集団事例の発生状況をみると初発患者は8月14日であったが，感染源調査のため実施した保育園の検食や食材（8月10日～22日分）及びペット飼育用水槽の水から本菌は検出されなかった．しかし，各種の疫学マーカーを用いて疫学解析を行った結果，全株が同一の起源に由来するものと考えられ，更に同菌の患者が保育園の近隣の住民等から報告されていないことから考察すると，本事例は飲食物を介してではなく，園内の患者あるいは保菌者からの接触感染により園児およびその家族等へ二次感染的に広がっていったものと推定された．しかし，初発患者の感染源は不明であった．

赤痢菌検査の問題点としては，本菌のための優れた増菌培地がこれまで報告されていないことである．今回食品等の検査に霜鳥ら[5]が報告したノボビオシン加 Shigella broth を使用したが，食品・水から赤痢菌を検出することはできなかった．今後，輸入食品，特に輸入魚介類による本菌感染症も危惧され[4]，十分に監視する必要があるため増菌培地は更に開発する必要がある．

1999年4月1日「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下，新法と略）が施行された．新法では，感染症対策に対して大幅な見直しが行われ，細菌性赤痢は二類感染症に分類された．新法の基本概念の1つに，人権への配慮が詠われている．従来の伝染病予防法では，赤痢に対する患者の隔離や消毒等の防疫措置が徹底して行われていたが，新法では大幅に緩和されている．それらの変更が二次感染を拡大させる可能性も否定できない．また海外帰国者が持ち込む輸入感染症に関する検疫所通報も廃止され，受診は患者自身の自主的な申告に委ねられている．これら新法の措置による影響を今後注意深く監視していかなければならない．

謝　辞　本事例の疫学調査は，墨田区衛生部，関係保健所および東京都衛生局で，また患者便の検査は関係保健所で実施された．関係各位に深謝致します．

本研究の概要は第73回日本感染症学会総会（1999年3月）で発表した．

文　献

1）大橋　誠：医学のあゆみ，**113**, 624-625, 1984.

2）松下　秀，工藤泰雄：臨床検査, **36**, 843-847, 1992.

3）松下　秀，工藤泰雄：モダンメディア，**44**, 312-320, 1998.

4）山田澄夫，太田建爾，尾畑浩魅，他：感染症学雑誌，**67**, 1183-1189, 1993.

5）霜鳥翔一，小島夫美子，東島弘明，他：感染症学雑誌，**64**, 1337-1344, 1990.

6）厚生省監修：微生物検査必携，細菌・真菌検査，第3　版，1987，日本公衆衛生協会，東京.

7）Abbot, J.D & Shannon, R.：*J. Clin. Path*，**11**，71-77, 1958.

8）National Commitee for Clinical Laboratory Stndards：Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests，5th ed，Approved Standerd, vol. 13, No.24, 1993, NCCLS, Villanava.

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

10）森田耕司，柴田幹良，伊藤健一郎，他：日本細菌学雑誌，**53**, 271, 1998.

11）日本細菌学会教育委員会編：細菌学技術叢書12, 細菌性病原因子研究の基礎的手技と臨床検査への応用，1993，菜根出版，東京.

12）厚生省大臣官房統計情報部編集：伝染病統計，1989～1996，厚生統計協会，東京.

13）国立感染症研究所：細菌性赤痢1996～1998，病原微生物検出情報，20(3), 1999.

14）感染性腸炎研究会：日本の感染性腸炎Ⅱ, 1997，菜根出版，東京.

15）甲斐明美，工藤泰雄：診断と治療，**86**, 1013-1017, 1998.

16）松下　秀，小西典子，柳川義勢，他：感染症学雑誌，**73**, 414-420, 1999.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 9-11, 1999

SRSVの関連した小児における集団胃腸炎事例について

森　功次*, 林　志直*, 佐々木　由紀子*, 野口　やよい*, 中村　敦子*,
長島　真美*, 吉田　靖子*, 平田　一郎*, 関根　大正**, 小久保　彌太郎**

SRSV-Related Community Gastroenteritis in Infants

KOHJI MORI, YUKINAO HAYASHI, YUKIKO SASAKI, YAYOI NOGUCHI, ATSUKO NAKAMURA,
MAMI NAGASHIMA, YASUKO YOSHIDA, ICHIRO HIRATA, HIROMASA SEKINE, YATARO KOKUBO

Keywords：小型球形ウイルス：Small Round Structured Virus(SRSV), ノーウォーク様ウイルス：Norwalk-Like Viruses(NLVs). 集団胃腸炎事例：Community gastroenteritis,嘔吐：Emesis,小児：Infant

はじめに

これまで，毎年冬季になると原因不明の食中毒や胃腸炎が多発してきた．その病原体の解明が，数多くの研究者によってなされ，病原体の主体は小型球形ウイルス(Small Round Structured Virus：SRSV)であることが明らかとされてきた。厚生省は1997年５月31日，食品衛生法施行規則の一部改正を行い，食中毒原因物質として，新たにこのSRSVを追加した．

SRSVによる胃腸炎症状は，通常感染して１～２日後に吐き気と嘔吐から始まり，続いて激しい下痢，腹痛が現れる．多くは治療をしなくとも３～５日位で自然治癒し，予後は良好である．その感染経路は従来の報告例においては生カキ等の二枚貝の喫食によることが圧倒的に多い[1) 2)]．

当研究科では食品衛生法の改正を受けて，1997年11月より食中毒発生時のSRSV検査を実施し，1997年度は検体搬入のあった食中毒様事例の約80%から，特にカキ関連事例では約90%からSRSVが検出されたことを報告してきた．今回は1998年11月から12月にかけて，東京都内の幼稚園や保育園を中心に小児の胃腸炎集団発生が5事例みられたので，各事例の概要とその検査成績を報告する．なお，小型球形ウイルスの学名がノーウォーク様ウイルス（Norwalk-Like Viruses：NLVs）に命名されることがほぼ決定しているが，本報ではSRSVと略称する．

Table 1. Number of SRSV detection on community outbreak cases

Case	Number of specimen			Number of detection		
	Patient	Healthy	Food	Patient	Healthy	Food
1	14	0	80	14	0	8*
2	34	11	7	31	4	0
3	21	16	16	15	4	0
4	91	41	0	53	18	0
5	18	11	10	15	6	0
Sum	178	79	113	128	29	8

*：devil's-tongue jelly, apple, greens (twice), young sardine, chicken, chinese cabbage and fried been curd

材料および方法

検査材料

検査に供試した材料は以下のとおりである．

事例１：患者糞便14件，食品80件

事例２：患者糞便34件，非発症者糞便11件，食品７件

事例３：患者糞便25件，非発症者糞便17件，食品22件

事例４：患者糞便91件，非発症者糞便41件

事例５：患者糞便18件，非発症者糞便11件，食品10件

検査方法：SRSVの検出は既報[3)]に従い，スクリーニング試験としてポリメラーゼ領域を対象としたRT-PCR法を用いた．またPCR後の電気泳動によりSRSVに特異的な位置にバンドが出現した場合，確認検査としてドットハイブリダイゼーションによりウイルス遺伝子の確認を行った．

* 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, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
** 同微生物部

事例の概要および検査結果

各事例における発症者数とSRSVの検出状況をTable1に示した.

事例１：新宿区内の保育園において11月20日に開催された行事で提供された食品（おでん，おにぎり，みそ汁等）を喫食した園児，職員が20日夜から翌21日早朝にかけて嘔吐，下痢，腹痛等の症状で園児，職員合わせて14名が発症し，うち園児１名が入院した．その後の調査で，16日には発症者がみられており，24日までの発症者は園児57名中25名，職員16名中６名であった（Fig.1）．患者糞便14件と行事食ならびに20日以前の給食の食材80件について検査を行ったところ，患者糞便では14件中14件からSRSVが検出された．食品については，行事食食材の油揚げ，白菜から、また行事以前の17～19日の給食食材では，こんにゃく，りんご，青菜，しらすおよび鶏肉の合計８食材からSRSVが検出された.

事例２：江戸川区内の幼稚園において11月27日に園児の欠席者数が急増した（26日37名，27日113名）．欠席理由として発熱，吐き気，腹痛などの症状を呈したものが多くみられた．共通食である給食は11月24日がハヤシライス，25日がスパゲッティなどであった．発症者は園児425名中78名，職員23名中３名である（Fig.2）．患者糞便34件，非発症者糞便11件および共通食７件について検査を実施したところ，患者糞便34件中31件および非発症者糞便11件中４件からSRSVが検出された．食材７件からはSRSVは検出されなかった.

事例３：豊島区内の保育園において12月６～11日にかけて園児85名中28名，職員25名中２名が嘔吐，下痢等の症状を呈して発症した．共通食である給食は12月３日がやきそば，４日が銀だら，５日がおかめうどん，７日がうまに丼，８日がおにぎりなどであった（Fig.3）．患者糞便21件，非発症者糞便16件および食材22件について検査を行ったところ，患者糞便21件中15件および非発症者糞便16件中１件からSRSVが検出された．共通食である給食食材22件からはSRSVは検出されなかった.

事例４：板橋区内の幼稚園において12月12，13日にかけて園児が60名程度嘔吐，下痢，発熱等の症状を呈して医療機関を受診しているとの届出があった．疫学調査の結果，９日から発症者がみとめられており，14日までの発症者は園児204名中146名であった（Fig.4）．この幼稚園は各家庭で調理された弁当を持参するため、園児に共通食はない．患者糞便91件および非発症者糞便41件について検査を実施したところ，患者糞便91件中53件から，非発症者糞便41件中18件からSRSVが検出された.

事例５：太田区内の小学校において12月18日に生活科の授業として調理実習（卵焼き、サラダなど）を行ったクラスで18日午後から19日にかけて36名中25名が嘔吐，下痢等の症状を呈して発症した．患者糞便18件，非発症者糞便11件および食品10件について検査したところ，患者糞便18件中10件および非発症者糞便11件中６件からSRSVが検出されたが，食品からはSRSVは検出されなかった.

考　　察

症状の分布：SRSVによる小児の胃腸炎においては，主要な症状が嘔吐であるという報告がなされている[1]．成人が発症者の大半をしめる97年11月から98年３月における食中毒様事例においては，主要な症状は下痢72.8%、吐き気が67.8%であった．それに対し今回の小児に関連した５事例では嘔吐が最も多くみられ（88.6%），次いで発熱（51.8%）であった．成人に多くみられた下痢症状は小児においては成人の約半数の38.6%でしかみられず，これまでの報告と一致していた（Fig.6）.

感染経路の検索：今回の５事例はいずれの事例も生カキに関連するものではなかった．これまでの報告では

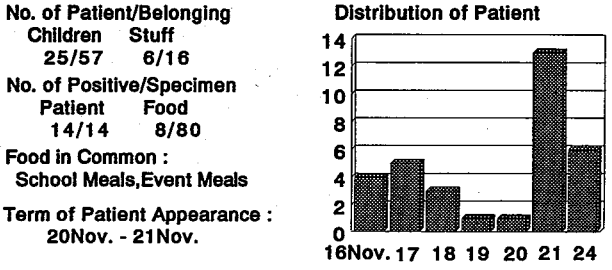


Fig.1. Status of Case 1

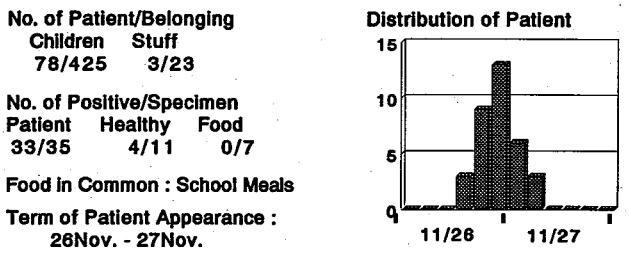


Fig.2. Status of Case 2

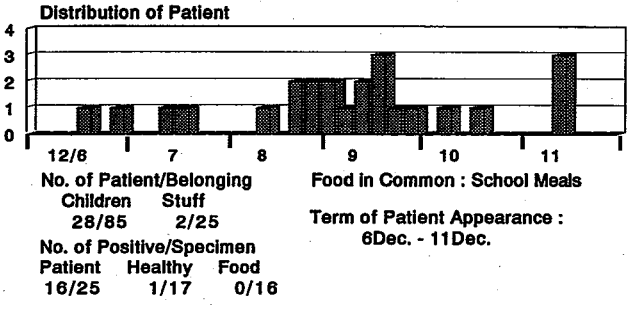


Fig.3. Status of Case 3

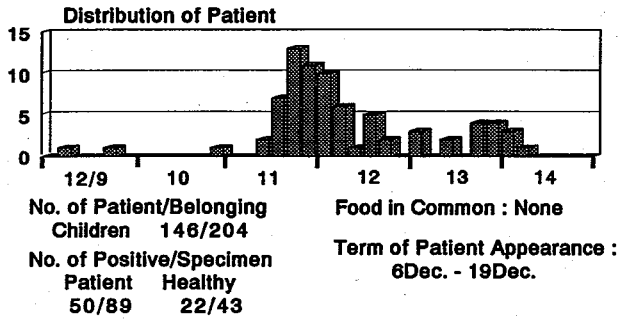


Fig.4. Status of Case 4

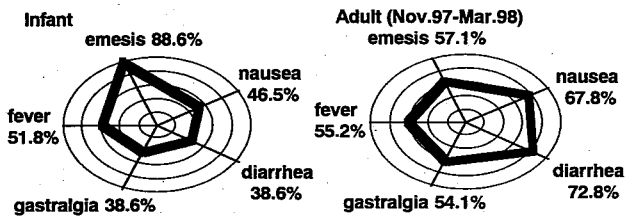


Fig.6. Distribution of Symptoms

SRSVの集団胃腸炎の発生は，生カキの喫食に起因する例が圧倒的に多い．また感染様式もすでにSRSVに汚染された食品を喫食することにより起こることが主で，この場合喫食から発症にいたる時間は１～２日であり，一峰性のピークがみられる．SRSVの場合ピークは喫食後37.1時間である．

事例２と５では，共通食からSRSVは検出されていないが発症時間が１～２日，患者発生に一峰性がみられることから，この2事例の感染は，前述の感染様式によることが推定された．

事例１の場合は，当初，園内行事の翌21日早朝から発症者がみられ，患者および行事食からSRSVが検出されたことから，園内行事食による事例と考えられた．しかし，その後の調査で16日には発症者がみられ，20日以前の行事以前の食材からもSRSVが検出されたことから，SRSV保有者が食品を汚染し，その食品を喫食したヒトが発症したという感染経路が推察された．

事例３は共通食からはSRSVは検出されず，発症者は12月８，９日にやや集中しているものの６日から11日と長期にわたってみられたことから，ウイルス保有者から

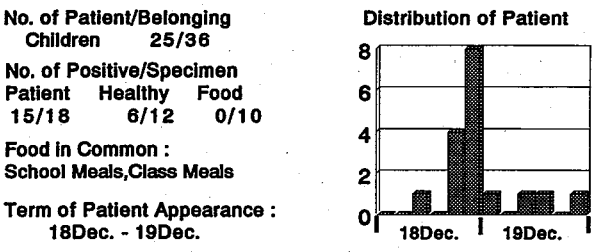


Fig.5. Status of Case 5

他のヒトへの感染が考えられ，ヒトからヒトへの２次的な感染による集団事例と推察された．また事例４の場合も，発症者は11日に30名程度のピークがみられるが，この幼稚園は各家庭で調理した弁当を持参するため園児の共通食がないこと，発症者のみられた期間が12月６日から19日と長いこと，ピークの収束が遅いことなどから，ヒトからヒトへの２次的な伝播が考えられる例であった．

今回，食品については113件を対象にSRSVの検査を実施したが，そのうち事例１の８件からSRSVが検出されただけで，その検出率は低率であった．

現在，食品からのウイルス検出法には標準化された方法がなく，試験機関によって検査法が異なっているのが現状である．食品からの原因物質を究明することは感染源や感染経路等の疫学解析をするためには不可欠であり，一日も早い食品からのウイルス検査法の開発が望まれる．

まとめ

- 1998年11～12月に発生した小児の集団胃腸炎５事例はいずれも生カキが関与するものではなかった．
- ヒトからヒトへの２次感染が疑われる集団胃腸炎が２事例認められた．
- 小児における症状の分布は，集団例においても従来の報告どおり嘔吐が主要な症状であった．

参考文献

1）関根整治，林志直，安東民衛他：東京衛研年報，**43**, 974-982, 1992
2）安東民衛：モダンメディア，**36**, 16-38, 1990
3）佐々木由紀子，中村敦子，門間公夫他：東京衛研年報，**49**, 12-16, 1998

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 12-15, 1999

東京都におけるエコー30型ウイルスによる無菌性髄膜炎の流行について

長谷川 道 弥*, 吉 田 靖 子*, 田部井 由紀子*, 長 島 真 美*,
平 田 一 郎*, 関 根 大 正**, 小久保 彌太郎**

Outbreak of Aseptic Meningitis Caused By Echovirus30 in Tokyo

MICHIYA HASEGAWA*, YASUKO YOSHIDA*, YUKIKO TABEI*, MAMI NAGASHIMA*,
ICHIROU HIRATA*, HIROMASA SEKINE** AND YATAROU KOKUBO**

Keywords：無菌性髄膜炎aseptic meningitis, 流行Outbreak, エコー30型ウイルスechovirus 30

緒　　言

無菌性髄膜炎は夏期に多く流行する中枢神経系のウイルス感染症で，毎年のようにその規模や起因ウイルスを変えて発生している．同疾患は主に小児にみられ，重傷化することなく，予後は良好であるが，脳炎を併発することもあるので軽視することはできない[1]．起因ウイルスとしては，主としてエンテロウイルス（特にコクサッキーウイルス，エコーウイルス）であるが，風疹，水痘，ヘルペスなどの流行時には，これらに関連した髄膜炎が発生している．中でもエコーウイルス30型（以下E30）は髄膜炎を起こしやすいウイルスの一つとして知られている．

東京都においてはE30に起因する髄膜炎は1991年の流行時に初めて確認された．[2] その後の発生は散発例のみであったが，[3] 1998年４月下旬より２回目の大流行がみられたので報告する．また，同時期に，集団風邪が疑われていた小学生から，E30が分離された事例や，家庭内におけるE30の不顕性感染事例についても併せて報告する．

材料と方法

１）検査材料

検査材料は1998年度に東京都の感染症発生動向調査事業の検査定点を受診した無菌性髄膜炎患者および髄膜炎症状を呈した患者332人から採取したふん便（87検体），咽頭拭い液（109検体），髄液（292検体）である．

集団風邪事例での検体は，患者からの急性期，回復期の血清10検体及びうがい液５検体である．

家族内感染事例における材料は，ふん便４検体，咽頭拭い液４検体，髄液１検体，である．

２）ウイルス検査法

検査は，まずスクリーニング試験としてnested-PCR法を用いて遺伝子学的診断を行い，それと並行して組織培養法によるウイルス分離試験を実施した．

３）遺伝子学的診断

検体材料からの遺伝子の抽出については，既報[4] に従った．すなわち，咽頭拭い液500μlに24%polyethlenglycol/4%NaCl（以下PEG）250 μlを加え，４℃で一晩放置した．これを12,000rpm，４℃にて30分遠心し，沈査を滅菌蒸留水で再浮遊し（以下PEG沈殿），遺伝子学的診断材料とした．10%ふん便検体もPEG沈殿し，同様に遺伝子学的診断材料とした．髄液については，そのまま使用した．RNA抽出については市販の凝集分配法による拡散抽出剤であるセパジーンRVR（三光純薬）を用い，供試RNAとした．

Nested-PCRは，エンテロウイルスについては1stPCRにプライマーセット5’ Non code領域のE1とE2（529bp）を使用し，2nd PCRのプライマーセットも同領域のE3とE4を使用した．PCR条件はどちらも97℃ １分，35℃２分，72℃２分のサイクルで行った．その他ムンプスウイルス，アデノウイルス，インフルエンザウイルス,EBウイルス，ヒトヘルペスウイルス６型（HHV6），帯状疱疹ウイルス（VZV），単純ヘルペスウイルス（HSV）に

＊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

ついてもPCR法を実施した.

4）ウイルス分離試験

咽頭拭い液はペニシリン・ストレプトマイシン液を最終濃度500 Uになるように加えて分離材料とした. また, ふん便は, Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) で10%乳剤とし, 4℃下で3,000rpmにて20分間遠心した後, 上清に前述の抗生物質を同様に加えてウイルス分離材料とした. 髄液はそのまま使用した.

ウイルス分離には, HeLa, Hep-2, RD-18Sの各細胞を用いた. 上記分離材料をそれぞれの細胞に接種して4代継代培養を行い, その間毎日顕微鏡にて細胞変性効果(以下CPE) の確認を行った. CPEが認められなかった場合をウイルス分離陰性とし, CPEが認められた場合には型別同定中和試験を行った. この試験には市販のエンテロウイルスプール血清と国立感染症研究所から分与されたエコーウイルスプール血清 (以下EP95) とを使用し, マイクロタイター法により行った.

5）患者血清のE30に対する中和抗体の測定

患者ペア血清を4倍に希釈して, 56℃30分非働化した. これをさらに2倍段階希釈を行った血清に100TCID 50/25 μlのウイルスを加え, 37℃60分の中和反応を行った. 反応液をRD18S細胞に接種し, CPEを抑制した最高血清希釈倍数を中和抗体価とした

結　果

1）無菌性髄膜炎患者検体の遺伝子学的診断成績

エンテロウイルスをはじめとする前述の各種ウイルスについてPCR法を行ったところ, 表1に示すように332名の患者のうち212名 (63.9%) からエンテロウイルスをはじめとして8種のウイルス遺伝子を検出した.

その内訳は, エンテロウイルスが190名 (57.2%) と最も多く, 次いでムンプスウイルス10名, アデノウイルス5名, インフルエンザウイルス3名, およびEBウイルス3名, HHV 6, HSV, VZVがそれぞれ1名であった. エンテロウイルスは7月の95名をピークに4月から12月まで毎月検出された.

表1. 無菌性髄膜炎患者の月別遺伝子学的診断成績 (1998年4月－12月)

PCR検査結果	4月 n=18	5月 n=16	6月 n=70	7月 n=135	8月 n=30	9月 n=15	10月 n=24	11月 n=15	12月 n=14	計 n=332
エンテロ	1	11	55	95	4	4	13	6	1	190 (57.2%)
ムンプス	3	2		4					1	10 (3.0%)
アデノ	4		1							5 (1.5%)
インフル	2								1	3 (0.9%)
EP	1									1 (0.3%)
HHV-6									1	1 (0.3%)
VZV	1									1 (0.3%)
HSV	1									1 (0.3%)
計	13	13	56	99	4	4	13	6	4	212 (63.9%)

2）無菌性髄膜炎患者検体からのウイルス分離成績

無菌性髄膜炎患者322人についてウイルス分離試験を行った結果, 147名 (44.3%) の患者からE30を分離した. 1998年4月下旬に無菌性髄膜炎患者2名からE30が分離されたのを始めとして5月に4名, 6月に49名, そして7月には74名からE30が分離され, この月をピークに12月まで毎月E30が分離された (表2). E30以外では, エコーウイルス18型が7名, またアデノウイルスが4名, コクサッキーB群ウイルスが3名, インフルエンザウイルスB型が1名から分離された. E30の型別同定に際しては, 市販のエンテロプール血清では同定不能であったが, EP95血清による同定が可能であった.

表2. 無菌性髄膜炎患者からの月別ウイルス分離状況 (1998年4月－12月)

分離ウイルス	4月 n=15	5月 n=14	6月 n=70	7月 n=135	8月 n=32	9月 n=15	10月 n=24	11月 n=15	12月 n=14	計 n=332
エコー30	2	4	48	74	6	2	6	4	1	147 (44.3%)
エコー18				5	2					7 (2.1%)
アデノ2					1					1 (0.3%)
アデノ3			1		1		1			2 (0.6%)
アデノ5									1	1 (0.3%)
コクサッキーB3						1				1 (0.3%)
コクサッキーB4					1					1 (0.3%)
コクサッキーB5				1						1 (0.3%)
インフルエンザB 1										1 (0.3%)
計	3	4	49	80	11	3	6	4	2	212 (63.9%)

検体別にみたウイルス分離成績を表3に示した. 咽頭拭い液109件からはE30が56件 (51.4%), アデノウイルス4件, インフルエンザウイルスB型2件, エコーウイ

表3. 検体別にみたウイルス分離成績

分離ウイルス	咽頭拭い液 n=109	髄液 n=292	ふん便 n=87	総計 n=488 (100%)
エコー30	56	98	60	214 (43.9%)
エコー18	1	3	6	10 (2.0%)
アデノ2	1			1 (0.2%)
アデノ3	2		1	3 (0.6%)
アデノ5	1			1 (0.2%)
コクサッキーB3		1		1 (0.2%)
コクサッキーB4		1		1 (0.2%)
コクサッキーB5		1		1 (0.2%)
インフルエンザB	2			2 (0.4%)
分離数計	63	104	67	234 (48.0%)

ルス18型が1件分離された．髄液では，292件中98件(33.6%）からE30が分離されたのを始めとしてエコーウイルス18型とコクサッキーB群ウイルスがそれぞれ3件分離された．また，ふん便（87件）からはE30が60件(69.0%)，エコーウイルス18型が6件，アデノウイルスが1件分離された．

次に無菌性髄膜炎患者の年齢別にみたウイルス分離状況を図1に示した．E30分離陽性者は生後5日から40才代までと幅広くみられたが，10歳未満の年齢層に集中していた．発症者の平均年齢は7.3才であった．

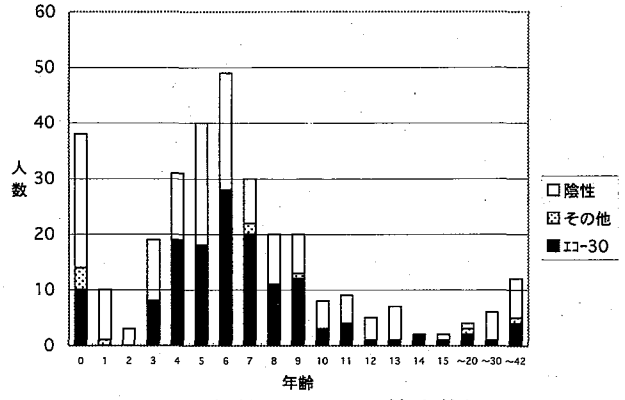


図1．年齢別ウイルス検出状況

3）集団風邪が疑われた小学校での発生例

今回の無菌性髄膜炎流行時に，多摩地区の小学校2年のクラスにおいて，33名中8名が，37～38℃の発熱，頭痛，食欲不振，腹痛，悪心を呈したことから「集団風邪」が疑われ，学級閉鎖になった．（表4）検体が採取できた患者5名のうがい液について，当初インフルエンザウイルス，アデノウイルスの検査を行ったが，これらのウイルスは分離されなかった．そこで各種ウイルスに対するPCR法を行ったところ，エンテロウイルスのPCRが陽性であった．また，4名のうがい液からE30が分離された．さらに，血清学的診断においても同ウイルスに対する中和抗体価が，32倍から512倍以上へと有意の上昇がみられた．しかし，併せておこなったインフルエンザA，B，アデノウイルスに対するCF抗体価については有意の上昇が認められなかった．

表4．集団風邪様発生例の症状

年令 性別	発熱 月日	主要症状 発熱	せき	頭痛	咽頭痛	関節痛	鼻汁	食欲不振	下痢	嘔吐	腹痛
7歳 男	5/31	38	−	+	−	−	−	+	−	+	−
7歳 女	6/1	37	−	+	+	−	−	+	−	−	−
7歳 男	6/1	39	−	+	−	−	−	+	−	+	+
7歳 女	6/2	38	−	+	−	−	−	−	−	−	+
7歳 男	6/2	38	−	+	−	−	−	+	+	−	+

表5．集団風邪様発生例検査結果

年令 性別	発熱 月日	検査結果 うがい液 (6/5採取)	血液採取月日	中和抗体価 (エコー30)	補体結合反応抗体価 インフルA	インフルB	アデノ
7歳 男	5/31	エンテロPCR (+)	6/5	32	8	<8	<8
		分離 (+) E30	6/27	≧512	8	<8	<8
7歳 女	6/1	エンテロPCR (+)	6/5	32	<8	<8	<8
		分離 (+) E30	6/24	≧512	<8	<8	<8
7歳 男	6/1	エンテロPCR (+)	6/5	32	8	<8	16
		分離 (+) E30	6/25	≧512	8	<8	16
7歳 女	6/2	エンテロPCR (+)	6/5	64	8	<8	<8
		分離 (+) E30	6/26	256	8	<8	<8
7歳 男	6/2	エンテロPCR (+)	6/5	32	8	<8	<8
		分離 (−) E30	6/23	≧512	8	<8	<8

4）家庭内感染例

保健所から依頼のかった不明疾患調査において，無菌性髄膜炎の子供から親への感染（家庭内感染）がみられた事例を表6に示した．この家庭は4人家族（両親，兄，弟）で，最初に8才の弟が6月23日に発症し，7月1日に採取したふん便検体から，E30が分離された．次に7月1日に母親が発症して，同日検体を採取し，うがい液とふん便からE30が分離された．また，無症状だった父親と9才の兄についても咽頭拭い液とふん便を検査したところ，いずれの検体からもE30が分離された．

表6．家庭内感染事例

年令	続柄	発病日	検体	採取日	結果
8才	次男	6/23	咽頭拭い液	7/1	分離 (−)
			糞便	7/2	E30分離
37才	母親	7/1	咽頭拭い液	7/1	E30分離
			髄液	7/1	分離 (−) PCR (+)
			糞便	7/3	E30分離
40才	父親	症状 (−)	咽頭拭い液	7/2	E30分離
			糞便	7/3	E30分離
9才	長男	症状 (−)	咽頭拭い液	7/2	E30分離
			糞便	7/4	E30分離

考　察

わが国におけるE30についての最初の分離報告は，1978年の愛知県の無菌性髄膜炎散発例からであった[6]．その後，1983年にはE30による無菌性髄膜炎の全国的な流行をみた5)．さらに，1989～1991年にかけて2回目の流行が報告されており，今回の流行は全国規模では3回

目となった．今回の患者数は現在判明しているだけでも1,800名を越えており，1991年の4,063名に次ぐ流行であった．1997年６～７月にかけて広島，岡山，島根等の西日本を中心に多数の患者発生がみられた後，全国的に流行していったものである．東京都では，1983年の流行時には無菌性髄膜炎患者からはE30が分離されず，1991年がE30による初めての流行であったので，今年は７年ぶり２回目の流行である．東京都における流行は1998年にはいってからであり，４月の下旬からE30が分離されはじめ，７月にピークを迎えた後，急激に数を減少しつつも12月まではウイルスが分離された．これは，1991年の流行時と同様の傾向を示していた．また，E30と同時にエコーウイルス18型，コクサッキーウイルスＢ群，アデノウイルス，インフルエンザウイルスが分離されており，E30以外のウイルスによる無菌性髄膜炎が散発的に発生していたことが明らかになった．

E30の分離された年齢分布をみると，６歳をピークに３～７歳で78％を占めており，これは患者の年齢分布とほとんど一致する成績であった．また，検体別ではこれまで報告がみられているのと同様に，ふん便からの分離率が69.0％と最も高く，次いで咽頭拭い液51.4％，髄液33.6％の順であった．

また今回の流行時には，多摩地区の風邪と思われる症状（発熱，頭痛，食欲不振，腹痛，嘔吐）を呈する集団発生例から病因ウイルスとしてE30が分離されたり，不明発疹，感染性胃腸炎，風疹様疾患等の検体からもE30が分離されたことは，E30は無菌性髄膜炎以外にも様々な病態を呈していたことが推察された．

無菌性髄膜炎は，一般に重症化することが少なく，予後が良好であるが，今期には脳炎，脳症を起こした患者の髄液からE30が２例分離されており，決して軽視することはできない．また，前回の流行時とは異なり，今回分離されたE30は，市販の抗血清では同定されず，EP95で同定されたことから抗原性が変化していることが示唆された．今後の抗原性の変化に注意が必要である．今後も感染症発生動向調査を継続しておこない，データを蓄積することにより，無菌性髄膜炎流行の予防対策7）へと役立ててゆくことが大切である．

まとめ

1　1998年東京都内でE30による無菌性髄膜炎の流行があり，332名中147名（43.9％）からE30が分離された．

2　４月下旬に初めてE30が分離されてから７月74件をピークに12月までE30が分離された．

3　年齢別のE30発生状況は，６歳をピークに３歳から７歳までが87％を占めた．検体別にはふん便から69％と最も多く，次いで咽頭拭い液51.4％，髄液33.6％の順であった．

（本研究の概要は，地方衛生研究所全国協議会第13回関東甲信静支部ウイルス研究会平成10年10月で発表済である．）

文　献

1）浦野　隆：臨床とウイルス，23増刊号，141-155，1995

2）林　志直，関根整治，関根大正，他：東京都衛研年報，**44**, 19-24, 1993

3）佐々木由紀子：東京都微生物検査情報（話題）（第18巻，１号），1997

4）田部井由紀子，貞升健志，吉田靖子，他：東京衛研年報，**49**, 17-22, 1998

5）国立感染症研究所感染症情報センター病原微生物検出情報：Vol. 19 No. **8**（No. 222），August 1998

6）栄　賢司，久野有文，石原佑弐，他：臨床とウイルス，**7**, 389-392, 1979

7）峯川好一，山崎謙治，大石功，他：臨床とウイルス，Vol. 20，No. 5, 400-411, 1992

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 16-19, 1999

東京都におけるHIV抗体検査成績（1995年～1998年）

貞升健志*, 中村敦子*, 森　功次*, 田部井由紀子*, 新開敬行*,
山崎　清*, 門間公夫***, 関根整治**, 吉田　勲****, 山田澄夫****,
平田一郎*, 関根大正**, 小久保彌太郎**

The HIV test result in Tokyo (1995-1998)

KENJI SADAMASU*, ATSUKO NAKAMURA*, KOHJI MORI*, YUKIKO TABEI*,
TAKAYUKI SHINKAI*, KIYOSHI YAMAZAKI*, KIMIO MONMA***, SEIJI SEKINE**,
ISAO YOSHIDA****, SUMIO YAMADA****, ICHIRO HIRATA*,
HIROMASA SEKINE** and YATARO KOKUBO**

Keywords：ヒト免疫不全ウイルス HIV，抗体検査 antibody test，陽性率 positive rate，サブタイプ subtype

緒　言

1981年にアメリカで初めてHIV（Human Immunodeficiency Virus；ヒト免疫不全ウイルス）によるAIDS（Acquired Immunodeficiency Syndrome；後天性免疫不全症候群）患者が報告されて以来，HIV感染者は世界的に増加の一途をたどり，1998年12月末現在，全世界で3,340万人以上[1]，日本では5,000人を超えるに至っている[2]．

当所では，1987年２月より都内保健所から搬入された検体のHIV抗体検査を開始し，1998年４月からは，検査の迅速化を目的に，これまで民間検査機関で行っていた南新宿検査相談室の検査も実施するようになった．

我々は，既に，検査開始から1994年までの検査成績については報告してきた[3-6]．本報ではそれ以降の1995年から1998年の４年間に実施したHIV抗体検査成績と検査受診者の解析結果を報告する．また，陽性検体については，感染経路等の疫学調査をする上で，重要な手段となり得るHIV－１のサブタイプ解析も実施したので併せて報告する．

材料及び方法

１）供試試料

供試した材料は，1995年１月から1998年12月までの間に，都内保健所及び南新宿検査相談室におけるHIV抗体検査受診者の血清49,954件である（うち19,847件のスクリーニング検査は民間検査機関で実施）．また，HIV－１のサブタイプ解析に供試した材料はHIV抗体確認検査でHIV－１抗体陽性となった181件の血清である．

２）検査方法

HIV抗体検査は既報[3-6]の手順に従い実施した。すなわち，スクリーニング検査として，酵素抗体法（ELISA法）及びゼラチン粒子凝集法（PA法）を実施し，陽性のものについては確認検査としてウエスタンブロット（WB）法及び間接蛍光抗体法を行った．確認検査で陽性となったものをHIV抗体陽性と判定した．

３）陽性例のサブタイプ解析

181件のHIV－１抗体陽性検体について，サブタイプＢとＥの型別を行った.サブタイプＢは欧米の標準型であるB_{MN}型を，サブタイプＥはE_A型を標的としたペプチドを用い，ペプチドELISA法で検討した[7]．

結果及び考察

(1)抗体検査受診者数と年齢構成

1995年から1998年にかけて，当所でHIV抗体検査を実施した都内保健所の検査総数は，30,107件であり，その

＊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
＊＊＊生活科学部
＊＊＊＊多摩支所

うち男性受診者数は18,576件で全体の61.7%であった．この割合は検査開始当初（64.2%）と比較して，ほとんど変化していない．年間検査数は，1992年の31,401件をピークに年々低下し，1995年は7,201件，以降1998年まで，7,034件，5,070件，4,522件と推移した．

南新宿検査相談室の1995年から1998年にかけての検査総数は，26,172件であった．年次別の検査数は，1995年の5,700件から1998年まで6，402件，6,134件，7,891件と推移した．当研究科では，98年３月までは確認検査のみを担当し，スクリーニング検査・確認検査共に実施するようになったのは，４月以降である．したがって，1998年3月までの詳細なデータが不足しており，この４年間の性別等の解析はできなかった．４月以降受診した6,325件についてみると，男性は4,074件（64.4%）であった．

年次別にみた検査受診者の年齢別構成を図１に示した．都内保健所で受診した男性における20～30才代で占める割合は95年が71.1%，96年が65.0%，97年が72.7%，98年が69.0%であり，女性ではそれぞれ84.4%，63.7%，84.0%，83.3%であった．96年を除くいずれの年次も女性の方が男性を約10%上回っており，若い年齢層では男性より女性の受診率が高いことが推察された．ちなみに，南新宿検査相談室では，男性が81.4%，女性が90.7%であった．

1996年は，男女ともに20～30才代で占める割合が低下している．この年は第４ルートの問題が明らかとなり，血友病以外の人でも，血液製剤の投与されたことによるHIV感染の可能性や血液製剤を投与された病院名が新聞やテレビ等で報道された．図２に示すように96年の10～11月に検査数の増加がみられる．この時期がちょうど報道がさかんになされた時期であり，HIV感染を心配した人々が数多く受診したことが推察される．受診者の年齢構成にも変化がみられ，男女共に40才以上の検査数が増加し，全体に占める割合は男性で32.4%，女性で31.9%であった（図１）．

過去にも，神戸でのエイズ患者，死亡例が報道された後の大幅な検査数の増加をみており，検査数はマスコミの報道に大いに影響されている．

また，1998年の７～９月にHIV感染を題材にした若年齢層向けのテレビドラマが放映された．その間の都内保健所，南新宿検査相談室における検査数も増加している（図２，３）．年齢層別に南新宿検査相談室の受診者数をみると，女性の20才代と男性の20，30才代に増加が認められ，特に20才代の増加が顕著であった．40才代以上の年齢層の検査数には，ほとんど変化が認められず，マスメディアが受診者に及ぼす影響が非常に大きいことが改めて推察された．

(2)HIV抗体検査成績

1995年から1998年に都内保健所及び南新宿検査相談室を訪れた受診者の血清49,954件を対象に，HIV抗体検査を実施したところ，181件がHIV抗体陽性で，その陽性率は0.362%であった．

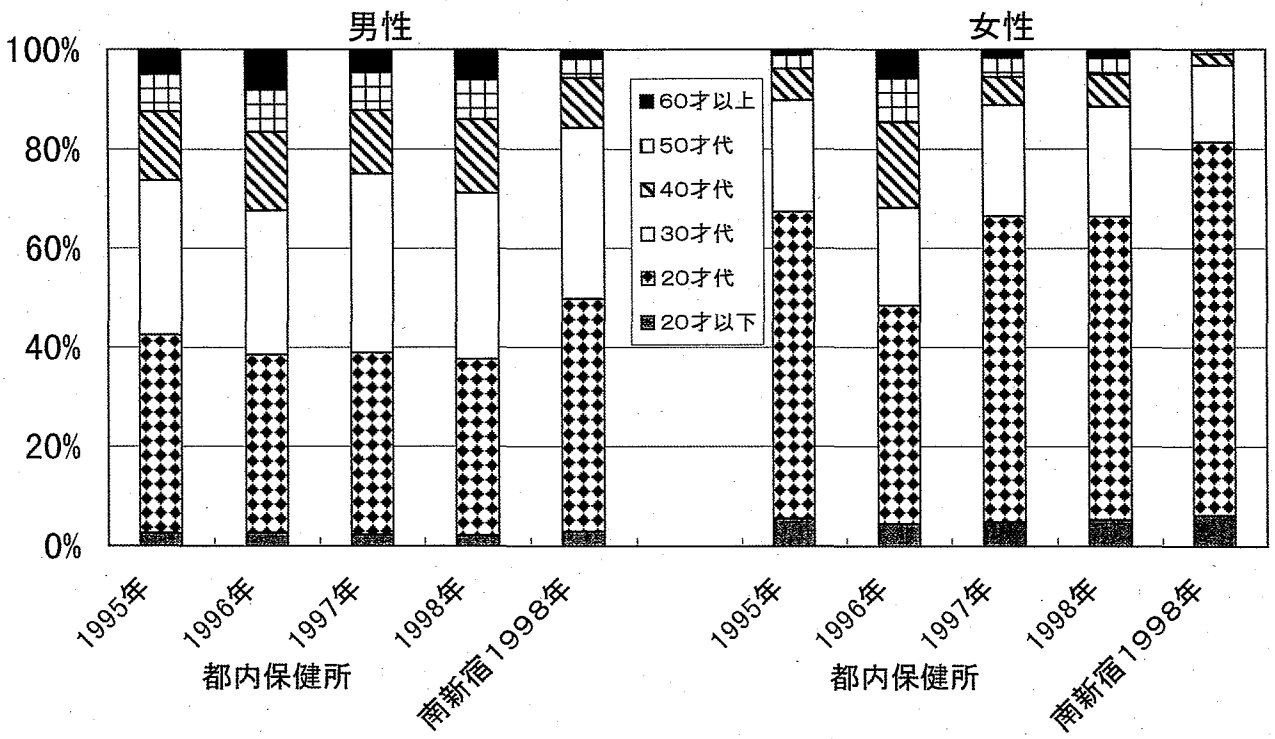


図１．HIV抗体受診者の男女・年齢別構成

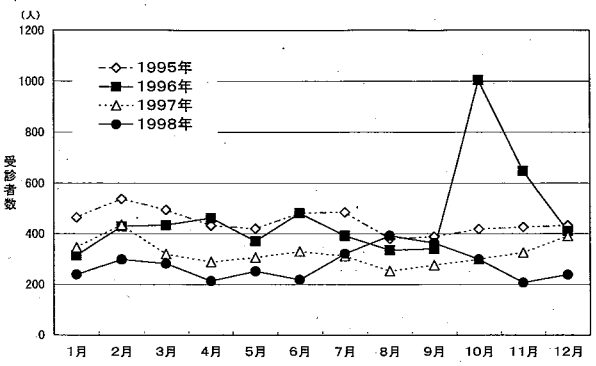


図２．月別にみた都内保健所のHIV抗体検査受診者数
(1995～1998年)

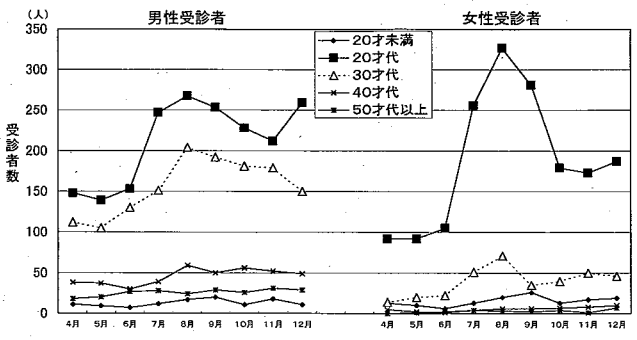


図３．南新宿検査相談室の月別HIV抗体検査数の推移（1998年）

性別にみた陽性者数は，男性が155件（85.6%）と圧倒的に多く，女性は21件（11.6%），不明が５件であった．

年代別には，20才未満の年齢層においては，男性で陽性者が２例認められた．20才代以上の年齢層をみると，20才代が71件（39.2%）と最も多く，次いで30才代59件（32.6%），40才代15件（8.3%），50才代５件，60才以上３件の順であった．女性では，30才代で10件，20才代で９件，40才代で２件陽性者が認められた．

図４に都内保健所のHIV抗体陽性者数を年次別に示した．1995年の陽性者数は６件であり，以降1998年まで10件，12件，15件と増加した．陽性率でみると，1994年以前の陽性率は0.072%（62/86，432）であったのに対し，1995年は0.083%，1996年は0.142%，1997年は0.237%，1998年は0.332%と上昇している．

南新宿検査相談室の陽性者数も，保健所同様に，1995年の18件から31件，42件，47件と増加し，陽性率も1995年の0.316%から98年の0.596%へと上昇した（図５）．

以上のことから，最近のHIV抗体検査の動向は検査数は1992年をピークに年々減少傾向にあるものの，陽性者は逆に増加傾向にあり，感染リスクの高い人々の受診が増えていることが推察された．

(3)抗体陽性例のサブタイプ解析

HIVは，全世界で蔓延している１型（HIV-１）と一部

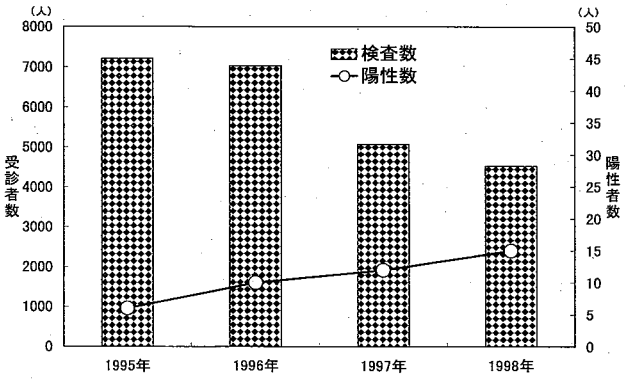


図４．都内保健所のHIV抗体検査数と陽性数
(1995～1998年)

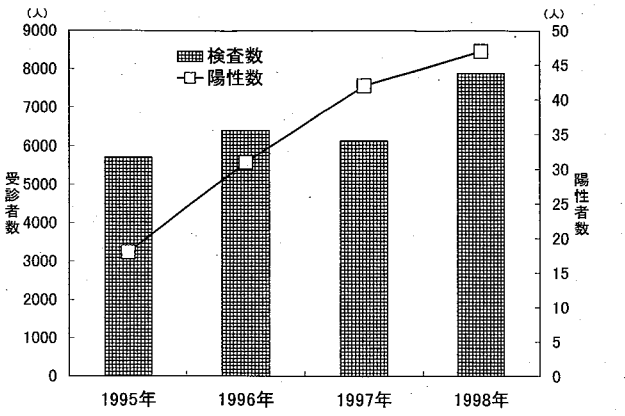


図５．南新宿検査相談室のHIV抗体検査数と陽性数
(1995～1998年)

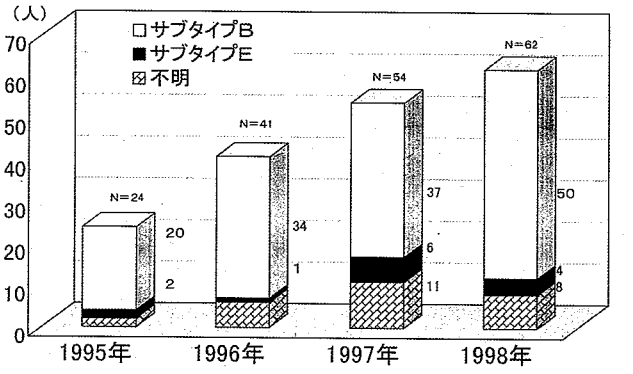


図６．HIV－１抗体陽性例のサブタイプ解析
(1995～1998年)

のアフリカに存在する２型（HIV-２）に分類されている.近年，HIV-１は，さらに多くのサブタイプに分類され，サブタイプ分類は感染経路等の疫学的な解析に重要な手法ともなっている[7].今回のHIV抗体検査で，陽性となった181例は全てHIV－１であり，ペプチドELISA法によるサブタイプ型別では，181例中140例（77.3%）がサブタイプBであり，年次的にもあまり変化は認められなかった（図６）．

都内病院におけるサブタイプ解析では，サブタイプBは同性間感染ならびに異性間感染で，サブタイプEは異性間感染のみで認められ[7]，また，最近の異性間感染の

多くがサブタイプBからEへとシフトしてきているという報告もみられている[8]．今回の結果では，異性間感染のマーカーであるサブタイプEによる感染の割合が低いこと，陽性者の85.6%が男性であること，また，ほとんどがサブタイプBによる感染であることから，東京都内保健所・相談室受診者のHIV感染は同性間感染による感染が主流なのではないかと推察された．

心配されたHIV－2の蔓延は，現在のところみられないものの，HIV－1抗体陽性数は年々増加の傾向が続いている．また，近年のHIV感染症治療効果が向上してきているとはいえ，完全に直る病気ではなく，まだまだ教育や疫学的に対処すべき疾患である．今後とも検査業務の遂行に努力しつつ，エイズの動向に注目していきたい．

まとめ

1．1995年から1998年のHIV抗体検査受診者の解析を行ったところ，男女ともに20～30才代の年齢層の受診者が多く，その割合は男性では69.0%，女性では76.7%を占めていた．

2．HIV抗体検査における受診者数はマスメデイアの影響により変動した．

3．HIV抗体検査数は年々低下しているものの，抗体陽性数は逆に上昇の傾向にある．

4．抗体陽性者のHIV-1サブタイプ型別では，77.3%がサブタイプBであることから，同性間感染者が多いことが推察された．

文　献

1）AIDS epidemic update:December 1998，WHO URL:http://www.unaids.org/

2）エイズニュースレター99年3月号，衛生局エイズ対策室，1999

3）大貫奈穂美，貞升健志，関根大正，他:東京衛研年報，**41**，16-21，1990

4）関根大正，貞升健志，大貫奈穂美，他:東京衛研年報，**43**，12-15，1992

5）森　功次，貞升健志，田部井由紀子，他:東京衛研年報，**45**，23-27，1994

6）田部井由紀子，貞升健志，森　功次，他:東京衛研年報，**46**，37-40，1995

7）貞升健志，森　功次，関根整治，他:東京衛研年報，**49**，29-32，1998

8）HIV感染症の疫学研究研究報告書　平成11年3月　木原正博，厚生省，324-384，1999

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 20-23, 1999

東京都におけるポリオウイルス検出状況（1998年）

田部井　由紀子*，吉　田　靖　子*，長谷川　道　弥*，長　島　真　美*，
平　田　一　郎*，関　根　大　正**，小久保　彌太郎**

Surveillance of Polio virus in Tokyo,1998

YUKIKO TABEI*, YASUKO YOSHIDA*, MICHIYA HASEGAWA*, MAMI NAGASHIMA*,
ICHIRO HIRATA*, HIROMASA SEKINE** and YATATO KOKUBO**

Keywords：ポリオウイルスpoliovirus,ウイルス分離virus isolation,健康小児healthy child

緒　　言

急性灰白髄炎（acute poliomyelitis：以下ポリオ）は，かつて世界中で発生し，特に先進国での発生が多かったため，文明病とまでいわれた．しかし，生ワクチンが開発され，ワクチンを積極的に投与した国では患者発生が劇的に減少した．また，1985年にWHO「全世界ポリオ根絶計画」の決議に基づき，世界的にポリオ根絶事業が展開されたことにより，現在では野生型ポリオウイルス（以下野生株）によるポリオの流行は東南アジア，中近東，アフリカに限局されている．

我が国でも，1950年代は年間1,300から4,000人の患者が発生し，1960年には北海道を中心に5,600人にも達する大流行が見られた．1962年にSabinの経口ポリオ生ワクチンが導入されたため患者数は激減し，1980年以降，野生株によるポリオ患者は発生していない．しかしながら，世界に今なおポリオの流行地がある以上，輸入感染症として，ポリオ患者発生の可能性は否定できない[1, 2]．

厚生省は，生ワクチン投与が始まった1962年からポリオ流行予測調査事業を実施し，患者発生の可能性を監視している．我々も本事業開始時からポリオウイルスに対する抗体保有状況を調べる感受性試験及び健康小児のポリオウイルス保有状況を調べる感染源調査を実施してきた．感染源調査ではポリオウイルスを分離するだけでなく，分離株がワクチン由来株であるのか野生株であるのかの鑑別も行い，野生株の侵入を監視している[3]．

本報では1998年東京都における健康小児のポリオウイルス保有状況を報告すると共に，これまで国立感染症研究所に依頼していた鑑別試験にPCR－RFLP法（PCR-restriction fragment length polymorphism）を導入し，当研究科で分離株の鑑別を行ったので，その成績も併せて報告する．

材料と方法

1．供試試料

供試試料は，1998年５月から12月の間に，都内Ａ～Ｉの９保健所管内の健康小児（０～６歳）より採取した糞便134件（内訳はＣ保健所14件，その他の保健所は各々15件）である．

2．ウイルス分離試験

ウイルス分離用の試料は，糞便約0.5ｇを１％牛胎児血清加イーグルMEM培地で10％乳剤とし，3,000回転で5分間遠心分離後，上清に500unitのペニシリン・500μｇのストレプトマイシンを添加して調製した．

ウイルス分離試験は，24穴プレートに単層培養したHeLa，HEp2及びRD-18S細胞に調製した分離用試料を接種し，５％CO_2存在下，37℃で５日間培養し，細胞変性効果（CPE）を指標に４代まで継代培養した．CPEの認められたものについては10^6TCID_{50}/25μlに調製し，ポリオウイルス含んだエンテロウイルス，アデノウイルス抗血清（デンカ生研）による中和試験で同定を行った[4]．

3．ポリオウイルスからのRNA抽出

分離したポリオウイルス株は，10^8TCID_{50}/100μlに調製し，市販の核酸抽出剤セパジーンRVR（三光純薬）を用いてRNAの抽出を行い，滅菌蒸留水10μlで溶解した．対照として，ワクチン株（Sabin 1,2,3）及び野生株

＊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
＊＊微生物部

(Mahony,MEF-1,Saukett) についても同様の操作を行った.

4．PCR－RFLP法による分離株の鑑別試験

Balanantらの方法[5]に準じて，ポリオウイルス外被タンパクVP1領域の5'末端480bpを標的にPCR法を行い，制限酵素での切断パターンの比較を行った（図1）．すなわち，抽出したポリオウイルスRNA 10μlに逆転写反応用試薬（RNasin（TOYOBO）1μl，1.25 mM dNTPs（Perkin Elmer Cetus）8μl，AMV（TOYOBO）7 unit/2μl，10倍濃度のreaction buffer（Perkin Elmer Cetus）2μlの混液）13μl，UC1プライマー（5'-GAATTCCATGTCAAATCTAGA-3'）1μlを加え，42℃，30分，逆転写反応を行い，cDNAを合成した．続いて，cDNA24μlに滅菌蒸留水51μl，10倍濃度のreaction buffer 8μl，1.25mM dNTPs 16μl，UC1／UG1プライマー（5'-TTTGTGTCAGCGTGTAATGA-3'）1μlを加えて，94℃，10秒，45℃，1分，70℃，1分のPCR法による増幅を30回行った．増幅産物は，0.01%ethidiumbromideを含む2%アガロースゲルで電気泳動を行い，480bpの大きさであることを確認した．

増幅産物をエタノール沈殿し，沈査を乾燥後，滅菌蒸留水30μlで再溶解した．これを10μlずつ3つに分け，3種類の制限酵素10UのHaeⅢ，5UのDdeⅠ及び14UのHpaⅡをそれぞれに1種類づつ加え，37℃で2時間反応させた．反応後のDNA断片は，0.01%ethidiumbromideを含む2%アガロースゲル電気泳動を行い，その泳動パターンと対照株の泳動パターンを比較して，ワクチン株か野生株かを判定した（図1）[6]．

結　果

ウイルス分離成績

ウイルス分離試験結果を表1に示した．ポリオウイルスは134件の糞便のうち，F保健所管内で7件，I保健所管内で1件，計8件（6.0%）から分離された．分離したポリオウイルスの中和抗血清による型別の内訳は，1型が2件，2型が5件，1と2型の混合が1件であった．その他に，26件（19.4%）の糞便からポリオウイルス以外のエンテロウイルス，アデノウイルスが分離された．その内訳はエコーウイルス18型及びコクサッキーウイルスB群2型がそれぞれ7件，アデノウイルス5型が5件，エコーウイルス30型，アデノウイルス2型がそれぞれ3件，アデノウイルス1型が1件であった．

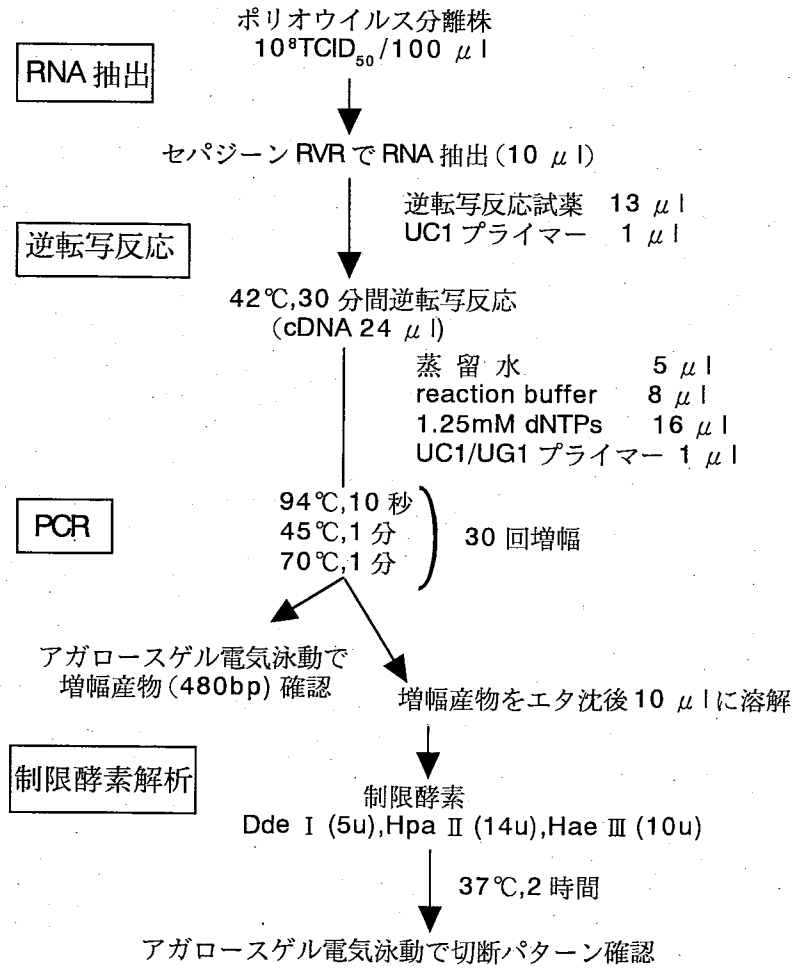


図1．PCR－RFLP法によるポリオウイルス鑑別試験の検査工程

表1．健康小児ふん便からのポリオウイルス検出状況

共試試料	134
ウイルス分離試験	
ポリオ1型	2（F，I）
ポリオ2型	5（F）
ポリオ1，2型	1（F）
エコー18型	7
エコー30型	3
コクサッキーB群2型	7
アデノ1型	1
アデノ2型	3
アデノ5型	5
検出数	34

（F）；F保健所，（I）；I保健所

PCR－RFLP法による分離株の鑑別試験成績

分離したポリオウイルス8株のPCR－RFLP法による制限酵素切断パターンを図2に，その判定結果を表2に示した．中和同定結果と合わせて比較すると，ポリオウイルス2型が分離された検体番号1，3，4，5，6番は，制限酵素HpaⅡによるDdeⅠの切断パターンでは，2型ワクチン株と2型野生株の鑑別が不能であったが，HaeⅢ，DdeⅠの切断パターンが2型ワクチン株と同一であったことから，ワクチン由来株と判定された．同様に，ポリオウイルス1型が分離された検体番号7，8番も，HpaⅡ，DdeⅠの切断パターンでは，1型ワクチン株と1型野生株の鑑別がつかなかったが，HaeⅢの切断パターンが1型ワクチン株と同一であり，ワクチン由来株と判定された．また，ポリオウイルス1型と2型が混合で分離された検体番号2番は，HaeⅢ，HpaⅡ，DdeⅠによるそれぞれのDdeⅠの切断パターンで違う結果を示したが，3種の酵素に共通する切断パターンが1型と2型のワクチン株と同一であったことから，ワクチン由来株と判定され，今回の健康小児から分離されたポリオウイルスは，8件全てワクチン由来株であった．

考　察

ポリオは野生株あるいはワクチン株ポリオウイルスの経口感染により発病する疾患であるが，麻痺型の発症は感染者の1％未満といわれている．95％以上の人は不顕性感染や発病しても感冒様症状で軽微に終わるとされている．生ワクチンの投与は，まさに不顕性感染そのものと言える．現在，わが国には野生株は存在せず，国民のポリオに対する免疫は，もっぱらワクチン投与によるものである．このワクチン接種効果により，わが国のポリオ患者は，ほとんどみられなくなった．一方，成田空港で，国際線航空機のトイレ排水から野生株が検出されたという報告もあり[8]，未だに海外からの野生株侵入の脅

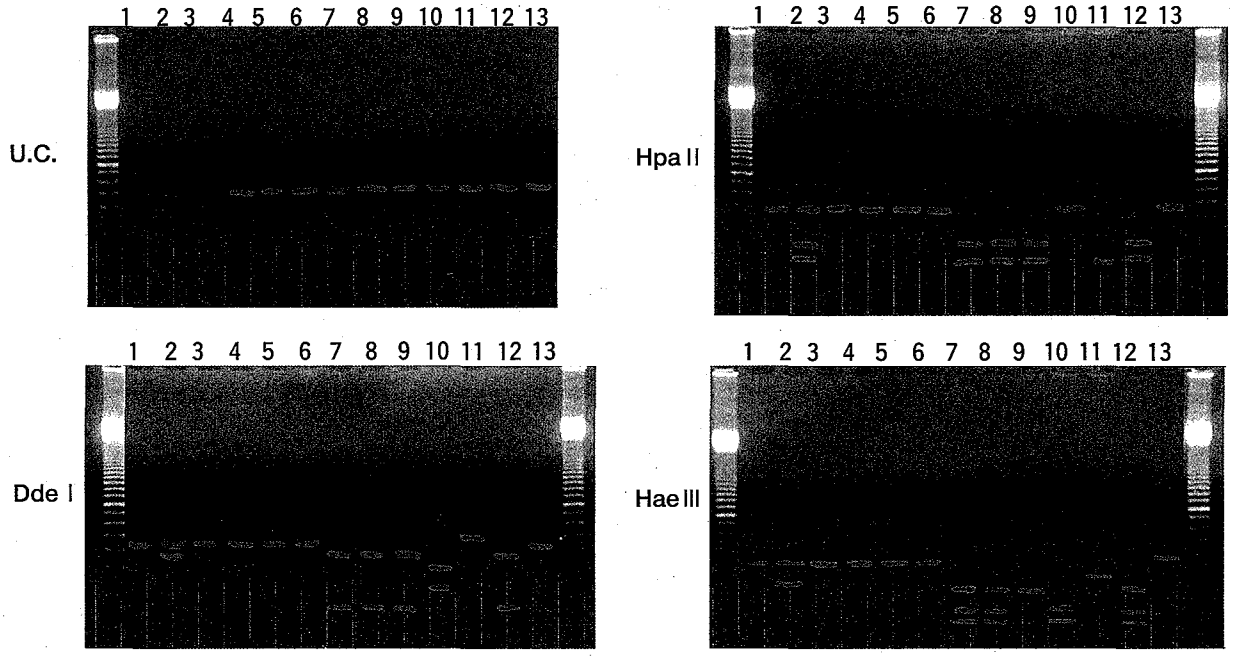


図2．PCR－RFLP法によるポリオウイルス分離株の切断パターン

U.C.：制限酵素未処理，レーン1：検体1（ポリオ2型），レーン2：検体2（ポリオ1，2型），レーン3：検体3（ポリオ2型），レーン4：検体4（ポリオ2型），レーン5：検体5（ポリオ2型），レーン6：検体6（ポリオ2型），レーン7：検体7（ポリオ1型），レーン8：検体8（ポリオ1型），レーン9：ポリオ1型野生株（Mahony株），レーン10：ポリオ2型野生株（MEF－1），レーン11：ポリオ3型野生株（Saukett株），レーン12：ポリオ1型ワクチン株（Sabin株），レーン13：ポリオ2型ワクチン株（Sabin株），

表2．分離されたポリオウイルスの性状

検体番号	年齢	性別	ワクチン接種日	検体採取日	血清型別	PCR-RFLP法（VP1）による鑑別結果
1（F）	1歳	女	1998.4.6	1998.10.8	2型	ワクチン株由来
2（F）	1歳	女	1998.10.5	1998.10.8	1，2型	ワクチン株由来
3（F）	1歳	男	1997.11.27	1998.10.8	2型	ワクチン株由来
4（F）	3歳	男	1996.10.2	1998.10.8	2型	ワクチン株由来
5（F）	2歳	女	1996.10.17	1998.10.8	2型	ワクチン株由来
6（F）	4歳	女	1997.4.10	1998.10.8	2型	ワクチン株由来
7（F）	4歳	男	1995.10.2	1998.10.8	1型	ワクチン株由来
8（I）	1歳	男	1998.12.8	1998.12.24	1型	ワクチン株由来

（F）；F保健所，（I）；I保健所

威にさらされている．

国内のポリオウイルス保有状況を把握することは，野生株侵入を監視するうえで重要である．そこで，我々は，都内の健康小児におけるポリオウイルス保有状況を調査すると共にポリオウイルス分離株については，鑑別試験を行った．その結果，F保健所管内の7名及びI保健所管内の1名からポリオウイルスを分離した．分離株はPCR－RFLP法により，全てワクチン由来株であることが明らかとなった．

通常，経口接種したワクチン株のポリオウイルスは，免疫が作られるまでの3週間から6週間の間，糞便から排泄されるといわれており，ポリオウイルス感染源調査では，ワクチン投与後2ヶ月以上経過した者の糞便を検査することになっているが，今回のF保健所管内の検体番号2及びI保健所管内の検体番号8は，検体採取時期が経口生ワクチン投与からそれぞれ3日後，16日後のものであり，分離されたウイルスはワクチン株そのものであることが推察された．また，F保健所管内ではワクチン投与後6ヶ月以上を経過している健康小児6名からもワクチン由来株が検出されたことは，生ワクチン投与を受けた小児の糞便から排出されたワクチン株による不顕性感染がF保健所管内で発生していたものと思われる（表2）．

ワクチン接種者の間にワクチン株による不顕性感染がみられたことは，ワクチン未接種で抗体を保有していない人が，ポリオウイルスに感染する可能性を示唆するものである．ワクチン株は弱毒化してあるものの，ヒトからヒトに感染が広がる間に神経毒性を復元することがあるといわれている．実際に毒性復帰株によるワクチン未接種の成人が，ポリオ様麻痺を発症した例も報告されており[7]，抗体を保有していない者やワクチン未接種の者は十分な注意が必要であろう．

結　論

1．東京都内の健康小児のポリオウイルス保有状況を調べた．その結果，134名中8名の健康小児の糞便からポリオウイルスが分離された．

2．分離されたポリオウイルスは，全てワクチン由来株であった．

3．F保健所管内ではワクチン接種株よる不顕性感染の発生が推察された．

文　献

1）国立予防衛生研究所学友会編：ワクチンハンドブック，120-129, 1995，丸善，東京

2）宮村達男,米山徹夫,吉田　弘他：臨床とウイルス，**24**(3), 154-161, 1996

3）衛生局医療福祉部結核感染症課：平成10年度流行予測 事業結果報告書, 1999

4）林　志直,関根整治, 安東民衛他：東京衛研年報, 38, **38**-41, 1987

5）Balanant J., Guillot S., Candrea A., et. al.：*Virology*, **184**, 645-654, 1991

6）Vonsover A.,Handsher R.,Neuman M.,et.al：*J Infect Dis*, **167**, 199-203, 1993

7）国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報, 17(9), 1996

8）茂田士郎，森島恒雄：ウイルス感染症，207-210, 1997，医薬ジャーナル社，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 24-27, 1999

と畜場で捕獲したハエの病原菌保有調査

飯田　孝*, 神崎政子*, 細谷夏美**, 宮崎奉之*

Examination of pathogenic bacteria from flies captured in a slaughterhouse

TAKASHI IIDA*, MASAKO KANZAKI*, NATUMI HOSOYA**, TOMOYUKI MIYAZAKI*

Keywords：ハエ fly, と畜場　slaughterhouse, 腸管出血性大腸菌 O157 verotoxin-producing *Escherichia coli* O157, 黄色ブドウ球菌　*Staphylococcus aureus*, リステリア *Listeia*

はじめに

ハエは動物の排泄物あるいは死骸などに集まる習性があり，その一生を非衛生的な環境下で過ごすことから，病原微生物をわれわれの居住環境に運び入れ，食品を汚染する原因の一つになっていることが考えられる[1]．近年，都市の衛生状況がよくなるにつれて，ハエを見る機会は少なくなったが，現在でもゴミの集積場や衛生状況の悪い場所，餌となる食べ物が多い場所ではハエが発生して，近隣住民に不快感を与えている．

ハエは飛翔能があり，またその能力が高いことから他の衛生害虫であるネズミ，ゴキブリ，蚊などに比べて病原体の伝播範囲も広い[2]．このハエはと畜場にも多く飛翔して，枝肉や場内の器具器材にとまっているのが観察されている．しかし，と畜場では家畜が持ち込む病原微生物の制御が重要な課題であり，生前検査による病畜の排除，体躯の洗浄，解体処理時の消化管結紮，鼠属の駆除など様々な試みがされている．しかし，と畜場で発生するハエについては実態がほとんどわからないこともあって，駆除対策も十分ではない．そこで，と畜場のハエが病原微生物の伝播に果たす役割を明らかにするためにハエが保有する病原微生物を調べるとともに，その菌の保有場所を特定するためにと畜場内の解体処理室別下水調査を実施した．

材料及び方法

1．調査対象

1996年７月から８月までに東京都のＨと畜場で3回にわたって昆虫網を使ってハエを捕獲した．

第１回目は７月17日にイエバエ，キンバエ各50匹，第２回目は７月24日にイエバエ，キンバエ，ニクバエ各10匹，第３回目は８月20日にイエバエ，キンバエ，ニクバエ各10匹である．また牛解体処理室の下水，豚解体処理室の下水，牛・豚内臓処理室の下水，最終放流水についても検査した．

2．検体の調製

ハエはピンセットで８×12cmのビニール袋に種類別に集め，保冷材を入れた発泡スチロールの容器で当研究所まで搬送した．検査を行う前にハエの運動性をなくすためにビニール袋を-30℃の冷凍庫に10分間保存した．第１回目に捕獲したイエバエ，キンバエ各50匹の入ったビニール袋に，それぞれ50mlの生理食塩水を加え，ストマッカーによりハエを粉砕して，その上清液を検体とした．

第２回目に捕獲したイエバエ，キンバエ，ニクバエ各10匹は，運動性を止めた後輸送用のビニール袋からそれぞれ新しいビニール袋に移して，そこに10mlの生理食塩水を加えてよく振り，ハエの体表を洗浄した液を検体とした．次に，ハエの腹部をはさみで切り取って，ビニール袋に集め，そこに10mlの生理食塩水を加えて，ストマッカーにより粉砕して，その上清液を検体とした．

第３回目に捕獲したイエバエ，キンバエ，ニクバエ各10匹は，運動性を止めた後，それぞれ10mlの生理食塩水を加え，ストマッカーによりハエを粉砕して，その上清液を検体とした．

また，と畜場の牛及び豚解体処理室の下水及び浄化槽の放流水は300mlのポリエチレン製容器に採取して，保冷剤とともに発泡スチロールの容器に入れて当研究所ま

* 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
** 大妻女子大学社会情報学部社会情報学科

で運搬して，これを検体として用いた．

3．菌の分離及び同定

大腸菌群の検査は，生理食塩液で10^{-3}まで希釈したハエの検体及び原液または10^{-1}まで生理食塩液で希釈した下水0.1mlをEMB寒天培地（日水製薬）に塗抹して37℃，24時間培養した．寒天平板上で黒色金属光沢のある集落が認められたものを大腸菌群陽性と推定した．

腸管出血性大腸菌O157は，ハエの検体1mlを9mlのノボビオシン加mEC培地（mEC；極東製薬工業）に加え，また下水は50mlを2倍濃度のmEC培地50mlに加えて，いずれも40℃,24時間増菌後,その0.5mlを3mlのTryptose broth（Difco）に加えて6時間二次増菌培養を行った．その後，免疫蛍光測定装置（VIDAS：日本ビオメリュー・バイテック社）によりO157の有無を調べた．VIDASで陽性を示した検体は，VT1，VT2遺伝子を腸管出血性大腸菌ベロ毒素遺伝子検出Primer set（Takara）を用いてPCR（Polymerase chain reaction）により調べた．菌の分離はCT加SIB（極東製薬工業）で行い，ソルビット遅分解，CLIG確認培地（極東製薬工業）で斜面が赤色，高層が黄色，365nmの紫外線照射で無蛍光，インドール陽性の菌についてO157診断用抗血清（デンカ生研）を用いて凝集を確認した．なお，VIDASで陰性を示した検体もPCRを用いて毒素遺伝子の確認を行い，陽性を示した検体については分離を行った．

サルモネラは，ハエの検体1mlを9mlのラパポート培地（栄研化学）に加え，また，下水は20mlを等量の2倍濃度ラパポート培地に加えて増菌後，DHL寒天培地（栄研化学）で分離した．その後,硫化水素を産生し,TSI及びLIM培地（日水製薬）でブドウ糖，リジンを分解し，インドール陰性，運動性のある菌はサルモネラ診断用O血清で凝集を確認した．

カンピロバクターは，7％馬血液加スキロー寒天培地（SKB；Oxoid）に検体を直接塗抹した後，微好気ガス下で42℃，48時間培養して分離した．その後，菌の形態及び運動性を位相差顕微鏡下で確認した．

黄色ブドウ球菌は，生理食塩液で10^{-2}に希釈したハエの検体または下水の原液0.1mlから3％卵黄加マンニット食塩寒天培地を用いて分離した．グラム陽性球菌でLAラテックス（デンカ生研）凝集があり，ブドウ球菌コアグラーゼ試験（デンカ生研）陽性，カタラーゼ陽性，DNA培地（栄研化学）上に発育した菌のまわりに透明帯を形成したものを黄色ブドウ球菌と同定した．その後，コアグラーゼ型別用免疫血清（デンカ生研）を用いて，コアグラーゼ型別及びブドウ球菌エンテロトキシン検出キット（デンカ生研），ブドウ球菌TSST-1検出用キット（デンカ生研），黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素検出用キット（デンカ生研）で毒素の検出を行い，オキサシリンディスク（ベクトン ディキンソン；センシディスク）でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）を調べた．

表1．と畜場のハエ及び下水の細菌汚染調査

検体	大腸菌群	腸管出血性大腸菌 VIDAS	腸管出血性大腸菌 PCR	腸管出血性大腸菌 分離	サルモネラ	カンピロバクター	黄色ブドウ球菌 (個/匹)	*L.monocytogenes*
第1回目								
イエバエ	＋	＋	＋	＋(O45)	－	－	－	－*
キンバエ	＋	＋	＋	－	－	－	＋(6×10^3)	－
第2回目								
イエバエ体表	＋	－	－	－	－	－	－	－
キンバエ体表	＋	－	－	－	－	－	－	－
ニクバエ体表	＋	－	－	－	－	－	－	－
イエバエ腹部内臓	＋	－	－	－	－	－	－	－
キンバエ腹部内臓	＋	－	－	－	－	－	－	－
ニクバエ腹部内臓	＋	－	－	－	－	－	－	－
第3回目								
イエバエ	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
キンバエ	＋	－	－	－	－	－	－	－
ニクバエ	＋	＋	－	－	－	－	－	－
牛の解体処理室下水	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
豚の解体処理室下水	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
牛・豚内臓処理室下水	＋	＋	＋	－	－	－	－	－*
最終放流水	＋	＋	＋	－	－	－	－	－

＊：*Listeria innocua*が分離された

表2．PCRによりベロ毒素遺伝子が検出された検体とベロ毒素の型別

検査実施回	検体	検出プライマー VT1	VT2
第1回目	イエバエ	−	+
	キンバエ	−	+
第3回目	イエバエ	−	+
	牛の解体処理室下水	−	+
	豚の解体処理室下水	−	+
	牛・豚内蔵処理室下水	−	+
	最終放流水	+	+

リステリアは，ハエの検体1mlを9mlのUVM modified listeria enrichment broth（UVM；Difco）に加え，下水は10mlを等量の2倍濃度UVM培地に加えていずれも30℃，48時間増菌後，PALCAM-Listeria-selectiveagar（Base）（Merck）で30℃，48時間培養して分離した．その後グラム陽性短桿菌でVP陽性，運動性のある菌をリステリアとし，溶血性，炭水化物の発酵でキシロース，ラムノースの性状を確認して菌種を決定した．

成　績

と畜場で捕獲したハエ及び下水から分離した大腸菌群，腸管出血性大腸菌O157，サルモネラ，カンピロバクター，黄色ブドウ球菌，リステリアの結果を表1に示した．第1回目の調査では，各50匹のイエバエとキンバエの検体から大腸菌群が分離された．どちらの検体もO157を検出するためのVIDASで陽性を示し，毒素遺伝子を検出するPCRによりVT2遺伝子が検出されたが（表2）菌は分離できなかった．しかし，イエバエからVT2を産生する腸管出血性大腸菌O45：H^-が分離された．サルモネラ及びカンピロバクターは分離されなかった．黄色ブドウ球菌はキンバエから1匹あたり6×10^3個分離された．卵黄加マンニット食塩寒天培地上に発育した集落でLAラテックスに凝集があり，黄色ブドウ球菌の性状を示した20株について，コアグラーゼ産生能を調べたところ18株（90%）が陽性株で，2株（10%）が陰性株であった．18株のコアグラーゼ型はⅦ型が12株（66.7%）で最も多く，Ⅲ型が4株（22.2%），Ⅵ型が1株（5.6 %），型別不能1株であった．エンテロトキシンは18株すべて非産生株であり，TSST-1，表皮剥奪毒素及びMRSAはすべて陰性であった．リステリアは，イエバエからCAMPテストで溶血性が無く，炭水化物の発酵でキシロース陰性，ラムノース陽性の*Listeria innocua*が分離された．

第2回目の調査は，ハエの体表及び腹部内臓について調べた．イエバエ，キンバエ，ニクバエの体表及び腹部内臓のすべての検体から大腸菌群が分離されたが，それ以外の菌は分離されなかった．

第3回目の調査で大腸菌群はイエバエ，キンバエ，ニクバエのすべての検体から分離された．イエバエの検体はVIDAS，PCRで陽性を示し，ニクバエはVIDASでのみ陽性であったが，どちらの検体からもO157は分離できなかった．一方，キンバエはVIDAS，PCRとも陰性であった．

と畜場の牛及び豚の解体処理室，内臓処理室の下水と最終放流水から大腸菌群が分離され，O157を検出するVIDASで全検体陽性を示し，さらにPCRでVT2遺伝子が検出されたが，最終放流水からはVT1遺伝子も検出された（表2）．しかし，O157を分離することはできなかった．また，牛及び豚内臓処理室の下水から*L.innocua*が分離された．

考　察

と畜場におけるハエの食中毒起因菌を中心とした保有調査を行い，イエバエ，キンバエ，ニクバエのすべての検体から大腸菌群が検出された．大腸菌群は，ほ乳動物の糞便汚染の指標菌として食品衛生上問題となる菌で，本菌群が分離されると糞便由来の食中毒起因菌の分離される可能性が極めて高くなる[2]．しかし，今回第1回目のイエバエから腸管出血性大腸菌O45：H^-，同じくキンバエから黄色ブドウ球菌が分離された以外，病原菌は分離されなかった．

腸管出血性大腸菌は厚生省が1996年「伝染病予防法」に基づく「指定伝染病」に定めた菌である．この中のO157：H7は1996年に約1万人の有症者と12人の死者を出した菌で，強い毒素を産生し，10^2個以下の菌量でヒトに食中毒を起こすとされている[3]．O157の分離は性状が類似した非病原性大腸菌と区別が難しく，時間がかかることから蛍光をラベルした抗体でO157の菌体抗原を識別するVIDASと，ベロ毒素を産生する遺伝子をPCRにより検出した．しかし，VIDASは，サルモネラO30群，*Escherichia hermannii*, *Citrobacter* spp, *Hafnia* spや*Yersinia enterocolitica* O：9などの菌と交差することが知られているし[4]，ベロ毒素遺伝子はO157以外にもO26，O111，O128などの大腸菌が保有することが知られている[4]．したがって，これら2つの検査法が陽性となってもO157以外の菌の可能性もあり，その後培養による菌の分離が必要であった．今回の実験でもハエ及びと畜場の下水からVIDASとPCRで陽性を示した検体は17検体中8検体あったが，O157が分離できた検体はなかった．

食中毒由来黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型はⅡ, Ⅲ, Ⅵ, Ⅶ型に集中して認められることからコアグラーゼ型は食中毒との因果関係を知る手段として，広く利用されている[4]．今回分離した黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型はⅢ, Ⅵ, Ⅶ型で食中毒の発生に結び付く可能性の高い菌であったが，エンテロトキシンの産生はなかった．また，黄色ブドウ球菌は，食中毒以外に，外毒素TSST-1による毒素性ショック症候群及び小児に多く見られる表皮剥奪毒素ET-A, ET-Bによる黄色ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群の原因菌としても知られている．さらに，抗生物質の効かないMRSAの出現が院内感染の重要な問題となっているが，今後は動物を介して広く環境中に分布することも心配されている．しかし，今回と畜場のハエから分離した黄色ブドウ球菌はMRSA, TSST-1, ET-A, ET-Bをいずれも保有しない株であった．

リステリアの１菌種である*Listeria monocytogenes*は，ヒトや動物に髄膜炎や，敗血症を起こすリステリア症の起因菌として知られている[5]．*L.monocytogenes*は低温でも増殖できる[6]ため，食品の低温流通が普及した現在でも，食品の製造及び製品の保管など食品管理において重要視されている．今回の調査では*L.monocytogenes*は分離されなかったが，環境中に多く分布する*L.innocua*が分離された．*L.innocua*が多く分布する検査材料中には，病原性のある*L.monocytogenes*が存在している可能性が高いと言われている[7]．また，と畜場では*L.monocytogenes*が枝肉や解体処理室などから分離されるだけでなく，解体処理室内に常在化していることが，われわれの調査で明らかになっていることから[8]，これら常在化した*L.monocytogenes*がハエにより運ばれて，枝肉や解体処理室内で汚染が広がる可能性についても注意が必要である．

食中毒起因菌の伝播はハエの体表に菌が付着して行われるのか，体内に取り込まれてその菌が排泄されることにより行われるのか．この点については，ハエの体表洗浄液と腹部内臓をすりつぶした液を調べた結果，どちらの検体からも大腸菌群は分離されたが，病原菌は分離されなかったため伝播に関与する菌の分布を明らかにすることはできなかった．この問題について，国立感染症研究所はO157を使い，菌はハエの体表に付着するだけではなく，消化管系のそ嚢内で少なくとも４日間保持されることを明らかにした[9]．したがって，他の病原菌もO157と同様の方法で運搬されることが考えられた．

今回の調査で，と畜場の処理室の下水からベロ毒素産生遺伝子VT1, VT2が検出されたが，目的のO175は分離できなかった．しかし，O157以外のベロ毒素産生大腸菌の分離を行えば，異なる血清型の菌が下水から分離できる可能性は高いと考えられる．今回ハエから分離した病原菌がと畜場内に分布していた菌であったかどうかは，と畜場の下水から大腸菌群以外の菌が分離できなかったので明らかではない．しかし，ハエの体表から大腸菌O45が分離され，この菌は豚に水腫を起こすことが知られている菌[10]であったことを考えると，ハエはと畜場内に分布していた菌を体表に付着させた状態あるいは，捕食した状態でと畜場内やその周辺地域を飛翔して，食品や環境を汚染することが考えられた．特にイエバエはキンバエが野外で活動するのに対して，家の中まで侵入するといわれていることから[11]，と畜場周辺地域の衛生を考えると，駆除しなければならない衛生害虫である．このことを受けて，と畜場ではハエの発生を防ぐためにトイレ及び解体処理室下水の整備や腸内容物の屋外堆積期間の短縮などの改善を行った結果，1997年以降，ハエは当と畜場内で激減した．

文　献

1）和田義人，篠永 哲，田中生男:ハエ・蚊とその駆除，1-67, 1990,日本環境衛生センター，川崎.
2）小久保彌太郎：モダンメディア，**43**, 107-116, 1997.
3）伊藤武，甲斐明美：化学療法の領域，**13**, 1115-1123, 1997.
4）伊藤武，甲斐明美，小畑浩魅：医学検査. **45**, 1461-1469, 1996.
5）寺山 武：臨床と微生物, **15**, 10-15, 1988.
6）飯田　孝，神崎政子，伊藤　武,丸山　務：衛研年報,**43** 87-91, 1992.
7）Seeliger, H.P.R.：*Infection*, **16**, 80-84, 1988.
8）水谷浩志，佐藤博行，鈴木輝康，他：日獣会誌，**46**, 343-346, 1993.
9）安居院宣昭：食品衛生研究，**47**, 30-33, 1997.
10）中澤宗生，末吉益雄：臨床と微生物，**23**, 843-849, 1996.
11）緒方 一喜，田中生男，和田義人，他：ハエ，ねずみ衛生害虫駆除ハンドブック，90-101, 1996, 日本環境衛生センター，川崎.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 28-32, 1999

臨床材料からのA型肝炎ウイルス（HAV）検索成績

新開敬行*, 森　功次*, 貞升健志*, 山崎　清*, 中村敦子*,
吉田靖子*, 平田一郎*, 関根大正**, 小久保彌太郎**

Detection of Hepatitis A virus from clinical samples

TAKAYUKI SHINKAI*, KOHJI MORI*, KENJI SADAMASU*, KIYOSHI YAMAZAKI*, ATSUKO NAKAMURA*,
YASUKO YOSHIDA*, ICHIRO HIRATA*, HIROMASA SEKINE** and YATARO KOKUBO**

The infectious hepatitis virus (HAV) was detected in samples from the patients diagnosed or suspected with hepatitis A using the PCR method, virus isolation and the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) methods.

The anti-HAV antibody was measured by the ELISA method.

The specimens were 30 fecal samples and 40 sera from 12 inpatients in Tokyo.

Hepatitis A virus (HAV) was detected from the feces (76.7%) and sera (25.0%) by the PCR method and the cell cultivation.

HAV was detected approximately 30 days after the symptoms of hepatitis A appeared.

Keywords：A型肝炎ウイルスHepatitis A，臨床材料Clinical samples，A型肝炎抗原検出法Detection methods of hepatitisA antigen,RT－PCR法Reverse transcliption coupled polymerase chain reaction method

はじめに

A型肝炎は，戦後，上下水道などの生活環境の整備により国内での感染率が低下した疾患の一つである．しかしながら，1996年に行われた年齢階層別のA型肝炎抗体保有調査では，50歳以上の年齢層は抗体陽性率が高いが，40歳以下では，およそ90%以上が抗体を保有していないことが報告されており[1]，若年層の罹患が危惧されている．

一方，近年は交通手段の発達による海外渡航者の増加や流通経路の発達により，生鮮食品が多く輸入されており，これに伴いA型肝炎の発生例も年々増加している．さらには，施設内感染や家族内感染などの報告例も見られるようになった[2]．A型肝炎ウイルス（HAV）による感染を予防するためには，その感染源および感染経路を特定することが重要である．我々は，これまでにHAVを迅速かつ正確に検出する目的で，遺伝子検査法（以下PCR法），ウイルス分離培養法および酵素抗体法（以下ELISA法）による検出法について検討し，報告してきた[3]．そこで，今回はこれらの方法を用いてA型肝炎患者由来材料からHAVの検索を行ったので，その成績を報告する．

材料と方法

1）検査材料

1997年2月から10月の間に都内の病院でA型肝炎と臨床診断された患者および疑似患者12名から採取したふん便30件，血清40件を対象にHAV検索を行った．患者の

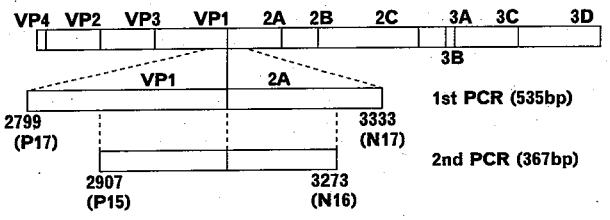


Fig. 1. HAV gene map with PCR primer

* 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

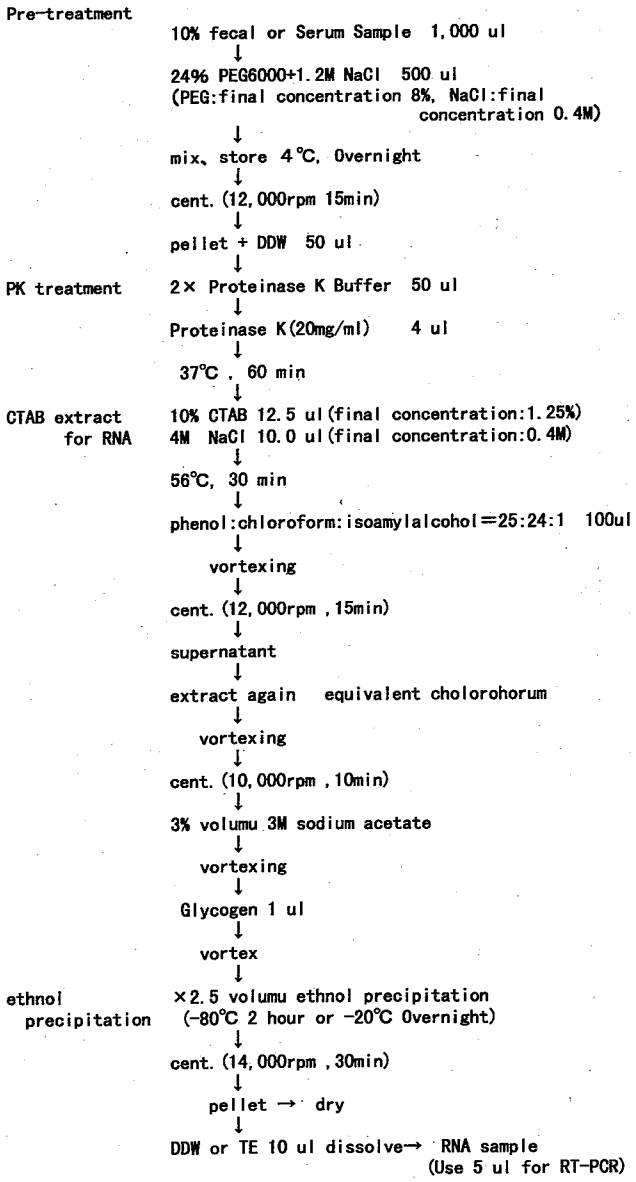


Fig. 2. Precipitation of HAV-RNA for RT-PCR test

Table 1. Detection of the HAV in clinical Samples

Tests	Samples	
	feces. N=30	Serum N=40
Antigen		
PCR	17 (56.7)	8 (20.0)
Culture	16 (53.3)	−
ELISA	7 (23.3)	−
Antibody		
ELISA-IgM	−	38(95.0)
ELISA-IgG	−	38(95.0)

( ) : %

内訳は，発症直前に海外渡航歴のあった患者4名（Kグループ；K-1～4のふん便11件，血清13件），国内での飲食物による感染が推定される患者3名（Fグループ；F-1～3のふん便2件，血清3件）および家族内感染による患者5名（Sグループ；S-1～5のふん便17件，血清24件）である．なお，Sグループの感染源はF-3であることがわかっている．

2）検査方法

HAVの検出は，ふん便については，PCR法，ウイルス分離培養法及びELISA法による抗原検査を実施した．各々の検査は，既報に準じて行った．すなわち，PCR法は，HAV遺伝子のVP1と2A接合部領域（2,903-3,269）についてRT-PCR法およびnested-PCR法を用いて標的遺伝子の検出を行った[4]（Fig.1）．遺伝子の抽出は，Fig.2に示す手順に従って行った[4),5)]．

また，細胞培養によるウイルス分離試験は，日本におけるワクチン作製用細胞であるGL37−21細胞を用いて30日間培養後，凍結融解した細胞懸濁液（cultivationsoup：CS）中のHAVをELISA法にて確認した[3]．

Table 2. Detection course of the HAV in world travellar's sample (Group K)

Case	course days	PCR		Antigen-ELISA		Antibody	
		feces.	serum	feces.	C.S*	IgM	IgG
K−1	1	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
K−2	1	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
	2	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	3	(−)	(+)	(−)	(−)	(+)	(+)
K−3	1	(+)	(−)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(+)	(−)	(+)	(−)	(+)	(+)
	4	(−)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
	7	(−)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
K−4	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	·	(+)	·	·	(+)	(+)
	14	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	16	(+)	(+)	(−)	(+)	(+)	(+)
	25	(−)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)

*C.S：Cultivation Soup ・：No Sample

Table 3. Detection course of the HAV in samples (Group F)

Case	course days	PCR		Antigen-ELISA		Antibody	
		feces.	serum	feces.	C.S*	IgM	IgG
F−1	1	(+)	(−)	(−)	(−)	(+)	(+)
F−2	2	(+)	·	(−)	(−)	·	·
F−3	54	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	58	·	(−)	·	·	(+)	(+)

*C.S : Cultivation Soup · : No Sample

Table 4. Detection course of the HAV infected in the family (Group S)

Case SEX(Age)	course days	PCR		Antigen-ELISA		Antibody	
		feces.	serum	feces.	C.S*	IgM	IgG
F−3	54	·	(−)	·	·	(+)	(+)
♂ (49)	58	·	(−)	·	·	(+)	(+)
S−1	4	·	(+)	·	·	(+)	(+)
♀ (41)	8	·	(−)	·	·	(+)	(+)
S−2	4	·	(−)	·	·	(+)	(+)
♀ (9)	6	(−)	·	(−)	(−)	·	·
	12	(+)	·	(−)	(+)	·	·
	21	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	24	(−)	·	(−)	(−)	·	·
	27	·	(+)	·	·	(+)	(+)
	29	(+)	·	(−)	(+)	·	·
	34	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	37	(−)	·	(−)	(+)	·	·
	39	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	42	(−)	·	·	(+)	·	·
	46	·	(−)	·	·	(+)	(+)
S−3	1	(+)	·	(−)	(+)	·	·
♂ (7)	8	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	14	·	(+)	·	·	(+)	(+)
	16	(−)	·	(−)	(+)	·	·
	24	(−)	·	(−)	(+)	·	·
	26	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	27	(−)	·	(−)	(+)	·	·
	31	·	(−)	·	·	(+)	(+)
S−4	1	·	(−)	·	·	(−)	(−)
♀ (5)	2	(+)	·	(+)	(+)	·	·
	6	·	(−)	·	·	(−)	(−)
	10	(+)	·	(+)	(−)	·	·
	13	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	18	(+)	·	(+)	(+)	·	·
	20	·	(+)	·	·	(+)	(+)
	23	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	24	(−)	·	·	(+)	·	·
	34	·	(−)	·	·	(+)	(+)
S−5	1	·	(−)	·	·	(+)	(+)
♀ (1)	8	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	10	(+)	·	(−)	(−)	·	·
	15	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	17	(+)	·	(−)	(+)	·	·
	20	·	(−)	·	·	(+)	(+)
	22	(−)	·	(−)	(−)	·	·
	27	·	(+)	·	·	(+)	(+)
	34	·	(−)	·	·	(+)	(+)

*C.S : Cultivation Soup · : No Sample

ELISA法による抗原検出及び抗体検出は，A型肝炎抗体検査用キットHAT-EIAとHAM-EIA（デンカ生研製）を用いて実施した[3]．

各検出法に要した日数は，RT-PCR法で4日，細胞培養法で30日，抗原ELISA法では2日，抗体測定ELISA法で1日であった．

結　果

1）HAV検査成績

A型肝炎患者のふん便30件及び血清40件を対象に実施したHAV検査の結果をTable 1に示した．

ふん便30件について抗原検査を行ったところ，PCR法で17件（56.7%）からHAV遺伝子が検出された．また，ウイルス分離試験で16件（53.3%）からHAVが分離され，ELISA法では7件（23.3%）からHAV抗原が検出された．

血清40件については，PCR法による抗原検査とELISA法による抗体検査を実施した．その結果，抗原検査では40件中8件（20.0%）が陽性であり，抗体検査では供試した40件中38件（95.0%）の血清が抗HAV-IgM抗体，抗HAV-IgG抗体ともに陽性であった．

2）KグループのHAV検出成績

発病前に海外旅行をしていた患者4名のHAV検出成績をTable 2に示した．

PCR法では，4名全てからHAV遺伝子が検出された．K-1とK-3では，発症直後のふん便から，K-2では，発症直後のふん便と発症3日目の血清から，また，K-4では，発症後16日目までのふん便3件と血清4件からHAV遺伝子が検出された．

ウイルス分離試験では，HAVが分離されたのは，K-3，K-4の2名であり，K-3は発症直後のふん便，K-4は発症後16日目までのふん便3件からHAVが分離された．また，ELISA法では，K-3の発症直後のふん便とK-4の発症後14日目までのふん便2件からHAV抗原が検出された．

3）FグループのHAV検出成績

国内で飲食物による感染が疑われた患者3名のうち，F-1とF-2は，PCR法により，発症直後のふん便からHAV遺伝子が検出されたが，HAVは分離されなかった．

F-3は，ふん便が採取できず，発症後約2ヶ月の血清についてPCR法を行ったが陰性であった（Table 3）．

4）SグループのHAV検出成績

F-3を感染源とする家族内感染例におけるHAV検出成績をTable 4に示した．

S-1は，血清2件についてPCR法を行ったところ発症後4日目の血清からHAV遺伝子が検出された．

S-2は，PCR法では発症後12日と29日目のふん便及び27日目の血清からHAV遺伝子が検出された．分離試験では，発症後12,29,37,42日目のふん便からHAVが分離されたが，ELISA法によるHAV抗原は全て検出されなかった．

S-3は，発症直後のふん便及び14日目の血清からHAV遺伝子が検出された．また，発症後27日目までのふん便4件全てからHAVが分離された．

S-4は，発症後18日目までのふん便3件及び20日目の血清からHAV遺伝子が検出され，発症後24日目までのふん便4件中3件からHAVが分離された．また，ELISA法では，18日目までのふん便3件が陽性であった．

S-5は，発症後17日目までのふん便2件と27日目の血清からHAV遺伝子が検出された．HAVは，発症後17日目のふん便から分離されたのみであった．

考　察

A型肝炎は経口により感染し，2～6週間の潜伏期を経て38℃以上の発熱，全身倦怠感，食欲不振，嘔吐等の前駆症状を呈し，遅れて肝炎に顕著な黄疸症状が見られる[6]．臨床では多くの場合，肝腫および黄疸の症状と抗HAV-IgM抗体の確認によりA型肝炎と診断されている．

A型肝炎は,ウイルス分離等の抗原検査が行われていない，潜伏期間が長い，比較的短期間で症状も軽減する等の種々の要因により，A型肝炎流行時における感染源や感染経路等の疫学解析がほとんどなされていないのが現状である．そこで我々は疫学調査には不可欠であるHAV検出を，前回検討した検査法を用いて行った[3]．

我々が，今回用いたPCR法，細胞培養法及びELISA法のHAV抗原検出感度は，実験的にはPCR法が最も高く，検出可能なウイルス粒子数は，それぞれ，1 mlあたり10^2個，10^5個，10^8個であった[3]．

患者ふん便からのHAV検出率は，PCR法で56.7%，細胞培養法で53.3%，ELISA法で23.3%であり，PCR法と細胞培養法の検出率は，ほとんど同程度であった．

これは，ふん便成分の影響でPCR反応が阻害されたことにより,PCR法の検出率が低下したことが考えられる．今後，ふん便成分中の反応阻害因子を除去するために前処理法，抽出法の改良を検討する必要がある．ELISA法は，ふん便材料において検出率が低く，抗原検査法として適していないことが判明した．

A型肝炎は，魚介類や井戸水を介した感染例が多いことが知られている．特に中国や東南アジアでは，井戸水による流行が多い．我々が行った二枚貝におけるウイル

ス汚染実態調査でも東京湾産の二枚貝では，6.7%，市販流通二枚貝では,2.5%からHAVを検出している[7), 8)]．Kグループの４名は，いずれも帰国後１週間から３週間以内に発症しており，海外でHAVに汚染された飲料水や魚介類の喫食による感染が推察される．

F-3（父:49歳）は，12中旬の忘年会において、生カキの喫食による感染が疑われた患者である．１月上旬に発症し，その後，F-3を感染源とするＳグループの家族内感染が２～３月にかけ発生した．この感染例は，F-3が発症した33日後にS-2（長女：９歳）が発症，次いで47日目にS-3（長男：７歳），53日目にS-1（母：41歳），60日目にS-5（三女：１歳），69日目にS-4（二女：５歳）が順に発症した．その他，我々は検査を実施していないが祖母の発症も確認され家族７名全員が感染，発症した例である．この事例の疫学解析にあたっては，今回我々が行ったHAV抗原および抗体検査成績が有効に活用されたことは言うまでもない．また，感染から治療終了までの長期にわたり検査できたことから，患者ふん便へのHAV排出は最長で発症後42日（平均で約30日）もの間続いていることが明らかとなり，これまでの左近ら[9)]や杉枝ら[10)]の報告と同様の成績であることが確認された．

現在，HAVの遺伝子型は，１～７型までの７種類に大別され，１型と３型にはＡ・Ｂ２つの亜群があることが知られている[5), 11)]．今回は分離したHAVについて遺伝子型は検討しなかったが，分離株の遺伝子型を決定することは疫学解析上，有力な手段となり得るので今後は遺伝子型についても検討していきたい．

まとめ

１．Ａ型肝炎患者のふん便30件を対象に抗原検査を実施したところ，PCR法で17件（56.7%），細胞培養法で16件（53.3%），ELISA法で８件（23.3%）からHAV抗原が検出された．

２．HAVのふん便中への排出は最高で42日目まで続き，平均では約30日であった．

３．Ａ型肝炎患者の血清40件について，PCR法による抗原検査とELISA法による抗体検査を実施したところ，40件中８件（20.0%）がHAV抗原陽性であり，38件（95.0%）が抗HAV-IgM，抗HAV-IgG抗体ともに陽性であった．

文　献

1）T.Kiyohara, T.Satoh, H.Yamamoto,et al：*Jap.J.Med. Science & Biology*, **50**, lss3, 123-131, 1997.

2）Guyader, F, L., Dubois, E. D., Pommepuy, M：*Appl. Env. Microbiol*, **60**, 3665-3671

3）新開敬行,吉田靖子,平田一郎他：東京都立衛生研究所年報, **48**, 13-17, 1997

4）戸塚敦子，森次保雄：臨床とウイルス，**23-Supplement**, 253-256, 1995

5）Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B.,et al：*J.Gen. Virol.*, **73**, 1356-1377, 1992

6）飯野四郎：臨床とウイルス, **23-Supplement**, 251-252, 1995

7）藤田満，寺村渉，新開敬行他：東京都衛生局学会誌, **99**, 230-231, 1997

8）藤田満，小川恭正，新開敬行他：東京都衛生局学会誌，**101**, 332-333, 1998

9）左近直美，山崎謙治，奥野良信：*IASR*, **18**, 212, 1997

10）杉枝正明，秋山真人，川森文彦他：静岡県衛生環境センター報告, **33**, 61-64, 1990

11）戸塚敦子，森次保雄：日本臨床，**51**, 267-274, 1993

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 33-38, 1999

Cryptosporidium muris オーシストの検出および同定法の検討

鈴木　淳*, 村田理恵*, 村田以和夫*, 柳川義勢**, 諸角　聖**

A Method for Detection and Identification of *Cryptosporidium muris*

JUN SUZUKI*, RIE MURATA*, IWAO MURATA*, YOSHITOKI YANAGAWA**, SATOSHI MOROZUMI**

Cryptosporidium parvum (*C. parvum*) is known as protozoa that causes diarrheal disease in normal as well as immunocompromised individuals. However, it was reported in 1996 that 2 children in Indonesia had been infected with *Cryptosporidium muris* (*C. muris*), which was thought to cause diarrhea in animals. So it is necessary to develop laboratory diagnostic techniques for detection and identification of *C. muris* oocysts.

In this study, the detection methods of *C. muris* oocysts, such as immunofluorescence assay, Nomarski differential interference contrast microscopy and acid fast staining method, were examined with *C. muris* oocysts purified from the stool of cattle. In addition, as a new method, the microstructure of *C. muris* oocysts was directly observed using a low-vacuum scanning electron microscope (LV-SEM).

In the results of this study, both *C. muris* and *C. parvum* oocysts showed varying degrees of cross-possitive activity with an immunofluorescence detection kit (FL Crypt-a-Glo) for *C. parvum*. With the new method using LV-SEM, it could be observed the fine microstructure of *C. muris* oocysts such as cyst-wall and sporozoites at 5,000X magnification. Therefore, these results were concluded that the LV-SEM method is useful for identifying either *C. muris* or *C. parvum* oocysts.

Keywords：*Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris*, 抗酸染色法acid-fast stain, 蛍光抗体法immunofluorescence assay, 低真空走査型電子顕微鏡low-vaccum SEM

緒　言

クリプトスポリジウムは1907年にマウスの胃粘膜から最初に発見された原虫である[1]．当初ヒトへの感染は不明であったが，1976年に免疫不全者への感染がはじめて報告[2]されて以来，欧米では本原虫が免疫不全患者重傷下痢症の原因として注目されてきた．その後，免疫健常者においても一過性の急性下痢症を引き起こすことが明らかとなった[3]．

ほ乳類に寄生するクリプトスポリジウムには小腸粘膜上皮細胞に寄生する小型種の*Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*)，胃粘膜上皮細胞に寄生する大型種の*Cryptosporidium muris* (*C. muris*) が知られている．これまでヒトに感染して急性下痢症を引き起こす原虫としては主に*C. parvum*が注目されてきた．本邦でも1993～1996年の間に神奈川で400人以上，埼玉で8,000人規模という２度にわたる大規模な*C. parvum*の水系感染による集団下痢症の発生が報告されている[4, 5]．一方，勝又ら[6]はインドネシアでの調査で，主にウシやネズミに寄生するとされていた*C. muris*オーシストの人体感染例として，健康な幼児に本原虫オーシストが見いだされたことを報告している．今後，*C. parvum*だけでなく*C. muris*による原虫症に対する検査法の改良や検査体制の整備が必要である．

今回，抗酸染色法とFITC標識抗*C. parvum*オーシストモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による*C. muris*の検出及び低真空走査型電子顕微鏡（低真空SEM）により本原虫を観察，鑑別及び同定する方法を検討したのでその結果を報告する．また，厚生省の暫定試験方法[7]

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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
** 微生物部細菌第一研究科

に示されるメンブランフィルター法は，蛍光染色時にフィルターが破れやすい，スライドグラス上で気泡が入りやすい，微分干渉顕微鏡により原虫の微細立体構造を観察するためには光の透過率が不十分といった問題点があげられる．そこで，これら問題点の解消を目的としてオーシストを直接スライドグラスに固定する方法についても検討したので合わせて報告する．

材料及び方法

1．*C. muris*オーシストの採取

*C. muris*に感染したウシの便（性状：泥状）から比重1.2のショ糖液を用いた遠心浮遊法で本原虫オーシストを精製し，10%中性ホルマリン水溶液で固定したものを濃縮試料として用いた．

2．オーシスト固定用スライドグラスの性能比較

病理組織検査に用いられる3-aminopropyltriethoxysilane（APS）でコートされた疎水性スライドグラス，MASRでコートされた親水性スライドグラス(各マツナミ社製)及び対照として通常のスライドグラスの3種について，暫定試験方法のメンブランフィルター法とオーシストの剥離状態を比較検討した．観察用試料は60℃の加温板上の各スライドグラス上に*C. muris*濃縮試料を塗布し，試料中の水分が蒸発乾燥するまで水平位に静置して固定した．次に，蛍光抗体染色を行い，染色操作によるスライドグラス表面からのオーシストの剥離率を調べた．

3．抗酸染色法

スライドグラスに固定した*C. muris*濃縮試料を抗酸染色（井関の変法[8]）を行い，鏡検によりオーシスト壁やスポロゾイドの形態を観察した．

4．蛍光抗体染色法

スライドグラスからオーシストの脱落を可能な限り減らすために染色工程の短い*C. parvum*用直接蛍光抗体のキットFL Crypt-a-Glo（Waterborne社）を使用し，以下の方法で染色した．

1）スライドグラスに固定した*C. muris*濃縮試料をメタノールで5分間再固定した．
2）*C. muris*オーシスト以外の粒子へ抗体の非特異的吸着を防止するためブロッキング用の1%BSA液を塗抹面に滴下し，室温で3分間放置した．
3）スーパーブロック（ScyTek社）で20倍に希釈した*C. parvum*用FITC標識IgMモノクローナル抗体Crypt-a-Glo（Waterborne社）をスライドグラスの塗抹面に滴下し，湿潤箱に入れ，36℃で30分間遮光静置し，*C. muris*とモノクローナル抗体を反応させた．
4）*C. muris*オーシストに包蔵されている4個のスポロゾイドに存在する核を染色するためにDAPI染色液をスライドグラスの塗抹面に滴下し，室温で1分間染色した．（DAPI染色液：DAPI 1 mgをメタノール0.5mlに溶解し，そのDAPI溶解液をPBSで0.4mg/mlに希釈したもの．）
5）イオン交換水でDAPI染色液を洗浄(1～3秒)後，蛍光試薬の退色を減少させるため，DABCO /glycerol固定化液で封入して検鏡した．
6）UV励起下で*C. muris*オーシストの蛍光像を確認した後，明視野で微分干渉装置に切り替えて本原虫の微細立体構造を観察した．

5．低真空SEMによる*C. muris*オーシストの観察法

筆者ら[9]が報告した*C. parvum*の観察・同定法に従い次の手順で観察を行った．

1）濃縮試料を平均孔径3.0 μmのSEM専用試料載台（日本電子データム㈱）でろ過し，オーシストをSEMの観察試料載台に吸着させた．
2）試料載台上の試料に蒸留水2 ml滴下し，載台下に装着したシリンジで吸引しながら2回洗浄した．
3）試料載台を専用試料ホルダーに装着し，発泡スチロール製の断熱容器内に置き，試料載台周囲に液体窒素を静かに注入して試料を凍結させた．冷却時間は試料の凍結直後から約40秒間とした．
4）凍結試料を速やかに低真空SEM（JSM-5600LV型日本電子㈱）内の試料ステージに装着し，試料室の真空度を60Paに減圧し，ゆっくりと約60分間かけて低真空SEM内の試料の氷を完全に昇華させた．
5）低真空SEM内の試料の氷を完全に昇華させた後，試料室の真空度を20Pa，加速電圧15～20kVの範囲で設定し，*C. muris*オーシストを倍率500～5,000倍までの範囲で検索及び内部構造を観察した．

結果及び考察

1．*C. muris*オーシスト固定用スライドグラスの比較結果

疎水性のAPSコートスライドグラス，親水性のMASコートスライドグラス，無処理のスライドグラスを用いて，*C. muris*オーシストの捕捉状態を計数し，暫定試験方法のメンブランフィルター法と比較検討した．

Table 1に示すように，メンブランフィルター法によるオーシスト捕捉率を100%とした場合，親水性のMASコートグラスの捕捉率が約70%，無処理のスライドの捕捉率が約30%に対して疎水性のAPSコートグラスでは90%以上の捕捉率であった．この結果から，疎水性の

Table 1. Fixation of *Cryptosporidium* oocysts to membrane filter and three types of slideglass

fixation method	fixation no. of oocusts	fixation % of oocysts*
Membrane filter※	95	—
Hydrophobic APS-coat slide (Mastumami Co.)	86	91 %
Hydrophobic APS-coat slide (Mastumami Co.)	66	69 %
Non-coated slide	28	29 %

*1 : fixation %=$\frac{\text{fixation no. with each three types slideglass}}{\text{fixation no. with membrane filter}}\times 100$

※2 : a provisional determination method of *Cryptosporidium* oocysts by The Ministry of Health and Welfare

APSコートスライドグラスを用いる方法は，メンブランフィルター法におけるフィルターの強度，光の透過率及び作業工程等の諸問題を解消できると考えられる．

2．抗酸染色法による観察結果

スライドグラスに固定した試料を抗酸染色した場合，*C. muris*はオーシスト内のスポロゾイドや残体が赤～淡赤色に染色された．*C. muris*は短径4～5 μm，長径7～8 μmの楕円形で小型種の*C. parvum*と比べオーシストに包蔵されるスポロゾイドが細長く大きいことが観察できた（Fig. 1）．

3．蛍光抗体法による観察結果

現在，FITC標識*C. muris*オーシスト用モノクローナル抗体のキットは市販されていない．FITC標識抗*C. parvum*オーシスト用モノクローナル抗体のキットは間接及び直接蛍光抗体の2種類が市販されている．今回，FITC標識抗*C. parvum*用モノクローナル抗体のキットを用いて*C. muris*のオーシストを染色した結果，小型種の*C. parvum*と同様にオーシスト壁が淡緑色の蛍光を発する像が得られた（Fig.2）．また，DAPI染色法では*C. parvum*と同様に4つのスポロゾイドの核を青紫色の蛍光像として確認することができた（Fig.2）．同視野を微分干渉顕装置に切り替えて，本原虫の立体構造を観察した結果，スポロゾイドと残体を確認することができた（Fig.3）．

これらの結果から，FITC標識*C. parvum*用モノクローナル抗体試薬による検査法は2種のクリプトスポリジウム原虫の検索に応用できることが明らかとなった．このことから，2種のオーシスト壁には共通の抗原性があると推定される．

4．低真空SEMによる*C. muris*オーシストの観察結果

低真空SEMにより，*C. muris*オーシストは1,000倍以上の倍率でその存在が確認できた．また，5,000倍の倍率では，光学顕微鏡や金蒸着処理を伴う従来の走査型電子顕微鏡では観察が困難なスポロゾイドやオーシスト壁等の内・外部微細構造を観察・確認することができた．小型種である*C. parvum*と比較した場合，*C. muris*は形が大型の楕円形で，内部に包蔵されているスポロゾイドが大きく細長いことが判明した（Fig. 4）．また，低真空SEMによる観察法は，オーシストの内部構造を詳細に観察できる点と，コンピューターに保存してある画像により*C. muris*のオーシストやスポロゾイドの大きさや形態について容易に*C. parvum*や他の夾雑物と比較検討できる点できわめて有用である．更に，本法は濃縮試料から観察までの作業行程が短く，しかもSEM専用試料載台を用いることにより，暫定試験方法のメンブランフィルター法による濃縮操作と同様にオーシストの脱落がないことも長所である．

まとめ

近年，小型種である*C. parvum*オーシストによる集団下痢症が先進諸国で重大視されている．これまであまり注目されていなかった*C. muris*の人体感染例が報告されるなど，今後，*C. muris*が原因とされる新たな感染症への検査方法の改善や検査体制の整備が急がれる．今回，ウシより採取した*C. muris*オーシストについて，抗酸染色法，蛍光抗体染色法及び低真空SEMを用いた検出及び同定法を検討した．その結果，*C. parvum*用蛍光抗体キットを用いた蛍光抗体染色法は大型種，小型種2種のオーシストの検査に応用可能である．更に，低真空SEMを用いた方法では，オーシスト内部のスポロゾイドの形態を判別できることから，*C. muris*と*C. parvum*オーシストの鑑別・同定が可能である．

謝　辞

低真空SEMによる*C. muris*オーシストの観察に際し，技術的な助言をいただいた日本電子株式会社　鈴木武雄氏，樋岡美紀子氏に深謝いたします．

文　献

1）Tyzzer,E.E：*Soc.Exp.Biol.Med.*, **5**, 12-13, 1907.
2）Nime,F.A., Burek,J.D., Page, D.L., Holscher, M.A., Yardley, J.H.：*Gastroenterology*, **70**, 592-598, 1976.
3）Navin, T.R., Juranek,D.D.：*Reviews on Infected Didease*, **6**(B), 313-327, 1984.
4）黒木俊郎，渡辺祐子，浅井良夫，他：感染症誌，**70**, 132-140, 1996.
5）埼玉県衛生部：クリプトスポリジウムによる集団下痢症－越生町集団下痢症発生事件－報告書，1997.
6）勝又達哉：日本内科学会雑誌，**86**, 48-53, 1997.

7）厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験法」，平成10年６月19日，衛水第49号.

8）井関基弘：月刊MEDICAL TECHNOLOGY別冊 染色法のすべて，320-321，医歯薬出版，東京，1998.

9）鈴木淳，村田以和夫，村田理恵，他：日食微誌，**14**(4), 187-191, 1998.

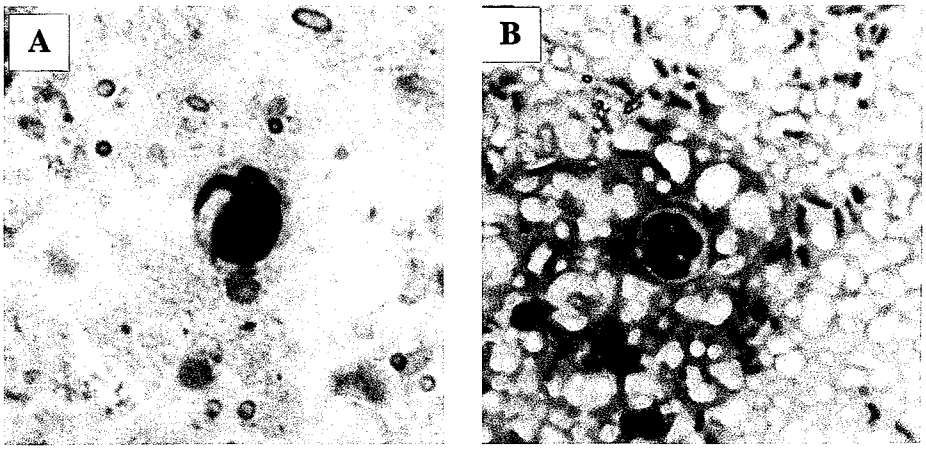


Fig. 1. Microscopy of *C. muris* and *C. parvum* stained with acid-fast staining (magnification, ×1,000)
(A) *Cryptosporidium muris* (B) *Cryptosporidium parvum*

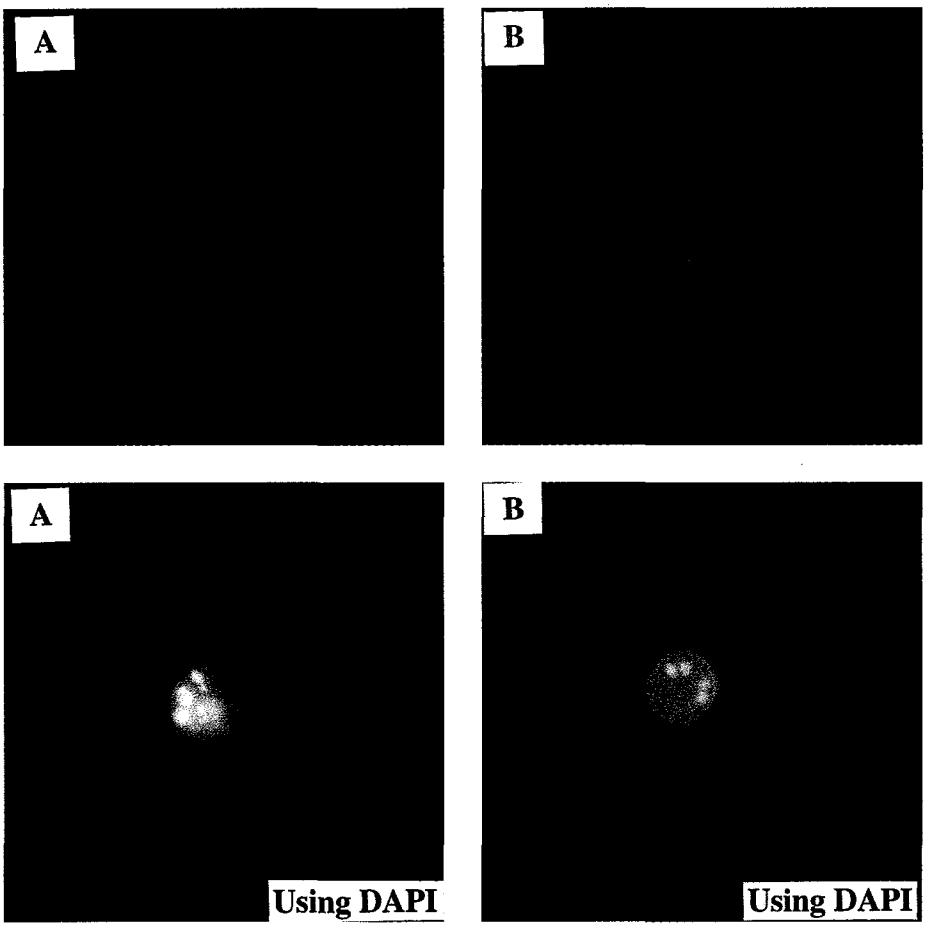


Fig. 2. Microscopy of *C. muris* and *C. parvum* by a direct immumofluorescence assay and fluorogenic assay of sporozoite nuclei using DAPI (magnification, ×1,000)
(A) *Cryptosporidium muris* (B) *Cryptosporidium parvum*

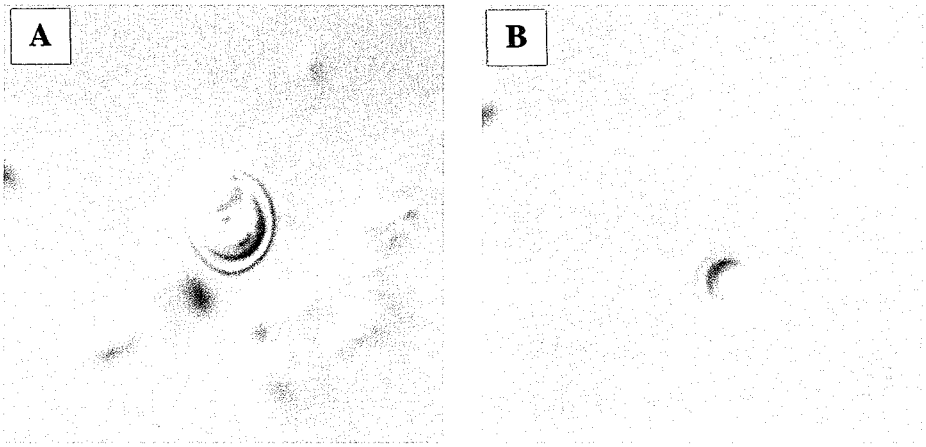


Fig. 3. Microscopy of *C. muris* and *C. parvum* viewed under Nomarski differential interference contrast microscopy (magnification, ×1,000)
(A) *Cryptosporidium muris* (B) *Cryptosporidium parvum*

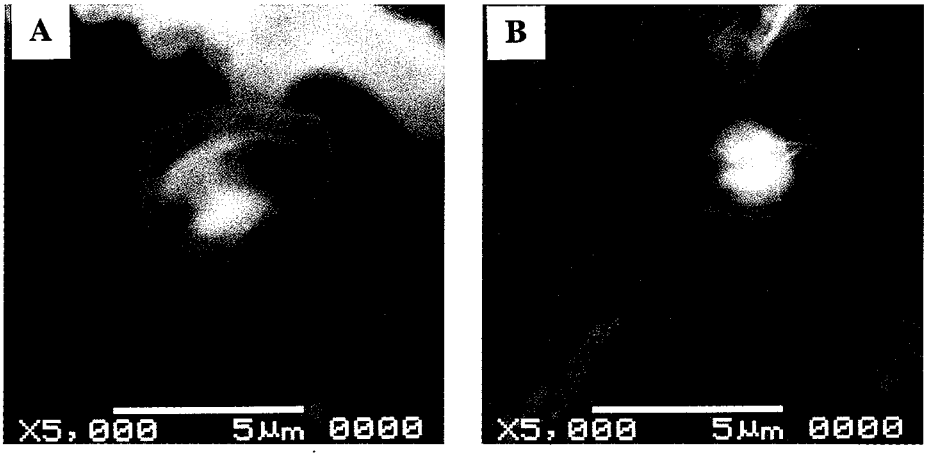


Fig. 4. Scanning electron micrographs of *C. muris* and *C. parcum* dried low-vacuum SEM freeze-drying method method (accelerating voltages : 15kV, magnification : ×5,000)
(A) *Cryptosporidium muris* (B) *Cryptosporidium parvum*

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，医薬部外品，化粧品，療品及び家庭用品に関する調査研究は，通常の行政試験検査業務を補完し，向上発展させることを目的に行われている．今年度は，医薬品に関して 4編，化粧品に関して 4編，家庭用品に関して１編が掲載されている．

現在，アニサキス症は外科手術又は胃内視鏡による虫体除去以外に適切な治療は行われていない．そこで，著者らは漢方方剤等をアニサキス症治療に適用する目的で，有効性の確認，その成分の特定及び単離を行ってきた．これまでに殺線虫作用の強い化合物として，ショウガ科生薬の良姜から1,7-diphenyl-4-hepten-3-one，同じく鬱金から*ar*-turmeroneを単離した．今回は，鬱金と同じ*Curcuma*属の1種類の生薬から有効成分として新たな殺線虫物質xanthorrhizolを単離し，その化学構造式を明らかにした．これらの研究は，アニサキス症治療に薬剤投与による化学療法が加えられる道を開いたと評価できる．

高品質で優れた医薬品等の製造を目的として，昭和55年，厚生省令により「医薬品等の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP)」が定められた．平成８年にはGMPの科学的検証とその文書化（バリデーション）が実施された．これに伴い，東京都は都内の各医薬品製造所がバリデーションに円滑に対応できるよう，行政支援を行うこととした．当所では，この支援業務の中で，特に品質管理における規格試験法，分析機器整備等の科学的妥当性に関する助言指導を担当している．以下の３編は，これらの事例報告である．

最初の製造所においては,昭和55年に設定された規格試験では製品の成分が分離定量できないことが分かった．このままでは製品の均質性が担保されないことから，サンプリング法，成分の確認及び定量試験法等の作成を指導した．この結果，良好な精度の分析法が確立され，製品中の主成分が均質であることを検証できるようになった．また，ロットによっては規格から偏りのある製品が混在することが判明し，今後の検討課題として指摘した．

次の製造所では，特に製品試験室の機器整備及び試験担当者の健康影響を考慮する必要を指摘し，簡便で高精度の試験法設定について助言した．これを受け，従来の製造工程管理に加え，職場環境の整備及び品質管理を重視した体制が整備され，規格不適合の製品が急減する成果を得た．

最後の報告では7社について，各社でバリデーション実施に向けての取り組みが異なり，その進行速度にも差が見られたと述べている．すなわち，品質管理に必要な試験室及び試験担当者の質的向上が急務と思われる例から試験法の改良により短期間で製造工程の短縮，効率化を実現できた例まで様々であった．

化粧品は薬事法により製造や輸入販売等の許可が品目の他に，清浄用，頭髪，基礎化粧品等の種別でも規制されており，品質確保のため，品質基準及び原料基準が定められている．しかし，流通している化粧品の種類と数量は厖大であり，化粧品及びこれに係わる皮膚障害の発生に関する苦情は多い．このため，化粧品の品質評価に不可欠である行政検査の需要は増大しているが，充分には対応できない．そこで，化粧品の構成成分を短時間で多種類分析できる方法を開発し，検査の効率化を図り検査需要に応えようと努力している．これに関する報告が初めの２題である．更に，検査精度を高める目的で，分析方法等の改良・開発を行い，その成果を通常検査に反映させている．これに関する報告が次の２題である．

化粧品検査の効率化を目的として，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて化粧品の表示対象成分及び配合規制成分の一斉分析法を検討した．紫外線吸収剤６種類及び防腐剤 9種類を同時にHPLCで分析したところ，吸収波長の相違により各成分を確認できた．この方法を用い，市販のスキンクリーム等を分析した結果も良好であり，通常の検査に適用できることを確認，業務の効率化が促進された．

化粧品中のタール色素の分析には薄層クロマトグラフィー（TLC）法やHPLC法が汎用されているが，更に効率的な方法を検討した．今回は，キャピラリー電気泳動（CE）法を用い，化粧品及び医薬部外品中の水溶性タール色素16種類の一斉分析を試みた．この結果，CE法はTLC及びHPLC法に比べ，分析の精度及び操作性に優れ，分析時間も短縮できることが分かった．本法を市販製品の検査に適用したところ，簡便な試料調整のみでタール色素を短時間で高精度に分析可能であり，効率的な検査法であると評価できる．

ホルムアルデヒド遊離型殺菌剤のうち我国では許可されていない5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane（BND）が成分として容器に表示されていたため，ある輸入ボディシャンプーが違反品とされた．BND検出に際し，従来の分析法の精度及び再現性にやや問題があったことから，分析法の改良を試みた．この結果，従来法での問題点を解決し，違反品にBNDが存在することを確認，濃度も80ppmと数値を確定できた．

ベルガモット油は香油として芳香化粧品に添加されるが，その成分であるベルガプテンは光毒性物質であり，皮膚障害の原因物質の一つとして古くから知られている．しかし，芳香化粧品へのベルガモット油の添加量は規制されていないことから，使用実態の現状を調査することとした．先ず，ベルガプテンの分析法を改良し，簡便な操作で，高い精度を実現，更に有害性の低い溶媒を用いるクリーンアナリシスも達成できた．この改良法を用い市販製品を調査したところ，27検体中8検体から102～2,030ppbのベルガプテンを検出したが，いずれも皮膚障害発生の危険を予測する濃度ではないと判断した．

近年，家庭用品に係わる健康被害の報告では，ピアス等の装飾品によるアレルギー性接触皮膚炎の発生事例が常に全体の約20%を占めている．そこで，被害の未然防止を目的として市販装飾品の品質調査を行い，ピアス，イアリング等は金，銀とニッケルの合金あるいはメッキ製品が多いことを報告した．今回は，アレルギーの主原因とされている遊離ニッケルの検出及び各種金属の人工汗液への溶出を検討した．遊離ニッケルはピアスで33%，イアリングで38%から検出され，人工汗液への溶出試験ではニッケル，銅，亜鉛が確認された．この結果は，これら装飾品の使用とアレルギー発症との関連を示唆していると考えられる．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 41-48, 1999

タイ産*Curcuma*属生薬の*Anisakis* I 型幼虫に対する運動抑制効果およびその殺線虫成分に関する検討

鈴木　淳*, 村田以和夫*, 安田一郎**

Inhibitory Effects of Thai *Curcuma* spp. on Mevement of *Anisakis, simplex* and Larvicidal Compound

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

Anisakiasis is a parasitic disease of the digestive tract caused by ingesting the larvae of *Anisakis simplex*. However, there are no effective methods for treatment of anisakiasis without surgery.

As the result of a bioassay, *ar*-turmerone isolated from *Curcuma longa* and 1,7-diphenyl-4-hepten-3-one isolated from *Alpinia officinarum* were found to have an impact upon larvicidal effects. So, we remarked on several species of the genus *Curcuma*, native to southeastern Asia and studied the inhibitory effect of nine species of Thai *Curcuma* spp. on larvae movement.

The bioassay directed for fractionation from Nang Kun (S-1) has led to the discovery of bisabolane type sesquiterpenoid, xanthorrhizol. 100% minimum lethal concentration (MLC) of the compound was 0.29 mM and was between 2 and 3 times more effective against the larvae than cinnamic aldehyde (MLC : 0.47mM) and anethole (MLC : 0.84 mM).

Keywords：クルクマ属生薬 crude drugs of *Curcuma* spp.，アニサキス *Anisakis simplex*，運動抑制効果 inhibitory effect on movement，殺線虫物質 larvicidal compound

緒　言

アニサキス症は人体内で胃や腸などに穿入し，胃腸炎などの症状を引き起こす幼虫移行症である．現在までのところ外科手術と胃内視鏡による幼虫の摘出以外に適切な治療法はなく，化学療法剤によるアニサキス症に対する治療法は確立されていない．

これまで著者らは漢方方剤，生薬及び香辛料に含有される抗アニサキス作用物質を検索し，本症治療の可能性を検討してきた．その結果，消化器系疾患に用いる漢方方剤に*Anisakis*の運動抑制効果を持つものが多く，その一つにショウガ科生薬である良姜から殺線虫作用の強い化合物1,7-diphenyl-4-hepten-3-oneを単離[1]した．また，主にタイ，東インド，インドネシアなどの熱帯・亜熱帯地域で栽培され，古くから健胃，利胆及び利尿作用[2,3]を有する生薬としてだけでなく香辛料としても広く利用されている鬱金（ターメリック）から比較的即効性があり強い殺線虫作用を持つ*ar*-turmeroneを単離[4]し報告してきた．

今回，ショウガ科生薬，特に強い殺線虫作用の認められた鬱金と同属の*Curcuma*属生薬に着目した．そこでタイ，バンコク市場で9種類の*Curcuma*属生薬（S-1～S-9）を入手し，それらのメタノール抽出エキスについて*Anisakis* I 型幼虫に対する運動抑制効果を検討したところ良好な結果が得られた．更に，これらのうち強い運動抑制効果が認められたNang Kun（S-1）に含有する殺線虫物質の化学構造式を明らかにしたので報告する．

材料及び方法

1．*Anisakis* I 型幼虫

スケトウダラの肝臓表面に被嚢している*Anisakis* I 型幼虫を採取し，試験管内で活発なS字運動をするものだ

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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
** 理化学部医薬品研究科

けを選び実験に用いた．

2．被検生薬

タイ，バンコク市場で健胃薬や香辛料などとして市販されているNang Kun (S-1)，Kmin Ouy (S-2)，Kmin Kom (S-3)，Kmin Hougkun (S-4)，Kan Tamala (S-5)，Jai Dum (S-6)，Van Pet Ma (S-7)，Kmin Chan (S-8)，King Coblar (S-9)，計9種類の*Curcuma*属生薬（Fig.1）を用いた．

3．*Anisakis* I型幼虫に対する運動抑制効果の判定法

各種被検液をそれぞれ20mlをガラスシャーレに分注し，*Anisakis* I型幼虫を10虫体ずつ各被検液に投入後，20℃のフラン器に入れ，1時間，3時間及び24時間後に本虫体の運動性及び生存状態を観察した．運動性の評価は既報[5]に準じ，以下に示す基準により判定した．また，対照として0.4%NaCl水における本虫体の運動性及び生存状態について観察し，次の通り表示した．(−)：運動停止（死滅），(+)：虫体に直接刺激を与えるとわずかに運動する，(++)：シャーレに弱い刺激を与えると自発的固有運動（巻き込み運動）を示す，(+++)：自発的に活発なS字状運動を示す

4．被検生薬液の調製

S-1～S-9の9種類の生薬を乾燥後に粉砕し，その各粉末200～300gにそれぞれメタノール300～400mlを加え，室温で24時間静置し抽出した．本操作を2回繰り返した後，メタノール抽出液を合わせ溶媒を減圧留去して，メタノール抽出エキスとした．S-1～S-9のメタノール抽出エキスからそれぞれ40mgを秤量し，40mlの0.4%NaCl水を加え被検液原液とし，更に，原液の2倍希釈液を0.4%NaCl水を用いて調整した．

運動抑制効果が認められたS-1～S-3の各メタノール抽出エキスをセライト80～120gに添加して吸着させ，オープンカラムに充てんした後，ヘキサン，クロロホルム，アセトン及びメタノール各500mlで順次溶出した．各溶出液の溶媒を減圧留去し，ヘキサン可溶分画，クロロホルム可溶分画，アセトン可溶分画及びメタノール可溶分

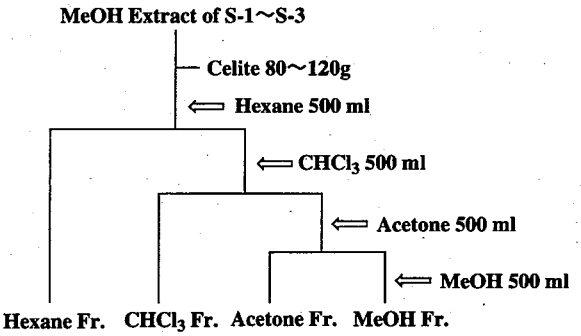


Fig. 2. Flow Diagram of Fractionation of S-1～S-3

Table 1. Effects of Methanol Extracts of Thai *Curcuma* spp. on *Anisakis simplex*

Crude Drugs	Concentration (μg/ml)	n**	Degree of larvae movement* after											
			1 hr.				3 hr.				24 hr.			
			+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
S-1	1000μg/ml	10	3	7				10					1	9
Nang Kun	500	10		10				4	6				6	2
S-2	1000	10		10				2	8				2	8
Kmin Ouy	500	10	4	6				10				3	5	2
S-3	1000	10		10				2	8					10
Kmin Kun	500	10		5	5			2	8				7	3
S-4	1000	10	2	8				3	7				9	1
Kmin Hougkun	500	10		10				6	4				10	
S-5	1000	10	3	7				2	8				5	5
Kan Tamala	500	10	2	8				10				7	3	
S-6	1000	10		10				3	7				7	3
Jai Dum	500	10		10				10					10	
S-7	1000	10		10				8	2			1	6	3
Van Pet Ma	500	10		10				10					10	
S-8	1000	10		10				3	7				6	4
Kmin Chan	500	10		10				4	6			1	9	
S-9	1000	10		10				10					8	2
King Coblar	500	10		10				5	5			4	5	1
Control	0.4%NaClaq.	10		10				10				10		

Note)*; +++; Movement as S-shape strongly ++; Movement as coil moderately +; A little movement by stimulus
−; Death Note)**; No. of Samples tested

Table 2. Effects of Hexane and Chloroform Fractions of S-1~S-3 on *Anisakis simplex*

Crude Drugs	Concentration (μg/ml)	n**	Degree of larvae movement* after 1 hr.				3 hr.				24 hr.			
			+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
S-1 Nang Kun (Hex. Fraction)	500μg/ml	10		10			2	8					6	4
	250	10		10			2	8				3	7	
S-1 Nang Kun ($CHCl_3$ Fraction)	500	10	2	6				10						10
	250	10		10			3	7						10
S-2 Kmin Ouy (Hex. Fraction)	500μg/ml	10		10				10					2	8
	250	10	5	5				10					5	5
S-2 Kmin Ouy ($CHCl_3$ Fraction)	500	10	5	5			3	7				4	6	
	250	10	4	6			3	7				2	8	
S-3 Kmin Kom (Hex. Fraction)	500μg/ml	10	3	7				3	5	2				10
	250	10		10				3	1	6				10
S-3 Kmin Kom ($CHCl_3$ Fraction)	500	10		10				10						10
	250	10	3	7				10				2	8	
Control	0.4%NaClaq.	10		10				10			2	8		

Note)*; +++; Movement as S-shape strongly ++; Movement as coil moderately +; A little movement by stimulus
−; Death Note)**; No. of Samples tested

画とし被検生薬エキスとした（Fig.2）．各S-1～S-3の4分画からそれぞれ20mgを秤量し，40mlの0.4%NaCl水を加え被検液原液とし，更に，原液の2倍希釈液を0.4%NaCl水を用いて調整した．

5．HPLC用被検生薬液の調製

被検生薬エキスの一部をメタノールで希釈し，0.45μmのフィルターに通しHPLC用試料溶液とした．

6．HPLCによる分析

HPLC装置は日本分光社製（Gulliver 900series）を以下の条件下で用いた．

1）逆相系でのHPLC分析条件：カラムはTSK gel ODS-80TM (4.6mmI.D.×150mm, 5μm, 東ソー製)を使用した．移動相は70%アセトニトリル溶液を用い，カラム温度は40℃，流量は1.0ml/minとし，検出は紫外部270nmの波長で分析を行った．

2）順相系でのHPLC分析条件：カラムは5SL-Ⅱ (4.6mmI.D.×25cm, 5μm,ナカライテスク社製）を使用した．カラム温度は40℃で，移動相はヘキサン－酢酸エチル（10：1），流速は1.0ml/minとし，検出は紫外部270nmの波長で分析を行った．

7．殺線虫物質の単離及び精製

分取用HPLC装置は日本分光社製（Gulliver 900series）を用い，カラムはTSKgel-ODS-80Ts（20mmI.D.×25cm, 5μm, 東ソー製）を使用した．カラム温度は45 ℃，移動相は70%アセトニトリル溶液，流速は7.0ml/min，検出は紫外部270nmの波長で分取クロマトグラフィーを行った．また，順層系のシリカゲルオープンカラムは試料の約50倍量のシリカゲルをカラムに充填し，ヘキサン－酢酸エチル（10：1）の条件で分取クロマトグラフィーを行った．

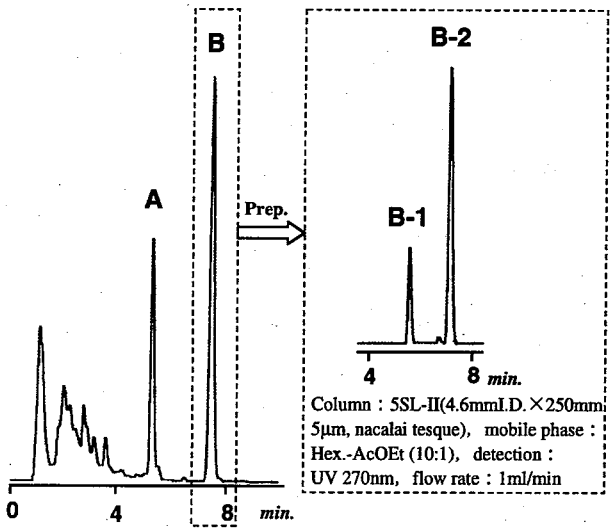
実験結果及び考察

1．*Anisakis*に対する運動抑制効果を示す*Curcuma*属生薬の検討

タイ，バンコク市場で健胃薬や香辛料などとして市販されている*Curcuma*属生薬S-1～S-9のメタノール抽出エキスの*Anisakis*に対する運動抑制効果をTable 1に示す．

強い運動抑制効果を示した生薬はS-1，S-2及びS-3であった．S-1はその外部形態及び特徴的な苦味，臭いから*Curcuma xanthorrhiza*と推定された（Fig.1）．S-2は根茎部分が2層を形成する特徴を持つが，日本の植物園等において育種管理されている種に該当するものはなかった．また，S-3はFig.1に示すように根茎がほふくして発達し，この断面は鮮やかなレモンイエローを示した．さらに，その独特な味，臭いからS-3は*Curcuma longa*であることが推察された[1, 6, 7]．

次に，効率的に殺線虫物質を検索する目的で，S-1～S-3のヘキサン及びクロロホルム可溶分画の*Anisakis*に対する運動抑制効果を検討した．Table 2に示すように，これらの活性の主な分画はS-1がクロロホルム可溶分画，S-2及びS-3がヘキサン可溶分画にあった．一方，アセト



Column : TSK gel ODS-80TM (4.6mmI.D.×150mm, 5μm, TOSO), mobile phase : 70% acetonitrile, detection : UV 254nm, flow rate : 1ml/min, column temperature : 40℃

Fig. 3. HPLC Chromatograms of Nang Kun (S-1) Chloroform Fraction

ン及びメタノール可溶分画には*Anisakis*に対する運動抑制効果は全く認められなかった.

2．Nang Kun（S-1）クロロホルム可溶分画のHPLCによる分析と主成分物質の単離

強い*Anisakis*の運動抑制効果を示したNang Kun（S-1）クロロホルム可溶分画の逆相系でのHPLCによる分析結果をFig.3に示す.

Fig.3から明らかのように，HPLC上のピークA及びBに相当する成分が*Anisakis*の運動抑制効果に関与している可能性が高いと推察された．そのため，S-1クロロホルム可溶分画を分取型HPLCでピークA及びBに一致する物質の単離を試みた．その結果，HPLC上ピークAと一致する無色油状物質furanodienone(1)を得た．また，HPLC上ピークBと一致する分画の一部を順相系のHPLCで分析した結果，2つのピーク（B-1，B-2）が存在することが判明した（Fig.3）．そのため，シリカゲルカラムクロマトグラフを用いヘキサン－酢酸エチル（10：1）で溶出し，HPLC上ピークB-1，B-2と一致する無色針状結晶germacrone(2)及び無色油状物質xanthorrhizol(3)を得た．化合物 **2** 及び **3** は文献値[8~10]と比較して構造を明らかにし，化合物1はNMR及びMassのスペクトルデータを解析し，furanodienone(1)と構造決定した（Fig.4）．化合物1のスペクトルデータは以下の通りである.

EI-MS *m/z* (%)：230 (M^+, 30.0), 215 (13.2), 162 (17.3), 122 (100.0), 94 (65.0), 77 (20.0), 66 (34.5), 39 (17.7)

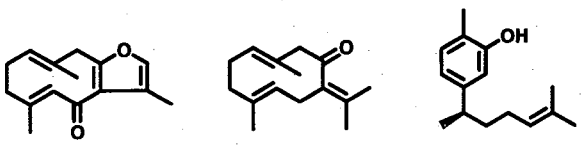
^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ ：7.07 (1H,s), 5.81 (1H,s), 5.18 (1H, dd, J=11.5, 4.7Hz), 3.77 (1H, d, *J*=16.6Hz), 3.68 (1H, d, *J*=16.6Hz), 2.46 (1H, dt, *J*=11.3, 3.6Hz), 2.32 (1H,m), 2.18 (1H, ddd, J=12.2, 12.5, 3.6Hz), 2.14 (3H, d, *J*=1Hz), 2.00 (3H, d, 1Hz), 1.89 (1H, td, *J*=11.9, 4.3Hz), 1.31(1H,s)

^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ ：189.76, 156.48, 145.70, 138.07, 135.39, 132.46, 130.52, 123.73, 122.20, 41.70, 40.66, 26.44, 18.95, 15.77, 9.53

Table 3. Effects of Hexane and Chloroform Fractions of S-1~S-3 on *Anisakis simplex*

Compounds	Concentration (μg/ml)	n**	Degree of larvae movement* after											
			1 hr.				3 hr.				24 hr.			
			+++	++	+	−	+++	++	+	−	+++	++	+	−
furanodienone	500μg/ml	10		10				10				5	5	
	250	10	1	9				10				8	2	
	125	10	2	8			1	9				10		
	62.5	10	2	8				10				10		
germacrone	500μg/ml	10	2	8				10				1	7	2
	250	10		10				10					9	1
	125	10		10				9	1			2	8	
	62.5	10		10				10				9	1	
xanthorrhizol	500μg/ml	10		10				10						10
	250	10		10				10	1					10
	125	10		10				10						10
	62.5	10		10				10						10
	31.25	10	2	8				10					5	5
Control	0.4%NaClaq.	10	1	8				10			1	9		

Note)*; +++ ; Movement as S-shape strongly ++ ; Movement as coil moderately + ; A little movement by stimulus − ; Death Note)** ; No. of Samples tested



furanodienone (1) germacrone (2) xanthorrhizol (3)

Fig. 4 Chemical Structures of Furanodienone (1), Germacrone (2) and Xanthorrhizol (3)

3．運動抑制効果を示す殺線虫物質の検討

S-1クロロホルム可溶分画の主要成分である3種のセスキテルペンfuranodienone(1), germacrone(2)及びxanthorrhizol(3)の*Anisakis* I 型幼虫の運動性に及ぼす効果についてTable 3に示す.

3の*Anisakis*に対する100%最小致死濃度（MLC）が0.29mMとすでに著者らが報告[1]している桂皮から単離したcinnamic aldehyde（MLC：0.47 mM），茴香から単離したanethole（MLC：0.84 mM）と比較して2～3倍の殺線虫効果が認められた．その結果から，化合物**1**及び**2**にほとんど殺線虫効果が認められなかったことから，Nang Kun（S-1）に含有する主な殺線虫物質は化合物3で有ることが判明した.

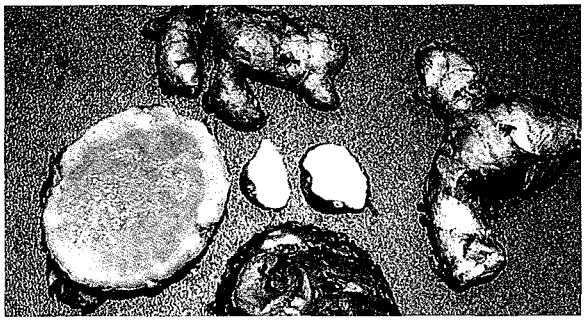
これまで殺線虫性が高い化合物として判明している*ar*-turmerone, 1,7-diphenyl-4-hepten-3-oneの化学構造からα,β-不飽和ケトンの部分構造が殺線虫作用に関与していると考えていた．しかしながら，α,β-不飽和ケトンの部分構造は存在するが，アリール基が存在しないゲルマクラン型セスキテルペンである化合物**1**及び**2**の殺線虫効果の検討結果から，必ずしもこの部分構造だけが殺線虫作用に関与しているとは限らないことが明らかとなった．したがって，今後はアリール基とα,β-不飽和ケトンの化学構造的相関と分子内での電子密度の分布状態などについて検討していくとともに，より殺線虫作用の高い物質の発見につなげていきたい.

まとめ

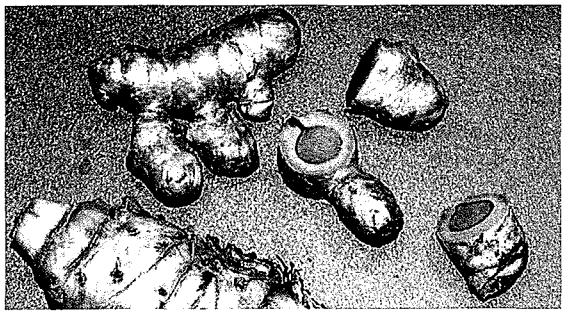
タイ，バンコク市場で健胃薬や香辛料などとして市販されている9種類の*Curcuma*属生薬を購入し，*Anisakis* I 型幼虫の運動性及び生存時間に及ぼす影響の有無について検討した．その結果，タイの現地名Nang Kun（S-1）のクロロホルム可溶分画に*Anisakis*に対する強い運動抑制効果を認めた．その分画の成分をHPLCを用いて精査したところ，桂皮に含有する殺線虫物質cinnamic aldehydeや茴香に含有する殺線虫物質anetholeと比較して2～3倍強い活性が認められた新たな殺線虫物質xanthorrhizolを単離し，その構造を明らかにした.

文　献

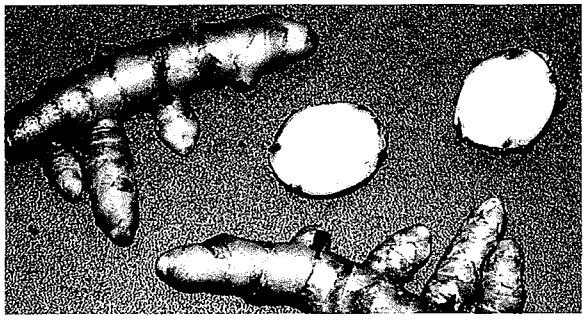
1）鈴木　淳，村田以和夫，安田一郎：東京衛研年報，**47**, 35-42, 1996.
2）E.Schraufstatter, H.Brent：*Nature*, **164**, 456, 1949.
3）浅川直樹，津野昌紀，服部禎一，他：薬学雑誌，**101**, 374-377, 1981.
4）鈴木　淳，村田以和夫，安田一郎：東京衛研年報，**45**, 35-41, 1994.
5）村田以和夫，宮沢貞夫，安田一郎，他：東京衛研年報，**39**, 15-18, 1988.
6）マルカム・スチュアート，難波恒雄　編：原色百科世界の薬用植物［Ⅱ］－ハーブ事典－，エンタープライズ，144, 1980.
7）上原真一，安田一郎，竹谷孝一，他：生薬学雑誌，**46**(1), 55-61, 1992.
8）T. Takahashi, K. Kitamura, H. Nemoto, *et.al.*：*Tetrahedron Letter*, **24**, 3489-3492, 1983.
9）T.Ohkura, J.Gao, J.Xie, *et.al.*：*Shoyakugaku Zasshi*, **44**(3), 171-175, 1990.
10）M.Yamazaki, Y.Maebayashi, N.Iwas, *et.al.*：*Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2070-2074, 1988.



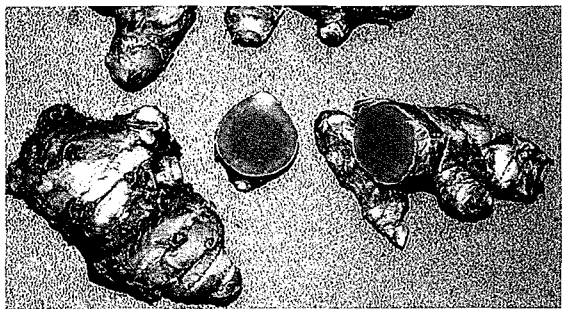
S - 1



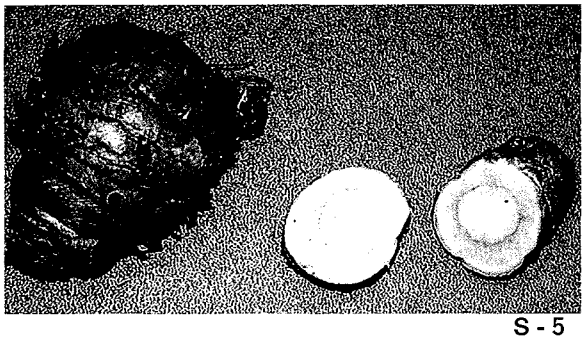
S - 2



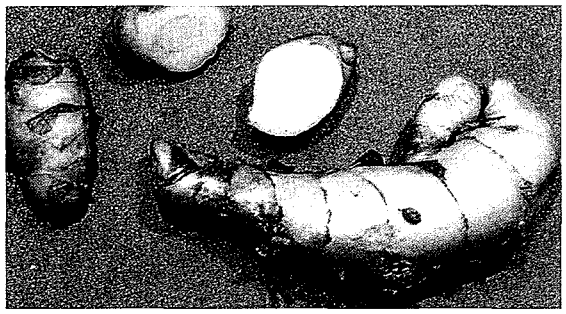
S - 3



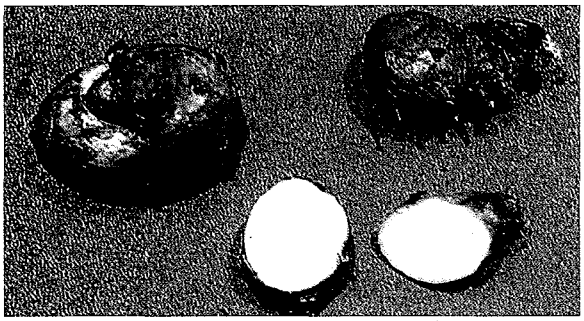
S - 4



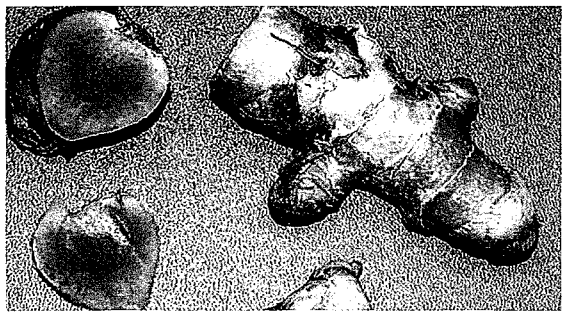
S - 5



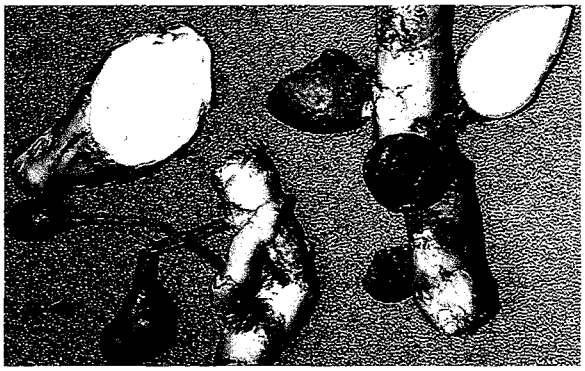
S - 6



S - 7



S - 8



S - 9

S - 1 : Kang Kun
S - 2 : Kmin Ouy
S - 3 : Kmin Kom
S - 4 : Kmin Hougkun
S - 5 : Kan Tamala
S - 6 : Jai Dum
S - 7 : Van Coblar
S - 8 : Kmin Chan
S - 9 : King Coblar

Fig.1. Nine Species of Thai *Curcuma* spp. for Screening of Inhibtory Effect on Mocvement Against *Anisakis simplex*

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 49-54, 1999

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援 ーステロイドホルモン配合軟膏剤メーカーへの対応ー

岸本　清子*，安田　一郎*，宮武　ノリヱ*，守安　貴子*，中嶋　順一*，
上村　尚*，大西　和夫*，前川　智明**，佐々木　勇夫**，宮城　不二男**

Technical Support of Validation Process for Pharmaceutical Factories in Tokyo — Steroid Hormone Ointment Factory—

KIYOKO KISHIMOTO*, ICHIRO YASUDA*, NORIE MIYATAKE*, TAKAKO MORIYASU*, JUNICHI NAKAJIMA*, HISASHI KAMIMURA*, KAZUO ONISHI*, TOMOAKI MAEKAWA**, ISAO SASAKI** and FUJIO MIYAGI**

Keywords：医薬品製造所 pharmaceutical factory，分析法バリデーション validation of analytical procedure，軟膏剤 ointment，均質性 homogeneity，メチルテストステロン methyl testosterone，プロピオン酸テストステロン testosterone propionate，高速液体クロマトグラフィー HPLC

はじめに

昭和35年に薬事法が全面改正され，医薬品の製造にあたっては，厚生大臣による品目ごとの製造承認及び製造所ごとの品目許可を受けることが必要になった．新法施行の際の附則によって，旧法の規定により製造の許可を受けていた品目については，品目ごとの製造承認を受けたものと見なされ，現在に至っている．

また，平成６年に医薬品の製造管理及び品質管理規則が制定され，「厚生省令で定める基準」いわゆるGMPソフトが製造業の許可要件として求められるようになった[1]．これに伴い各地方自治体では医薬品メーカーを対象に様々な相談，支援活動を行ってきた[2]．

平成８年にはこの規則のうちバリデーション（製造管理及び品質管理の科学的検証とその文書化）に係わる部分が施行され，査察を担当する薬事監視員から地方衛生研究所の試験担当者に対して，特に品質管理部門における各種分析機器のデータの評価方法について相談，助言が求められるようになった[3, 4]．

バリデーションは医薬品製造における品質確保のための作業・技術管理の概念であり，品質確保のシステムとして必要不可欠である．しかし，それ以前から製造販売している業者の中には新しい概念の導入に消極的な姿勢を示したり，独自に工程のバリデーションを行うことが難しい小規模業者もある．そこで東京都においては平成８年度より，主に中小企業を対象にバリデーションの理念を理解し，その上で各企業にとって意義のあるシステムとして確立し，定着させるための支援活動を行っている[5]．本報では，都内の軟膏剤メーカーを対象として行った，規格試験方法の設定及び製造工程のバリデーション支援業務に取り組んだ事例を報告する．

対象メーカーはメチルテストステロン（MT）及びプロピオン酸テストステロン（TP）を主成分とした軟膏剤を製造している従業員15名（うち，試験担当者２名）の事業所である．製品の概要を図１に示す．

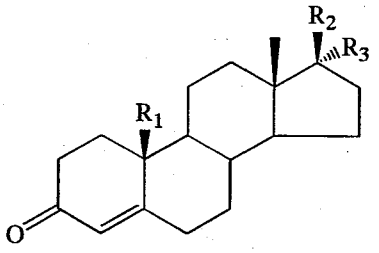
この軟膏剤は昭和31年に製造許可を受けているため規格試験法が設定されておらず，昭和55年に表１に示した薄層クロマトグラフ（TLC）法による確認試験及び吸光度法により定量する自社規格試験法を設定した．

今回，医薬品製造業許可更新申請に基づく東京都による立入検査が行われ，この際，自社規格試験では成分が分離定量されていないため，製品の均質性についてバリデーションを行う体制を整備することとの指摘があった．このためメーカーは高速液体クロマトグラフ（HPLC）を購入し定量法を検討したが，HPLCに不慣れなため定量値のばらつきが大きく，試験法の確立が困難であった．そこで，著者らは分析法等の技術的な支援を

＊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
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊東京都北部薬事衛生事務所

＜成分,分量＞

	本品100g中
メチルテストステロン(**MT**)	1.00g
プロピオン酸テストステロン(**TP**)	0.50g
化合物1	0.20g
化合物2	5.00g
色素	0.02g
香料	0.50g
親水軟膏	92.78g



MT R_1=CH_3, R_2=OH, R_3=CH_3
TP R_1=CH_3, R_2=$OCOCH_2CH_3$, R_3=H

＜製造工程＞

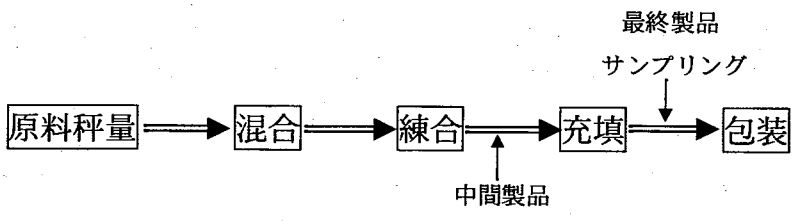


図1．商品の概要

表1．自社規格試験法

〈確認試験〉
試料溶液の調製：試料約0.5gを量り，エタノールに溶かしてろ過し，ろ液を試料溶液とし，TLCを行う．
ＴＬＣ条件：薄 層 板；薄層クロマトグラフ用シリカゲル（蛍光剤入り）
展開溶媒；ベンゼン・エタノール(8：2)
検　　出；紫外線ランプ（主波長254nm）

〈定量試験〉
試料溶液の調製：試料約0.7gを量り，エタノール15mLを加え，水浴（50℃）中で振り混ぜる．冷後、ろ紙でろ過．さらにエタノールで抽出(2回)し、50mLとする．この液を5mLとりエタノールで100mLとし，試料溶液とする．
吸光度測定条件：対照；エタノール
層長；10mm
波長；241nm

目的として規格試験方法全体を見直すと共に主成分含量から軟膏剤の均質性についても検証した．

方　　法

1．確認試験法　確認試験はTLC法で行った．測定条件は表1に示した．なお，薄層板はMERCK社製Silica gel F254，展開溶媒は後述のものを使用した．

2．定量試験法　MT及びTPの定量はHPLC法で行った．方法は表2に示した．

3．サンプリング方法　軟膏釜内の成分の均質性を検証するため，異なった部位からサンプリングすることとした．練合工程中軟膏釜（図2）を減圧にするため練合途中の抜き取りは行わず，練合後の中間製品5ロット(Lot.01～05)，5ポイント（①～⑤，図3）について行った．このうちの1検体（Lot.01②）については併行精度を見るため6回繰り返して定量を行った．練合後の最終製品（Lot.01）については充填機から出る順に，初期，中期，終期の3回，各2個サンプリングした．また，製造時期の異なる最終製品（Lot.00）も併せてサンプリングした．

試料及び標準品は著者ら（A）とメーカー（B）が2分して分析に供した．なお，その他の試薬，装置等はA及びB独自のものを用いた．

4．品質管理の方法　製品の均質性について検証するため変動係数（CV値）を求めた．また，二元配置の分散分析を用いて差の検定を行った．

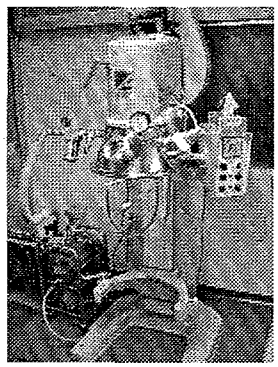
結果及び考察

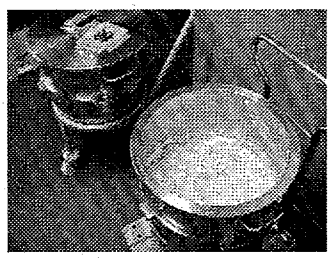
1．確認試験法の改良

自社規格試験法ではTLCの展開溶媒に有害物質のベンゼンを使用しているため，他の溶媒を検討した．その結果，ヘキサン・エーテル・アセトン（2：1：1）を用いたとき，主成分と他の共存成分との分離が良好であった．検出は通常，暗所でのUVランプ（主波長254nm）照射と共に，希硫酸噴霧後に加熱して発色を確認するが，メーカーにドラフトの設備がないためUVランプ照射の

表2．従来法と改良法による定量方法の比較

従　来　法	改　良　法
試料溶液の調製	
試料0.6 g にメタノールを加えて50 mL.	試料約0.1g精秤し，移動相40mL加える.
↓ 超音波抽出（30分）	↓ 超音波抽出（30分）
5.0mLを採り，メタノールで50mL.	移動相を加え，正確に50mLとする.
↓ 冷蔵庫保存	↓
シリカゲル粉末（吸着）	フィルターろ過
↓	↓
フィルターろ過→ HPLC（10 μL）	HPLC（10 μL）
ＨＰＬＣ条件	
カ ラ ム：ODSカラム	ODSカラム
4.6×250 mm	4.6×250mm
ガードカラム 4.6×35mm	ガードカラムなし
温　　度：45℃	40℃
移 動 相：水・メタノール（1：3）	水・メタノール（1：3）
流　　量：1.0 mL／min	1.0mL／min
検出波長：241nm	241nm


混合真空ミキサー


軟膏釜

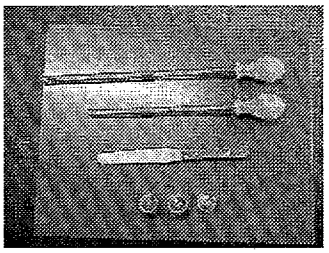

サンプリング器具

図2．軟膏剤製造装置とサンプルリング器具

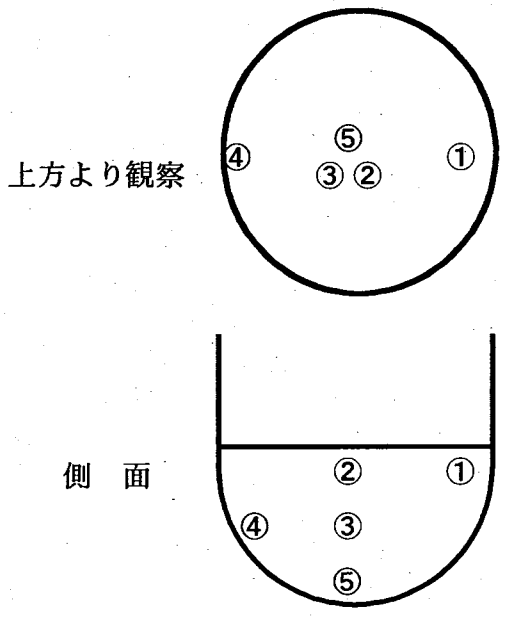


図3．軟膏釜とサンプルリング部位（①～⑤）

確認のみとした.

2．定量試験法の改良

Bの試験担当者はHPLC分析に際し，(1)吸光度法に比べてHPLC法による定量値はばらつきが大きい．(2)カラムの劣化が早いという問題点を持っていた.

そこで(1)に関してはHPLCへの注入方法を指導し，実際にどの程度のばらつきを生じるのか調べることとし，その状況によって内部標準法の使用など今後の方針を決めることとした．試験担当者2名（甲，乙）は標準溶液を用いて吸光度法による値，及びHPLC法によりマイクロシリンジを用いて標準溶液10 μLを注入した時の主成分の面積値，またループによる20 μL全量注入による面積値をそれぞれ6回繰り返し求めた．その結果，ばらつきが小さいと予想された20 μL全量注入によるMTの面積のCV値は，甲によるものが4.93%，乙が6.77%と大きく，装置の調整が必要であることがわかった．しかし，吸光度及び10 μL注入によるMTの面積値のばらつきは

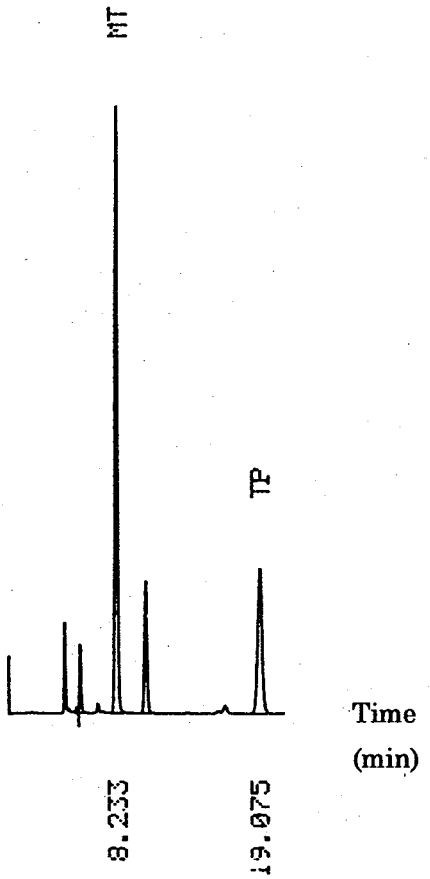


図４．軟膏剤のHPLCクロマトグラム
HPLC条件：カラム；TSK-GEL ODS-120T (4.6×250mm)
カラム温度；40℃
移動相；水・メタノール（１：３）
流量；1.0ml/min
検出波長；241nm

いずれも小さくCV値は0.21～0.36%の範囲であり，十分定量可能であると思われた．

(2)カラムの劣化に関しては，長期間使用するとゴーストピークが現れる懸念があり，シリカゲルによる前処理が行われていた．そこで著者らは同処理を行わずに，試料溶液をODSカラムを装着したHPLCに300回注入した．しかし，若干の保持時間の変化はみられたが，妨害ピークの出現や明らかなピーク形状の変化等，定量に支障のあるほどの劣化を確認することはできなかった．

次に，メーカーが検討していた定量方法（従来法）を改良するための検討を行った．即ち，親水軟膏の配合割合が多いため，メタノールのみでは抽出効率が低いと考えられたので，水・メタノール（１：３）混液の移動相による抽出に替えた．また，冷蔵庫保存及びシリカゲル吸着処理を行わず，フィルターろ過をして直接HPLCに注入し，ガードカラムは使用しないなどばらつきの要因を最小限にするため，表2に示したように試験法を変更した．

３．分析法バリデーション用データの作成

上記の改良法を規格試験法として採用するため分析法バリデーション用のデータを作成した．代表的なクロマトグラムを図４に示した．また，フォトダイオードアレイ検出器により特異性を確認した．検量線は配合量の50～150 %の濃度範囲で５水準について作成し，相関係数（r）=0.9999と高い直線性が得られた．添加回収試験は80, 100, 120%の3濃度について各３回行い98.0%以上，そして同一検体から６回採取した試料を分析した併行精度はCV値が1.1%といずれも良好な値が得られた．

４．主成分の定量結果

１）併行精度の検証　同一試料から６回採取した場合の結果を表３に示した．Lot.01②の試料及びLot.05の最終製品（Aのみ）を用いて試験した結果，オートサンプラーを用いたA及びマニュアル注入によるB共にCV値は１%以下となり，精度は良好であった．

２）均質性の検証　表４にサンプリング部位別の定量結果を示した．中間製品では練合器のハネが⑤の部位に届きにくい形状で撹拌不十分である可能性があったが，Aの結果は0.37～1.19%，Bは0.74～1.52%といずれのロットにおいてもロット内のCV値が小さく，また，二元配置の分散分析を用いても部位間に有意差は認められず，均質であることが検証された．

３）品質管理　Lot.01の最終製品の定量結果を表5に示した．同一ロットの中間製品（01①～⑤，表４）と最終製品についてAによる定量値で比較すると，中間製品の

表３．A，Bによる併行精度の比較

	A		B	
Lot.	MT	TP	MT	TP
01②	1.019	0.521	1.035	0.517
	1.026	0.529	1.019	0.511
	1.016	0.523	1.028	0.516
	1.005	0.520	1.035	0.517
	1.010	0.522	1.017	0.511
	1.021	0.529	1.026	0.516
AVE	1.016	0.524	1.027	0.515
CV%	0.75	0.76	0.75	0.57
00	0.935	0.483		
	0.916	0.478		
	0.910	0.475		
	0.905	0.473		
	0.916	0.478		
	0.911	0.478		
AVE	0.915	0.477		
CV%	1.12	0.67		

単位：g/100g

表4．中間製品のサンプリング部位による比較

Lot.	部位	A MT	A TP	B MT	B TP
01	①	1.005	0.516	1.034	0.519
	②	1.019	0.521	1.028	0.516
	③	1.025	0.524	1.026	0.514
	④	1.024	0.524	1.028	0.516
	⑤	1.028	0.525	1.014	0.505
	AVE	1.020	0.522	1.026	0.514
	CV%	0.89	0.69	0.74	1.05
02	①	1.005	0.516	0.995	0.507
	②	0.995	0.510	1.000	0.507
	③	1.011	0.517	1.007	0.505
	④	1.005	0.511	0.987	0.489
	⑤	1.007	0.514	1.020	0.505
	AVE	1.005	0.514	1.002	0.502
	CV%	0.61	0.56	1.25	1.52
03	①	0.993	0.510	0.999	0.498
	②	0.995	0.511	1.030	0.514
	③	1.000	0.511	1.002	0.501
	④	0.990	0.506	0.991	0.498
	⑤	0.993	0.508	1.006	0.507
	AVE	0.994	0.509	1.006	0.503
	CV%	0.37	0.43	1.46	1.32
04	①	0.995	0.511	1.014	0.499
	②	1.002	0.510	0.993	0.502
	③	0.999	0.509	1.017	0.507
	④	0.995	0.506	0.989	0.494
	⑤	1.004	0.511	1.019	0.504
	AVE	0.999	0.510	1.006	0.501
	CV%	0.37	0.38	1.40	0.99
05	①	0.996	0.509	1.005	0.508
	②	1.007	0.515	0.993	0.499
	③	0.982	0.502	1.007	0.504
	④	0.998	0.512	1.019	0.506
	⑤	1.014	0.515	0.997	0.499
	AVE	0.999	0.511	1.004	0.503
	CV%	1.19	1.07	0.98	0.86

単位：g/100g

MTの平均は1.020g / 100g，TPの平均は0.522g / 100gであるのに対し，最終製品のMTの平均は0.978g / 100g，TPの平均は0.509g / 100gであり，両成分共に最終製品が低い傾向を示し，統計的にも有意差が認められた．

また，Lot.01最終製品におけるBによるMTのCV値は2.94%と大きいが，Aによる同一サンプルのCV値は0.72%と小さかった．試料が軟膏剤であるため，サンプリング時の誤差は生じやすいと考えられる．すなわち，品質管理における分析は1試料1回では真値との誤差を生じやすいと思われる．

表5．A，Bによる最終製品（Lot.01）の定量値の比較

サンプリング	A MT	A TP	B MT	B TP
初期－1	0.989	0.514	0.964	0.494
2	0.980	0.511		
中期－1	0.971	0.506	1.015	0.505
2	0.975	0.507		
終期－1	0.970	0.504	1.015	0.506
2	0.980	0.511		
AVE	0.978	0.509	0.998	0.502
CV%	0.72	0.74	2.94	1.26

単位：g/100g

さらに，MTの定量値に関してはAとB間に有意差は認められなかったが，TPについては両者の定量値に有意差が認められた．標準溶液の調製等に原因があると考えられる．

このメーカーは平成8年の更新時査察を機会にバリデーション導入に積極的に取り組んでいた．しかし，試験担当者への助言システムがないため意欲はあっても新しい機器の導入に対応出来ず，暗礁に乗り上げた状況であった．今回，著者らの支援，助言により規格試験法を確立し，製品中の主成分の均質性を検証することが出来た．これらの結果を踏まえ，中間製品と比較して最終製品の成分含有量が低いことの原因究明やロット間のばらつき及び設定した規格からの偏り等への対策をとり，メーカー独自に工程管理をしていく必要がある．有効性，安全性を含めた高品質の医薬品を供給するための高度な管理が望まれる．

まとめ

都内医薬品製造所のバリデーションに対し，技術支援を行った．独自に工程のバリデーションを行うことが難しい小規模業者がバリデーション導入に積極的に取り組み，品質管理が可能となった事例である．その結果，

1）試験担当者の分析技術の向上をはかり，既存の設備，装置，試薬等の変更を最小限にとどめた上で精度良い分析法を確立することが出来た．
2）製品の各成分含有量については，ロット内の差はなく，均質であることが検証された．
3）同一ロットの中間製品に比べて最終製品の含有量が若干低い傾向にある製品がみられるなど工程管理の必要性が示唆された．

文　献

1）医薬品の製造管理及び品質管理規則：平成6年1月27日厚生省令第3号（1994）．
2）大阪医薬品協会：医薬品品質保証における統計手法

講座，平成8年6月.
3）小和田和宏，佐藤四郎，堀池あずさ他：静岡県環境衛生科学研究所報告，**40**, 25 - 29, 1997.
4）前多隆志：医薬品研究，**30**(3), 134 - 143, 1999.
5）斉藤幸久，伊藤　恵，山田秀男他：第31回日本薬剤師会学術大会要旨集，80, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 55-58, 1999

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援
―硫酸銅配合軟膏剤メーカーへの対応―

中嶋順一*, 寺島　潔**, 岸本清子*, 安田一郎*, 宮武ノリヱ*,
守安貴子*, 三宅啓文*, 上村　尚*, 大西和夫*, 高澤浩一***,
瀧　昭則***, 香川一浩***, 秋山恵子***

Technical Support of Validation Process for Pharmaceutical Factory in Tokyo
―Cupric Sulfate Ointment Factory―

JUNICHI NAKAJIMA*, KIYOSHI TERAJIMA**, KIYOKO KISHIMOTO*, ICHIRO YASUDA*, NORIE MIYATAKE*, TAKAKO MORIYASU*, HIROFUMI MIYAKE*, HISASHI KAMIMURA*, KAZUO ONISHI*, KOICHI TAKAZAWA***, AKINORI TAKI***, KAZUHIRO KAGAWA*** and KEIKO AKIYAMA***

Keywords：軟膏剤 ointment, 硫酸銅 cupric sulfate, 滴定 titration, バリデーション validation, 医薬品製造所 pharmaceutical factory

緒　言

東京都衛生局薬務部は平成８年度から，GMP対策事業の一環として，小規模メーカーに対しての支援・育成を目的とした指導を行ってきた．当科においても前報[1]のように試験方法の開発や製造工程におけるバリデーション等，様々な技術的支援をしてきたところである．

今回（平成10年７月～平成11年５月）東京都南部薬事衛生事務所の依頼により，薬効成分の定量方法の開発及び構造設備の改修に伴うバリデーション支援を行った事例を報告する．

事例概要

今回バリデーション支援の対象となった品目は，化膿性皮膚疾患の排膿を目的とした軟膏剤で，１g中に硫酸銅５水和物を20mg含むものである．昭和32年に厚生省により医薬品製造承認がなされたが，承認書では定量方法が定められていないため，製造所が自主規格を設定し管理している．

本製造所の試験室は管理薬剤師一名のみで運営され，設置されている機器は，最小限のガラス器具類と旧式の化学天秤のみであった．製造所が行っている定量方法は，軟膏剤20gを正確に量り，水浴上で加温して溶かし，温時クロロホルムと水により振とう分配し，水層の硫酸銅を0.1mol/Lのチオ硫酸ナトリウム液を用いて滴定する方法であった．

分析上の問題点として，定量結果のばらつきが大きい，クロロホルムが室内に充満し人体に有害である，更に塩素系溶剤であるクロロホルムの廃棄処理に困ることなどが挙げられ，自主設定された試験方法に代わる新たな方法の開発が必要であった．

また平成11年に当該製造所の構造設備が変更されるのに伴い，新しい設備についてバリデーションを行う必要が生じた．そこで製造工程の中間製品及び最終製品について，開発した試験方法を用いて硫酸銅の定量を行った．

実　験

Ⅰ．材　料

本剤の製造工程は図１に示したようにパラフィン，白色ワセリン，松脂等の油脂を金属製のかまを用いて加熱溶解させ，硫酸銅，酢酸及び色素を加え，放冷しながらペースト状になるまで撹拌する．撹拌停止後更に常温まで放冷し，軟膏剤に光沢をつけるためローラーにかけるなどの行程を経たあと，充填，検査を行って最終製品と

＊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
＊The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊＊同微量分析研究科
＊＊＊東京都南部薬事衛生事務所

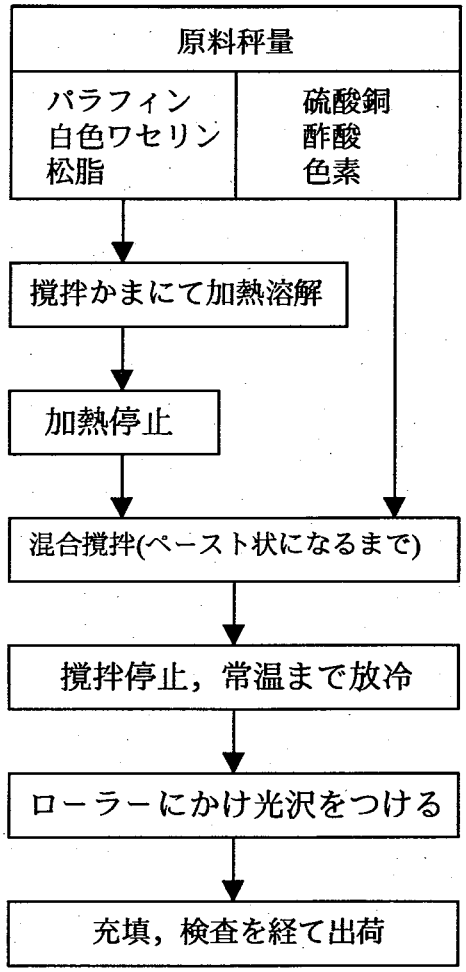


図１．製造工程

されていた．

製品のロットに対するメーカー側の考え方は，従前より同一日に製造したものは，撹拌かまが異なっても同一ロットとして扱うものであった．しかし，実際の製造工程では，製造原料は撹拌かまごとに秤量，加工され，製品とされていたことから，著者らは撹拌かま１つを１ロットとした．

分析試料は製造に用いられる３つの撹拌かま（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ）についてそれぞれかまの上部，中部，下部の３ケ所に分け，平成11年３月３日（A），３月17日（B），３月31日（C）の異なる製造日毎に，合計９ロット27検体を中間製品として採取した．またそれぞれの中間製品を用いて製造された最終製品９ロット９検体についても分析試料とした．

Ⅱ．定量方法

１．試薬　0.01mol/Lのチオ硫酸ナトリウム液は標定済みの㈱和光純薬製．酢酸，酢酸ナトリウム，酢酸エチル，１－プロパノールは㈱ナカライテスク製の試薬特級を使用した．

２．抽出方法　試料約1.00gを100mLの分液ロートに正確に量ったのち，酢酸エチル10 ml，１－プロパノール3mLを正確に加え軟膏剤を溶解させた．次に硫酸銅抽出液（日局酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液 pH4.0及び飽和塩化ナトリウム水溶液の等量の混液）20mLを正確に加え，振とう機で１分間あたり約300回の速さで15分間振とうしたのち静置し，水層（下層）はヨウ素瓶に移す．溶媒層（上層）は更に同様に２回抽出し，全水層を合わせ試料溶液とした．

３．滴定方法　試料溶液にヨウ化カリウム３gを加え，ただちに密栓し，さらにヨウ素瓶のつばの内側にヨウ化カリウム試液の適量を入れ，おだやかに振り混ぜ10分以上放置した．次につばの内側のヨウ化カリウム試液と共に，遊離したヨウ素を0.01mol/Lのチオ硫酸ナトリウム液で滴定した．滴定の終点は，試料溶液が終点近くで青緑色になったときにデンプン試薬３mLを加え，生じた紺色が明るい青色になった時とした．また同様の方法で空試験を行い補正した．

なお含量の計算は0.01mol/Lチオ硫酸ナトリウム液1mL＝2.4967mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$として算出した[2]．

４．統計処理　複数の測定結果から得られた平均値に差があるのかどうかを検定するために，繰り返しのない二元配置の分散分析を危険率５％で行った[3]．この統計処理は比較する測定結果の分散の比と，標本の自由度から得た臨界値（F境界値）により両者の有意差を検証するものである．

結果及び考察

Ⅰ．試験方法の検討

バリデーションの実施にあたりまず，現在の製造所試験室の器具および設備で実施可能な試験方法であること，ついで有機溶媒の人体に及ぼす影響を考慮し，クロロホルムを他の溶媒に切り替えること及び簡便で精度よ

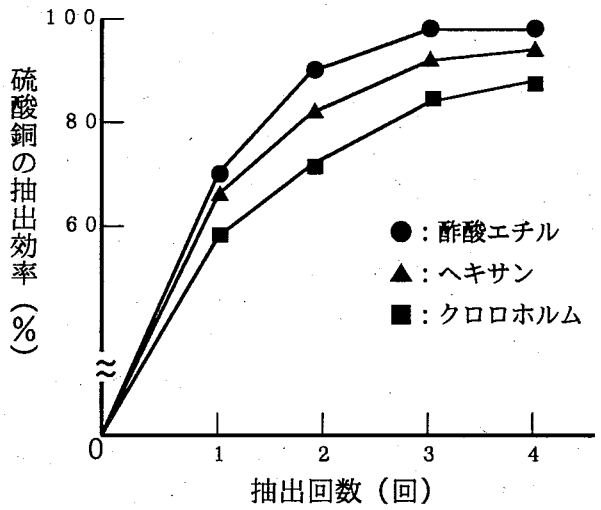


図２．各種溶媒による軟膏剤からの硫酸銅の抽出効率

い定量法を開発することの３点に留意して試験方法の開発を行った．

１．分析試料の採取量

試料の採取量が多いと，混在している色素により滴定の終点が判別しずらい．また抽出溶媒の量を可能な限り少なくすること等から分析試料の採取量は１gとした．

２．滴定液の濃度の選択

試料量１gに対応する硫酸銅の量と滴定液の必要量，及び0.01mol/Lのチオ硫酸ナトリウム液でも滴定の終点が判別できること等を考慮した結果，チオ硫酸ナトリウム液の濃度は0.01mol/Lを選択した．

３．抽出溶媒の選択

酢酸エチル，クロロホルム，ヘキサンの３種の有機溶媒を用いて抽出効率を求めた結果を図２に示す．

この結果酢酸エチルを用いた３回の分配抽出により硫酸銅はほぼ100％水層へ移行することが判った．また酢酸エチルの毒性は比較的低く[4]，また本軟膏剤をよく溶解させ，しかも比重が水より小さいため分液ロートを用いた一連の操作が効率的に行えた．

更に少量の１－プロパノールを加えることにより，振とう後分液ロートを静置した時，二層は澄明で速やかに分離することが確認された．従って抽出に用いる有機溶媒は酢酸エチル及び少量の１－プロパノール混液とした．

表１．分析精度の検討

項目	測定結果
平均値（mg/g）	20.20
標準偏差	0.21
変動係数（％）	1.05
添加回収率（％）	101.25
添加回収の標準偏差	0.81
添加回収の変動係数（％）	0.80

(n=6)

表２．撹拌かま中の中間製品の定量結果（mg/g）

製造日	採取位置[a)]	Ⅰ[b,c)]	Ⅱ[b,c)]	Ⅲ[b,c)]
A	上部	20.28	20.12	19.43
	中部	19.99	20.00	19.07
	下部	19.90	20.04	20.07
B	上部	20.09	19.52	19.03
	中部	20.32	18.81	19.72
	下部	20.58	19.56	18.70
C	上部	19.95	20.16	19.90
	中部	20.71	20.10	20.55
	下部	20.37	20.34	20.39

a：サンプリングの異なる試料．
b：３個の撹拌かまをそれぞれⅠ,Ⅱ,Ⅲとした．
c：Ⅰ,Ⅱ,Ⅲそれぞれの間で５％の危険率で有意差を認めた．

４．硫酸銅抽出液の選択

硫酸銅とヨウ化カリウムからヨウ素が遊離される反応は，pH４～5.5に於いて定量的に進行する[5]．このことから操作の簡便性を考慮し，あらかじめ調製したpH４の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を用いて定量したところ良好な結果を得た．また水層にはNaClが加わることにより，油層との分離が更に鮮明に分離した．

これらのことから，日局に記載される酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液pH4.0及び飽和塩化ナトリウム水溶液の等量の混液を硫酸銅抽出液として用いることとした．

５．終点の判定

指示薬として使用したでんぷん試液は予想される終点近くで加え，更に滴定の終点はヨウ素瓶を激しく振って判定した．また本軟膏剤は緑色の色素を含有しており，当量点付近では色素の呈色が，ヨウ素－デンプンの紫色と重なり判別が難しい．従って終点の判定には，別に同様に操作した試料溶液に，0.01mol/Lチオ硫酸ナトリウムを過剰に加えたものを対照として用いた．

６．分析精度の検討

同一試料より６回のサンプリングにより分析精度を求めるとともに，添加回収実験を行った結果を表１に示した．この結果硫酸銅の含量は平均値20.20mg/g，標準偏差0.21で変動係数は1.05％であった．また本軟膏剤に表示量の硫酸銅の100％に対応する量を加えた６回の添加回収実験では平均回収率は101.3％，標準偏差は0.81，変動係数は0.80％と良好であった．従って本試験法は簡易な操作性とその分析精度から日常の品質管理に適した試験法であると考察された．

Ⅱ．採取位置及び撹拌かまによる違いと最終製品の含量

中間製品（９ロット27検体）について硫酸銅の含量を求めた結果を表２に示す．この結果から以下の２点が確認された．

１．採取位置

硫酸銅の含量が同一撹拌かまの採取位置（上部，中部，下部）で差が認められるかどうかを検証する目的で，二元配置の分散分析を行った，この結果Ｆ境界値（3.276）に比較して，観測された分散比（0.535）は小さかった．従って同一撹拌かまの場合，採取位置での含量は統計的に差がないことが確認された．

２．撹拌かま

硫酸銅の含量が異なった撹拌かま（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ）で差が認められるかどうかを調査する目的で，二元配置の分散分析を行った．この結果Ｆ境界値（3.276）に比較して，観測された分散比（5.624）は大きかった．

このことは撹拌かまが異なると，硫酸銅の含量が異なることを示し，従前よりメーカーが行っている同一製造日に製造された製品を同一ロットとして扱うことは好ましくないことが判明した．

3．最終製品

最終製品9ロットの硫酸銅含量は，18.95～20.39（mg/g）で，平均値19.98（mg/g）標準偏差0.45，変動係数2.27%でありほぼ表示量のとおりであることが確認された．

まとめ

1．軟膏剤中の硫酸銅について，定量方法の検討を行った．その結果酢酸エチルに1－プロパノールの添加及び硫酸銅抽出液（日局酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液pH4.0及び飽和塩化ナトリウム水溶液の等量混合物）とで分配することで，ほぼ100%の硫酸銅が抽出されることが判明した．また今回検討した定量方法は簡易でかつ精度の良い定量方法であった．

2．本法により硫酸銅の定量を行ったところ，一つの撹拌かまの内部では均一に混合されていたが，撹拌かまや製造日が異なると，硫酸銅の含量が異なることが統計処理により確認された．なお最終製品はほぼ規格通りの含量であった．

3．本製造所は，製造に重点が置かれ，試験室の整備や品質検査の充実を図るということに関しては消極的であった．しかし今回バリデーション支援事業が本製造所に適用されたことがきっかけとなり，品質管理の重要性が理解され，電子天秤，振とう機の購入等，試験室の整備充実が図られた．これらのことは医薬品製造メーカーが目標とする一定の品質を持つ医薬品の製造に資するものである．

今回バリデーション支援事業に当科が参画し，試験方法を開発し，製品のバリデーションを行うことが可能となった．このことは科学的根拠をもって，小規模メーカーが一定の品質をもつ医薬品の製造および供給が可能となったという点で効果があったといえる．

今後も行政がバリデーション支援事業に積極的に取り組み続けることで，特に小規模製造所の意識改革及び分析技術の支援等を通じて薬事行政に有益な効果が現れると思われる．

文　献

1）岸本清子，安田一郎，宮武ノリエ他：東京衛研年報，**50**, 48-53, 1999.
2）第9改正日本薬局方解説書，C-1442-1445　廣川書店，東京
3）J.C.Miller，J.N.Miller：データーのとり方とまとめ方－分析化学のための統計学，77～99, 1991，共立出版株式会社，東京.
4）大垣市民病院薬剤部，吉村正一郎，早田道治，山崎太他：急性中毒情報ファイル，第3版，平成8年廣川書店，東京.
5）百瀬勉著：定量薬品分析，234，廣川書店，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 59-64, 1999

都内医薬品製造所のバリデーションに対する技術支援 ―漢方及び生薬製剤メーカーへの対応―

浜野朋子*, 瀬戸隆子*, 塩田寛子*,
安田一郎*, 上村尚*, 大西和夫*

Technical Supports of Validation Process for Pharmaceutical Factories in Tokyo —Herbal Medicines—

TOMOKO HAMANO*, TAKAKO SETO*, HIROKO SIODA*,
ICHIRO YASUDA*, HISASHI KAMIMURA* and KAZUO ONISHI*

Keywords： バリデーションvalidation, 技術支援technical support, 漢方及び生薬製剤メーカーpharmaceutical factory of herbal medicines, 製造管理manufacturing control, 品質管理quality control, 均一性equality, 検証inspection, 定量 determination

良質な医薬品を広く世界に流通させることを目的として，医薬品の品質や試験法などについて国際調和を図ろうという動きが，近年の国際的な趨勢となっている[1, 2]．この国際動向の中でバリデーションは位置付けられ，日本では，規制緩和の流れと相まってその導入が図られた．これにより，改正GMP[3]並びにバリデーション基準[4]という法的規制が敷かれ，医薬品製造所に対して科学的根拠に基づいた製造管理及び品質管理を実施，検証することを義務づけ，製剤の品質確保を徹底させることになった．

バリデーションの施行にあたって，東京都ではその前年の1995年に，都内医薬品製造所に対してバリデーション実施状況に関する調査を行った[5]．その結果，実施に至っていないとの回答が全体の半数にも上り，主たる要因が実施方法についての知識や技術が不十分であること，行政に対しては具体的個別指導が求められていることなどが判った．そこで，施行の年に東京都はバリデーション支援事業を策定し，これらのメーカーに対する行政支援を開始した．

バリデーションの実施には科学的検証が必須要件であり，改正GMPで実施が許可要件化された以上，生薬製剤といえども例外とはされ得ない．しかしながら，生薬が天産物であるという特殊性ゆえに，その適用を困難にしている場合が少なくない．実際，行政支援を必要とする多くは中小企業で，特に生薬製剤を扱うメーカーで対応の立ち遅れが目立ち，許可更新に向けて支援が急務とされる状況であった．そこで，我々は技術支援にあたり，まず生薬製剤中の指標成分を選定，定量し，バリデーション基準[4]に示されている含量均一性並びに製造工程の妥当性を，定量値を用いて科学的に検証する方法を例示し，その過程を通して，技術的な助言，指導を行うことにした．

生薬製剤の場合は特に，医薬品製造承認書が現在の科学水準に見合った内容に整備されていないものが多く残されている．承認の取得時期が古く，規格及び試験方法が全く設定されていない，いわゆる「縦書き承認」がいまだに見受けられるほか，規格及び試験方法が設定されていても，定量試験がないものも多い．また，定量試験に成分定量が設定されていない，あるいは定量法に感度の低い旧式法を採用したままのものもある．したがって，バリデーションの実施にあたっては，試験法の整備から始めなければならないことが予想された．

表１に，これまで支援を行った7社8製剤に設定されている規格及び試験方法の概略を示した．今回，剤形別に一連の支援の経緯を追うとともに，問題点について考察を行った．本稿では，これらをまとめ，報告する．

事例１：生薬粉末から成る丸剤（A-1．便秘薬）

試験室の概況：試験管理者１名，試験担当者３名が配置

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1．支援対象製剤8種の規格及び試験方法

製剤	定量試験		その他
	成分定量	その他	
A-1	結合型アントラキノン（比色法） バルバロイン（HPLC法） グリチルリチン酸（HPLC法）	乾燥減量 灰分，酸不溶性灰分	性状，確認試験 重量偏差試験，崩壊試験 重金属，ヒ素
A-2	なし（縦書き承認）		
A-3			性状，確認試験 重量偏差試験，崩壊試験
B-1	なし（縦書き承認）		
B-2		灰分，酸不溶性灰分	性状，確認試験 重量偏差試験
C-1		精油 灰分，酸不溶性灰分 乾燥減量，エキス含量	性状，確認試験，pH
D-1		エキス含量，強熱残分 アルコール数	性状，比重，pH 純度試験
D-2	鉄クロロフィリンナトリウム（比色法）		性状，確認試験 比重，pH 重金属，ヒ素，遊離鉄

され，既にバリデーション実施に向けての試験を試みていた．HPLCを2式所有．1式はバリデーション対応型で，新規導入したものだが，未稼働であった．

指標成分の選定；表1に示す通り，承認内容は比較的充実していたが，比色法によるダイオウ及びセンナ中の結合型アントラキノンの定量はばらつきが大きく，HPLCによるアロエ中のバルバロイン定量は手技に若干の問題が見受けられた．カンゾウ中のグリチルリチン酸は本剤の主薬効成分ではないが，配合量が少ないため均一性の検証に適していること，また日本薬局方にHPLCによる分析法が記載され[6]，定量法が確立されていることから，これを指標成分に選定した．

経過：過去の試験データから分析上の問題点を指摘し，改善点の提案を行った後，試験担当者3名に対し，試験手技誤差を把握する目的で，HPLCによる原料生薬カンゾウ中のグリチルリチン酸の定量を課した．この際，これは試験能力の評価でないことを強調し，徹底したブラインドで行うよう指示した．試験の結果，3者間に技量差がなく，繰り返し分析(n=6)のCV値が3者共1.5%以内と良好であることが確認できた．そこで，重要工程[4]のうち再混合工程を例にとり，均一性並びに混合時間の妥当性の検証を3ロットについて実施した．

サンプリングポイント(n=6)；混合機停止時の試料上層部，中層部，下層部から，それぞれ均等に3ポイント，2ポイント，1ポイント（図1）．

サンプリング時期(n=6)；混合開始10分後，30分後，60分後，90分後，120分後（メーカー設定時間），180分後．

結果及び考察：メーカーと当所それぞれで試験を行った結果，いずれも3ロットの間にほとんど差は認められなかった．表2にロット1の結果を示したが，各サンプリング時期における6ポイントのCV値を比較すると，両者の定量精度はほぼ同等と考えられた．個々のCV値は

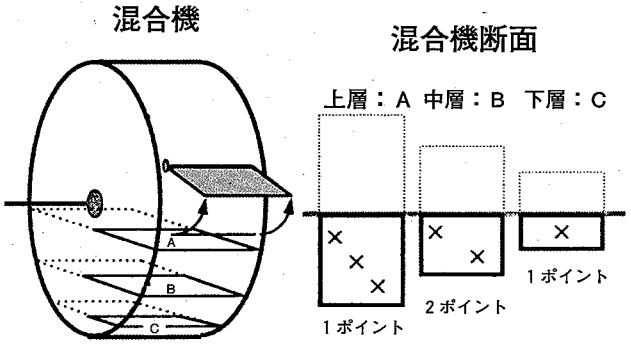


図1．製剤A-1における混合機内のサンプリング位置

表2．製剤A-1（ロット1）におけるグリチルリチン酸含量(%)の比較

混合時間	メーカー		当所	
(分)	グリチルリチン酸[a]	CV(%)	グリチルリチン酸[a]	CV(%)
10	0.453	1.08	0.372	1.25
30	0.416	0.60	0.374	0.73
60	0.418	1.44	0.374	0.79
90	0.414	0.86	0.371	0.73
120	0.422	1.15	0.370	1.20
180	0.415	1.29	0.374	0.71

a）平均値（n=6）

いずれも良好で，混合10分後には既に均一性が実証されたが，安全を期して混合時間は30分と設定するのが適当と判断された．これより，メーカーは従来の混合工程が1/4に短縮でき，効率化につながる結果となった．

グリチルリチン酸の含量は，メーカー側が3ロット共高い値を示したが，これは後に，ピーク分離が不十分で夾雑ピークも計り込んだためであることが判明した．試験法の特異性[7]に関する検証を事前に十分行うことができなかったことが原因で，今後の指導上の課題となった．

メーカーはこれまで，独自に行った回顧的バリデーションで得た10%のCV値をもって，製造工程管理は良好と評価していた．しかし，このバリデーション実地体験を通して，分析精度並びに分析技術の向上を体得したわけで，今後はこれを範例に試験範囲を拡大し，バリデーションを軌道に乗せていく自信を得たものと考える．

事例2：生薬粉末から成る丸剤（A-2. 婦人薬）

試験室の概況：試験担当者は1名配置されているが，実際に試験は行っていない．HPLCを1式所有している．

指標成分の選定；ケイヒ中のケイヒ酸，シャクヤク中のペオニフロリン等定量可能な指標成分のうち，A-1と同様の理由で，カンゾウ中のグリチルリチン酸を選定した．

経過：本剤は縦書き承認のため，まず試験法の設定から取り掛かった．HPLC条件を種々検討したが，夾雑ピークの妨害が甚だしく，ピーク純度，スペクトルマッチ度によるピーク検定を行いながら，最適条件を設定した．

本剤は，1ロット分を4バッチに分割して製造しており，生薬粉末7種を混合後，精製水，蜂蜜，デンプンを加えて練合する工程もバッチ毎に行っている．そこで，バッチ内及びバッチ間の均一性と練合時間の妥当性について，検証を行った．

サンプリングポイント(n=6)；練合した試料を平らにならし，ランダムにサンプリングする．

サンプリング時期(n=5)；生薬粉末だけを2分間混合後(練合開始時)，蜂蜜等を加えて練合開始1分後，3分後(メーカー設定時間)，8分後，13分後．

結果及び考察：試験結果を表3に示したが，各々のバッチのCV値から，バッチ内の均一性は確保されていると考えられた．しかし，グリチルリチン酸含量はⅠ，Ⅱバッチに比べ，Ⅲ，Ⅳバッチの値が低い傾向が見られ，バッチ間での均一性は保たれていない可能性が示唆された．最終製品に至る前に，4バッチ分をまとめて混合する工程を挿入するよう，提案する必要がある．また，練合時間については，CV値から見て，既に練合1分後で十分に混和されていると考えられ，メーカーの設定している3分間の練合時間は妥当と判断された．

表3．製剤A-2における各サンプリングポイントでのグリチルリチン酸含量(%)

練合時間 (分)	バッチ			
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
0[a]	0.462[b]	0.465	0.453	0.452
	(0.52)[c]	(0.49)	(0.42)	(0.78)
1	0.395			
	(0.99)			
3	0.392	0.392	0.383	0.380
	(0.96)	(0.95)	(0.96)	(0.82)
8	0.387			
	(0.27)			
13	0.385			
	(1.15)			

a) 生薬粉末のみ混合2分後　b) 平均値(n=6)　c) CV(%)

事例3：生薬粉末から成る丸剤（A-3. 利尿薬）

試験室の概況：試験担当者は1名．旧型HPLCを1式所有．バリデーション実施に向けての対応は積極的で，既にHPLCによる定量を試みていたが，試験担当者の手技に問題があり，満足できる結果が得られていなかった．

指標成分の選定：配合生薬のうちサンシュユ中のロガニン，ボタンピ中のペオノール，ケイヒ中のケイヒ酸等が定量可能であったが，既にメーカーがロガニンの定量に着手していたことから，これを指標成分とした．

経過及び結果：メーカーから提出されたクロマトグラムでは明らかなピーク割れが確認され，定量値は激しくばらついていた．製剤の均一性の検証以前に，試験担当者の手技向上を図ることが先決であった．

まず，当所で試験法の設定を行い，メーカーが実施している方法と比較検討して，改善点を指導した．続いて，データのばらつく原因を可及的に排除するため，HPLCの基本操作を逐一点検し，問題点を洗い出した．インジェクタがマニュアル式であるため，注入をオーバーフロー方式に切り替えるなどの改善を図った後，新品のカラムで改めて分析を行った結果，ばらつきは飛躍的に改善した．しかし，依然としてCV値が安定しない傾向が続いたため，再度詳細に点検を行ったところ，GC用シリンジで注入を行っていたことが明らかとなった．目下，インジェクタ部分の整備点検が必要な状況である．

考察：試験担当者は，分析に係わる問題点を自ら把握することができず，当所からの指摘内容も十分に理解できていない様子が見受けられ，一連の指示に対する対応も

遅々としたものであった．本事例の問題は，試験担当者が分析技術に習熟していなかったことにある．当所に対しては，技術支援として基礎的事項からの入念な指導が要求され，それに沿った対応を行ってきたが，メーカー側には，技術習得の場を積極的に求めていく姿勢が必要であろうと考える．

メーカー所持の機器は旧型で，検出器の感度は最新型の1/5程度，ポンプはシングルヘッド型で，オートサンプラは付属していなかった．この状況を踏まえ，低感度でも分析可能な試験法を設定し，分析値のCV値の妥当性は脈流を考慮に入れて判断することとした．90分後に出現するゴーストピークは，試験担当者の実働時間と手技を考え，前処理を行わず，ゴーストピークを回避する分析プログラムを設定することで対処した．しかし，バリデーションを軌道に乗せていくことを考えると，将来的には，オートサンプラを用いたグラジェントによる分析を視野に入れておくことが望ましい．

事例４：生薬粉末から成る散剤（B-1．中風改善薬 及びB-2．胃腸薬）

試験室の概況：高齢の夫婦が経営し，妻が試験担当者となっている．分析機器はなく，高齢のため試験実施は難しい状況であった．

指標成分の選定：B-1は42種，B-2は９種の生薬粉末から成り，共にオウレンとオウバクとが配合されている．オウレン，オウバクに共通して含有されるベルベリンは，共存成分が多い場合でも，選択性の高いHPLC条件で定量できるほか，TLC上では鮮明な蛍光スポットとして特異的に検出することができる．そこで，ベルベリンを指標成分に選定した．

経過：B-1，B-2は受注製造で，注文量に応じた生薬粉末を混合，分包するのみの工程である．まず，バリデーション実施にあたり，HPLCによる試験を１年に１回程度外部委託することを提案した．また，バリデーション基準に対するＱ＆Ａ[8]に示された「確認試験のみが規定されている場合の運用」を，試験室の状況を勘案した上で敢えて適用することとし，日常的にはTLCによる確認試験を行うことを勧めた．そこで，当所でHPLC及びTLCによるベルベリンの試験法の設定を行った．

注文量分だけを仕込むため，混合工程での中間製品のサンプリングは難しいことから，最終製品を１包毎に分析し，得られたベルベリン含量を均一性の検証に用いることにした．また，分包は手作業で行われることから，重量偏差試験も実施した．TLCについては，ベルベリン標準系列を作成し，簡易定量法の検討も加えた．

結果及び考察：重量偏差試験の結果，B-1（15包分包）は偏差が0.0～1.2％，B-2（21包分包）は最大でも10%を超えるものはなく，最大値の7.4%を除き0.1～1.7%の範囲に分布した．これは，第12改正日本薬局方の重量偏差試験[9]に照らすと適合となり，手作業の分包が精度良く行われていることを示している．また，B-1を１包毎に定量して得たベルベリン含量のCV値は1.2%，B-2では1.3%で，分包が十分混和後に行われていることが検証された．さらに，TLCによる確認試験では，他の配合生薬の影響もなく，良好にスポットが検出できた．しかし，ベルベリン標準系列による簡易定量の試みは，視覚的に濃度差を捉えることが難しく，実用に適する結果が得られなかった．TLCは簡便な試験法ではあるが，経験のない高齢者に果たして実施できるものか，疑問が残る．

本事例は，長年培った経験が，機械のように正確な手作業を生み出した１例である．簡易な製造工程においては，正しく品質検査された原料を用い，正確なSOPに従って製造すれば，バリデーションの目的に適った品質の製剤を恒常的に得ることが可能と考える．

事例５：生薬刻み剤（C-1．婦人薬）

試験室の概況：試験担当者１名．HPLCは所有しているが，稼働していない．

指標成分の選定：本剤は，刻み生薬11種を混合した振り出し剤である．そのうちのカンゾウ及びオウレンは，１包中の配合量が500 mg以下と極めて少ないため，刻みではとりわけばらつく可能性が高いと考えられ，グリチルリチン酸及びベルベリンを指標成分に選定した．

経過：グリチルリチン酸は，夾雑ピークの妨害とゴーストピークの出現のため，HPLC分析に長時間を要した．メーカー所持の機器がグラジェント対応ならば分析時間の短縮が可能だが，アイソクラクティックでは非効率的な分析は避けられない．一方，ベルベリンはイオン対を用いたHPLC法で良好な結果が得られ，その選択性の高さにより，効率的な条件設定が可能であった．

本剤の製造は，11種の秤量皿を備えた分包機３レーンが３～４日間稼働して，１ロット生産となる．秤量皿は一定の重量が入るよう成型されているが，配合量が少ないほど偏差は増大するため，分包時の配合量の均一性を検証する必要がある．また，偏りが生じ易い刻み生薬を原料に用いているうえ，１ロットあたりの生産量が10万包前後と大容量であるため，ロット生産を通じて原料が均質な状態で分包されていることも検証しなくてはならない．そこで，１日毎の製造終了時に，分包された中間製品及び原料生薬を各レーンから１回ずつサンプリング

し，3ロットについて均一性の検証を行った．

結果及び考察：原料生薬を定量した結果，ロット内のカンゾウ中のグリチルリチン酸並びにオウレン中のベルベリン含量のCV値は，最大でも3%程度とばらつきが少なく，また3ロットの定量値は概ね同等であった．このことから，ロット内及びロット間の製造を通じ，原料生薬が刻みの偏りのない均質な状態で各製造レーンに供給されていることが検証された．表4には中間製品の定量結果を示したが，3ロットのグリチルリチン酸並びにベルベリン含量はいずれも同じ様な値を示し，ロット間に有意な差は認められなかった．

また，中間製品の平均含量に対する個々の偏差を求めたところ，グリチルリチン酸で最大54.2%，ベルベリンでは33.2%であった．医薬品製造指針[10]によれば，生薬エキス及び最終製品の含量規格幅は，その中心値から±50%以内，可能な限り±30%以内とすることとなっている．これに加え，本剤が刻み生薬を用いた製剤であり，1包あたりの配合量が極めて少ないことを考慮すると，本剤の定量値のばらつき程度は許容範囲内と判断される．

今回のような刻み剤の場合，重要工程に該当するのは秤量工程のみで，いわゆるバリデーションを適用するには馴染まない．原料生薬の刻みの切度，秤量精度，品質並びに均質性等を確保することで，十分に一定の品質が担保されるものと考える．

事例6：生薬抽出エキスから成る液剤(D-1. 滋養強壮薬)

試験室の概況：試験担当者1名．分析機器はない．

指標成分の選定：定量可能な成分は数種あったが，製剤中で安定して定量ができるものとして，シャクヤク中のペオニフロリンを選定した．

経過：本剤は9種の生薬が配合された薬用酒で，HPLC分析にあたり，夾雑物による妨害が懸念された．ピーク純度，スペクトルマッチ度によるピーク検定を行いながら，ペオニフロリンの定量に最適なHPLC条件を設定した．

貯蔵原酒を必要量抜き，アルコール数を調整，ろ過，一旦別タンクに移した後充填するまでが一連の製造工程である．均一性の検証にあたり，ろ過後の貯蔵タンクの上層部と下層部，充填工程の序盤，中盤及び終盤からサンプリングし，ペオニフロリンを定量した．

結果及び考察：いずれのサンプリングポイントにおいてもペオニフロリン含量は一定で，製剤の均一性は確保されていた．通常，液剤で均一性が損なわれることはないため，むしろ，ロット間の均一性の確保上，ロット生産毎に貯蔵原酒の品質をチェックすることが重要である．

なお，本剤は製造が年1回程度のため，自社での試験を止め，現在外部委託に向けての作業が進行中である．この際，常時同一カラムで分析が行えるよう，メーカー側でカラムを準備し，所持しておくことを勧めたい．

事例7：生薬抽出エキスから成る液剤(D-2. 疲労回復薬)

試験室の概況：品質管理室長の下に係員を2名配置し，表1の比色法により，既にバリデーションに取り掛かっていた．分光光度計は，波長固定型のものを所有．

指標成分の選定：本剤はクマザサ葉のみから成る製剤で，その含有成分である鉄クロロフィリンナトリウムを指標成分とした．

経過：鉄クロロフィリンナトリウムは多成分の混合物で，天産物ゆえの成分組成と組成比の変動を考えるとき，必ずしもHPLC等による分別定量が良いとは言えない．総量を表す比色法が，むしろ妥当な方法と考えられた．

表4．製剤C-1における3ロットのグリチルリチン酸及びベルベリン含量(%)

ロット	製造日	グリチルリチン酸			ベルベリン[a]		
		3レーンの平均	ロット内の平均	ロット内のCV(%)	3レーンの平均	ロット内の平均	ロット内のCV(%)
1	1日目	0.111[b]			0.189[b]		
	2	0.107	0.105[c]	13.8	0.220[c]	0.214[c]	13.6
	3	0.097			0.233		
2	1	0.117			0.221		
	2	0.096	0.115[c]	20.3	0.218[c]	0.219[c]	9.7
	3	0.131			0.217		
3	1	0.122			0.249		
	2	0.097	0.109[d]	22.9	0.232[d]	0.235[d]	12.2
	3	0.105			0.248		
	4	0.114			0.213		

a) ベルベリン含量(%)は、塩化ベルベリンとして算出した　b) n=3　c) n=9　d) n=12

製造3ロットにつき，最終の充填工程において，充填開始直後，中盤及び終了直前の3ポイントでサンプリングを行い，均一性の検証を行った．

結果及び考察：充填工程における3ポイント間，並びに製造3ロット間で，鉄クロロフィリンナトリウム含量にばらつきはほとんどなく，全行程を通じて，常時均一な製剤が製造されていることが検証された．

メーカーの試験法を実地に行った結果，吸光度が3を超え，測定精度に問題が生じた．日本薬局方[11]では，吸光度が0.2～0.7になるように，試料溶液の濃度を調節するのがよいとしており，今後，試料採取量を少なくする，あるいは試料溶液を希釈するなどの対応をとることが望まれる．また，試料溶液に経時変化の傾向が認められたことから，試料溶液調製後，測定までの時間を取り決めるなど，試験法のSOPを見直す必要がある．

まとめ

本支援事業により，メーカーのGMP体制の整備も進展してきた．個別対応に重点を置いた当初の3年間を一区切りとして，今年度からは支援バリデーション，洗浄バリデーションに行政支援もステップアップする．しかしながら，依然としてバリデーション実施が困難な状況にあるメーカーが残されているのも事実である．行政としては，メーカーのGMP体制の確立に向けて，さらに進んだバリデーション支援を実施すると同時に，立ち遅れたメーカーの支援も忘れてはならない．

今回の技術支援を通して，試験を行う立場から，メーカーの試験室が十分機能していないこと，試験担当者が熟練していないことが，バリデーション実施を妨げる一因となっているように思われた．奥田[12]が指摘しているように，バリデーションに伴う仕事量は膨大である．試験室においては，積極的な省力化，効率化の推進に努めなければ，バリデーションへの対応は難しい．さらに，試験室の機能を十分に活かせるよう，講習会等の啓蒙活動を通じて，分析技術を含めた試験担当者の資質向上を図っていく必要があると考える．

現在のところ，行政側の試験担当者が行ったバリデーション支援事例はほとんど見当たらないが，今後，このような事例が多数集積されれば，査察マニュアル作成の資料として，有機的に生かされるものと思われる．また，当所の試験担当者がメーカー査察に同行するにあたっては，指導体制の整備が必要であることを，最後に付け加えたい．

謝　辞　本稿をまとめるにあたり，ご協力下さいました薬務部薬事指導課及び各薬事衛生事務所の各位に深謝いたします．

文　献

1）WHO Technical Report Series No.823, WHO EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS, 1992.
2）三澤馨，前田洋一：月刊薬事，**37**, 763-767, 1995.
3）医薬品の製造管理及び品質管理規則：厚生省令第3号，1994年1月27日．
4）バリデーション基準について：薬発第158号，1995年3月1日．
5）東京都衛生局薬務部薬事衛生課基準指導係：東薬工会報，**304**, 389-395, 1996.
6）日本公定書協会：第13改正日本薬局方解説書，D-227-228, 1996，廣川書店，東京．
7）日本公定書協会：第13改正日本薬局方解説書，F-17-34, 1996，廣川書店，東京．
8）バリデーション基準に対するQ＆Aについて：薬監第85号，1995年11月7日．
9）日本公定書協会：第12改正日本薬局方解説書，B-182-183, 1991，廣川書店，東京．
10）厚生省医薬安全局審査研究会：医薬品製造指針1997年版，303, 1997，薬業時報社，東京．
11）日本公定書協会：第13改正日本薬局方解説書，B-111, 1996，廣川書店，東京．
12）奥田秀毅：ぶんせき，**12**, 980-986, 1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 65-69, 1999

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の表示対象成分及び配合規制成分の同時分析

横山敏郎*, 森　謙一郎*, 中村義昭*
大貫奈穂美*, 松島陽子*, 藤井　孝*

Simultaneous Determination of Indicative Ingredients and Restrictive Ingredients in Cosmetics by HPLC

TOSHIRO YOKOYAMA*, KEN'ICHIRO MORI*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
NAHOMI OHNUKI*, YOKO MATUSHIMA* and TAKASHI FUJII*

In this paper, we describe the application of HPLC to the simultaneous determination of the fourteen indicative ingredients or indicative-restrictive ingredients in cosmetics.

The analytical procedure was as follows. A cosmetic sample was weighed at 1.0g in a 50-ml volumetric flask, then isoamyl *p*-hydroxybenzoate for internal standard was added, dissolved in ethanol by sonication and accurately filled to 50ml. After being left overnight, the supernatant solutions were injected into a gas chromatograph.

The determination of the fourteen ingredients was performed on a Model LC-10AT HPLC equipped with a photo-diode arrey detector, and the low-pressure gradient elution method. The used colomun was TSK-GEL ODS-80Ts(150mm×4.6mmI.D.). The injection volume was 10μl,and liquid flow-rate was 1ml/min. The column temperture was set at 40℃. The composition of mobil phase A was 0.05M sodium dihydrogenphosphate in water・methanol・acetonitrile(45:40:15) + 0.002M Cetyltrimethylammonium Chloride, B was acetonitrile・tetrahydrofuran・water (60：20：20) and C was water・methanol・acetonitrile(45:40:15). The gradient elution was A 100% −B 100% (30min)−C 0%(32min)−C 100% (35min)−B 0%(38min)−C 100% (42min)−A 100% (45min)−A 100% (55min).

This method could be satisfactorily used as a simultaneous determination for fifteen ingredients(methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, isopropyl *p*-hydroxybenzoate, butyl *p*-hydroxybenzoate, isobutyl *p*-hydroxybenzoate, dehydroacetic acid, sorbic acid, isopropylmethylphenol, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate, 2-ethylhexyl *p*-methoxycinnamate, 4-dihydroxybenzophenone, 2, 2', 4, 4'-tetrahydroxybenzophenone, 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoilmethane)in cosmetics.

Keywords：化粧品 cosmetics，同時分析 simultaneous determination，高速液体クロマトグラフィー HPLC，表示対象成分 indicative ingredients，配合規制成分 restrictive ingredients

緒　言

近年の規制緩和により，輸入化粧品が急増している．平成10年の化粧品輸入総額は994億円で，前年度に引き続き輸入記録を更新している．これに伴い無許可成分や許可量を超えた成分を含有する不正な製品が市場に出回る危険性も増大すると考えられる．一方，国民生活センターが集計した1998年の消費者苦情[1]の内容をみると，品目では化粧品が，内容では皮膚障害が依然として一位

* 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

である．この事実は先に述べた輸入化粧品の急増も関与している可能性が考えられる．このような状況に対して，都民の健康障害を未然に防止るためには，迅速で効率的な化粧品の分析法設定が急務である．そこで，著者らは化粧品検査の効率化を目的として，容器等への表示を義務づけられている成分（化粧品表示対象成分）と，化粧品種別許可基準に配合上限が規定されている成分（配合規制成分）の一斉分析法の検討を行ってきた．前報[2]ではガスクロマトグラフィーを用いた同時分析法について報告した．今回は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた一斉分析を試みたところ新たな知見を得たので報告する．今回検査対象とした成分は配合規制成分である紫外線吸収剤の2,4-dihydroxybenzophenone（DHB），2,2',4,4'tetrahydroxybenzophenone（THB），2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate（EDB），2-ethylhexyl *p*-methoxycinnamate（EMC），4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoilmethane（BMD），表示対象成分でかつ配合規制成分である防腐剤のmethyl *p*-hydroxybenzoate（MHB），ethyl *p*-hydroxybenzoate（EHB），propyl *p*-hydroxybenzoate（PHB），isopropyl *p*-hydroxybenzoate（IPHB），butyl *p*-hydroxybenzoate（BHB），isobutyl *p*-hydroxybenzoate（IBHB）（パラベンエステル），dehydroacetic acid（DHA），sorbic acid（SOA），isopropylmethylphenol（IPMP），及び紫外線吸収剤の2-hydroxy-4-methoxybenzophenone（HMB）について検討した．

実験方法

1．試　　薬

標準試薬等は，東京化成製又は和光純薬製の試薬特級を用いた．

2．混合標準溶液の作成

各標準物質及び内標準物質としてisoamyl *p*-hidroxybenzoate（IAHB）を50mg精秤し，それぞれ無水エタノールで溶解して2,500μg/mlの標準原液を作成した．この標準原液を1mlずつとり，IAHBの標準原液1mlを加え，無水エタノールで50mlに希釈して50μg/mlの溶液を作成した．

3．試料溶液の作成

化粧品1.0gを精秤し，IAHBの標準原液1mlを加え，無水エタノールで50mlとした．超音波処理した後，上澄液をとり，必要に応じてメンブランフィルターでろ過し分析試料とした．

4．分析条件

装置：高速液体クロマトグラフLC10-AT，フォトダイオードアレイ検出器SPD-M10AVP，オートサンプラSIL-10AXL，装置制御及びデータ処理ソフトウエアCLASS-LC10（以上，島津製作所製）．カラム：TSK-GEL ODS-80Ts．移動相:A；0.05Mりん酸二水素ナトリウム・メタノール・アセトニトリル（45：40：15）＋0.002M塩化セチルトリメチルアンモニウム，B；アセトニトリル・テトラヒドロフラン・水（60：20：20），C；水・メタノール・アセトニトリル（45:40:15）．グラジェント条件：Table 1　検出器：フォトダイオードアレイ検出器　200～350nm．流量：1.0ml/min，注入量：10μl．

Table 1. The Condition of Gradient Elution

min	A(%)	B(%)	C(%)
0	100	0	0
30	0	100	0
32	0	100	0
35	0	0	100
42	0	0	100
45	100	0	0
55	100	0	0

結果及び考察

1．分析対象成分

今回の検査対象成分は通常のルーチンワークで頻繁に分析する成分で、また個々の分析条件がオクタデシルシリル化シリカゲルカラム（ODS）と移動相として水，メタノール，またはアセトニトリルを使用する成分に限定した．検査対象成分の名称と，それぞれの化粧品種別許可基準における基準値をTable 2に示した．表示対象成分は定性試験を目標において，スペクトル測定により検査を行った．配合規制成分は定性試験はもとより，配合規制値を上回っているかどうかの簡易定量分析を目標として行った．今回はTable 2におけるCLS Category 1の濃度を基準として，配合上限標準溶液を作成し，配合規制濃度検定用として用いた．すなわち，DHB，THB，MHB，EHB，PHB，IPHB，BHB，IBHB及びIPMPを200μg/ml，DHA，SOA，HMBを100μg/ml，EDBを1400μg/ml，BMDを400μg/mlとして標準溶液を作成し，簡便迅速に定量分析用スクリーニングをすることができた．本スクリーニングの結果が配合規制値の90%以上である場合は，再度個々の対象成分について精密定量分析を行った．

2．移動相及び測定波長

移動相はA，B，Cの3種を用意した．移動相Aの組

Table 2. Objective Ingredients for Analysis, and Their Restrictive Values

Ingredient Name	Restrictive Value (%) CLS Category[1)]										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Restrictive Ingredients											
2,4-Dihydroxybenzophenone(DHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	—	—	—	0.2
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone(THB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	10	1.0	0.05	0.05	0.05	1.0
2-Ethylhexyl p-Dimethylaminobenzoate(EDB)	7.0	7.0	7.0	7.0	10	7.0	1.0	7.0	7.0	7.0	7.0
2-Ethylhexyl p-Methoxycinnamate(EMC)	10	10	10	10	10	10	10	1.0	7.5	7.5	5.0
4-tert-Butyl-4'-Methoxydibenzoilmethane(BMD)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	10	10	0.1	2.0	—	2.0
Indicative and Restrictive Ingredients											
Methyl p-Hydroxybenzoate(MHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ethyl p-Hydroxybenzoate(EHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Propyl p-Hydroxybenzoate(PHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Isopropyl p-Hydroxybenzoate(IPHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Butyl p-Hydroxybenzoate(BHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Isobutyl p-Hydroxybenzoate(IBHB)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Dehydroacetic Acid(DHA)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sorbic Acid(SOA)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Isopropylmethylphenol(IPMP)	1.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenone(HMB)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	0.02	5.0	5.0	5.0

1) CLS Category : The Comprehensive Licensing Standards of Cosmetics Category. 1 : Cleansing Preparations, 2 : Hair Care Preparations, 3 : Treatment Preparations, 4 : Makeup Preparations, 5 : Fragrant Preparations, 6 : Suntan and Sunscreen Preparations, 7 : Nail Makeup Preparations, 8 : Eyeliner Preparations, 9 : Lip Preparations, 10 : Oral Preparations, 11 : Bath Preparations.

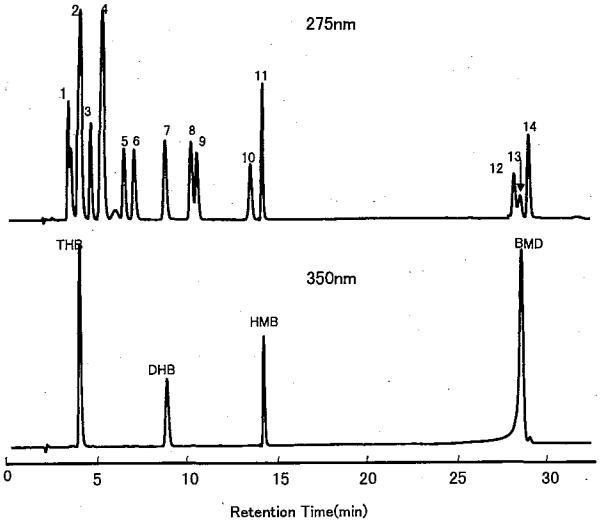


Fig. 1. Chromatograms of Fifteen Standard Ingredients
1.MHB 2.THB, DHA 3.EHB 4.SOA 5.IPHB 6.PHB 7.DHB 8.IBHB 9.IPMP, BHB 10.IAHB 11.HMB 12.EDB 13. BMD, EMC (2) 14. EMC

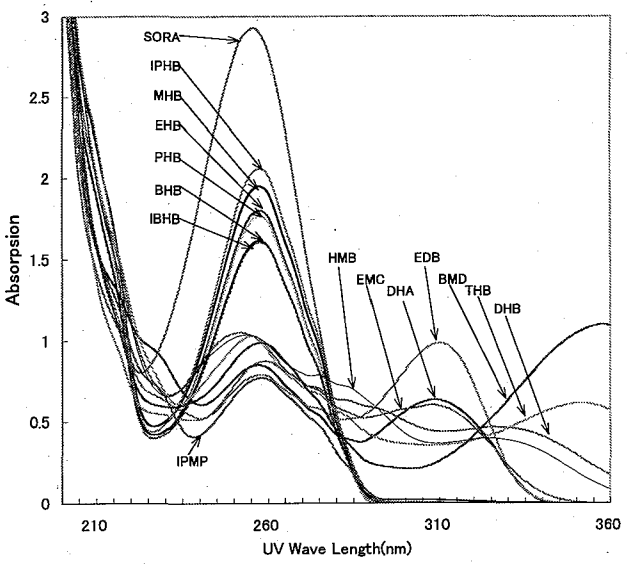


Fig. 2. UV Spectra of Objective Ingredients

成は基本的にパラオキシ安息香酸類分析用であり，移動相Bの組成は紫外線吸収剤の分離条件である．移動相Cは移動相Aから塩類を除いたものであり，グラジエントによる塩析出を防止するための洗浄用である．

検査した15成分の同時分析HPLCクロマトグラムをFig. 1に示した．検出器の主波長は対象成分のUV吸収曲線（Fig. 2）から，各成分の吸光度が比較的高く，成分による吸光度差が少ないこと，またベースラインのドリフトが比較的少ないことから275 nmとした．

Fig.1 に示すように，275nmのクロマトグラムにおいて，保持時間3.7分のピーク2はTHBとDHAのピークが

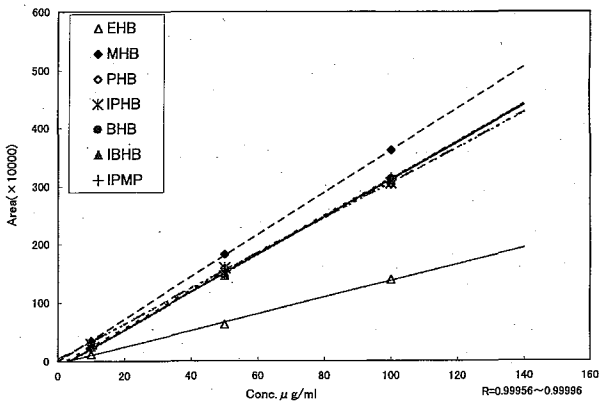


Fig. 3-1. Calibration Curves of Seven Ingredients

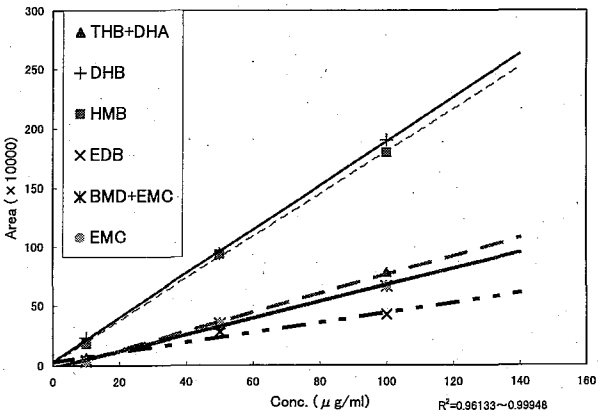


Fig. 3-2. Calibration Curves of Six Ingredients

重複した．しかし，350nmのクロマトグラムでは，Fig. 2のUV吸収曲線から明らかなように，DHAは350nmでは吸収がないため，THBのみの吸収ピークが得られた．

また，EMCについては275nmのクロマトグラムでは

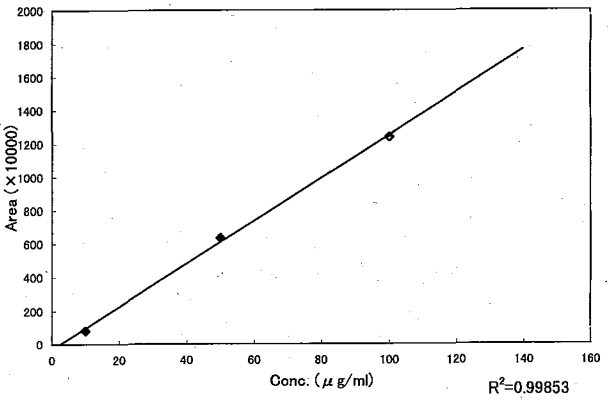


Fig. 3-3. Calibration Curve of SOA

2本のピークを示し，しかもピーク13がBMDのピークと重複した．しかし，この重複も350nmのクロマトグラムをとることによりBMDだけのピークを得ることができた．

IPMPとBHBについてもピークが重複した．この場合，350nmではどちらもＵＶ吸収がないため識別ができなかった．そこで，IPMPの吸収が極小になる245 nmでクロマトグラムの比較ををしたところ，良好に定性・定量分析することができた．

これらの結果から，THBとDHA，IPMPとBHB及びBMDとEMCの３つの重複ピークは，どれも吸収波長の違いで成分を見分けることが可能であることがわかった．実試料で本法を利用した場合も良好にスクリーニングできることが確認できた．

3．検量線の作成

検量線は，各々の成分について，10μg/ml，50μ

Table 3. Recovery of Objective Ingredients Added to Commercial Skin Creams

Ingredient (Added 2.5mg／1.0g)	Recovery* (%)	C.V.* (%)
2,4-Dihydroxybenzophenone(DHB)	97.2	1.1
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone(THB)	126.4	0.9
Dehydroacetic Acid(DHA)	126.4	0.9
2-Ethylhexyl p-Dimethylaminobenzoate(EDB)	81.5	1.3
2-Ethylhexyl p-Methoxycinnamate(EMC)	91.7	1.0
4-tert-Butyl-4'-Methoxydibenzoilmethane(BMD)	92.6	0.9
Methyl p-Hydoxybenzoate(MeP)	100.1	0.9
Ethyl p-Hydoxybenzoate(EtP)	116.8	1.0
Propyl p-Hydoxybenzoate(PrP)	96.8	1.5
Isopropyl p-Hydoxybenzoate(IPrP)	102.4	1.1
Butyl p-Hydoxybenzoate(BuP)	92.5	1.1
Isobutyl p-Hydoxybenzoate(IBuP)	92.5	1.0
Sorbic Acid(SOA)	68.4	1.0
Isopropylmethylphenol(IPMP)	134.1	0.7
2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenone(HMB)	95.8	

*n=3

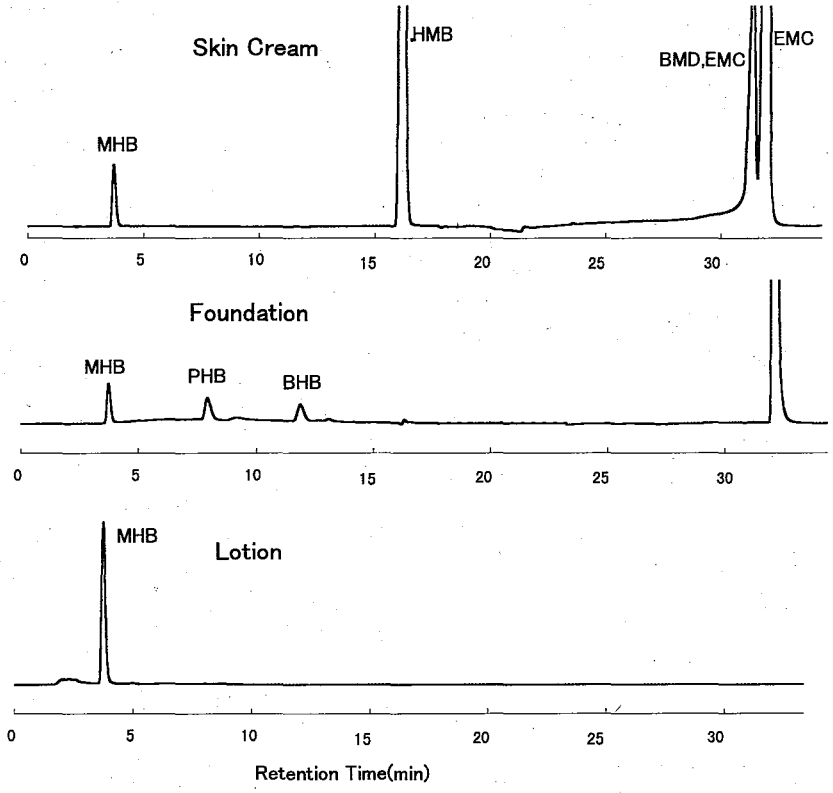


Fig. 4. Chromatograms of a Commercaial Cosmetics

g/ml, 100 μg /mlの3点で作成した.

その結果, Fig. 3-1～3-3に示すように感度の差によると思われる傾きの大小はあるものの, ほぼ原点を通る直線となった. 相関係数も良い値を得た.

Fig. 3-3は, ソルビン酸の感度が非常に高いため, 単独の検量線とした.

4. 添加回収実験

添加回収実験は, クリーム, ローション, ファンデーションについて行った. Table 3はクリームを用いて実験した結果であるが, 他の化粧品試料についても同様に良好な結果を得た.

5. 実試料の分析

本法を用いて市販のスキンクリーム, ファンデーション及びローションについて試験をおこなった結果, Fig. 4に示したように良好な結果を得ることができた.

まとめ

近年の高度にオートメーション化された液体クロマトグラフィーを用いることで, 15成分を一斉に分析する方法を作成することができた. 本法は簡便・迅速な方法であり, ルーチンワークとして行政の効率化に適切に対応可能である.

文 献

1) 国民生活センター編：消費生活年報1998, pp. 79-86, 1998, 新日本法規出版, 東京.
2) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 他：東京衛研年報, **48**, 96-100, 1997.
3) Kazuo Ikeda, Sukeji Suzuki, Yohya Watanabe : *J. Chromatography*, **482**, 240-245 1989.
4) 日本薬学会編：衛生試験法・注解, pp. 891-893, 1990, 金原出版, 東京.
5) 東京化粧品工業会：平成10年度化粧品工業年報, 1999, 東京
6) 厚生省薬務局審査課監修：化粧品種別許可基準, 1997, 薬事日報社, 東京
7) 厚生省薬務局審査課監修：化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブック, 第三版, 1996, 薬事日報社, 東京.
8) 厚生省薬務局審査課監修：化粧品・医薬部外品関係通知集, 1994, 薬事日報社, 東京.
9) 日本公定書協会編：化粧品原料基準, 第二版注解Ⅰ, 1984, 薬事日報社, 東京.
10) 厚生省薬務局審査課監修：医薬部外品原料規格, 1991, 薬事日報社, 東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 70-76, 1999

キャピラリー電気泳動を用いた化粧品中タール色素の一斉分析

大貫 奈穂美*, 森 謙一郎*, 中村 義昭*,
横山 敏郎*, 松島 陽子*, 藤井 孝*

Simultaneous Analysis of Tar Dyes in Cosmetics by Capillary Electrophoresis

NAHOMI OHNUKI*, KEN'ICHIRO MORI*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
TOSHIRO YOKOYAMA*, YOKO MATUSHIMA* and TAKASHI FUJII*

A rapid and simple simultaneous analysis by capillary electrophoresis (CE) was developed to determine the synthetic tar dyes for cosmetics and quasi-drugs.

The analytical procedure was as follws : After concentration by evaporation of a volatile component of cosmetics *in vacuo* or by using a high-speed centrifugal separator, the sample, diluted with 50% ethanol, was injected into CE. The CE conditions were as follows : capillary column ; fused silica (50 μm i.d.×56cm), running solution ; 30mM Glycine-NaOH buffer (pH10.5-10.7), applied voltage ; 30kv, photodiode-array ; 190-600nm, detection ; 215, 410, 520, 550 and 580nm and capillary temperature ; 25℃. 16 water soluble tar dyes were separated about 10min and were identified from the absorbant spectra of each peak.

By using this method, water soluble tar dyes used in the 16 commercial cosmetics and quasi-drugs were determined to have good handling quality.

Keywords：キャピラリー電気泳動 capillary electrophoresis, 化粧品cosmetics, 医薬部外品quasi-drugs, タール色素tar dyes, 一斉分析simultaneous analysis

緒　　言

現在，厚生省令[1]により化粧品等に使用が許可されているタール色素は84種類（うち水溶性色素38種類）である．従来これらの分析法として衛生試験法[2]には薄層クロマトグラフィー(TLC)法が収載されていたが，1995年の衛生試験法追補注解[3]によりフォトダイオードアレイを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法が新たに収載された．しかし，化粧品の剤型や共存物質は様々であり，界面活性剤等の影響により，TLC法またはHPLC法のいずれか単独の分析では色素の分離及び同定が十分に得られない場合もあり，これらの方法を組み合わせることでより正確な分析が可能となる．

一方，キャピラリー電気泳動(CE)は分離の原理がTLC及びHPLC法とは異なるため，これらの方法で分離できない検体への応用が可能と考えられる．この他の利点として測定時間が短く，フォトダイオードアレイによる各色素スペクトルの測定により精度の高い定性分析が可能である．また，グラジエントなどの複雑な条件を用いることなく一定の測定条件で複数の色素の同時分析が可能である．さらに，測定に必要な試料量も微量である．

CEを用いたタール色素の分析法は食品に使用される色素については報告されている[4,5]が，食品に用いられる色素（11種)より遙かに使用許可色素が多い化粧品・医薬部外品中タール色素の分析については報告されていない．そこで，今回はキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)を用いた化粧品中の水溶性タール色素の同時分析法を検討し，市販化粧品検査への応用を試みた．

方　　法

1．試　　料

平成９年４月より10年３月までの１年間に東京都内の

* 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

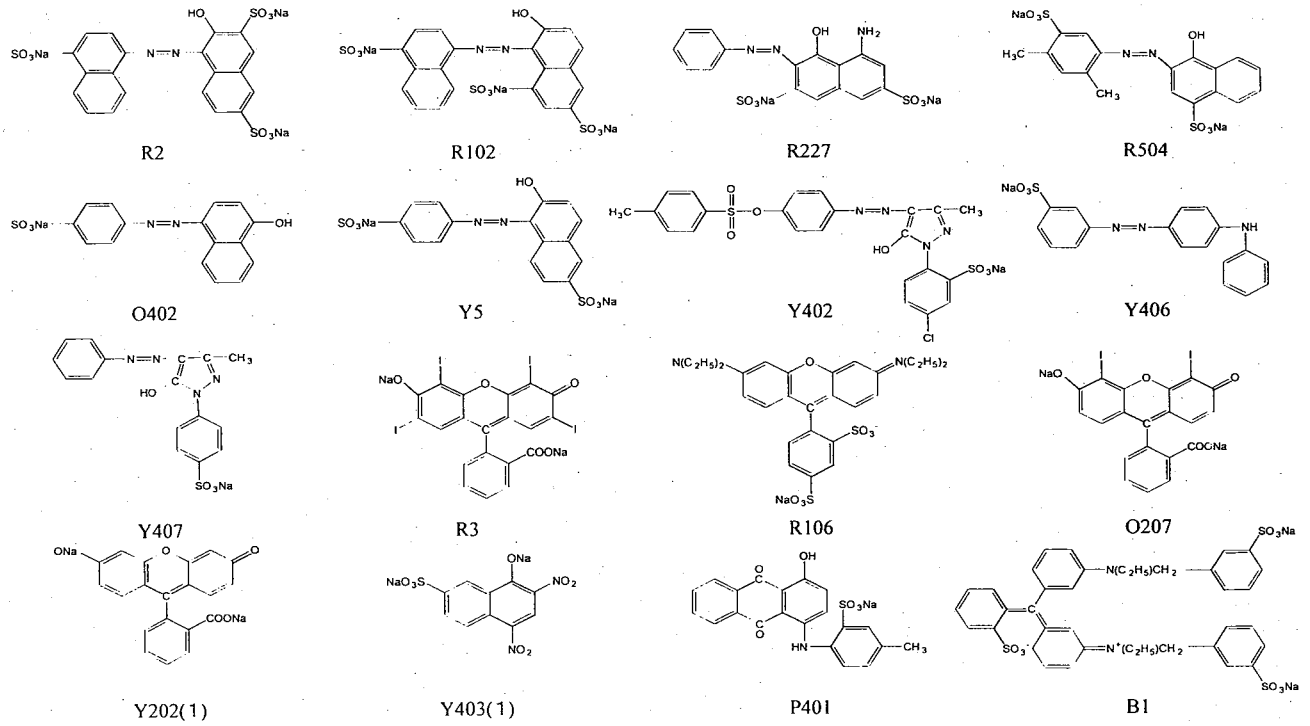


Fig. 1. Structures of the Tar Dyes Studied.
R is short for red, O for orange, Y for yellow, P for purple, B for blue. R2, R227, R504, O402, Y5, Y402, Y406 and Y407 are classified as azo dyes, R3, R106, O207 and Y202 as xanthene dyes, Y403 is as naphthol dye, P401 is as anthraquinone dye and B1 is as triphenylmethane dye.

小売店より購入した化粧品及び医薬部外品16検体を試料とした.

2. 試薬

1) 色素標準品

アゾ系色素：赤色2号，赤色102号，赤色227号，赤色504号，だいだい色402号，黄色5号，黄色402号，黄色406号，黄色407号（計10種類），キサンテン系色素：赤色3号，赤色106号，だいだい色207号，黄色202号（計4種類），ナフトール系色素；黄色403号，アントラキノン系色素：紫色401号，トリフェニルメタン系色素：青色1号．これらの色素の構造はFig.1に示すごとくであり，赤色102号及び黄色402号がアルドリッチ社製，赤色106号は和光純薬社製，その他の色素はコンスタム社製を用いた．

2) 標準原液

各標準色素約0.1gを精密にはかり，50%エタノール100mLに溶解し，1,000ppmの標準原液を調製した．

3) 標準溶液

各々の標準原液1mLをとり，50%エタノールを加えて20mLとし，50ppmの標準色素混合溶液とした．

4) その他の試薬

3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸(CAPS)緩衝液(pH10.5)及びホウ酸緩衝液(pH9.5)はフルカ製のHPCE用調製済み緩衝液を用いた．その他の試薬は東京化成又は和光純薬製試薬特級品を用いた．

3. 分析条件

1) CE測定条件

装置：横川アナリティカルシステムズ㈱製G1600A型，カラム：Fused silica (50μm×56cm, Hewlett-packard)，泳動液：30mMグリシン－水酸化ナトリウム緩衝液，電圧：30kv，温度：25℃，プレコンディショニング：4分，検出波長（バンド幅）：215nm(50nm)，410nm(60nm)，520nm(60nm)，550nm(60nm)，580nm(40nm)．フォトダイオードアレイ検出器：190～600nm．試料注入：加圧式50mbar，3.7秒（注入量として約4nL)．

2) HPLC測定条件

装置：日本分光(株)製ガリバーシリーズ，カラム：L-column ODS(4.6mmi.d.×250mm, (財)化学品検査協会)，移動相：(20mMリン酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)：イソプロパノール(25：1))：アセトニトリル(1：1)，カラム温度：40℃，流速：1mL/min，フォトダイオードアレイ検出器：200～800nm，注入量：10μL.

3) TLC条件

展開溶媒A；n-ブタノール：エタノール：0.5mol/L酢

酸（6：2：3），B；n-ブタノール：エタノール：0.5mol/Lアンモニア水（6：2：3）．色素によりA又はBの展開溶媒を用い，常法に従って分析を行った．

4．試験溶液の調製

1）浴用剤及びヘアカラー

各検体を50%エタノールに希釈して測定試料とした。

2）化粧水，エナメルリムーバー，洗口剤等

検体のうち，溶剤としてエタノール，アセトン等の揮発性有機溶媒を比較的多く含有する製品は，直接濃縮後50%エタノールで再度希釈して測定試料とした．水分含量の多い製品はエタノールで共沸させて濃縮後，必要に応じて50%エタノールで再度希釈して測定試料とした．

3）パック，歯磨き

検体に50%エタノールを加え，超音波分散させた．その後12,000rpmの高速遠心により上清を得，必要により濃縮した後に測定試料とした．

4）クリーム等

油溶性成分含量が多い製品については，石油エーテル及びトルエンで抽出して油脂を可能な限り除いた．その後に50%エタノールで分散し，12,000rpmの高速遠心にて上清を得，必要により濃縮し，測定試料とした．

4）その他

以上，1）～3）の方法で色素が十分得られない検体はSAXアニオン交換カラム（東ソー製）を用いる林らの方法[7]に準拠して色素の抽出及び濃縮を行った．これによりスルホン基及びカルボキシル基を持つ色素を効率よく吸着させ，濃縮することが可能となった．

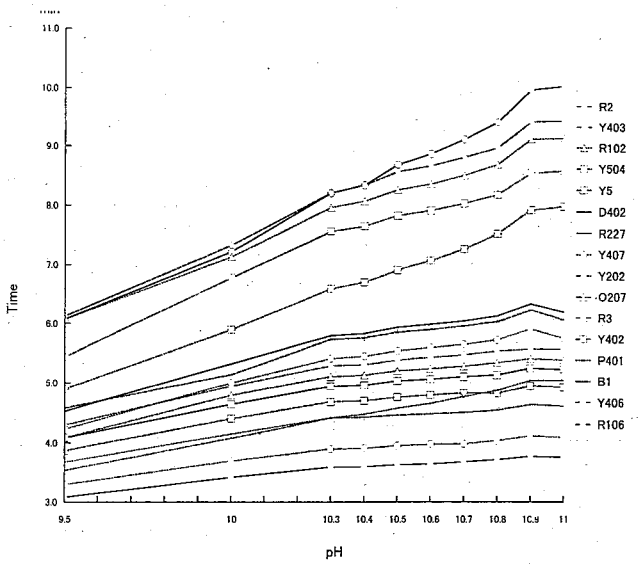


Fig. 2. Effect of pH on Separation of 16 Standard Dyes. Capillay：Fused Sillica, 50 μm i. d. ×56cm；Running solution：30mM Glycine-NaOH buffer, pH9.5～11.0；Applied voltage：30kV；Temperature：25℃

5．定性分析

CEでは泳動時間及びスペクトルを基に標準色素及び市販製品中の各色素を同定した．また、TLCでは色調及びRf値，HPLCは保持時間及びスペクトルにより各色素を同定した。

結果と考察

1．分析条件の検討

1）泳動液の選定

今回検討した16種の色素は構造内にカルボキシル基またはスルホン基を有している．これらをイオン化するためにアルカリ性の緩衝液を用いることとした．泳動液は，pH10前後の緩衝液を選び，30mMグリシン－NaOH緩衝液(pH10.5)，10mMリン酸－5 mM炭酸水素ナトリウム緩衝(pH10.5)，30mM CAPS緩衝液(pH10.5)及び30mMホウ酸緩衝液(pH9.5)を用いて分離度及び泳動時間の検討を行った．

その結果，いずれの緩衝液でも一定の分離が認められたがグリシン－NaOH緩衝液を用いると16種類の色素がすべて分離可能であった．そこで，グリシン－NaOH緩衝液を泳動液として選定し，色素の分離を検討した．

2）泳動の至適pHの選定

各色素の分離度及び分離時間についてグリシン－NaOH緩衝液のpHを9.5から11.0まで変化させて検討した(Fig. 2)．pH9.5からpH10にかけては全体的に十分な分離が得られなかったが，pH10から11にかけてはpHの上昇に伴い分離が改善された．

CEでは泳動液のpHが変化すると成分の移動度が変動するため検出順序が変わることがある．今回分析を試みた色素では，他の色素に比べ紫色401号及び黄色403号の移動度がpHにより大きく変化したため，検出順序に変動が認められた．従って，これら2種の色素の分析に際しては測定pHの設定が不適切な場合，他の色素と分離できない可能性も考えられる．

また，赤色2号と赤色102号とはFig.1に示すようにスルホン基の位置のみが異なる異性体である．これらの色素の分析を試みたSuzukiらはCZEによる分離は不可能であり，測定モードを硫酸ドデシルナトリウムを用いたミセル導電クロマトグラフィーとした上でβ-シクロデキストリンを添加することにより分離を達成できるとしている[5]．しかし，本法ではpHを10以上に設定することにより，無添加でキャピラリーゾーン電気泳動による十分な分離が可能であることが明らかとなった．

以上の結果より，16種の色素を良好に分離するために

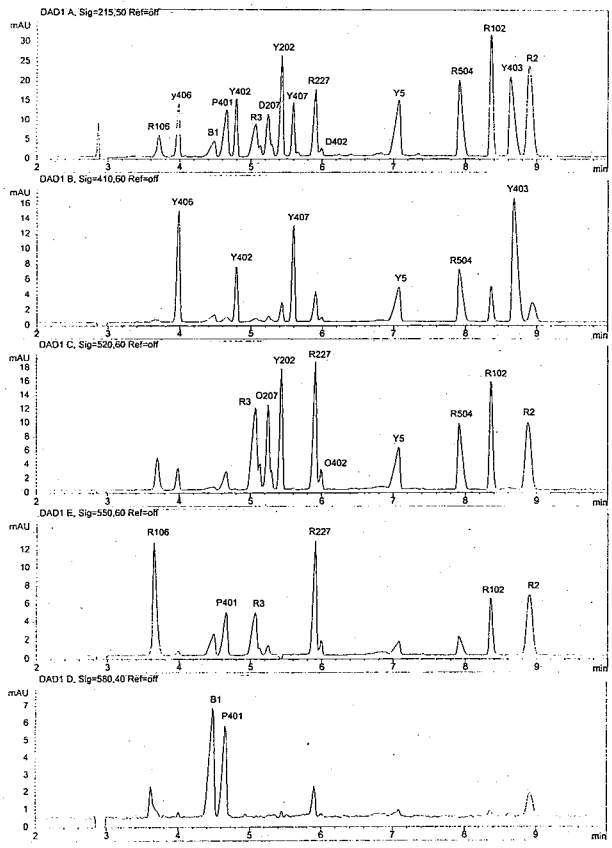


Fig. 3. Electropherograms at 215, 410, 520, 550 and 580 nm of 16 Standard Dyes.
Runing solution : 30mM Glycine-NaOH buffer, pH10.6. Other conditions are the same as Fig.2. Concetration of each dyes are 50 ppm.

はグリシン－NaOH緩衝液のpHは10.5～10.7がよいと思われる.

3）泳動液の濃度選定

グリシン－NaOH緩衝液のグリシン濃度を10から50 mMに変化させて分離度及び分離時間の検討を行ったところ，10mMでは後半に検出される黄色504号から赤色2号までの分離が不可能であった．30mM以上の濃度で十分な分離が得られたため，泳動液に用いるグリシン濃度は30mMとした.

4）標準色素の分析結果

上記1～3)の分析条件で測定した50ppmの標準色素液のフェログラムをFig.3に示す．今回使用したCEの装置では5種類の測定波長で同時にモニターすることが可能である．このため，分析を試みた16種の色素の極大吸収波長に最も近くなるように4種類の測定波長を設定した．すなわち，それぞれの極大波長に対応する410nm(黄色)，520nm(だいだい色)，550nm(赤色)及び580 nm(青及び紫色)を測定波長とした。さらに非特異的に全

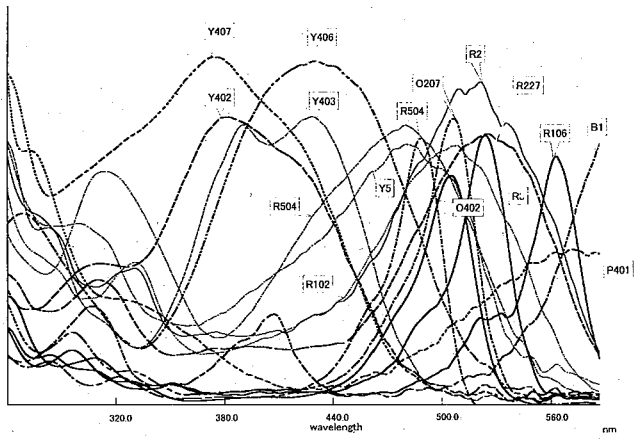


Fig. 4. Visible Spectra of the 16 Standard Dyes.
R : red, O : orange, Y : yellow, P : purple, B : blue.

ての成分を検出するための215nmでも併せてモニターした.

Fig. 4にフェログラムから得られた各色素のスペクトルを示した．これらのスペクトルはそれぞれの色素に特有であり，各色素を確実に同定可能である.

ただし，本装置のフォトダイオードアレイ検出器の測定波長範囲は190～600nmであることから，極大波長が630nmの青色1号はスペクトルのピークを検出することはできない．したがって，青色1号は410nm付近の小ピークと長波長側にかけて高くなっていくピークのパターンから同定する必要がある．このため，赤及び黄色系の他の色素に比べて，製品からの青色1号の検出及びスペクトルによる同定は困難であることも予測される.

これら16種類の色素について検出限界，泳動時間及びその変動係数をTable 1に示した．本法は色素の定性分析を目的としたため，Fig.4で示した各色素に特有なスペクトルが検出できる最低濃度を検出限界に設定した．その結果，本法における検出限界濃度はほぼ5～10 ppmとなった.

フォトダイオードアレイ検出器付HPLCにおいて各色素に特有なスペクトルが検出できる最低濃度は10μL注入時に0.1～0.5 ppm，TLCの最低検出濃度は1μLをスポットした場合に10ppm以上である．したがってCEはTLCとほぼ同程度の濃度で検出可能である.

また，50ppmの標準色素溶液を用いた場合，泳動時間の変動係数は0.6～1.5%程度であり，泳動時間から色素を推定する際に問題は生じないと考えられる．以上のごとく，CEを用いた水溶性タール色素の一斉分析は，TLC及びHPLCによる分析法と比較して検出感度は同等であり，分析操作の簡便性，分析時間が10分以内と短時間であることなどの点で良好な分析法であると評

価した．

2．市販製品の分析

上述の評価に基づき，市販化粧品及び医薬部外品をCEを用いて分析した結果について述べる．

Table 1. Detection Limit and Reproducibility of 16 Standard Tar Dyes

Dye	Detection limit (ppm)	Migration time (min)	C.V.(%)[1]
R106	5	3.65	0.62
Y406	10	3.98	0.66
B1	10	4.48	0.72
P401	10	4.66	0.71
Y402	10	4.79	0.79
O207	10	5.07	0.81
R3	5	5.24	0.81
Y202	5	5.43	0.87
Y407	10	5.60	0.91
R227	10	5.91	0.94
O402	5	5.99	0.96
Y5	5	7.07	1.19
R504	10	7.91	1.31
R102	5	8.36	1.42
Y403	5	8.46	1.47
R2	5	8.86	1.49

1）C.V.(%) at 50ppm, n=5

1）CEとTLC及びHPLCによる市販製品の分析結果の比較

タール色素は表示対象成分であり，薬事法により使用されている色素名を容器に記載するように定められている．そこで，容器に表示されている使用色素について，CEによる分析を行った．また，CEによる分析との比較のために各色素に応じた条件でTLCを行い、TLCにより十分な分析が行えなかった検体についてはHPLCによる確認を行った．

Table2に示すように16種の市販化粧品及び医薬部外品の分析を行ったところ，製品の剤型に関わらずCEによる含有色素の分析が可能であった．また，検出した色素は化粧水２及びエナメルリムーバー２を除き表示と良く一致していた．青色１号に関しても妨害ピークのため検出できなかったエナメルリムーバー２を除き検出・同定することが可能であった．更に，浴用剤の分析においてCEでは全ての色素を検出したのに対し、TLC及びHPLCでは分離が不十分で検出されない色素があった．

また，分析を行ったヘアカラー１及び２にはだいだい色205号及び黒色401号が使用されていた．これらの色素は一斉分析からは除いたものであるが，単独の色素標準液を作成し，泳動時間及びスペクトルを比較することで同定することができた．

なお，製品からの色素の抽出について，CEではSAX

Table 2. Analytical Results of Tar Dyes Extracted from Commercial Cosmetics and Quasi-drugs by CE and HPLC or TLC

Cosmetics and Quasi-Drugs		Indication	Analytical method	
			CE	TLC, HPLC
Shampoo	1	R2	R2	R2
	2	Y4,Y5	Y5	Y4[2],Y5[2]
Hair Coloring Preparation	1	O205,P401,Black401	O205,P401,Black401	O205,P401,Black401
	2	R201,O205,P401,Black401	O205,P401,Black401	R201,O205,P401,Black401
Cream		Y4,Y403	Y403	Y403
Lotion	1	R227	R227	R227
	2	R504	R227[1]	R227[1,2]
Perfume		R504	R504	R504
Pack		R504	R504	R504
Nail Makeup Remover	1	R106,P401	R106,P401	R106,P401
	2	R227,B1	R227,R504[1]	R227,R504[1,2],B1
Lipstick		R104	R104	R104
Lip Cream		Y5	Y5	Y5
Tooth Paste	1	R102	R102	R102
	2	B1	B1	B1
Oral Preparation		B1	B1	B1
Bath Preparation		R2,R102,Y5,Y202,B1	R2,R102,Y5,Y202,B1	R2,Y5,Y202,B1

1）Un-indicated tar dye was detected.

2）Detected by HPLC.

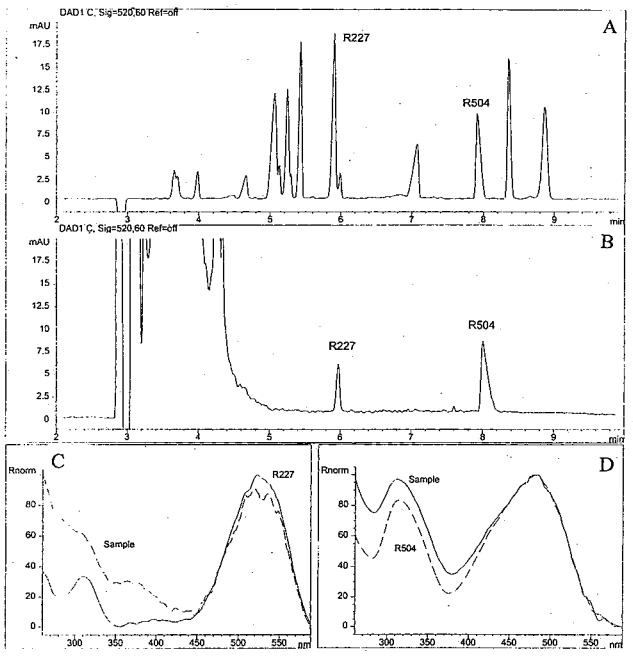


Fig. 5. Electropherograms and Visible Spectra of Standard Dyes and Commercial Nail Makeup Remover.
A : Electropherogram at 520 nm of standard Dyes.
B : Electropherogram at 520 nm of commercial nail makeup remover.
C : Visible spectra of standard R227 extracted from nail makeup remover.
D : Visible spectra of standard R504 and R504 extracted from nail makeup remover.

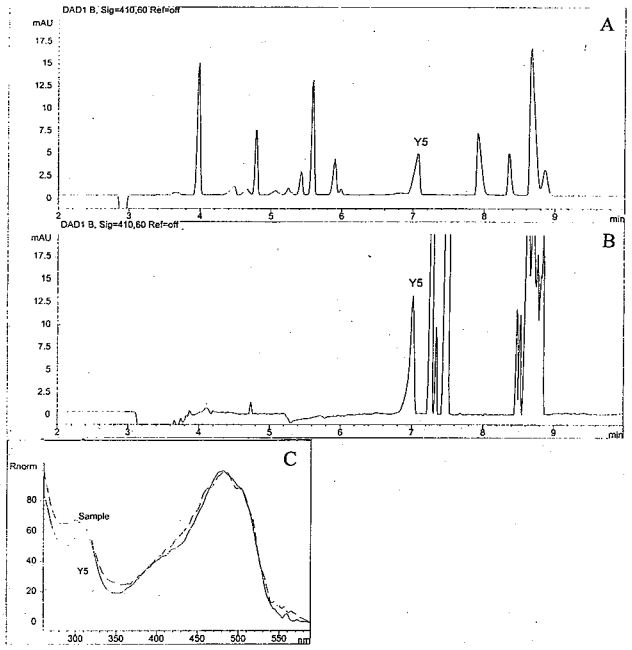


Fig. 6. Electropherograms and Visible Spectra of Standard Dyes and Commercial Lip Cream.
A : Electropherogram at 410 nm of standard dyes.
B : Electropherogram at 410 nm of commercial lip cream.
C : Visible spectra of standard Y5 and Y5 extracted from lip cream.

カラムを用いた濃縮を行うと泳動時間が大きく変動する場合があった．これはカラムから色素を溶出させるために用いる塩酸が残留し，泳動時間に影響するためと思われる．この場合も標準色素スペクトルとの比較及び標準色素添加により定性は可能であるが，CEを用いた分析ではSAXカラムを用いず，試料の液性を中性付近に保ちながら濃縮を行う方がよい結果を得られると考えられる．

2）CEによる分析例

CEによる市販化粧品の分析結果の例としてFig.5にエナメルリムーバー2のフェログラム及びスペクトルを示した．検出波長520nmで5.95分及び8.03分に2種類の赤色系のピークが認められた．これら2種の色素は泳動時間及びスペクトルの比較により赤色227号及び504号であることを確認した．この製品は容器に赤色504号と表示されておらず，薬事法上の表示違反に該当する事例である．

Fig.6はCEによるリップクリームの分析結果である．検出波長410nmで複数のピークが認められるが，泳動時間及びスペクトルを比較したところ6.98分のピークが黄色5号であることが判明した．クリームやリップクリームのように油溶性成分が多く含まれている製品の場合，TLCによる分析では薄層板上に共存物質に由来する黄色のスポットが現れ，定性が困難になる例がみられる．しかし，本法のようにスペクトルを確認することで共存物質由来の黄色の成分とタール色素との判別が容易となる．

まとめ

化粧品及び医薬部外品中の水溶性タール色素についてCEを用いた一斉分析法の検討を行った．その結果，16種の色素を5～10ppmの濃度で10分以内で分析することができた．標準色素では各成分の検出限界濃度は5～10 ppm，泳動時間の変動係数は0.6～1.5%であった．これによりCE法は従来法のHPLC及びTLC法と比較して，分析感度は同等であるが，分析精度，分析操作，分析時間及び試料調製の簡便性などの点で優れた分析法であることを確認した．本法を市販製品の検査に適用したところ，剤型に関わらず簡便な試料調製のみで効率的に色素

の定性分析が実施できた.

文　献

1）昭和41年8月31日厚生省令第30号「医薬品等に使用されるタール色素を定める省令」.

2）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990，1990年版第1刷，894－917，平成2年，金原出版株式会社，東京.

3）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990付．追補(1995)，1990年版第5刷，1743-1745，平成8年，金原出版株式会社，東京.

4）渡辺敏郎，長谷川直樹，山本明，他：分析化学，**45**，765-770, 1996.

5）Suzuki Sumiko，Shirano Mika，Aizawa Momoyo, et.al.：*J.Chromatogr.A*, **680**, 541-547, 1994.

6）林智子，深谷幸代，田中宏，他：食衛誌，**34**, 398-403, 1993.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 50, 77-80, 1999

輸入化粧品中の5－ブロモ－5－ニトロ－1，3－ジオキサンの分析法

中村義昭*，森　謙一郎*，大貫奈穂美*，
横山敏郎*，松島陽子*，藤井　孝*

Determination of 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane in an Imported Cosmetic

YOSHIAKI NAKAMURA*, KEN'ICHIRO MORI*, NAHOMI OHNUKI*, TOSHIRO YOKOYAMA*, YOKO MATUSHIMA* and TAKASHI FUJII*

Analytical method of an antiseptic, formaldehyde donor, 5-bromo-5-nitoro-1,3-dioxane(BND) was developed by ECD-GC and GC-MS(CI). BND was detected in a imported shampoo and was not permitted under the Japanese Drugs, Cosmetics and Medical Instruments Act. The concentration of detected BND was 80ppm in the shampoo. DB-1 (0.53mmi.d.×30m) was used as a GC column. Good chromatographic results were carried out by putting a bit of glass wool into the GC insert portion. The concentration of detected formaldehyde was 0.01% in the shampoo. It was suggested that BND was decomposed to formaldehyde in the manufacturing process of shampoo.

Keywords：5-ブロモ-5-ニトロ-1,3-ジオキサン 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane，ブロニードックス L bronidox L，輸入化粧品 imported cosmetics，ボディシャンプー body syampoo，ガスクロマトグラフィー GC，ガスクロマトグラフィー/質量分析法 GC/MS

緒　言

近年，我が国では規制緩和により輸入化粧品が増加しており[1]，製品に使用される防腐又は殺菌を目的とする成分の種類も多くなっている．このため平成７年には厚生省告示によりホルムアルデヒド（以下FAと略す）遊離型殺菌剤としてイミダゾリジニルウレア及びDMDMヒダントインが表示対象成分としてシャンプーやリンス等の洗い流す製品についてのみ使用が許可された[2]．今回ドイツ製のボディシャンプーを検査したところFAを検出した．この製品の容器にはFig.1に示す邦文表示が添付されているが，これには表示対象成分である上記２種のFA遊離型殺菌剤の記載は見られなかった．しかし，この容器にはFig.2に示す英文の全成分表示が印刷されており，その中にFA遊離型防腐殺菌剤である5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane商品名ブロニードックスＬ（以下BNDと略す，Fig.3)[3]の記載が見られた．ところが，このBNDは現在我国において使用を許可されておらず，本品は違反品であることが示唆された．BNDの分析方法はReinhard[4]らが電子捕獲検出器付ガスクロマトグラフ(GC-ECD)でパックドカラムを用いた分析法を報告している．しかし，この分析法では，得られたGCピークはブロードであり，しかも分析回数を重ねるうちにピークが検出されなくなる現象が起こった．そこで，上記の製品を検査するに際し，分析法の改良を試みた．今回はGCカラムにメガボアカラムを用い，ガラスインサートにガラスウールをつめる方法で分析した．その結果，上記の問題を解消し，良好な結果を得たので報告する．

実験方法

１．試料

平成10年８月東京都内で購入したボディーシャンプー

* 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

カミレン60 ーフスバッド (化粧石けん液)
プロピレングリコール だいだい色205号 200ml
適量を水でうすめて皮膚を清浄にし、洗い流す
原産国：ドイツ 輸入元：バン産商株式会社 東京都千代田区外神田3-3-5 (お肌に合わないときは使用をおやめ下さい)

Fig.1. Indication of Japanene Ingredients on Receptacle

INGREDIENTS:

AQUA, SODIUM MYRETH SULFATE, COCAMIDOPROPYL BETAINE, PROPYLENE GLYCOL, CHAMOMILLA RECUTITA, PEG-7 GLYCERYL COCOATE, LAURETH-2, COCAMIDE DEA, UNDECYLENAMIDE DEA, 5-BROMO-5-NITRO-1,3-DIOXANE, LACTIC ACID, PARFUM, CI 13015, CI 15510

Fig.2. Indication of English Ingredients on Receptacle

(ドイツ製) を試料とした.

2．試薬

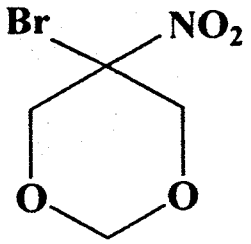
(1)FA標準原液：日本薬局方ホルマリンの項の定量法[5]に従って標定し，ホルムアルデヒドの濃度が36.6%と判明したFA溶液（和光純薬(株)）を0.28mlとり，水を加えて100mlとした．(2)FA標準溶液：標準原液を0.5ml取り水を加え100mlとした．この溶液1mlは5ppmのFAを含む(用時調製)．(3)アセチルアセトン（以下AAと略す）溶液：酢酸アンモニウム150gを水に溶かし，酢酸3mlおよびAA溶液2mlを加え，さらに水を加えて1000mlとした．(4)BND標準溶液：BND（シグマ製）0.01gを精密に取りエタノールを加えて100mlとし，100ppmの標準溶液を作成した．他の試薬は和光純薬試薬特級品を用いた．

3．装置

(1)FA測定　AA定量法[6]：分光光度計 日立U-3000オートシッパ付．(2)BND測定 GC：島津 GC-17A，GC/MS：日本電子オートマス150.

4．測定条件

(1)FA測定　AA定量法：測定波長420nm．(2)BND測定 GC：カラム DB-1　0.53mmϕ×30m（J&W)，カラム温度100℃，注入口温度250℃，検出器 ECD330℃，注入量



$C_4H_6BrNO_4$　mw : 212.0

Fig.3. Constitutional Formula of 5-bromo-5-nitoro-1, 3-dioxane (BND)

2μl，キャリアーガス窒素40ml/min．GC/MS：カラム DB-1　0.25mmϕ×15m（J&W)，カラム温度70℃，キャリアーガスHe，流速 6.5ml/min，スキャン範囲 m/z100-220，測定モード　化学イオン化法（CI)，イオン化電圧-150eV，フィラメント電流337μA，イオン源温度205℃，インターフェイス温度255℃，反応ガス　イソブタン（真空度1.33～3.99hPa)，注入量5μl，注入方法スプリットレス，SIM　m/z　212,165.

5．試料の調製

(1)FA分析　AA定量法：試料1.0gを共栓遠沈管にとり，25%硫酸ナトリウム水溶液20mlで振とう後，水を加えて全量40mlとする．密栓して40℃の水浴中でときどき振とうしながら1時間放置し，AA定量用の試料溶液とした．(2)BND測定：試料1.0gを取りエタノールを加えて溶解し，20mlとしたものを試料溶液とした．

6．BNDからのFA遊離とpHの関連

BND約0.2gを精密に量り，水を加えて正確に100mlとした．この溶液を試験管20本に5mlずつ分注し，これら試験管を4本ずつ5群に分けた．この試験管の各群ごとに，希酢酸（1mol/L）及び水酸化カリウム試液(1mol/L）を用いてpHを3, 5, 7,9及び11に調整した溶液を各々5mlずつ加えた．これらの5群の異なったpHのBND溶液を室温で最長7日間放置し，1，2，5，7日間に各群の各々1本より5ml採取し，これらにAA溶液5mlを加えて，以下に示したAA法によるFAの測定を行う．

7．定量

(1)FAのAA法定量操作　AA定量用試料溶液5mlを取り，AA溶液5mlを加えて振り混ぜた．次に40℃の水浴中で30分間加温し，30分間放冷後，420nmで吸光度を測定した．別にFA標準溶液1，2，3，4及び5mlを取り，これらに全量が5.0mlになるように水を加え5，10，15，20及び25ppmの標準系列を作成した．以下試料溶液と同様に操作し検量線を作成し，これよりFAの濃度を

求めた.

(2)BNDの定量操作

BND標準溶液をエタノールで希釈して，2～20ppmの溶液を調整し，GCを行ってピーク高より検量線を作成し，同様に試験溶液についてGCを行い，BNDの濃度を求めた.

結果及び考察

1．試料中FAの定量

FAはAA法では5～25ppmの濃度範囲でピーク高を測定したところ，原点を通るr=0.9997の良好な検量線が得られた．この検量線を用い，試料中のFAを測定したところ，その値は105ppmであった．薬事法では，FAは全ての化粧品への配合が禁止されている[7]．このためこの製品は違反品扱いとなった.

2．BND標準品からのFAの遊離

BNDのpHによるFAの遊離について調べたところ，Fig.4 に示すようにpH 7 以下の中性および酸性領域ではFAの遊離は見られなかった．しかし，1日放置ではpH 9 で1ppm，pH11で12ppmの濃度のFAを検出した．7日放置ではpH 9 で 9 ppm，pH11で27ppmと1日放置に比べFAの濃度が増加していた．これらのことから，pH 9 以上のアルカリ領域ではFAがBNDから遊離され易いことを確認することができた.

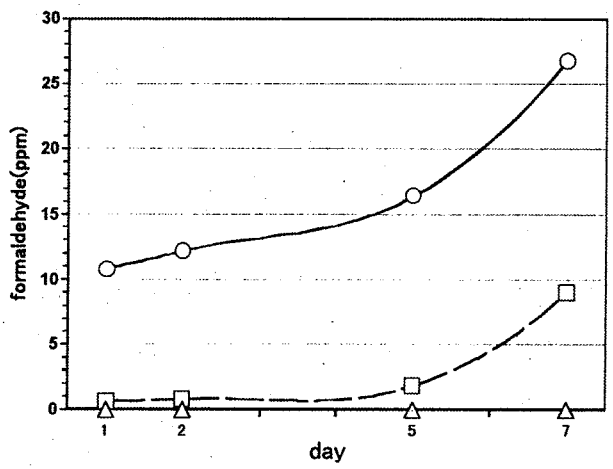


Fig.4. Released Amount of Formaldehyde from BND under Three Different pH Conditions
－○－：pH11，－□－：pH 9，－△－：pH 7

3．GCによるBNDの測定

(1)ピーク形状の改良　メガボアカラムを用いGCでBND試料溶液を分析したところ，パックドカラムより感度の高いピークが得られた．しかし，BNDのピークは大きくテーリングし，回数を重ねて測定を行うとピークが低くなる現象がみられた．この現象は，トリス（1-アジリジニル）ホスフィンオキシドや塩化アルキルトリメチルアンモニウムなど反応性に豊んだ化合物のGC分析において良く見られる．この対応として，経験的にGCのインジェクション部分にガラスウールを詰める方法が採られている[8,9]．そこでガラスインサートの上部に約1cmガラスウールを詰めて分析したところ，ピークがテーリングせず，シャープな形状で再現性あるクロマトグラムが得られた.

(2)検量線の作成

BNDの標準溶液は2～20ppmの濃度範囲でピーク高を測定したところ，r=0.9995の良好な検量線が得られた.

(3)BNDのピークの再現性

10ppmの濃度のBND溶液を5回GCに注入しピークの再現性を求めた．インテグレーターによるピークのエリアを測定したところ，118, 833, 120, 162, 120,776, 120, 915, 121, 043，平均120, 345（n=5），変動係数は0.756%で，再現性が良いことを確認した.

(4)添加回収

今回のGC条件で，BNDを含有していないことを確認したシャンプー1gにBND標準溶液1ml（100μg）及び3ml（300μg）を添加し，添加回収実験を行ったところ，Table 1 の結果が得られた（n=5）．100及び300μg添加した回収率の変動係数は，各々2.01%及び1.31%とバラツキの少ない良好な結果が得られた．またシャンプーの他の成分の妨害もなくBNDを分析できることが確認できた.

Table.1. Recovery of BND in Shampoo

Addition amount	Recovery n=5		
	Range(%)	Average(%)	C.V.*(%)
100μg	97.8-102.2	99.6	2.01
300μg	98.5-102.0	99.8	1.31

＊ Coefficient of Varation

(5)試料の分析結果

本法を用いて試料を測定したところ，BNDを80ppm検出した．そのクロマトグラムをFig. 5 に示した．また，GC/MS CI法で測定したところ試料，標準品共にFig. 6 に示すようなm/z 212 M^+，214$(M+2)^+$の分子イオンピークを含むマススペクトルが得られた．m/z165のピークはニトロ基の外れたもの，m/z154はニトロ基とブロムが外れたものに反応ガスであるイソブタンが結合したものではないかと考えられる.

緒言で述べたごとく，わが国では化粧品にBNDを使用することは許可されていない．しかし，本品の製造国

であるドイツでは殺菌剤として使用が認められているため，成分表示をして輸出されたのではないかと考えられる．ECのガイドラインによれば，洗い流す化粧品には0.1%までBNDを使用でき，また0.01%以下では殺菌効果はないとされている[3]．今回の分析結果では，BNDの含有量は80ppmであり，この濃度での殺菌効果は期待できないと考えられる．しかし，前述したようにBNDはpH 9以上で分解されるが，この製品のpHは6であり製品中での分解は考えられない．従って製造過程においてpH値がアルカリ領域になり，FAに分解されたことが推測される．

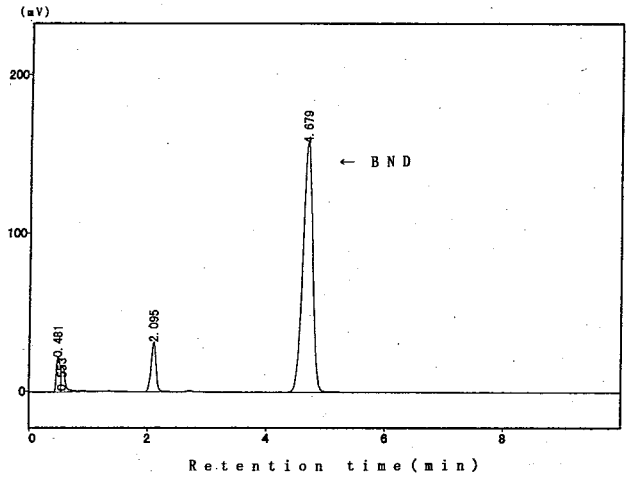


Fig.5. Gas Chromatogram of BND in a Imported Shampoo
GC conditions：column, DB-1 (0.53mmi. d. × 30m)；column temp., 100℃；injection temp., 250℃；detecter, ECD；detecter temp. 300℃；injection volume, 2μ 1；carrier gas (N_2), 40ml / min.

まとめ

BNDの分析方法として，試料からエタノール抽出した試料溶液を用い，メガボアカラムを用い，インサートにガラスウールを入れた．ECD-GC法により定量を行い，さらにGC-MS-CI法による確認法を作成した．本法を輸入シャンプーに適応して分析したところ80ppmのBNDが検出された．

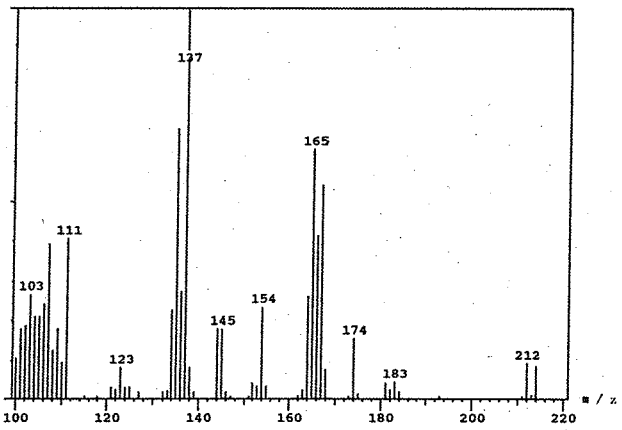


Fig.6. Mas Spectra of BND in a Imported Shampoo
MS conditions：column, DB-1 (0.25mm i. d.× 15m)；column temp., 70℃；injection volume, 5μ 1；carrier gas (He), 6.5ml/min；electron energy, -150eV；ionization method, CI；attach gas, isobutane；injection method, splitless.

文　献

1）東京化粧品工業会：平成10年度化粧品工業年報，15-19, 1999.
2）厚生省告示第191号：官報，第1747号，1995.
3）ジョン・J・カバラ編，香粧品・医薬部外品 防腐・殺菌剤の科学，522-524, 1990，フレグランスジャーナル社，東京.
4）Reinhard,M.: *Z Lebensm Unters Forsch*, **177**, 271-277, 1983.
5）日本公定書協会：第10改正日本薬局方，1981年第1刷，D-845-D-848，廣川書店，東京.
6）日本薬学会編：衛生試験法・注解，1990年版第5刷，1718-1721, 1996, 金原出版，東京.
7）化粧品配合禁止成分リストの作成について，薬審二第100号各都道府県衛生主管部（局）長あて厚生省薬務局審査第二課長通知，1986.
8）鈴木助治，雨宮　敬，伊藤弘一，他：衛生化学，**40**, 147-153, 1994.
9）K. J. Hyver編，キャピラリガスクロマトグラフィー，第3版，3-7-3-8，1990，横川電機株式会社，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 81-84, 1999

芳香化粧品中のベルガプテンの分析

森　謙一郎*, 大　貫　奈穂美*, 中　村　義　昭*,
横　山　敏　郎*, 松　島　陽　子*, 藤　井　孝*

Determination of Bergapten in Fragrant Preparations

KEN'ICHIRO MORI*, NAHOMI OHNUKI*,
YOSHIAKI NAKAMURA*, TOSHIRO YOKOYAMA*,
YOKO MATSUSHIMA* and TAKASHI FUJII*

Determination of bergapten in fragrant preparations was improved. The analytical method of The Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists -With Commentary- has been used as one of the convenient determination methods of bergapten in cosmetics. But it lacks sensitivity and has the disadvantage of using harmful solvents such as dichloromethane or 1,2-dichloroethane. A liquid chromatograph equipped with a photodiode array detector was used for improvement of sensitivity and qualitative accuracy of bergapten. Diethyl ether, petroleum ether and acetone were adopted for the clean analysis solvents. The use of florisil cartridge made analytical procedure more comfortable. By this method, the detection limit of bergapten in commercial fragrant preparations was 80ppb, and the recovery tests of bergapten added to commercial products were between 93.4 and 98.5%. The determination results of bergapten in 27 commercial fragrant preparations were between 103 and 2,030 ppb in eight products.

Keywords：ベルガプテン bergapten, 5-メトキシソラレン 5-methoxypsoralen, 芳香化粧品 fragrant preparations, 液体クロマトグラフィー HPLC

緒　　言

化粧品由来の皮膚傷害は依然として消費者苦情の首位にある[1]．とくに近年のアロマテラピーの普及に伴って芳香化粧品による皮膚傷害が多く報告されている[2,3]．芳香化粧品の皮膚傷害誘起物質としては，古くよりベルガモット油中の成分であるベルガプテンが光毒性成分として知られている．皮膚傷害に対するベルガプテンの安全値はベルガモット油中５ppm以下の報告[4]があり，また一般に芳香化粧品に添加されるベルガモット油量はほんの少量であることが多い．しかしながら添加量は規制されてはいない．そこで化粧品中有害物質検索の仕事の一貫として，市販芳香化粧品中のベルガプテン含量調査の検討を行った．ベルガプテンの分析法はいくつか報告[5-8]されているが，妨害物質の多い芳香化粧品中のベルガプテンを簡便に分析する方法は少ない．衛生試験法・注解1990追補1995収載の分析法[9]（衛試法）は簡易で効率的な方法であるが，検出感度と回収率が悪く，またジクロロメタン，1,2-ジクロロエタンの有害性の高い溶媒を使用するなどの問題点があった．今回フォトダイオードアレイ検出器付き液体クロマトグラフィーの採用により定性分析の高精度化を，フロリジルカートリッジの採用により分析操作の簡便性を，またジエチルエーテル，石油エーテル，アセトン等の有害性の低い溶媒を用いることによりクリーンアナリシスとすることで，衛試法を改良し，良好な結果を得ることができたので報告する．本法による市販芳香化粧品中のベルガプテン含有量の検査結果も併せて報告する．

実験の部

１．試薬，器具及び装置

ベルガプテン：アルドリッチ製5-Methoxypsoralenを

* 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

用いた．HPLC移動相：メタノール・アセトニトリル・水の25：25：50混液を用いた．ベルガプテン標準液：ベルガプテンをLC移動相を用いて1.0μg/mlに希釈した．液体クロマトグラフィー(HPLC)：島津LC-10A．フォトダイオードアレイ検出器：島津SPD-M10A．フロリジルカートリッジ：Waters Sep-Pak Vac 6cc Florisil Cartridgeを用いた．

2．試　料

平成9年4月から平成10年8月までに都内で購入した香水，オーデコロン等芳香化粧品27品を用いた．

3．分析操作

試料約0.4gを精秤し，分液ロートにとり水30ml，塩化ナトリウム5gを加え，ジエチルエーテル30ml，次いで，20mlで抽出した．ジエチルエーテル層は無水硫酸ナトリウム10gで乾燥し，ロータリーエバポレーターで約1mlに濃縮した．無水硫酸ナトリウム1gをフロリジルカートリッジに積層し，濃縮液を負荷した．ジエチルエーテル・石油エーテル（70：30）20mlで洗浄し，次いでエーテル・アセトン（50：50）10mlで溶出した．溶出液はロータリーエバポレーターで約1mlに濃縮し，LC移動相を加えて正確に2mlとし，50μlをHPLCに注入した．別にベルガプテン標準液をHPLC移動相で希釈して40，80，120，160ppbの標準系列を作り，同様にLCに注入した．分析条件は，カラム：東ソー製TSK-GEL ODS-80TS 4.5mm i.d.×150mm，移動相：HPLC移動相，流速：毎分1ml，検出器：測定波長200-350nm，定量分析268 nm.

結果及び考察

1．調製用溶媒の検討

各種溶媒を用いてベルガプテンの1ppm溶液を調製し，HPLCに注入した．その結果，アセトン，メタノール，エタノール，アセトニトリルを用いた場合は各溶媒ともシャープなピークを得た．一方，ジエチルエチルエーテル，テトラヒドロフラン，酢酸エチルを用いるとそれぞれショルダーを持った変形したピークが出現した．これらのピーク形は再現性があることから，ベルガプテンのピークが溶媒に重なり，影響を受けることに由来すると考えられた．そこでHPLC移動相およびベルガプテン標準液にはこれらの溶媒を使わないこととした．

2．濃縮法の検討

香料成分であるベルガプテンは濃縮時揮発して，回収率が低下するおそれがあるため，低沸点溶媒を用いた濃縮法を検討した．抽出用溶媒はジエチルエーテルとし，フロリジルカートリッジによる精製にもジエチルエーテルを用いた．極性の調整には石油エーテルおよびアセトンを用いた．これらの溶媒中ではアセトンが最も沸点が高いことから，ベルガプテン200ngのアセトン溶液について各種濃縮法を検討した．その結果をTable 1に示した．保留剤*n*-ノナンを添加して，40℃水浴にてロータリーエバポレーターを使用する衛試法の濃縮収率は93.6-95.4%であった．蒸発乾固法，K-D濃縮法および窒素通気濃縮法はアセトンを用いた場合，良好な結果を得ることができなかった．これに対し，保留剤を添加せず，ロータリーエバポレーターで約1mlに濃縮する方法では，99.2-99.8%とほぼ定量的濃縮収率を得た．この濃縮法ではジエチルエーテルがベルガプテンピークの形状に及ぼす影響はほとんど見られなかった．

Table 1．Concentration Recovery of Bergapten[1)]

Concentration Method	Recovery (%)		
	1	2	3
RE[2)], Dryness	91.6	89.1	90.0
RE, Added *n*-Nonane 0.5ml	95.4	94.8	93.6
RE, Residue about 1ml	99.2	99.8	99.5
KD[3)]	88.1	79.7	89.2
Nitrogen Bubbling	79.0	80.7	83.5

1)：2ppb bergapten acetone solution, 100ml
2)：Rotary evaporater
3)：Kuderna-Danish concentrator

Table 2．Recovery of Bergapten Added to Commercial Fragrant Preparations

Sample	Added	Found[1)]	Recovery[1)] (%)	C.V.[1)] (%)
1 Perfume	2.00μg[2)]	1.97μg	98.5	2.7
	32.0 ng[3)]	30.4 ng	95.0	3.8
2 Perfume	2.00μg[2)]	1.95μg	97.5	3.2
	32.0 ng[3)]	31.1 ng	97.2	3.8
3 Perfume	2.00μg[2)]	1.97μg	97.0	3.3
	32.0 ng[3)]	29.2 ng	93.4	4.0
4 Eau De	2.00μg[2)]	1.95μg	97.5	3.0
Cologne	32.0 ng[3)]	30.0 ng	93.8	3.8
5 Eau De	2.00μg[2)]	1.94μg	97.0	2.9
Cologne	32.0 ng[3)]	30.4 ng	95.0	4.3

1) n＝4
2) 5.00ppm in Sample,The safety limit of dermatitis
3) 80.0ppb in Sample,The detection limit of photodiode array detector

3．フロリジルカートリッジによる精製法の検討

フロリジルカラムは市販のディスポーザブルカートリッジを採用することにより分析操作の簡便性を求めた．本濃縮法ではジエチルエーテル等の濃縮液に少量の水が

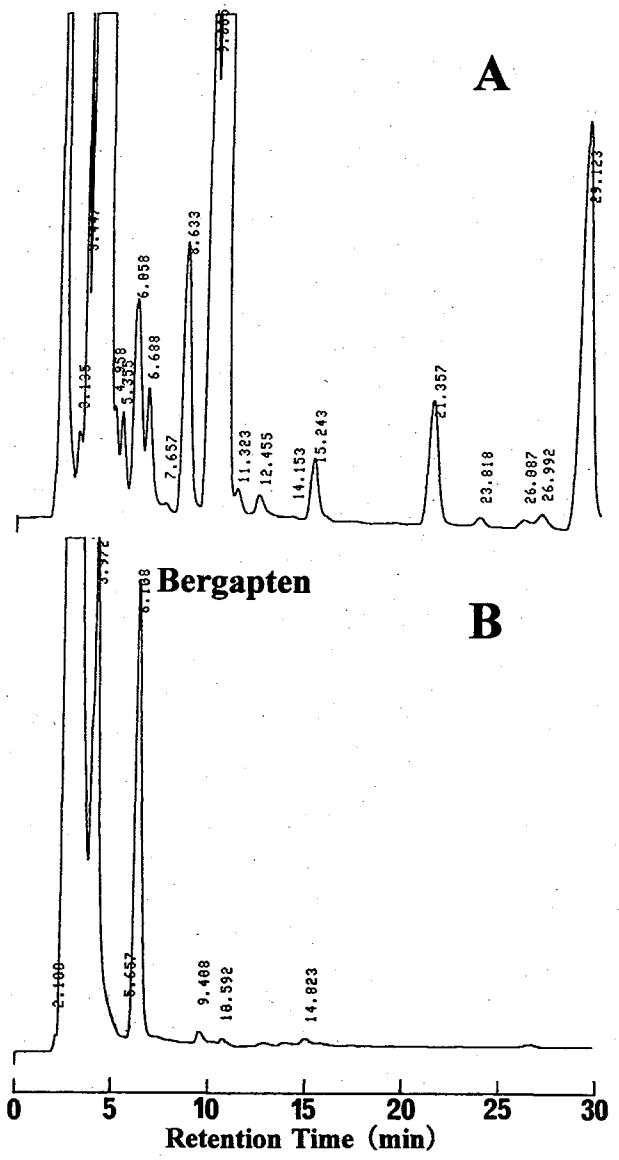


Fig. 1. Liquid Chromatograms of Bergapten Added to Eau De Toilette Sample 1
A : Chromatogram of the five times diluted prepurified sample solution
B : Chromatogram of the florsil purified solution

混入するため，フロリジルカートリッジは無水硫酸ナトリウム 1g を積層できる注射筒型のものを用いた．クロマトグラム上ベルガプテンの保持時間近くに多くのピークの出現する試料（Table 2，試料 1-4）を用いて，フロリジル精製の条件を検討した．試料 1 のフロリジル精製前後の HPLC クロマトグラムをFig. 1 に示したが，良好に精製できることがわかった.試料2-4 も同様に良好な結果を得た．今回使用したカートリッジと同容量（フロリジル1g，カートリッジ容量6ml）の市販品 2 種（Supelco Spelclean LC-Florisil，Varian MegaBond Elut Florisil PR）を比較検討したところ，いずれもほぼ同様の結果を得た．

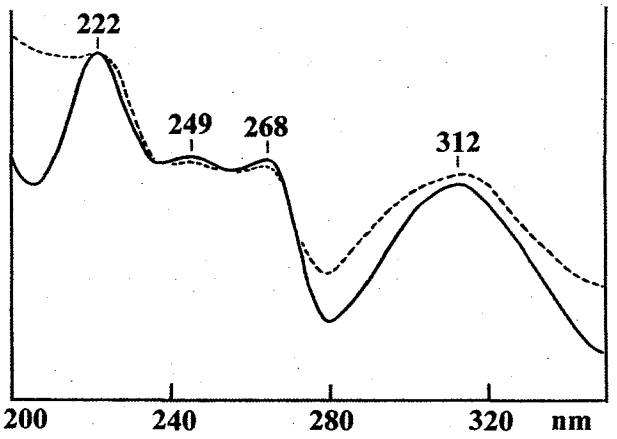


Fig. 2. UV Spectra of Bergapten on Photodiode Array Detector
—：Bergapten, 50ng (1ppm, 50 μl)
…：Bergapten, 0.8ng (16ppb, 50 μl)

Table 3. Determination Results of Bergapten in Commercial Fragrant Preparations

No.	Sample	Country	Bergapten(ppb)
1	Eau De Toilette	France	2030
2	Eau De Cologne	Japan	670
3	Eau De Cologne	USA	180
4	Eau De Toilette	Spain	177
5	Eau De Cologne	Japan	170
6	Eau De Cologne	Japan	150
7	Eau De Toilette	USA	123
8	Eau De Toilette	France	103

4．フォトダイオードアレイ検出法の検討

ベルガプテンのＵＶ-スペクトルは312,268,249および222nmにピーク波長を持つ特徴的なスペクトルであり，このスペクトルの定性限界値0.8ng(16ppb溶液,50 μl)，試料中80ppbを本法によるベルガプテンの検出限界とした．ベルガプテン50ng（1ppb溶液,50 μl)，試料中 5 ppmの標準スペクトルと定量限界値0.8ngのスペクトルをFig. 2 に示した．検量線は試料中80ppbから100ppmの間で原点を通る良好な直線性を得た．

5．添加回収実験

市販芳香化粧品 5 種について，ベルガプテン 5 ppmおよび80ppbの添加回収率を測定し，結果をTable 2 に示した．妨害物の影響を受けることなく93.4－98.5%，変動係数2.7-4.3%の良好な値を得た．

6．市販製品の分析

本法により市販芳香化粧品27検体のベルガプテンを定量分析した結果，Table 3 に示したとおり 8 検体から103-2,030ppbのベルガプテンが検出された．

7．衛試法との比較

本法の検出感度はガスクロマトグラフィーを用いる衛試法に比較して約60倍の感度を得た．またフォトダイオードアレイ検出器によりベルガプテンの同定を容易に行うことができた．フロリジルカートリッジの使用により分析操作の迅速化が得られた．

ま と め

芳香化粧品中のベルガプテンを効率よく分析するため従来法を改良した．すなわち衛試法のベルガプテン分析法について，ディスポーザブルフロリジルカートリッジにより簡易精製法とし，フォトダイオードアレイ検出器付き液体クロマトグラフを利用することで高感度化と定性分析の確実性を向上させ，またジエチルエーテル等の有害性の低い溶媒を用いることでクリーンアナリシスとした．

本法により市販芳香化粧品27検体中のベルガプテン含有量を調査した結果，８検体から102-2,030ppbのベルガプテンが検出された．この検出量は５ppm以下であり，皮膚傷害を起こす可能性は低いと考えられる．

文　献

1）消費生活年報，国民生活センター編，86-87，1998，新日本法規出版，東京．

2）Clark S. M.：*Contact Dermatitis*, 38, 289-293, 1998.

3）Johansen D. J., *Amer. J. Contact Dermatitis*, **9**, 80 (1998).

4）Girard, J., Unkovic, J., Guimbard, J. P.：*Parfum. Cosmet., Aromes.*, **38**, 39-43, 1981.

5）Suzuki H.：*J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **31**, 57-61, 1979.

6）Analytical Methods Committee, *Analyst*, **112**, 195-198,1987.

7）Avalos J., Fontan G. P., Rodriguez E.：*J. Liquid Chromatogr.*, **18**, 2069-2076, 1995.

8）Mignot B., Guillaume Y., Makki S.：*J. Chromatogr. B*, **700**, 283-285, 1997.

9）衛生試験法・注解1990付．追補1995，日本薬学会編，883-886，1990，金原出版，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 85-92, 1999

家庭用品の衛生化学的研究（第40報*）
ピアス及びイヤリングの金属組成と金属溶出

山野辺 秀 夫**, 都 田 路 子***, 上 原 真 一****,
観 照 雄*****, 藤 井 孝**

Hygienic Chemical Studies on Household Necessities (XXXX)
Studies on Metal Allergy to Ear piercings and Earrings: the Relationship between Metal Composition and Metal Release

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

Keywords：ピアスear piercing, イアリングearring, 金属組成 metal composition, 金属アレルギー metal allergy, DMG試験 dimethylglyoxime test, 金属溶出 metal release, 人工汗 synthetic sweat, ニッケル nickel, 銅 copper, 亜鉛 zinc

緒　言

近年，金属製装飾品によるアレルギー障害が問題になっている[1-8]．厚生省が毎年集計している「家庭用品に係る健康被害病院モニター報告」によれば1986年～1997年の12年間の健康被害の上位１，２位はピアスなど装飾品によるアレルギー性接触皮膚炎であり，全件数の20%前後を占めている[7,8]．アレルギーの原因金属はニッケル(Ni)が主なものとされているが，金（Au），クロム（Cr）など他の金属による場合も報告されている[1-8]．一方，この問題に対するヨーロッパ諸国の対応は早く，特にデンマークでは1991年以降，ジメチルグリオキシム（DMG）試験により表面に0.5 μg/cm^2/週以上のNiを遊離している金属製品の販売を禁止している[3,4,6]．

著者らはこれまで装飾品によるアレルギー防止に関する研究の一環として，ピアス及びイアリングの金属組成について調査を行い，これら装飾品によりヒトは多様な金属に接触しアレルギーを起こす可能性があることを報告した[9]．今回はさらに研究を進め，素材金属及び表面に施されているメッキの種類の同定など，ピアス及びイアリングの構造を詳細に解明すると共に，製品表面の遊離Niの有無，さらに製品から汗へ溶出する金属の種類及び量を人工汗液を用いて調査した．これらの結果を基に，どのような製品がアレルギーを起こす可能性があるか検討を行った．

実験の部

１．試薬，試液　(1)ジメチルグリオキシム，りん酸水素二ナトリウム・12水：以上JIS特級．L-ヒスチジン塩酸塩一水和物，アンモニア水（25.0～27.9%），塩化ナトリウム，りん酸二水素ナトリウム二水和物，エタノール(99.9v/v%)，：以上試薬特級．0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液：容量分析用．以上和光純薬工業製を用いた．

(2)１%ジメチルグリオキシム・エタノール溶液：ジメチルグリオキシム0.5gにエタノール適量を加えて溶解し，さらにエタノールを加えて全量を50mlとした．

(3)10%アンモニア水：アンモニア水20mlに水を加えて全量を50mlとした．

＊第39報　東京衛研年報，49，71-74，1998.

＊＊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
＊＊＊同多摩支所理化学研究科
＊＊＊＊同環境保健部
＊＊＊＊＊同生活科学部

(4)人工汗液：JIS（L 0848-1996「汗に対する染色堅ろう度試験方法」）の酸性及びアルカリ性人工汗液を用いた．(a)酸性人工汗液：L-ヒスチジン塩酸塩一水和物0.5g，塩化ナトリウム5ｇ及びりん酸二水素ナトリウム二水和物2.2gを水に溶かし，これに0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液約15mlと水を加えてpH5.5で全容が約１Lになるようにした．(b)アルカリ性人工汗液：L-ヒスチジン塩酸塩一水和物0.5g，塩化ナトリウム5g及びりん酸水素二ナトリウム・12水5ｇを水に溶かし，これに0.1mol/L水酸化ナトリウム溶液約25mlと水を加えてpHが8.0で全容が約1Lになるようにした．

(5)ICP分析用標準液系列：原子吸光分析用Ni，銅(Cu)，亜鉛（Zn），Cr，Au，銀（Ag），鉄（Fe），鉛（Pb）標準液（1000ppm，和光純薬工業製）の一定量を水で希釈し，それぞれ５，10，20ppmの標準液系列を調製した．

２．装置 (1)蛍光Ｘ線分析装置：理学電機工業社製波長分散型蛍光Ｘ線分析装置RIX-3000型．

(2)成形機：前川試験機社製電動型油圧成型機BRIQETTING PRESS TYPE・BPE-31 CAPACITY300kN.

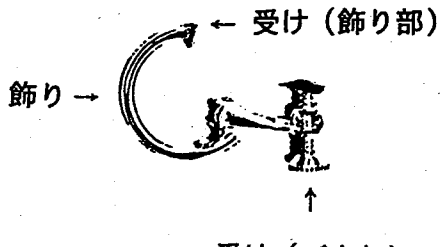
(3)誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP)装置：サーモジャーレルアッシュ社製ポリスキャン61ESS型．

３．検体 市販のピアス55種及びイアリング13種を検体とした．

４．ピアス，イアリングの金属分析 (1)試料：(i)ピアス：ピアスはポスト（Ｐ，耳に通す針の部位），キャッチ（Ｃ，耳の裏側からピアスを押さえる部位）及び飾り（Ｄ）から構成されている．検体の各部位を切り離しそれぞれを試料とした．Ｄが複数の金属種で構成されている場合は耳に接触する部分を試料とした．環状でリング（Ｒ）及び留め金（ＣＬ）から構成される検体，フック状（Ｈ）の検体については，その機能からＲ及びＨはＰに，ＣＬはＣに分類した（表３）．

(ii)イアリング：イアリングは皮膚に接触する部位である耳を挟む「受け」を飾り部とバネ部とに分けそれぞれ試料とした（図１）．

図１．イアリングの各部位の名称



(2)分析：(i)試料を原形の状態で蛍光Ｘ線分析装置により金属分析した．定量値（%）は同定解析されたスペクトルの強度から，感度ライブラリーを用いた半定量分析法（オーダー分析）により求めた．得られた結果を分析結果１とした．

(ii)試料を成形機で板状に押しつぶし，(i)の場合と同様に金属分析を行い，その結果を分析結果２とした．

(iii)板状にした試料の表面を希硝酸による溶解あるいは紙ヤスリによる研磨などの方法により完全に除去した後，(i)，(ii)と同様に金属分析を行った．得られた結果を分析結果３とした．分析結果３から素材金属の種類を同定した[10]．

(vi)分析結果１，２，３の比較から試料表面のメッキの有無及び種類の同定を行った．すなわち分析結果１，２及び３に変化が見られない試料はメッキ処理がされていないと判断した．一方，分析結果１及び２のみで確認される金属はメッキされたものであると判断した．複数のメッキが施されている場合は板状に押しつぶした試料の表面をルーペなどで観察し，色調及び構造からメッキ各層の順序を決定した．

５．DMG試験による遊離ニッケル試験 １%ジメチルグリオキシム・エタノール溶液及び10%アンモニア水各２滴を滴加した綿棒で，試料表面を30秒間擦る．赤色を呈した場合0.5μg/cm^2/週を超えるNiを遊離しているもの（陽性）とみなした[4]．

６．ピアスから人工汗液への金属溶出試験 (1)試料：ピアスのうちP，Cから構成されるもの２検体，P，C及びDから構成されるもの５検体，R及びＣＬからなるもの2検体，フック（Ｈ）状のもの２検体の計11検体について検討した．可能なかぎり部位別に試料としたが，PとD，RとCLのように一体化しているものは切り離すと切断面からの金属溶出が考えられることからそのまま試料とした．

(2)試験方法：試料の２～４個を酸性及びアルカリ性汗液それぞれ５ml中に室温で1週間放置した後，その１mlを取り，水で適宜希釈し試料溶液とした．ICP分析用標準液系列を標準としてICP装置で分析し，金属溶出量を求めた．溶出量は１週間における試料の表面積当たりのμg量（μg/cm^2/週）で表した．また，試料の表面積は①ノギスを用いて各部位の寸法を測定し算出する．②複写機により試料を拡大コピーした後，当該複写部分を切り取り，その重量を同倍率で拡大コピーした方眼紙の重量と比較する．などの方法で求めた．

結果及び考察

1．ピアスの素材金属とメッキの種類　分析結果を表1に示した．

(1)素材金属：ピアスの素材には18金を主としたAu合金，Ag合金，白金（Pt）合金，チタン（Ti），Cr-Ni系を主としたステンレス，黄銅を主としたCu合金，Sn合金，Pb合金，Ni合金及びプラスチックが使用されていた．

これを部位別に見るとPではステンレス（27/55, 49%），Au合金（12/55, 22%），Ti（9/55, 16%），Ag合金（4/55, 7%），Pt合金（2/55, 4%），Cu合金（1/55, 2%）が用いられていた．これらはCu合金を除きいずれも化学的，物理的に安定な金属であることから，Pにはアレルギーを考慮した金属が使用されていると考えられる．

Cではステンレス（18/41, 44%），Cu合金（8/41, 20%），Au合金（6/41, 15%），Ti（3/41, 7%），Ag合金（2/41, 5%），Pt合金（2/41, 5%），Ni合金（1/41, 2%），プラスチック（1/41, 2%）が使用され，Pとほぼ同様の傾向である．しかしCu合金，Ni合金のように化学的に不安定な金属も見られ，アレルギーへの配慮が軽視されているように思えた．

Dに使用されている素材はCu合金（16/38, 42%）を中心に，Sn合金（7/38, 18%），Au合金（4/38, 11%），Ag合金（4/38, 11%），プラスチック（4/38, 11%）が大半であった．これは細工の容易さ及び経済性を重視したものと考えられるが，化学的には不安定なものが多くなる．その他ステンレス，Pt合金，Pb合金も各1例見られた．

(2)メッキの有無及び種類：素材別に見ると18金，Pt合金，Ti，Ni合金のすべて，14金の1/3，Ag合金の8/9，Cr-Ni系ステンレスの19/39，Cr系ステンレスの1/7，プラスチックの4/5にはメッキが施されていなかった．これら以外はメッキ処理されているが，その種類はAu，Au-Cu，Au-Ni，Au-Ni-Cu，Au-Ag-Cu，Ag，Ag-Ni，Ag-Ni-Cu，Ni，Ni-Cu，Sn-Cu，Tiの12種であった．

2．イアリングの受け部分の素材金属とメッキの種類

分析結果を表2に示した．イアリングの受け部分の素材にはCu合金を中心として，Sn合金，Fe及びプラスチックが使用されていた．メッキはプラスチックを除いたすべてに見られ，その種類はAu-Ni-Cu，Au-Cu，Au-Ni，Pt-Ni-Cu，Ni-Cu，Niの6種類であった．

受け部分はピアスのP，Cに相当するが，化学的には不安定な素材が使用されており，アレルギーに対して配慮が不足しているように思われる．

3．製品表面の遊離ニッケル　DMG試験により試料表面の遊離Ni試験を行った（表1，2）．

(1)ピアス：検体（製品全体）における陽性率は18/55（33%）であり，部位別の内訳はPでは12/55（22%），Cでは8/41（20%），Dでは10/38（26%）であった．デンマークでは本試験陽性の製品の販売を禁止していることを考えると極めて高い陽性率であり，今後なんらかの対策を立てる必要がある[3,4,6]．

次に陽性試料について材質との関係を検討した．Niメッキが最表面に施された試料では7/21（33%），Au-Ni（-Cu）メッキされた試料では11/25（44%），Ag-Ni（-Cu）メッキされた試料では1/5（20%），Ni合金（無メッキ)では1/1（100%），無メッキのCr-Ni系ステンレスでは2/19（11%）が陽性を示した．したがって，遊離Niが検出された試料の大半はNiメッキされたものであり，Niの上にAuなどのメッキが被覆された試料についても高い割合で遊離Niが存在することが明らかになった．陰性の試料の存在も考慮すると，この原因はメッキの良否が遊離Niの有無を左右することを示唆しているものと考えられる．

一方，TiのようにNiを含まず化学的にも安定であることから，アレルギー防止を目的として使用されていると考えられる材質でも陽性を示すものがあった．すなわちTiでは2/12（17%），銀合金では1/8（13%），18金では1/18（6%），Au-Cuメッキされたプラスチックでは1/1（100%）が陽性を示した．これらは拭うことにより陰性になることから，他のNi含有製品との接触など何らかの原因で微量のNiが付着したものと推測している．平成7年度家庭用品に係る健康被害病院モニター報告[7]ではパッチテストでTi材質のピアスが陽性になった例を報告しているが，今回の結果を踏まえると興味深い事例で，今後解明すべき重要な課題と考えている．

(2)イアリング：検体（製品全体）における陽性率は5/13（38%）と高い値でありピアス同様今後対策を立てる必要がある．陽性になった試料は飾り部で3/13，バネ部で4/13ですべてNiメッキされたものであった．

材質との関係はNiメッキが表面に施された試料では1/6（17%），Au-Ni（-Cu）メッキされたものでは6/12（50%）が陽性を示した．なおPt-Ni（-Cu）メッキではすべて陰性であった（0/2）．

以上の結果は，ピアスの場合と同様にメッキの良否が遊離Niの有無を左右することを示唆している．

4．ピアスから人工汗液への金属溶出　分析は製品の

表1．ピアス（n＝55）の金属組成とDMG試験

金属組成			DMG試験（陽性数/試料数）		
素材の金属組成(%)		メッキ	ポスト	キャッチ	飾り
Au合金	1. Au(74～79)－Ag(13～16)－Cu(5～12) (18K)	無	1/9	0/5	0/4
	2. Au(57～63)－Ag(13～28)－Cu(8～23)－Zn(0～4)－Pd(0～6) (14K)	無	0/1	－	－
		Ag	－	0/1	－
		Ni	1/1	－	－
	3. Au(62)－Cu(22)－Ni(8)－Zn(7) (ホワイトゴールド)	Ni	1/1	－	－
Ag合金	1. Ag(93～97)－Cu(3～8)－Zn(0～1)	無	1/3	0/2	0/3
		Ni, Au, Cu*	－	－	0/1
	2. Ag(70)－Cu(8)－Zn(22)	Ni	1/1	－	－
Pt合金	1. Pt(87～92)－Pd(2～8)－Cu(0～6)	無	0/2	0/2	0/1
Ti	1. Ti(100)	無	2/9	0/3	－
ステンレス	1. Fe(65～74)－Cr(12～23)－Ni(8～13) Mn(1～3)－Cu(+～3)－Mo(+) (Cr－Ni系)	無	1/11	1/8	－
		Au, Ni, Cu	1/1	－	0/1
		Au, Ni	2/5	0/1	－
		Au Cu	0/1	－	－
		Ag, Ni	0/1	－	－
		Ni, Cu	0/1	－	－
		Ni	1/3	3/4	－
		Ti	0/2	－	－
	2. Fe(81～85)－Cr(14～18)－Mn(0～1) (Cr系)	無	－	0/1	－
		Au, Ni, Cu	－	1/2	－
		Au, Ni	0/1	0/1	－
		Ag, Ni	0/1	0/1	－
Cu合金	1. Cu(55～66)－Zn(34～45) (黄銅，真鍮)	Au, Ni, Cu	－	1/4	3/5
		Au Cu	－	0/1	0/1
		Au, Ag, Cu	－	－	0/1
		Ni, Cu	－	1/2	1/2
		Ag, Ni, Cu	－	－	0/1
		Sn Cu	－	－	0/2
		Ni	0/1	－	－
	2. Cu(83～96)－Zn(4～17) (黄銅)	Ag, Ni, Cu	－	－	1/1
		Ni, Cu	－	－	0/1
		Au, Ni	－	－	0/1
	3. Cu(60)－Ni(21)－Zn(19) (洋銀)	Au, Ni, Cu	－	－	1/1
	4. Cu(92)－Sn(8)	Au	－	0/1	－
Sn合金	1. Sn(71～92)－Pb(5～21)－Sb(0～7)	Au, Ni, Cu	－	－	2/2
		Au Cu	－	－	0/2
		Ni, Cu	－	－	1/2
		Sn Cu	－	－	0/1
Pb合金	1. Pb(90)－Sn(2)－Sb(7)	Ni, Cu	－	－	0/1
Ni合金	1. Ni(96)－Cu(4)	無	－	1/1	－
プラスチック		無	－	0/1	0/3
		Au Cu	－	－	1/1

＊複数のメッキを示し，上層から下層の順番に種類を記載した．

表2．イアリング（n＝13）の受け部分の金属組成とDMG試験

金属組成			DMG試験（陽性数/試料数）	
素材の金属組成（%）		メッキ	飾り部	バネ部
Cu合金	1. Cu(58～65)－Zn(35～42)　（黄銅，真鍮）	Au, Ni, Cu*	2/3	1/3
		Au　Cu	0/2	0/2
		Au, Ni	0/1	1/1
		Pt, Ni, Cu	0/1	0/1
		Ni, Cu	0/1	1/2
		Ni	0/1	0/1
Sn合金	1. Sn(87)－Pb(10)－Sb(3)	Au, Ni, Cu	0/1	－
	2. Sn(97)－Sb(3)	Au, Ni, Cu	0/1	－
Fe	1. Fe(100)	Au, Ni, Cu	1/1	1/1
		Ni, Cu	0/1	－
プラスチック		無	－	0/2

＊複数のメッキを示し，上層から下層の順番に種類を記載した．

構成金属であるNi，Cu，Zn，Cr，Au，Ag，Fe，Pbの8金属について行った．結果を表3に示した．人工汗液への溶出した金属はNi，Cu，Znの3種でありその他の溶出は確認できなかった．

⑴Ni溶出：DMG試験陰性の製品を含め，Niメッキの施された16試料すべてからNiの溶出が見られた．したがってNiメッキされた製品は遊離Ni陰性であってもNiアレルギーを発現する可能性があることが示唆された．

溶出量を酸性とアルカリ性汗液で比較すると，前者への溶出は後者に比べ高い値を示すものが多かった．またメッキとの関係ではNiメッキが最表面に露出している試料では溶出量が多く，Niの上にさらにAuメッキが施されているものからの溶出は少ない傾向が見られた．しかし検体1のP，D及び検体2のPように例外も見られることから，Ni溶出はメッキの厚さなどの品質が密接に係わっていると考えられる．Niを溶出しない2試料（検体4のC，6のD）の材質は無メッキのCr-Ni系ステンレスであり，本金属の安定性がうかがえた．また，検体4のCはDMG試験陽性であるが，汗へのNi溶出は確認されなかった．これは前項3で述べたように，何らかの原因で試料に微量のNiが付着したために生じた現象と考えている．

⑵Cu溶出　Cuを含む11試料中10試料からアルカリ性汗にCuの溶出が観察された．酸性汗で溶出されたものは8試料で，アルカリ性汗に比べ溶出量も少ない傾向が見られた．

⑶Zn溶出　Znが溶出したものはZnを含む7試料中6試料で，このうち，酸性汗では6試料全部，アルカリ性汗では5試料であった．

Cu，Znの2金属についてはメッキ及び素材金属からの溶出と考えられる．両金属共アレルギー感作の原因金属の可能性も指摘されていることから[7,8]，Ni溶出と同様さらに検討を行う必要がある．

まとめ

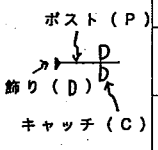
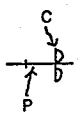
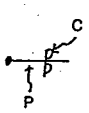
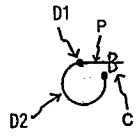
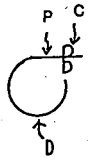
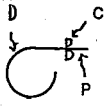
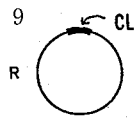
ピアス及びイアリングの構造を明らかにすると共に，アレルギーの主な原因と言われている遊離Niの有無及び人工汗液へ溶出する金属の種類を検討した．

DMG試験による遊離Niの陽性率はピアスで33%，イアリングで38%と高い値を示し，アレルギー防止の観点から今後何らかの対策を立てる必要があることが分かった．遊離NiはNiメッキ由来が大半であり，その有無はメッキの良否に左右されることが示唆された．またTiのようにアレルギー防止を目的として使用されると考えられる材質からも遊離Niが検出された．他のNi含有製品との接触などの原因によりNiが付着したものと推測されるが，今後解明すべき重要な課題である．

人工汗液へはNi，Cu，Znの3金属が溶出した．NiはDMG試験陰性の試料を含めNiメッキされたすべてから溶出し，Niによるアレルギーの可能性が示唆された．Cu，Znについてはアレルギー感作の可能性も指摘されていることからさらに検討を行う必要がある．

謝辞　本研究を行うにあたり，有益なご助言を賜ると共に貴重な資料をご提供下さった前東京都消費者センター試験研究室課長補佐　山川芙貴子氏（現東京都下水道局小菅処理場場長），前同次席　肥塚　勝氏（現東京都消費生活総合センター活動支援課技術担当係長）に深謝いたします．

表3．ピアスの金属組成とDMG試験結果及び人工汗への金属溶出

検体	部位	色	表面積 cm²	素材（金属組成 %）	メッキ	DMG試験	金属溶出量（μg/cm²/週） 人工汗	Ni	Cu	Zu
1 	P	金	0.3	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Mo） 66 22 11 1 ＋	Au, Ni, Cu	−	酸	181.7	−	−
	D	金		銅，亜鉛合金（Cu-zn） 96-4	Au, Ni	−	アルカリ	130.7	6.2	−
	C	金	1.2	ステンレス（Fe-Cr-Mn） 81 18 1	Au, Ni, Cu	−	酸	3.5	20.6	−
							アルカリ	0.2	4.6	−
2 	P	金	0.4	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 67 19 11 2 ＋ ＋	Au, Ni,	−	酸	147.7	−	−
							アルカリ	107.0	−	−
	C	金	1.1	ステンレス（Fe-Cr-Mn） 82 17 1	Au, Ni, Cu	−	酸	3.0	16.9	−
							アルカリ	0.2	15.5	−
3 	P	銀	0.4	銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 57 41	Ni	−	酸	126.6	33.0	27.2
							アルカリ	56.0	97.2	44.6
	C	銀	0.6	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 72 16 10 1 ＋ ＋	Ni	＋	酸	199.9	−	−
							アルカリ	155.3	−	−
4 	P	銀	0.9	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 67 21 11 1 ＋ ＋	なし	＋				
	D1	金		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 61 38	Au, Ni, Cu	−	酸	1.7	31.3	9.4
							アルカリ	4.3	25.9	8.0
	D2	金		ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 70 18 10 1 ＋ ＋	Au, Ni, Cu	−				
	C	銀	1.3	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 69 17 10 3 ＋ ＋	なし	＋	酸	−	−	−
							アルカリ	−	−	−
5	P	銀	1.7	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 65 23 10 1 ＋ ＋	Ni	＋				
	D	銀		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 89 11	Ni	−	酸	41.5	−	−
							アルカリ	38.0	−	−
	C	銀	1.2	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 71 18 9 2 ＋ ＋	Ni	−	酸	55.1	−	−
							アルカリ	40.0	−	−
6 	P	銀	1.6	チタン（Ti） 100	なし	＋＋＋				
	C	銀		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 62 38	Ni, Cu	−	酸	555.2	−	1.8
							アルカリ	144.8	3.3	−
	D	銀	1.3	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 67 18 11 3 ＋ ＋	なし	−	酸	−	−	−
							アルカリ	−	−	−
7 	P	銀	2.2	チタン（Ti） 100	なし	−				
	C	銀		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 56 43	Ni, Cu	＋＋	酸	362.4	0.4	1.1
							アルカリ	4.6	27.5	8.2
	D	銀	0.6	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 73 16 9 1 ＋ ＋	Ni	＋	酸	189.7	−	−
							アルカリ	166.1	−	−
8	R	銀	0.6	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 69 21 8 2 ＋ ＋	Ni	−				
	CL	銀		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 61 38	Ni, Cu	−	酸	59.5	0.4	3.2
							アルカリ	24.1	14.1	9.6
9 	R	金	1.8	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 70 19 9 2 ＋ ＋	Au, Ni	−				
	CL	金		銅，亜鉛合金（Cu-Zn） 65 35	Au, Ni, Cu	−	酸	6.2	2.9	6.9
							アルカリ	0.3	2.7	0.5
10 フック（H）	H	銀	0.5	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 66 16 13 2 ＋ 2	Ni, Cu	−	酸	111.4	0.4	−
							アルカリ	6.3	53.6	−
11	H	金	0.7	ステンレス（Fe-Cr-Ni-Mn-Cu-Mo） 71 17 11 1 ＋ ＋	Au, Cu	−	酸	70.5	−	−
							アルカリ	4.4	28.1	−

文　献

1）吉川邦彦，甚目憲司：皮膚病診療，**1**(3)，223-225，1979.

2）原田昭太郎：医学のあゆみ，**136**(8)，573-575，1986.

3）小林道雄：表面技術，**45**(9)，907-913，1994.

4）Kanerva, L., Sipiläinen-Malm, T., Estlander, T., *et al : Contact Dermatitis*, **31**, 299-303, 1994.

5）Dotterud L. K. and Falk E. S.：*Contact Dermatitis*, **31**, 308-313, 1994.

6）東京都消費者センター試験研究室:金属製のアクセサリー・時計バンドー金属アレルギーを考えるー，1996年11月.

7）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：平成７年度家庭用品に係る健康被害病院モニター報告，1996年９月.

8）厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室：平成９年度家庭用品に係る健康被害病院モニター報告，平成10年12月.

9）山野辺秀夫，岩崎由美子，上原真一，他：東京衛研年報，**48**，106-109，1997.

10）日本化学会編：改訂３版化学便覧基礎編Ⅰ，501-515，1984，丸善，東京.

報　　文　Ⅲ

食品等に関する調査研究

REPORTS Ⅲ

PAPERS ON FOOD HYGIENE

Ⅲ　食品等に関する調査研究

食品等に関する調査研究として23編及び資料１編が掲載されている．分析法の開発として，食品添加物に関するもの２編，残留農薬に関するもの４編，食肉からの微生物に関するもの１編である．残留実態及び含有量調査では，食品添加物に関するもの４編，残留農薬に関するもの３編，汚染物質に関するもの２編，栄養成分に関するもの２編である．また，近年外因性内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）に関する問題がクローズアップされているが，これらへの取り組みに関するもの２編がある．さらに，健康茶類の衛生学的調査，台所用品中の防かび剤，化学性食中毒への取り組み事例各１編，資料として飲用茶類における生物農薬の調査に関するもの１編があり，以下掲載順と異なるが内容別に要約する．

一酸化炭素（CO）処理された魚は鮮度が落ちても赤色を保持し，消費者に対して鮮度を誤らせ，衛生上の危害の発生が懸念される．COに対する分析法は，厚生省通知による現行法では，実試料を分析した際に，測定値にバラツキがあるなどの問題がある．そこで，分析法の検討を行い，魚肉からのCOの解離剤として25％硫酸亜鉛溶液，GCの内標準物質にメタンガスを用いることにより，再現性のよい結果が得られた．

HPLCによる濃縮果汁中の防かび剤（OPP，DP，TBZ及びIMZ）の系統的分析法を検討した．濃縮果汁中の４種の防かび剤をアルカリ性下で酢酸エチル抽出し，TBZ，IMZを0.025 mol/L硫酸で分配し，OPP，DPとTBZ，IMZに分画した．これらをC18ファーストカラム，移動相にアセトニトリル－メタノール－0.025mol/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液（pH2.5）（45:15:40）混液を用いてHPLCで分析した．本カラムの適用で分析時間を大幅に短縮することができた．本法による４種防かび剤の回収率は81.4～105.9％，変動係数0.3～4.5％であった．

GC/FPDによるオキソン体を含めた48種の有機リン系農薬について，カラムにHP-1，HP-5，HP-1701を用いて相対保持指標値（PTRI）を作成し，48種農薬の定性確認が可能となった．また，45種の有機リン系農薬の溶媒，固相抽出について検討したところ，操作性，回収率などの点で固相抽出が優れ，キャベツ等の妨害物の少ない試料ではそのままスクリーニング試験に適用できた．また，精製法としてENVI-Carb/NH2カラムについて検討したところ，ホウレンソウの色素の除去に適用できた．

農作物中の含窒素系農薬であるチフルザミドについて，カフェンストロール等7種の含窒素系農薬における公定試験法の適用の有無を検討した．その結果，チフルザミドの分析にも適用でき，これを含めた８種の含窒素系農薬の同時分析が可能であった．本法によるチフルザミドの米，大豆，ライム及びホウレンソウからの添加回収率は66.7～81.1％，定量限界は0.01 ppmであった．

蛍光X線分析装置を用い，米中臭素の簡易分析法について検討した．試料粒度の均一化，乾燥時間等の最適試料調製条件及び蛍光X線分析の最適測定条件を設定すると共に，標準化試料を用いた検量線補正による簡略な定量法を確立した．本法の添加回収率は100～102％，検出限界は1μg/gであった．本法を用いて国内産，輸入の市場流通米76検体を調査したところ，オーストラリア産３検体から，残留臭素濃度1～3 μg/gが検出された．

茶抽出物を添加したガム24検体及びキャンディー21検体を対象に，エピカテキン等カテキン類８種及びカフェイン（CF）等メチルキサンチン類３種の含有量を調査した．キャンディー及びガムから検出された８種のカテキン類の合計はそれぞれ0～400μg/g，0～1,200μg/gであった．また，カテキン類が検出された試料の全てから，カフェインも10～260μg/g検出された．緑茶抽出物を添加した試料中から検出されたCF及び８種のカテキン類の合計量の間に相関が認められた．

輸入及び国産魚醤油中の甘味料，合成着色料及び保存料の調査を行った．甘味料では輸入の４検体からサッカリンが検出され，これらの内の３検体には表示がなかった．合成着色料は検出されなかった．保存料ではプロピ

オン酸が全ての検体から0.02～0.84g/kg検出され，製造工程中で生成したものと推定された．エタノールは国内品で14検体中６検体から0.29～3.5 %(v/v)検出され，添加の有無については調査中である．

国内産の野菜・果実類25種83検体の残留農薬を調査したところ，有機リン系殺虫剤５種（クロルピリホス，CYAP等），カーバメイト系殺虫剤（チオジカルブ，メソミル），有機塩素系殺虫剤３種（ヘプタクロルエポキサイド，ジコホール等），同殺菌剤５種（イソプロジオン，プロシミドン等）が検出された．また，含窒素殺虫剤（テブフェンピラド），同殺菌剤（ミクロブタニル，ビテルタノール）が検出された．今回の調査では残留農薬基準及び登録保留基準を越えるものはなかった．また，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68種250検体の残留農薬（有機リン系及び含窒素系農薬）を調査したところ，有機リン系殺虫剤11種（エチオン，クロルピリホス等），含窒素系殺菌剤４種（ミクロブタニル，トリアジメホン等）が検出された．また，食品衛生法の残留基準値のある農薬８種（クロルピリホス，テルブホス等）が検出された．さらに，わが国で登録されていないエトリムホスがイギリス産麦芽から検出された．これらの残留量は中国産サヤエンドウから検出されたトリアジメノールを除いて，いずれもわが国，FAO/WHO及び各国の残留基準値以下であった．

輸入農産物68種250検体の残留農薬（有機塩素系及びN-メチルカーバメイト系農薬等）を調査したところ，有機塩素系殺虫剤５種（BHC，DDT等），同殺菌剤（イプロジオン，キャプタン），カーバメイト系殺虫剤（NAC，メソミル），同除草剤（クロルプロファム），その他の農薬として，殺菌剤３種（イマザリル，TBZ等），除草剤（2,4-D）が検出された．これらのうち，ブドウから検出されたNACはわが国の残留基準値を越えていたが，FAO/WHO，各輸出国の農薬許容量を超えたものはなかった．また，農産物の原産国を５地域に分類し，地域別に農薬検出率を比較した．

1981年４月から1998年３月まで都内に搬入された米中のカドミウム，銅，ヒ素を検査した（国内産玄米4,069検体，輸入米52検体）．カドミウムの濃度別度数分布0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ppmを各々超える割合は18.5, 4.3, 1.2, 0.4%であった．FAO/WHO合同食品規格計画の食品添加物・汚染物質部会（CCFAC）において，穀類等のカドミウム濃度のガイドラインレベル案が検討されているが，仮に0.2mg/kgに設定された場合，搬入米の約５%が適合しない．また，輸入米のカドミニウム濃度は国産米に比較して低く，銅，ヒ素は概ね同レベルであった．

平成３年４月から同７年３月まで都内で購入したドクダミ茶等の健康茶類８種77検体について食品添加物，有害元素，カビ毒，放射性物質，残留農薬，総臭素及びカフェインの衛生化学的調査を行った．食品添加物では原料植物に由来する安息香酸が多数検出された．有害元素ではクロム等の値の高いものが1試料あった．残留農薬ではBHC，DDT，フェニトロチオン，パラチオンが検出された．総臭素では小麦の基準値を越えるものが12検体あった．また，カフェインは約40%の試料から検出され，10,000 μg/gを越えるものが６検体あった．

平成10年４月から11年３月までに都内で販売されていた輸入食品等250試料について放射能濃度を測定した．暫定規制値の370 Bq/kgを超えた試料はなく，50Bq/kgを超えたものは９試料（3.6%）であった．フランス産ピエ・ド・ムトン294Bq/kgが最高濃度であり，トルコ産の紅茶３試料120, 89, 68Bq/kg，イタリア産の蜂蜜86Bq/kg，フランス産のセップ80Bq/kg，イタリア産のポルチーニ76, 74, 54Bq/kgであった．

平成10年度に発生した化学物質による食中毒のうち，①ヒスタミンによる食中毒の４事例（仕出し弁当マグロ唐揚げ食中毒，魚しょうゆ漬け焼き食中毒，イワシの丸干し食中毒，アジの開き食中毒）②洗剤が混入した菓子による有症苦情事例　③キノコによる中毒の３事例（群馬県沿道の農産物販売のシビレタケ，山梨県で採取したオシロイシメジ，福島県で採取したカキシメジ）の計８事例について報告した．

遺伝子組み替え技術により作られたα－アミラーゼ（バイオ製品）はα－マルトース生成能の高い酵素で菓子，パンなどに使用されている．本論文はバイオ製品と従来品についてタンパク質の電気泳動パターン，有害金属，

副剤等の含有量及び酵素活性を比較した．その中の酵素活性測定において糖化力に対する糊精化力の比が従来品は１～３倍であったが，バイオ製品は60～70倍と高いことが明らかとなった．

ポリカーボネート製ほ乳びん及び給食器からのビスフェノールＡ（BPA）の溶出について検討した．都立病院など３施設での使用済みほ乳びんから0.3～2.5ng/ml，参考の１施設のものからは4.8～132ng/mlのBPA溶出が見られた．未使用ほ乳びんの煮沸消毒（0.3～1.0ng/ml），電子レンジ消毒バッグ使用によるほ乳びん（最大0.4ng/ml），使用済み給食器（0.4～120ng/ml），はし（平均39.6ng/ml）などからの溶出が認められた．

食品用ポリスチレン製器具，容器，包装製品51検体中のスチレンモノマー（30～760ppm），ダイマー（60～1,180ppm）及びトリマー（150～7,310ppm）の含有量を明らかにした．60℃及び90℃，30分の水による溶出実験ではいずれも検出されなかったが，*n*-ヘプタンでは全ての検体からモノマー（10～324ppb），ダイマー（1～1,225ppb），トリマー（3～16,068ppb）が溶出し，脂肪性食品による溶出が危惧された．

天然添加物製剤中のN-メチルカルバメート系農薬８種について，アルカリ分解，誘導体化法を応用した蛍光検出器付きHPLCによる分析法について検討した．抽出操作のみでは測定が不可能な抽出カロテン，ブドウ果皮色素，ウコン色素製剤についてはフロリジルカラムによる精製後，測定した．これら製剤９種類32検体から，いずれもこれらの農薬は検出されなかった．

食品添加物製剤中の無機塩類添加物のICP発光分光分析法による簡易一斉分析法を検討した．製剤に硝酸を加え，マイクロ波により分析の妨害となる有機物を分解してICPにて測定した．測定元素はカリウム，ナトリウム，カルシウム，マグネシウム，アルミニウム及びリンの６元素である．本分析法をかんすいなど各種73製品に適用し，添加物延べ186品目を分析し，表示と実際の配合量との差を明らかにした．

都農業試験場において，有機農法（A群），減農薬・減化学肥料農法（B群），慣行法（C群）により栽培された16品目，26種類の農産物について栄養成分含量の１）タンパク質，脂質，食物繊維など，２）無機質，３）ビタミンを調査し，有意差検定（分散分析，t検定）により比較した．その結果，これらの農法（施肥，農薬の条件など）の違いによる各成分含量に明快な相違は認められなかった．

新規野菜と従来種の栄養成分を比較した．細胞融合で創られたナス「クロナス」は従来種の千両２号に比べ，タンパク質がやや高い値を示した．組織培養で創られたトマト「越のルビー」は従来種（桃太郎８）と主要成分は類似し，ビタミンＡ，Ｃ，リコペンが高く，「ミニトマト」はトマトに比べビタミンＡ含量がかなり高かった．「トマピー」はビタミンＣを多く含み，破断荷重は従来のピーマンに類似していた．

台所用抗菌スポンジタワシ中のチアベンダゾール（TBZ）の簡易な分析法を開発した．本分析法を用いて実態調査を行ったところ，43試料中の10試料より11～2,700μg/gのTBZを検出した．いずれもTBZの添加の表示はなかった．TBZが検出されたスポンジタワシを食器洗浄に使用したところ，タワシ中のTBZは急激に減少することが明らかとなった．

食肉から病原性大腸菌O157：H7をスクリーニングするための検査法としてPetrifilm ™ Test Kit-HEC（PF法）を応用する方法を検討した．PF法によりノボビオシン加mEC brothで，40℃，24時間増菌培養したところ，汚染菌量として，牛挽肉10g当たり数個の検出が可能であった．また，増菌培養の時間等についても検討した．本検査法を市販食肉（牛肉，豚肉，鶏肉）計227検体に応用して良好な結果が得られた．

本報は資料に分類される報告である．生物農薬の１つである*Bacillus thuringiensis*（Bt菌）について飲用茶類，計53品目，55検体を調査した．商品に表示してある飲み方に従い抽出し，Bt菌の検出を試みたところ，55検体中16検体から殺虫性結晶毒素産生株が分離され，そのうちの11株が*B.t.* serovar *kurstaki* の因子血清で凝集反応を示した．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 97-100, 1999

魚肉中の一酸化炭素のＧＣによる定量法の検討

有松真保*, 大橋則雄**, 天川映子***,
鎌田国広****, 鈴木助治***

Studies on Determination of Carbon Monoxide in Fish Meat by GC

MAHO ARIMATSU*, NORIO OHASHI**, EIKO AMAKAWA***,
KUNIHIRO KAMATA****and SUKEJI SUZUKI***

Keywords：魚肉 fish meat, 一酸化炭素 carbon monoxide, ガスクロマトグラフィー gas chromatography

緒　　言

食品衛生法では，鮮度保持や変色防止を目的とした生鮮魚への食品添加物の使用は禁止されている．しかし，近年，一般消費者に対して鮮度をよく見せるために一酸化炭素（以下COと略す）処理を行った冷凍マグロが市場に流通し，食品衛生上問題となった．

マグロやブリなどの赤身魚の肉中には，筋肉色素であるミオグロビン（Mb）が多量に含まれている．漁獲直後の赤身魚の肉色素は還元型Mbの赤紫色をしているが，空気に接触するとMbが酸素（O_2）と結合してオキシミオグロビン（MbO_2）に変わり，鮮やかな赤色を呈する．これをさらに，空気中に放置すると徐々に酸化を受け，メトミオグロビン（metMb）へと変化して，肉は褐色から灰褐色に変わり商品性のない状態となる[1]．

MbはO_2との結合力に比べCOとの結合力が強く，COと容易に結合して鮮やかな赤色のカルボキシミオグロビン（MbCO）を生成する[2]．MbCOはMbO_2よりも酸化に対して安定性が強いため[3]，CO処理された魚は鮮度が落ちても赤色を長時間保持し，鮮度についての消費者の判断を誤らせ，衛生上の危害を生じさせる恐れがある．このため，厚生省は平成６年９月に鮮魚に対するCOの使用について，食品衛生法第６条（指定外添加物の使用）に違反する旨を都道府県に通知した[4]．更に，平成９年５月に厚生省がマグロにおけるCOのガスクロマトグラフィー（GC）による検査法（通知法）及び判定基準を示した[5]．これに伴い当研究所でも都の緊急監視に対応して魚肉中のCO検査を実施した．

しかし，著者らの市販鮮魚の検査において，通知法より得た定量値にばらつきが認められ，CO処理の有無の判定に困難な場合がみられた．

そこで，著者らは，通知法を参考にして，GCによる魚肉中のCOの定量法を検討し，精度のよい定量法を確立したので報告する．

実験方法

１．試　　料

市場で購入した冷凍マグロをポリエチレン袋に入れて脱気した後，COガスを注入してガス置換を行い，このまま，５℃で18時間静置してCO処理マグロを作製し，再度脱気して凍結保存（−20℃）し，標準試料とした．

２．試　　薬

COガス（試料作製用）：ガステック㈱製COガス（99.5%），CO標準ガス：ガステック㈱製校正用ガス（80ppm），内標準用メタンガス：ジーエルサイエンス㈱製メタンガス（99.5%）を窒素ガスで希釈し，160 ppmとしたものを用いた．その他の試薬：すべて和光純薬工業㈱製試薬特級を用いた．

３．装　　置

ガスクロマトグラフ：島津製作所㈱製GC-9A（FID検出器付）にジーエルサイエンス㈱製メタナイザーを接続して用いた．ホモジナイザー：杉山元医理器製エルビス

＊東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科（現：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
＊＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
＊＊＊東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科
＊＊＊＊東京都立衛生研究所生活化学部乳肉衛生研究科

シェーカーEL，振とう機：日本精機製作所製AM-3，冷却遠心分離機：佐久間製作所製50A-7

4．試料溶液の調製

試料溶液の調製法を図1に示した．試料を解凍した直後に細切し，その150gに2倍量の水300mlを加え，ホモジナイザーを用いて氷冷下で1分間ホモジナイズし，遠心管にとり，10℃で遠心分離（3000rpm，10min）して，その上清を試料溶液とした．

5．COの定量

試料溶液50mlを100ml容ヘッドスペースボトルにとり，消泡剤としてn-オクタノール5滴，水5ml，25%硫酸亜鉛溶液20mlを加え，直ちにシリコンラバーセプタム付の蓋をした後，10分間強く振とうする．10分間静置後，ボトル中の気体相をガスタイトシリンジで1.5ml，次いで同シリンジで内標準用メタンガス0.5mlを正確に採取し，GCに注入する．別に，CO標準ガス0.25，0.5，0.75，1.0，1.25，1.5ml（CO濃度として20，40，60，80，100，120ppm）と内標準用メタンガス0.5 mlのピーク面積の比から作成した検量線を用いて通知法[5]より試料中のCO濃度を求めた．

6．GC分析条件

カラム：Molecular Sieve 13X（60 - 80 mesh）3mm i.d.×2m，カラム温度：90℃，試料注入口温度：150℃，ガス流量：窒素ガス40ml/min，メタナイザー温度：400℃，注入量2ml.

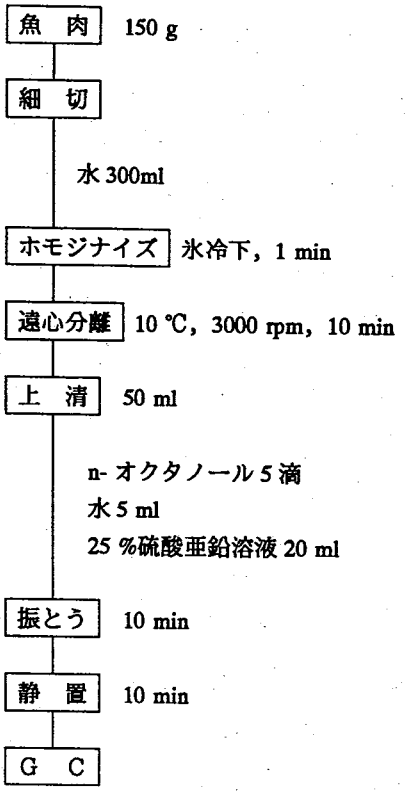


図1．魚肉中のCO分析法

結果及び考察

1．定量条件の検討

CO測定値のばらつきの要因の一つとして，試料溶液からのCOの解離のばらつきが考えられる[6]．そこで，試料溶液からCOを効率よく且つ再現性よく解離させるための定量条件について検討した．

1）解離剤について　試料溶液からCOを効率よく解離させるための解離剤について検討を行った．解離剤としてリン酸，塩酸，フェロシアン化カリウム溶液，チオシアン酸カリウム溶液，トリフルオロ酢酸溶液，硫酸亜鉛溶液及び通知法で用いられている硫酸の7種を用いてCOの解離量を比較した．解離量の最大を100として，その結果を図2に示した．その結果，通知法で用いられている硫酸の解離量は約66%を示し，検討した7種の解離剤の中で硫酸亜鉛溶液が最も優れていることが認められた．

2）硫酸亜鉛溶液の濃度について　解離剤として用いら

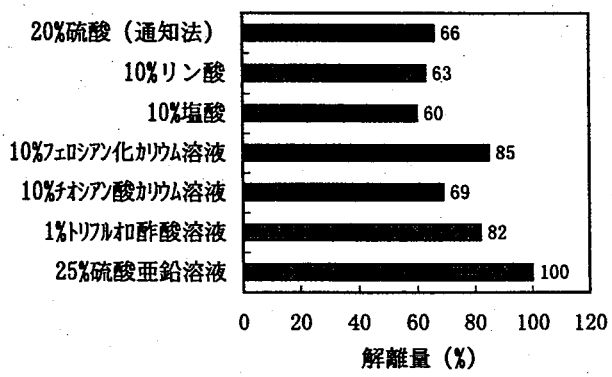


図2．解離剤のCO測定値への影響

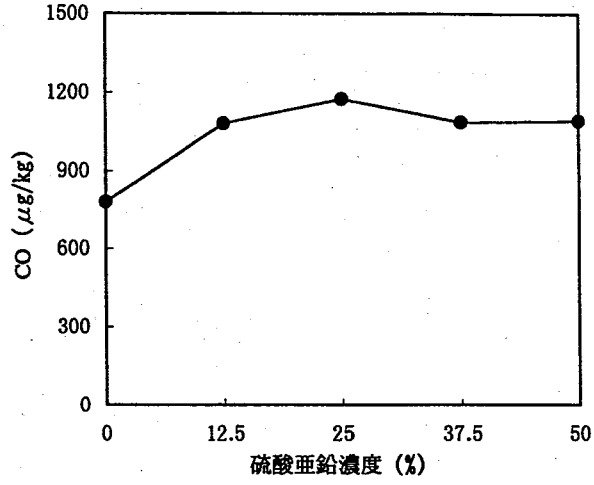


図3．硫酸亜鉛濃度のCO測定値への影響

れる硫酸亜鉛溶液の濃度について検討した．硫酸亜鉛溶液の添加量を20mlとし，硫酸亜鉛溶液の濃度を段階的に変化させ，それぞれにおけるCOの解離量を調べた．その結果，図3に示すように硫酸亜鉛の濃度に比例して解離量も増加し，25%以上でほぼ一定になった．そこで，解離剤として25%硫酸亜鉛溶液20mlを用いた．

3）振とう時間について 次に振とう時間がCOの解離量に及ぼす影響について検討した．その結果，図4に示すように解離量は10分間でほぼ一定の傾向を示したので振とう時間を10分間とした．なお，通知法は，振とう時間が2分間と短いためCOの解離が不十分で，測定結果のばらつきの大きな要因になっているものと考えられる．

2．内標準物質、精度および検量線

内標準物質としてメタン，エタン及びエチレンガスを用いてヘッドスペースGCを行ったところ，いずれの内標準物質も対称性のよいピークとなった．しかし，保持時間（t_R）はCO（t_R：9.8min）に対してメタン（t_R：7.2min），エタン（t_R：45min），エチレン（t_R：>60min）であった．この結果からメタンが内標準物質として適していることが認められた（図5）．

そこで検量線について，メタンを用いた内標準法と絶対検量線法（通知法）とで比較検討した．絶対検量線は，COピークの面積と濃度から，また，内標準法は，メタンに対するピーク面積比と濃度から，最小二乗法によって検量線を作成した．その結果，両方法とも20～120 ppmの範囲においてほぼ原点を通る直線性を示した．なお，相関係数（r）は内標準法0.9993，絶対検量線法0.9981であった．

次に、CO 40ppm及び80ppmについて5回ずつ繰り返して分析を行い、測定値の再現性について検討した．その結果、絶対検量線法では、それぞれの変動係数（CV）は13.2%，8.0%であったのに対し、内標準法では、3.7%、2.7%であった。

以上の結果から通知法の絶対検量線法よりメタンを内標準に用いる本法が直線性及び再現性で優れていることが認められた．

3．本法と通知法との比較

CO処理マグロに対する本法の分析精度を確認する目的で、本法と通知法の定量値の比較を行った．その結果を表1に示した．本法は、通知法に比べて若干高い測定値を示した．また，それぞれの測定値のCVを求めたところ、本法5.6%，通知法9.0%であった．これらの結果から，本法は通知法より魚肉から効率よくCOを解離し，かつ定量精度が優れていることが認められた．

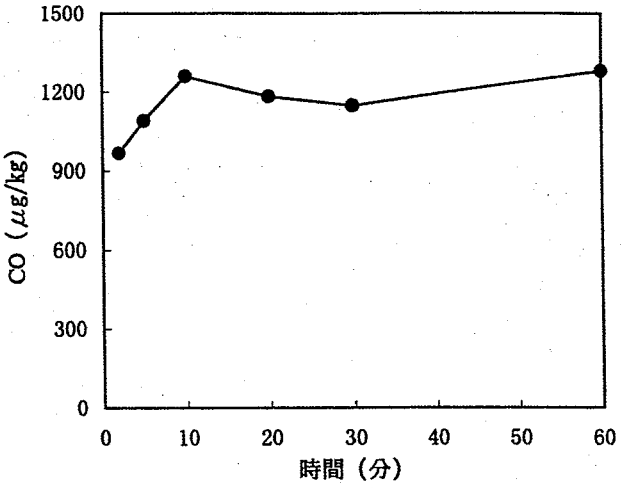


図4．振とう時間のCO測定値への影響

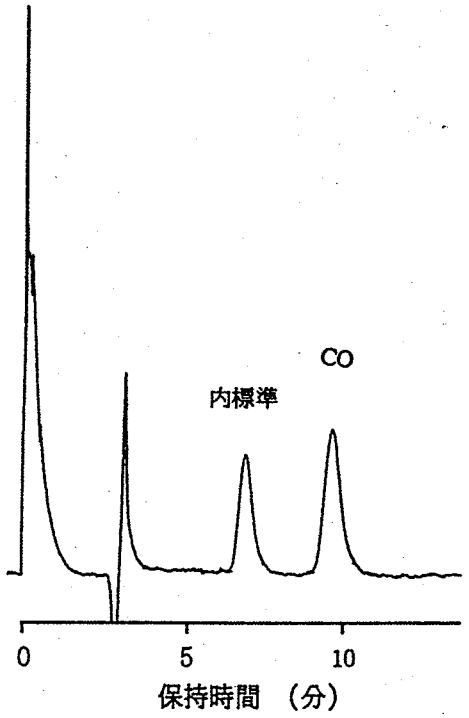


図5．COのGCクロマトグラム
内標準物質：メタン

表1．本法と通知法のCO測定値の比較

試 料	CO（μg/kg）	
	本法	通知法
1	1452	1387
2	1251	1143
3	1284	1080
4	1326	1278
5	1256	1163
平均値	1314	1210
標準偏差	74	109
CV（%）	5.6	9.0

まとめ

GCによる魚肉中のCOの定量法について検討した．解離剤として25%硫酸亜鉛溶液を，GCの内標準物質としてメタンガスを用いることにより，再現性の高い結果が得られた．また，本法と通知法の定量精度について比較したところ，本法（CV：5.4%）が通知法（CV：9.0%）より優れていることが認められた．この結果，本法は，魚肉中のCOの改良法として精度の良い定量法であると考える．

文　献

1）岡　弘康：食品工業，**38**，41 - 47，1995.

2）安河内五郎：急性一酸化炭素中毒，6-7，1972，医学書院，東京.

3）Lanier, T. C., Carpenter, J. A. and Toledo, R. T.：*J. Food Sci.*, **43**，1,788 - 1,796，1978.

4）厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：「鮮魚に対する食品添加物の使用について」平成6年9月22日，衛乳第141号・衛化第89号.

5）厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知：「マグロへの一酸化炭素の使用について」平成9年5月21日，衛乳第146号・衛化第68号.

6）阿部政夫，宮崎仁志，永井祐治：名古屋市衛研報，**40**, 10-15，1994.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 101-106, 1999

茶抽出物を添加した食品中のカテキン類及びメチルキサンチン類の分析

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 and Methylxanthins in Foods Added Tea Extracts

CHIGUSA KOBAYASHI*, MITSUO NAKAZATO*, YUKIKO YAMAJIMA*,
YUKA KAWAI**, YUKINARI TATEISHI* and KAZUO YASUDA*

A survey of the contents of 8 catechins ; catechin (C), epicatechin (EC), gallocatechin (GC), epigallocatechin (EGC), gallocatechin gallate (GCG), epigallocatechin gallate (EGCG), catechin gallate (CG) and epicatechin gallate (ECG), and 3 methylxanthines ; caffeine (CF), theobromine (TB) and theophylline (TP) in chewing gum and candy that had added tea extracts was carried out.

The total contents of 8 catechins in 24 samples of chewing gum and 21 samples of candy were in the range of 0-400 μg/g and 0-1200 μg/g, respectively.

From the all samples detected catechins, CF was also detected in the range of 10-260 μg/g. The correlation between the contents of CF and the total contents of 8 catechins was observed on the samples that had added green tea extracts. The results suggested that CF was derived from the tea extracts, which were added to the samples.

Keywords：カテキン類 catechins，メチルキサンチン類 methylxanthines，茶抽出物 tea extract，キャンディー candy，ガム chewing gum，高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒　言

最近，緑茶等に含まれるカテキン類による虫歯予防，消臭，抗酸化，抗菌，抗アレルギー，抗ガン作用等の多種の効果が注目され，茶葉の消費が増大している．また，このような茶の効果を食品に付与する目的で，緑茶又は茶抽出物を添加したさまざまな加工食品が多数開発され，消費者の健康増進志向ともあいまって，その消費量が伸張している[1-6]．たとえば，虫歯予防効果のある子供向け菓子，口臭予防効果のある菓子，健康食品，さらに，油脂の酸化防止，水産・畜産加工品の消臭及び鮮度保持等にも用いられている．

一方，カテキン類は酸化されやすい性質があり，製造，流通過程で食品中の含有量が減衰して期待された効果が無くなる可能性も考えられる．また，茶には覚醒，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有されるため，食品に添加された茶抽出物に含まれるメチルキサンチン類を消費者が知らずに摂取してしまう可能性がある．しかし，これらの含有量実態については調査報告例がみあたらない．

前報で著者らは茶葉及び茶飲料中のカテキン類8種及びメチルキサンチン類3種の含有量について調査結果を報告した[7]．今回は，茶抽出物を添加した食品のうち，虫歯予防あるいは口臭防止等をアピールした菓子を対象にカテキン類及びメチルキサンチン類の含有量について調査したので報告する．

実験方法

1．試料

平成7年から9年に東京都内で市販されたガム24検体

* 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

及びキャンディー21検体について調査を行った．これらはいずれも茶抽出物を添加又は緑茶を原材料としている旨の表示があった．また，対照として茶及び茶抽出物を添加していないガム3検体及びキャンディー4検体を併せて調査した．

2．分析項目

1）カテキン類：カテキン（C），エピカテキン（EC），ガロカテキン（GC），エピガロカテキン（EGC），ガロカテキンガレート（GCG），エピガロカテキンガレート（EGCG），カテキンガレート（CG），エピカテキンガレート（ECG）の8成分

2）メチルキサンチン類：カフェイン（CF），テオブロミン（TB），テオフィリン（TP）の3成分

3．試薬及び装置

前報[7]に従った．

4．試験溶液の調製

キャンディーは粉砕し，その10gに0.1%メタリン酸を10ml加えて50℃の水浴で加温溶解した．冷後，水で50mlとしたのち，ろ紙を用いてろ過した．これを10mlとり，Mega Bond Elut C18に負荷し，水5mlで洗浄後，メタノール−0.05mol/Lリン酸緩衝液（pH 3.0）（4:6）で溶出し，10mlとしたものを試験溶液とした．

ガムは粉砕又は細切したもの10gをとり，0.01%メタリン酸80mlを加えて80℃の水浴で30分間攪拌して抽出した．冷後，水で100mlとし，ろ紙でろ過した．この10mlをとり，Mega Bond Elut C18に負荷し，以下キャンディーと同様に操作して試験溶液を作成した．

5．HPLC条件

前報[7]に従った．

結果及び考察

1．分析法の検討

試料からのカテキン類及びメチルキサンチン類の抽出方法を検討した．ガムでは常温での抽出が困難であったので，加温抽出する方法を検討した．カテキン類は，加熱したときに弱酸性から塩基性領域では異性化が起こりやすく[8]，また，酸化されやすいため，強酸性の抽出溶剤を用いる必要がある．そこで，アスコルビン酸等の抽出に用いるメタリン酸溶液を用いることにした．カテキン類8種及びメチルキサンチン類3種の標準物質のメタリン酸溶液を調製して安定性を検討した．その結果，30分間の加熱では全成分ともほとんど変化が生じなかったので，メタリン酸溶液を抽出溶媒とした．その濃度が0.01%以上のとき，全成分を90%以上回収することができた．また，キャンディーを加温して溶解する場合も同様にメタリン酸溶液を用いた．

次のMega Bond Elut C18によるクリーンアップ操作では，メタリン酸溶液をそのまま負荷すると，塩基性物質であるメチルキサンチン類の保持に影響することが懸念された．しかし，0.01〜0.02%程度のメタリン酸溶液であれば中和等の処理を行うことなしに11成分のすべてが保持されることを確認した．

緑茶抽出物を添加したキャンディーのUV検出によるHPLCクロマトグラムをFig.1に示した．今回分析したガム及びキャンディーでは，ほとんどの試料において夾雑ピークの影響を受けることなく11成分を良好に分離することができたが，保持時間の最も短いGCにおいて夾雑ピークとの分離が不十分なものが一部あった．そこで，より選択性の高いECD検出器を用いたところ夾雑ピークは出現せず，GCも完全に分離することができたので，ECD検出器を併用することにした．なお，本法に従って分析したときの11成分の添加回収率は85 %以上であった．

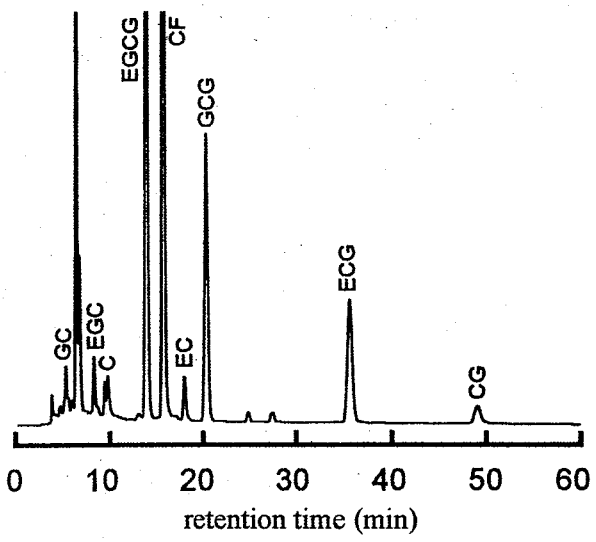


Fig. 1 .HPLC Chromatogram of Candy Containing Green Tea Extract by UV Detection
Column：J'sphere ODS-H80 (4 μ m, 4.6mm i. d.×250mm), Mobile phase：methanol-0.1mol/L phosphate buffer (pH3.0) (11:39), Flow rate：0.7ml/min, Column temp.:40℃, Detection：UV 275nm, Injection vol.: 10 μ l

2．カテキン類の含有量

茶抽出物を添加したガム及びキャンディーの含有量調査結果をTable 1及びTable 2に示した．さらに，カテキン類8種の合計値を総カテキン量として各Tableに掲載した．

試料に添加されていた茶抽出物は，「緑茶抽出物」，「ウーロン茶抽出物」，「茶抽出物」，「甜茶抽出物」と表

Table 1. Contents of Catechins and Methylxanthines in Chewing Gums Added Tea Extracts

(μg/g)

sample No.		Catechins									Methylxanthines	
		C	EC	GC	EGC	GCG	EGCG	CG	ECG	Total	CF	TB
1	green tea extract	<10	<10	(−)	<10	13	42	(−)	<10	75	59	(−)
2		<10	<10	(−)	(−)	10	28	(−)	<10	53	47	(−)
3		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	13	(−)
4		(−)	(−)	(−)	<10	<10	12	(−)	(−)	22	22	(−)
5		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
6		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	13	(−)
7		<10	<10	(−)	(−)	23	54	(−)	13	100	59	(−)
8		<10	<10	(−)	<10	<10	22	(−)	<10	47	20	(−)
9		<10	<10	(−)	10	20	50	(−)	<10	95	62	(−)
10		<10	<10	(−)	(−)	16	49	(−)	<10	80	59	(−)
11		10	41	47	66	24	170	(−)	39	397	78	(−)
12		(−)	(−)	<10	10	(−)	25	(−)	(−)	40	31	(−)
13		(−)	<10	11	15	(−)	25	(−)	(−)	56	35	(−)
14	tea extract	<10	<10	(−)	<10	20	28	(−)	<10	68	43	(−)
15		<10	<10	(−)	<10	11	29	(−)	<10	60	39	(−)
16	oolong tea extract	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	13	(−)	(−)	13	24	(−)
17		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	21	(−)
18		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	14	(−)
19		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	15	(−)
20		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	16	(−)
21		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	15	(−)
22		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	19	(−)
23		(−)	(−)	(−)	<10	(−)	17	(−)	(−)	22	24	(−)
24	oolong tea extract and CF	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	1620	(−)

Table 2. Contents of Catechins and Methylxanthines in Candies Added Tea Extracts

(μg/g)

sample No.		Catechins									Methylxanthines	
		C	EC	GC	EGC	GCG	EGCG	CG	ECG	Total	CF	TB
1	green tea extract	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)	(−)	<10	31	(−)
2		<10	<10	(−)	29	42	110	(−)	27	218	65	(−)
3		<10	<10	(−)	29	26	88	(−)	16	169	54	(−)
4		<10	<10	(−)	31	41	110	(−)	26	218	61	(−)
5		<10	<10	(−)	23	37	72	(−)	18	160	63	(−)
6		<10	<10	(−)	25	46	88	(−)	19	188	63	(−)
7		<10	<10	(−)	28	46	80	(−)	16	180	66	(−)
8		<10	<10	(−)	23	34	63	(−)	16	146	57	(−)
9		<10	<10	(−)	34	37	78	(−)	19	178	52	(−)
10		(−)	(−)	(−)	(−)	<10	23	(−)	(−)	28	10	(−)
11		<10	30	22	56	30	140	(−)	34	317	58	(−)
12	tea extract	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
13		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	13	(−)	(−)	13	20	(−)
14		(−)	(−)	(−)	(−)	<10	<10	(−)	(−)	10	24	(−)
15	green tea paste and green tea extract	<10	30	(−)	144	62	270	(−)	61	572	125	<10
16	green tea and tea extract	18	103	103	328	89	439	14	102	1196	260	(−)
17		<10	(−)	10	<10	16	12	(−)	(−)	48	140	(−)
18	oolong tea extract	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
19		(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
20		(−)	(−)	(−)	<10	(−)	12	(−)	(−)	17	10	(−)
21	tien-cha extract	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	<10	(−)

示されていた.

ガムでの添加表示の内訳は，緑茶抽出物13検体，ウーロン茶抽出物９検体，茶抽出物の表示があったものが２検体であった．キャンディーでは，緑茶抽出物11検体，ウーロン茶抽出物３検体，茶抽出物のみの表示があったものが３検体，緑茶と茶抽出物の両方使用が２検体，緑茶ペーストと緑茶抽出物の両方使用が１検体及び甜茶抽出物が１検体であった．

緑茶抽出物又は茶抽出物の添加表示がある試料32検体中，カテキン類を検出したのは27検体であった．総カテキン量の検出量は，ガムでは22～397 μg/g，平均91 μg/g，キャンディーでは10未満～1196 μg/g，平均144 μg/gであり，大きなばらつきがあった．一方，茶抽出物を添加した旨の表示があっても，カテキン類をほとんど検出しないものもあり，ガムでは15検体中３検体，キャンディーでは17検体中２検体あった．これらはもともと茶抽出物の添加量が少なく，カテキン類が製造工程等で減衰したものと思われるが，茶抽出物が全く添加されていなかった可能性もある．

キャンディーの中で，緑茶ペーストと茶抽出物の両方を使用したもの及び緑茶と茶抽出物を原材料としたもの各１検体では，総カテキン量として572及び1196 μg/gと非常に多く検出された．これは，本来緑茶の味を付与することが目的で使用された緑茶ペーストあるいは緑茶にもカテキン類が含まれ，茶抽出物由来のカテキン類がさらに加わったためである．なお，最も多く総カテキン量を検出したキャンディーは煎茶浸出液に相当する含有量であった[7].

検出されたカテキン類の組成については，EGCGの含有量が最も多く，総カテキン量の50%以上を占め，続いて，GCG，EGC，ECGの順であり，この4成分の合計は総カテキン量の90%に相当する．C，EC，GC，CGの４成分の検出量はわずかであった．前報では，緑茶中のカテキン類の各成分組成は，EC，ECG，EGC，EGCGの２R体のものが大部分を占めていた．一方，ガム及びキャンディー中ではEGCGの異性体である２S体のGCGが比較的多く検出される傾向があった．これは，すでに緑茶抽出物中のカテキン類の組成が緑茶葉の組成と異なっていたためと思われる．また，ガムやキャンディーの製造中に２R体から２S体へのエピメリ化が起こった可能性も考えられる．

今回調査した試料のうち，緑茶抽出物のみ添加したキャンディー及びガムのほとんどが子供向けであり，「歯に優しい」あるいは「歯を大切に」という虫歯予防効果を期待させる旨の表示があった．それ以外の一般向けのものでは口臭防止効果を期待させるような表示があるものもあった．

虫歯の原因菌である*Streptococcus mutans*に対するカテキン類の最小発育阻止濃度は，カテキン類の種類によって多少の差はあるが，おおよそ250～1000 μg/mlといわれている[9]．また，緑茶抽出物（カテキン類75%含有）0.05%を飲水又は飼料に添加してラットに与えると有意に虫歯を抑制し，緑茶抽出物0.05%溶液で洗口したときのヒト口腔内の歯垢付着量を有意に減少させるという報告もある[10]．これらの報告から，虫歯予防効果を表示しているものでも総カテキン量が50 μg/g未満の試料では，茶抽出物単独での虫歯予防効果を期待しにくいと思われる．

ウーロン茶抽出物又は甜茶抽出物を添加したガム及びキャンディー中のカテキン類の検出量はわずかであり，中には検出されないものもあった．ウーロン茶抽出物中の抗う蝕（虫歯予防）作用の有効成分は分子量約2000のカテキン重合体である[3]．また，甜茶抽出物の抗アレルギー作用の有効成分は高分子のポリフェノール類であることも知られている[11]．これらの物質は今回の分析対象としなかったが，今後検討したい．

3．メチルキサンチン類の含有量

CFについては，添加表示のあるものはガム1検体のみであったが，それにもかかわらず，添加表示のないガムでも23検体中22検体から13～62 μg/g，キャンディーでは21検体中18検体から，10 μg/g未満～260 μg/g検出された．CF添加表示のあるガム1検体からは1620 μg/gという高濃度のCFが検出されたが，これには眠気防止効果のある旨の表示があった．なお，成人において80mg以上の投与量で睡眠遅延作用があるといわれ[12]，このガムでは50g中の含有量に相当する．

CF含有の表示がない試料からもCFは検出された．これらの試料にはいずれも茶抽出物添加の表示もみられ，カテキン類が検出された．さらに，総カテキン量に比例してCF量も多くなる傾向が認められた．また，茶抽出物の表示のないガム３検体及びキャンディー４検体からはカテキン類及びメチルキサンチン類が検出されなかった．これらの結果から，試料から検出されたCFは茶抽出物に由来するものと判断される．

キャンディーのうち，No.15～17の緑茶エキス及び緑茶を原料としたもの３検体からCFが125～260 μg/g検出された．この検出濃度は平均的な緑茶飲料とほぼ同じである．また，上記３検体及びCFの添加表示のある１検

体を除いたキャンディー及びガムの平均CF検出量は32 μg/g，最大値は78μg/gであった．したがって，一般的な喫食量では大きな生理的影響はないものと考えられるが，子供では一度に多量に喫食したりあるいは茶飲料等を同時に飲用することで思わぬ生理的影響が出現することも懸念される．また，消費者が緑茶そのものが使われていない菓子にもCFが含有されていることを原材料表示から判断することは不可能と思われるので，特に子供向け食品についてはこの旨の注意表示が必要であると考える．

TBはキャンディー1検体からわずかに検出されたが，それ以外からは検出されなかった。また，TPは全検体から検出されなかった。

まとめ

茶抽出物を添加し，虫歯予防あるいは口臭防止効果等を期待させる旨の表示のあるガム及びキャンディー計45検体を対象に茶の有効成分であるカテキン類8種及びメチルキサンチン類3種の含有量を調査した．

1．緑茶抽出物を添加し，虫歯予防効果が期待される旨の表示があるキャンディー，ガム中の総カテキン量は検出量に大きな差があった．中にはほとんどカテキン類が検出されないものもあった．

2．カテキン類が検出されたものすべてから，CFも検出され，添加された茶抽出物に由来することが判明した．

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）石川久史：月刊フードケミカル，**10**(4), 29-37, 1994.
2）青井暢之，大久保勉，津田憲：月刊フードケミカル，**11**(11), 89-96, 1995.
3）細野秀和：月刊フードケミカル，**10**(4), 16-18, 1994.
4）細野秀和：ジャパンフードサイエンス，**32**(1), 28-34, 1993.
5）川上正子，南条文雄，原征彦：ジャパンフードサイエンス，**35**(3), 45-54, 1996.
6）井川靖之：ニューフードインダストリー，**40**(3), 33-39, 1998.
7）小林千種，中里光男，山嶋裕季子，他：東京衛研年報，**49**, 135-143, 1998.
8）Seto R., Nakamura H., Nanjo F., *et al. : Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(9), 1434-1439,1997.
9）平井孝一：食品と開発，**32**(2), 22-24, 1997.
10）Sakanaka S., Kim M., Taniguchi M., *et al. : Agric. Biol.Chem.*, **53**(9), 2307-2311, 1989.
11）津田憲：JAFAN，**14**(6), 11-17, 1995.
12）村松敬一郎：茶の科学，186, 1991，朝倉書店，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 107-112, 1999

いわゆる健康茶類の衛生化学的調査

中里光男*, 牛山博文*, 横山敬子**, 小林千種*,
川合由華***, 立石恭也*, 小川仁志*, 安田和男*

Hygienic Studies on Health Foods Using Dried Leaves of Plants

MITSUO NAKAZATO*, HIROFUMI USHIYAMA*, KEIKO YOKOYAMA**, CHIGUSA KOBAYASHI*,
YUKA KAWAI***, YUKINARI TATEISHI*, HITOSHI OGAWA* and KAZUO YASUDA*

Keywords：健康茶 harb tea, 健康食品 health food, 食品添加物 food additives, 有害元素 harmful elements, カビ毒 mycotoxins, 放射能 radioactivity, 残留農薬 pesticide residues, 総臭素 total bromide, カフェイン caffeine.

緒　　言

我が国は着実に高齢化社会への道を歩んでいるが，それに伴い国民の健康に対する関心もかつてないほどの高まりをみせている．そうした中で健康食品産業といわれる業種が台頭し，年毎に確実な発展を見せている．その市場規模は1998年の調査で約6,500億円に達しており，これは10年前の約２倍である[1]．その間，様々な健康食品が市場に投入されてきたが，近年は美容やダイエットの要素のある健康茶類が売れ筋商品となっており，特に世界各地の民間伝承的な健康茶類が人気を集めている．一方，これら健康茶に関する消費者からの苦情や相談も増加している．特に，輸入健康茶の品質や素材あるいは安全性について正確な情報の提供を望む声が強くなっている．ちなみに，1996年には食欲抑制剤であるフェンフルラミンの添加された中国産の健康茶が発見され，問題となった事例もあった[2]．

著者らは昭和54年以来様々な健康食品の衛生化学的調査を実施し，報告[3-7]してきたが，今回はその後得られた結果のうち，平成３年から平成６年度に実施した健康茶類を中心にした衛生化学的調査の結果について報告する．

実験の部

１．試　　料

平成３年４月から平成７年３月に東京都内で購入したドクダミ茶15(11)検体，クマザサ茶５(2)検体，ヨモギ茶10(6)検体，アロエ茶６(4)検体，杜仲茶10(5)検体，グァバ茶８(5)検体，ギムネマ茶10(7)検体及びルイボスティー13(0)検体，総計８種77(40)検体を試料とした．これらはこれまでの調査では対象としなかった検体である．なお，購入した各健康茶は乾燥葉をそのまま袋詰めしたものあるいはそれらを細切してティーバッグにしたもののいずれかである．また，一部の種類を除いてその約半数はウーロン茶や緑茶あるいは野草類とのブレンド品であった．なお，( )内の数値はブレンド品の数である．

２．分析法

１）食品添加物

(1)保存料：安息香酸，ソルビン酸，デヒドロ酢酸，パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸プロピル，パラオキシ安息香酸イソプロピル，パラオキシ安息香酸ブチル及びパラオキシ安息香酸イソブチルを対象とし，衛生試験法[8]に従って分析した．

(2)甘味料：サッカリンは衛生試験法[9]，サイクラミン酸は著者らの方法[10]及びズルチンは西垣らの方法[11]に従って分析した．

(3)着色料（酸性タール色素）：食品衛生検査指針[12]に従った．

(4)漂白剤（亜硫酸塩）：衛生試験法[13]に従った．

* 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
** 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科
*** 東京都立衛生研究所精度管理室

2）有害元素等

ヒ素（As），鉛（Pb），カドミウム（Cd），クロム（Cr），ニッケル（Ni），銅（Cu），亜鉛（Zn），マンガン（Mn），コバルト（Co），鉄（Fe），マグネシウム（Mg），カルシウム（Ca）を分析対象に選び，衛生試験法[14]に準拠して分析した．すなわちAs用試験溶液の調製はニッケルイオン添加硫酸－硝酸－過塩素酸法により，また，As以外の元素については乾式灰化法により灰化した後，硝酸に溶解し試験溶液とした．As，Cr及びCoの測定は炭素管フレームレス原子吸光光度法で，Pb，Cd，Cu，Zn，Fe，Mn，Mg，Caはフレーム原子吸光光度法によった．

3）カビ毒

アフラトキシン類（B_1，B_2，G_1，G_2）[15]，トリコテセン系マイコトキシン（デオキシニバレノール，ニバレノール，フザレノン-X，ジアセトキシスシルペノール，ネオソラニオール，T-2トキシン）及びゼアラレノン[16]について衛生試験法に従って分析した．

4）放射性物質（セシウム134（^{134}Cs）及びセシウム137（^{137}Cs））

観らの方法[17]に準じた．すなわち，試料を粉砕した後，規格一定容器（1 L容）に均一に詰め，試料中の総セシウム（^{134}Cs＋^{137}Cs）の放射線量をγ線用NaI（TI）シンチレーション検出器で測定した．放射能濃度は試料1 kgあたりのベクレル（Bq）で表した．

5）残留農薬

(1)有機塩素系農薬：総BHC（α-，β-，γ-及びδ-BHCの総和），総DDT（*pp'*-DDT，*pp'*-DDE及び*pp'*-DDDの総和），ディルドリン，エンドリン，ヘプタクロルエポキサイド

(2)有機リン系農薬：EPN，ジクロルボス（DDVP），ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，フェニトロチオン（MEP），フェンチオン（MPP），フェントエート（PAP），マラチオンについて分析を行った．

試料はアセトン・*n*-ヘキサン（1：1.5）混液で抽出し，以下，前報[4]に従った．

6）総臭素

上村らの方法[18]に従った．

7）カフェイン

守安らの方法[19]に従った．

結果及び考察

1．食品添加物

甘味料（サッカリン，サイクラミン酸及びズルチン），着色料（酸性タール色素）及び漂白剤（亜硫酸塩）はすべての試料から全く検出されなかった．保存料では約半数の試料から安息香酸が検出されたが，その含有量はすべて0.03g/kg以下であった．

安息香酸はわずかではあるが果実，野菜，穀類等の農産物中に含まれていることはよく知られており[20, 21]，また，乾燥によって濃縮されていること等を考え合わせると，この程度の値は天然由来と考えて差し支えないと思われる．その他の保存料は検出されなかった．

2．有害元素等

有害元素等の分析結果を表1に示した．

Asは地表にも生物界にも広く分布する元素であるが，「ヒ素ミルク事件」以来，食品衛生上，有害元素の代表とされている．近年は必須栄養素であることが確認されているが，過剰摂取による害毒もよく知られており，最も注意の必要な元素の一つとされている[22-23]．Asは今回の調査ではいずれも検出限度の0.1μg/g未満であり，全く問題はなかった．

Pb及びCdは環境汚染に起因する健康障害によって，食品衛生上の有害性が指摘された金属であり，今回の調査による含有量は各々Tr（0.1μg/g未満）～1.7及びTr～0.4μg/gであった．Pbでは1.0μg/g以上検出されたものがドクダミ茶で1検体（1.0μg/g），グァバ茶で1検

表1．健康茶中の有害元素等の含有量

（μg/g）

試料	試料数	As	Pb	Cd	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Mn	Fe	Mg	Ca
ドクダミ茶	15	Tr	0.1～1.0	Tr～0.4	Tr	Tr	0.3～1.6	1.3～6.7	20～32	50～270	47～440	540～2,100	170～ 4,600
クマザサ茶	5	Tr	Tr	Tr	0.1～0.2	Tr	Tr～0.2	0.3～3.5	7.2～26	16～ 66	19～ 80	620～1,200	110～ 970
ヨモギ茶	10	Tr	0.1～0.8	Tr～0.1	0.1～0.9	Tr	0.2～1.3	4.0～10	22～32	24～140	44～200	1,100～2,000	1,200～ 4,000
アロエ茶	6	Tr	Tr～0.7	Tr～0.2	0.1～1.3	Tr～0.6	0.6～2.1	1.2～9.6	22～130	59～390	22～120	1,800～6,800	3,700～48,000
杜仲茶	10	Tr	0.3～0.7	Tr～0.1	Tr～0.5	Tr～0.1	0.1～1.0	1.1～7.8	13～30	51～180	14～110	1,200～2,000	2,500～10,000
グァバ茶	8	Tr	0.1～1.5	Tr	Tr～0.9	Tr～0.3	0.4～1.2	5.6～12	12～28	12～110	46～100	880～2,800	970～ 9,800
ギムネマ茶	10	Tr	Tr～1.7	Tr～0.1	0.2～4.9	Tr～0.4	0.1～7.9	Tr～17	Tr～28	0.4～180	10～ 69	1,900～4,800	3,100～ 7,400
ルイボスティー	13	Tr	0.1～0.3	Tr	0.1～0.2	Tr～0.1	0.2～0.4	1.7～2.4	5.2～7.4	37～ 54	13～ 28	1,300～1,500	750～ 1,100

Tr：0.1μg/g未満

表2．健康茶の有機塩素系農薬及び有機リン系農薬の残留

試料	試料数	有機塩素系農薬			有機リン系農薬		
		検出数	総BHC (ppm)	総DDT (ppm)	検出数	フェニトロチオン(ppm)	パラチオン(ppm)
ドクダミ茶	15	5	Tr～0.04(5)	0.02～0.08(2)	0		
クマザサ茶	5	0			0		
ヨモギ茶	10	6	Tr～0.22(4)	Tr～0.54 (6)	3	0.10(1)	0.23, 0.42(2)
アロエ茶	6	3	0.02 (1)	0.02～0.03(3)	0		
杜仲茶	10	4		Tr～0.08 (4)	1	0.02(1)	
グァバ茶	8	5	Tr～0.09(5)	0.03 (1)	0		
ギムネマ茶	10	5	Tr～0.23(5)		1	0.23(1)	
ルイボスティー	13	0			0		

Tr：0.01ppm未満 ( )：各農薬の検出数

体（1.5μg/g）ギムネマ茶で2検体（1.5及び1.7μg/g）あった．Pbの一日摂取許容量（ADI）は5μg/kg/日であること[22]，茶葉を用いた溶出実験でのPbの溶出率がさほど高くないことから[4]，これらの健康茶類から検出された量も食品衛生上特に問題となる量ではないと思われる．Cdではドクダミ茶で0.4μg/gと他の健康茶と比較して値のやや高いものが1検体あったが，浸出液中への溶出も比較的少ないことから[4]，茶として飲用する場合には問題はほとんどないと思われる．

Cr，Co，Ni及びCuは栄養学的には必須微量元素であるが，過剰摂取によって種々障害をもたらすことも知られている[22-25]．含有量はそれぞれTr～4.9，Tr～0.6，Tr～7.9及びTr～17μg/gであった．これらのうちギムネマ葉100%使用の1試料がこれら4種の元素の最高値を示し，他のギムネマ茶に比べ，含有量は10倍以上高い値であった．この試料は原料を顆粒状に加工してティーバックにしたものであり，加工工程中での汚染あるいは濃縮が疑われる．しかしながら，これらの金属の毒性は比較的低いことから[22-25]，今回の検出量程度ならば連用しても過剰摂取となる危険性はほとんどなく，全く問題ないと思われる．

Zn，Mn及びFeの検出量はそれぞれTr～130，0.4～390及び10～440μg/gであった．特にアロエ茶（アロエ葉100%使用のもの）でZn及びMnの含有量が高い傾向がみられた．これらの元素も生体の恒常性維持に必要な必須の微量元素であるが，多量に摂取すると過剰症をきたす[22-25]．しかし，これらの金属の無毒性量（NOAEL）はそれぞれ30，10及び65 mgであることから[24]，茶として飲用する場合には食品衛生上の問題はほとんどないものと思われる．

Mg及びCaの検出量はそれぞれ540～6,800及び110～48,000μg/gであり，アロエ茶（アロエ葉100%）の含有量に高い傾向がみられた．Mg及びCaは生体を構成あるいは維持するに必要な元素であり[22-25]，NOAELは700及び1,500mgとされているが[24]，むしろ日本人では摂取不足が指摘されている元素である．健康茶の中にはアロエ茶のように比較的高含有量のものもあるが，茶として飲用する限りにおいてはその寄与もあまり大きくないものと思われる．

3．カビ毒

カビ毒はいずれの試料からも検出されなかった．

アフラトキシンは穀類，種実類あるいは香辛料等での汚染が多いことはよく知られており[26]，トリコテセン系マイコトキシン及びゼアラレノンは麦類やコーンでの汚染頻度がかなり高いとされている[27]．

健康茶には主原料の他にいくつかの副原料を組み合わせたブレンド品も多く，これには上記のカビ毒の汚染頻度の高いハトムギがその副原料の一つとしてよく用いられる．したがって，副原料がこれらカビ毒の汚染の原因になる可能性もあるため，特に穀類がブレンドされているものについては注意する必要があろう．

4．放射能

1986年4月26日のチェルノブイリ原子力発電所の事故以来，放射性物質に汚染された輸入食品の監視が必要となり，健康茶類についても検査を実施した．わが国では，国際放射線防護委員会（ICPR）の勧告を基にして，輸入食品の放射能濃度の限度を^{134}Csと^{137}Csの総和をもって370Bq/kgとしている．今回試料とした77検体の残留放射能はこの値に比べはるかに低い値（50Bq/kg以下）であったことから，茶として長期間連用しても特に人の健康に影響を及ぼさないものと思われる．

5．残留農薬

健康茶中の有機リン系農薬及び有機塩素系農薬の分析結果を表2に示した．値は乾燥葉中の含有量である．

有機塩素系農薬は総BHCが77検体中20検体からTr（0.01 ppm未満）～0.23ppm，総DDTが16検体からTr

(0.01 ppm未満) ～0.54ppm検出され，両者が同時に検出された試料もあった．このように比較的高い頻度で総BHCと総DDTが検出された理由として，これらの農薬は土壌への残留性が高く，さらに，乾燥により試料中に濃縮されている可能性が高いことがあげられる．さらに今回の試料の多くが数種類の原料を用いたブレンド品であるため，農薬の残留した原料が混入する機会が増加したものと考えられる．

有機リン系農薬ではフェニトロチオンがヨモギ茶，杜仲茶及びギムネマ茶の各１検体からそれぞれ0.10，0.02及び0.23ppm検出され，また，パラチオンがヨモギ茶の２検体からそれぞれ0.23及び0.42 ppm検出された．

このうちフェニトロチオンは我が国をはじめ多くの国で使用されているが，パラチオンは我が国では使用が禁止され，現在では特定毒物に指定されている．しかし，中国や台湾等では現在でも農薬として使用されており，本試料はそれらの国から輸入されたものと推察される．

ところで，健康茶にはこれらの農薬の残留基準は設定されていない．一方，日本茶（不発酵茶）では総BHCと総DDTの残留基準値としてそれぞれ0.2ppm，パラチオンは0.3ppm，フェニトロチオンで0.2ppmと設定されている．これと比較すると総BHCはヨモギ茶の１検体(0.22ppm) 及びギムネマ茶の１検体 (0.23ppm) で，総DDTはヨモギ茶の１検体 (0.54ppm)，フェニトロチオンはギムネマ茶の１検体，パラチオンはヨモギ茶の１検体で基準値を越えていた．しかし，日本茶の基準値は浸出液での基準値であり，これらの健康茶の値と比較するには溶出率で比較する必要がある．

そこで，BHC (0.22ppm) 及びパラチオン (0.42ppm) が検出されたヨモギ茶，フェニトロチオン (0.10ppm) が検出されたヨモギ茶，BHC (0.01ppm) 及びフェニトロチオン (0.23ppm) が検出されたギムネマ茶の計３種を用いて，溶出率を調べた．

溶出率はパラチオンで約24%，フェニトロチオン及び総BHCとも約20%であった．したがって，これらの溶出率をそれぞれの検出値に掛けるといずれも日本茶の基準値以下となることから特に食品衛生上の問題はないと考えられる．

DDTについては，永山ら[28]は茶葉を用いた溶出実験でDDTはほとんど溶出しなかったと述べていることから，総DDTが基準値以上検出されたヨモギ茶についても飲用による摂取ではほとんど影響はないものと思われる．

表３．健康茶中の総臭素の調査

試　料	試料数	総臭素 (ppm)
ドクダミ茶	15	27 ～240
クマザサ茶	5	Tr ～ 6
ヨモギ茶	10	3 ～100
アロエ茶	6	Tr ～ 13
杜仲茶	10	Tr ～ 38
グァバ茶	8	4 ～ 41
ギムネマ茶	10	2 ～ 32
ルイボスティー	13	18 ～ 55

Tr：1ppm未満

６．総臭素

臭素はもともと土壌中に含まれる元素であるが，食品中の臭素は主として土壌薫蒸剤あるいは検疫薫蒸で使用された臭化メチルに由来すると考えられている．そこで，食品衛生法では穀類や果実類，柑橘類を中心に薫蒸後の残留量を総臭素として残留基準を定めている．しかし，茶葉を含め，その他の農産物については残留基準は設定されていない．

今回調査した各種健康茶中の総臭素含有量を表３に示したが，含有量は果実類や柑橘類での残留基準値（おおむね20～30ppm）と比較して高い傾向を示した．これは乾燥によって濃縮されたためと考えられるが，ドクダミ茶で９検体，ヨモギ茶で１検体，ルイボスティーで２検体で小麦の設定値50ppmを超えていた．これら３種の健康茶の含有量別分布を図１に示した．

ドクダミ茶では240ppm検出されたものが１検体あったが，50ppm前後のグループと100ppm前後のグループに大別された．ヨモギ茶では100ppm検出されたものが

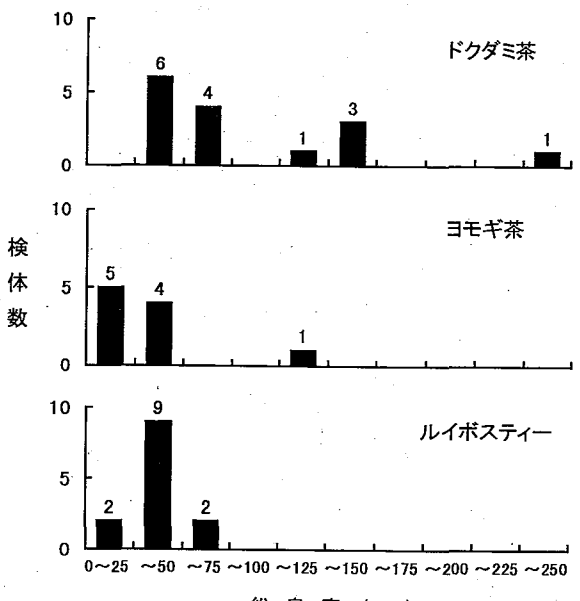


図１．健康茶の臭素含有量の分布

1検体あった他は，いずれも50ppm以下であった．また，ルイボスティーでは55ppm検出されたものが2検体あったが，平均値（38ppm）から大きくかけはなれた値ではなかった．これらの結果から判断して100ppm以上検出されたものは，臭化メチルで薫蒸された原料が使用された可能性が高いと推察される．

臭素のADIは1mg/kg/日であり[29]，最高値の240ppm検出されたドクダミ茶を体重50kgの人がそのまま200g食べてもこれに達しないことになる．したがって，茶として飲用した場合直ちに問題となる量ではないと思われる．

7．カフェイン

今回調査した健康茶のうちの半数以上は副原料としてウーロン茶や緑茶等の茶葉，ハトムギ，玄米，大麦等を焙煎したものが配合されていた．この中で，茶葉には覚醒作用や利尿作用があるカフェインが含まれていることは一般によく知られており，そのため，飲用をひかえる人もいる．しかし，健康茶中のカフェイン含有量についてはほとんど調べられていない．そこで，表4に示した5種の健康茶についてカフェインの分析を行った．

51検体の試料中21検体からカフェインが検出された．検出量は1,100～15,000 μg/gであったが，そのうちヨモギ茶の2検体，グァバ茶の1検体，ギムネマ茶の3検体からは10,000 μg/g以上のカフェインが検出された．

試料の原材料表示を照合した結果，カフェインが検出されたものはギムネマ茶の1検体を除いてすべて茶葉が配合されているものであった．このギムネマ茶からはギムネマ葉100 %使用の表示があるにもかかわらずカフェインが高濃度（10,000 μg/g）に検出され，茶葉の配合が疑われた．

カフェインは煎茶，ウーロン茶，紅茶の茶葉中に25,000～30,000 μg/g程度含まれていることから[30]，カフェインが比較的高濃度（10,000～15,000 μg/g）に検出された試料の茶葉配合率は30～50%前後と思われる．したがって，このような健康茶の飲用にあたっては覚醒作用，利尿作用等が発現する可能性が高いことに留意する必要があろう．

表4．健康茶中のカフェインの含有量

試　料	試料数	検出数	検出量（μg/g）
ヨモギ茶	10	6	1,100 ～13,000
杜仲茶	10	5	2,100 ～ 9,800
グァバ茶	8	3	3,300 ～15,000
ギムネマ茶	10	7	3,300 ～10,000
ルイボスティー	13	0	－

まとめ

ドクダミ茶，クマザサ茶，ヨモギ茶，アロエ茶，杜仲茶，グァバ茶，ギムネマ茶及びルイボスティーのいわゆる健康茶8種，計77検体について食品添加物，有害元素等，カビ毒，放射性物質，残留農薬，総臭素及びカフェインについて衛生化学的調査を実施した．

食品添加物では安息香酸が検出されるものが多数あったが，これらは本来的に原料植物に含まれていたものと考えられた．有害元素等においてはギムネマ茶でCr，Cu，Mn等の値が高いものが1試料あり，製造工程での汚染あるいは濃縮が疑われたが，検出量は食品衛生学的には問題となる量ではなかった．カビ毒及び放射能については全く問題となるような試料は認められなかった．残留農薬では有機塩素系農薬の総BHC及び総DDTが約20%の試料から検出された．有機リン系農薬のフェニトロチオンとパラチオンが5％の検体から検出されたが，日本茶の残留基準と比較してほとんど問題はないと思われた．総臭素では小麦の基準値を越えるものが12検体認められ，特に100ppmを越えるものについては，薫蒸処理された原料が使用されたものと思われた．カフェインについては供試した試料の約40%から検出され，そのうち10,000 μg/g以上検出された試料が6検体あった．これらの試料では喫飲する量によっては覚醒作用あるいは利尿作用が発現する可能性が高いと思われた．

文　献

1）健康産業新聞：第915号／第Ⅱ部，(1)，1999. 7. 1.
2）安田一郎，塩田寛子，浜野朋子，他：東京衛研年報，**48**, 71-75, 1997.
3）安田和男，西島基弘，斉藤和夫，他：食衛誌，**25**, 371-377, 1984.
4）安田和男，西島基弘，斉藤和夫，他：食衛誌，**27**, 302-310, 1986.
5）只野敬子，安田和男，牛山博文，他：食衛誌，**32**, 402-407, 1991.
6）中里光男，小川仁志，牛山博文，他：食衛誌，**37**, 343-350, 1996.
7）安田和男，横山敬子，牛山博文，他：食衛誌，**38**, 335-340, 1997.
8）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，追補1，食品中の食品添加物分析法，335-342, 1993，日本食品衛生協会，東京.
9）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付.追補(1995), 1542-1544, 1996，金原出版，東京.
10）中里光男，斉藤和夫，石川ふさ子，他：食衛誌，**34**,

248-253, 1993.

11) 西垣　進，西島基弘，田村行弘，他：東京衛研年報，**21**, 45-46, 1969.

12) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，食品中の食品添加物分析法，142-166, 1989，日本食品衛生協会，東京.

13) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付.追補(1995), 474-478, 1996，金原出版，東京.

14) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付.追補(1995),551-567，1996，金原出版，東京.

15) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付.追補(1995), 404-406, 1996，金原出版，東京.

16) 日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付.追補(1995), 411-414, 1996，金原出版，東京.

17) 観　公子，真木俊夫，永山敏廣，他：東京衛研年報. **41**, 113-118, 1990.

18) 上村　尚，西島基弘，永山敏廣，他：食衛誌. **21**, 214-218. 1980.

19) 守安貴子，斉藤和夫，中里光男，他：食衛誌. **37**, 14-19, 1996.

20) 永山敏廣，西島基弘，安田和男，他：食衛誌，**24**, 416-422，1983.

21) 永山敏廣，西島基弘，安田和男，他：食衛誌，**27**, 316-325, 1986.

22) 渡辺正雄：新・ミネラル栄養学，147-172, 1996，健康産業新聞社，東京.

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) Hathcock, J. N. (editor)，細谷憲政 翻訳監修：ビタミンとミネラルの安全性，87-111, 1997. 健康産業新聞社，東京.

25) 鈴木継美，和田　攻：ミネラル・微量元素の栄養学，261-507, 1994，第一出版，東京.

26) 田端節子：マイコトキシン：**47**, 9-14, 1998.

27) 上村　尚，田端節子，田村行弘，他：食衛誌，**28**, 322-329, 1987.

28) 永山敏廣，田村行弘，真木俊夫，他：東京衛研年報，**34**, 165-170, 1983.

29) 日本食品衛生学会編：食品・食品添加物等規格基準(抄)，食衛誌. 40, j-102, 1999.

30) 小林千種，中里光男，山嶋裕季子，他：東京衛研年報，**49**, 135-143, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 113-118, 1999

輸入魚醤油の衛生化学的調査
—食品添加物の含有量について—

中里光男*, 小林千種*, 山嶋裕季子*, 立石恭也*
大野郁子*, 川合由華**, 安田和男*

Hygienic Studies on Imported Fish Sause
—Contents of Food Additives—

MITSUO NAKAZATO*, CHIGUSA KOBAYASHI*, YUKIKO YAMAJIMA*, YUKINARI TATEISHI*,
IKUKO OHNO*, YUKA KAWAI** and KAZUO YASUDA*

Keywords：魚醤油 fish sauce，調味料 seasoning，保存料 preservative，甘味料 sweetener，合成着色料 artificial color，サッカリン saccharin，プロピオン酸 propionic acid，エチルアルコール ethyl alcohol

緒　　言

近年，食生活の多様化，国際化に伴い，今まで我が国では食経験のほとんどないような食品までも世界各国から輸入されるようになった．特に，最近のエスニックブームにより，世界各地の伝統食品が珍重され，その輸入が増加している．その中でも特に，東南アジア諸国や中国産の魚醤油の需要が増え続けている．

魚醤油は魚に塩を加えて発酵させたものであり，日本の大豆，小麦等を原料とする穀醤（日本農林規格での醤油）と同様にグルタミン酸等のアミノ酸類の旨味を基調とする調味料であるが，発酵に際して麹菌等を使用しない．すなわち，魚醤油の旨味は魚の内臓や肉に含まれている酵素がタンパク質を分解してアミノ酸等に変えることに由来するものである[1]．

魚醤油は東南アジア諸国では日常的な調味料として広く用いられているが，これらは中小のメーカーで家内工業的に製造されるものが多いことから，中には衛生学的に不安を抱かせるようなものもある．しかしながら，その実態について食品衛生学的に調査したデータは非常に少ない．ちなみに，最近，中国やタイ産の魚醤油から保存料のプロピオン酸が検出され，添加の有無が問題となった事例があった[2]．そこで，魚醤油について輸入品を中心に食品添加物（甘味料，着色料，保存料及びアルコール）の使用実態について調査を行うことにした．その結果について報告する．

実験の部

1．試　　料

平成９年12月から平成10年８月の間に東京都内のスーパー，デパート，一般小売店から購入した各種魚醤油55検体について調査を行った．内訳は輸入品が41検体（タイ産25検体，ベトナム産５検体，フィリピン産２検体，韓国産５検体，中国産２検体，不明２検体），国産品が14検体（「しょっつる」４検体，「いしる」４検体，その他６検体）である．

なお，試料は製造者あるいは輸入業者等の明らかなものを使用した．

2．分析法

1）甘味料

(1)サッカリン（SN）及びアセスルファムK（AK）：守安らの方法[3]に従った．

(2)サイクラミン酸（CY）：中里らの方法[4]に従った．

(3)グリチルリチン酸（GA）：大石らの方法[5]に従った．

2）合成着色料

食用赤色２号，食用赤色３号，食用赤色40号，食用赤色102号，食用赤色104号，食用赤色105号，食用赤色106号，食用黄色４号，食用黄色５号，食用緑色３号，食用青色１号，食用青色２号及び不許可合成着色料：食品衛生検査指針[6]に従った．

* 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
** 東京都立衛生研究所精度管理室

表1．魚醤油中のサッカリン，安息香酸，プロピオン酸及びエタノールの含有量

試料番号	品　名	SN(g/kg)*	BA(g/kg)	PA(g/kg)	エタノール(V/V%)	原産国	原材料
Y-01	ナンプラー	ND	ND	0.09	ND	タイ	イワシ・塩・砂糖
-02	ナンプラー	ND	0.002	0.06	ND	タイ	魚（アンチョビ）・食塩・砂糖
-03	ナンプラー	ND	0.003	0.08	ND	タイ	魚・塩
-04	シャールー	ND	0.003	0.34	ND	タイ	エビ・塩
-05	ナンプラー	ND	ND	0.25	ND	タイ	小魚・塩
-06	魚露	ND	ND	0.29	ND	タイ	魚（かたくちいわし）・水・塩
-07	ナンプラー	ND	ND	0.27	ND	タイ	かたくちいわし・塩・水
-08	魚露	ND	ND	0.27	ND	タイ	魚エキス・塩
-09	フィッシュソース	ND	0.001	0.19	ND	タイ	水・アンチョビ・塩
-10	ナンプラー	ND	ND	0.26	ND	タイ	
-11	魚露	ND	0.001	0.46	ND	タイ	魚・塩・砂糖
-12	ナンプラー	ND	0.001	0.04	ND	タイ	魚（アンチョビ）・食塩・砂糖
-13	ナンプラー	ND	0.003	0.12	ND	タイ	魚（アンチョビ）・食塩・砂糖
-14	魚露	ND	ND	0.45	ND	タイ	魚・塩・砂糖
-15	ナンプラー	ND	ND	0.19	ND	タイ	魚（かたくちいわし）・水・塩
-16	ナンプラー	ND	ND	0.08	ND	タイ	イワシ・塩・砂糖
-17	ナンプラー	ND	ND	0.12	ND	タイ	水・アンチョビ・塩
-18	ナンプラー	ND	ND	0.23	ND	タイ	かたくちいわし・塩・水
-19	ナンプラー	ND	ND	0.27	ND	タイ	かたくちいわし・塩・水
-20	ナンプラー	ND	ND	0.45	ND	タイ	魚エキス・食塩・砂糖
-21	シャールー	ND	0.003	0.50	ND	タイ	エビ・塩
-22	ナンプラー	ND	ND	0.48	ND	タイ	小魚・塩
-23	ナンプラー	ND	0.002	0.07	ND	タイ	魚・塩
-24	ナンプラー	ND	ND	0.21	ND	タイ	魚・塩
-25	ナンプラー	ND	0.004	0.29	ND	タイ	魚（かたくちいわし）・塩・水
-26	ニョクマム	ND	ND	0.06	ND	ベトナム	魚エキス・食塩
-27	フィッシュソース	ND	0.003	0.63	ND	ベトナム	魚・塩・水
-28	ニョクマム	0.13	0.002	0.13	ND	ベトナム	イワシ・塩
-29	ニョクマム	0.14	ND	0.02	ND	ベトナム	イワシ・塩・サッカリンNa
-30	ニョクマム	0.07	0.003	0.33	ND	ベトナム	魚・食塩
-31	パティス	ND	0.006	0.69	ND	フィリピン	魚・塩
-32	パティス	ND	0.006	0.50	ND	フィリピン	魚・塩
-33	アンチョビソース	ND	0.002	0.10	ND	韓国	イルコ・食塩水・アミノ酸等
-34	イワシエキス	ND	0.002	0.08	ND	韓国	イワシ・食塩
-35	エビエキス	0.02	0.002	0.11	ND	韓国	エビ・食塩
-36	イワシエキス	ND	ND	0.03	ND	韓国	いわし原液・食塩水
-37	魚醤	ND	ND	0.06	ND	韓国	かます・塩
-38	魚露	ND	0.004	0.84	ND	中国	魚・塩・水
-39	魚露	ND	0.004	0.72	ND	中国	魚・塩・水
-40	ガルム	ND	ND	0.02	ND	不明	かたくちいわし・食塩
-41	ガルム	ND	0.001	0.04	ND	不明	かたくちいわし・食塩
N-01	しょっつる	ND	ND	0.05	1.6	日本	ハタハタ・塩
-02	しょっつる	ND	0.001	0.04	ND	日本	食塩・魚
-03	しょっつる	ND	ND	0.09	1.6	日本	ハタハタ・塩
-04	しょっつる	ND	0.001	0.03	ND	日本	食塩・魚
-05	いしる	ND	ND	ND	ND	日本	いか・食塩
-06	いしる	ND	ND	0.48	ND	日本	いわし・食塩
-07	いしる	ND	ND	0.01	ND	日本	いか・荒塩
-08	いしる	ND	ND	0.01	ND	日本	さば・荒塩
-09	魚醤	ND	ND	0.64	ND	日本	小鯛（レンコダイ）・食塩
-10	魚醤	ND	0.002	0.04	3.5	日本	鮭・酵母エキス・塩
-11	魚醤	ND	0.001	0.02	3.1	日本	鮭・食塩・酒精
-12	魚醤	ND	ND	0.58	ND	日本	小鯛（レンコダイ）・食塩
-13	調味料	ND	ND	0.01	0.29	日本	いわしいしる・かつお節等
-14	調味料	ND	ND	0.03	0.30	日本	いわしいしる・かつお節等

ND：Not detected, *サッカリンナトリウムとして

3）保存料

(1)安息香酸（BA），サリチル酸（SA），ソルビン酸（SoA），デヒドロ酢酸（DHA），パラオキシ安息香酸メチル（PHBA-methyl），パラオキシ安息香酸エチル（PHBA-ethyl），パラオキシ安息香酸イソプロピル（PHBA-isopropyl），パラオキシ安息香酸プロピル（PHBA-propyl），パラオキシ安息香酸イソブチル（PHBA-isobutyl）及びパラオキシ安息香酸ブチル（PHBA-butyl）：食品衛生検査指針[7]に従った．

(2)プロピオン酸（PA）：立石らの方法[2]に従った．

4）エタノール及びメタノール

衛生試験法・注解[8]に従った．

結果及び考察

我が国に輸入される魚醤油の一般的な販売形態はほとんどビン詰めであるが，輸出にあたって，製品の変質を防止するために保存料を添加したり，いわゆる生臭さや味あるいは色調を矯正するために甘味料，着色料やその他の食品添加物が添加される可能性がある．そこで，タイの「ナンプラー」，ベトナムの「ニョクマム」，フィリピンの「パティス」等に代表される輸入魚醤油41検体について，食品添加物，特に保存料，甘味料，着色料について調査を実施することにした．特にタイ産の数が多いが，これは輸入品の市場占有率を反映しているものと思われる．原料は判明したものではイワシ及びカタクチイワシが最も多く，一部カマスやエビを使用したものもあった．

また，我が国においても地方の特産品として秋田の「しょっつる」，能登の「いしる」等の古来からの魚醤油があり，また，近年，我が国の魚醤油の需要が急増していることから，新たに魚醤油製造に参入するメーカーが増えている[9]．そこで，これらについても併せて実態調査を実施することにした．原料は判明したものでは「しょっつる」はハタハタ，「いしる」はイワシ，サバあるいはイカであった．その他のものの原料はレンコダイ，鮭，蠣エキス等であった．

また，これらの魚醤油の中には食塩のほかに，砂糖あるいはかつお節やサバ節，アミノ酸等の調味料で成分の調整を行っているものもあったが，今回分析対象にした食品添加物については，ベトナム産の「ニョクマム」1検体に甘味料のSN使用の旨の表示があるのみであった．

1．甘味料

合成甘味料については世界中で広く使用され，我が国でも許可されているSN，我が国では許可されていないが，すでに50カ国以上で許可されているAK[10]，現在，我が国では不許可添加物となっているが，中国等では今でも比較的よく使用され，我が国の検査で不許可添加物の使用による違反としてしばしば摘発されるCY[11]について調査を行った．また，天然甘味料としては漬物や調味料への使用頻度が高い甘草抽出物について，その主成分であるGAについて分析を行った．

その結果は，SNが55検体中4検体から検出されただけであり，他の甘味料はいずれの試料からも検出されなかった．SNの分析結果を表1中に示した．

SNが検出されたもののうち3検体はベトナム産の「ニョクマム」であった．そのうち添加表示があったのは試料番号Y—29の1検体のみであり，Y—28及びY—30の2検体は表示違反であった．それらの検出量はそれぞれ0.14，0.13及び0.07g/kg（ナトリウム塩として）であった．SNの醤油に対する使用基準は0.50g/kg（ナトリウム塩として）であるが，魚醤油は日本農林規格での醤油に該当しない[12]．したがって，食品衛生法では魚醤油はその他の食品の基準値0.20g/kgが適用される．しかし，いずれもその基準値を越えるものではなかった．

また，韓国産のエビを原料とした魚醤油から0.02g/kg（ナトリウム塩として）検出されたが，これも表示違反であった．この程度のSNの添加は甘味付けに使用されたというよりも味の矯正に使用したものであろうと推察される．

2．着色料

酸性タール色素はいずれからも検出されなかった．過去にも魚醤油からタール色素が検出されたという報告は見当たらないことから，タール色素使用の実態はないものと思われる．

3．保存料

保存料については我が国で使用が許可されているBA，SoA，DHA，PHBA-ethyl，PHBA-isopropyl，PHBA-propyl，PHBA-isobutyl，PHBA-butyl及びPA，また，現在我が国では許可されていないが，東南アジア，東アジア産の加工食品からしばしば検出されるPHBA-methyl[13]，さらに過去，我が国で清酒の保存料として許可されていたSAの計11種を分析対象に選び，調査を実施した．なお，検査にあたっては，これらの保存料のいくつかは動植物の生体中にも存在する可能性が高いことから，魚醤中のバックグランドを併せて調査することとし，そのため検出限界をPAを除く10種については0.001g/kgとして分析することにした．

BA及びPAの結果を表1中に示した．

BAについては輸入品の21/41検体から0.001～0.006g/kg，

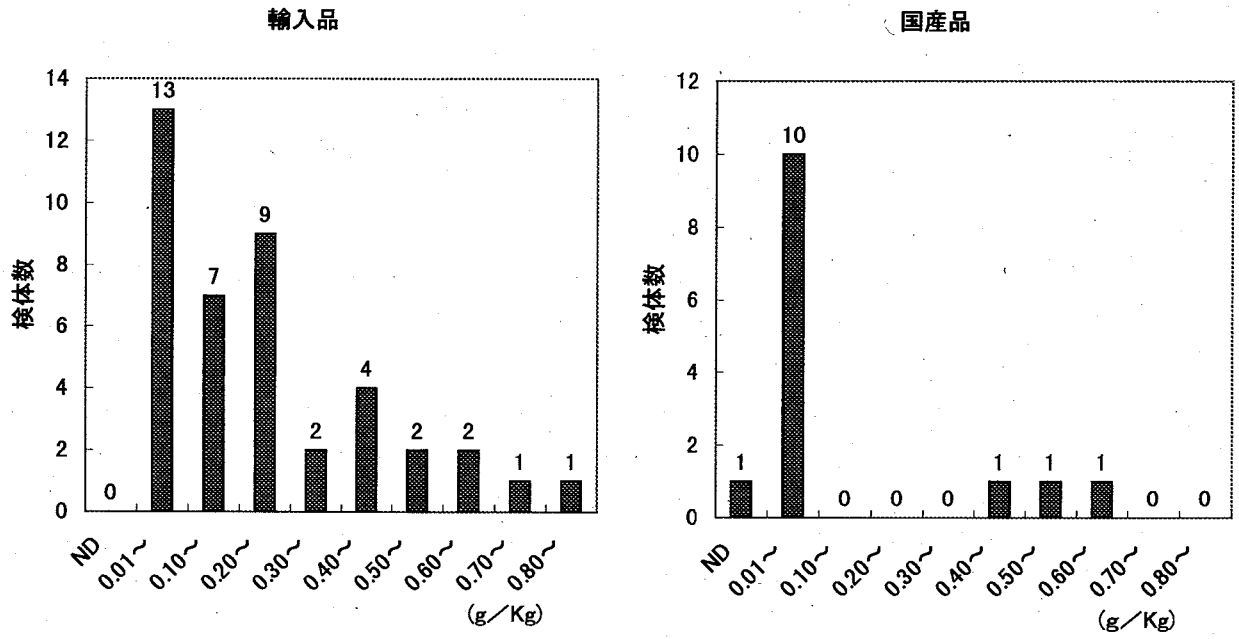


図１．輸入及び国産魚醤油のプロピオン酸の含有量別分布

また，国産品では4/14検体から0.001～0.002 g/kg検出されたが，特に生産国間での検出頻度に差は認められなかった．今回の検出量は極めて微量であることから，添加されたものではなく，製造中に発酵の副産物として生成されたものか，あるいは本来的に原料に含有されていたものと考えられる．

また，PAが輸入品の全検体から0.02～0.84 g/kg（平均0.255g/kg），国産品では13/14検体から0.01～0.64g/kg（平均0.145g/kg）検出された．図１に輸入品及び国産品の含有量別の分布を示した．

輸入品では13検体，約32%が0.01～0.10g/kg未満，同じく16検体が0.10～0.30 g/kg未満，6検体が0.30～0.50g/kg未満であった．また，0.50g/kg以上と比較的高濃度のPAが検出されたものも６検体あり，個々の含有量に大きな差があった．

また，国別ではタイ産（25検体）が0.04～0.50g/kg，ベトナム産（５検体）は0.02～0.63g/kgであり，一方，フィリピン産は２検体で0.50及び0.69g/kgと比較的高濃度の含有量であった．韓国産（５検体）は0.03～0.11g/kgと比較的低い傾向にあったが，中国産は２検体で，0.72と0.84g/kgと最も高い含有量を示し，国別の分類でも含有量に大きな差が認められた．また，古代ギリシャの製法を模倣して製造したとされる「ガルム」２検体のPA含有量は0.02及び0.04g/kgであった．これらのうちPAが0.50 g/kg以上検出されたものについて輸入業者を通じてその使用の有無について調査を行ったが，いずれもPAを添加した事実はないとの回答を得た．

一方，国産品では11/14検体，約80%がND～0.10g/kg未満であり，輸入品と比べ含有量の少ないものが多かった．しかし，0.40g/kg以上の含有量を示したものも３検体あり，国産品の中にも高含有量のものがあることが判明した．３検体の内訳は，いわしを原料にした「いしる」が１検体で含有量は0.48g/kg，他の２検体は同一メーカーの新製品であり，原料等の組成も同じものであった．含有量は0.58及び0.64g/kgであった．これらの試料についても使用の有無について調査を行ったが，いずれもPAは使用していないとのことから，製造中に生成した可能性が示唆された．

我が国でPAの使用基準が設定されている食品は，チーズ，パン及び洋菓子のみであるため，魚醤油から検出された場合は対象外使用となる．

一方，諸外国での許可状況は一部の国を除いて不明な点が多いが，ビスケット，醤油，酢，ソース，マヨネーズ，ジャム等に使用を許可している国もある[14]．しかし，東南アジア諸国の許可状況は今のところほとんど把握されていない．中国[15]については醤油，酢への添加を許可していることから，魚醤油への添加の可能性もあると思われる．

魚醤油中の有機酸は本来，アミノ酸や核酸と共にうま味成分の一つと考えられている．藤井ら[16]は市販の「しょっつる」４検体中の有機酸組成について調査を行っているが，２検体からプロピオン酸が0.013及び0.052g/L検出されたことを報告している．今回の調査では「しょっつる」は４検体について調査を実施したが，含有量は

0.03～0.09g/kgであり，藤井らの値と大差のないものであった．また，藤井ら[17]は腐敗した「しょっつる」の化学成分についても調査しており，生菌数の増加と共に，VBN，トリメチルアミンが正常品よりも高い濃度で検出され，また，揮発性酸が著しく増加していたと報告している．その時のPAは0.151g/Lであったと述べており，これら揮発性酸の増加は腐敗の悪臭の一因となているのではないかと推測している．さらに，分離菌株をVBN及びトリメチルアミンの増加を指標として検討した結果，主要腐敗原因菌として*Halobacterium*を見いだし，また，副次的に*Streptococcus*等が関与していたと報告している[18, 19]．しかし，PAとの因果関係については明らかにしていないが，これも微生物の関与によって生成したものであろうと推定している．

今回の調査では輸入品，国産品とを問わず相当高濃度のものも発見されたが，「ナンプラー」や「パティス」等についてのPA含有量について調査した報告はほとんど見られない．わずかに藤井ら[20]が「パティス」の化学組成について検討しており，PAはイソ酪酸とのトータル値で0.06g/Lであったと述べている．これらについても微生物の作用によって生成したものと考えられ，今後，微生物学的な検討が必要であると思われる．

その他の保存料についてはいずれの検体からも検出されなかった．

4．エタノール及びメタノール

エタノールが酵母によるアルコール発酵によって大量に生成されることはよく知られている．そのため通常の醸造においても，酵母の関与が認められればエタノールが検出される例は多い．

醤油（穀醤）にも２～４%のアルコールが含まれており，これらは味や香りに寄与していると同時に醤油の保存性を高めるための効果もある[12, 21]．また，日本農林規格には濃口醤油及び淡口醤油の特級にアルコール分として各々0.8及び0.7%以上を含有することと規定されている[12]．したがって，保存を目的にエタノールが添加される可能性もある．この場合，発酵の過程で生成したものか，あるいは添加したものかの判断は困難である．しかし，「しょっつる」や「いしる」，あるいは外国産の魚醤油のエタノール含有量についての実態はほとんど調べられていない．また，製造中に係わる微生物の種類も多岐にわたることからその副産物として有害性物質であるメタノールが生成される可能性もある．

そこで，保存料調査の一環としてエタノールを，また，有害性物質としてメタノールの含有量についても併せて調査を行った．

メタノールはいずれの試料からも検出されなかった（定量限界：20mg/L）．また，エタノールは輸入魚醤油からは検出されなかったが（定量限界：0.02v/v%），国産品からは表１に示したように6/14検体から検出された．検出した試料は「しょっつる」が２検体（1.6及び1.6v/v%）新製品が４検体（0.29，0.30，3.1及び3.5v/v%）であった．

今回の調査で，輸入魚醤油からメタノール及びエタノールは全く検出されなかったことから，少なくとも東南アジア産については，従来からの製造方法で製造するかぎりこれらが多量に生成することはないと考えられる．しかし，国産品ではエタノールが検出されるものがあり，添加された疑いがもたれたが，「しょっつる」については使用していないとのことであった．

遠藤ら[22]はブナ鮭を魚醤油製造の原料にすることを提案し，その際，酵素力の不足を補うために醤油麹を添加すると，わずかではあるがエタノールも生成したと報告している．したがって，国産品から検出されたエタノールは製造法の違いによって生成された可能性もある．しかし，今回，エタノールが検出された製品の製造法については不明であり，国産のものについては，今後さらに検討の必要がある．

まとめ

輸入及び国産魚醤油中の食品添加物の使用実態調査を実施した．

１．甘味料ではSNが4/55検体，ベトナム産の「ニョクマム」３検体及び韓国産のエビを原料にした魚醤油１検体から検出された．これらの中の３検体にはSN添加の旨の表示がなかった．また，CY，AK及びGAは検出されなかった．

２．合成着色料はいずれからも検出されなかった．

３．保存料ではPAがすべての検体から検出され，その含有量は0.01～0.84g/kgであった．これは保存料として添加されたものではなく，おそらく製造工程中で生成したものと推察された．その他BAが極くわずか検出されたが，これは本来的に原料に含有されていたものであると考えられた．SoA，DHA，SA及びPHBA-エステル類は検出されなかった．

４．エタノールは輸入魚醤油からは検出されなかったが国産品6/14検体から0.29～3.5 v/v%検出された．これらの添加の有無については現在調査中である．なお，メタノールはいずれの試料からも検出されなかった．

文　献

1）太田静行：魚醤油の知識，52-67, 1996，幸書房，東京.

2）立石恭也，中里光男，小林千種，他：東京衛研年報，**49**, 77-83, 1998.

3）守安貴子，中里光男，小林千種，他：食衛誌．**37**, 91-96, 1996.

4）中里光男，斉藤和夫，石川ふさ子，他：食衛誌．**34**, 248-253, 1993.

5）大石充男，竹内正博，大西和夫，他：*Chromatography*, **15**, 141-146, 1994.

6）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，食品中の食品添加物分析法，142-166, 1989，日本食品衛生協会，東京.

7）厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針，追補Ⅰ，食品中の食品添加物分析法，335-342, 1993．日本食品衛生協会，東京.

8）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990, 122-123, 1996, 金原出版，東京.

9）健康産業新聞社編集部編：食品と開発，**34**(1), 25-29, 1999.

10）守安貴子，斉藤和夫，中里光男，他：食衛誌．**34**, 277-282, 1993.

11）小林千種，中里光男，山嶋裕季子，他：第34回全国衛生化学技術協議会年会講演集：84-85, 1997.

12）福場博保，小林彰夫編：調味料・香辛料の事典，196-224, 1991，朝倉書店，東京.

13）大塚完二郎：日本食品衛生学会公開シンポジウム「今食品は安全か？」講演要旨集，13-17, 1998.

14）金山龍男：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

15）川端俊治，劉　志誠：別冊フードケミカル６，世界の食品添加物，33-39, 189-206, 1994．食品化学新聞社，東京

16）藤井健夫，新国佐幸，飯田　遙：食工誌．**39**, 702-706 1992.

17）藤井健夫，酒井久夫：日水誌．**50**, 1067-1070, 1984.

18）藤井健夫，酒井久夫：日水誌．**50**, 1593-1597, 1984.

19）藤井健夫，酒井久夫：日水誌．**50**, 1599-1604, 1984.

20）藤井健夫，Bambang Basuki, S，戸沢晴巳：日水誌．**46**, 1235-1240, 1980.

21）井上　喬：やさしい醸造学，273-289, 1997，工業調査会，東京.

22）遠藤浩志，大野正博：福島県ハイテクプラザ試験研究報告：207-211, 1997.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 119-123, 1999

ファーストカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる濃縮果汁中の防かび剤の分析

小沢秀樹, 広門雅子, 井部明広, 島村保洋
中島和雄, 木村圭介, 安田和男

Determination of Fungicides in Fruit Juice Coucentrates by High Performance Liquid Chromatography equipped with the Fast Column

HIDEKI OZAWA, MASAKO HIROKADO, AKIHIRO IBE, YASUHIRO SHIMAMURA, KAZUO NAKAJIMA, KEISUKE KIMURA and KAZUO YASUDA

A high performance liquid chromatographic (HPLC) method using the C18 fast column is described for determining the fungicide (*o*-phenylphenol, OPP ; diphenyl, DP ; thiabendazole, TBZ ; and imazalil, IMZ) residues in fruit juice concentrates. Fungicides were extracted with ethyl acetate, and then OPP and DP were partitioned into ethyl acetate, and TBZ and IMZ were distributed into 0.05N sulfonic acid solution. Each fraction was quantified by HPLC equipped with C18 fast column (3 μ m, 4.6mm i.d. x 100mm) using acetonitrile-methanol-0.025M sodium dodecyl sulfate (SDS) aquaous solution pH 2.5 (45 : 15 : 40) as a mobile phase. For analysis, we could take data within 10 min by using the fast column. This allowed us to reduce the amount of organic solvents used as a mobile phase. Recoveries from fruit juice concentrates were between 81.4 and 105.9 % and relative standard deviations of samples were between 0.3 and 4.5 %.

Keywords：オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol, ジフェニル diphenyl, チアベンダゾール thiabendazole, イマザリル imazalil, 濃縮果汁 fruit juice concentrates, ファーストカラム fast column, 高速液体クロマトグラフィーHPLC

緒　　言

現在，我が国では食品衛生法に基づき，柑橘類の防かび剤としてOPP，DP，TBZ及びIMZの４種類が許可されており，その使用基準は，DPが0.070g/kg，OPP及びTBZが0.010g/kg，IMZが0.0050g/kgとなっている．これらの防かび剤は、柑橘類を原料にして果汁を作る際，製造方法によっては果汁中に混入してくる可能性があり，それらの残留量をモニタリングしていくことは重要である．

これまでに，柑橘類中の防かび剤の分析法については多くの報告[1-4]があるが，濃縮果汁に対する分析法の報告[4,5]は少なく，しかも，その系統的分析法の報告は見あたらない．そこで，我々は，濃縮果汁中の４種の防かび剤（OPP, DP, TBZ及びIMZ）のHPLCによる系統的分析法を検討した．また，HPLCカラムに逆相系C18ファーストカラムを用いることにより，分析時間の短縮及び移動相に用いる有機溶媒の使用量の低減を試み，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1．試　　料

業務用濃縮果汁（レモン，グレープ，オレンジ，グレープフルーツ及び洋なし）を用いた．

2．試　　薬

(1) OPP，DPは和光純薬工業㈱製試薬特級，TBZは同社製食品添加物試験用及びIMZは同社製残留農薬試験用試薬を用いた．

(2) OPP, DP, TBZ, 及びIMZの混合標準溶液は以下に示す２種類をメタノールを用いて調製した．

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

① OPP及びTBZ：10μg/ml；DP及びIMZ：100μg/ml.
② OPP及びTBZ：1μg/ml；DP及びIMZ：10μg/ml.

(3)液相分離用ろ紙（1PS，ワットマン㈱製）は溶媒の脱水に，ナーゲル社製スティックpH試験紙（#92120, pH 4.5-10.0）はpHの確認に用いた.

(4)アセトニトリル及びメタノールは和光純薬工業㈱製HPLC用を用いた.

(5)その他の試薬は和光純薬工業㈱製試薬特級を用いた.

3．装　　置

高速液体クロマトグラフ（HPLC）：日本分光工業㈱製PU-1580型ポンプ，UV-1570 紫外／可視部吸収検出器，AS-950-10 型インジェクター，CO-965 型カラム恒温槽，㈱島津製作所製RF-535型蛍光検出器及びDGU-12A型デガッサーにより構成したものを用いた．なお，紫外部吸収検出器と蛍光検出器は流路を直列に接続して用いた．データ処理にはJASCO BORWIN-NTクロマトデータ処理プログラム（日本分光工業㈱，ver.1.5）を用いた.

4．試験溶液の調製

試料10gを水30mlに混和し，トリスヒドロキシアミノメタン5 gを加えてpHをアルカリ性にした（Fig. 1）．その後，中里らの方法[3]に準じて試験溶液を調製した．すなわち，このアルカリ性果汁液試料を酢酸エチルで抽出し，水50mlで洗浄した後，0.05N硫酸溶液で分配した．酢酸エチル層は，液相分離用ろ紙を用いて脱水し，DPの揮散を防ぐためn-ブタノール2.5ml添加後，減圧濃縮（35℃，80mmHg）した．これをメタノールで10mlとし，OPP及びDP測定用の試験溶液とした（フラクションA：Fr. A）．一方の0.05N硫酸溶液で分配した溶液は，5N NaOHにてアルカリ性（スティックpH試験紙を使用）とした後，酢酸エチルに転溶し液相分離用ろ紙で脱水し濃縮乾固した．残留物をメタノール5 mlに溶解し，TBZ及びIMZ測定用の試験溶液とした（フラクションB：Fr. B）.

5．HPLC分析条件

カラム：ファーストカラムCapcell PAK UG 120 C18（粒径3 μm，4.6mm i.d. x 100mm；㈱資生堂製），移動相：アセトニトリル・メタノール・0.025M ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液（りん酸でpHを2.5に調整したもの）45：15：40，流速：0.8ml/min，カラム温度：40℃，検出波長：(1)OPP, DP及びTBZ；蛍光（Ex.285 nm, Em.325 nm），(2)IMZ；紫外部吸収（UV220 nm），注入量：10 μl.

6．添加回収実験

あらかじめ防かび剤が検出されないことを確認した濃縮果汁10gをとり，防かび剤混合標準溶液①あるいは②を100μl添加し，以下Fig. 1に従って操作して添加回収実験を行い回収率を求めた.

結果及び考察

1．HPLC 条件の検討

中里らの方法[3]は一回の分析に30分程度要するため，カラムを変えることにより時間短縮を試みた．カラムは充填剤の粒径が3 μmと従来品より細かく，かつ分離が良いと言われているファーストカラムの適用を検討した．中里らの用いた移動相の条件では，UVクロマトグラム上におけるIMZとDPのピークが近接した．このため，移動相の各溶液の比率を再検討し，アセトニトリル・メタノール・0.025M SDS溶液（pH2.5）の比率が45：15：40のとき，TBZ，OPP，DP及びIMZの保持時間はそれぞれ2.9，3.4，7.3及び8.1minと良好な分離が得られた．この結果，一回の分析時間を10分に短縮することができ，移動相に用いる有機溶媒の使用量も中里らの方法[3]の1/3に低減することができた.

2．検量線及び検出限界

OPP, DP, TBZ及びIMZは10μg/ml以下の範囲において原点を通る良好な直線性を示した（r=0.999）.

また，本法における検出限界はOPP は5 ppb, DP は30 ppb, TBZは3 ppb及びIMZは50 ppbであった.

3．試験溶液の調製法の検討

TBZをHPLCによって分析する方法として，Bushway[4]により濃縮果汁をメタノール・水（75：25）混液に混和させ，直接これをカラムに注入し分析する方法が報告されている．しかし，この方法では，IMZに対してはUVクロマトグラムにおける妨害ピークのため適用できなかった．そこで，今回，我々は以下の方法を検討した．濃縮果汁は非常に粘稠なため，はじめに水で希釈した後酢酸エチルで抽出した．その際，エマルジョンの形成を防ぐため希釈濃縮果汁と酢酸エチルの体積比を１：２とした．次に抽出率に及ぼすpHについて検討した．pH 1～12においてOPP及び DP はpH依存性は無いが，TBZ及び IMZはpH 6 ～ 7 より酸性側では抽出率が低下することが分かっている[6]．そこで，抽出はアルカリ性下で行った．これまでに柑橘類での防かび剤分析時に試料をアルカリ性に調整する場合，無水酢酸ナトリウム[3]，アンモニア[2]あるいはNaOH[1,6]等を用いる方法が報告されている．しかし，レモンのようなpHの低い試料に対しては，酢酸ナトリウムあるいはアンモニア等を用いてのpH調整は不十分であり，また，NaOHのような強アルカリではpHが急激に上がるため調整が困難であった.

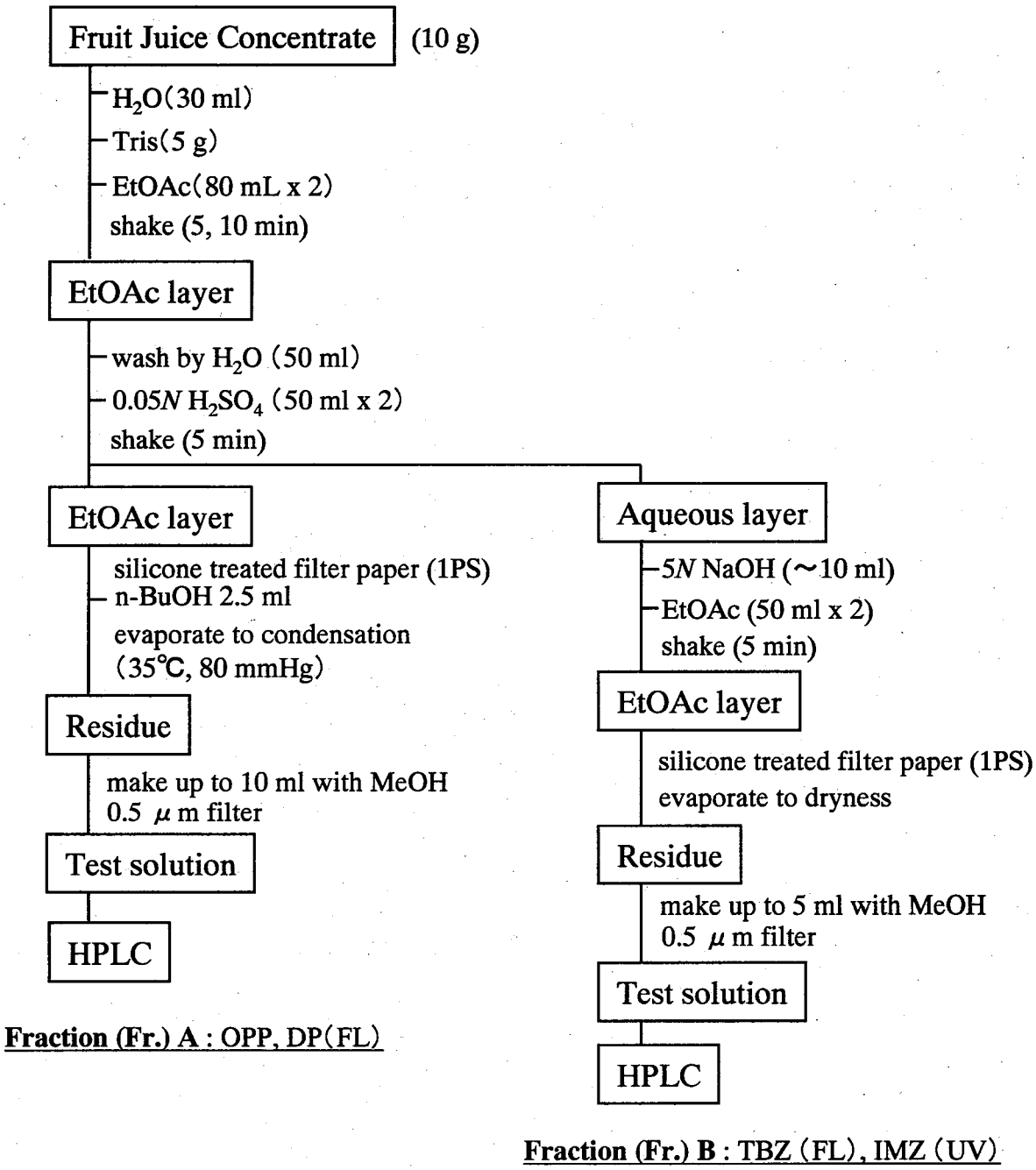


Fig. 1. Schematic diagram for determination of OPP, DP, TBZ and IMZ.

そこで，著者らは，希釈濃縮果汁（濃縮果汁10 g ・水30ml）に対し5 gのトリスヒドロキシアミノメタン（トリス）を使用することで，レモンではpH2をpH8に，またオレンジではpH4をpH10に調整することができた．さらに，脱水に用いられている無水硫酸ナトリウムのかわりに，簡便な液相分離用ろ紙の適用を検討したところ，脱水も十分であり，また，防かび剤の吸着もなく良好な結果が得られた．

4．添加回収率

レモン，グレープ，オレンジ，グレープフルーツ及び洋なしの濃縮果汁を用いて添加回収試験を行った．濃縮果汁10gに対しOPP及びTBZを各0.1 μg/g, DP及びIMZを各1.0 μg/gあるいはOPP及びTBZを各0.01 μg/g, DP及びIMZを各0.1 μg/gになるように混合標準溶液を添加し，本法に従って回収率を求めた．その結果，いずれの試料の場合にも，液体クロマトグラム上には防かび剤に対する妨害ピークは認められなかった．回収率はTable 1に示したとおり，81.4～105.9%（CV：0.3～4.5%）と良好な結果が得られた．レモン及びオレンジの濃縮果汁に対し，OPP及びTBZを各0.01 μg/g, DP及びIMZを各0.1 μg/gになるように標準溶液を添加したときのHPLCクロマトグラムをFig. 2に示した．また，オレンジ果汁

Table 1. Recoveries of OPP, DP, TBZ and IMZ spiked into Fruit Juice Concentrates at the levels of 1.0 or 0.1 μg/g (DP, IMZ) and 0.1 or 0.01 μg/g (OPP, TBZ)

Bulk Juices	Added (μg/g)	Recovery (%)			
		OPP	DP	TBZ	IMZ
Lemon	1.0	——	90.5 (2.6)	——	93.3 (2.1)
	0.10	90.2 (1.7)	94.1 (2.2)	94.1 (1.1)	90.9 (2.7)
	0.010	88.6 (2.4)	——	92.2 (1.4)	——
Grape	1.0	——	91.2 (2.2)	——	86.8 (1.1)
	0.10	86.8 (0.8)	85.7 (1.0)	88.0 (2.2)	85.1 (1.1)
	0.010	88.5 (2.3)	——	87.7 (2.3)	——
Orange	1.0	——	88.7 (2.3)	——	91.1 (1.8)
	0.10	82.6 (0.6)	81.6 (0.6)	90.7 (2.4)	85.9 (1.7)
	0.010	84.2 (2.0)	——	81.4 (0.7)	——
Grape Fruit	1.0	——	89.5 (1.9)	——	96.1 (1.9)
	0.10	83.4 (0.3)	100.1 (2.4)	92.5 (1.6)	92.5 (0.8)
	0.010	86.5 (2.4)	——	86.5 (2.3)	——
Pear	1.0	——	95.2 (4.1)	——	96.4 (2.9)
	0.10	88.8 (1.9)	95.1 (4.4)	100.3 (2.5)	95.6 (3.5)
	0.010	89.5 (4.5)	——	105.9 (3.6)	——

n = 3; ( ): CV %; —— : not tested.

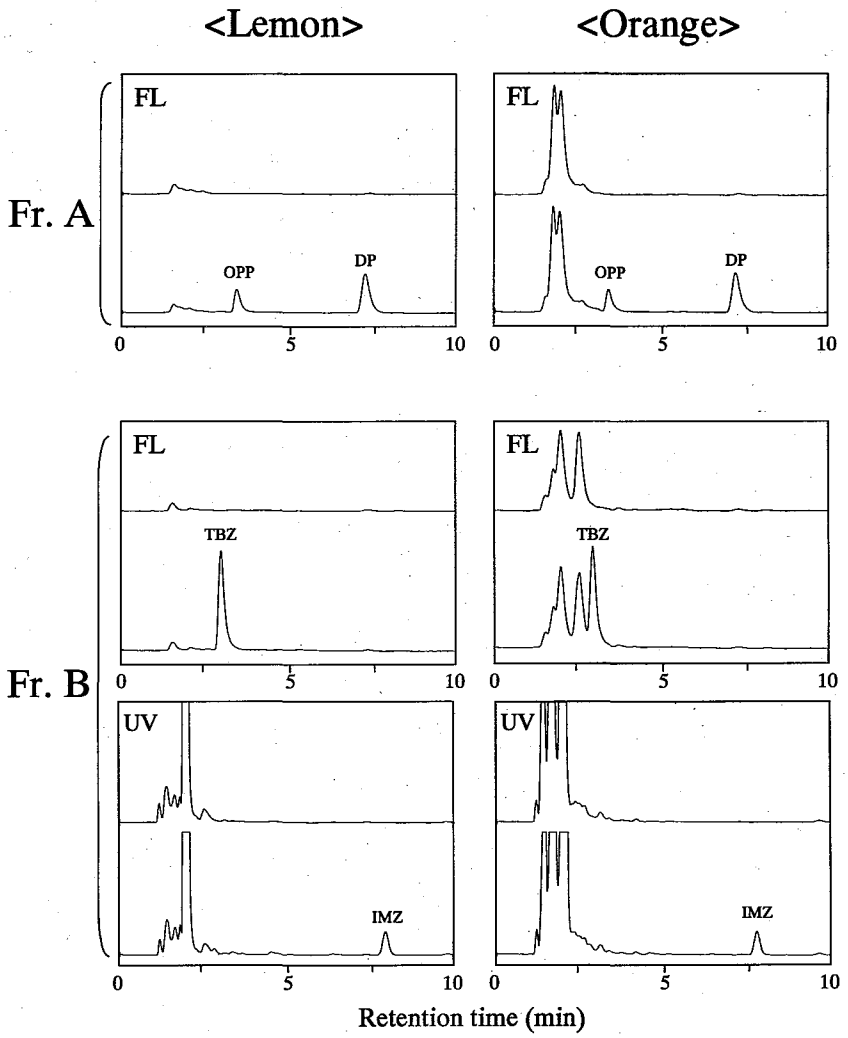


Fig. 2. HPLC Chromatograms of OPP, DP, TBZ and IMZ spiked into Orange or Lemon Juice Concentrates at the levels of 0.1 μg/g (DP, IMZ) and 0.01 μg/g (OPP, TBZ). Upper profile : unspiked, fluorescence emission at 325 nm. Fr, A, B : see Fig. 1

については，FLクロマトグラム上においてTBZに近接するピークが存在したが，TBZを低濃度の0.01 μg/g添加した場合においてもTBZの定量値への影響は認められなかった（Fig. 2, Orange, Fr. B, FL）．

まとめ

HPLCによる濃縮果汁中の防かび剤（OPP，DP，TBZ及びIMZ）の系統的分析法を検討した．濃縮果汁中の4種の防かび剤はアルカリ性下酢酸エチルで抽出し，OPP及びDPは酢酸エチルに，TBZ及びIMZはさらに0.05N硫酸溶液に分配した後，C18ファーストカラム（粒径3 μm, 4.6mm i.d. x 100mm）で移動相にアセトニトリル・メタノール・0.025M SDS溶液（pH 2.5）（45：15：40）を用いてHPLCで分析した．従来のカラム（粒径5 μm, 長さ250mm）に比較し，ファーストカラムを用いることにより分析時間を30分から10分に短縮することができ，移動相に用いる有機溶媒の使用量も低減することができた．濃縮果汁へ4種の防かび剤を添加したときの回収率は81.4-105.9%，変動係数は0.3-4.5%と良好な結果が得られた．

文　献

1）川原章弘，山田真記子，加藤善昭，中村幹雄，西島基弘，伊藤誉志男：*Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, **163**, 104-110, 1995.

2）茶谷裕行，近本武次，棟久美佐子，足立透，小松正幹：食衛誌，**37**, 187-194, 1996.

3）中里光男，只野敬子，小川仁志，牛山博文，川合由華，小林千種，立石恭也，田村行弘：衛生化学，**41**, 392-397, 1995.

4）Bushway, R. J.: *J. Chromatogr.A*, **754**, 431-435, 1996.

5）Bushway, R. J., Brandon, D. L., Bates, A. H., Li, L., Larkin, K. A. and Young, B. S.: *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1407-1412, 1995.

6）小川正彦，坂井　亨，大熊和行，佐藤　誠，志村恭子：三重衛生年報, **42**, 111-117, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 124-129, 1999

FPD/GCによる野菜中の有機リン系農薬の一斉分析法

佐藤　寛*, 大橋則雄**, 天川映子*, 荻原　勉*
鎌田国広***, 鈴木助治*

Simultaneous Determination of Organophosphorous Pesticide Residues in Vegetables by FPD/GC

HIROSHI SATOH*, NORIO OHASHI**, EIKO AMAKAWA*, TSUTOMU OGIWARA*,
KUNIHIRO KAMATA*** and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：残留農薬pesticide residue, 野菜vegetable, 有機リン系農薬organophosphorous pesticide, 相対保持指標retention index, ガスクロマトグラフィーgas chromatography

緒　言

有機リン系農薬は，分子内にP=S基を有する場合に硫黄が酸化的に代謝されて酸素置換したオキソン体を生成するといわれており，著者らは，すでに野菜及びその加工品からジメトエートの酸化体であるオメトエートやプロチオホスのオキソン体を検出した事例について報告[1]した．オキソン体は，原体よりコリンエステラーゼ阻害活性が強いため，食品の安全性確保の観点から原体と同時に分析を行うことが重要である．平成10年度の食品衛生法では唯一イソフェンホスがオキソン体を同時に定量するように定められている．また，同法では有機リン系農薬の分析法を水溶性の高い農薬や低い農薬，さらにオキソン体等について5種類の分析法に分け,それぞれに用いる抽出溶媒や精製カートリッジを個々に規定するなど複雑な方法を採用している[2]．オキソン体の分析についてはアセトニトリル溶媒抽出法を用いたGC/MSによる分析報告[3]があるが，今回，我々は有機リン系農薬のオキソン体や代謝物の同時分析を目的とし，酢酸エチル溶媒抽出及びケイソウ土カラム固相抽出を用いてリン検出器付きガスクロマトグラフ（FPD/GC）により定性定量を行う一斉分析法について検討した．まず,対象農薬の効率的な定性確認を目的として，3種類のキャピラリーカラムについて保持指標基準物質[4-6]を用いた39種の有機リン系農薬及び9種のオキソン体についてFPD/GCによる相対保持指標値（programmed temperature retention index：PTRI）を作成した．さらに，38種の有機リン系農薬及び7種のオキソン体について酢酸エチル溶媒抽出及びケイソウ土カラム固相抽出による一斉抽出法及び農薬の同時精製に有効なミニカラム[7]の適用性について検討したので，その結果を報告する．

実験方法

1．試　料

淡黄色野菜としてキヤベツ，緑黄色野菜としてほうれんそうを購入し，添加回収用試料として用いた．

2．試　薬

1）農薬標準品：和光純薬工業㈱，林純薬工業㈱,関東化学工業㈱，ジーエルサイエンス工業㈱，Riedel-de-Haen社製の残留農薬標準品を用いた．

2）農薬標準原液：表1に示した各農薬の標準品50 mgをアセトンに溶かし50mlとした．α-CVP，β-CVPは和光純薬工業㈱製の100ppm溶液を用いた．

3）農薬標準1 ppm溶液：各標準原液をアセトンで1000倍に希釈して調製した．この各標準溶液はPTRIの測定に用いた．

4）農薬標準1 ppm混液：各標準原液を用いてアセトンで1 ppm混液となるように調製した．

5）農薬標準4 ppm混液：HP-1のカラムで得たPTRIが重ならないように，48種の農薬を以下のように3グループ（A，B，C）に分類してアセトンで4 ppm混液を調製した．これらの標準混液は添加回収試験に

＊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環境保健部環境衛生研究科
＊＊＊東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科

用いた．ただし，イソフェンホスオキソン，イソキサチオン，同オキソンについては，試薬の安定性や量不足のため標準4 ppm混液の調製より除いた．

グループA, B, Cの農薬標準品は表1の化合物番号を以下に示した．

A：1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 43, 46

B：2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 32, 35, 38, 41, 44, 47

C：3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48

6）保持指標基準物質溶液：HNU-Nordion社製 M-Series（M5～20,22の17種の混合物で化学式 $(CF_3)_2$-PS-$(CH_2)_nCH_3$）2.5×10^{-4}Mを使用時にヘキサンで100倍に希釈して用いた．

7）ケイソウ土カラム：メルク社製Extrelut 20.

8）精製用ミニカラム：スペルコ社製Supelcosil ENVI-Carb/NH_2（500mg）.

9）その他の試薬は，すべて残留農薬試験用を用いた．

3．装　　置

ガスクロマトグラフ：ヒューレットパッカード（HP）社製 HP 5890 II（FPD/GC）.

4．GC分析条件

カラム：①HP-1，②HP-5，③HP-1701（30m×0.25mm i.d, 膜厚0.25μm, HP社製），カラムヘッド圧：12psi，カラム温度：60℃（2min）-（10℃/min, 昇温）-290℃（3min），注入口温度：220℃，検出器温度：250℃，スプリット比：スプリットレス，パージオンタイム：1min，キャリヤーガス及び流量：He1～2ml/min，メイクアップガス：He30ml/min，空気流量：100ml/min，水素流量：75 ml/min，検出器：FPD.

5．PTRIの作成

PTRIについては，窒素系及びカーバメイト系農薬について田村らの報告があり，その算出法に準じた[6]．48種の農薬標準1 ppm溶液及び保持指標基準物質溶液をGC分析条件で測定し，極性の異なるHP-1，HP-5及びHP-1701のカラムにおけるPTRIを求めた．

6．試験溶液の調製

1）アセトン処理　野菜試料を細切し，その50 gにアセトン100mlを加え，10,000rpmで5分間ホモジナイズし，吸引ろ過した．残査をアセトン50mlで洗浄し，同様にろ過後，これらのろ液を合わせアセトンで正確に200mlとした．野菜20gに相当する80mlを正確に取り，これに農薬標準4 ppm混液1 mlを添加後，40℃以下でアセトンを減圧留去し，その濃縮液を溶媒抽出及び固相抽出の試料溶液とした．

2）酢酸エチルによる溶媒抽出　試料溶液の全量を塩化ナトリウム（NaCl）10g，水50mlを加えた分液漏斗に移し酢酸エチル100ml，次いで50mlで抽出を行った．これらの酢酸エチル層を分取して合わせ無水硫酸ナトリウム10gを加えて脱水後，40℃以下で酢酸エチルを乾固しないように減圧濃縮し，酢酸エチルで2 mlとしたものを粗抽出液とした．

3）Extrelut 20による固相抽出　試料溶液の全量にNaCl 2gを加えて溶解し，Extrelut 20へ負荷して10分以上放置後，酢酸エチル150mlで溶出した．溶出液は溶媒抽出と同様に減圧濃縮し，酢酸エチルで2 mlとしたものを粗抽出液とした．

4）ミニカラムによる精製　溶媒抽出及び固相抽出より調製した粗抽出液1 mlを窒素ガスを用いて濃縮乾固し，アセトニトリル-トルエン（3：1）1 mlに溶解後，予め同液で洗浄したENVI-Carb/NH2カラムに負荷し，アセトニトリル-トルエン（3：1）25mlで溶出した．溶出液を減圧濃縮後，同液で1 mlとしたものを精製液とした．

得られた粗抽出液と精製液について，各々GCにより測定した．

7．GCによる定性及び定量

溶媒抽出と固相抽出により得られた粗抽出液及びミニカラム処理により得られた精製液について，GC分析条件でそれぞれ1 μlを注入して測定し，ピークの保持時間（Rt）とピーク面積より農薬の定性及び定量を行った．

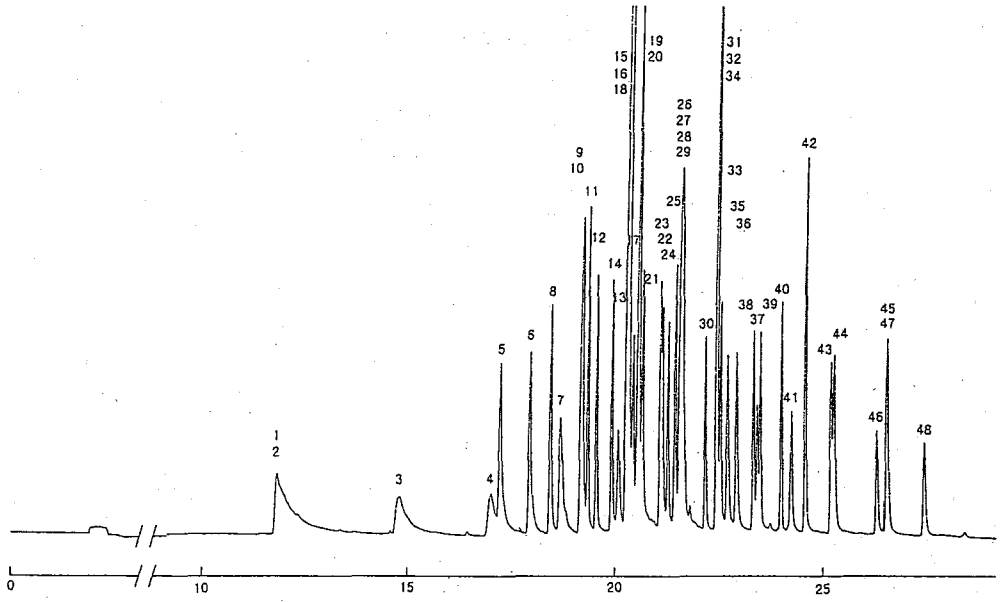
8．添加回収試験

「6．試験溶液の調製，1）アセトン処理」の項にしたがって野菜試料20gに相当するアセトン処理液80mlにA，B，Cの農薬標準4 ppm混液を1 ml添加した．以下同様に試料溶液を調製して溶媒抽出及び固相抽出によりA，B，Cのグループ毎に3回ずつ回収試験を行った．

結果及び考察

1．PTRIの検討

今回，実試料の分析において微量の有機リン系農薬の定性確認を容易にするために，保持指標基準物質を用い，3種類のキャピラリーカラムにおけるPTRIを算出した．なお，図1に48種の農薬標準1 ppm混液の代表的なクロマトグラムを示した．PTRIを求めるには対象農薬に近接した保持指標基準物質で測定した方が誤差が少なく，再現性も良いため，17種類の混合物を利用した．表1に3種類のカラムの保持時間及びPTRIを示した．48種の有機リン系農薬はHP-1, HP-5, HP-1701のキャピラリーカラムを用いることにより，対象農薬を全て分離し定性



保 持 時 間 （ 分 ）

図1．48種類の有機リン系農薬のガスクロマトグラム
カラム：HP-1，ピーク No.：表1の化合物No.

確認することが可能であった．例えば表1のNo. 17, 18（以下同様に化合物番号を記す）はHP-1ではRtが近いがHP-1701では分離し，No. 35, 36はHP-1701ではRtが同じであったがHP-1, HP-5では分離していた．Rtで0.1分の差があればPTRIは10以上の差があり，分離可能であった．こまつなやベカナでEPNが検出された粗抽出液に保持指標基準物質を添加して測定した結果，PTRIはほぼ一致したことから，今回作成したPTRIを利用することで食品由来成分や他の農薬との誤認を防ぐことが可能となり，一斉スクリーニングに適用できることが確認された．

なお，水溶性の高いメタミドホス（農薬No. 1，以下同様に化合物番号を記す），アセフェート（No. 3），オメトエート（No. 4）のピーク形状は，HP-1701が最も良好であり，検量線の直線性も改善することができた．しかし，HP-1701ではRtが保持指標基準物質のそれより大きくなる農薬も一部に認められた．

2．溶媒抽出及び固相抽出による回収率

溶媒抽出及び固相抽出により得られた粗抽出液の回収率の結果を表2に示した．

溶媒抽出　粗抽出液において，キャベツでは，回収率が74～122%を示した農薬は45種中43種，ほうれんそうでは，回収率が70～137%を示した農薬は45種中40種であった．水溶性の高いメタミドホス（No. 1），アセフェート（No. 3）はキャベツ及びほうれんそうで回収率が40%程度と低く，EDDP（No. 44）はほうれんそうで45%であった．

固相抽出　粗抽出液において，キャベツでは，アセフェート（No. 3）が168%を示した以外は44種の農薬全てが85～124%の回収率を示した．水溶性の高いメタミドホス（No. 1），アセフェート（No. 3）においても良好な回収率であった．ほうれんそうでは回収率が62～118%を示した農薬は45種中40種であったが，ホルモチオン（No. 13），ブタミホスオキソン（No. 35），EPN（No. 47）は各々52%，53%，57%，クロルピリホスオキソン（No. 25），EDDP（No. 44）は各々30%，34%と低い回収率であり，野菜の種類により差が認められた．

以上，溶媒抽出及び固相抽出は，いずれも分析対象とした45種の有機リン系農薬の一斉分析に使用でき，実際のルーチン分析に適用できると考えられる．特に水溶性の農薬については，キャベツ，ほうれんそう共に固相抽出の方が高い回収率を示し，操作性の点でも優れていた．また，FPD/GC分析では，キャベツ，ほうれんそうの場合は妨害が少なく，ミニカラムによる精製を省略して，粗抽出液の段階で定性確認が可能であった．

なお，ほうれんそうにおいて両抽出法ともにEDDP（No. 44），EPN（No. 47）等の回収率が低いため，ほうれんそうの粗抽出液に直接標準混液を加えてGC測定を行ったところ，表2の回収率と同様の結果が得られ，ほうれんそうでは農薬によって夾雑物により回収率に影響

を受け易いという報告[8]と一致した.

3．クリーンアップ

多成分の有機リン系農薬のクリーンアップには，これまで含水フロリジルやシリカゲルが用いられてきた．これらの方法では，水溶性の高い有機リン系農薬は極性の高い溶媒で溶出する必要があり，色素成分が多い試料ではクリーンアップ効果が低くなるため，GC/MSのマススペクトルによる確認時にバックグランドが高くなり妨害となることがある．ENVI-Carb/NH2ミニカラムは色素除去効果に優れており，多種類の極性の異なる農薬のクリーンアップに適しているという報告[7]がある．そこで，今回このミニカラムによる精製について検討を行った．表2に溶媒抽出及び固相抽出で得られた各粗抽出液をこのミニカラムで精製して得た最終回収率を示した．ほうれんそうのように葉緑素の多い粗抽出液も精製後ではほぼ透明になり，最終回収率の結果から，ミニカラム精製は概ね両粗抽出液のクリーンアップに適用できることがわかった．しかし，溶媒抽出で得た粗抽出液を精製した場合は，キャベツ及びほうれんそう共にメタミドホス（No. 1），アセフェート（No. 3），ホルモチオン(No. 13)，EPNオキソン（No. 41）に，また，キャベツではエチルチオメトン（No. 12）に最終回収率の低下がみられた．これらは粗抽出液の回収率に対する低下の割合が50～70%であった．次に固相抽出で得た粗抽出液を精製した場合もキャベツ及びほうれんそう共にホルモチオン（No.13)，EPNオキソン（No. 41）に，また，キャベツではメチルジメトン（No. 5)，チオメトン（No.8）に最終回収率の低下がみられ，低下の割合が30～60%であった．農薬標準品を用いて直接ミニカラム処理した結果では，ホルモチオン（No. 13)，EPNオキソン（No. 41）に回収率の低下が認められ，これらの農薬についてはミニカラム処理に原因があることがわかった．また，メチルジメトン（No. 5)，チオメトン（No. 8)，エチルチオメトン（No. 12）は化学構造が類似しているので，酢酸エチル中での安定性について検討したところ，室温21時間放置しても安定であり，溶媒による分解はないことを確認した．これらの農薬の回収率の低下は，ミニカラム精製の検討において酢酸エチルをロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固し，アセトニトリル-トルエン溶液に溶解する操作を行っていたためであり，酸化分解を受けたためと推測された．酢酸エチルの濃縮操作において，濃縮液を数ml残した場合は100%近く残留し，窒素ガスを吹き付けて乾固を行った場合は60%以上残留したので，溶媒抽出，固相抽出，ミニカラムによる精製において溶媒を減圧留去する際に完全に乾固させないことにより回収率の低下を防ぐ改善を行った．

まとめ

FPD/GCによってオキソン体を含めた48種の有機リン系農薬についてPTRIを作成した．その結果，HP-1，HP-5，HP-1701の3種類のキャピラリーカラムを用いることによって，これら農薬の全てが分離可能であった．作成したPTRIは，対象農薬の測定時にカラム選択やピーク同定の目安になる利点がある．その数値から簡易迅速な定性確認が可能となり，実試料のスクリーニングに有効であることが認められた．

45種の有機リン系農薬について溶媒抽出及び固相抽出による回収率を検討した結果，両法で得られた粗抽出液で一斉分析が可能であった．固相抽出は溶媒抽出に比べて操作性の良さや時間の短縮化など前処理法としての利点があり，特に水溶性の高い農薬において回収率が高く，定量法としても固相抽出の方が優れていた．

両法で得られた粗抽出液の精製にENVI-Carb/NH2カラムを用いたところほうれんそうの色素除去効果に優れており，ホルモチオンやEPNオキソンを除き，良好な回収率を示し，精製法として適用できることがわかった．

（本研究の概要は，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第11回理化学研究部会1999年2月で発表した）

文　献

1）大橋則雄,大石充男,田口信夫,他：地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第9回理化学研究部会要旨集,1997年2月.

2）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法 平成10年版 473－539，新日本法規出版，東京.

3）Y.Akiyama,N.Yoshioka,M.Tsuji：食衛誌, **39**, 303-309, 1998.

4）A. MANNINEN, M,-L. KUITUNEN, L. JULIN: J. Chromatogr 394, 465-471, 1987.

5）土屋悦輝,大橋則雄：衛生化学 ,**38**, 560-565,1992.

6）田村康宏，永山敏廣，小林麻紀,他：食衛誌，**39**, 225-232, 1998.

7）F.Julie, H. Palph, L. Mario, et al：J.AOAC Int., **78**, 1252-1266, 1995.

8）根本了，佐々木久美子，豊田正武：第35回全国衛生化学技術協議会年会講演集,56-57, 1998.

表1．有機リン系農薬の保持時間(Rt)と相対保持指標値(PTRI)

No.	有機リン系農薬	標準グループ	キャピラリーカラム HP-1 Rt (min)	HP-1 PTRI	HP-5 Rt (min)	HP-5 PTRI	HP-1701 Rt (min)	HP-1701 PTRI
1	メタミドホス	A	10.46	732	11.47	796	14.81	1004
2	ジクロルボス（ＤＤＶＰ）	B	10.97	765	11.56	802	13.42	898
3	アセフェート	C	13.39	932	14.45	1008	18.01	1269
4	オメトエート	A	15.57	1097	16.67	1182	19.97	1450
5	メチルジメトン	B	16.09	1139	16.90	1200	18.92	1351
6	サリチオン	C	16.66	1185	17.56	1256	19.74	1428
7	ジメトエート	A	17.29	1237	18.31	1320	21.43	1594
8	チオメトン	B	17.35	1242	18.06	1299	19.65	1420
9	シアノホス（ＣＹＡＰ）	C	17.92	1291	18.80	1364	21.29	1579
10	テルブホス	A	18.20	1315	18.78	1362	19.97	1450
11	ダイアジノン	B	18.38	1331	18.97	1378	19.95	1448
12	エチルチオメトン	C	18.49	1342	19.15	1395	20.53	1503
13	ホルモチオン	A	18.66	1356	19.69	1444	22.61	1716
14	イプロベンホス（ＩＢＰ）	B	18.86	1374	19.53	1430	21.00	1550
15	フェニトロチオンオキソン	C	18.99	1386	19.90	1463	22.49	1703
16	トルクロホスメチルオキソン	A	19.00	1387	19.87	1461	21.98	1650
17	マラチオンオキソン	B	19.26	1410	20.05	1478	22.24	1677
18	ジクロフェンチオン（ＥＣＰ）	C	19.29	1413	19.90	1463	21.09	1560
19	メチルパラチオン	A	19.32	1416	20.16	1488	22.48	1702
20	クロルピリホスメチル	B	19.41	1424	20.15	1486	21.49	1600
21	トルクロホスメチル	C	19.48	1431	20.26	1496	21.78	1629
22	フェニトロチオン（ＭＥＰ）	A	19.91	1471	20.74	1543	22.89	1746
23	ピリミホスメチル	B	20.03	1481	20.69	1538	21.88	1640
24	マラチオン	C	20.13	1491	20.87	1556	22.68	1723
25	クロルピリホスオキソン	A	20.25	1502	21.05	1573	22.79	1735
26	フェンチオン（ＭＰＰ）	B	20.34	1511	21.14	1582	22.70	1725
27	パラチオン	C	20.45	1521	21.20	1588	23.29	1789
28	クロルピリホス	A	20.48	1525	21.18	1585	22.33	1687
29	イソフェンホスオキソン	B	20.51	1527	21.27	1594	23.14	1773
30	α-クロルフェンビンホス(α-CVP)	C	21.07	1581	21.77	1644	23.29	1788
31	β-クロルフェンビンホス(β-CVP)	A	21.28	1601	22.04	1671	23.66	1830
32	プロチオホスオキソン	B	21.31	1605	22.04	1671	23.46	1807
33	フェントエート（ＰＡＰ）	C	21.32	1606	22.13	1680	23.75	1840
34	イソフェンホス	A	21.34	1608	22.03	1670	23.55	1817
35	ブタミホスオキソン	B	21.43	1617	22.31	1698	24.60	1937
36	メチダチオン	C	21.56	1630	22.49	1717	24.60	1937
37	イソキサチオンオキソン	A	22.09	1684	23.00	1770	25.23	2009
38	ブタミホス	B	22.11	1687	22.90	1760	24.84	1965
39	プロチオホス	C	22.37	1713	23.05	1776	24.15	1886
40	イソキサチオン	A	22.72	1750	23.58	1832	25.61	2050
41	EPNオキソン	B	22.74	1753	23.79	1854	26.10	2103
42	エチオン	C	23.32	1814	24.11	1889	25.76	2066
43	シアノフェンホス（ＣＹＰ）	A	23.76	1863	24.71	1955	27.12	2210
44	エデイフェンホス（ＥＤＤＰ）	B	23.80	1867	24.77	1962	26.72	2171
45	ホスメット（ＰＭＰ）	C	24.80	1978	25.97	2090	29.11	2372
46	ピリダフェンチオン	A	24.73	1972	25.76	2068	28.56	2327
47	ＥＰＮ	B	25.00	2002	25.96	2090	28.59	2330
48	ホサロン	C	25.72	2080	26.80	2180	30.08	2462

表2．有機リン系農薬の溶媒抽出法及び固相抽出法の添加回収率

(%)

No.	有機リン系農薬	キャベツ				ほうれんそう			
		溶媒抽出法		固相抽出法		溶媒抽出法		固相抽出法	
		粗抽出	精製	粗抽出	精製	粗抽出	精製	粗抽出	精製
1	メタミドホス	43.1	28.0	117.2	102.0	42.9	28.6	102.1	98.0
2	ジクロルボス（DDVP）	100.5	94.5	108.1	86.2	87.3	61.3	110.1	93.5
3	アセフェート	43.0	23.8	168.0	122.0	40.0	25.4	68.3	62.0
4	オメトエート	74.0	76.5	107.5	96.9	71.0	65.0	66.0	61.0
5	メチルジメトン	91.8	63.2	108.7	56.0	77.1	64.5	88.5	77.8
6	サリチオン	106.6	86.5	97.4	85.1	92.3	77.2	97.8	80.8
7	ジメトエート	103.9	92.5	105.9	113.8	107.8	101.1	87.0	74.8
8	チオメトン	97.3	61.8	107.7	54.0	70.4	66.0	88.8	97.2
9	シアノホス（CYAP）	104.7	88.1	105.3	98.1	93.0	85.4	98.5	84.1
10	テルブホス	104.8	93.6	85.1	63.0	101.2	102.0	110.4	111.0
11	ダイアジノン	110.0	117.0	108.0	99.6	104.0	105.0	108.2	110.0
12	エチルチオメトン	97.3	52.1	88.8	65.0	98.1	80.7	96.9	83.4
13	ホルモチオン	84.3	40.7	91.6	36.4	90.7	52.6	52.8	32.8
14	イプロベンホス（IBP）	100.2	103.0	108.5	94.3	101.9	93.7	105.9	93.7
15	フェニトロチオンオキソン	106.2	79.4	105.5	85.4	124.0	99.3	118.0	79.5
16	トルクロホスメチルオキソン	93.8	78.5	96.0	93.4	87.8	81.6	73.9	62.2
17	マラチオンオキソン	94.9	91.4	101.2	85.4	82.3	64.3	76.0	60.1
18	ジクロフェンチオン（ECP）	89.9	74.4	90.2	81.8	96.7	88.6	102.1	90.2
19	メチルパラチオン	102.0	88.2	94.2	91.8	95.7	95.4	82.5	75.6
20	クロルピリホスメチル	84.6	83.7	99.3	84.1	95.0	92.0	91.3	95.6
21	トルクロホスメチル	104.5	86.9	103.0	93.2	102.8	98.1	110.0	96.5
22	フェニトロチオン（MEP）	110.4	94.9	99.1	99.1	98.5	88.3	72.7	66.6
23	ピリミホスメチル	95.8	97.5	105.2	92.3	106.9	109.1	109.6	105.0
24	マラチオン	103.9	86.5	101.2	90.8	82.3	78.7	82.8	70.3
25	クロルピリホスオキソン	102.4	75.9	97.9	80.5	100.1	86.9	30.0	23.3
26	フェンチオン（MPP）	98.6	104.0	101.7	77.2	96.1	97.3	92.7	97.3
27	パラチオン	100.0	83.9	101.2	88.0	92.5	86.8	100.1	84.6
28	クロルピリホス	99.8	89.4	112.1	97.8	97.1	99.0	108.7	104.4
29	イソフェンホスオキソン	—	—	—	—	—	—	—	—
30	α-クロルフェンビンホス(α-CVP)	92.3	77.0	89.0	79.7	78.7	80.7	84.7	68.3
31	β-クロルフェンビンホス(β-CVP)	118.0	101.0	124.0	115.0	82.0	83.3	62.7	67.7
32	プロチオホスオキソン	102.9	103.0	85.3	73.2	104.7	95.3	83.1	68.0
33	フェントエート（PAP）	100.3	82.1	113.0	99.9	64.1	61.0	67.2	62.6
34	イソフェンホス	111.0	101.3	93.1	95.7	107.2	108.0	100.6	98.0
35	ブタミホスオキソン	115.9	103.0	113.7	99.6	60.2	62.0	53.5	39.4
36	メチダチオン	107.2	82.6	111.2	93.6	104.0	97.7	116.0	89.0
37	イソキサチオンオキソン	—	—	—	—	—	—	—	—
38	ブタミホス	97.0	103.0	93.6	81.8	86.6	89.4	82.9	84.3
39	プロチオホス	93.8	77.7	97.1	87.6	90.5	90.1	104.1	93.6
40	イソキサチオン	—	—	—	—	—	—	—	—
41	EPNオキソン	121.6	72.8	119.5	63.5	137.2	63.0	86.5	28.2
42	エチオン	100.0	80.5	101.5	90.4	88.5	88.8	99.7	87.0
43	シアノフェンホス（CYP）	93.3	78.1	91.3	91.3	95.6	85.7	95.8	82.3
44	エデイフェンホス（EDDP）	108.6	98.5	110.2	89.0	45.7	50.2	34.6	25.3
45	ホスメット（PMP）	99.7	70.9	108.7	84.7	98.3	118.0	103.0	101.0
46	ピリダフェンチオン	92.3	75.3	86.9	85.3	84.5	69.0	76.7	75.3
47	ＥＰＮ	100.9	98.9	102.9	84.3	72.8	85.3	57.4	43.0
48	ホサロン	84.9	71.7	93.3	86.5	98.0	110.0	100.0	98.7

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 130-133, 1999

既存公定試験法を応用した農産物中のチフルザミドの分析

田村康宏*, 永山敏廣*, 高野伊知郎*, 小林麻紀*, 伊藤正子*,
木村奈穂子*, 北山恭子*, 高田千恵子**, 安田和男*

Determination of Thifluzamide in Agricultual Products by using the Examination Method Shown in Japanese Food Sanitation Law

YASUHIRO TAMURA*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, ITIROU TAKANO, MAKI KOBAYASHI*, MASAKO ITO*,
NAOKO KIMURA*,KYOKO KITAYAMA*,CHIEKO TAKADA** and KAZUO YASUDA*

Thifluzamide in agricultural products was determined using the examination method shown in the Japanese Food Sanitation Law for seven organonitrogen pesticides including cafenstrole, difenoconazole, cyproconazole, etc.

The sample(grain or bean:10 g, vegetable or fruit:20 g) was homogenized with acetone followed by extraction with n-hexane, and the extract was evaporated. In the case of grain or beans, fat or oil was removed from the extract by n-hexane･acetonitrile partitioning. Then the extract was purified by Florisil column chromatography and analyzed by GC-FTD.

The recovery rate of thifluzamide spiked in used brown rice, soybean, lime and spinach at the level of 0.1 ppm was between 66.7 and 81.1%, and the limit of detection was 0.01 ppm.

Keywords： チフルザミド thifluzamide, 農薬 pesticide, 農作物 agricultural producuts, ガスクロマログラフィー(FTD) gas chromatography(FTD), 公定試験法 examination method shown in Japanese Food Sanitation Low

緒　　言

チフルザミド（Fig. 1.）はイネ絞枯病の殺菌剤として，我が国では1997年に登録され[1]，米に対し0.5ppmの農薬登録保留基準値が設定されている[2]．平成11年４月27日，食品衛生調査会に諮問されたことから，今年度中に残留農薬基準が設定される予定である[3]．残留農薬基準は現在179農薬に係わる89通りの試験法が示されており，多くの種類の農薬を検査するためには種々の試験法を駆使しなければならず，検査業務の負担が非常に大きい．今回チフルザミドの分析法を作成するにあたり，現在告示されている公定試験法を応用し，分析の省力化を試みた．

実験方法

1．試　　料

市販の米，大豆，ライム及びホウレンソウを用いた．

2．試　　薬

チフルザミド標準液：チフルザミド（林純薬工業㈱製）をアセトンに溶解し1000 μg/mlの標準原液を作製し，ヘキサンで適宜希釈した．

有機溶媒等：残留農薬試験用を用いた．

フロリジル：Florisil PR（和光純薬工業㈱製）を130℃で12時間以上活性化し，デシケーター中で放冷したものを用いた．

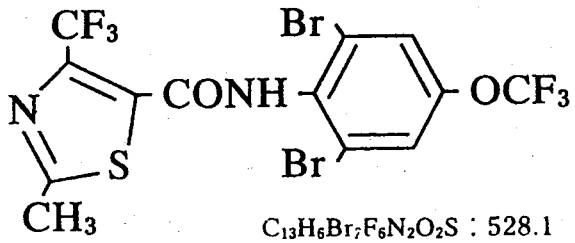
3．装　　置

(1)キャピラリーガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-17A（検出器：FTD）

(2)ガスクロマトグラフ-質量分析計：Hewlett Packard社製 HP5973

(3)粉砕器：㈲廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

* 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多摩支所理化学研究科



$C_{13}H_6Br_2F_6N_2O_2S$: 528.1

Fig. 1. Chemical structure of thifluzamide

4．分析方法

公定試験法「カフェンストロール，ジフェノコナゾール，シプロコナゾール，テブコナゾール，トリアジメノール，フルジオキソニル及びプロピコナゾール試験法[4]」に従った．試料溶液の調製方法をScheme 1.に示した．またGC条件は以下の通りである．

カラム：DB-1（30m×0.25mm，膜厚0.25μm），J&W社製

カラム温度：100℃（1分）→30℃/分→250℃（0分）→6℃/分→300℃（2分）

注入口温度：250℃

検出器温度：280℃

キャリヤーガス：ヘリウム 2.7ml/min

結果及び考察

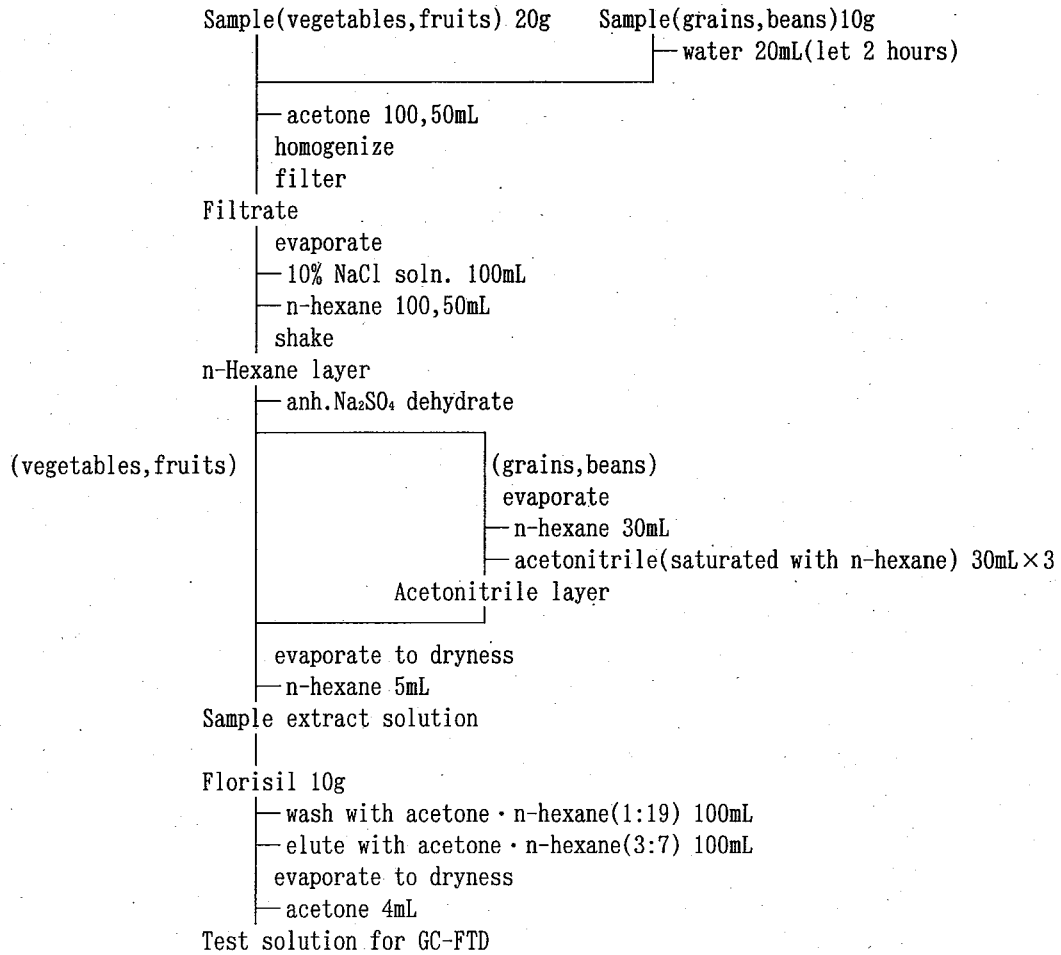
1．適用可能な既存公定試験法の選択

チフルザミドの分析法には，農薬取締法で定められた方法として，アセトンで抽出しヘキサンに転溶後，フロリジルミニカラムで精製し，GC-FTDで測定する方法がある[2]．この方法は加水分解や誘導体化などの特別な操作を必要とせず，かつ精製法も一般的な方法である．そこですでに告示されている含窒素系農薬の公定試験法のうち，これに類似した方法を検索したところ，10通りの試験法が見出された．このうちGC測定条件，精製時に使用する溶媒の極性等を考慮したところ，「アラクロール，イソプロカルブ，エスプロカルブ等試験法[4]（以下告示法①）」及び「カフェンストロール，ジフェノコナゾール，シプロコナゾール等試験法[4]（以下告示法②）」が適用できる可能性のあることがわかった．そこでこの2法について検討することとした．

2．試験溶液の調製

(1)抽出操作

告示法①はアセトン抽出後，酢酸エチルに転溶し，告示法②はアセトン抽出後，ヘキサンに転溶する方法であ



Scheme 1. Analytical method for thifluzamide

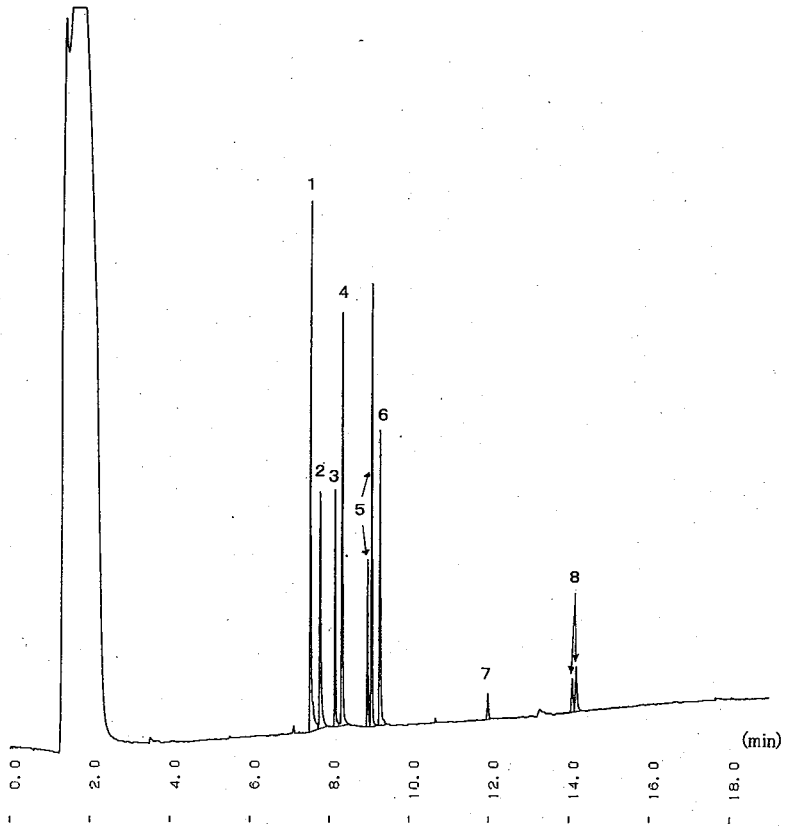


Fig. 2. Gas chromatogram of 8 pesticides
1. triadimenol 2. fludioxonil 3. thifluzamide 4. cyproconazole
5. propiconazole 6. tebuconazole 7. cafenstrole 8. difenoconazole

る．チフルザミド標準溶液を食塩水に添加し，酢酸エチル及びヘキサンでの転溶操作を行って回収率を求めたところ，それぞれ102.2%及び98.6 %であり，いずれも良好な回収率が得られ，いずれの転溶方法も適用できることがわかった．

(2)精製操作

両告示法ともフロリジルカラムを用いて精製を行っている．告示法①はフロリジル5gを用いてエーテル・n-ヘキサン（1：99）混液50mlで洗浄し，アセトン・n-ヘキサン（3：7）混液50mlで溶出する．告示法②はフロリジル10gを用いてアセトン・n-ヘキサン（1：19）混液100mlで洗浄し，アセトン・n-ヘキサン（3：7）混液100mlで溶出する．チフルザミド標準溶液をフロリジルカラムに負荷した後，告示法①及び②の各精製操作を行い回収率を求めた．両告示法とも洗浄溶液中にはチフルザミドは溶出せず，それぞれの回収率は85.6%及び106.5%であった．そこで回収率が良かった告示法②を適用することとした．

2．GCの分析条件

告示法②と同一条件で測定したGCのクロマトグラムをFig. 2.に示した．同法にあるようにカフェンストローを約12分で流出するように流速を調節したところ，チフルザミドは約8.1分で流出した．また他の7農薬との分離及び定量も良好であった．

3．添加回収試験

添加回収試験用試料として穀類のうち主食である米（玄米），豆類のうち油脂を多く含む大豆，果実のうち精油を有し，酸性を呈するライム及び野菜のうち葉菜のホウレンソウを用いた．各試料にチフルザミドを試料中濃度が0.1ppmとなるように添加し，本法を用いて回収試験を行った．3回の試行による回収率の平均値をTable 1.に示した．残留基準値の設定が予定されている米で77.9 %の回収率が得られ，また大豆，ライム，ホウレンソウでも66.7～81.1%の回収率が得られたことから，本法の適用に問題はなかった．Fig. 3.に玄米を用いて試験

Table 1. Recovery of Thifluzamide Spiked in Samples

Sample	Recovery[1](%)
Brown Rice	77.9±4.5
Soybean	66.7±4.5
Lime	77.5±3.9
Spinach	81.1±0.4

1) The values are mean±S.D.(n=3)

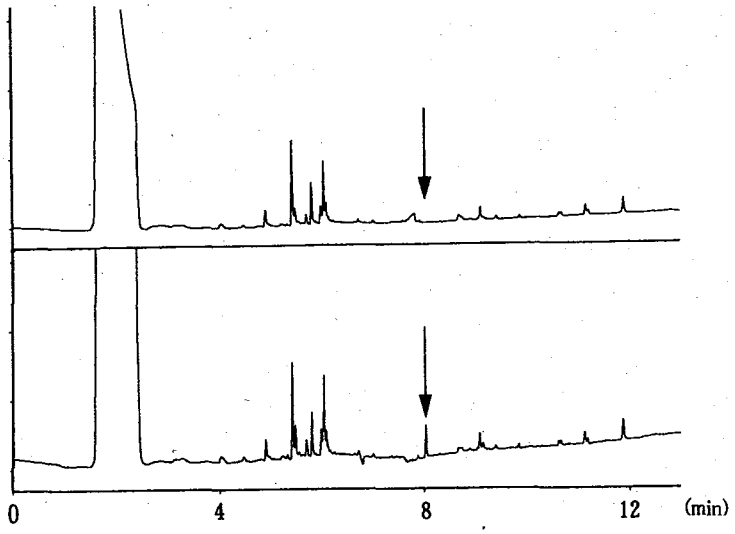


Fig. 3. Gas chromatogram of brown rice extract
(a) : unspiked sample ; (b) : spiked sample (thifluzamide : 0.1ppm)

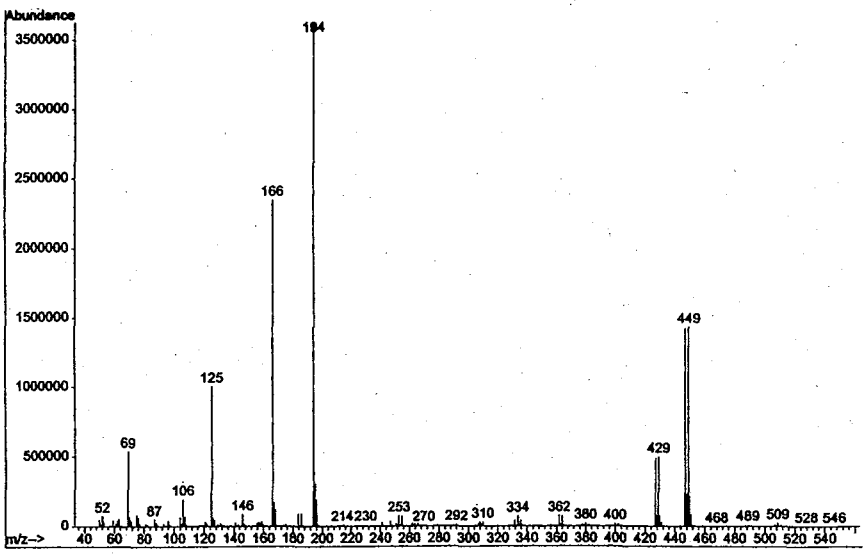


Fig. 4. Mass spectrum of thifluzamide by GC / MS

を行ったときのガスクロマトグラムを示した．定量を妨害するピークは見られず，また他の作物でも同様に妨害ピークは見られなかった．またチフルザミドの確認方法としてガスクロマトグラフ-質量分析計を用いてマススペクトルを観察したところ，Fig. 4.に示すようなスペクトルを得ることができた．本分析法の定量限界は0.01ppmであった．

まとめ

既存公定試験法を応用した農作物中のチフルザミドの分析法について検討した．公定試験法のうちカフェンストロール，ジフェノコナゾール，シプロコナゾール等7種の含窒素系農薬試験法が適用できたため，本試験法を利用することでチフルザミドを含めた8種の含窒素系農薬が同時に分析できるため，分析の省力化を図ることができた．本法を用いて米，大豆，ライム及びホウレンソウを用いて添加回収試験を行ったところ回収率は66.7～81.1%であり，定量を妨害するピークは見られなかった．

本研究の一部は国立医療品食品衛生研究所の委託により実施した．

文　献

1）農薬ハンドブック1998年版編集委員会：農薬ハンドブック1998年度版，270-271, 1998，社団法人日本植物防疫協会，東京．
2）「今月の農業」編集室：農薬登録保留基準ハンドブック，改訂3版，477, 1998，化学工業日報社，東京．
3）食品化学新聞：平成11年5月13日
4）厚生省告示：第245号，平成10年10月12日

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 134-137, 1999

蛍光X線分析法による米中総臭素の定量

高田千恵子*, 高野伊知郎**, 永山敏廣**, 小林麻紀**,
伊藤正子**, 田村康宏**, 木村奈穂子**, 北山恭子**, 安田和男**

X-Ray Fluorescence Spectrometric Determination of Total Bromide in Rice

CHIEKO TAKADA*, ICHIRO TAKANO**, TOSHIHIRO NAGAYAMA**, MAKI KOBAYASHI**,
MASAKO ITO**, YASUHIRO TAMURA**, NAOKO KIMURA**, KYOKO KITAYAMA** and KAZUO YASUDA**

An analytical procedure was developed for the analysis of total bromide residues in rice, using X-ray fluorescence spectrometry.

Rice sample was pulverized, riddled to align the size under 500 μm and then dried at 100℃ for 2 hours. A 7.0g sample of powder was applied a 40mm i. d. aluminium ring, then pressed and set in the spectrometer. The recovery rates of bromide added to rice at the level of 5 and 50 μg/g as bromine(Br) were 100～102%, and the detection limit was 1 μg/g. This procedure allows easy and rapid for the analysis of total bromide residues in rice as compared with other methods.

Pesticide residues in 65 sample of domestic rice and 11 of imported(Thailand 7,Australia 4) rice had been investigated from April 1997 to March 1999. Br was detected from 3 rice samples imported from Australia (the rate of detection;75%). Br residues (1-3 μg/g) were much lower levels as against the tolerance for pesticide residues in Japan(50 μg/g) and acceptable daily intake(ADI;1mg/kg body weight/day).

Keywords：総残留臭素量 total bromide residues, 蛍光X線分析法 X-ray fluorescence spectrometry, 定量 determination, 米 rice

はじめに

近年，米は食生活の多様化，輸入自由化に伴い，国内産米のみならず諸外国からの輸入米が広く流通している．これらは保税倉庫，船そう内で害虫駆除を目的として臭化メチルくん蒸処理を受けている．臭化メチルは臭素化合物として食品中に残留することが知られており，我が国では米（玄米）に対して50ppmの残留基準値が設定されている[1]．

米中の総臭素検出頻度及び残留濃度は，国内産米に比べて輸入米で高い傾向にあることが，これまでの検査結果から明らかにされており[2]，市場流通米の検査需要が増大している．

臭素分析法については，公定法の他にイオンクロマトグラフ法[3]やガスクロマトグラフ法[4]等が報告されているが，操作性あるいはデータの再現性等に様々な難点が指摘されている[5]．蛍光X線分析法については，前処理・分析ともに簡便，迅速な分析法としてすでに筒井らの標準添加法[6]，著者らの検量線法[7-9]等の報告があり，その実用性が確認されている．しかし，この方法をそのまま米に適用した場合，X線照射に伴い発生する熱によって分析中に試料が装置内で崩壊する等の問題点があった．そこで今回，米中の総臭素分析用に最適な分析条件の検討を行った．また本法を用いて，市場流通米中の総臭素の残留実態調査を実施したので合わせて報告する．

* 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 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研究科

実験方法

1．装　　置

(1) 蛍光X線分析装置:理学電気工業㈱製波長分散型RIX-3000

(2) X線管球：バリアンインスツルメント社製ロジウムデュアルターゲット管球

(3) 検出器：重元素用シンチレーションカウンター(SC)

(4) ペレット成型器：前川試験機㈱製手動型油圧成型器

(5) 粉砕器：㈲廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

2．試　　料

1997年4月から1999年3月に東京都内の市場等で購入した国内産米65検体，輸入米としてタイ産米7検体及びオーストラリア産米4検体の計76検体を試料とした．

3．標準品並びに標準溶液

(1) 標準品：臭化カリウム（以下KBrと略す．和光純薬製試薬特級）

(2) 標準溶液：標準品を水に溶解し，臭素（以下Brと略す）として10,000μg/g溶液となるように調製した．以下，適宜水で希釈した．

(3) 標準化試料：パルファイ調整用試料（Cat. No. CN3590T2, Lot. No. 976696B, 理学電気工業製）

4．標準試料の調製

試料約100gを粉砕後，500μmのふるいに通して粒度を均一化した．この米粉末10gに対して，標準試料中のBr濃度が1，4，25，50，75及び100μg/gになるようにKBr標準溶液を2.5mlずつ添加し，乳鉢中で混和した．風乾後，更に100℃で2時間乾燥させ，再度乳鉢中でよく均一化した．各試料粉末7.0gを精秤して，内径40mmのアルミリングをのせたペレット作製用台座に乗せ，小型油圧式プレス器を用いてペレットを作製し，標準試料とした．

5．測定試料の調製

試料約100gを粉砕後，500μmふるいに通し，100℃で2時間乾燥させ，再度乳鉢中で混和均一化した．以下，標準試料と同様に操作してペレットを作製し，測定試料とした．

6．測　　定

1）定性　Br濃度5μg/gの標準試料及び測定試料をTable 1に示す定性条件で測定した．

2）定量　定性分析で陽性を示した試料について，標準試料を用いてTable 1に示す定量条件で測定した．得られたBr-Kα線のX線強度とBr量の関係から検量線を作成した．次に，標準化試料を測定し，これらのデータをX線分析装置の記憶装置に保存した．2回目以降の定量を行う際には，標準化試料を測定し，そのX線強度から自動的に補正した検量線を用いて定量値を算出した．

実験結果及び考察

1．試料調製方法の検討

蛍光X線分析では，粉末試料の粒度がX線強度に変動を与えることが知られている[10]．そこで，試料を粉砕後，500μmのふるいに通すことによって試料粒度の均一化を図ったところ，測定値の変動が改善された．

また，米中には水分と油脂分が含まれているため，そのままではペレットの作製が困難であったり，測定中にペレットが崩壊あるいは収縮してアルミリングから脱落する等の現象が観察された．そこで，試料中の水分含量がX線強度へ与える影響を検討するために，試料の乾燥時間とX線強度の関係について調べた．粉砕した試料の粒度を均一化し，Brの試料中濃度が5μg/gとなるようにKBr標準溶液を添加後，2日間風乾した．その後，100℃の温度条件下で0.5，1，2，3及び4時間それぞれ乾燥させた．各乾燥粉末試料のペレットを作製し，X線強度を測定した（Fig. 1）．乾燥時間0.5～1時間では乾燥が不十分であり，X線強度が低く，ペレットの物理的強度も弱いことが判明した．一方，乾燥時間2時間以上ではX線強度もほぼ安定し，ペレットの収縮現象は観察されなかった．そこで，試料粉末の乾燥時間は2時間とした．また，X線測定は真空中で行われるため，ペレット中に空気層があると真空中で膨潤し，このためにペレットが崩壊する可能性があった．そこで，ペレット作製時には5，10，15及び20kg/cm²の4段階で各20秒間加圧す

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

Excitation	Target : Rh/Cr, Voltage(kv) : 50, Current(mA) : 50, Filter : out
Optics	Attenuator : 1/1, Slit : coarse, Crystal : Lif(200), Detector : SC, Diaphragm : 35 mm
PHA*	Lower limit : 100, Upper limit : 300
Qualitative Analysis(2θ Scan)	Step mode, Sampling angle Start : 29.000 deg, End : 31.000 deg, Step : 0.050 deg, Sampling time : 2.0 s
Quantitative Analysis	Br-Kα 2θ : 29.950 deg,Sampling time : 20.000 s, Background(BG)correction : 2 point method BG 1 2θ : 29.636 deg, Sampling time : 5.0 s, BG 2 2θ : 30.277 deg, Sampling time : 5.0 s

＊：pulse height analyser

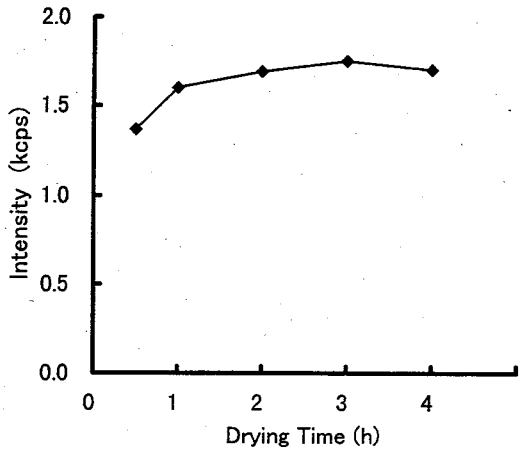


Fig. 1. Effect of Drying Time on the Intensity of X-ray Fluorescence Spectrometry (XF)

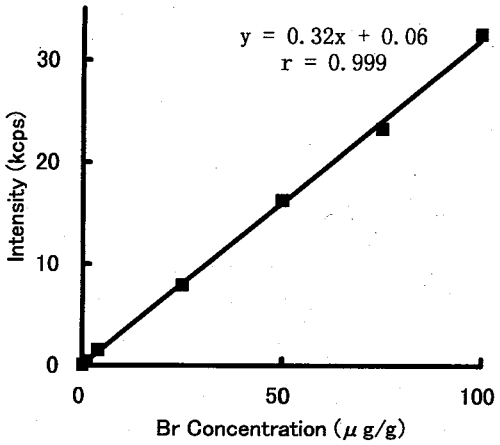


Fig. 2. Calibration Curve of Br in Rice by XF

ることとした．徐々に加圧形成することにより試料中の空気を完全に除くことができたため，ペレットの崩壊現象は観察されなかった．

2．測定条件の検討

米中にBrの検出を妨害すると考えられる共存元素由来のX線ピークの有無を確認した[10]．単独ピークとして，2θ 29.950にBr-Kα線が検出され，他に妨害となるようなピークは認められなかった．更に，アッテネーター，スリットについて検討を重ねた結果，Table 1に示す定性測定条件で良好な検出感度が得られた．

また，定量についてはTable 1に示す条件とした．一次X線を照射した時のBr-Kα線の検出感度を高めるために，サンプリング時間について検討した．その結果，ペレットの物理的強度を考慮して，サンプリング時間は20秒間とした．バックグラウンド（BG）処理は，Br-Kα線の前後に妨害となるようなピークの存在が確認されなかったため，2点法を用いた．ピーク開始前のBG1は29.636deg，ピーク終了後のBG2は30.277degとし，それぞれ5秒間ずつ測定を行った．これを用いて，BG1及びBG2を結んだ直線をベースラインとし，Br-Kα線のX線強度からベースラインのX線強度を差し引いた値を測定値とした．

3．検量線の作成

試料のうちBrを検出しないことを確認した1検体を用いて検量線を作成した．(Fig. 2)．その結果，1～100μg/gの範囲でBr濃度とX線強度との間に直線関係が見られ，その相関係数もr=0.999と良好な値であった．この検量線とともに，標準化試料のBr-Kα線強度を測定し，これらのデータを合わせて記憶装置に保存した．試料を定量する時には，まず標準化試料を測定し，そのX線強度から保存されている検量線を自動補正して試料中のBr定量値を算出した．なお，この方法による値は，定量時ごとに作成する検量線によって得られる値と差がないことを確認した．

4．検出限界及び定量限界

本法の定性分析条件下での検出限界は1μg/g，定量分析条件下での検出限界は0.5μg/g，定量限界は1μg/gであった．

5．添加回収実験

Brを検出しないことを確認した試料にKBr標準溶液をBrの試料中の濃度が5及び50μg/gになるように各々添加し，検量線を用いた測定値から回収率を求めた(Table 2)．その結果，5μg/g 添加時の回収率は102%(n=3)，変動係数は7.1%，50μg/g 添加時の回収率は100%（n=3），変動係数は1.2%と良好な結果であった．

Table 2. Recovery of Br in Rice

(n=3)

Added (μg/g)	Detected (μg/g)	Ave.±S.D. (μg/g)	Recovery (%)	C.V. (%)
5.0	4.8 4.9 5.5	5.1±0.4	102	7.1
50.0	49.5 49.9 50.7	50.1±0.6	100	1.2

6．繰り返し測定精度

本試験法に用いる装置の測定精度について検討を行った．Brを検出しないことを確認した試料に，Brとして5μg/gになるようにKBr標準溶液を添加し，4回繰り返して測定したところ，平均測定値は4.9μg/g，変動係数は2.7%と良好な精度が得られた．

Table 3. Br Contents in Rice on the Market

Country of origin	No. of sample	No. of positive	Br (μg/g)	Ave. (μg/g)
Japan	65	0	n.d.	n.d.
Thailand	7	0	n.d.	n.d.
Australia	4	3	n.d.,1,2,3	1.5
Total	76	3		

n.d.：<1ppm

7．市販品の分析結果

本法を用いて，1997年4月から1999年3月に東京都内の市場等で購入した国内産米65検体，タイ産米7検体及びオーストラリア産米4検体，計76検体を分析した結果をTable 3に示した．国内産米の65検体及びタイ産米7検体のいずれからもBrは検出されなかった．一方，オーストラリア産米では4検体のうち3検体（検出率75%）からBrが検出された．しかし，Br検出量は低少なく，いずれも3μg/g以下であり，残留基準値の1/16以下であった．また，Brの許容1日摂取量（ADI）は1mg/kg体重/日とされ[11]，体重50kgの人で50mgに相当する．Brが3μg/g検出された米を16.7kg摂取しないと50mgには達しないこと，米の国民一日平均摂取量は165.4gであることから[12]，今回検出された米からのBr摂取量はADI値のほぼ1/100であることがわかった．

まとめ

蛍光X線分析装置を用いた米中Brの簡易分析法について検討した。試料を粉砕後，粒度の均一化，水分含量の調整を行った後，ペレットを作成し，蛍光X線分析装置によって測定した．検量線は1～100μg/gの範囲で，良好な直線性を示した．また，標準化試料による検量線補正により定量操作を簡略化した．本法の定性分析による検出限界は1μg/g，定量分析による定量限界は1μg/gであった．

本法は，従来の分析法と比較して簡易かつ迅速であり，食品衛生法の残留基準値にも十分対応できる感度を持つことから，米を対象としたBrの迅速分析法として，十分実用的な方法と考える。本法を用いて市場流通米76検体についてBrの残留実態を調査したところ，国内産米の65検体及びタイ産米7検体のいずれからもBrは検出されなかった．一方，オーストラリア産米からは4検体のうち3検体（検出率75%）からBrが検出されたが，いずれも3μg/g以下で，残留基準値，ADIを考慮しても問題のない値であった．

文　献

1）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法　平成11年版，288-291, 1998，日本法規出版株式会社，東京.

2）厚生省生活衛生局食品化学課編：食品中の残留農薬，43-44, 1998，㈳日本食品衛生協会，東京.

3）大島晴美，山田貞二，斉藤勲，他：愛知衛所報，**43**, 23-27, 1993.

4）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990 付．追補1995, 1553-1555, 1995，金原出版.

5）貞升友紀，井部明広，田端節子，他：㈳日本食品衛生学会第77回学術講演会講演要旨集，59,1999.

6）筒井剛毅，太田真由美，茶谷祐行，他：京都府衛公研年報，**37**，19-24，1992.

7）高野伊知郎，長嶋真知子，瀬戸隆子，他：東京衛研年報，**45**, 42-48, 1994.

8）長嶋真知子，高野伊知郎，高橋美佐子，他：衛生化学 **42**(6)，519-523，1996.

9）中村義昭，大貫奈穂美，森謙一郎，他：東京衛研年報 **48**, 86-89, 1997.

10）大野勝美，川瀬　晃，中村利廣，：X線分析法，168-173，1987，共立出版，東京.

11）㈳日本食品衛生学会編：食衛誌 **40**(1)，J-101，1999.

12）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：国民栄養の現状，138，1999，第一出版，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 138-144, 1999

国内産野菜・果実中の残留農薬実態調査
―平成10年度―

伊藤正子*, 永山敏廣*, 高野伊知郎*, 小林麻紀*,
田村康宏*, 木村奈穂子*, 北山恭子*, 高田千恵子**, 安田和男*

Pesticide Residues in Domestic Vegetables and Fruits
―Apr. 1998～Mar.1999―

MASAKO ITO*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, ICHIRO TAKANO*, MAKI KOBAYASHI*,
YASUHIRO TAMURA*, NAOKO KIMURA*, KYOKO KITAYAMA*, CHIEKO TAKADA** and KAZUO YASUDA*

Pesticide residues in 47 kinds of vegetables and fruits and 36 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, 3 kinds of organochlorine insecticides ,5 kinds of organochlorine fungicides, 1 kind of organonitrogen insecticide and 2 kinds of organonitrogen fungicides were detected. Concentrations of organophosphorus insecticides(Chlorpyrifos,CYAP,Pyridaphention, Diazinonand MEP), carbamate insecticides (Methomyl and Thiodicarb), organochlorine insecticides(Heptachlor epoxide and Dicofol),organochlorine fungicides (Iprodione, Procymidone, Captan, Vincrozolin, Benzoepinsulufate and TPN), organonitrogen insecticide (Tebufenpyrad) and organonitrogen fungicides (Microbutanil and Bitertanol) were between 0.01 and 0.11ppm in 10 kinds of crops, 0.03 and 0.98ppm in 4 kinds of crops , Tr and 0.69ppm in 18 kinds of crops and Tr and 0.26ppm in 14 kinds of crops respectively.

There were no samples that exceeded the maximum limit of standards for withholding registration and the tolerance for pesticide residues.

Residues of organochlorine fungicide (Procymidone) and carbamate insecticide(Methomyl) in 3 kinds of organic cultivation crops or the like were detected. Their concentrations were between0.01 and 0.03ppm.

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

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．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[2~19]．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[8~19]．

近年，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．

無・減農薬栽培野菜とともに，今回は慣行栽培の野菜

* 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多摩支所理化学研究科

Table 1. The List of Serveyed Pesticide

Organophosphorus pesticides (42)[1]	butamifos, cadusaphos, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chlorfenvinphos-E (CVP-E), chlorfenvinphos-Z (CVP-Z), cyanofenphos (CYP), cyanophos (CYAP), dialifol, diazinon, dichlofenthion(ECP), dichlorvos(DDVP), dimethoate, dimethylvinphos, dioxabenzofos,edifenphos (EDDP), EPBP, EPN, ethion, ethylthio-meton, fenitrothion (MEP), fenthion (MPP), formothion, fosthiazate, iprobenfos (IBP), isofenphos, isoxathion, malathion, methidathion (DMTP), parathion, parathion-methyl, phenthoate (PAP), phosalone, pirimiphos-methyl, phosmet (PMP), prothiofos, propaphos, pyridaphenthion, sulprofos, tetrachlorvinphos (CVMP), thiometon, trichlorfon (DEP),
Organochlorine pesticides(26)[1]	aldrin, α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o, p'*-DDT, captan, captafol, chlorobenzilate, chlornitrofen (CNP), chlorothalonil (TPN), dicofol, dieldrin, endrin, endosulfan-Ⅰ, endosulfan-Ⅱ, endosulfan sulfate, heptachlor, heptachlorepoxide, iprodione, procymidone, quintozene (PCNB), vinclozolin
Carbamate pesticides(23)[1]	aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, bendiocarb, carbaryl (NAC), carbofuran, chlorpropham (CIPC), diethofencarb, ethiofencarb, ethiofencarb sulfone, ethiofencarb sulfoxide, fenobucarb (BPMC), isoprocarb (MIPC), methomyl, metolcarb (MTMC), methiocarb, methiocarb sulfone, methiocarb sulfoxide, oxamyl, pirimicarb, propoxur (PHC), thiobencarb, thiodicarb
Organonitrogen pesticides(19)[1]	bitertanol, clofentezine, dichlofluanid, esprocarb, fenarimol, flucythrinate, mefenacet, mepronil, metribuzin, myclobutanil, oxadiazon, pendimethalin, propiconazole, pyridaben, quinomethionate, tebufenpyrad, thenylchlor, triadimefon,triadimenol
	Total 110 kinds

1) Values in parentheses indicate the number of individual pesticide.

に加え，比較的農薬の検出頻度の高かった果実類を重点的に検査し，そ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

1998年4月から1999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15種47検体について調査した．

(2)無・減農薬栽培野菜類

1998年4月から1999年3月に東京都内の市場等で購入した野菜及び果実16種36検体について調査した．

2．調査対象農薬

調査対象農薬はTable 1に示した。有機リン系農薬42種，有機塩素系農薬26種，カーバメイト系農薬23種及びその他の農薬19種の計110種の農薬を対象とした．

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，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），HN®-Nordion社製MICROMAT HRGC-412（検出器：ATD）

(3)高速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－質量分析計：Finnigan Mat社製 Traker™ System及びGCQ™ System，Hewlett Packard社製HP5973

(5)高速液体クロマトグラフ－質量分析計：VG Biotech社製Platform Ⅱ-LC

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[20]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15種47検体中3種10検体（検出率：21%，以下同様）から殺虫剤であるクロルピリホス（検出検体名：りんご，もも；以下同様），ダイアジノン（もも），CYAP（もも），MEP（もも）及びピリダフェンチオン（かき）の5種類が0.01～0.11ppm検出された（Table 2）．

ももの全果から比較的多くの農薬が検出された．クロ

Table 2. Residues of Organophosphorus[1] and Carbamate[2] Pesticides in Crops

Sample	No.of sample	No.of positive	Organophosphorus(ppm) Insecticides Chlorpyrifos	CYAP	Pyridaphention	Others	Carbamate(ppm) Insecticides Methomyl	Thiodicarb
Vegetables								
Cabbage[KYABETSU]	1	0	—[3]	—	—	—	—	—
Lettuce[RETASU]	1	0	—	—	—	—	—	—
Pimento[PIMAN]	1	0	—	—	—	—	—	—
Spinach[HORENSO]	1	0	—	—	—	—	—	—
Young leaves of chinese cabbage[KOMATSUNA]	1	0	—	—	—	—	—	—
Edible flower								
Chrysanthemum[SYOKUYOGIKU]	1	0	—	—	—	—	—	—
Fruits								
Apple[RINGO]								
(whole)	1	1	0.08	—	—	0.02(Diazinon)	—	—
(flesh)	1	0	—	—	—	—	—	—
Grape[BUDO]	6	0	—	—	—	—	—	—
Japanese pear[NASHI]								
(whole)	2	1	—	—	—	—	0.22	0.98
(flesh)	2	1	—	—	—	—	0.03	—
Mandarin orange[MIKAN]								
(whole)	1	0	—	—	—	—	—	—
(flesh)	1	0	—	—	—	—	—	—
Melon[MERON]								
(whole)	1	1	—	—	—	—	0.04	—
(flesh)	1	1	—	—	—	—	0.04	—
Peach[MOMO]								
(whole)	9	6	0.01, 0.01, 0.05 0.08, 0.11	0.02	—	0.02(MEP)	—	—
(fresh)	9	1	—	0.01	—	—	—	—
Persimmon[KAKI]								
(whole)	1	1	—	—	0.02	—	—	—
(flesh)	1	1	—	—	0.01	—	—	—
Watermelon[SUIKA]								
(whole)	2	0	—	—	—	—	—	—
(flesh)	2	0	—	—	—	—	—	—

1) Insecticides : Chlorpyrifos, CVP, dimethoate, EPN, parathion, parathion-methyl, MEP, MPP, PAP, phosalone, DEP, DDVP, diazinon, dioxabenzophos, 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, Aldicarb sulfon, Aldicarb sulfoxide, bendiocarb, carbofuran, ethiofencarb, ethiofencarb sulfon, ethiofencarb sulfoxide, NAC, BPMC, methomyl, oxamyl, pirimicarb, MIPC, thiodicarb, MTMC , PHC, methicarb, methiocarb sulfon and methiocarb sulfoxide are investigated.
Fungicides : Diethofencarb is investigated.
Herbicides : Chlorpropham and thiobencarb are investigated.

3) — : not detected

ルピリホスがもっとも検出割合が高く，9検体中5検体から0.01～0.11ppm検出された．また，フェニトロチオン（MEP）及びシアノホス（CYAP）がそれぞれ1検体から検出された．ももの残留農薬基準値は，果肉に設定されており，全果から検出されたクロルピリホス及びMEPは，果肉の基準の1.0ppm及び0.2ppmのそれぞれ1/10以下であった．CYAPには登録保留基準値0.2ppmが設定されているが，検出されたCYAPは，基準の1/20であった．

りんごの全果から検出されたクロルピリホスは残留農薬基準値1.0ppmの4/5と比較的高い値であった．クロルピリホスは1日摂取許容量（ADI）0.01mg/kg体重/日の殺虫剤であり，体重50kgの人が毎日このりんごを約6kg食べ続けても，健康上特に問題はないと判断されるが，劇物であるため，今後とも，その動向を見守っていきたい．また，ダイアジノンも検出されたが，その検出量は残留農薬基準値0.1ppmの1/5であった．

かき1検体の全果及び果肉からピリダフェンチオンが0.02及び0.01ppm検出された．この値は登録保留基準値0.1ppmの1/10以下であった．

(2)カーバメイト系農薬

殺虫剤であるチオジカルブ（日本なし）及びメソミル

(日本なし，メロン）が，２種４検体（４％）から0.03～0.98ppm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３ppm及び１ppmが設定されている．いずれの検体も基準値以内であったが，日本なしの全果からは0.98ppm検出され，基準値と同じレベルであった（Table 2）．

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はいずれも0.03mg/kg体重/日である．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頻度が高い傾向にある[15~19]．果皮ごと食すこともある日本なしや，葉菜類のうちレタスのように生食することが多いものでは，残留した農薬は，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や分解はなく，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．

(3)有機塩素系農薬

有機塩素系農薬は，７種18検体（38％）から３種の殺虫剤及び5種の殺菌剤がTr.（0.01pp未満）～0.38ppm検出された（Table 3）．

検出された殺虫剤は，ヘプタクロルエポキサイド（メロン），ジコホール（みかん），エンドスルファンサルフェート（みかん）であった．

メロンから検出されたヘプタクロルエポキサイドは，登録が抹消されているヘプタクロルの代謝物である．メロンやかぼちゃなど，ウリ科植物に比較的多く残留している[22]．すでに登録が抹消されており，全果と果肉の濃度が変わらないことから，土壌中に残留したヘプタクロルが代謝され，根を通してメロン内に取り込まれたものと推測する．

みかんの全果から検出されたジコホールは，残留農薬基準は設定されていないが，環境庁告示の登録保留基準が設定されている．みかんの基準値は果肉に3.0ppmと設定されているが，検出量は全果で0.37ppmであり，基準値の1/13以下であった．また，同じみかん（全果）から，エンドスルファンサルフェートが0.06ppm検出された．エンドスルファンサルフェートはエンドスルファンの代謝物であり，みかんの登録保留基準は，α－エンドスルファン，β－エンドスルファン及びエンドスルファンサルフェートの総和で0.5ppmである．検出量は基準の1/5以下であり，通常は，果皮を除去して喫食するため，ほとんど摂取されることはないと考える．

(4)その他の農薬

その他の農薬は，３種14検体（30％）から１種の殺虫剤及び2種の殺菌剤がTr.～0.26ppmの範囲で検出された．

殺虫剤のテブフェンピラド（リンゴ及びブドウ）が0.05及び0.06ppm，殺菌剤であるミクロブタニル（もも）が0.04ppm及びビテルタノール（もも）がTr.～0.26ppmで検出された．

テブフェンピラドのりんご及びぶどうにおける残留農薬基準は，それぞれ0.5ppmであり，残留量は，その1/10以下であった．

殺菌剤であるミクロブタニルは同じももの全果及び果肉から0.04ppmずつ検出された．残留農薬基準値の1/25であり，通常の喫食では，健康上問題ないと考える．ミクロブタニルは水溶性が高いため，果肉に浸透し，全果と果肉が同じ残留量であったと考える．農薬の果肉への移行は水溶性と密接な関係があるといわれており[23]，今回の結果も同様の傾向が見られた．また，ビテルタノール（もも）は18検体中10検体（56％）からTr.～0.26ppm検出された．果肉からの残留量はTr.～0.06ppmであり，残留農薬基準値1.0ppmの1/15以下であった．

(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 4に示した．

複数残留は，ほうれんそう，りんご，ぶどう，なし，みかん，メロン，ももの７種16検体（34％）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，野菜類は，ほうれんそう１検体のみで野菜類は20%であった．果実類は，全果で52%，果肉で18%であった．果実類は，殺虫剤及び殺菌剤の両者とも残留しているものが多く，特にももの全果は，複数残留しているものが78%であった．

野菜類については，調査対象数が少ないため，そこから全体を推測するのは難しいが，例年通り，葉菜類からの複数残留が見られた．

今年度は，野菜類及び食用花の調査数が少なく，また例年，複数残留が見られる食用菊からの農薬の検出がなかった．しかし，これらについては，今回，多数の複数残留が見られた果実類とともに，今後とも注意深く見守っていく必要がある．

Table 3. Residues of Organochlorine[1] and other[2] Pesticides in Crops

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine(ppm)						Others(ppm)		
			Insecticides		Fungicides				Insecticides	Fungicides	
			Hep.ep	Others	Iprodione	Procymidone	Captan	Others	Tebufenpyrad	Miclobutanil	Bitertanol
Vegetables											
Cabbage[KYABETSU]	1	0	–[3]	–	–	–	–	–	–	–	–
Lettuce[RETASU]	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Pimento[PIMAN]	1	1	–	–	0.06	–	–	0.29 (Vincrozolin)	–	–	–
Spinach[HORENSO]	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Young leaves of chinese cabbage [KOMATSUNA]	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Edible flower Chrysanthemum [SYOKUYOGIKU]	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fruits											
Apple[RINGO]											
(whole)	1	1	–	–	–	–	–	–	0.05	–	–
(flesh)	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Grape[BUDOU]	6	2	–	–	0.08, 0.24	–	–	–	0.06	–	–
Japanese pear [NASHI]											
(whole)	2	2	–	–	–	–	0.01, 0.07	–	–	–	–
(flesh)	2	1	–	–	–	–	Tr.	–	–	–	–
Mandarin orange [MIKAN]											
(whole)	1	1	–	0.37(Dicofol) 0.06 (Endosulfan sul.)	–	–	–	–	–	–	–
(flesh)	1	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Melon[MERON]											
(whole)	1	1	0.01	–	0.07	0.01	–	–	–	–	–
(flesh)	1	1	0.01	–	0.01	–	–	–	–	–	–
Peach[MOMO]											
(whole)	9	9	–	–	0.07, 0.09, 0.69	0.02,0.38	–	0.01(TPN)	–	0.04	Tr, Tr, 0.02,0.15 0.19,0.26
(fresh)	9	6	–	–	0.03, 0.08	0.01,0.09	–	–	–	0.04	Tr,0.01, 0.02, 0.06
Persimmon[KAKI]											
(whole)	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(flesh)	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Watermelon [SUIKA]											
(whole)	2	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
(fresh)	2	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–

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-Endosulfan, Endosulfan sulfate, chlorobenzilate, dicofol, heptachlor and heptachlor epoxide are investigated.
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) – : not detected

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16種36検体について調査したところ，３種３検体（8%）から有機塩素系殺菌剤１種及びカーバメイト系殺菌剤１種が検出された(Table 5)．

検出された農薬は，プロシミドン及びメソミルであり，両者とも残留農薬基準は設定されていないが，登録保留基準があり，野菜類ではそれぞれ2及び0.5ppmである．

プロシミドン（トマト，キュウリ）及びメソミル（ピーマン，トマト）の残留量は基準の1/50及び1/15以下であった．

農薬が検出された作物はすべて減農薬栽培の表示のあるもので，無農薬栽培や有機農法と表示のあるものはなかった．しかし，メソミルを検出したピーマンには，使用した農薬名の記載がなく，プロシミドンを検出したキュウリ，メソミルを検出したトマトは，記載された農薬の中に，検出した農薬はなかった．

無・減農薬栽培表示作物における農薬の検出割合は，

Table 4. Detailes in the Sample Contained Several Pesticides

Sample	No.	Pesticide residues(ppm)
Spinach	1	Vincrozolin(0.29), Iprodione(0.06)
Apple(whole)	1	Chlorpyrifos(0.08), Diazinon(0.02), Tebufenpyrad(0.05)
Grape	1	Iprodione(0.24), Tebufenpyrad(0.06)
Japanese pear(whole)	1	Captan(0.01), Methomyl(0.98), Thiodicarb(0.22)
Mandarin orange(whole)	1	Dicofol(0.37), Benzoepin sulfate(0.06)
Melon(whole)	1	Iprodione(0.07), Procymidone(0.01), Heptachlor epoxide(0.01), Methomyl(0.04)
Melon(fresh)	1	Procymidone(0.01), Heptachlor epoxide(0.01), Methomyl(0.04)
Peach(Whole)	1	Chlorpyrifos(0.01), Bitertanol(0.02)
	2	Chlorpyrifos(0.08), Procymidone(0.38), Bitertanol(0.19)
	3	MEP(0.02), Iprodione(0.07), TPN(0.01), Bitertanol(Tr)
	4	Iprodione(0.09), Bitertanol(Tr)
	5	Chlorpyrifos(0.01), Iprodione(0.69)
	6	Chlorpyrifos(0.11), Procymidone(0.02)
	7	CYAP(0.02), Chlorpyrifos(0.05), Myclobutanil(0.27)
Peach(fresh)	1	Procymidone(0.09), Bitertanol(0.02)
	2	CYAP(0.01), Myclobutanil(0.07)

1) The value in parentheses shows detected concentration of pesticide.
2) Tr : below 0.01ppm

表示ガイドライン制定後も10～20%と，ほとんど変化がなく推移していたが[12~17]，今回は，8%と多少減少した．検出例は表示ガイドラインに従った作物の検出例よりも販売者独自の表示による作物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

1998年4月から1999年3月までに都内に入荷した野菜・果実類25種83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，クロルピリホス，CYAP，ピリダフェンチオン，ダイアジノン及びMEPが3種10検体から0.01～0.11ppm検出された．

カーバメイト系農薬では，チオジカルブ及びメソミルが2種4検体から0.03～0.98ppm検出された．このうち，なしの全果からはチオジカルブ及びメソミルの両者が検出されたが，メソミルはチオジカルブに由来すると推察された．

有機塩素系農薬では，ヘプタクロルエポキサイド，ジコホール及びエンドスルファンサルフェート，イプロジオン，プロシミドン，キャプタン，ビンクロゾリン及びTPNが6種9作物からTr.～0.69ppm検出された．

その他の農薬では，テブフェンピラド，ミクロブタニル及びビテルタノールが3種4検体からTr.～0.26ppm検出された．

また農薬の複数残留が，ほうれんそう，りんご，ももなど7種16検体に認められた．

今回の調査では，残留農薬基準及び登録保留基準を超えたものはなかった．農薬の複数残留が認められたものには，今後とも注意を払っていく必要があるが，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，プロシミドンが2種2検体から0.01及び0.03ppm検出された．

カーバメイト系農薬では，メソミルが2種2検体から0.03ppmずつ検出された．

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．

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，

Table 5. Residues of Pesticides[1] in Organic Cultivation Vegetable or the Like

Sample	No.of sample	No.of positive	Organochlorine(ppm) Fungicide Procymidone	Carbamate(ppm) Insecticide Methomyl
Cabbage	4	0	—[2]	—
Chinese cabbage[HAKUSAI]	1	0	—	—
CHINGENSAI	1	0	—	—
Crown daisy[SYUNGIKU]	1	0	—	—
Cucumber[KYURI]	3	1	0.03	—
Egg plant[NASU]	3	0	—	—
Lettuce	3	0	—	—
Mini tomato	1	0	—	—
MOROHEIYA	1	0	—	—
Pimento	3	1	—	0.03
Radish[DAIKON]	1	0	—	—
Radish(leaf)	1	0	—	—
ROKETTO[3]	1	0	—	—
Spinach	2	0	—	—
Sweet potato[SATSUMAIMO]	1	0	—	—
Tomato	5	2	0.01	0.03
Young leaves ofchinese cabbage	4	0	—	—

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) — : not detected

3) ROKETTO is crucifere vegetable and used for salad.

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）小林麻紀，永山敏廣，伊藤正子他：東京衛研年報，**49**, 88-94, 1998

20）田村康宏，永山敏廣，小林麻紀他：食衛誌，**39**, 225-232, 1998.

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）「食品中の残留農薬」：厚生省生活衛生局食品化学課編，1997

23）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.*, **50**, 145-150, 1999

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10年度―

高野伊知郎*, 永山敏廣*, 小林麻紀*, 伊藤正子*, 田村康宏*,
木村奈穂子*, 北山恭子*, 高田千恵子**, 安田和男*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops
(Organophosphorus and Organonitrogen pesticides)
―Apr.1998 ～ Mar.1999―

ICHIRO TAKANO*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, MAKI KOBAYASHI*, MASAKO ITO*, YASUHIRO TAMURA*,
NAOKO KIMURA*, KYOKO KITAYAMA*, CHIEKO TAKADA** and KAZUO YASUDA*

Organophosphorus and organonitrogen pesticide residues in 250 imported crops were investigated. In thirteen kinds of crops, residues of 11 kinds of organophosphorus insecticides and 4 kinds of organonitrogen fungicides were detected. Concentrations of organophosphorus insecticides (Ethion, Chlorpyrifos, etc.) and organonitrogen fungicides (Myclobutanil, Bitertanol, Triadimefon and Triadimenol) were between a trace and 0.47ppm in 11 kinds of crops and 0.02 and 0.22ppm in 4 kinds of crops, respectively.

Six kinds of pesticides detected in 12 kinds of crops are regulated by the tolerance for pesticide residues by the Food Sanitation Law. One kind of pesticide (Etrimfos), which is not a registered agricultural chemical in Japan, was detected in malt produced in Great Britain.

Residues of these pesticides were at levels lower than the tolerance for pesticide residues, the standard for withholding registration of pesticides in Japan, the CODEX maximum residue limits for pesticides or the tolerance in each country, except Triadimenol (0.20ppm in the Chinese pea produced in China).

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, 収穫後使用：postharvest application

緒　　言

多種多様な輸入農産物は，かつて我々の食生活を豊かにするものとして受け入れられた．しかし，今日では安価な食品加工用原料としても大きな需要があり，我が国における食糧確保の面からも必要不可欠なものとなっている．一方，消費者からはその安全性に対して常に不安の声が寄せられており，これら輸入農産物の安全性を確保することは衛生行政上の最重要施策の一つとなっている[1]．特に食品中の残留農薬に関しては，諸外国における農薬使用状況が明らかでない場合が多いことから，作物残留に関する情報提供を求める声も高い．そこで，著者らは昭和57年度より輸入農産物中の残留農薬実態調査を実施してきた[2-13]．本稿では平成10年度に実施した有機リン系農薬及び含窒素系農薬の調査結果について報告する．

実験方法

1．試　　料

1998年4月から1999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68品種250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．

2．調査対象農薬

我が国において食品衛生法による残留農薬基準がある

＊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多摩支所理化学研究科

Table 1. List of Investigated Imported Crops

Sample	Commodity
Vegetables	Cabbage [KYABETSU] (1)[1], Chicory (2), Spinach [HORENSO][2] (3), Trevise (3), Bamboo sprout [TAKENOKO] (2), Carrot[NINJIN][2] (5), Garlic [NINNIKU] (4), Garlic (stem) [NINNIKUNOKUKI] (4), Leek[RIKI] (2), Ginger[SYOGA] (4), Onion[TAMANEGI] (10), Welsh onion[NAGANEGI] (1), Salsify[SEIYOGOBO] (2), Shallot[ESYAROTTO] (2), Celery (1), Celeriac (2), Egg plant[NASU] (1), Okura (4), Pimento[PIMAN][2] (5), Pumpkin[KABOCHA] (6), Asparagus (5), Baby corn (1), Broccoli (7), Cauliflower (1), Sweet corn[2] (4), Chinese pea[SAYAENDO] (4), String pea [SAYAINGEN][2] (5), Green soybean[EDAMAME][2] (1), Mashed potato (2), Potato[3] (3), Taro[SATOIMO][2] (5) 30 species 102 crops
Fruits	
Citrus[4]	Grapefruit[4] (9), Lemon[4] (5), Lime[4] (2), Orange[4] (8) 4 species 24 crops
Others	Avocado[4] (2), Banana[4] (10), Blue berry (7)[2], Cherry[SAKURANBO] (3), Chestnut[MUKIGURI] (2), Grape [BUDO] (5), Kiwifruit[4] (4), Litchi[4] (2), Mango[4] (6), Melon[4] (5), Papaya[4] (4), Pineapple[4] (6), Strawberry[ICHIGO][2] (2) 13 species 58 crops
Beans	Butter bean (1), Coffee bean (6), Garbanzo bean (1), Lentil pea (1), Soybean[DAIZU] (6) 5 species 15 crops
Mushrooms	Matsutake fungus[MATSUTAKE] (2), Shiitake fungus[SHIITAKE] (5) 2 species 7 crops
Nuts	Almond (4), Cashew nut (3), Peanut (1), Pine seed [MATSUNOMI] (1), Pistachio nut (1), Qeensland nut (1), Walnut[KURUMI] (1) 7 species 12crops
Cereals	Flour [KOMUGIKO] (7), Corngrits (2), Corn flour (1), Corn meal (2), Corn starch (1), Buckwheat[GENSOBA] (4), Malt [BAKUGA] (9), Oatmeal (1) 5 species 27 crops
Teas	Oolong tea[URONCHA] (2), Tea (3) 2 species 5 crops
	Total 68 species 250 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) precooked frozen potato
4) This sample was analyzed both whole and flesh

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ている農薬などから，有機リン系41種及び含窒素系18種の計59種類を選び，調査した（Table 2）．

3．装　　置

(1) ガスクロマトグラフ：㈱島津製作所製 GC-14A及びGC-14BP（検出器：FPD及びFTD）

(2) キャピラリーガスクロマトグラフ：Varian Associates 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) 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245号（平成10年10月12日），残留農薬分析法[14] 及び増補残留農薬分析法[15] 等に準じた．

結果及び考察

1．農薬残留実態

輸入農産物68品種250検体中13品種（検出率19%，以下同様）30検体（12%）から11種類の有機リン系農薬及び4種類の含窒素系農薬が，痕跡（0.01ppm未満）～0.47ppm検出された．

(1)果実類

果実類から検出した農薬をTable 3に示した．

Table 2. The List of Serveyed Pesticide

Organophosphorus pesticide (41)	azinphos-methyl, bromophos-ethyl, butamifos, cadusafos, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chlorfenvinphos(CVP-*E,Z*), demeton-*O*, demeton-*S*, diazinon, dioxathion, dichlorvos(DDVP), dimethoate, edifenphos(EDDP), EPN, ethion, ethoprophos, etrimfos, fenchlorphos, fenitrothion(MEP), fensulfothion, fenthion(MPP), fosthiazate, isofenphos, malathion, mecarbam, methidathion(DMTP), parathion, parathion-methyl, phenthoate(PAP), phosalone, pirimiphos-methyl, phosmet(PMP), prothiofos, pyraclofos, quinalphos, terbufos, tetrachlorvinphos(CVMP), thiometon, tolclophos-methyl, trichlorfon(DEP)
Organonitrogen pesticide (18)	bitertanol, esprocarb, fenarimol, flusilazole, flutolanil, mefenacet, mepronil, metribuzin, myclobutanil, pacrobutrazol, pendimethalin, pretilachlor, propiconazole, pyridaben, tebufenpyrad, thenylchlor triadimefon, triadimenol
	Total 59 kinds

1) Values in parentheses indicate the number of individual pesticide.

果実類のうち柑橘類は4品種24検体中3品種（75%）9検体（38%）から3種類の有機リン系殺虫剤が全果で0.01～0.47ppm検出された．いずれも果肉からは検出されず，農薬の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クロルピリホス，メチダチオン（DMTP）及びエチオン，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及びDMTPがそれぞれ検出された．これらは例年当該果実より検出される農薬である[8-13]．過去6年間における柑橘類からのクロルピリホスの検出率は7～30%で推移しているが，今年度も21%でこの範囲内であった．有機リン系農薬が検出された柑橘類はいずれもアメリカ産であった．グレープフルーツ2検体から検出されたエチオンは国際食品規格残留農薬許容量（5ppm）の1/10以下であったが，環境庁の定める登録保留基準値（果実類0.3ppm）を超えていた．全果から0.41～0.47ppm検出され，果肉から検出されていないことから，エチオンは果皮に局在化していることが明らかであった．エチオンは脂溶性が高い農薬であるため，精油に富む柑橘類果皮へ浸透し，植物組織内で保護されて残留量が高くなったものと推察された．エチオンの一日許容摂取量（以下，ADIと略す）は0.006mg/kg体重/日であり，これは体重50kgのヒトが全果まるごと1.6kg毎日継続摂取することに相当すること，また，実際の可食部である果肉からは農薬が検出されていないこと等から，喫食上の問題はないと考える．

柑橘類を除く13品種58検体中5品種（38%）13検体（22%）から4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痕跡～0.23ppm検出された．有機リン系殺虫剤では各国産バナナからクロルピリホスが検出された．バナナからのクロルピリホスの検出率は今年度も50%と高く，検出率及び残留濃度とも例年と同程度であった[8-13]．台湾産バナナ全果からはジチオ型殺線虫剤テルブホスが検出された．テルブホスはADI 0.00016mg/kg体重/日の普通物で，今回の検出濃度は残留基準（0.05ppm）の2/5であること，可食部である果肉から検出されていないこと等から特に喫食上の問題はないと考える．含窒素系殺菌剤では，エクアドル産バナナからビテルタノールが検出された．ビテルタノールの果皮から果肉への移行率は数%程度であり，著者らが以前バナナで調査した結果とも一致した[16]．また，フィリピン産パイナップルからトリアジメホン及びトリアジメノールが，またコスタリカ産バナナ及びアメリカ産チェリーからミクロブタニルが検出された．これらの農薬の果皮から果肉への移行率も低く，残留濃度は昨年度の調査結果とほぼ同程度であった[13]．農薬の果肉への移行率については農薬の持つ化学的性質が最も大きく影響するが[17]，他にも農薬の散布方法，散布後の経過時間，収穫農産物の保存状況などの要因が関与しており[18]，今後も引き続き調査したいと考えている．

日本では特定毒物に指定されている農薬として，例年，台湾産ライチからパラチオンが検出されていたが[8-13]，今年度は中国産ライチから初めてパラチオンメチルが検出された．日本国内では使用が禁止されているこれらの農薬が諸外国で日常的に使用されることも多い[19]．また，特定の作物からは特定の農薬が検出される傾向があるが，今回のように同一品種の作物でも生産国によって使用される農薬が異なる場合もあり，一概に残留農薬を予想することは困難なのが現状である．今後，輸入農産物中の農薬使用実態に関する国内外の情報をより多く収集する必要がある．

Table 3. Pesticide Residues in Fruits

Sample	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Citrus						
Grapefruits (whole)	USA	9	4	Chlorpyrifos	0.01	0.3[1], 0.3[3], 1.0[4]
				DMTP	0.04	5[2], 2[3], 2.0[4]
				Ethion	0.41, 0.47	0.3[2], 5[3], 2.0[4]
Lemon (whole)	USA	5	2	Chlorpyrifos	0.03, 0.04	0.3[1], 0.3[3], 1.0[4]
Orange (whole)	USA	8	3	Chlorpyrifos	0.01,0.03	0.3[1], 0.3[3], 1.0[4]
				DMTP	0.31	5[2], 2[3], 2.0[4]
Others						
Banana (whole)	Ecuador	4	2	Bitertanol	0.23	0.5[1], 0.5[3]
				Chlorpyrifos	Tr[5], 0.01	0.5[1]
	Costarica	2	2	Myclobutanil	0.03, 0.22	2.0[1]
				Chlorpyrifos	0.01	0.5[1]
	Philippines	2	2	Chlorpyrifos	0.01, 0.02	0.5[1]
	Taiwan	2	1	Terbufos	0.02	0.05[1], 0.05[3]
(flesh)	Ecuador	4	1	Bitertanol	0.02	0.5[1], 0.5[3]
	Costarica	2	1	Myclobutanil	0.09	2.0[1]
Cherry	USA	3	1	Myclobutanil	0.08	1.0[1], 1[3], 5.0[4]
Pineapple (whole)	Philippines	6	2	Triadimefon	0.03, 0.06	0.5[2], 2[3]
				Triadimenol	0.04	1[3]
Litchi (whole)	Taiwan	1	1	Chlorpyrifos	0.01	0.5[1]
	china	1	1	Parathion-methyl	0.02	0.2[1]
Mango (whole)	Philippines	4	1	Parathion-methyl	0.02	0.2[1]
				PAP	0.01	0.1[2]
(flesh)	Philippines	4	1	Parathion-methyl	0.01	0.2[1]

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

(2)野菜類

野菜類から検出された農薬を Table 4 に示した.

30品種102検体中２品種（７%）３検体（３%）から２種類の有機リン系殺虫剤及び２種類の含窒素系殺菌剤が0.02～0.20ppm検出された.

中国産ホウレンソウから有機リン系殺虫剤パラチオンが，中国産サヤエンドウからパラチオンメチルが検出された．いずれも食品衛生法残留農薬基準を下回るものであった．例年，サヤエンドウから比較的高く検出されるジメトエートが今年度は検出されなかった．含窒素系殺菌剤については，中国産及び台湾産サヤエンドウからトリアジメノールが，中国産サヤエンドウからトリアジメホンが検出された．トリアジメノールには残留基準及び登録保留基準が設定されていないが，国際食品規格残留農薬許容量を超えるものもあった．トリアジメノールはそれ自体が農薬として使用される他にトリアジメホンが植物体中で代謝され生成することも知られており[15]，このため残留量が比較的高くなったとも考えられる．トリアジメノールは ADI0.05mg/kg体重/日，経口投与におけるLD_{50}はラットで700-1200mg，マウスで1300mg，ト

Table 4. Pesticide Residues in Vegetables and Cereals

Sample	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Vegetables						
Chinese pea	China	3	1	Triadimefon	0.06	1[2], 0.05[3]
				Triadimenol	0.20	0.1[3]
				Parathion-methyl	0.05	1.0[1], 0.05[3]
	Taiwan	1	1	Triadimenol	0.02	0.1[3]
Spinach	China	3	1	Parathion	0.02	0.3[1]
Cereals						
Corngrits	USA	1	1	Diazinon	0.08	0.1[2]
				MEP	Tr[5]	1.0[1], 10[3]
Malt	Great Britain	1	1	Etrimfos	0.01	10[4]
	France	1	1	Pirimiphos-methyl	0.01	1.0[1], 10[3]
	New Zealand	1	1	Pirimiphos-methyl	0.04	1.0[1], 10[3]
		1	1	Pirimiphos-methyl	0.03	1.0[1], 10[3]
Oatmeal	Australia	1	1	MEP	0.05	1.0[1], 10[3]

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

リアジメホンはADI 0.03mg/kg体重/日，ラット及びマウス経口投与における LD_{50}>1000mgである[20]．これらのデータから比較的安全性の高い農薬と考えられるが，今後も残留状況の推移を観察していく必要がある．

(3)豆類，キノコ類，種実類及び茶類

豆類，キノコ類及び種実類の16品種39検体について調査した結果，いずれからも農薬は検出されなかった．平成3年の調査で中国産ピーナッツからジメトエートが0.02ppm検出されたが，それ以後，有機リン系及び含窒素系農薬の検出例はない．

(4)穀　　類

5品種7検体中3品種（60%）5検体（71%）から4種の有機リン系殺虫剤が痕跡～0.08ppm検出された．ダイアジノンは登録保留基準の4/5，MEP及びピリミホスメチルはそれぞれ残留農薬基準の1/100未満～1/20，1/100～1/25であった．麦芽から検出されたエトリムホスは我が国では既に登録失効しているが，イギリスでは現在もポストハーベスト使用が認められている農薬の一つである[19]．エトリムホスはADI 0.003mg/kg体重/日の普通物であり，今回の検出量はイギリスにおける穀類中の残留基準（10ppm）の1/1000であった．

2．地域別による比較

輸入農産物の原産国を前報[13]と同様に5地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめ，Table 5に示した．

有機リン系及び含窒素系農薬の検出率はアメリカ産12%，アジア産13%，オセアニア産7%及びヨーロッパ産8%であり，全般に低い傾向であった．また，アフリカ産からはいずれの農薬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10%，5%，アメリカ産は9%，3%といずれの地域も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

1998年4月から1999年3月に都内の市場等で購入した輸入生鮮農産物等68品種250検体について，有機リン系農薬及び含窒素系農薬の残留実態調査を行った．

1．農作物中の農薬残留実態

11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24検体から痕跡～0.47ppm検出された．

含窒素系農薬では4種類の殺菌剤（ミクロブタニル，トリアジメホンなど）が8検体から0.02～0.22ppm検出された．

食品衛生法残留農薬基準値が設定されている農薬（クロルピリホス，テルブホスなど）8種類が12品種（18%）

Table 5. Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No. of sample	No. of positive sample		Total	Detected rate (%)
		Organophosphorus insecticide	Organonitrogen fungicide		
America	115	12 (5)[1)]	4 (2)	14 (7)	12
Asia	80	8 (5)	4 (2)	11 (7)	13
Oceania	27	2 (2)	0	2 (2)	7
Europe	25	2 (2)	0	2 (2)	8
Africa	3	0	0	0	0
Total	250	24 (11)	8 (4)	29 (15)	11

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

23検体（9%）から検出された．いずれも基準値以内であったが，特定毒物であるパラチオン及びパラチオンメチルが本年度も微量ながら検出された．

残留農薬基準値が設定されていない農薬（エチオン，DMTP，PAPなど）7種類が7品種（10%）11検体（4%）から検出された．また；イギリス産麦芽から日本では登録されていない農薬であるエトリムホスが検出されたが，いずれも登録保留基準，国際食品規格残留農薬許容量あるいは各国の残留基準未満であった．

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，アジア産が同程度で，次いでオセアニア産及びヨーロッパ産がその約半分程度であった．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）「東京都における食品安全確保対策にかかる基本方針」：東京都生活文化局消費者部，1999.
2）永山敏廣，田村行弘，真木俊夫他：東京衛研年報，**34**, 165-170, 1983.
3）永山敏廣，観　公子，田村行弘他：東京衛研年報，**35**, 210-218, 1984.
4）永山敏廣，真木俊夫，観　公子他：食衛誌，**30**, 438-443, 1989.
5）永山敏廣，真木俊夫，川合由華他：東京衛研年報，**41**, 125-132, 1990.
6）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：東京衛研年報，**42**, 134-140, 1991.
7）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**43**, 130-136, 1992.
8）小林麻紀，永山敏廣，塩田寛子他：東京衛研年報，**44**, 155-161, 1993.
9）塩田寛子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**45**, 98-104, 1994.
10）小林麻紀，永山敏廣，伊藤正子他：東京衛研年報，**46**, 127-133, 1995.
11）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**47**, 141-147, 1996.
12）橋本常生，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**48**, 163-169, 1997.
13）田村康宏，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**49**, 95-100, 1998.
14）後藤真康，加藤誠哉編著：残留農薬分析法，1980，ソフトサイエンス社，東京.
15）後藤真康，加藤誠哉編著：増補残留農薬分析法，1987，ソフトサイエンス社，東京.
16）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**, 400-403, 1995.
17）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**, 383-392, 1995.
18）「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，222-228, 1989，㈳日本植物防疫協会，東京.
19）「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.
20）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.*, **50**, 151-157, 1999

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10年度—

小林麻紀*, 永山敏廣*, 高野伊知郎*, 伊藤正子*, 田村康宏*
木村奈穂子*, 北山恭子*, 高田千恵子**, 安田和男*

Survey of Pesticide Residues in Imported Crops (Organochlorine, N-methyl carbamate and the other pesticides) —Apr.1998.~Mar.1999.—

MAKI KOBAYASHI*, TOSHIHIRO NAGAYAMA*, ICHIRO TAKANO*,MASAKO ITO*,YASUHIRO TAMURA*, NAOKO KIMURA*,KYOKO KITAYAMA*,CHIEKO TAKADA** and KAZUO YASUDA*

Pesicide residues in 250 imported crops were investigated from April 1998 to March 1999.

Residues of organochlorine pesticides, five kinds of insecticides(T-BHC, T-DDT, Dicofol, Endosulfan and Endosulfan sulfate) and two kinds of fungicides(Captan and Iprodione) were detected between 0.02 and 1.1ppm.

As for carbamate pesticides, 2 kinds of insecticides(NAC and Methomyl) and one kindof herbicide(CIPC) were detected between 0.04 and 3.6ppm.

In the others, 3 kinds of fungicides(Imazalil, OPP and TBZ) and one kind of herbicide(2,4-D) were detected between a trace and 6.9ppm.

NAC(Carbaryl) in grapes exceeded the maximum limit in the tolerance for residues in Japan. Residus of these pesticides were at the leveles lower than the tolerance for pesticide residues in origin and CODEX maximum residues limits for pesticides.

As for the kind of detected pesticides in imported crops, there was scarcelyany difference among 5 regions. The difference based on the kind of imported crops was recognized.

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[5-16]．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11年度の調査結果を報告する．

実験方法

1．試　料

1998年4月から1999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68種250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．

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

* 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多摩支所理化学研究科

Table 1. List of Investigated Imported Crops

Sample	Commodity
Vegetables	Cabbage [KYABETSU](1)[1] ,Chicory(2),Spinach [HORENSO][2] (3),Trevise(3), Bamboo sprout [TAKENOKO](2), Carrot[NINJIN][2] (5), Garlic [NINNIKU](4), Garlic(stem) [NINNIKUNOKUKI](4), Leek [RIKI](2), Ginger[SYOGA](4), Onion [TAMANEGI](10), Welsh onion [NAGANEGI](1), Salsify [SEIYOGOBO](2), Shallot [ESYAROTTO](2), Celery(1), Celeriac(2), Egg plant [NASU](1), Okura(4), Pimento [PIMAN][2] (5), Pumpkin [KABOCHA](6), Asparagus(5), Baby corn(1), Broccoli(7), Cauliflower(1), Sweet corn[2] (4), Chinese pea [SAYAENDO](4), String pea[SAYAINGEN][2] (5), Green soybean [EDAMAME][2] (1), Mashed potato(2), Potato[3] (3), Taro [SATOIMO][2] (5) 30 species 102 crops
Fruits	
Citrus[4]	Grapefruit[4] (9), Lemon[4] (5), Lime[4] (2), Orange[4] (8) 4 species 24 crops
Others	Avocado[4] (2), Banana[4] (10),Blue berry(7)[2] , Cherry[SAKURANBO](3), Chestnut[MUKIGURI](2), Grape [BUDO](5), Kiwifruit[4] (4), Litchi[4] (2), Mango[4] (6), Melon[4] (5), Papaya[4] (4), Pineapple[4] (6), Strawberry [ICHIGO][2] (2) 13 species 58 crops
Beans	Butter bean(1), Coffee bean(6), Garbanzo bean(1), Lentil pea(1), Soybean[DAIZU](6) 5 species 15 crops
Mushrooms	Matsutake fungus [MATSUTAKE](2), Shiitake fungus [SHIITAKE](5) 2 species 7 crops
Nuts	Almond(4), Cashew nut(3), Peanut(1), Pine seed [MATSUNOMI](1), Pistachio nut(1), Qeensland nut(1), Walnut [KURUMI](1) 7 species 12 crops
Cereals	Flour [KOMUGIKO](7), Corngrits(2), Corn flour(1), Corn meal(2), Corn starch(1), Buckwheat [GENSOBA](4), Malt [BAKUGA](9), Oatmeal(1) 5 species 27 crops
Teas	Oolong tea [URONCHA](2), Tea(3) 2 species 5 crops
	Total 68 species 250 crops

1) Values in parentheses indicate number of individual samples.
2) include the cut or frozen commodity
3) precooked frozen potato
4) This sample was analyzed both whole and flesh.

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，Table 2に示す50種の農薬を調査対象とした．

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．なお，2,4-Dは柑橘類について，イマザリル，チアベンダゾール（TBZ）及びオルトフェニルフェノール（OPP）はバナナ及び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），GC-17A（検出器：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），Hewlett Packard社製 HP5890（検出器：NPD）

(3)高速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ー質量分析計：Finnigan Mat 社製 Tracker™ System，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)粉砕器：㈲廣澤鉄工所製 ダンシングアジテーター

Table 2. The List of Serveyed Pesticide

Organochlorine pesticide (20)[1]	α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, *p,p'*-DDT, *p,p*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, aldrin, captan, captafol, chlorobenzilate, dicofol, dieldrin, endrin, endosulfan-Ⅰ, endosulfan-Ⅱ, endosulfan sulfate, heptachlor, heptachlorepoxide
Carbamate pesticide (24)	aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, bendiocarb, carbaryl (NAC), carbofuran, chlorpropham (CIPC), diethofencarb, ethiofencarb, ethiofencarb sulfone, ethiofencarb sulfoxide, fenobucarb (BPMC), isoprocarb (MIPC), methomyl, metolcarb (MTMC), methiocarb, methiocarb sulfone, methiocarb sulfoxide, oxamyl, pirimicarb, propoxur (PHC), thiodicarb, XMC, xylylcarb (MPMC)
Others (6)	2,4-D, carbendazim (MBC), imazalil, *o*-phenyl phenol (OPP), piperonyl butoxide, thiabendazole (TBZ)
	Total 50 kinds

1) Values in parentheses indicate the number of individual pesticide.

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[17]及び増補残留農薬分析法[18]等に準じた．

結果及び考察

1．農薬残留実態

68種250作物中16種41作物（検出率16%，以下同様）から14種の農薬が，痕跡（0.01ppm未満）～6.9ppm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 3に，果実類，野菜類及び茶葉類はTable 4に示した．

(1)柑橘類

4種24作物全て（100%）から5種（検出農薬名：イマザリル，カルバリル（NAC），TBZ，OPP及び2,4-D）の農薬が痕跡～6.9ppm検出された（Table 3）．

平成3年度から9年度までの過去7年間の柑橘類における農薬の検出率は，48～87%であったが，本年度は100%と全てからいずれかの農薬が検出された．残留濃度の平均値は，1.8ppmと過去7年間における平均値0.27～0.84ppmの範囲と比較してやや高い値であった．これは，昨年度[16]から検査項目に加えた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0.67ppmと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，レモン及びオレンジ；以下同様）が3種20作物（80%）から0.05～2.7ppm検出された．これらはいずれも全果の残留基準値5.0ppmを下回っていた．検出率は80%と平成8年度及び9年度の30～50%と比較すると高頻度であり，平成5年度から7年度の67～79%に近かった．また，残留濃度の平均値は1.0ppmと平成2年度から9年度の0.47～1.4ppmの範囲内[5-16]であった．

また，イマザリルの一部は果肉からも検出されたが，その濃度は全果の検出値の約5%以下であった．

NAC（オレンジ）が，1種1作物（4%）から0.33ppm検出された．オレンジには基準が設定されていないが他の柑橘類に設定されている1.0ppmの約1/3であった．

昨年度から検査項目に加えた殺菌剤であるTBZ（グレープフルーツ，レモン，ライム及びオレンジ）が4種22作物（91%）及びOPP（グレープフルーツ，レモン及びオレンジ）が3種6作物（25%）からそれぞれ0.09～4.3ppm，痕跡～6.9ppm検出された．

TBZ及びOPPは柑橘類に食品添加物の防かび剤としていずれも0.010g/kgの使用基準があり，ADIはそれぞれ0.1mg/kg体重/日及び0.02mg/kg体重/日である．残留濃度の平均値はTBZが0.63ppm，OPPが1.7ppmであった．これらはFAO/WHO及び米国の柑橘類における残留許容量の約1/2以下であった．TBZ及び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，ライム及びオレンジ）が3種5作物（19%）から0.02～0.32ppm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1/6及び1/15以下であった．2,4-Dやイマザリルは，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[19]．今回も，果肉からそれらの農薬が検出されているが，残留濃度は低かった．

(2)果実類（柑橘類を除く）

果実類13種58作物中3種7作物（12%）から5種

Table 3. Pesticide Residues in Citrus Fruits

Sample	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Grapefruits						
(whole)	USA	9	9	Imazalil	0.05, 0.43, 0.51, 0.63 0.88, 1.1, 1.7, 1.8	5.0[1], 5[3], 10[4,6]
				TBZ	0.42, 0.96, 1.0, 1.0, 1.1, 1.4, 1.5, 1.8, 2.0	10[3], 10[4,6]
				OPP	0.07, 0.10, 0.30	10[3], 10[4,6]
(flesh)	USA	9	6	Imazalil	0.01, 0.03, 0.04, 0.04, 0.04, 0.05	
				TBZ	0.02, 0.02, 0.02, 0.03, 0.12, 0.12	
Lemon						
(whole)	USA	4	4	Imazalil	0.10, 1.3, 1.4, 2.0	5.0[1], 5[3], 10[4]
				TBZ	Tr[5], 0.02, 0.27, 0.75	10[3], 10[4,6]
				OPP	1.5,1.7	10[3], 10[4]
				2,4-D	0.09, 0.16, 0.32	2[3], 5[4]
	Chile	1	1	Imazalil	0.10	
				TBZ	0.02	
(flesh)	USA	4	3	Imazalil	0.05	
				TBZ	0.01	
				OPP	Tr	
				2,4-D	0.02, 0.03, 0.03	
Lime						
(whole)	Mexico	2	2	TBZ	0.02	
				2,4-D	0.07	
Orange						
(whole)	Chile	1	1	Imazalil	1.3	
				TBZ	2.0	
	South Africa	1	1	Imazalil	1.6	
				TBZ	1.9	
	Swaziland	1	1	Imazalil	0.14	
				TBZ	0.05	
				2,4-D	0.02	
	USA	5	5	NAC	0.33	0.05[1], 0.05[3]
				Imazalil	0.22, 1.3, 2.1, 2.7	5.0[1], 5[3], 10[4,6]
				TBZ	1.8, 2.8, 3.6, 4.3	10[3], 10[4,6]
				OPP	6.9	10[3], 10[4]
(flesh)	Chile	1	1	TBZ	0.02	
	South Africa	1	1	Imazalil	0.01	
	USA	5	1	Imazalil	0.06	
				TBZ	0.05, 0.48, 0.52	

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

(イプロジオン，イマザリル，キャプタン，NAC及びTBZ）の農薬が0.01～2.2ppm検出された（Table 4）．

このうち，ぶどうから検出されたNACは残留基準1.0ppmの2倍の濃度であった．NACは，ADIが0.003mg/kg体重/日の劇物（5%以下普通物）である．今回の残留量の2.0ppmは，体重50kgの人が毎日約7kgのぶどうを継続して喫食する量に相当する．通常の喫食量を考えると健康上特に問題のないものの，過量に残留することのないよう，使用方法等に留意する必要がある．

その他残留基準のある農薬では，イプロジオン（ぶどう及びいちご）が2種5作物（18%）から0.01～0.42pm検出された．残留濃度は各果実の基準値のそれぞれ1/60，1/400及び1/2000以下であった．イプロジオンは昨年度[16]，フィリピン産のバナナ全てから検出されたが，今回は全く検出されなかった．なお，バナナではイマザリルが平成2年度[9]の検査開始以来初めてエクアドル産のものから検出された．検出値は残留基準値の1/50であった．また，同じバナナからTBZが使用基準の1/100レベルで検出された．イマザリル及びTBZともに果肉からも検出されたが，残留濃度は少なく，TBZで設定されている果肉への使用基準の1/40であった．このように農薬の使用状況は調査年度によって変動するため，動向を注意深く把握していく必要がある．

キャプタンは，検出されたぶどう及びいちごには残留基準が設定されていないが，他の作物に設定されている基準値5ppmの約1/2，1/50及び1/250であった．

(3)野菜類

野菜類では，30種102作物中5種5作物（5%）から4種のカーバメイト系農薬（NAC，メソミル及びクロルプロファム（CIPC））が0.04～3.6ppm検出された

残留農薬基準のある農薬では，CIPC（ポテト及びマッシュポテト）が2種2作物（5%）から0.05及び0.54ppm検出された．残留濃度は基準値の1/90以下であった．CIPCは諸外国でポストハーベスト使用され，ポテト食品からの検出頻度が高い[8-10, 12, 14-16]．フライドポテトなど加熱調理後も残存する[20]ことから今後も残留状況を注意深く観察していく必要がある．

その他，NAC（オクラ）が1種1作物（1%）から3.6ppm検出された．検出されたオクラには基準が設定されていないが，他の作物に設定されている基準値1.0ppmを超えていた．

この濃度をADIと比較すると体重50kgの人が約4kgのオクラを毎日喫食する量に相当する．実際の喫食量から問題のない量ではあるが，注意深く観察する必要がある．

メソミルは2種2作物（2%）から0.04ppm（インゲン）及び0.07ppm（ピーマン）検出されたが，登録保留基準値の1/7以下であった．

(4)茶葉類

茶葉類では，2種5作物中2種4作物（80%）から有機塩素系殺虫剤である総BHC（ウーロン茶及び紅茶），総DDT（ウーロン茶）及びジコホール（ウーロン茶及び紅茶）が0.03～0.34ppm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茶湯として測定したとき，それぞれ0.2ppm（総BHC及び総DDT）及び3.0ppm（ジコホール）が設定されている．しかし，今回は茶葉を直接測定しており，また，検出されたウーロン茶及び紅茶は，半発酵茶及び発酵茶であるため基準は適用されない．茶湯への農薬の浸出は，BHC及びDDTにおいては25%程度であり[5]，飲用摂取量は少ないと考える．BHC及びDDTは，難分解性及び高蓄積性のため登録が失効されている．今回の検出量は低く，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．しかし，原産国での使用実態は明らかではなく，製造中止後も在庫品を使用している可能性もある．BHC及びDDTの消失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．今後も引き続きその動向を把握していきたい．ジコホールはDDT類の分解過程で生成される代謝物の一つでもあり[21]，検出量全てがジコホールが使用されたものによるか不明である．

その他，エンドスルファン（0.21ppm）及びその代謝物であるエンドスルファンサルフェート（0.15ppm）が紅茶から検出されたが，茶湯として測定時に設定されている登録保留基準値以内であった．

茶葉類には，多様な有機塩素系殺虫剤が残留していることが示唆された．

(5)穀類，種実類，豆類及びキノコ類

穀類5種27作物，種実類7種12作物，豆類5種15作物及びキノコ類2種7作物からはいずれの農薬も検出されなかった．

2．地域別による比較

輸入農産物の原産国を5地域に分類し，地域別に農薬の検出状況をまとめ，Table 5に示した．

農薬の検出率は，アフリカ産が67%と最も高く，次いでアメリカ産，アジア産，ヨーロッパ産，オアセアニア産の順であった．アフリカ産の検出率が高かった原因

Table 4. Pesticide Residues in Fruits,Vegetables and Tea leaves

Sample	Country	No. of sample	No. of positive	Pesticide	Residue (ppm)	Tolerance (ppm)
Fruits						
Banana						
(whole)	Ecuador	4	2	Imazalil	0.04, 0.04	2.0[1], 2[3]
				TBZ	0.03	3[3]
(flesh)	Ecuador	4	1	Imazalil	0.01	
				TBZ	0.01	
Grape	Chile	1	1	Captan	0.10	
	USA	4	2	Iprodione	0.06,0.42	25[1], 10[3], 60[4]
			1	NAC	2.0	1[1], 5[3], 10[4]
Strawberry	Newzealamd	1	1	Captan	2.2	20[3]
				NAC	0.06	7[3]
	USA	1	1	Captan	0.02	20[3], 25[4]
				Iprodione	0.01	20[1], 10[3], 15[4]
Vegetables						
Okura	China	4	1	NAC	3.6	10[3]
Pimiento	Saudiarabia	1	1	Methomyl	0.07	0.5[2], 1[3]
String pea	Oman	1	1	Methomyl	0.04	0.5[2], 2[3]
Potato	Canada	2	1	CIPC	0.54	50[1]
Mushed potato	USA	2	1	CIPC	0.05	50[1], 50[4]
Tea leaves						
Oolong tea	China	2	2	T-DDT	0.18, 0.34	0.2[1]
				T-BHC	0.02	0.2[1]
				Dicofol	1.1	3.0[1], 5[3]
Tea	France	1	1	T-DDT	0.04	0.2[1]
	India	1	1	T-BHC	0.03	0.2[1]
				Endosulfan	0.21	0.5[2]
				Endosulfan sulfate	0.15	
				Dicofol	0.08	3.0[1], 5[3]

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

は検査作物数が3作物と少なく，また，そのうち2作物が柑橘類であったため，ポストハーベスト使用された農薬が検出されたことによると考える．

同様にアメリカ産の検出率も柑橘類のポストハーベスト使用農薬の検出により高まったと考えられ，昨年度[16]と類似の傾向がみられた．

アジア産及びヨーロッパ産からの有機塩素系農薬の検出は茶葉に由来したものであり，その他については，全体的に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る傾向が認められた．地域差は平成5年度[12]以降大きな違いはみられなくなった．これは農作物ごとに適用農薬を変えるなど先進国の技術が導入されたことによるとも考えられる．

まとめ

1998年4月から1999年3月に都内の市場等で購入した輸入生鮮農作物等68種250作物について，残留農薬の実態調査を行った．

1．農作物中の農薬残留実態

有機塩素系農薬では，5種の殺虫剤（総BHC，総DDT，ジコホール，エンドスルファン及びエンドスルファンサルフェート）が0.02～0.34ppm，2種の殺菌剤（イプロジオン及びキャプタン）が0.01～2.2ppm検出された．

カーバメイト系農薬は，2種の殺虫剤（NAC及びメソミル）が0.04～3.6ppm，1種の除草剤（CIPC）が0.05～0.54ppm検出された．

Table 5. Influence of Original Country in the Pesticide Residues in Agricultural Commodities

Area	No.of sample	No.of positive sample						Total	Detected rate(%)
		Organochlorine		Carbamate		Others			
		Insecticide	Fungicide	Insecticide	Herbicide	Fungicide	Herbicide		
America	115	0	4(2)[1)]	2(1)	2(1)	23(4)	4(1)	31(9)	27
Asia	80	3(6)	0	3(2)	0	0	0	6(8)	7
Oceania	27	0	1(1)	1(1)	0	0	0	1(2)	3
Europe	25	1(1)	0	0	0	0	0	1(1)	4
Africa	3	0	0	0	0	2(2)	1(1)	2(3)	67
Total	250	6(5)	5(2)	6(2)	2(1)	25(3)	5(1)	41(14)	16

1) Values in parentheses indicate number of detected pesticides.

その他の農薬では，3種の殺菌剤（イマザリル，TBZ及びOPP）が痕跡～6.9ppm及び1種の除草剤（2,4-D）が0.02～0.32ppm検出された．

このうち，ぶどうから検出されたNACは残留基準を超えていた．しかし，FAO/WHOの最大残留許容量及び各輸出国の農薬許容量を超えたものはなく，喫食上特に問題となる作物はなかった．

2．地域別による比較

検出された農薬の種類に地域による差はほとんどなく，輸入される農作物の種類に由来する傾向が認められた．

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.

16）伊藤正子，永山敏廣，小林麻紀他：東京衛研年報，**49**, 101-108, 1998.

17）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．

18）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．

19）永山敏廣，小林麻紀，塩田寛子他：食衛誌，**36**, 383-392, 1995.

20）Nagayama,T., Kikugawa,K.:*Jpn.J.Toxicol.Environ. Health*, **38**, 78-83, 1992.

21）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.*, **50**, 158-166, 1999

都内搬入米におけるカドミウム，銅，ヒ素の含有量について（第2報*）
ー1981年から1998年までの試験成績の概要ー

小野塚 春 吉**，雨 宮 敬**，水 石 和 子**，山野辺 秀 夫**，
藤 井 孝**，大 西 和 夫**

The Contents of Cadmium, Copper and Arsenic in Rice Carried into Tokyo（Ⅱ）
ーAn Analysis of Examination Results from 1981 to 1998ー

HARUKICHI ONOZUKA**, TAKASHI AMEMIYA**, KAZUKO MIZUISHI**,
HIDEO YAMANOBE**, TAKASHI FUJII** and KAZUO ONISHI**

Keywords：米 rice, 汚染 pollution, カドミウム cadmium, 銅 copper, ヒ素 arsenic, 許容基準 permissible value, 濃度分布 content distributed, 農用地汚染 agricultural soil pollution

はじめに

1955年に荻野らによる学会発表を契機に，イタイイタイ病が全国的に知られるようになった．その後富山県及び国では,研究班を組織し原因究明の調査研究に着手した．そして1968年5月「イタイイタイ病の本態は,カドミウムの慢性中毒によりまず肝臓障害を生じ,次いで骨軟化症を生じ,これに妊娠,授乳，内分泌の変調,老化および栄養としてカルシウム等の不足などが誘因となってイタイイタイ病という疾患を形成した」との，いわゆる厚生省見解を発表した[1]．

またその後厚生省は,食品衛生調査会委員及び専門家により構成された微量重金属調査研究会の報告[2]を受けて,米の安全基準を「玄米で1.0 ppm未満」を設定し[3]，同年10月に食品衛生法に基づく「食品,添加物等の規格基準」の改正を行った[4,5]．

一方,東京都は独自に「玄米及び精米で0.4ppm未満」の基準を設定し,「都民の健康と生命の安全を確保するため,カドミウム等汚染のおそれのある米穀を都内搬入時点において検査する態勢を整備し,その流通を防止する」ことを目的に，1973年度から年度毎に検体採取計画を立て検査を実施している．その検査の一部を当衛生研究所が担当している．

国際的にもカドミウム及び微量元素の低濃度暴露による健康影響が注目されており，FAO/WHO合同食品規格計画食品添加物・汚染物質部会（CCFAC）において,食品中のカドミウム及び鉛の基準値が審議されている[6-8]．

1999年3月に開催された第31回CCFACでは，デンマークから食品（10の食品群に区分）中のカドミウムに関する基準案が提出されている．このデンマーク案によれば,米については「小麦と米」として0.2mg/kgが提案されている．

1973年度から80年度まで衛生研究所が実施した検査成績については,既に伊藤らにより概要が報告されている[9]．また,山野辺らにより1984年度から87年度にかけての検体から，無作為抽出した試料（100検体）により実施した各種微量元素濃度に関する研究結果も報告されている[10]．

本報では,伊藤らにより報告された以後，1981年度から98年度まで18年間の検査成績の概要を報告する．

試料及び方法

1．試　　料

1981年4月から98年3月までに各産地から都内米穀倉庫に搬入された米を,厚生省の通知（昭和45年10月23日付,環食第473号）[5]に従ってサンプリングしたものを分析検体とし，そのうちの一定量を試験に供した．

なお，国内産米は玄米であり，輸入米は精米である．

2．試験方法

カドミウム及び銅：試料10.0 gを正確に秤取り,硫硝酸灰化法により湿式分解したのち,分解液をアンモニア水

＊第1報　東京衛研年報，**31**, 142-148, 1980

＊＊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

表１．都内搬入米中に含まれる年度別カドミウム濃度（国産玄米，1981－1998年度）　（単位：ppm，風乾重量あたり）

統計量（項目）		1981年	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
平均		0.06	0.07	0.05	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.08	0.07	0.09	0.08	0.06	0.06	0.08	0.07
幾何平均		0.04	0.04	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.05	0.04	0.06	0.05	0.04	0.03	0.05	0.04
中央値（メジアン）		0.04	0.05	0.02	0.01	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.05	0.05	0.06	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05
最頻値（モード）		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
標準偏差		0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.10	0.05	0.06	0.06	0.05	0.08	0.07	0.08	0.09	0.05	0.09	0.07	0.08
最小		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
最大		0.48	0.39	0.39	0.62	0.35	1.37	0.24	0.33	0.34	0.31	0.62	0.44	0.48	0.80	0.38	1.00	0.43	0.56
度数分布	0.01以下（ppm）	82	66	111	129	93	63	78	80	64	74	33	49	28	15	47	56	30	36
	0.02～0.05	70	63	63	63	70	100	92	88	89	81	99	89	67	35	71	68	74	77
	0.06～0.10	42	68	37	34	37	48	48	47	62	59	50	61	42	28	46	40	35	40
	0.11～0.15	24	20	13	14	32	23	22	21	19	24	34	23	23	13	18	17	28	21
	0.16～0.20	13	14	12	4	13	4	6	8	7	6	19	17	18	5	11	9	17	7
	0.21～0.25	4	6	5	1	4	3	4	3	5	4	4	2	12	1	1	1	5	7
	0.26～0.30	4	8	5	2	0	6	0	2	2	1	5	7	1	2	0	2	2	2
	0.31～0.35	2	4	0	2	1	1	0	3	2	1	3	1	0	0	0	0	3	2
	0.36～0.40	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	1	0	1
	0.41以上	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0	2	1	2	1	0	1	1	2
検体数（n）		244	250	247	250	250	250	250	252	250	250	250	250	196	100	195	195	195	195
0.4ppm超過率＊（%）		0.8	0.0	0.0	0.4	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.4	1.0	1.0	0.0	0.5	0.5	1.0

＊東京都の基準である0.4ppmに適合しない検体の出現率（不適検体数／総検体数，%）

を用いてpH8.0～8.5の範囲に調整した．これにジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）溶液を加え,反応して生じた錯体を，10ｍｌのメチルイソブチルケトン（MIBK）で抽出し,抽出液をフレーム原子吸光法により定量した．

ヒ素：試料2.0又は2.5ｇを正確に秤取り，硫硝酸灰化法により湿式分解した．分解液中に硝酸が残らないよう過酸化水素水を加え十分加熱し硝酸を除去した．分解液にブロムチモールブルー（BTB）指示液を加え,アンモニア水を用いてpHを中性付近に調整した．これに塩酸4.5ml加え，次いでアスコルビン酸及びヨウ化カリウム溶液を加え,精製水により全量を50mlとした．その後試料溶液とテトラヒドロホウ酸ナトリウム溶液を連続水素化物発生装置を用いて混合し，発生した水素化ヒ素ガスを加熱石英セルに導入し，原子吸光法により定量した．

結果及び考察

1．カドミウム

試験成績を年度別に整理したものを表１に示した．

1）基準値を超えた検体数

東京都の基準値（0.4ppm未満）を超えた検体は，1981年度から98年度までの4069検体中15検体（0.37%）であった．18年間中でその約半数にあたる８年は，基準値を超える検体はなかった．

基準値超過の時系列的な傾向を見るため,前報[9]の成績を含めて５カ年移動平均値を求めたものを図１に示した．その傾向は,検査開始時における高い状態から1982年頃まで顕著に減少し,その後しばらく低い状態が続き,再び1990年頃を境に微増し,微増したまま現在まで横這いの状態が続いている．

国の基準値（1.0ppm未満）を超える検体は，1986年度に１検体（濃度1.37ppm），96年度に１検体（1.00ppm）計２検体であった．

2）平均濃度

1981年度から98年度までの各年度の平均値を再平均した値は0.06ppm，幾何平均値及び中央値はそれぞれ0.04ppmであった．

前報における1973年度から80年度までの平均値は,単一検体で0.11ppm（1196検体），混合検体で0.12ppm（304検体）であり，この当時からは明らかに減少している．

3）濃度別度数分布

1981年度から98年度の18年間を便宜的に初めの方を3カ年,その後を５カ年毎に区切り,その区分毎の度数分布率を求め図２に示した．典型的な対数正規型の分布図を示した．

18年間全体では,0.1ppmを超える割合は18.5%,0.2ppmを超える割合は4.3%,0.3ppmを超える割合は1.2%,0.4ppmを超える割合は0.4%であった．

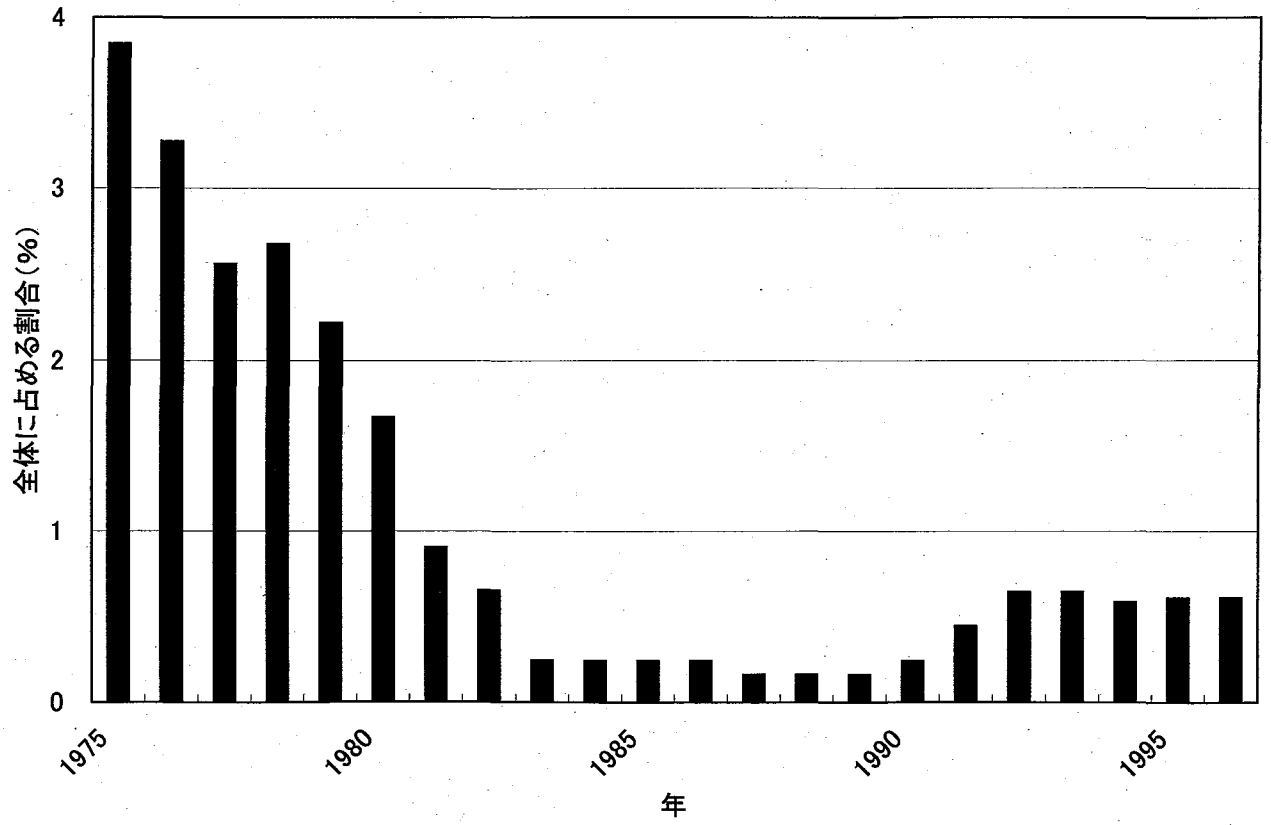


図１．都内搬入米におけるカドミウム基準値（0.4ppm）超過出現率の推移（５カ年移動平均）

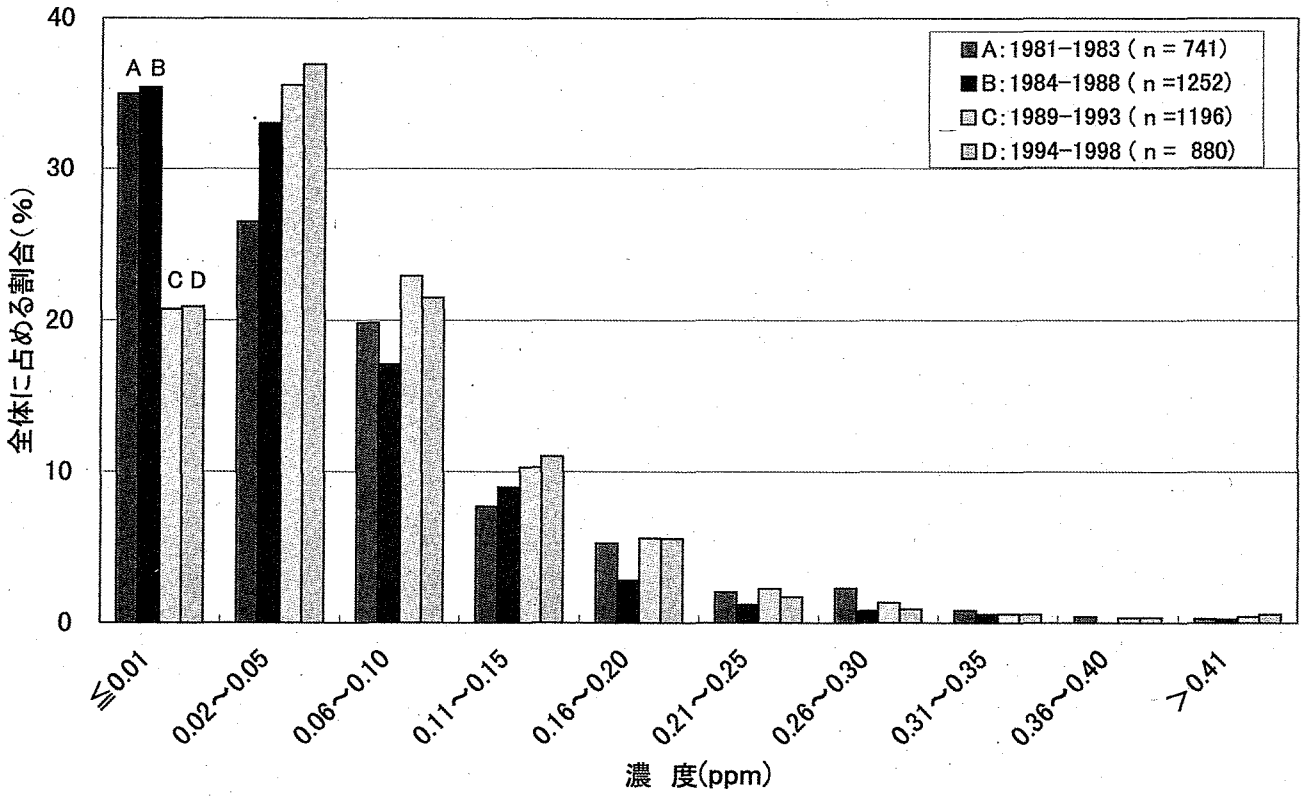


図2．都内搬入米中のカドミウム濃度度数分布（国産玄米，1981－1998年度）

4）輸入米

1994年2月から99年3月までに,アメリカ産米14検体,タイ産米14検体,オーストラリア産米13検体,中国産米11検体，合計52検体について検査した．その成績を表2に示した．

また，国産米との濃度レベルの比較を行うため，国産米20検体について,玄米とその玄米を精米したものを分析した[11]．その結果,精米したものは玄米のカドミウム濃度の93%（平均値）であった．

輸入米のカドミウム濃度は,いずれの国のものも低かった．タイ産米の1検体（0.20ppm）を除き,すべて0.04ppm以下であった．

2．銅

試験成績を年度別に整理したものを表3に示した．

米中に含有する銅の基準は，日本及び国際的にも定められていない．

1）平均及び最大濃度

1981年度から98年度までの各年度の平均値を再平均した値は2.45 ppm，幾何平均値は2.35ppm，中央値は，2.42ppmであった．

既存のデータ[12]とほぼ同レベルの値であった．

最大濃度は,1984年度の7.14ppmであった．

2）濃度別度数分布

1981年度から98年度までの18年間を,カドミウムと同様に初めの方を3カ年,その後を5カ年毎に区切り,その区分毎の度数分布率を求め図3に示した．カドミウムの分布に比較するとやや正規分布に近い形を示している．

18年間全体では，3.0ppmを超える割合は19.5%，4.0ppmを超える割合は2.0%，5.0ppmを超える割合は0.3%であった．

3）輸入米

国産米に比較して,タイ産米が平均値で1.71ppmで若干低い傾向にあるが,他の国のものはほぼ同レベルの値であった．

なお，国産米との濃度レベルの比較を行うため，国産米20検体について,玄米とその玄米を精米したものを分析した[11]．その結果，精米したものは玄米の銅濃度の85%（平均値）であった．

3．ヒ　　素

試験成績を年度別に整理したものを表4に示した．

米中に含有するヒ素の基準は,日本及び国際的にも定められていない．

1）平均及び最大濃度

1981年度から98年度までの各年度の平均値を再平均した値は0.15 ppm ,幾何平均値及び中央値は,それぞれ0.14 ppmであった．

既存のデータ[13]とほぼ同レベルの値であった．

最大濃度は，1986年度の2.20ppmであった．

表2．輸入米に含まれるカドミウム，銅，ヒ素の濃度（精米）

（単位：ppm，風乾重量あたり）

統計量（項目）	カドミウム（国別）				銅（国別）				ヒ素（国別）			
	アメリカ	タイ	中国	オーストラリア	アメリカ	タイ	中国	オーストラリア	アメリカ	タイ	中国	オーストラリア
平均	0.01	0.03	0.01	0.00	2.27	1.71	2.32	2.23	0.12	0.11	0.14	0.24
中央値（メジアン）	0.01	0.02	0.01	0.00	2.25	1.65	2.29	2.26	0.10	0.11	0.14	0.28
最頻値（モード）	0.01	0.01	0.01	0.00	2.30			2.04	0.05	0.14	0.17	0.28
標準偏差	0.01	0.05	0.01	0.00	0.45	0.31	0.31	0.42	0.08	0.06	0.05	0.09
最小	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	1.30	1.82	1.64	0.05	0.04	0.05	0.01
最大	0.01	0.20	0.02	0.01	2.96	2.50	3.10	3.06	0.36	0.28	0.22	0.33
検体数（n）	14	14	11	13	14	14	11	13	14	14	11	13

	カドミウム（輸入米全体）		銅（輸入米全体）		ヒ素（輸入米全体）	
	濃度範囲（ppm）	度数	濃度範囲（ppm）	度数	濃度範囲（ppm）	度数
度数分布	0.01以下	42	1.00以下	0	0.05以下	7
	0.02～0.05	9	1.01～1.50	3	0.06～0.10	12
	0.06～0.10	0	1.51～2.00	16	0.11～0.15	15
	0.11～0.15	0	2.01～2.50	25	0.16～0.20	5
	0.16～0.20	1	2.51～3.00	6	0.21～0.25	3
	0.21～0.25	0	3.01～3.50	2	0.26～0.30	6
	0.26～0.30	0	3.51～4.00	0	0.31～0.35	3
	0.31～0.35	0	4.01～4.50	0	0.36～0.40	1
	0.36～0.40	0	4.51～5.00	0	0.41～0.45	0
	0.41以上	0	5.01～5.50	0	0.46～0.50	0
検体数（n）		52		52		52

表３．都内搬入米中に含まれる年度別銅濃度（国産玄米，1981－1998年度）

（単位：ppm，風乾重量あたり）

統計量（項目）		1981年	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
平均		2.39	2.42	2.35	2.57	2.64	2.69	2.35	2.54	2.42	2.45	2.54	2.54	2.45	2.42	2.32	2.33	2.33	2.30
幾何平均		2.30	2.36	2.28	2.44	2.57	2.60	2.24	2.44	2.29	2.37	2.44	2.41	2.35	2.32	2.20	2.23	2.24	2.21
中央値（メジアン）		2.36	2.38	2.29	2.47	2.62	2.61	2.34	2.51	2.42	2.46	2.47	2.47	2.49	2.43	2.30	2.30	2.31	2.35
最頻値（モード）		2.01	2.65	2.00	3.00	2.36	2.50	2.41	2.20	2.30	2.47	2.39	2.14	1.96	1.92	2.00	2.47	2.28	2.52
標準偏差		0.68	0.52	0.58	0.93	0.59	0.68	0.69	0.69	0.75	0.63	0.70	0.77	0.68	0.69	0.72	0.69	0.62	0.61
最小		0.91	0.92	0.85	0.76	1.00	1.25	0.39	0.86	0.61	0.87	0.80	0.68	0.79	0.91	0.66	0.77	0.80	0.71
最大		5.30	4.38	4.44	7.14	4.62	5.45	4.65	4.76	4.44	4.64	4.78	5.84	4.09	4.29	4.92	4.23	4.33	4.69
度数分布	1.00以下（ppm）	2	1	2	1	1	0	7	3	6	3	1	4	2	1	4	3	3	3
	1.01～1.50	22	9	16	16	2	6	21	12	20	10	13	14	15	9	20	23	12	14
	1.51～2.00	42	45	56	45	28	30	41	42	53	46	46	48	35	17	45	39	39	44
	2.01～2.50	79	95	80	66	77	71	92	69	60	76	71	65	51	26	44	53	69	64
	2.51～3.00	58	62	62	75	82	71	49	63	54	69	59	51	53	27	51	43	47	50
	3.01～3.50	30	33	23	29	46	50	26	45	39	34	33	42	26	14	22	23	17	14
	3.51～4.00	8	4	6	6	8	11	10	13	13	8	19	19	12	4	6	9	5	4
	4.01～4.50	0	1	2	4	5	5	3	4	5	2	7	6	2	2	2	2	3	1
	4.51～5.00	1	0	0	0	1	5	1	1	0	2	1	0	0	0	1	0	0	1
	5.01～5.50	2	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.51以上	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
検体数（n）		244	250	247	250	250	250	250	252	250	250	250	250	196	100	195	195	195	195

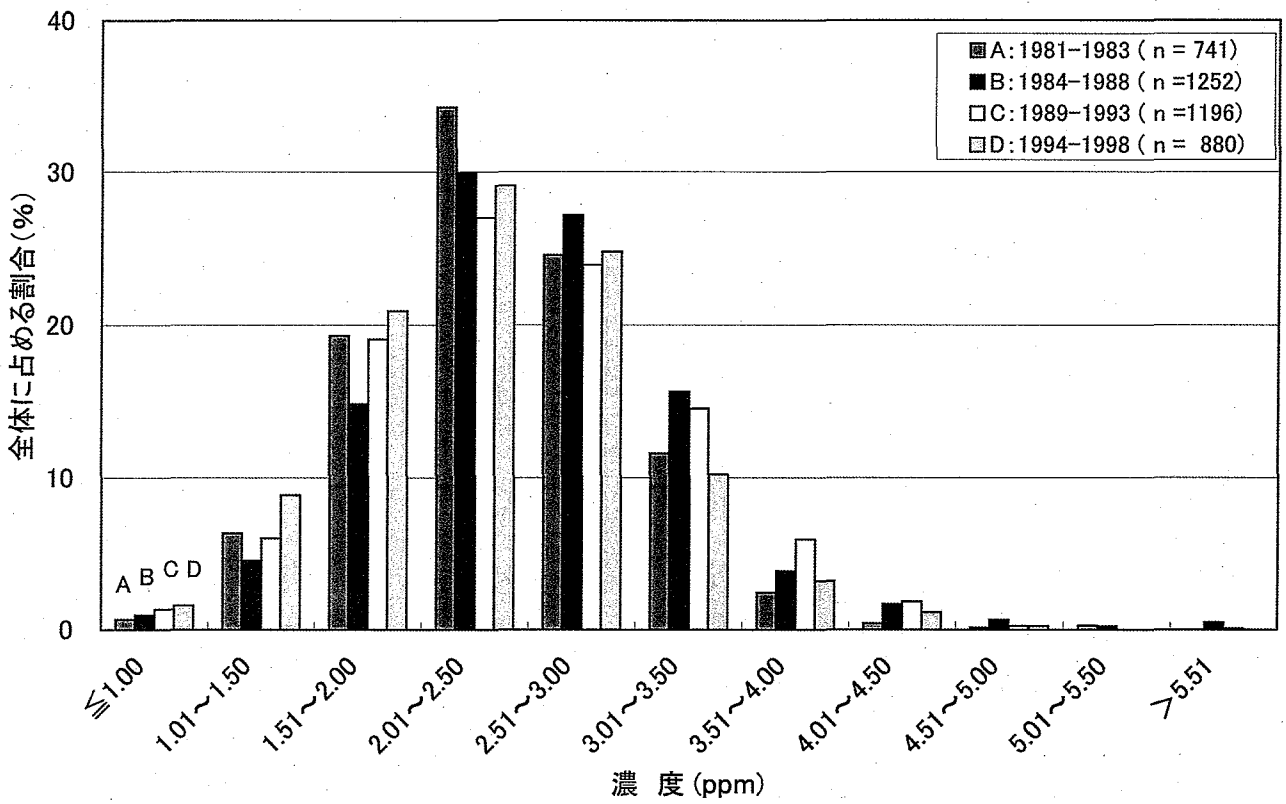


図３．都内搬入米中の銅濃度度数分布（国産玄米，1981－1998年度）

２）濃度別度数分布

1981年度から98年度の18年間を，カドミウムと同様に初めの方を３カ年，その後を５カ年毎に区切り，その区分毎の度数分布率を求め図４に示した．

18年間全体では，0.2ppmを超える割合は20.7%，0.3ppmを超える割合は6.2%，0.4ppmを超える割合は2.0%，0.5 ppmを超える割合は0.8%であった．

３）輸入米

国産米に比較して，オーストラリア産米が平均値で0.24ppmで若干高い傾向にあるが，他の国のものはほぼ同レベルの値であった．

なお,国産米との濃度レベルの比較を行うため，国産米20検体について,玄米とその玄米を精米したものを分析した[11]．その結果,精米したものは玄米のヒ素濃度の73%（平均値）であった．

まとめ

カドミウム濃度の度数分布を見ると，1981年度から98年度までの18年間全体（4069検体）で0.1ppmを超える割合は18.5%，0.2ppmを超える割合は4.3%，0.3ppmを超える割合は1.2%，0.4 ppmを超える割合は0.4%であった．

FAO/WHO合同食品規格計画食品添加物・汚染物質部会（CCFAC）における米の基準が，仮に0.2mg/kgに設定された場合，都内搬入米の５%弱が基準に適合しない可能性がある．

東京都の基準（0.4ppm未満）に適合しない検体の出現率は,一時期低下したが1990年頃を境に再び微増し，微増のまま横這い状態が現在も続いている．

輸入米（52検体）のカドミウム濃度は国産米に比較して全般的に低く，また銅及びヒ素の濃度は概ね同レベルであった．

謝　辞　本報告をまとめることについて，了承くださった生活文化局消費生活部流通対策課及び衛生局生活環境部食品保健課に感謝します．

文　献

１）厚生省「富山県におけるイタイイタイ病に関する厚生省の見解」（昭和43年５月８日）

２）微量重金属調査研究会「米のカドミウムの安全基準についての報告」（1970年７月24日）

３）昭和45年７月30日付環食第326号，環境衛生局長通知「カドミウム汚染米の安全性について」

４）昭和45年10月15日，厚生省告示第346号「食品，添加物等の規格基準（昭和34年12月厚生省告示第370号）の一部改正」

５）昭和45年10月23日付環食第473号，環境衛生局長通知「食品，添加物等の規格基準の一部改正について」

表４．都内搬入米中に含まれる年度別ヒ素濃度（国産玄米，1981－1998年度）

（単位：ppm，風乾重量あたり）

統計量（項目）		1981年	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
平均		0.13	0.12	0.14	0.19	0.21	0.20	0.19	0.17	0.14	0.16	0.14	0.13	0.12	0.16	0.16	0.13	0.13	0.14
幾何平均		0.12	0.11	0.13	0.16	0.19	0.17	0.17	0.15	0.12	0.13	0.12	0.11	0.10	0.14	0.15	0.12	0.12	0.13
中央値（メジアン）		0.11	0.10	0.13	0.17	0.20	0.17	0.17	0.15	0.12	0.13	0.13	0.11	0.10	0.15	0.16	0.13	0.12	0.13
最頻値（モード）		0.11	0.08	0.12	0.12	0.21	0.13	0.15	0.12	0.11	0.11	0.13	0.08	0.08	0.15	0.16	0.11	0.09	0.12
標準偏差		0.07	0.08	0.08	0.15	0.11	0.16	0.09	0.08	0.07	0.10	0.08	0.09	0.08	0.09	0.07	0.05	0.06	0.06
最小		0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.02	0.02	0.04	0.00	0.02	0.01	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03
最大		0.75	0.80	0.45	1.23	0.63	2.20	0.49	0.51	0.73	0.85	0.56	0.69	0.58	0.57	0.47	0.35	0.35	0.33
度数分布	0.05以下（ppm）	4	43	18	34	9	9	2	4	8	13	23	28	28	6	4	9	10	2
	0.06～0.10	96	83	68	36	23	31	34	49	83	66	69	85	73	24	37	49	61	48
	0.11～0.15	94	66	75	45	45	65	69	82	89	74	74	68	61	24	52	86	67	77
	0.16～0.20	31	25	36	41	54	54	57	55	42	48	49	36	17	30	56	36	33	45
	0.21～0.25	12	19	32	35	55	31	35	27	16	21	15	17	7	5	27	11	16	13
	0.26～0.30	3	7	8	24	19	29	23	15	4	13	10	4	5	5	10	3	7	8
	0.31～0.35	1	4	3	9	21	7	17	15	4	3	3	3	2	1	6	1	1	2
	0.36～0.40	2	2	6	9	8	13	7	3	2	4	5	3	1	0	1	0	0	0
	0.41～0.45	0	0	1	4	7	5	4	0	0	3	0	3	0	3	1	0	0	0
	0.46～0.5	0	0	0	4	3	3	2	0	1	2	1	0	1	1	1	0	0	0
	0.51以上	1	1	0	9	6	3	0	2	1	3	1	3	1	1	0	0	0	0
検体数（n）		244	250	247	250	250	250	250	252	250	250	250	250	196	100	195	195	195	195

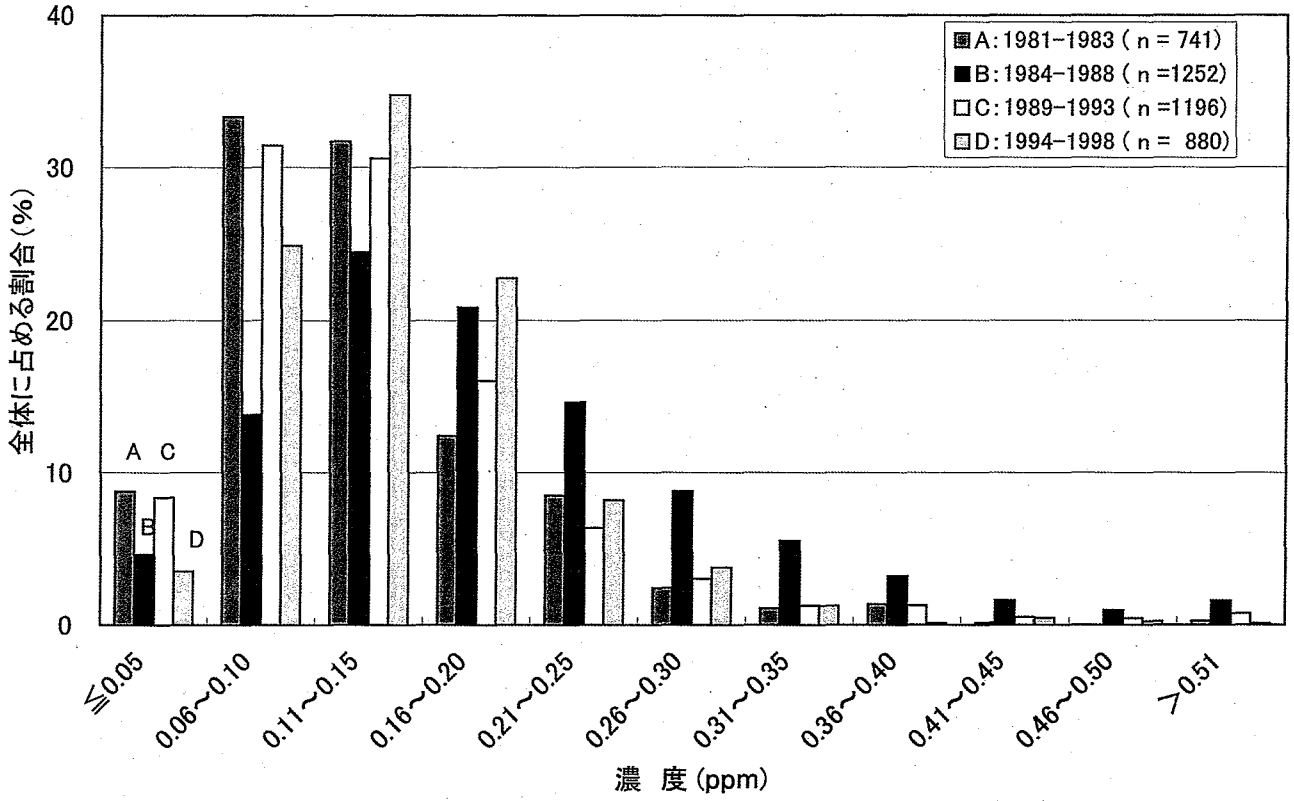


図４．都内搬入米中のヒ素濃度度数分布（国産玄米，1981－1998年度）

6）今井美津子：食品衛生研究，**48**(5), 57-66, 1998.

7）浅見輝男：シンポジウム わが国における土壌汚染の実態とその修復をめぐって，1999年６月４日，3-49，日本学術会議土壌・肥料・植物栄養学研究連絡委員会，同自然保護研究連絡委員会，社団法人日本土壌肥料学会，東京.

8）浅見輝男：日本環境学会第25回研究発表会予稿集，213-216, 1999.

9）伊藤弘一,原田裕文：東京衛研年報，**33-1**, 142-148, 1980.

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

11）未発表

12）細貝祐太郎,中澤裕之，西島基弘編：食品衛生化学物質データブック，479-480, 1998，中央法規出版，東京.

13）細貝祐太郎，中澤裕之，西島基弘編：食品衛生化学物質データブック，207-209, 1998，中央法規出版，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 167-174, 1999

輸入食品中の放射能濃度（第8報*）
―平成10年度―

観　公子**, 牛山博文**, 新藤哲也**, 安田和男**

Radioactive Contamination in Imported Foods(Ⅷ)
― Apr.1998～Mar.1999 ―

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，紅茶 black tea，蜂蜜 honey，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月に発生したチェルノブイリ原子力発電所事故に伴い，主にヨーロッパ地域からの輸入食品に放射能汚染がみられ，その安全性が危惧された．そのため我が国では昭和61年11月，この事故により降下した放射性核種の内部被爆寄与率及び国際放射線防護委員会（ICRP）の勧告等から判断して，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1 kg当たり370ベクレル（Bq）以下と設定し，監視が行われてきた[1]．

東京都においても，暫定限度値を超える放射能汚染食品の発見をし，有害食品の排除を目的として監視を行ってきた．著者らは昭和63年度からこれらに基づいて食品の放射能実態調査を続けてきた[2-8]．本報では都内市販輸入食品を中心に調査した平成10年度の放射能濃度調査結果を報告する．

実験方法

1．試　料

平成10年4月から平成11年3月までに東京都内に流通していた輸入食品等で食品衛生監視員が収去した250試料を用いた．

2．器具及び装置

前報[2-8]に従った．

3．試料の調製

前報[2-8]に従った．

4．分析方法

前報[2-8]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17～42 Bq/kgである．

また，25 Bq/kg以上を検出したものについては試料の波高分布を描き，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[8]．

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250試料について，放射能濃度を測定した．その結果，50 Bq/kgを超えたものは9試料（全試料に対する検出率：3.6 %）であり，厚生省の暫定限度値370 Bq/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．

表1．放射能濃度別の検出試料数

放射能濃度（Bq/kg）	検出試料数
0～ 50	241
51～100	6
101～200	2
201～370	1
371～	0
計	250

＊第7報 東京衛研年報, **49**, 149-156, 1998

＊＊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

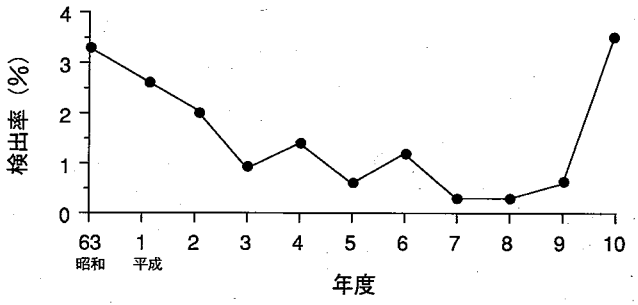


図1．放射能濃度が50 Bq/kgを超えた試料の検出率の推移

放射能濃度が51～100 Bq/kgのものが6試料（2.4%），101～200 Bq/kgのものが2試料（0.8 %）及び201 Bq/kg～370 Bq/kgのものが1試料（0.4 %）であった．また，50 Bq/kg以下のものは241試料で総試料の96.4 %を占めていた．

昭和63年度から平成10年度までの50 Bq/kgを超えた試料の検出率の推移を図1に示した．

減少傾向にあった検出率が平成10年度では調査初期の割合にもどった．これは検査対象食品の選択に今までの調査結果を踏まえて，キノコ，ハーブ等検出率の高い品目を目標としたことによるものと思われる．チェルノブイリ事故による汚染は，^{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食品全般では今後，さらに増加することは考えにくい．

表2．食品群別の試料数及び検出数*

	食品群	試料数	検出数*
1	ナッツ類	0	0
2	香辛料・ハーブ類	68	0
3	ジャム・マーマレード類	6	0
4	乳・乳製品	20	0
5	食肉・食肉製品	34	0
6	蜂蜜	9	1
7	魚介・加工品	10	0
8	菓子類	2	0
9	酒類	0	0
10	穀類	17	0
11	野菜・果実・加工品	56	5
12	油脂類	0	0
13	調味料	2	0
14	その他	26	3
	計	250	9

＊：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50 Bq/kgを超えた試料数

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群に分類したところ，50 Bq/kgを超えて検出された試料は野菜・果実・加工品群が5試料（2 %），蜂蜜が1試料（0.4 %）及びその他の食品が3試料（1.2 %）

表3．国別の試料数及び検出数*

原産国名	試料数	検出数*	原産国名	試料数	検出数*
フランス**	42	2	アルバニア**	2	0
イタリア**	30	4	ニュージーランド	2	0
アメリカ	28	0	モロッコ	2	0
イギリス	13	0	ポルトガル	2	0
中　国	13	0	タ　イ	2	0
デンマーク	11	0	日　本	2	0
スペイン**	8	0	グルジア（旧ソ連）**	1	0
ドイツ連邦	7	0	ノルウェー	1	0
トルコ**	6	3	スウェーデン**	1	0
インド	6	0	チェコスロバキア	1	0
スリランカ	6	0	ハンガリー	1	0
オランダ	4	0	アイルランド**	1	0
ベルギー	4	0	オーストラリア	1	0
カナダ	4	0	アルゼンチン	1	0
スイス	3	0	ベトナム	1	0
ポーランド	3	0	パキスタン	1	0
エジプト	3	0	マレーシア	1	0
インドネシア	3	0	ジャマイカ	1	0
オーストリア	2	0	スーダン	1	0
ギリシャ**	2	0	不　明	25	0
ブルガリア	2	0			

＊：^{134}Cs及び^{137}Csの放射能濃度の合計が50 Bq/kgを超えた試料数

＊＊：暫定限度を超えた食品を輸出した特定12カ国に含まれる国

：チェルノブイリ事故放射能汚染が比較的少なかった国

表4．放射能濃度が50 Bq/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	ピエ・ド・ムトン（カノシタ）（生）	294	ND*	294	フランス	1998.11.25
2	紅茶	120	ND**	120	トルコ	1995
3	紅茶	68	ND**	68	トルコ	1997.08.15
4	紅茶	89	／	／	トルコ	1997.09.26
5	蜂蜜（栗の花）	86	／	／	イタリア	不明
6	セップ（ヤマドリタケ）（冷凍）	80	／	／	フランス	1997.10.15
7	ポルチーニ（ヤマドリタケ）（千）	76	／	／	イタリア	不明
8	ポルチーニ（ヤマドリタケ）（千）	74	／	／	イタリア	不明
9	ポルチーニ（ヤマドリタケ）（千）	54	／	／	イタリア	不明

ND*：3.2 Bq/kg以下，ND**：4.5 Bq/kg以下

であった．

検出頻度の高い品目は限定されており，それらが含まれる食品群の検出率が高くなっている．ここにおいてもキノコが含まれる野菜・果実・加工品群で検出率が高く，試料のうち5試料（50 Bq/kgを超えて検出された試料のうちの55％）はキノコであった．検疫所においても，平成10年12月2日付衛検第223号厚生省通達で検査対象食品の見直しが行われ，キノコ及びキノコ乾製品は全ロット検査対象食品とされている[9]．著者らの調査結果からもキノコ類の放射能含有量は比較的多く，国の旧ソ連原子力発電所事故に関わる輸入食品の監視指導体制は妥当なものと考えられる．

3）原産国別

原産国別の検出状況を表3に示した．

原産国の明らかな国は38カ国であった．フランス，イタリア，アメリカ，イギリス，中国，デンマークの順に試料数が多く，これらで全体の55％を占めた．

この中で50 Bq/kgを超えて検出されたものはフランス産が2試料（0.8％）及びイタリア産が4試料（1.6％）であった．また，検査数の少ない国ではあるがトルコ産のものが3試料（1.2％）あった．トルコは国別の平均降下量では汚染が比較的少ない国とみられていたが，トルコ産の食品は検疫所において暫定限度値を超えて発見されたこともあり[10]，事故後の気象条件等により放射性降下物の地域差がみられる国であると推測されている[11]．このように50 Bq/kgを超えて検出されたもの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る．また検疫所の16食品群モニタリング検査においても，これらの国は特定の12カ国に含まれ，輸入食品の全ロット検査を実施する国とされている[9]．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，放射能汚染が比較的少なかった地域の国の食品も，原料を汚染地域から輸入ししていることが考えられたため調査したが，50 Bq/kgを超えて検出されるものはなかった．しかし，現在でも核実験が行われていることや原子力施設の核廃棄物処理の不明な点のある現状を考えると，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放射能汚染を監視する必要があると考える．

4）放射能濃度が50 Bq/kgを超えて検出された試料

放射能濃度が50 Bq/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100 Bq/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．

50 Bq/kgを超えた試料はキノコが5試料（2％），紅茶が3試料（1.2％）及び蜂蜜が1試料（0.4％）であり，キノコの内訳はポルチーニ（ヤマドリタケ）が3試料，ピエ・ド・ムトン（カノシタ）及びセップ（ヤマドリタケ）がそれぞれ1試料であった．精密検査をしたフランス産ピエ・ド・ムトン及びトルコ産紅茶を写真1から3に示した．

50 Bq/kgを超えた試料はキノコに多くみられたが，キノコは土中からCsを取り込み，蓄積することが知られており[12, 13]，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．

294 Bq/kgの放射能濃度を検出したピエ・ド・ムトンは生鮮品であったが，乾燥品として流通すると仮定して，キノコの水分含量90％から，乾物試料あたりに換算すると2,940 Bq/kgとなり暫定限度値を大幅に超えてしまう．また，このキノコは，著者らの調査では平成3年度以来，放射能濃度100 Bq/kg以上の検出頻度が多く，平成6年度には暫定限度値を越えて検出されたものと同一種キノコである．

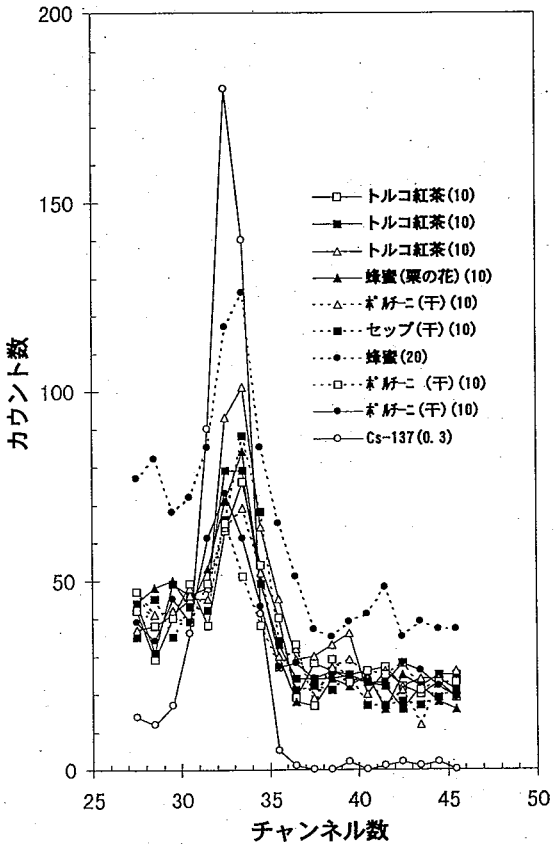


図２．試料及び^{137}Csの波高分布
（）内の数字は測定時間(分)を示す

この他，平成10年１月には検疫所において限度値を越えて積み戻しされた乾燥キノコがあった[14]．

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注目し，今後も放射能汚染の監視が必要と考える．

また，トルコ産紅茶のうち68 Bq/kgを検出したものは当研究室で100 Bq/kg以上検出したものを産業技術研究所で精密検査した値であり，当研究室の値より低い値であった．このことは，土壌中のタリウム（^{208}Tl）やアクチニウム（^{228}Ac）等は当研究室で行っているスクリーニング試験にプラスの妨害をもたらす元素であり[7]，栽培土壌が汚染されていたために，その微粉粒が混入していたことが理由の一つとして考えられる．

なお，核種分析では精密検査をした３検体とも^{134}Csは検出限界以下であり，^{137}Csのみが検出された．事故当時，^{134}Cs及び^{137}Csの核種の存在比は１：２であった[15]が，半減期は^{134}Csが２年及び^{137}Csが30年であるため，調査した1998年ではその比は約１：97になり，仮に^{134}Csが存在していたとしても検出限界の3.2 Bq/kg以下の値となる．このように核種の自己崩壊による減衰の為，今後はより一層^{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．

表５．放射能濃度が25 Bq/kg以上から50 Bq/kg未満の試料

No.	品名	^{134}Cs+^{137}Cs(Bq/kg)	原産国
1	蜂蜜	44	イタリア

５）放射能濃度が25 Bq/kg以上50 Bq/kg以下の試料

食品中の低濃度放射能を調査するために，50 Bq/kg以下についても測定を行い，放射能濃度が25 Bq/kg以上50 Bq/kg以下の試料の内訳を表５に示した．

放射能濃度が25 Bq/kg以上50 Bq/kg以下の試料はイタリア産の蜂蜜１試料であった．蜂蜜は検疫所におけるモニタリング調査の対象となっている食品である．

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実態調査のため，平成10年４月から平成11年３月までに都内で流通していた輸入食品等250試料について放射能濃度を調査した．

放射能濃度が50 Bq/kgを超えて検出された試料は９試料（3.6 %）であり，キノコ類でフランス産のピエ・ド・ムトン（カノシタ）（生）が294 Bq/kgであったのを最高にトルコ産の紅茶３試料がそれぞれ120 Bq/kg，68 Bq/kg及び89 Bq/kgであり，イタリア産の蜂蜜（栗の花）が86 Bq/kg，フランス産のセップ（ヤマドリタケ）（冷凍）が80 Bq/kg，イタリア産のポルチーニ（ヤマドリタケ）（干）３試料がそれぞれ76 Bq/kg，74 Bq/kg，54 Bq/kgであった．なお，放射能濃度は暫定限度値 370 Bq/kgを超えて検出されたものはなかった．

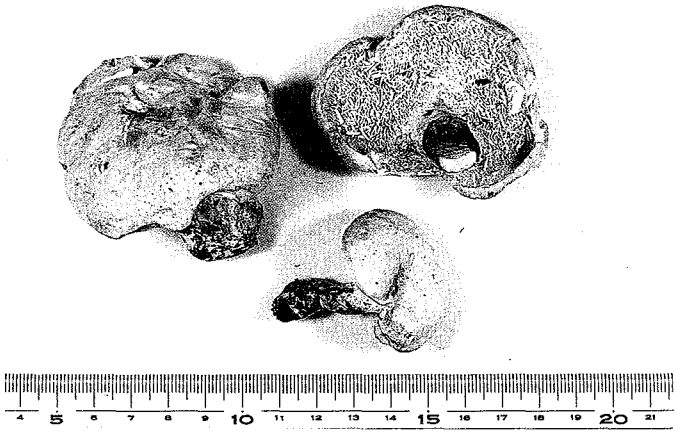
当研究室で100 Bq/kg を超えて検出された試料の核種分析では^{137}Csが主であり^{134}Csは検出限界以下であった．

今後，放射能汚染の可能性は，キノコ等自然環境の影響を受けやすい食品において考えられる．また，検疫所において放射能汚染の食品が検出される実態及び原子力施設の小規模な事故の発生あるいは核保有国が核実験を行なうなど輸入食品の放射能汚染が懸念され，今後も監視を継続し，有害食品の排除に努める必要があると考える．

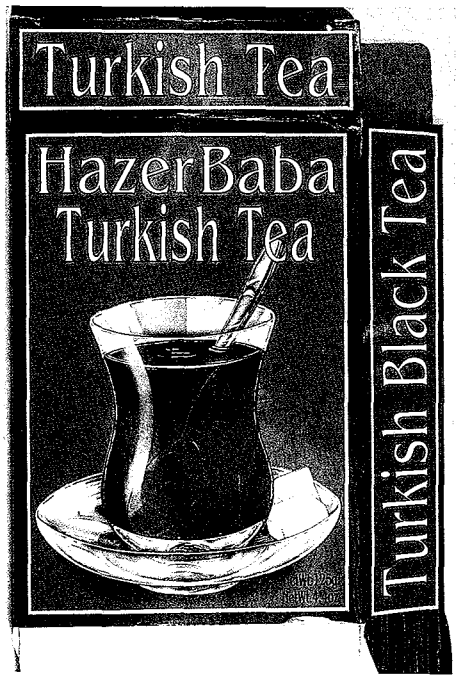
文　献

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.

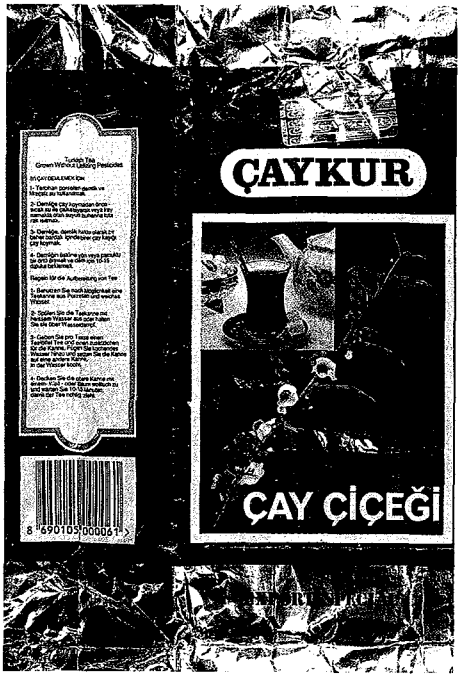
4）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**43**, 142-148, 1992.
5）観　公子，真木俊夫，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**44**, 166-173, 1993.
6）観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**45**, 105-109,1994.
7）観　公子，冠　政光，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**46**, 120-126, 1995.
8）観　公子，牛山博文，新藤哲也，他：東京衛研年報，**49**, 149-156, 1998.
9）近藤卓也：食品衛生研究，**49**(6), 21-29, 1999.
10）食卓にあがった死の灰　パート2　ーチェルノブイリ事故による食品汚染，6-10, 1987, 原子力資料情報室，東京.
11）大久保　隆，岩島　清：公衆衛生院研究報告，**37**(3-4), 169-175, 1988.
12）Korky J.K., Kowaiki L. ：*J. Agric. Fd.Chem.*, **37**, 568-569, 1989.
13）杉山英男：第21回 放医研環境セミナー予稿集，27-28, 1993.
14）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.
15）高谷　幸：食品衛生研究，**39**(10), 15-25, 1989.



1．ピエ・ド・ムトン（カノシタ）（生）
PIEDS DO MOUTON



2．紅 茶



3．紅 茶

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 175-178, 1999

化学物質及び自然毒による食中毒等事件例（第16報*）
—平成10年—

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 (XVI*)
—1998—

HIROFUMI USHIYAMA**, KIMIKO KAN**,
TETSUYA SHINDO**and KAZUO YASUDA**

Keywords：化学性食中毒 chemical food-poisoning，ヒスタミン histamine，アブラソコムツ *Lepidocybium flavobrunneum*，シビレタケ属 *Psilocybe*，オシロイシメジ *Lyophyllum connatum*，カキシメジ *Tricholoma ustale*

著者らはこれまで都内で発生した化学性食中毒事例を報告してきた[1-5]．

今回は平成10年に発生した化学物質による食中毒等の事例のうち，ヒスタミンによる食中毒等事例４件，洗剤が混入した菓子による有症苦情事例及びキノコによる中毒事例３件について報告し，今後の食中毒発生防止のための参考に供することとする．表１に事例の概要をまとめて示した．

１．ヒスタミンによる食中毒等事例

事件の概要　事例１：平成10年４月２日午後１時頃から，発疹，動悸，目の異常，顔の紅潮等の症状を呈している４人の患者を診察した医師からの届出を，八王子保健所が受けた．保健所で調査した結果，患者は全員同じ幼稚園職員であり，共通食は昼食に喫食した仕出し弁当であった．さらに，仕出し弁当業者を調査し，同日の当該仕出し弁当は36ヶ所に配達，304個が販売され，幼稚園職員４人を含む６ヶ所の配達先の12名が，同様の症状を呈したことが明らかとなった．

事例２：平成10年６月都内の飲食店で，昼の定食を喫食した40人のうち21人が，食後直ちにヒスタミン様の食中毒症状を呈し，医院で受診した．症状は発疹，頭痛，動悸等で，発症者はいずれも，「アラ」のしょうゆ漬け焼きを喫食していた．

事例３：平成10年10月都内の販売店からイワシの丸干しを購入し，自宅で焼いて夫と共に喫食したところ，妻のみが喫食直後唇と舌にしびれを感じ，唇が赤く腫れるといった症状を呈した．

事例４：平成10年11月23日伊豆高原の販売店でアジの開きを購入，翌24日夜夫婦で２枚喫食したところ，舌の先がピリピリする感じがしたものの，そのまま喫食したが，それ以外の症状はなかった．翌々日の25日13時夫婦で残りのアジを２枚喫食したところ，１時間後首から上が赤くなり，首まわりに発疹を呈した．

①試料　事例１：マグロから揚げ残品４検体及びから揚げ原材料の生マグロ２検体．

事例２：アラしょうゆ漬け焼き残品３検体，アラ切り身１検体及びアラフィレー（３枚おろし）１検体．

事例３：イワシの丸干し残品３検体及び販売店より収去されたイワシの丸干し参考品１検体．

事例４：焼いたアジの開き喫食残品１検体及び購入翌日に冷凍保存したアジの開き残品４検体．

②原因物質の検索　いずれの事例とも発症状況及び患者が典型的なヒスタミン様食中毒症状を呈していることから，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ＴＬＣ及びＨＰＬＣにより不揮発性腐敗アミン類の分析を行った．不揮発性腐敗アミンのうち，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，スペルミジン及びプトレシンを対象とした．

＊第15報，東京衛研年報，**49**，172-178，1998

＊＊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．平成10年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10	4	25分	12	304	マグロから揚げ	発疹,頭痛,腹痛,発熱,顔の紅潮	ヒスタミン
	6	10分	2	2	カリントドーナツ	喉の腫れ	洗剤
	6	直後	21	40	魚しょうゆ漬け焼き(アブラソコムツ)	発疹,頭痛,動悸	ヒスタミン
	10	30分	2	2	キノコ入り煮込みうどん	めまい,吐き気,痺れ	シロシビン,シロシン
	10	60分	14	18	オシロイシメジ	吐き気,嘔吐	毒成分不明
	10	60分	3	3	カキシメジ	吐き気,嘔吐,下痢	毒成分不明
	10	直後	1	2	イワシの丸干し	唇と舌の痺れ,唇の腫れ	ヒスタミン
	10	60分	2	2	アジの開き	紅潮,発疹	ヒスタミン

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，3枚の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．

ＴＬＣでヒスタミンあるいはその他の不揮発性腐敗アミン類を検出した場合，標準品及び試料をダンシルクロライドで蛍光ラベル化した後ＨＰＬＣで分析を行った．

ＨＰＬＣ条件：カラム；Inertsil ODS-80A (4.6 mm×250 mm)，移動相；アセトニトリル－水 (62：38) 混液，流速；1.5 ml/min，カラム温度；40℃，励起波長；325 nm，蛍光波長；525 nmで行った．

その結果，事例1では，マグロから揚げ残品及び生マグロすべての検体から，ヒスタミンが710～1000 mg%，カダベリンが8～16 mg%検出された．

事例2では，アラしょうゆ漬け焼き3検体いずれからもヒスタミンが，それぞれ500 mg%，71 mg%及び40 mg%検出された．また，アラ切り身からヒスタミンが580 mg%検出されたが，アラフィレーからはヒスタミンは検出されなかった．

事例3では，イワシの丸干し残品及び参考品いずれからもヒスタミンが120～220 mg%，カダベリンが66～94 mg%，チラミンが17～34 mg%検出された．

事例4では，焼いたアジの開きから，ヒスタミンが740 mg%，冷凍保存したものから190～330 mg%，カダベリン，チラミン及びプトレシンが，焼いたアジの開きからそれぞれ，150 mg%，20 mg%及び6 mg%，冷凍保存したものからそれぞれ平均，74 mg%，7 mg%及び6 mg%検出された．

③考察　ヒスタミンによる食中毒は，遊離のヒスチジンが*Morganella morganii*等のヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌が増殖しヒスタミンが生成されることにより発生する．したがって，これまで都内で発生したヒスタミンによる食中毒等事例でも，イワシ，マグロ，アジ等遊離のヒスチジンを多く含有する魚種に多く発生している[2,3]．

ヒスタミンは100 mg%程度でも発症することがあり，それはカダベリン等の不揮発性腐敗アミンが共存することによるとされている[6]．事例1ではその約10倍ものヒスタミンが，マグロから揚げ残品及び原料用マグロ解凍品から検出されたことから，本事例はマグロから揚げを原因食品とする食中毒と判定した．また，仕出し弁当業者の原材料の仕入れ元の業者に冷凍保管されていたマグロ5検体について分析したところ，1検体からヒスタミンが790 mg%検出された．当該マグロは輸入品で，冷凍の状態でいくつかの業者を経て，弁当業者に納入されている．これらのことから，マグロは水揚げ時あるいは，流通のいずれかの過程でヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌に汚染したものと推察した．

事例2でも500 mg%ものヒスタミンが検出されたことから，原因物質はヒスタミンであると判定した．また，しょうゆ漬け焼き3検体のうち他の2検体はヒスタミン含量が比較的少なく，個体により汚染の程度に差があると推察された．

しょうゆ漬け焼きの原材料の魚はインドネシアからの輸入品であった．輸入業者が倉庫に冷凍保管してあったアラフィレー9検体について分析したところ，3検体からヒスタミンが150～730 mg%検出された．本事例も水揚げ時あるいは流通の過程で細菌に汚染されたものと思われた．

一方，アラフィレーを鑑定したところ，尾柄各側の隆起縁及び著しく波状に湾曲した側線等の特徴からアブラソコムツ（*Lepidocybium flavobrunneum*）と判定した．

アブラソコムツはワックスを多量に含有し，そのワックスによりしばしば下痢を起こすことから，食品衛生法第4条第2項に該当するとして，昭和56年販売が禁止さ

れた[7]．当該品はジャワ島付近の海域で漁獲され，現地で通常喫食されていること及び魚種鑑別が図鑑による判断であったことから，誤って輸入されたものと考えられる．

事例3及び4も検出されたヒスタミン量から，原因物質はヒスタミンであると考えられた．ヒスタミンによるアレルギー様食中毒は都内だけでも毎年数件発生している．症状は，顔面の紅潮，発疹，動悸，頭痛，吐き気，嘔吐，下痢等であるが，喫食時に唇や舌先にピリピリ等の刺激を感じることが多い．ヒスタミンによる中毒防止には魚介類の流通販売において鮮度保持が重要であるが，喫食時に刺激を感じたらそれ以上喫食しないよう，啓蒙活動も必要であると考える．

2．洗剤が混入した菓子による有症苦情事例

事件の概要　平成10年6月8日，都内在住の女性が，販売店で製造し，量り売りされていたカリントドーナツを購入，同日1本を喫食，異常は感じられなかった．さらに1本を喫食したところ苦みを感じた．夕方，夫が1本を喫食したところ，喉がヒリヒリとして腫れたような感じとなった．

①試料　カリントドーナツ残品，6月9日製造のカリントドーナツ参考品及び衣料用洗剤

②原因物質の検索　カリントドーナツの製造状況及び苦情者の症状から洗剤の混入が疑われた．そこで，試料0.5 gに水5 mlを加え振とう混和し，発泡の有無を確認した．カリントドーナツ残品及び衣料用洗剤は発泡が認められたが，参考品は発泡を認めなかった．また，試料0.5 gを水5 mlで混和したときのpHは，残品が9.8，参考品が7.2，洗剤が10.9であった．

③考察　保健所の調査によると，カリントドーナツの製造方法は，ドーナツ生地をフライヤーで揚げ，油を切った後，粉糖300 gを50 mlの熱湯に溶いたものをからめて製品としている．製造した従業員は，生地をフライヤーで揚げている間に，からめる砂糖の調製をしようと，倉庫から「水あめ」と書いてあるダンボール箱を厨房に持ち込み，中の白い粉を湯でとき，スプーンで2～3杯かけてからめた．混ざり具合がおかしいので，別の従業員に砂糖の所在を聞いたところ，粉糖をだしてきた．そこで粉糖300 gをはかり熱湯に溶いたものを，先にからめたものと，からめていなかったもの両方にからめ，商品として販売したとのことである．

残品から発泡が認められたこと，衣料用洗剤がアルカリ性であり，残品のpHが参考品に比べ高いことから．本事例は水あめと思いこみ，誤って洗剤を混入させてしまったものと推察された．食品に誤って洗剤を混入してしまう事例は，都内でもしばしば発生しているが，そのほとんどが，洗剤を別の容器に入れ替えたり，担当者が変わった時に発生している[2,4]．本事例も洗剤の管理と，「白い粉」が何であるかを確認しなかったことが原因であると思われる．

3．キノコによる食中毒事例

事件の概要　事例1：平成10年10月1日，女性が群馬県嬬恋村沿道の農産物販売所で購入したキノコを，同日自宅でナスと共に炒めた後煮込みうどんにして，21時30分頃娘と共に喫食した．同日22時頃から2人とも，めまい，吐き気，痺れ等の症状を呈し，都内の病院に入院した．

事例2：平成10年10月3日，都内桧原村でバーベキューを行った18人のグループのうち14人が17時から21時30分にかけて，吐き気，嘔吐等の症状を呈し10人が入院した．いずれも，参加者の一人が山梨県内で採取したキノコを，みそ汁や網焼きにして喫食していた．

事例3：平成10年10月20日，都内在住の夫婦が福島県内の山でキノコを採取し，これを帰宅後，同日22時頃に娘とともに焼いて喫食したところ，同日23時頃から，3人とも吐き気，嘔吐，下痢等の症状を呈し，妻が入院した．

①試料　事例1：キノコが入った煮込みうどん残品．

事例2：みそ汁（汁のみ）残品，みそ汁の具及びキノコ残品．

事例3：本人が病院に持ち込んだキノコ10数本．

②原因物質の検索　事例1：子実体及び胞子の形状からモエギタケ科シビレタケ属（*Psilocybe*）と鑑定したが，試料は加熱調理されており，形態が不完全であるため種までは明らかにできなかった．

事例2：みそ汁及びみそ汁の具は形態が不完全で鑑定ができなかった．キノコ残品は数種のキノコが含まれていたが茎の一部あるいは傘の一部といったように形態が完全なものが少なく，オシロイシメジ(*Lyophyllum connatum*）のみを確認できた．

事例3：試料は3種類のキノコが含まれており，いずれも加熱前の生のキノコで，傘，柄とも比較的形態が整っていた．子実体及び胞子の形状からカキシメジ（*Tricholoma ustale*），シイタケ（*Lentinus edodes*）及びクリタケ（*Naematoloma sublateritium*）と鑑定した．

③考察　シビレタケ属には，アイセンボンタケ，オオシビレタケ，ヒカゲシビレタケ等多くの毒キノコが含まれる[8,9]．シロシビン，シロシン等の毒成分を含み，誤食

するといずれも吐き気，手足の痺れ，麻痺，幻覚等の症状をおこす[9]．事例1では，農家がシビレタケとは知らずに自家用にとっておいたものを，患者らが購入したものであった．患者の症状は2人とも，めまい，痺れ等の症状を呈しており，シビレタケ属のいずれかの有毒キノコによるものと考えられる．

また，キノコの見分け方や食べ方には多くの言い伝えがあるが，その一つに「ナスと一緒に料理すれば食べられる」というものがある．しかし，迷信であり今回のような中毒事例が数多く発生している[2,10]．

オシロイシメジは傘の径3～8 cm，高さ4～10 cm，白色で，誤食すると胃腸系の症状を起こし，特に生食は禁物であるとされるが[9]，毒成分は不明である．図鑑によっては食用キノコとしているものもあり注意が必要である．

カキシメジは傘の径3.5～8 cm帯赤褐色で中心部は暗色，高さ2.5～6 cmでクサウラベニタケ，ツキヨタケに次いで中毒発生の多いキノコである．チャナメツムタケやマツタケモドキと誤認しやすく，吐き気，嘔吐，下痢，腹痛等の症状を起こすが毒成分は明らかになっていない[9]．

キノコによる食中毒を防ぐには，一本ずつ確実に鑑定された食用のキノコ以外は口にしないことが大切である．また，数多くある言い伝えは，いずれも確実なものはなく，信じるのは危険である．

以上，平成10年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，マグロから揚げ，アブラソコムツしょうゆ漬け焼き，イワシの丸干し及びアジの開きによる，ヒスタミン等不揮発性腐敗アミンによる事例，洗剤が混入したカリントドーナツの事例，及びシビレタケ，オシロイシメジ及びカキシメジによる有毒キノコの誤食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．

謝辞 アブラソコムツの鑑定をしていただいた，国立科学博物館　篠原現人先生に深謝いたします．

文　献

1）冠　政光，観　公子，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**45**，111-115，1994.
2）冠　政光，観　公子，橋本秀樹，他：東京衛研年報，**46**，115-119，1995.
3）観　公子，冠　政光，新藤哲也，他：東京衛研年報，**47**，105-112，1996.
4）牛山博文，観　公子，新藤哲也，他：東京衛研年報，**48**，143-147，1997.
5）牛山博文，観　公子，新藤哲也，他：東京衛研年報，**49**，172-178，1998.
6）日本薬学会編：衛生試験法・注解，289，1990，金原出版，東京.
7）厚生省生活衛生局監修：食品衛生小六法，1612-1613，1998，新日本法規出版，東京.
8）今関六也他編：原色日本新菌類図鑑，198-202，1987，保育社，大阪.
9）小山昇平：日本の毒キノコ150種，40，43，86-89，1992，ほおずき書籍，長野.
10）東京都衛生局生活環境部食品保健課編：知っておきたい毒キノコ，28-29，1994，東京都衛生局，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 179-184, 1999

有機農産物の栄養成分について（第2報*）

牛尾房雄*2，齋東由起*2，門間公夫*2，坂牧成恵*2，
横山知子*3，植田忠彦*4，高橋　巌*5，府川則子*6，
増田智子*6，小松博久*6，川村眞次*7，丸田里江*7，
市川久次*2

Study on Nutritional Components in Some Vegetables Produced by Organic Cultivation (Ⅱ)

FUSAO USHIO*2, YUKI SAITOH*2, KIMIO MONMA*2, NARUE SAKAMAKI*2,
TOMOKO YOKOYAMA*3, TADAHIKO UETA*4, IWAO TAKAHASHI*5, NORIKO FUKAWA*6,
TOMOKO MASUDA*6, HIROHISA KOMATSU*6, SHINZI KAWAMURA*7,
SATOE MARUTA*7and HISASTUGU ICHIKAWA*2

Keywords：有機栽培 organic cultivation，栄養成分 nutritional components，野菜 vegetables

緒　　言

穀物，野菜，果実等の植物性食品はβ－カロチン，ビタミンC，E，食物繊維などの食生活における供給源である．また最近では，これら植物性食品に含まれるフラボノイド等のポリフェノール化合物[1]，サポニン[2]，さらにリコペン，ルティン等のβ－カロチン以外のカロチノイド[3,4]においても各々生理活性が報告され，抗腫瘍性，抗アレルギー性，抗ウィルス性等が期待されている．米国では，ガン予防の為，カロチノイド，ポリフェノール化合物を多く含むキャベツ，大豆，ニンジン，タマネギなどの野菜を用いたデザイナーフーズも検討されている[4]．現在の我国の食生活の中でも，植物性食品は益々その重要性を高めている．そして消費者はこれら農作物について，農薬，化学肥料を使わない有機栽培による農作物を，より安全性の高い食品として求め，その需要が年々増加している．平成4年農林水産省は，野菜，果物等の生産，流通の円滑化を図り，消費者が混乱することなく，適正な選択がなされることを目的とし，『有機農産物及び特別栽培農産物等に係わる表示ガイドライン』を施行した．

有機農産物に対しては，その安全性と共に「栄養価が高い」等の栄養的な付加価値が云われている[5]．しかし，有機栽培による農作物と化学肥料を用いた栽培による農作物の栄養学的な評価について，客観性のある判断を下せる資料はほとんど見られない．そこで我々は平成5年より，東京都農業試験場において実験的な試みとして栽培された有機質肥料による野菜（有機農法），農薬と化学肥料を5割減らし，その分有機質肥料を施用し栽培されたもの（減農薬・減化学肥料農法）そして従来の化学肥料を主体とした栽培法によるもの（慣行法）について，栄養成分を測定し，比較検討を行った．平成5年，6年度に行ったダイコン，トマト，ナス，ホウレンソウ等

＊ 第1報　東京衛研年報，**46**, 159-164, 1995

＊2 東京都立衛生研究所 生活科学部 栄養研究科　169　東京都新宿区百人町3－24－1
＊2 The Tokyo Metropolotan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊3 東京都職員共済組合青山病院
＊4 東京都環境科学研究所
＊5 東京都立府中療育センター
＊6 東京都衛生局健康推進部
＊7 東京都農業試験場

10品目，18種類の調査については96年度の当該研究年報にて報告したが[6]，その後，さらにニンジン，カボチャ等6品目を調べ，さらにダイコン，ホウレンソウは再度測定したので，前回の結果も踏まえ，その結果を報告する．

実験方法

1. 試　　料

平成7年から10年にかけ，前報と同様に東京都農業試験場実験圃場にて栽培，収穫された野菜を試料として用いた．試料とした野菜は，エダマメ，ニンジン（平成7年7月 収穫），リーフレタス（平成7年12月），カボチャ（平成8年8月），ネギ（平成8年12月），サトイモ(平成9年12月)，ダイコン（平成10年3月），ホウレンソウ（平成10年12月)である．ダイコン，ホウレンソウは有機栽培を開始した当時の前調査においても行ったが，その後の土壌変化を考慮し，再度検査を行った．

栽培法は有機農法（以下　A群とする），減農薬・減化学肥料農法（以下　B群とする），そして慣行法（以下　C群とする）である．

2. 分析方法

前報[4]と同様に行った．すなわち，試料を水洗したのち，水分を拭き取り，可食部を採取した．カロチン，ビタミンE，ビタミンCについては，可食部50～100ｇを混合，均質化し，分析試料とした．またタンパク質，脂質，灰分，食物繊維，ミネラル，チアミン，リボフラビンについては，凍結乾燥したのち，粉末，均質化し，分析に供した．各分析項目について用いた分析方法は前報[4]と同じである．

結果及び考察

表－1に水分，タンパク質，脂質，食物繊維等，表－2には無機質，表－3ではビタミン類の測定結果を示す．なお，ダイコン，ホウレンソウについては，平成5年度の分析結果も比較のため記した．また，有機農法（A群）および減農薬・減化学肥料農法（B群）の測定値の慣行法（C群）に対する有意差検定は分散分析，t検定により行った（危険率は5%とした）．

(1)　タンパク質，脂質，食物繊維等の成分

今回の調査において，有機農法（A群）および減農薬・減化学肥料農法（B群）が慣行法（C群）より有意に高い数値を示した品目，項目はカボチャのB群におけるタンパク質，及びエダマメのA群におけるタンパク質，脂質，炭水化物，食物繊維，灰分であった．一方，リーフレタスのB群における脂質，炭水化物などはむしろC群より有意に低い数値であった．さらに炭水化物の数値が低いため，食物繊維量も有意ではないが低い傾向を示した．ニンジンについても，B群ではタンパク質，脂質，炭水化物，食物繊維などはC群より低い傾向を示し，食物繊維は有意であった．

それ以外の品目では，各項目ともA群またはB群とC群では有意差は示さず，ほぼ同程度の数値であった．

(2)　無機質

前報において，A及びB群がC群に対し有意な差を示した主な無機成分はカルシウム（以下　Ca），カリウム（以下　K）および亜鉛（以下　Zn）であった．Kはほぼ全試料において，A，B群がC群より高い数値を示す傾向があり，ホウレンソウ，ジャガイモではその差は有意であった．一方，Ca，Znでは特にダイコン，コマツナ，ホウレンソウにおいて，A，B群がC群より有意に低い数値を示した．今回の調査においても，Caはダイコン，ホウレンソウ，リーフレタス，ネギ，サトイモではA，B群の数値はC群より有意に低かった．またZnについてもエダマメのB群を除き，全試料においてA，B群がC群より有意に低い数値を示した．反対にやはりKはほぼ全試料において，A，B群の数値はC群より高い傾向があり，ホウレンソウ，ニンジン，エダマメのA群はC群に対し有意であった．Kの数値が有機肥料を中心としたA，B群において化学肥料を用いたC群より高く，逆にCa，Znでは低い数値となるのは，これまで分析した全試料に共通して認められた傾向であり，肥料の相違を示したものと考えられる．

(3)　ビタミン

今回，β－カロチン，ビタミンC等に加え，野菜類には比較的に多く含まれるビタミンEもニンジン，カボチャ等の一部の野菜について測定を行った．前報では，A，B群がC群より有意に高い数値を示したものは，トマトの1品種（品種名：おおみや163）におけるβ－カロチン及びホウレンソウの1品種（品種名：新緑）のビタミンCが散見されるのみであった．多くの品目，品種において，A，B群はC群より高いビタミン含量は認められず，ほぼ同程度の含有量であった．むしろホウレンソウの2品種（品種名：アクティブ，おかめ）のβ－カロチン量では，C群よりA，B群の方が低い数値を示すこともあった．今回の調査においても同様の傾向を示し，ほとんどの品目でβ－カロチン，ビタミンB類，CそしてEでもA，B群とC群の間に差は認められていない．

平成5年から10年まで，16品目，26種類の作物について，同時期に同じ圃場おいて栽培された有機農法(A群)，減農薬・減化学肥料農法（B群）と慣行法（C群）によ

表1．エネルギー，水分，タンパク質，脂質，炭水化物，食物繊維，灰分の測定結果

品名 (品種)	栽培法	エネルギー kcal	水分 g	タンパク質 g	脂質 g	炭水化物 g	食物繊維 g	灰分 g
ダイコン	A	20±0.6	94.0±0.2 *	0.5±0.06	0.10±0.00	4.7±0.2	1.4±0.1	0.7±0.00
(天春)	B	19±0.6	94.4±0.1 *	0.5±0.06	0.10±0.00	4.3±0.2	1.3±0.1	0.7±0.06
	C	20±1.1	94.1±0.3	0.7±0.06	0.10±0.00	4.4±0.2	1.4±0.1	0.7±0.06
ダイコン	A	20±0.6	94.0±0.2 *	0.6±0.06	0.10±0.00	4.7±0.2	1.3±0.0	0.6±0.00
(富美勢)	B	20±0.6	94.2±0.2	0.7±0.06	0.10±0.00	4.3±0.2	1.3±0.1	0.6±0.06
	C	20±0.6	94.2±0.1	0.7±0.00	0.10±0.00	4.4±0.1	1.2±0.1	0.6±0.06
ダイコン	A	20±1.4	93.8±0.3	0.9±0.06	0.04±0.00	4.6±0.4	1.6±0.1	0.7±0.10
(春たから)	B	20±1.6	94.0±0.4	0.9±0.06	0.04±0.00	4.3±0.5	1.6±0.1	0.8±0.08
	C	20±1.2	93.9±0.3	0.8±0.00	0.05±0.00	4.6±0.4	1.6±0.1	0.7±0.05
ホウレンソウ	A	19±0.6 **	92.3±0.2 *	2.5±0.06 *	0.20±0.00	3.3±0.1 **	2.0±0.2 **	1.7±0.06
(アクティブ)	B	21±0.6 **	92.0±0.2 *	2.7±0.12	0.20±0.00	3.5±0.2 **	2.4±0.2 **	1.7±0.06
	C	29±0.6	89.4±0.3	2.7±0.10	0.20±0.00	5.9±0.1	3.0±0.3	1.8±0.10
ホウレンソウ	A	21±0.0 **	91.8±0.1 *	2.7±0.12	0.20±0.00	3.5±0.2 **	2.5±0.3 **	1.8±0.06
(おかめ)	B	23±0.6 **	91.4±0.1 *	2.7±0.06	0.20±0.00	3.9±0.2 **	2.3±0.2 **	1.7±0.06
	C	30±1.2	89.3±0.3	2.8±0.06	0.20±0.00	6.0±0.3	3.2±0.1	1.6±0.00
ホウレンソウ	A	18±0.6 **	92.6±0.1 *	2.4±0.10	0.20±0.00	3.1±0.1 **	2.0±0.2 **	1.7±0.00
(深緑)	B	22±0.6 **	91.5±0.1 *	2.8±0.10 *	0.20±0.00	3.7±0.1 **	2.0±0.1 **	1.8±0.06
	C	26±1.0	90.7±0.3	2.4±0.06	0.20±0.00	5.1±0.2	2.7±0.1	1.6±0.00
ホウレンソウ	A	21±0.4	91.9±0.1	2.5±0.12	0.42±0.04	3.1±0.2	2.5±0.2	2.0±0.05
(深緑)	B	20±0.5	92.1±0.2	2.5±0.06	0.38±0.04	3.2±0.1	2.3±0.1	1.9±0.04
	C	19±1.2	92.5±0.2	2.4±0.06	0.40±0.06	2.8±0.1	2.4±0.1	1.9±0.07
リーフレタス	A	26±1.9	91.4±0.5	1.5±0.00	0.28±0.04	5.5±0.5	2.5±0.1	1.3±0.00
(スーパーベイブリッジ)	B	24±0.8	91.7±0.1	1.6±0.10	0.20±0.00 **	5.2±0.1 **	2.4±0.1	1.3±0.00
	C	26±1.0	91.2±0.3	1.6±0.06	0.28±0.04	5.6±0.2	2.5±0.1	1.3±0.10
ニンジン	A	39±1.2	88.7±0.3	0.7±0.00	0.12±0.04	9.4±0.3	2.8±0.1	1.0±0.04
(向陽二号)	B	38±0.7	88.9±0.2	0.7±0.00	0.12±0.04	9.3±0.2	2.8±0.1 *	1.0±0.05
	C	40±1.4	88.7±0.3	0.8±0.00	0.14±0.05	9.4±0.2	2.9±0.1	0.9±0.05
カボチャ	A	70±4.5	79.3±1.3	1.7±0.05	0.55±0.05	17.1±1.3	2.9±0.3	1.4±0.07
(みやこ)	B	65±5.0	80.6±1.5	2.1±0.53 **	0.64±0.16	15.1±0.7	2.6±0.1	1.5±0.19
	C	71±8.4	79.1±2.2	1.6±0.12	0.58±0.12	17.3±2.2	2.9±0.4	1.4±0.08
ネギ	A	28±1.0	91.5±0.3	1.1±0.00	0.10±0.00	6.8±0.2	1.8±0.1	0.5±0.00
(ホワイトタワー)	B	29±0.7	91.2±0.2	1.0±0.00	0.10±0.00	7.2±0.2	2.0±0.0	0.5±0.00
	C	28±0.4	91.5±0.1	1.1±0.00	0.10±0.00	6.7±0.2	2.0±0.1	0.5±0.00
エダマメ	A	110±2.6 *	75.8±0.3 *	7.8±0.15 *	4.1±0.26 *	10.9±0.2 *	5.8±0.5	1.5±0.04 *
(サヤムスメ)	B	101±1.9	77.6±0.5 *	7.4±0.10	3.7±0.07	10.0±0.4 *	5.6±0.4	1.4±0.04
	C	99±1.9	78.3±0.4	7.2±0.12	3.7±0.11	9.4±0.3	5.6±0.3	1.4±0.05
サトイモ	A	66±1.2 **	81.9±0.3 *	2.3±0.04 *	0.20±0.00	14.3±0.3 **	2.1±0.1	1.3±0.00
(土垂系)	B	64±1.5 **	82.3±0.5 *	2.1±0.14	0.20±0.00	14.1±0.4 **	2.0±0.1	1.3±0.04
	C	71±1.9	80.7±0.5	2.0±0.10	0.20±0.00	15.9±0.4	2.2±0.1	1.2±0.00

単位：可食部100ｇ当たり，平均値±標準偏差　　*：C栽培法（慣行法）に対して有意に高い（危険率５％）
N＝5　　**：C栽培法（慣行法）に対して有意に低い（危険率５％）

表2．無機質の測定結果

品名（品種）	栽培法	Ca mg	P mg	Fe mg	Na mg	K mg	Mg mg	Zn μg	Cu μg
ダイコン	A	20±0.0	33±2.6 *	0.3±0.06	9±1.2	300±10	8±0.6 **	0.15±0.01 **	0.02±0.00
（天春）	B	19±0.6	29±1.0	0.2±0.00	5±0.6	290±6	10±1.0	0.15±0.01 **	0.02±0.00
	C	23±3.1	28±1.2	0.2±0.00	6±1.5	280±15	13±1.7	0.19±0.01	0.02±0.00
ダイコン	A	18±1.5 **	27±1.0 *	0.2±0.00	6±0.6	270±6	7±0.6 *	0.13±0.01	0.02±0.00
（富美勢）	B	20±0.0 **	23±0.6	0.2±0.00	4±0.6	290±15	10±0.6	0.15±0.01	0.02±0.00
	C	25±1.0	22±0.6	0.2±0.00	4±1.0	270±12	9±0.6	0.15±0.01	0.02±0.00
ダイコン	A	27±1.7 **	20±0.7	0.1±0.00	12±1.5	310±35	10±0.7 *	0.18±0.02	0.02±0.00
（春たから）	B	29±2.3 **	19±0.7	0.1±0.00	13±2.1	326±49	10±1.1	0.17±0.01	0.02±0.00
	C	33±3.0	20±1.2	0.1±0.00	12±1.2	276±17	9±0.7	0.19±0.02	0.02±0.00
ホウレンソウ	A	38±1.0 **	50±0.6 **	1.3±0.10 **	3±0.0	780±23 *	77±2.1 **	0.48±0.01 **	0.08±0.00 **
（アクティブ）	B	49±1.0 **	52±2.1 **	1.8±0.12 **	5±0.6 *	730±23	92±1.0 **	0.54±0.01 **	0.08±0.01 **
	C	73±2.3	72±2.3	4.6±0.40	3±1.0	690±35	100±0.0	1.20±0.06	0.12±0.01
ホウレンソウ	A	34±1.0 **	47±2.6 **	1.3±0.00 **	2±0.0	840±15 *	81±1.0 **	0.58±0.02 **	0.09±0.00 **
（おかめ）	B	35±1.2 **	50±1.2 **	1.4±0.10 **	2±0.0	780±6 *	80±1.5 **	0.64±0.01 **	0.09±0.00 **
	C	58±4.4	59±1.5	2.8±0.23	3±0.0	640±15	99±1.2	1.20±0.06	0.12±0.01
ホウレンソウ	A	39±1.0 **	56±0.6 **	1.0±0.06 **	2±0.6	760±15 *	90±2.1	0.68±0.03 **	0.08±0.00 **
（深緑）	B	58±3.5	61±1.7	1.8±0.06 **	6±0.6 *	730±6 *	110±5.8 *	0.78±0.01 **	0.09±0.06
	C	63±2.3	63±1.5	2.6±0.23	2±0.0	620±6	93±2.1	1.30±0.06	0.10±0.00
ホウレンソウ	A	32±0.8 **	51±1.6 *	1.0±0.08	5±0.0 **	786±8 *	57±0.8	0.56±0.02 **	0.06±0.01 *
（深緑）	B	42±2.4 **	47±2.1 *	0.9±0.08	10±1.5	702±18 *	68±2.4 *	0.56±0.03 **	0.04±0.00
	C	54±2.1	45±2.6	0.9±0.05	9±2.0	666±16	59±3.2	0.94±0.10	0.04±0.00
リーフレタス	A	66±2.9 **	39±2.3	0.9±0.10 **	6±0.5 *	506±15	20±1.0	0.26±0.01 **	0.07±0.00 **
（スーパーベイブリッジ）	B	69±1.9 **	40±1.6 *	1.3±0.25	4±0.0	500±11	20±0.6	0.25±0.01 **	0.08±0.01
	C	74±5.9	37±1.0	1.1±0.07	3±0.5	498±20	20±0.9	0.30±0.01	0.09±0.02
ニンジン	A	32±1.2	39±1.6 *	0.3±0.04	15±2.8	420±14 *	13±0.7	0.15±0.01 **	0.05±0.01 **
（向陽二号）	B	31±1.5 **	36±1.0	0.2±0.05 **	14±2.0	392±10	13±0.5	0.14±0.00 **	0.07±0.01
	C	33±1.0	36±1.2	0.3±0.00	13±1.7	378±13	13±0.6	0.19±0.01	0.08±0.01
カボチャ	A	15±2.2	58±5.7	0.3±0.05	0.6±0.1	602±46	18±2.3	0.21±0.03 **	0.06±0.01
（みやこ）	B	11±3.1 **	67±11 *	0.3±0.05	0.5±0.1	662±73 *	19±3.1	0.26±0.06 **	0.06±0.01
	C	17±2.8	51±3.3	0.3±0.05	0.5±0.1	582±29	17±1.5	0.37±0.06	0.06±0.00
ネギ	A	30±2.2 **	28±0.5	0.3±0.00	0.3±0.1	180±6	15±0.5	0.18±0.00	0.03±0.00
（ホワイトタワー）	B	35±4.4	25±0.7	0.3±0.04	0.4±0.1	180±0	15±0.7	0.20±0.01	0.03±0.00
	C	47±5.4	26±0.6	0.3±0.04	0.5±0.1	184±8	13±0.5	0.26±0.01	0.06±0.01
エダマメ	A	46±1.1 **	128±4.0 *	1.9±0.00	0.6±0.12	566±20 *	47±0.4 *	1.30±0.00 *	0.33±0.01 *
（サヤムスメ）	B	48±1.0	120±0.0	1.8±0.06	0.6±0.09	510±9	42±1.2	1.20±0.00	0.28±0.01 **
	C	48±1.0	120±0.0	2.0±0.36	0.7±0.14	496±10	41±0.8	1.20±0.05	0.30±0.05
サトイモ	A	10±1.1 **	52±2.0	0.3±0.05	0.4±0.10	626±5 *	20±0.4	0.18±0.00	0.10±0.00
（土垂系）	B	11±1.0 **	50±2.9	0.4±0.05	0.3±0.05	614±15	18±1.6	0.19±0.02	0.09±0.01
	C	14±1.4	51±1.5	0.4±0.04	0.3±0.05	584±8	19±1.7	0.29±0.06	0.11±0.01

単位：可食部100ｇ当たり，平均値±標準偏差　　*：C栽培法（慣行法）に対して有意に高い（危険率５％）
N＝5　　**：C栽培法（慣行法）に対して有意に低い（危険率５％）

表3．ビタミンの測定結果

品名（品種）	栽培法	β-カロチン μg	ビタミンA効力 IU	チアミン mg	リボフラビン mg	ビタミンC mg	α-トコフェノール μg	ビタミンE効力 IU
ダイコン（天春）	A			0.016±0.003	0.019±0.002	23±1.5		
	B			0.016±0.001	0.016±0.002	21±1.0		
	C			0.016±0.003	0.015±0.002	22±1.0		
ダイコン（富美勢）	A			0.017±0.002	0.015±0.002	20±1.0		
	B			0.020±0.002	0.015±0.000	20±1.2		
	C			0.022±0.003	0.015±0.001	21±1.0		
ダイコン（春たから）	A			0.020±0.000	0.020±0.000	17±2.0		
	B			0.020±0.000	0.020±0.000	17±1.2		
	C			0.016±0.000	0.016±0.000	16±1.4		
ホウレンソウ（アクティブ）	A	3000±310 **	1700±150 **	0.11±0.01	0.21±0.02	63±10		
	B	3200±210 **	1800±100 **	0.10±0.01	0.22±0.03	66±12		
	C	4600±250	2600±150	0.11±0.01	0.23±0.01	73±5.5		
ホウレンソウ（おかめ）	A	2700±100 **	1500±100 **	0.12±0.01	0.20±0.01 **	61±7.5		
	B	2900±58 **	1600±58 **	0.11±0.01	0.21±0.01	59±6.8		
	C	3700±200	2100±150	0.12±0.01	0.22±0.01	64±3.5		
ホウレンソウ（深緑）	A	3100±350	1700±200	0.10±0.01	0.20±0.01	57±4.7		
	B	3500±350	2000±200	0.10±0.01	0.21±0.01	73±3.1 *		
	C	3200±250	1800±150	0.11±0.01	0.20±0.01	59±4.7		
ホウレンソウ（深緑）	A	2500±420	1400±230	0.08±0.01	0.18±0.00	44±3.9		
	B	2000±280	1100±160	0.09±0.00	0.18±0.00	44±2.5		
	C	2400±390	1300±220	0.07±0.01	0.19±0.01	41±4.9		
リーフレタス（スーパーベイブリッジ）	A	1600±100	870±55	0.09±0.00	0.13±0.01	23±2.1		
	B	1700±49	920±25	0.10±0.00	0.12±0.01	23±6.0		
	C	1600±40	880±24	0.09±0.01	0.12±0.01	23±3.5		
ニンジン（向陽二号）	A	4400±350	3300±130	0.05±0.00	0.04±0.00	5.0±1.0	0.03±0.01 *	0.03±0.01 *
	B	4000±500	3100±390	0.05±0.00	0.04±0.00	5.5±0.8	0.02±0.01	0.02±0.01
	C	4300±420	3300±300	0.05±0.00	0.04±0.00	5.0±1.2	0.01±0.00	0.01±0.00
カボチャ（みやこ）	A	2800±330	1600±190	0.07±0.01	0.08±0.01	26±2.8	2.4±0.5	2.5±0.5
	B	2600±200	1500±120	0.08±0.01	0.07±0.01	30±3.7	2.5±0.3	2.6±0.3
	C	2500±140	1400±80	0.07±0.01	0.07±0.01	28±3.8	2.3±0.8	2.4±0.8
ネギ（ホワイトタワー）	A	540±98	300±55	0.05±0.00	0.04±0.00	18±1.4	0.21±0.01 **	0.22±0.01 **
	B	620±61	350±34	0.04±0.00	0.04±0.01	19±2.1	0.28±0.06	0.29±0.06
	C	540±71	300±40	0.04±0.00	0.04±0.00	17±1.4	0.27±0.02	0.28±0.02
エダマメ（サヤムスメ）	A	70±7	51±5	0.31±0.020	0.11±0.000	35±2.7	0.28±0.07	0.38±0.07
	B	75±18	54±13	0.33±0.020	0.13±0.010	35±1.6	0.24±0.05	0.34±0.05
	C	67±7	49±5	0.34±0.020	0.15±0.000	35±1.6	0.24±0.05	0.34±0.05
サトイモ（土垂系）	A			0.08±0.00	0.03±0.00	3.9±0.1	0.03±0.01 *	0.03±0.01 *
	B			0.08±0.01	0.02±0.00	3.8±0.2	0.02±0.01	0.02±0.01
	C			0.08±0.00	0.03±0.00	4.0±0.1	0.01±0.00	0.01±0.00

単位：可食部100ｇ当たり，平均値±標準偏差　　*：C栽培法（慣行法）に対して有意に高い（危険率５％）

N＝5　　**：C栽培法（慣行法）に対して有意に低い（危険率５％）

る作物の栄養成分含量について比較,検討を行ってきた.その結果，タンパク質，脂質，炭水化物，食物繊維，β－カロチン，ビタミンC含量は，今回の調査では栽培方法による差は認められなかった．また比較的栽培方法による差を，Ca，Zn，Kなどで示した無機質においても，ホウレンソウにおけるZn，Feを除き，1.5倍以上の含量に差を示すものは見当たらず，そのZn，Feについても，Feは数mg，Znは1μg前後の微量レベルにおける差でしかない．

吉田[7-9]はホウレンソウとトマトについて，有機質肥料の栽培による収穫物と無機質（化学肥料）による収穫物を比較している．ホウレンソウでは，β－カロチン，ビタミンCいずれも施肥条件に差は認められないとしているものの，トマトはビタミンC，糖，有機酸の含量について有機質肥料による収穫物が高い数値であったと報告している．我々の調査では，ホウレンソウは4品種調べ，2種は有機質肥料を施肥した有機農法（A群）または減農薬・減化学肥料農法（B群）による収穫物の方が化学肥料施肥（慣行法，C群）による収穫物より有意ではないが高い傾向を示したものの，他の2種（アクティブ，おかめ）では逆の傾向を示し，施肥条件の明確な相違は認められていない．またトマトにおいても，調査した2種類（ふじみ，おおみや163）でβ－カロチン，糖度，酸度いずれも3栽培法間に相違はない．吉田が報告しているトマトのビタミンC，糖，有機酸の含量を見ると，確かに平均値では有機栽培の収穫物が高い数値ではあるものの，ビタミンC，有機酸含量については各群の数値の変動は大きく，有意差は認められない．

農作物の栄養成分含量は，天候，気温等の気象条件により大きく影響されることは知られている．今回は，同じ気象条件下における同時期，同圃場において，有機農法，減農薬・減化学肥料農法そして慣行法で栽培された作物についての比較である．また，使用した有機質肥料は，鶏，豚，牛の糞便，剪定枝を基にした堆肥，脱脂大豆，骨粉，油粕等から成り，有機質肥料としては十分なものである．以上のことより，本調査では施肥された肥料の性状，方法の相違による作物の栄養成分含量への影響，効果は少ないものと判断された．

文　献

1）宮澤陽夫：日本農化学誌：**73**, 532-34, 1999
2）吉積智司：日本油化学会主催　第3回　食品健康科学セミナー講演要旨, 70-106, 1998, 東京
3）西野輔翼, 岩島昭夫：ビタミン, **67**, 531-535, 1993
4）西野輔翼：ビタミン, **72**, 403-405, 1998
5）国民生活センター編：多様化する有機農産物の流通, 1992, 学陽書房, 東京
6）高橋巌, 横山知子, 坂牧成恵　他：東京衛研年報, **46**, 159-164, 1995
7）吉田企世子, 森　敏, 長谷川和久　他：栄食誌, **37**, 123-127, 1984
8）中美治子, 吉田企世子：女子栄養大学栄養科学研究所年報, **3**, 293-296, 1995
9）吉田企世子：栄養学雑誌, **56**, 1-9, 1996

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 185-188, 1999

新規市販野菜の栄養成分及びその物性

菊谷典久*, 齋東由紀*, 坂牧成恵*, 門間公夫*,
井口正雄*, 牛尾房雄*, 早藤知惠子*, 市川久次*,
新井聡美**, 帯刀敏彦**

Nutrient Compositions and Physical Properties of Commercial Vegetables newly introduced in the Japanese Market

NORIHISA KIKUTANI*, YUKI SAITOH*, NARUE SAKAMAKI*, KIMIO MONMA*,
MASAO IGUCHI*, FUSAO USHIO*, CHIEKO HAYAFUJI*, HISATSUGU ICHIKAWA*,
SATOMI ARAI** and TOSHIHIKO TATEWAKI**

Recently numerous kinds of new vegetables have been put on the Japanese market and some of these have been widely accepted. In this paper nutrient compositions and breaking strength analysis of four new vegetables, 1) "Nakurosu", a variety of eggplants produced by the use of cell fusion, 2) "Koshino ruby", a variety of tomatoes produced by the utilization of tissue culture, 3) cherry tomato(mini tomato), 4) "TOMA-P", tomato sweet pepper, a variety of paradicsom paprika of Hungary, were described.

The protein content of the "Nakurosu" was slightly higher than that of a conventional type of eggplant, the "Senryo No.2".

The macronutrient composition of the "Koshino ruby" was similar to that of a conventional type of tomato, the "Momotaro eight". Vitamin A, vitamin C and lycopene contents in the "Koshino ruby" were higher than those in the "Momotaro eight".

As for the cherry tomato, the vitamin A content was remarkably higher than that in tomatoes, the "Koshino ruby" and the "Momotaro eight".

The "TOMA-P" was rich in vitamin C, and the value of the breaking force of "TOMA-P" measured by a creep meter was similar to that of conventional sweet peppers.

Keywords：栄養成分 nutrient composition, 物性 physical property, 破断試験 breaking strength analysis, ナス eggplant, トマト tomato, ミニトマト mini tomato, チェリートマト cherry tomato, トマピー TOMA-P

* 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
** 東京都食品環境指導センター

緒　言

世界的な人口増加による食糧供給の逼迫化を背景に，農業生産の拡大を目的として各種の新技術が開発されてきた．特に1960年代以降の分子レベルに及ぶ生物学の進歩は，農業分野にも多大な影響を与え，その生産プロセスや農産物そのものを大きく変えつつある．

現在，組織培養，胚培養，細胞融合，遺伝子組み換え等の技術が実用化されており，野菜では千宝菜，ポマトなどの新種が作られている．

また，近年，我が国においては農産物輸入の自由化を契機として，新たな種類の野菜類が市場に出回り，より一層の食の多様化が進んでいる．

今回，著者らは，これら新技術を用い創出されたナス，トマトの新品種とその在来種，また近年普及が進んでいるミニトマト，トマトとピーマンの形質を合わせ持つといわれ，最近市販され始めた新野菜トマピーについて栄養成分分析，物性試験を行い，若干の知見を得た．以下報告する．

実験方法

1．試料

1）ナス「ナクロス」：細胞融合技術で作られたナス，奈良県産．「千両二号」：ナス在来種，東京都産．

2）トマト「越のルビー」：組織培養技術で作られたトマト，福井県産．「桃太郎8」：トマト在来種，東京都産．

3）ミニトマト「ミニキャロル」：ミニトマト在来種，東京都産．

4）トマピー：ハンガリー原産のピーマンの改良種，千葉県産．

2．分析方法

栄養成分分析：試料は水洗し，へたなどを除いた可食部について凍結乾燥を行った後，粉末・均一化して分析に供した．なお，カロテノイド，ビタミンC，ビタミンEは，同様に可食部について生試料を直接分析に供した．各項目の分析方法は次の通りである．1）水分：常圧加熱乾燥法[1]．2）タンパク質：セミミクロケルダール法[2]．3）脂質：酸分解法[3]．4）炭水化物，エネルギー：100gから水分，タンパク質，脂質及び灰分の合計を差し引いた値を炭水化物とした．またエネルギー換算には，FAOのエネルギー換算係数[4]を用いた．5）灰分：直接灰化法[5]．6）無機質：衛生試験法[6]に従い灰化した後，ナトリウム（以下Naと略す），マグネシウム（以下Mgと略す），カルシウム（以下Caと略す），亜鉛（以下Znと略す）は原子吸光法[7]，カリウム（以下Kと略す），リン（以下Pと略す），鉄（以下Feと略す），銅（以下Cuと略す），マンガン（以下Mnと略す）はICP（誘導結合プラズマ）発光分光分析法[8]で測定．7）ビタミンA：液体クロマトグラフ法[9]．8）ビタミンB_1：高速液体クロマトグラフ法[10]．9）ビタミンB_2：高速液体クロマトグラフ法[11]．10）ナイアシン：微生物学的試験法[12]．11）ビタミンC：高速液体クロマトグラフ法[13]．12）ビタミンE：高速液体クロマトグラフ法[14]．13）リコペン：高速液体クロマトグラフ法[15]．14）ビタミンK：高速液体クロマトグラフ法[16]．

物性試験（破断試験）：ナスでは，輪切り切片を1cm厚として破断試験を行った．トマト，ミニトマト，トマピーでは，皮部側からプランジャーを挿入し破断試験を行った．破断強度の測定にはクリープメータ「レオナーRE-3305型」（山電株式会社）を用いた．測定条件はロードセル 2 kg，測定速度 1 mm/s，プランジャーNo. 4，直径3mmである．なお，トマピーの試験と同時に，都内で市販されていたピーマン，赤ピーマンについても同様に試験を行った．

結果および考察

1．栄養成分分析

主要栄養成分と無機質の分析結果をTable 1に示した．

ナスの原産地はインドで，今では，日本の各地で多くの品種が作られている．ナクロスは，青枯病抵抗性に優れた品種の開発を目的に，細胞融合技術で作られたナスである．中長ナスの千両種は，食味に優れ，栽培上の利点もあるところから，現在，日本で一番多く生産されている．タンパク質ではナクロスが，Caでは千両二号が，やや多い傾向を示したが，他の成分では両種ともほぼ同様な結果であった．

トマトは明治期には特殊な西洋野菜として扱われていたが，1930年代に一般に普及し，現在，生食用，加工用とも品種の改良が進められている．越のルビーは，高糖度で食味が良く，青枯病抵抗性に優れたフルーツタイプの品種の開発を目的に，組織培養技術で作られたトマトである．主要栄養成分は越のルビー，桃太郎８とも，ほぼ同様の値であった．無機質は，Caで越のルビーが，P，Mnで桃太郎８が多い傾向を示した．

ミニトマトはプチトマトとも呼ばれ，近年普及が著しい野菜である．今回は，丸形で欧米においてチェリートマトと称される品種について分析した．トマトに比べ，水分含量は低く，各無機成分は高い結果であった．

トマピーはハンガリー原産のピーマンの一種で，数年前より我が国で栽培され，市場に登場した．トマトのよ

Table 1. Contents of Macronutrients and Minerals

Vegetable	Energy kcal	Water g	Protein g	Lipid g	Carbohydrate g	Ash g	Na mg	K mg	Ca mg	Mg mg	P mg	Fe mg	Zn μg	Cu μg	Mn μg
Eggplant															
Nakurosu	23	92.8	1.5	0.1	5.1	0.5	1	390	12	6	20	0.2	130	65	140
Senryo No.2	19	93.9	1.1	0.1	4.4	0.5	1	330	19	5	17	0.1	150	76	160
Tomato															
Koshino ruby	24	92.7	1.2	0.2	5.4	0.5	3	390	14	5	20	0.2	140	46	100
Momotaro eight	26	91.8	1.3	0.2	5.9	0.8	2	440	10	5	24	0.2	130	41	180
Mini tomato	29	90.5	1.7	0.2	6.6	1.0	4	510	23	7	28	0.2	170	68	280
TOMA-P	30	90.6	1.4	0.2	7.1	0.7	2	670	14	6	51	0.6	200	90	100

Values are expressed as amounts per 100g edible portions.

Table 2. Contents of Vitamins (V) and Lycopene

Vegetable	α-Carotene μg	β-Carotene μg	V.A potency IU	Lycopene μg	$V.B_1$ mg	$V.B_2$ mg	Niacin mg	V.C mg	α-Toc mg	β-Toc mg	γ-Toc mg	δ-Toc mg	V.E potency mg	V.K μg
Eggplant														
Nakurosu	tr	13	7	tr	0.03	0.04	0.8	5	0.63	0.03	0.07	tr	0.7	6.2
Senryo No.2	tr	8	4	21	0.03	0.03	0.6	4	0.27	0.02	0.01	tr	0.3	6.4
Tomato														
Koshino ruby	tr	356	198	607	0.06	0.03	0.9	30	0.57	0.35	0.34	0.04	0.7	6.4
Momotaro eight	tr	235	131	315	0.07	0.03	1.0	11	0.66	0.18	0.25	0.13	0.7	7.0
Mini tomato	tr	633	352	567	0.07	0.04	1.2	13	0.50	0.24	0.55	tr	0.6	9.4
TOMA-P	71	490	292	330	0.06	0.12	1.5	157	5.10	0.10	0.01	0.02	5.1	5.5

Values are expressed as amounts per 100g edible portions.
Toc : Tocopherol
tr : trace

うな赤色果実であるが，切断するとピーマン同様空洞がある．主要栄養成分は赤ピーマン[17]と類似しており，無機質では，特にK，P，Cuを多く含んでいた．

ビタミンとリコペンの分析結果をTable 2に示した．

リコペンは赤色色素で，カロテノイドの一種である．特に近年，ガンの予防効果の観点から注目されている[18]．

ナスでは千両二号のリコペン量はナクロスに比べ多かったが，ビタミンについては，両種ともほぼ同様の結果であった．

トマトでは，越のルビーは桃太郎８に比べ，ビタミンA，C，リコペンの値が高かった．

ミニトマトではビタミンAが両種のトマトより高い値を示した．

トマピーはビタミンCが多く，イチゴ（可食部100gあたり80mg）[19]，レモン（同90mg）[20]に比較しても高い値であった．また，α－カロテンの量も比較的多かった．

2．物性試験

物性試験結果をTable 3に示した．破断荷重(breaking force)は，モノを噛んだときの堅さの指標とされている．

ナスでは，輪切り切片で測定した．千両二号に比べナクロスの値は低く，果肉部は柔らかいといえる．

トマトでは，皮部側からプランジャーを挿入し破断試験を行った．越のルビーは桃太郎８よりも低い値であった．

ミニトマトは越のルビーと同様な数値であった．

トマピーはトマトとピーマンの形質を合わせ持つといわれるが，物性面からみると，同時に試験を行ったピーマン（1114gf），赤ピーマン（995gf）とほぼ同様の値であり，これらに類似した野菜であることが示された．

Table 3. Results of Breaking Strength Analysis

Vegetable	Breaking force (gf)
Eggplant	
Nakurosu	20
Senryo No.2	301
Tomato	
Koshino ruby	58
Momotaro eight	367
Mini tomato	60
TOMA-P	1021

文　献

1）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，1-2, 1997, 社団法人資源協会，東京

2）日本薬学会編：衛生試験法注解，272-274，1990，金原出版，東京

3）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，21-23, 1997, 社団法人資源協会，東京

4）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，16, 1997, 大蔵省印刷局，東京

5）日本薬学会編：衛生試験法注解，261-263，1990，金原出版，東京

6）日本薬学会編：衛生試験法注解，266-267，1990，金原出版，東京

7）日本薬学会編：衛生試験法注解，269-271，1990，金原出版，東京

8）日本薬学会編：衛生試験法注解，17-21，1990，金原出版，東京

9）日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法１，34-39，1983，東京化学同人，東京

10）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，83-86, 1997, 社団法人資源協会，東京

11）日本薬学会編：衛生試験法注解，363-365，1990，金原出版，東京

12）日本薬学会編：衛生試験法注解，372-375，1990，金原出版，東京

13）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，107-109, 1997, 社団法人資源協会，東京

14）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，72-73, 1997, 社団法人資源協会，東京

15）Müller, H.：*Z. Lebensm. Unters. Forsch A*, 204, 88-94, 1997

16）科学技術庁資源調査会食品成分部会編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアル，74-82, 1997, 社団法人資源協会，東京

17）科学技術庁資源調査会編：五訂日本食品標準成分表－新規食品編－，64-65, 1997, 大蔵省印刷局，東京

18）Giovannucci, E.：*J. Natl. Cancer Inst*, 91, 317-331, 1999

19）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，233, 1997, 大蔵省印刷局，東京

20）科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表，255, 1997, 大蔵省印刷局，東京

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 189-192, 1999

バイオ食品添加物α-アミラーゼの品質調査

広門雅子[*1], 伊藤弘一[*2], 安野哲子[*3], 平田恵子[*3],
植松洋子[*3], 鈴木助治[*4], 安田和男[*1]

Survey on the Quality of Food Additive's α-Amylase Derived from Genetically Modified Organisms

MASAKO HIROKADO[*1], KOICHI ITO[*2], TETSUKO YASUNO[*3], KEIKO HIRATA[*3],
YOKO UEMATSU[*3], SUKEJI SUZUKI[*4] and KAZUO YASUDA[*1]

Keywords：遺伝子組み換え体 genetically modified organisms, α-アミラーゼ α-amylase, キャピラリーゾーン電気泳動 capillary zone electrophoresis, 有害金属 hazardous metal, 酵素活性 enzyme activity

緒　　言

遺伝子組み換え技術により生産された食品及び食品添加物の安全性評価指針が，平成３年12月厚生省によって定められ，平成10年２月に遺伝子組換えα-アミラーゼ（以下バイオアミラーゼと略す）はこの指針に適合した食品添加物であることが確認された[1)]．

バイオアミラーゼは*Bacillus stearothemophilus*（α-マルトース生成能の高いα-アミラーゼを産生する細菌）の有用遺伝子を繁殖力の強い*Bacillus subtilis*に導入し製造されたものであり，α-マルトース（還元糖）生成能の高い酵素である[2)]．

バイオアミラーゼはパンなどの保湿性を高めて柔らかさを保つ効果があり[2)]，既に米国やヨーロッパ諸国の市場に登場し，菓子，デンプン糖等の製造にも用いられている[2)]．しかしその酵素製剤としての品質は不明である．そこでバイオ製品の品質を検討するため，キャピラリーゾーン電気泳動（以下CZEと略す）法を用いて酵素タンパク質の泳動パターンを分析するとともに有害金属,副剤等の含量及び酵素活性を測定して，バイオ製品と従来品との比較を行ったので報告する．

実験の部

１．試料　バイオアミラーゼ：製造ロットの異なる粉末製品２検体をBio-P1及びBio-P2とし，液体製品１検体をBio-Lとした．いずれもノボノルディスクバイオインダストリー㈱より提供されたものである．従来型のα-アミラーゼ（以下TRと略す）：４社の食品添加物用を用いた．細菌由来の製品３検体をTR-B1，TR-B2，TR-B3とし，カビ由来の製品２検体をTR-F1及びTR-F2とした．酵素活性の測定には全試料を用い，その他の試験にはBio-P1, Bio-L, TR-B1，TR-F1を用いた．

２．α-アミラーゼ標準品　1）*Bacillus subtilis*由来及び*Procine pancreas*由来の２種のα-アミラーゼ（フナコシ製）

３．装置　CZE装置：Hewlett Packard（以下HPと略す）社㈱製HP^{D20}型，マイクロ波式分解装置：CEM社製MDS-2000型，原子吸光光度計：㈱日立製作所製Z-5300型（水素化物発生装置HFS-3型付），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，水銀測定装置：日本インスツルメンツ㈱製マーキュリーSP-3D型，水分測定装置：京都電子製MKS-210型，自動滴定装置：平沼製COM-900型

４．実験操作

１）タンパク質のCZEパターン分析　あらかじめ各試料中の塩類を分析し，主成分が塩化ナトリウム（NaCl）であることが確認されたので，その含量を測定したところ最高濃度が約84%であった．そこで試料４gを秤取し，NaCl含量を約84%に調製し，水に溶解して100mlとした．この水溶液をメンブランフィルター（0.45μm）を用い

＊1 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
＊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添加物研究科
＊4 東京都立衛生研究所多摩支所理化学研究科

てろ過した後，CZE法により測定した．得られた電気泳動図及び各ピークの吸収スペクトルについてバイオ製品と従来品との比較を行った．

CZE分析条件　キャピラリーカラム：フューズドシリカ，長さ56cm，内径75μm（HP製），泳動バッファ：50mMホウ酸塩溶液（pH9.3）（HP製），注入：50mbr×2.0s.，電圧：30kV（ネガティブ），カラム温度：20℃，検出器：フォトダイオードアレイ（測定波長214nm，スペクトル測定波長190～350nm）

2）有害金属[3] カドミウム（Cd），鉛（Pb），クロム（Cr）は試料を乾式灰化した後，4-メチル-2-ペンタノンを用いて抽出し，マンガン（Mn）は乾式灰化した後，それぞれ原子吸光光度法により測定した．ヒ素（As）は硝酸マグネシウムを用いて乾式灰化した後，テトラヒドロホウ酸ナトリウム還元気化原子吸光法により測定した．水銀（Hg）は熱分解・金アマルガム・常温原子吸光法により測定した．

3）重金属（硫化ナトリウム法）：食品添加物公定書中の重金属試験法[4]の方法に従って試験し，試料中の有害金属と硫化ナトリウムが反応し生成した硫化物の黄色～黒褐色の度合いをPb標準溶液の黒色度と比較した．本法は有害金属類の総量の限度をみる試験である．

4）水分　カールフィシャー法[5]を用いた．

5）食塩（NaCl）：硝酸銀滴定法[6]を用いた．

6）カルシウム（Ca）　マイクロ波を用いて湿式分解した後，ICP発光分光分析法[6]により測定した．

7）糖類　液体クロマトグラフ法[7]を用いた．

8）酵素活性　①デンプン糖化力[8]：0.5%溶性デンプンを基質として用いpH5.5，40℃の条件で10分間反応させた後，1分間当たりの還元力（ブドウ糖）の増加量（U/g）を測定した．②デンプン糊精化力[9]：1%溶性デンプンを基質として用いpH5.5，40℃の条件で10分間反応させた後，ヨウ素ーデンプン反応による青色呈色を1分間に10%減少させる力（U/g）を測定した．

表1．副剤の測定結果

(%)

種類	形態	水分	塩化ナトリウム	カルシウム	糖類* ブドウ糖	糖類* ショ糖
Bio-P1	粉末	1.2	80.2	0.37	0.5以下	0.5以下
Bio-L	液体	54.0	13.2	0.18	0.5以下	12.9
TR-B1	粉末	1.3	83.9	0.15	0.5以下	0.5以下
TR-F1	粉末	2.8	37.9	0.11	9.2	0.5以下

*乳糖，麦芽糖：全て0.5%以下，ソルビートル：0.2%以下
Bio：バイオ製品，TR：従来品（TR-B　細菌由来，TR-F　カビ由来）

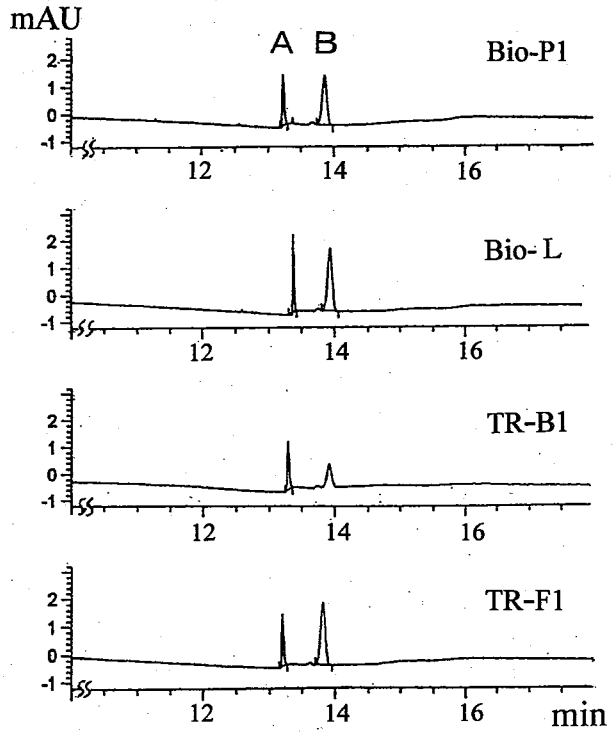


図1．キャピラリー電機泳動図
Bio：バイオ製品
TR：従来品（TR-B：細菌由来，TR-F：カビ由来）

結果及び考察

1．酵素タンパク質のCZEパターン分析　CZE分析においては塩濃度が泳動時間に影響を及すため，あらかじめ試料中の塩類を分析したところ，表1に示すようにNaClが主成分であることが分った．そこで全ての試料中のNaCl濃度が最高の84%とほぼ同等になるようにNaClを添加し調製した後，CZE分析を行った．

バイオ製品及び従来品の電気泳動図を図1に示したが，泳動時間約13.3分にピークA，13.9分にピークBの2本のピークが全製品で確認された．さらにピークA及びBについて190～350nmの吸収スペクトルを確認したところ，バイオ製品及び従来品とも一致しており，両者に特に差は見られなかった．これらA，B2本のピークは2種のα-アミラーゼ標準品においても同様に確認され，吸収スペクトルも一致していたことから，ピークA及びBは酵素タンパク質であると推定された．

2．有害金属類　酵素の有害金属類の限度値は国際規格（JECFA規格）ではAs3mg/kg，Pb10mg/kg，重金属40mg/kgと設定され，米国規格（FCC規格）では，Pb 5mg/kg，重金属30mg/kgと規定されている．そこでこれらの金属とMn，Cr，Cd，Hgについて分析を行った．その結果，MnがBio-P1から0.67mg/kg，Bio-Lから0.94mg/kg，TR-B1から0.40mg/kg，TR-F1から

0.86mg/kg検出された．このようにバイオ製品と従来品との間でMn含有値に特に差は見られなかった．その他の重金属についてはバイオ製品及び従来品ともPbは0.1mg/kg以下，Crは0.05mg/kg以下，Cdは0.01mg/kg以下，Hgは0.01mg/kg以下，Asは0.05mg/kg，重金属は30mg/kg以下であり，JECFA及びFCC規格に規定されたPb，As及び重金属の限度値を超えたものはなかった．以上，有害金属類については食品衛生上特に問題は見られなかった．なお，わが国においても本年4月に食品添加物の成分規格が改正され，トリプシン，パパイン，ブロメライン，ペプシンなど4種の酵素にはじめてAs（亜ヒ酸として），Pb及び重金属（Pbとして）についてJECFA規格と同じ限度値がそれぞれ4.0μg/g，10μg/g及び40μg/gと設定された[10]．今後はこれらの基準値が全ての酵素に設定されると思われる．

3．副剤等　著者らは平成2～3年度に酵素製剤の品質調査[11-14]を行い，酵素の製造過程で使用される培地成分や塩析剤が製剤に残留していること，また酵素の安定化や希釈の目的で種々の添加物が加えられていることを明らかにした．その調査において従来品のα-アミラーゼから塩類ではNaClやCa塩が，糖類ではブドウ糖，乳糖，麦芽糖，ショ糖などが検出された．このことから，今回のバイオ製品及び従来品についてもNaCl，Ca塩及び糖類を分析しその結果を表1に示した．

1）塩類　酵素の活性を高める目的で添加されたと考えられるNaClやCaが検出された．NaCl含量は，バイオ製品が13.2%，80.2%，従来品が37.9%，83.9%であった．今回のNaCl含量は，前回の調査結果[12, 14]（12.2～63.8%）に比べ，バイオ製品及び従来品とも濃度の高い製品があったが，両者の含有量に差はなく，低い含量は両者とも前回の調査結果の範囲内であり，特に差は見られなかった．

Ca含量はバイオ製品が0.18%，0.37%，従来品が0.11%，0.15%であった．前回の調査[12, 14]ではCa含量が1%を超える製品が数種類あったが，今回はバイオ製品及び従来品とも1%を超えたものはなく，特に差は見られなかった．

2）糖類　酵素の安定剤として添加されたと考えられるブドウ糖が従来品のTR-F1から9.2%，ショ糖がバイオ製品のBio-2から12.9%検出された．平成3年度の調査でも従来品のアミラーゼからショ糖が同程度検出されていたことから，糖類はバイオ製品と従来品との間に特に差はないものと思われる．

4．酵素活性　従来品はデンプンを主としてグルコース6分子重合体単位で分解する作用があり，バイオ製品は従来品と同様の分解作用に加えて，グルコース2分子重合体（還元糖）単位に分解する作用が強いと言われている．そこで糖化力測定法（主として還元糖量を測定する試験）と糊精化力測定法（主としてグルコース6分子重合体量を測定する試験）を用いて比較検討した．

表2．酵素活性の測定結果

種類	形態	最適pH	デンプン糖化力a(U/g)	デンプン糊精化力b(U/g)	a/b
Bio-P1	粉末	5.5	11,000	150	73
Bio-P2	粉末	5.5	10,000	150	67
Bio-L	液体	5.5	5,000	80	63
TR-B1	粉末	5.5	15,000	10,000	1.5
TR-B2	粉末	6.0	52,000	27,000	1.9
TR-B3	粉末	6.0	2,000	2,000	1.0
TR-F1	粉末	5.0	80,000	30,000	2.7
TR-F2	粉末	5.0	40,000	16,000	2.5

Bio：バイオ製品，TR：従来品（TR-B　細菌由来，TR-F　カビ由来）

デンプン糖化力（a）及びデンプン糊精化力（b）の測定結果とそれらの比（a/b値）を表2に示した．糖化力及び糊精化力ともにバイオ製品は従来品に比べ低い値を示し，特に糊精化力が低かった．そこでaに対するbの比を求めたところ，従来品は1～3倍程度であったが，これに対してバイオ製品は60～70倍と高く，バイオ製品は糊精化力に比べ糖化力が顕著に強いことが認められた．このことはバイオ製品がα-マルトース（還元糖）生成能の高いα-アミラーゼを工業的に生産する目的で開発されたものであることと符合した．

まとめ

遺伝子組み換え技術により作られたバイオアミラーゼ製品の品質を検討した．酵素タンパク質のCZEパターン分析及び有害金属類，副剤などの分析結果からは，バイオ製品と従来品との間に特に差は認められなかった．酵素活性測定においては，糖化力と糊精化力の比が従来品の1～3倍程度に対し，バイオ製品は60～70倍と高く，バイオ製品は糊精化力に比べ糖化力が顕著に強いことが認められた．

なお，本研究の一部は日本食品衛生学会第75回学術講演会（1998年10月，新潟）において発表した．

謝　辞　本研究を行うにあたりバイオアミラーゼをご提供頂きましたノボノルディスクバイオインダストリー㈱に深謝いたします．

文　献

1）厚生省生活衛生局食品保健課：食品分野への組換え

DNA技術応用に関する指針，59－72，1992，中央法規，　東京
2）池田千絵子：食品衛生研究，46，No.12，29－76，1996.
3）厚生省生活衛生局：食品衛生検査指針　理化学編 1991，177－210，社団法人日本食品衛生協会，東京.
4）石館守三，鈴木邦男，谷村顕雄：食品添加物公定書解説書，第6版，B59－B61，1992，広川書店，東京.
5）石館守三，鈴木邦男，谷村顕雄：第6版食品添加物公定書解説書，B61－B66，1992，広川書店，東京.
6）安野哲子，荻野周三，小関正道，他：東京衛研年報，**42**，163－169，1991.
7）中島和雄，広門雅子，平田恵子，他：東京衛研年報，**40**，175－177，1989.
8）広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：食衛誌，**35**，28－33，1994.
9）広門雅子，平田恵子，植松洋子，他：食衛誌，**38**，341－346，1997.
10）厚生省：食品添加物公定書厚生省復刻版，第7版，363，378，421－422，431，1999，日本食品添加物協会，東京.
11）広門雅子，平田恵子，中島和雄，他，東京衛研年報，**42**，163－169，1991.
12）安野哲子，荻野周三，小関正道，他，東京衛研年報，**42**，170－175，1991.
13）広門雅子，平田恵子，植松洋子，他，東京衛研年報，**43**，149－154，1992.
14）安野哲子，栗原裕子，荻野周三，他，東京衛研年報，**43**，155－157，1992.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 193-197, 1999

高速液体クロマトグラフィーによる天然添加物中のN－メチルカルバメート系農薬分析

萩原輝彦*, 安野哲子*, 羽石奈穂子*, 斉藤和夫*

Analysis of N-methyl Carbamate Pesticide Residues in Natural Food Additives by High-Performance Liquid Chromatography

TERUHIKO HAGIWARA*, TETSUKO YASUNO*, NAHOKO HANEISHI* and KAZUO SAITO*

Keywords：天然添加物 natural food additive，N-メチルカルバメート系農薬 N-methyl carbamate pesticide，ポストカラム高速液体クロマトグラフィー post column reaction high-performance liquid chromatography

緒　　言

天然添加物は植物や動物などの天然素材からの抽出物やその濃縮物あるいはこれら素材の粉砕物で，取り扱いやすくするために植物油などの食品素材を加え製剤化されている．このように天然添加物製剤は様々な素材から製造されているため，分析の際，その製剤から得られる抽出物は多くの成分から構成され，その性状は一般的に粘稠性が高く，油分含量を多く含有するものもある．このため天然添加物中に含まれる成分を分析する際の抽出，精製などの前処理には食品中の成分分析と比べて多くの労力が必要となる場合が多い．

天然添加物の安全性を確保するため，順次，安全性試験成績の収集及び毒性試験が実施されている．しかし，天然添加物中の「残留農薬等のチェックは製造者責任のもとに管理，必要があればテストされ危険回避に努めることは当然である」[1]とされながら，その分析方法等に関する報告は少なく，農薬の残留実態はほとんど不明である．

今回，衛生試験法注解に収載されているアルカリ加水分解・誘導体化を利用した蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーによる分析法[2]（以下，HPLC注解法と略す）に準じて，天然添加物製剤９種類32検体中のN-メチルカルバメート系農薬９種類の分析を試みた．なお，HPLC注解法では分析困難なものについては，若干の前処理操作の検討を行ったので報告する．

実験方法

1．試　　料

平成10年度に添加物製造業および卸売販売業から入手した着色料の抽出カロテン（デュナリエラカロテン2，パーム油カロテン１），クロロフィル3，アナトー色素5，ブドウ果皮色素２，ウコン色素７，酸化防止剤のトコフェロール２，チャ抽出物３，γ-オリザノール５及び酸味料のフィチン酸２の９種類32製剤を試料とした．

2. 調査したN-メチルカルバメート系農薬

カルバリル，アルジカルブ，エチオフェンカルブ，イソプロカルブ，フェノブカルブ，オキサミル，メチオカルブ，ベンダイオカルブおよびメソミルの計９農薬の分析を試みた．

3. 試薬，試液及び分析方法

HPLC注解法[2]に準じて分析した（図１）．

3.1　N－メチルカルバメート系農薬標準溶液

各農薬標準品25.0mgを量り，それぞれメタノールに溶かして50.0mlとする．その1.0mlずつを合わせメタノールを加えて50.0mlとする．

3.2　検量線の作成

農薬標準溶液0.5，1.0及び2.0mlをとり，それぞれにメタノールを加えて10.0mlとする．その1.0mlずつをそれぞれ薄めた塩酸液（pH 3）3.0mlに加え混合した後，高速液体クロマトグラフィーを行い，得られたピーク面積から検量線を作成する．

* 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

試料 1.0 ～ 5.0 g
| アセトン 200 mL でホモジナイズ
| セライト545でろ過
| ろ液を減圧濃縮
残留物①
| 5 % 塩化ナトリウム溶液 200 mL
| 酢酸エチル 100, 50 mL (x 2)
| 振とう
| 酢酸エチル層 脱水（無水硫酸ナトリウム）
| 減圧濃縮
残留物②
| ヘキサン 50 mL
| アセトニトリル 30mL(x 3)で振とう
＊アセトニトリル層＊
| ヘキサン 30 mL（アセトニトリル飽和）(x 2)
| 振とう
| アセトニトリル層 減圧濃縮
残留物③
| メタノール 3.0 mL で溶解し，この液 1.0 mL
| 薄めた塩酸液(pH3)3.0 mL に加える
| ろ過(メンブランフィルター 0.45 μm)
試験溶液
[クロロフィル，アナトー，トコフェロール，γ-オリザノール，
フィチン酸，ブドウ果皮]

＊アセトニトリル層＊
| ヘキサン 30 mL（アセトニトリル飽和）
| 振とう
| アセトニトリル層 減圧濃縮
残留物④
| アセトン・ヘキサン(1:1)混液 3 mL で溶解
フロリジルカラムクロマトグラフィー
| ヘキサン 50 mL でカラム洗浄
| 20%アセトン含有ヘキサン液 150 mL で溶出
| 溶出液 減圧濃縮
残留物⑤
| 残留物③と同様に操作
試験溶液
[ブドウ果皮，ウコン，抽出カロテン，チャ抽出物]

図１．天然添加物中のN-メチルカルバメート系農薬の抽出操作法

4．装置および試験操作条件

ポストカラム高速液体クロマトグラフ：カルバメート分析システム（日本分光製），移動相：A液：超純水，B液：HPLC用メタノール，グラジェント条件：（A液：B液）0分（85：15）→25.0分（35：65）→30.0分（35：65）→30.1分（0：100）→35.0分（35：65）→35.1分（85：15），流速：1 ml/min，注入量：20μl，カラム：Carbamatepak（日本分光製）4.0x150mm，カラム温度：40℃，検出：蛍光検出器（励起波長：340 nm，蛍光波長：445nm）．その他の分析条件はHPLC注解法[2]に準じた．

5．試験溶液の調製

試料中に多量の油分が含まれていること及び多くの共存物質の影響等が考えられるため，試料採取量は抽出カロテン3.0 g，クロロフィル1.0g，アナトー色素5.0 g，トコフェロール3.0 g，フィチン酸5.0g，γ-オリザノール2.0g，ブドウ果皮色素5.0g，ウコン色素5.0g及びチャ抽出物1.0gとした．HPLC注解法[2]に従って行い，溶媒抽出で得られた最終段階のアセトニトリル抽出液は減圧下で留去した．得られた残留物にメタノールを加え溶解し，この液1.0mlを薄めた塩酸液（pH 3）に加え，軽く振り混ぜた後,メンブランフィルター（0.45μm）を通じ試料溶液とした（図１）．なお,抽出カロテン，ウコン色素，チャ抽出物及びブドウ果皮色素の精製を行う必要がある試料は衛生試験法注解収載N-メチルカルバメート系農薬のガスクロマトグラフ分析法[2]に準じてフロリジルカラムクロマトグラフィーにより精製を行うことにした．

6．フロリジルカラムクロマトグラフィー

アセトニトリル抽出液を減圧下留去して得た残留物にアセトン・ヘキサン（１：１）混液３mlを加え溶解する．この液をフロリジルカラムに導入して，常法に従い50mlのヘキサンでカラムを洗浄後，20%アセトン含有ヘキサン混液150mlで溶出させ，減圧下（35℃以下）で溶媒を留去した．この残留物は前述の「試験溶液の調整」に従って同様に調製した（図１）．

7．添加回収試験

試料採取量に対してN-メチルカルバメート標準品がそれぞれ0.1ppmになるように各標準品を溶解希釈して作製したメタノール液1mlを添加した．9種類の天然添加物製剤それぞれについてHPLC注解法[2]に従って添加回収試験を行った．なお，ブドウ果皮色素は抽出操作においてアセトン抽出を省略した．また，抽出カロテン，ウコン色素，ブドウ果皮色素及びチャ抽出物についてはHPLC注解法[2]に従って抽出した後，フロリジルカラムクロマトグラフィー精製を行い添加回収率を求めた．

結果及び考察

1．HPLC注解法による添加回収試験

天然添加物製剤9種類に0.1ppmの濃度になるようにN-メチルカルバメート系農薬を添加した試料についてHPLC注解法を用いて添加回収率を求めた（表1）．アセトンによる抽出操作を省略したブドウ果皮色素を除きすべての試料においてエチオフェンカルブはほとんど回収されなかった．抽出操作中に酸化体へ変化することが回収されない原因として報告[3]されている．

ブドウ果皮色素製剤は，液状で油分を含まないため，第一段階の抽出操作であるアセトン抽出を省略した．その際のホモジナイズ操作を行わなかったため，エチオフェンカルブを含め，ほぼ50%程度以上の良好な回収率が得られた．今回，2種類のブドウ果皮色素製剤を分析したが，その内1種は上記の添加回収試験に用いたものあり，無添加の試料分析ではクロマトグラム上に各々の標準品と共存物質ピークの重なりはみられなかった．しかし，他の一方の製剤では無添加の試料分析においてクロマトグラム上に標準品と同一のリテンションタイム近くに共存物質によるピークが検出されるためフロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った．

γ-オリザノールはアセトン抽出を除く抽出の各段階において，白色の沈殿が析出した．このため，この沈殿をろ紙でろ過を行いながら抽出操作を行った．

フィチン酸は数個のリン酸がイノシトールの水酸基とエステル結合したもので，強い酸性を示す．メソミル，アルジカルブ及びメチオカルブがほとんど回収されなかった．他の分析の対象にしたN-メチルカルバメート系農薬もフィチン酸により分解してしまうことが推定された．

クロロフィルは酢酸エチル－水及びアセトニトリル－ヘキサンの各々の液－液分配において，どちらの層も濃い暗黒緑色となり放置しても境界が非常に見分けにくかった．また，エマルジョンを起こしやすく遠心（3000rpm，5分）でも分離しなかった．このため，試料採取量を1g以上にできなかった．

トコフェロール及び抽出カロテン（デュナリエラカロテン及びパーム油カロテン）は，最後の溶媒抽出段階であるアセトニトリル－ヘキサンによる液－液分配を行っても，アセトニトリル層留去後の残留物に油分が多く残った．そこで，分取したアセトニトリル層に再び30mlのヘキサンを加え振とうした．トコフェロールは計2回のヘキサン30ml振とうにより，アセトニトリル層の溶媒留去後の残留物は減少した．しかし，抽出カロテンでは食品素材として植物油脂が70%程度添加されているため，アセトニトリル抽出後の減圧留去した残留物中に油分が多く残留し，また，赤褐色のカロテン類の沈殿物も析出したため，以後の定量的な操作は不可能であった．

ウコン色素は図2-2に示したようにHPLCクロマトグラム上にオキサミル，メソミル及びアルジカルブと同一リテンションタイム付近に共存物質のピークがあり分析不能であったため，フロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことにした．

チャ抽出物はアセトニトリル－ヘキサン分配後のアセトニトリル層を留去して得た残留物は褐色で粘油状の物質が残った．この残留物は多量であったため，以後の定量操作は不可能であった．この残留物をメタノール5mlに溶解して分析操作を継続しHPLC分析を試みたところ，クロマトグラムには共存物質の大きなピークが全範囲に出現しN-メチルカルバメート系農薬の分析はできなかった．

2．フロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製

衛生試験法注解[2]は，N-メチルカルバメート系農薬分析のガスクロマトグラフ法でフロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製を採用している．溶媒抽出，液－液分配だけでは分析不能であったブドウ果皮色素，ウコン色素及びチャ抽出物について，また，油分が多く残った抽出カロテンをこのカラムクロマトグラフィー精製法に従って回収率を求めた（表2）．ただし，衛生試験法注解では残留物をカラムに負荷する際にヘキサンを使用することになっているが，油含量が多い試料の場合，ヘキサンのみでは溶解しないため，残留物はアセトン・ヘキサン（1：1）混液3mlで溶解することにした．

フロリジルによる精製を行った後のデュナリエラカロテンの回収率は溶媒抽出のみの場合（表1）に比べ改善された．

ブドウ果皮色素ではHPLCクロマトグラムでの共存物質のピークの重なりもなくなり分析可能となったが，エ

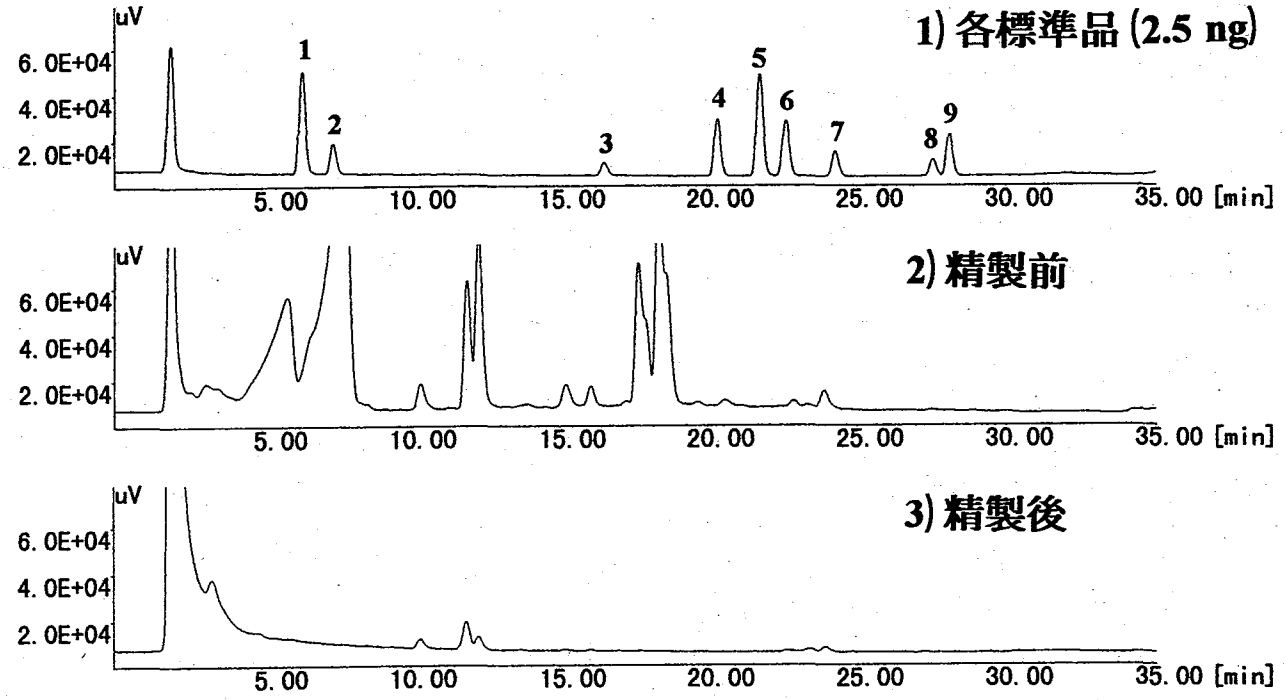


図2．フロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製

1）N-メチルカルバメート系各農薬標準品（2.5ng），2）ウコン色素（無添加）精製前のクロマトグラム，3）ウコン色素（無添加）精製後のクロマトグラム

1：オキサミル，2：メソミル，3：アルジカルブ，4：ベンダイオカルブ，5：カルバリル，6：エチオフェンカルブ，7：イソプロカルブ，8：フェノブカルブ，9：メチオカルブ

表1．天然添加物からのN-メチルカルバメート系農薬の添加*回収率（±標準偏差）

	オキサ	メソミ	アルジ	ベンダ	カルバ	エチオ	イソプ	フェノ	メチオ	
デュナリエラカロテン	29±2.5	50±3.2	10±1.9	37±2.9	15±2.3	0	21±1.8	0	5±0.9	(%)
アナトー色素	46±4.0	69±4.7	17±5.8	72±3.3	47±6.2	3±0.5	59±3.1	27±5.4	7±6.0	
クロロフィル	34±11.6	27±9.5	11±9.4	66±12.8	49±4.1	1±1.7	26±4.5	18±14.8	49±6.9	
トコフェロール	81±3.0	98±4.8	72±3.3	57±6.0	53±8.2	15±9.8	83±8.2	61±24.4	134±6.9	
フィチン酸	14±5.0	0	0	8±11.7	48±31.7	7±9.8	56±13.6	52±16.8	0	
γ-オリザノール	31±4.3	57±6.8	38±6.7	65±5.8	58±7.5	10±2.1	61±6.4	46±4.9	20±7.1	
ブドウ果皮色素**	37±1.4	71±1.7	92±3.7	93±1.5	105±1.4	48±1.9	89±0.7	90±2.3	89±1.5	

＊添加量：天然添加物中に0.1ppmの濃度になるように各農薬を添加した．試験回数：n=4　オキサ：オキサルミ，メソミ：メソミル，アルジ：アルジカルブ，ベンダ：ベンダイオカルブ，カルバ：カルバリル，エチオ：エチオフェンカルブ，イソプ：イソプロカルブ，フェノ：フェノブカルブ，メチオ：メチオカルブ．

＊＊ホモジナイザーによるアセトン抽出を省いた．

表2．フロリジルカラムクロマトグラフィーを行った場合のN-メチルカルバメート系農薬の天然添加物からの添加*回収率（±標準偏差）

	オキサ**	メソミ	アルジ	ベンダ	カルバ	エチオ	イソプ	フェノ	メチオ	
デュナリエラカロテン	42±21.0	80±0.8	25±3.2	41±3.7	36±9.5	5±0.5	25±1.8	23± 6.7	4±2.3	(%)
ブドウ果皮色素	25±0.4	60±1.3	52±3.3	47±3.3	62±4.3	8±2.2	36±2.7	26± 2.5	28±2.7	
ウコン色素	13±0	48±1.5	27±2.3	50±6.9	65±5.4	23±0	37±9.6	49±12.0	47±7.0	
各標準品0.5mg***	89±1.9	102±1.1	26±3.2	77±5.3	103±4.6	20±0.8	56±7.3	71± 5.6	58±2.3	

＊添加量：天然添加物中に0.1ppmの濃度になるように各農薬を添加した．試験回数：n=4

＊＊略字は表1と同じ

＊＊＊各農薬標準品（0.5mgずつ）のみの回収率（±標準偏差）（n=4）

チオフェンカルブ，フェノブカルブ及びメチオカルブなどの回収率の低下が認められた．

図2-1 に示したようにウコン色素のHPLC注解法では共存物質のため分析不能であったが，フロリジルカラムクロマトグラフィーによる精製後ではオキサミル及びアルジカルブの回収率にやや低い傾向が認められるが図2-3に示したように分析可能となった（表2）．

アセトニトリル・ヘキサンの液－液分配は油分を除くのに有効である．チャ抽出物から抽出し分取したアセトニトリル層を留去して得た粘油性の褐色物質は，アセトン及びアセトニトリルに可溶であったが，ヘキサンには溶解しなかった．この残留物はフロリジルカラムクロマトグラフィーに負荷する際の溶解用の溶媒であるアセトン・ヘキサン（1：1）混液3 ml には溶解しなかったため，フロリジルカラムによる精製はできなかった．完全に溶解するためには，アセトン量を増やすか，アセトニトリルを添加する必要があった．しかし，いずれの場合も，N-メチルカルバメート系農薬はフロリジルカラムに保持されず溶解液とともにカラムから流出してしうため分析することができなかった．チャ抽出物はカテキンなどポリフェノールを45%以上含有する製剤も発売されている．チャ抽出物中の残留農薬分析を可能にするためには，この多量に存在するポリフェノール類の除去法の開発が必要である．

3．天然添加物製剤中のN-メチルカルバメート系農薬

天然添加物やその製剤は直接飲食されることはない．今回，調査した天然添加物製剤の食品中への一般的な使用量は，最大でも1%以下，通常0.1～0.5%程度以下であり，添加された天然添加物は食品成分により100倍以上希釈された状態で使用されていることになる．HPLC注解法[2]による食品中のN-メチルカルバメート系農薬の試料採取量は20.0 gであり，定量限界は試料中濃度として0.01 ppmに設定している．しかし，①天然添加物製剤の使用実態が食品中に100倍以上希釈されて使用される．②天然添加物自体が濃縮されているものが多い．③油分を多く含有しているものもあり，試料採取量を20.0gにしてしまうと抽出精製が非常に困難になる．以上の理由によりN-メチルカルバメート系農薬の定量限界を試料中濃度として0.1ppmとした．

本法により，今回，チャ抽出物を除く8種類29天然添加物製剤について調査したところ8種類のN-メチルカルバメート系農薬（分析不能のエチオフェンカルブを除く）は検出されなかった．

まとめ

天然添加物製剤中のN-メチルカルバメート系農薬について分析法の検討を行い，本法を用いて市販の天然添加物製剤の調査を行ったところ，以下のことが明らかとなった．

1）クロロフィル，トコフェロール，及びγ-オリザノールはHPLC注解法に提示されている試料採取量20gを1～5gに減らすことで，液－液分配による溶媒抽出が可能となり，N-メチルカルバメート系農薬8種類の分析を行った．

2）抽出カロテン，ブドウ果皮色素の一部及びウコン色素は試料採取量を3～5 gに減らし，溶媒抽出後，フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製することにより8種類のN-メチルカルバメート系農薬の分析は可能となった．

3）チャ抽出物はフロリジルカラムクロマトグラフィーを行っても，ポリフェノール類の影響により，N-メチルカルバメート系農薬の分析は不能であった．

4）分析不能のチャ抽出物を除く，8種類29天然添加物製剤中について8種類のN-メチルカルバメート系農薬（カルバリル，アルジカルブ，イソプロカルブ，フェノブカルブ，オキサミル，メチオカルブ，ベンダイオカルブおよびメソミル）の分析を行ったところ，いずれも検出されなかった．

5）本法による定量限界は試料中濃度として0.1ppmである．

文　献

1）清水孝重，中村幹雄：食品天然色素，藤井正美監修，21, 1993，光琳，東京．

2）日本薬学会編：衛生試験法・注解1990追補，1,555-1,566, 1995，金原出版，東京．

3）岩堀雅子，今泉則子，渋谷　隆，前川吉明：日本食品衛生学会第65回学術講演会講演要旨集，51, 1993．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 198-201, 1999

ICP発光分光分析法による食品添加物製剤中の無機塩類の分析

安野哲子*, 萩原輝彦*, 羽石奈穂子*,
斎藤和夫*

Determination of Inorganic Salts in Food Additive Preparations by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

TETSUKO YASUNO*, TERUHIKO HAGIWARA*,
NAHOKO HANEISHI* and KAZUO SAITO*

Keywords：無機塩類 inorganic salt, かんすい kansui, 合成膨脹剤 baking powder, 食品添加物製剤 food additive preparation, ICP発光分光分析法 inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

緒　言

食品添加物は1品目ごとの単品のほかに，複数の品目を配合した製剤の形でも販売されている．使用に便利であるとか，主剤の酸化や分解を防止するためであるとか製剤にする目的はいろいろであるが，この食品添加物製剤には食品衛生法により配合成分及びそれぞれの重量パーセントの表示が義務づけられている．そして，表示成分の検査には高速液体クロマトグラフィー，ガスクロマトグラフィーなどの分離分析法や原子吸光光度法のような元素分析法がよく用いられている[1]．食品添加物製剤中の塩化カリウム，炭酸水素ナトリウム，硫酸カルシウム，炭酸マグネシウム，硫酸アルミニウムカリウム，リン酸塩類などといった無機塩類の添加物の分析には，原子吸光光度法のような元素分析法が適している．しかし原子吸光光度法は単元素分析で，しかも測定濃度範囲が狭いため，多種類の無機塩類が様々な割合で配合された製剤では，濃度の異なる試験溶液を種々調製する必要があり操作が煩雑である．近年重金属などの分析に繁用されているICP発光分光分析法[2]は，元素分析法の一種であるが，多元素の同時分析が可能で，しかも測定濃度範囲が広い．そこで，このICP発光分光分析法を用いた製剤中の無機塩類の分析法を検討した．また，分析の妨害となる製剤中の有機物を分解するために，マイクロ波による簡易な分解法も検討し，その結果，食品添加物製剤中の無機塩類の簡易一斉分析法を作成したので，これを報告する．更に，本法を用いて市販の食品添加物製剤中の無機塩類を分析し，表示量と実際の配合量との差について調査を行ったので，併せて報告する．

実　験

1．試料　平成7年度から10年度にかけて東京都食品環境指導センターより送付されたかんすい28製品，次亜硫酸ナトリウム製剤3製品，合成膨脹剤25製品，及びその他の食品添加物製剤17製品の計73製品を試料とした．また，その表示成分をICP発光分光分析法による定量成分とその他の成分に分けて表1に示した．

2．試薬　硝酸：比重1.42，特級．硝酸（1→2）：硝酸を水で2倍に希釈して用いた．カリウム，ナトリウム，カルシウム，マグネシウム，アルミニウム，リンの各標準液：関東化学㈱製，原子吸光分析用，各1,000mg/L．デンプン：和光純薬工業㈱製，トウモロコシ製，特級．塩化カリウム，ピロリン酸四ナトリウム（無水），炭酸カルシウム，炭酸マグネシウム，硫酸アルミニウムアンモニウム（乾燥）：食品添加物成分規格適合検体．

3．装置　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［Torch gas flow:High flow, Auxiliary gas flow:1.0 L/min, Reflect power:1150 w, Analysis pump rate:100 rpm, Nebulizer pressure：30 psi, Observation height:15 mm, Wavelength(nm):K 766.4, Na 588.9, Ca 317.9, Mg 279.0, Al 308.2, P 214.9, Integration time:10 s, Number of repeats:3］，マイクロ波式分解装置：CEM社製MDS-2000型．

4．分析法　定量の目的成分が塩化カリウムのとき，試

* 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

表1．分析試料

食品添加物製剤の種類	A：ICP発光分光分析法による定量成分	B：共存成分
かんすい (28製品)	炭酸カリウム(無水)*1，炭酸ナトリウム(無水)*2，炭酸ナトリウム(結晶)*2，ピロリン酸四ナトリウム(無水)*6，ポリリン酸ナトリウム*6，メタリン酸ナトリウム*6，リン酸水素二ナトリウム(無水)*6	
次亜硫酸ナトリウム製剤 (3製品)	ポリリン酸ナトリウム*6，硫酸アルミニウムカリウム(乾燥)*5	次亜硫酸ナトリウム，炭酸ナトリウム(無水)
合成膨脹剤 (25製品)	炭酸カルシウム*3，炭酸水素ナトリウム*2，炭酸ナトリウム(無水)*2，ピロリン酸二水素二ナトリウム*6，硫酸アルミニウムカリウム*5，硫酸アルミニウムカリウム(乾燥)*5，リン酸二水素カルシウム*3，リン酸二水素ナトリウム(無水)*6	塩化アンモニウム，グリセリン脂肪酸エステル，L-酒石酸水素カリウム，ショ糖脂肪酸エステル，フマル酸一ナトリウム，食品素材(デンプン等)
その他の製剤 (17製品)	塩化カリウム*1，塩化マグネシウム*4，炭酸カルシウム*3，炭酸水素ナトリウム*2，炭酸マグネシウム*4，ピロリン酸二水素二ナトリウム*6，ピロリン酸四ナトリウム(無水)*6，ポリリン酸ナトリウム*6，メタリン酸ナトリウム*6，硫酸アルミニウムアンモニウム(乾燥)*5，硫酸アルミニウムカリウム*5，硫酸アルミニウムカリウム(乾燥)*5，硫酸カルシウム*3，リン酸三カルシウム*3，リン酸二水素カルシウム*3	アジピン酸，亜硝酸ナトリウム，L-アスコルビン酸，α-アミラーゼ，DL-アラニン，塩化アンモニウム，エリソルビン酸ナトリウム，カゼインナトリウム，グァーガム，クエン酸(無水)，クエン酸三ナトリウム，グリシン，グリセリン脂肪酸エステル，グルコノデルタラクトン，L-グルタミン酸ナトリウム，コチニール色素，酢酸ナトリウム(無水)，L-シスチン，脂肪酸類，L-酒石酸水素カリウム，L-酒石酸ナトリウム，硝酸カリウム，植物レシチン，ソルビン酸，ソルビン酸カリウム，乳酸カルシウム，フマル酸，DL-リンゴ酸，食品素材（塩化ナトリウム，油脂等）

かんすい：1製品にA欄の1品目以上の成分を含む．
合成膨脹剤：1製品にA欄の2品目以上及びB欄の1品目以上の成分を含む．
次亜硫酸ナトリウム製剤：1製品にA欄及びB欄の成分を含む．
その他の製剤：1製品にA欄の1品目以上及びB欄の1品目以上の成分を含む．
ICP発光分光分析法による定量成分の測定元素　*1：カリウム，*2：ナトリウム，*3：カルシウム，*4：マグネシウム，*5：アルミニウム，*6：リン

料中のカリウム含量を定量して，これに塩化カリウムとの分子量比（KCl=74.55/K=39.098）を乗じ，その値を塩化カリウムの含量とした．試料中の定量目的成分と測定元素は表1に示した．なお，硫酸アルミニウムカリウム（乾燥）[$AlK(SO_4)_2 \cdot nH_2O$] やリン酸二水素カルシウム [$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot nH_2O$] などのように，結晶水の量が特定できないものについては無水物として計算した．また，ポリリン酸ナトリウム及びメタリン酸ナトリウムは，食品添加物の規格では分子式が特定されておらず，それぞれ五酸化リン（P_2O_5）として含量範囲が規定されているため[3]，これらを含む試料ではリンを定量し，五酸化リンとして計算した．その他，配合成分上，表示通りの塩の形で計算するのが困難な場合は，元素量をもって含量とした．

1）試験溶液の調製　試料に用いた製剤中の無機塩類の表示量から分子量比により計算して，試験溶液には，カリウムは100～500 μg/ml，ナトリウムは1.0～500 μg/ml，カルシウムとマグネシウムは0.10～50 μg/ml，アルミニウムは1.0～50 μg/ml，リンは2.0～500 μg/mlの範囲で含まれるように調製した．また，試料の溶解や分解には硝酸を用いることとし，試験溶液中の硝酸濃度は分析感度に影響を与えないよう，50.0ml中0.5ml以下とした[4]．試験溶液の調製は，試料の種類により以下のように調製した．

①かんすい　試料約1gを精密に量り，水を加えて溶かして100.0mlとした．この液5.0mlを量り，硝酸（1→2）1ml及び水を加えて50.0mlとし，これを試験溶液とした．

②次亜硫酸ナトリウム製剤　試料約1gを精密に量り，水20ml及び硝酸（1→2）10mlを加え，蒸発する水を補いながら，イオウが分離して液が透明になるまで約45分間煮沸した．冷後，ろ過し，洗液をあわせて100.0mlとした．この液5.0mlを量り，水を加えて50.0mlとし，これを試験溶液とした．

③合成膨脹剤　試料約1gを精密に量り，硝酸（1→2）10mlを加え，マイクロ波式分解装置で30分間加熱して分解したのち，水を加えて100.0mlとした．この液1.0mlを量り，水を加えて50.0mlとし，これを試験溶液とし

た.

④その他の製剤 有機物を含まない試料は，約1gを精密に量り，硝酸（1→2）10ml及び水を加えて溶かして100.0mlとした．目的成分の表示量に応じてこの液1.0～10.0mlを量り，水を加えて50.0mlとし，これを試験溶液とした．有機物を含む試料の場合は，約1gを精密に量り，硝酸（1→2）10mlを加え，マイクロ波式分解装置で30分間加熱して分解したのち，水を加えて100.0mlとした．目的成分の表示量に応じてこの液1.0～10.0mlを量り，水を加えて50.0mlとし，これを試験溶液とした．

2）標準溶液の調製

①カリウム標準溶液 カリウム標準液5.0mlを量り，硝酸（1→2）1ml及び水を加えて50.0mlとした（100μg/ml）．

②5元素混合標準溶液 ナトリウム，カルシウム，マグネシウム，アルミニウム，リンの各標準液0.50mlを量り，硝酸（1→2）1ml及び水を加えて50.0mlとした（各10μg/ml）．リン標準液はリン酸二水素カリウムを溶解して製造されているため，カリウム標準液とリン標準液は混合しないで別々の標準溶液として調製した．

3）検量線 硝酸（1→2）1mlに水を加えて50.0mlとした液をブランクとし，標準溶液との2点で，ICP発光分光分析法により各元素の発光強度を測定して検量線を作成した．試験溶液についても同様に各元素の発光強度を測定して，この検量線により，試料中の各元素含量を定量した．

結果及び考察

1．各元素の測定濃度範囲 ICP発光分光分析法の特長の一つとして，検量線の直線範囲が最大5桁と非常に広いことがあげられる[2]．表1に示したように，今回測定した元素はカリウム，ナトリウム，カルシウム，マグネシウム，アルミニウム，そしてリンの計6元素であるが，それぞれの元素の感度及び試料に用いた各種製剤中の無機塩類の表示量をもとに，試験溶液中には，カリウムが100～500μg/ml，ナトリウムが1.0～500μg/ml，カルシウムとマグネシウムが0.10～50μg/ml，アルミニウムが1.0～50μg/ml，リンが2.0～500μg/mlの範囲で含まれるように調製した．一方，検量線はブランクと標準溶液（カリウムは100μg/ml，他の5元素は各10μg/ml）の2点で作成した．そこで，この検量線における各元素の定量精度を検討した．6元素の標準液をそれぞれ希釈して，上記濃度範囲における最低及び最高濃度の溶液を調製し，これらの溶液について各元素の発光強度を測定して検量線により定量した．結果は表2に示したが，各元素の定量値は調製濃度の92.5～108%と良好な値を示し，変動係数も0.24～3.6%と良好であった．また，表1に示した試料はすべて，1回希釈しただけの1種類の試験溶液に，目的元素のすべてが上記濃度範囲内で収まった．以上により，何種類もの無機塩類がいろいろな割合で配合された製剤でも，本分析法では，1種類の試験溶液の調製で，しかも簡易な検量線により定量できることが確認できた．

表2．検量線の有効範囲

元素	調製濃度 μg/ml	回収率 Mean, %	変動係数 %
カリウム	100	99.4	0.65
	500	97.5	0.75
ナトリウム	1.0	107	1.3
	500	92.5	0.70
カルシウム	0.10	108	0.87
	50	96.7	0.24
マグネシウム	0.10	98.8	3.0
	50	99.2	0.29
アルミニウム	1.0	100	0.86
	50	99.6	0.43
リン	2.0	96.8	3.6
	500	95.6	0.26

検量線：ブランクと標準溶液（カリウム100μg/ml，他の5元素は各10μg/ml）の2点検量線

n=6

2．マイクロ波による湿式分解の添加回収率 食品添加物製剤中の有機物の添加物，又はデンプン，小麦粉，香辛料など，分析の妨害となる有機物は，硝酸を加え，マイクロ波により加熱して分解した．有機物を分解するために必要な硝酸量と加熱時間は，製剤に配合されることの多いデンプンを用いて検討した．デンプン1gは，硝酸（1→2）10mlを加えて30分間加熱することにより，完全に分解することができた．また，表1に示した試料で，デンプン以外の有機物を含む試料でも，この硝酸量と加熱時間により問題なく分解することができた．マイクロ波による湿式分解の添加回収試験を，デンプンと測定対象元素である6元素を含む5種類の無機塩類の添加物［塩化カリウム，ピロリン酸四ナトリウム（無水），炭酸カルシウム，炭酸マグネシウム，硫酸アルミニウムアンモニウム（乾燥）］を用いて行った．すなわち，デンプン1.000gに，塩化カリウム0.100g及びピロリン酸四

表3．マイクロ波による湿式分解の添加回収率

元素	添加量 μg/ml	回収率 Mean, %	変動係数 %
カリウム	103	101	0.52
ナトリウム	6.59	102	0.80
カルシウム	7.51	101	0.72
マグネシウム	4.65	101	0.71
アルミニウム	2.05	101	1.1
リン	4.52	101	2.7

添加量：試験溶液中の添加濃度
n=6

ナトリウム（無水）ほか3種類の添加物各0.010gを加えて回収試験を行い，その結果を表3に示した．各元素の添加量は試験溶液中，カリウム103μg/ml，ナトリウム6.59μg/ml，カルシウム7.51μg/ml，マグネシウム4.65μg/ml，アルミニウム2.05μg/ml，リン4.52μg/mlであった．回収率は101～102%，変動係数は0.52～2.7%と良好な結果が得られ，マイクロ波による湿式分解は，製剤中の有機物の分解法として有効な方法であることが確認できた．

3．各種製剤中の無機塩類の分析結果　表1に示した各種製剤73試料に本分析法を適用して，試料中の無機塩類の添加物延べ186品目を分析した．それらの含有量を試料の表示量と比較して，結果を表4に示した．合成膨脹剤25試料では，今回分析した無機塩類はすべて表示量の±10%の範囲内にあったが，かんすいでは28試料中14試料に，次亜硫酸ナトリウム製剤では3試料すべてに，その他の製剤では17試料中8試料に，すなわち，全体の34 %の試料に，表示量の±10%を超える量の無機塩類が配合されていた．特にかんすいでは，28試料中4試料に，表示量の±50%を超える量の成分が配合されていた．表示量と含有量の差が大きい試料の中には，結晶水の量が特定できないため，無水物として計算した（これは負の誤差要因となる）硫酸アルミニウムカリウム（乾燥）などを含む試料や，製剤に配合されている食品素材の有機物中の元素量（これは正誤差の要因となる）を考慮すべき試料もあったが，全般に，表示成分の計量ミスや混合不十分，あるいは表示の誤りなどの問題のある製品が多いことがわかった．

ま と め

食品添加物製剤中の無機塩類の添加物を分析するために，ICP発光分光分析法を用いた簡易一斉分析法を作成した．

表4．食品添加物製剤中の無機塩類の分析結果

含有量/表示量	製剤の種類別試料数			
	かんすい	次亜硫酸ナトリウム製剤	合成膨脹剤	その他の製剤
≦±10%	14		25	9
±10%＜≦±20%	8	3		4
±20%＜≦±30%	1			
±30%＜≦±50%	1			4
±50%＜	4			
合計	28	3	25	17

試料数は表示量と含有量の差の最大成分により分類した．

分析の妨害となる製剤中の有機物は，硝酸を加え，マイクロ波により加熱して分解した．測定元素はカリウム，ナトリウム，カルシウム，マグネシウム，アルミニウム，及びリンの6元素とした．これら6元素の試験溶液中の濃度は，カリウム100～500μg/ml，ナトリウム1.0～500μg/ml，カルシウムとマグネシウム0.10～50μg/ml，アルミニウム1.0～50μg/ml，リン2.0～500μg/mlとした．検量線はブランクと標準溶液（カリウムは100μg/ml，他の5元素は各10μg/ml）の2点で作成した．

本法では，製剤中の有機物の前処理が短時間にでき，また，多種類の無機塩類が様々な割合で配合された製剤でも，1種類の試験溶液の調製で，しかも簡易な検量線により定量することができた．この分析法をかんすい等各種製剤73製品に適用し，製剤中の無機塩類の添加物延べ186品目を分析して，その表示量と実際の配合量との差を明らかにした．

文　献

1）谷村顕雄，藤井正美，義平邦利，伊藤誉志男，城照雄監修，食品中の食品添加物分析法解説書，1992，講談社，東京．
2）日本薬学会編，衛生試験法・注解，1990（付．追補1995），17-32，金原出版，東京．
3）第六版食品添加物公定書，468-474，1992，日本食品添加物協会，東京．
4）池辺克彦，西宗高弘，田中凉一：食衛誌，**31**，382-393，1990．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, 50, 202-207, 1999

ポリカーボネート製ほ乳びん及び給食器からのビスフェノールAの溶出

船山恵市*, 渡辺悠二*, 金子令子*,
樺島順一郎*, 斎藤和夫*

Migration of Bisphenol A from Nursing Bottles and Tableware for Meal Service Made of Polycarbonate

KEIICHI FUNAYAMA*, YUJI WATANABE*, REIKO KANEKO*,
JUNICHIRO KABASHIMA* and KAZUO SAITO*

Keywords：ポリカーボネート polycarbonate，ビスフェノールA bisphenol A，溶出試験 migration test，ほ乳びん nursing bottle，給食器 tableware for meal service

緒　言

ポリカーボネートは，その原料の一つとしてビスフェノールA（以下BPAと略す）を使用したプラスチックである．その製造工程においてBPAの一部はポリマーとならずにモノマーのまま残存することがある．そこで食品衛生法においてはポリカーボネート中のBPAの基準を定めており，材質中の残存量が500ppm以下（フェノール及び*p-t*-ブチルフェノールを含む），溶出試験では2.5 ppm以下と規定している[1]．しかし，今日そのBPAが極微量で生体に影響を及ぼす内分泌かく乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）として作用する恐れがあることが明らかとなってきたことから[2]，ポリカーボネート製品に対する消費者の不安が高まってきている．とりわけ内分泌かく乱化学物質は，動物の胎仔期や生まれた直後の細胞分化の盛んな時期に作用すると，生体に不必要な不可逆的な変化を引き起こしてしまうことから[3]，人の胎児や乳幼児への影響が懸念されているため，ポリカーボネート製品の安全性が問われている．

このため東京都は平成10年7月，「東京都環境ホルモン取組方針」を策定し，その中で現状把握を推進する上から，食器等から溶出する物質等の実態調査を行うこととした．そこで，著者らはポリカーボネート製ほ乳びん及び給食器について，実際に使用されていた製品からのBPA溶出状況や，未使用品を用いて経時的溶出状況を把握するために溶出試験を行ったので，その結果について報告する．

実験方法

1．試料

1）使用済みほ乳びんは，東京都衛生局管轄の都立病院等A，B及びCの3施設から42本，また参考としてDの1施設から20本の計62本収集した．各ほ乳びんの使用経歴はおおむね半年から3年程度使用されたものである．D施設のほ乳びんは，使用終了後廃棄予定で約2ヶ月間放置され，使用終了時の洗浄方法及び保管中の扱いが不明確なため，参考品として扱った．

2）煮沸消毒の影響及び電子レンジ消毒バッグの影響を検討した実験で用いたほ乳びんは，A及びBの2社の市販未使用品（120ml及び150ml）を用いた．

3）使用済み給食器は，都立病院関係給食施設及び都内学校給食施設（計11施設）から計190個収集した．

4）給食器からの経時的溶出の検討で用いた給食器は，1社の市販未使用の深皿を用いた．

なお，試料はいずれも食品環境指導センターから送付されたものである．

2．試薬及び試液　1）ビスフェノールA：東京化成工業㈱製，2）クエン酸（無水），リン酸：和光純薬工業㈱製特級試薬，3）酢酸：和光純薬工業㈱製精密分析用試薬，4)アセトン，メタノール：ナカライテスク㈱製特級試薬，5）アセトニトリル，*n*-ヘプタン：ナカライテスク㈱製高速液体クロマトグラフ用特製試薬，6）乳

* 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

児用調製粉乳：雪印乳業㈱製雪印ネオミルクL.ai，7）4％酢酸溶液：酢酸40mlに水を加えて1000mlとした．8）0.5%クエン酸溶液：クエン酸（無水）5gに水を加えて1000mlとし，1N水酸化ナトリウム溶液を用いてpH 3.5に調製した．

3．装置 1）高速液体クロマトグラフ・クーロアレイ電気化学検出システム（クーロメトリック型電気化学検出器4 chモジュール，送液ポンプ，オートサンプラー，温度コントロールモジュール，溶媒脱気装置，データ処理装置：ESA社製，紫外可視分光検出器：島津製作所製SPD-10AVP），2）恒温器：タバイエスペック㈱製SPS-222，3）電子レンジ：松下電器産業㈱製ナショナルオーブンレンジNE-N300（定格高周波出力700W），4）pHメーター：HANNA instruments社製HI 8416，5）蛍光X線分析装置：理学電機工業㈱製RIX-3000

4．高速液体クロマトグラフィーの測定条件 分離カラム：ジーエルサイエンス㈱製Inertsil ODS-3，5 μm，4.6 mm i.d.×250mm，移動相：0.2%リン酸を含有する〔アセトニトリル・水（45：55）〕，流速：1.5ml/min，カラム及び電気化学検出器温度：35℃，電気化学検出器電極電位：1ch. 300 mV；2ch. 360mV；3ch.520mV；4ch. 660 mV，紫外可視分光検出器測定波長：217nm，注入量：100 μl

5．定性及び定量

クーロアレイ電気化学検出システムでは，直列につながった各電極の電位を少しずつずらして設定することにより，BPAに対する各電極の反応が異なる．その反応比（クロマトグラムのピーク高比）は純品であれば常に一定となることから，検出ピークの定性を行った．

定量はBPA10ng/mlの一点検量線とし，定量限界は0.2ng/mlであった．

6．試験方法

1）溶出試験

各溶出試験の溶出液の調製は，下記に示した試験溶液及び温度条件により各々行った．

①水（95℃，30分間保持又は30分間室温放置），②4％酢酸（室温，30分間放置）③0.5%クエン酸（室温，30分間放置）④*n*-ヘプタン（室温，30分間放置）

(1) ほ乳びんについては，試験溶液100mlを用いて①，③及び④の溶出条件により溶出を行い，その溶出液を分析に供した．*n*-ヘプタン溶出液は，溶出液10mlを45%アセトニトリル水溶液5mlを用いて分液ロートで2回振とう後，合わせたアセトニトリル層を分析に供した．

(2) 給食器については，試験溶液を容器に満たし①，②及び④の溶出条件により溶出を行い，その溶出液を分析に供した．「はし」のみ2 ml/cm^{2}の割合で試験溶液に浸漬し，同様に放置した浸漬液を溶出液とした．

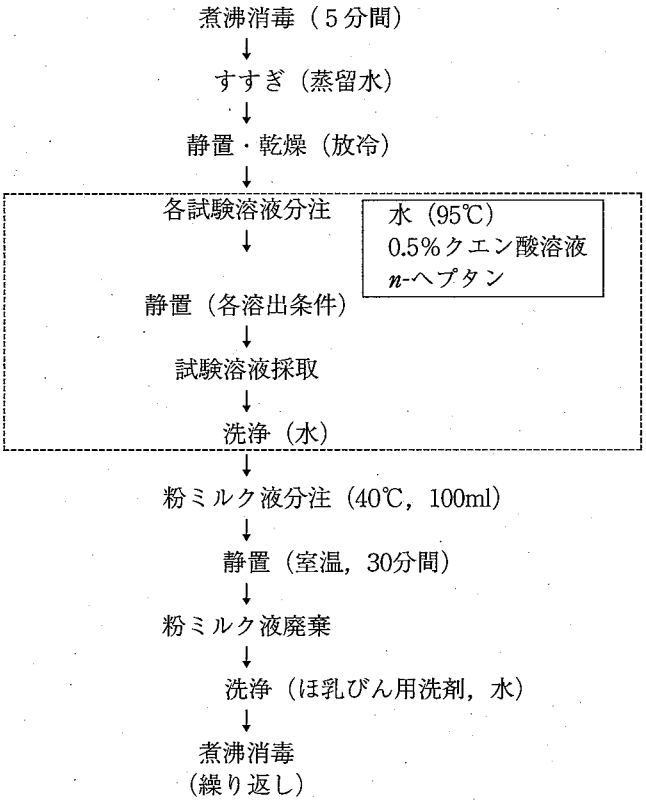


図1．ほ乳びんの繰り返し煮沸消毒操作法

1．試料数：各溶出条件あたり 5本×2社

2．溶出条件

水	：100ml，95℃，30分間保持
水	：100ml，95℃，30分間室温放置
0.5%クエン酸溶液	：100ml，室温，30分間放置
n-ヘプタン	：100ml，室温，30分間放置

3．[ ]内は測定回のみ操作を行った．

2）ほ乳びんの繰り返し煮沸消毒試験

未使用の市販ほ乳びん（2社，各5本/溶出条件）を図1.の流れ図に従って360回煮沸消毒を繰り返し，各々溶出液中のBPA濃度の経時変化を測定した．

3）ほ乳びんの電子レンジ消毒バッグ使用試験

市販ほ乳びん用電子レンジ消毒バッグ（ポリエチレン／ポリエチレンテレフタレートのラミネートフィルム製品）に水70ml及びほ乳びん2本（同一品）を入れ，3分間加熱消毒後（バッグ内温度は約80℃），水は消毒廃液としてそのまま分析に供した．ほ乳びんは水を切って放冷した後95℃の水100mlを入れ，室温で30分間放置した．放置後なかの水を採取し，溶出液として分析に供した．水洗した後この操作を10回繰り返した．

4）給食器からのBPA溶出試験（経時変化）

未使用の市販給食器（深皿）を学校給食施設で学校給

食と同じ条件で使用した．一定期間ごとに5検体ずつ抜き取り，溶出試験に供した．

結果及び考察

1．使用済みほ乳びんからの溶出

4施設合計62本の使用済みほ乳びんについて水(95℃，30分間保持）で溶出試験を行い，その結果を表1.に示した．A～Cの3施設では全てのほ乳びんから微量ながらBPAが検出され，検出量は0.3～2.5ng/mlの範囲の値であった．また，参考として行ったD施設のほ乳びんからは比較的高い濃度のBPAが検出され，平均で42ng/ml，最も高い値は132ng/mlを示した．このほ乳びんの内表面にはシミのような汚れあるいは表面が変化したような白濁点が認められ，他の3施設のほ乳びんではこの白濁点がほとんど認められなかったことから，これらの変化がBPAの溶出に影響を与えているものと推察された．

ポリカーボネート樹脂は温水やアルカリ性薬品によりエステル結合が加水分解を受けるといわれている[4]．D施設ではアルカリ性の洗剤を使用しており，使用終了時の洗浄方法や保管中の取り扱いが原因で，ほ乳びんの材質が化学的に劣化した可能性も考えられるが，真の原因は不明である．いずれにしろ，ほ乳びんの取り扱い次第では高濃度のBPAが溶出してくる可能性が示唆された．したがってポリカーボネート製ほ乳びんの使用に当たり，たとえばアルカリ性の洗剤を使用しないなど，取り扱いには十分に注意し，さらに取り扱い説明書に従って正しく使用することが必要である．

表1．使用済みポリカーボネート製ほ乳びんからのビスフェノールAの溶出

施設	容量	試料数	溶出量(ng/ml) 平均値	範囲
A	120ml	10	0.5	0.3 － 1.0
	240ml	10	0.4	0.3 － 0.7
B	100ml	5	0.6	0.4 － 0.9
	200ml	5	1.3	0.9 － 2.5
C	200ml	6	1.0	0.3 － 2.1
	240ml	6	1.1	0.3 － 2.2
D	120ml	10	55.6	9.4 －132
(参考品)	200ml	10	28.9	4.8 － 74.3

溶出条件　：水（95℃），30分間保持

2．ほ乳びんからの繰り返し煮沸消毒による溶出

図1.に示した4溶出条件に従い，煮沸消毒及び溶出試験を360回繰り返した．表2.に示すように，最もBPAが溶出した条件は水（95℃，30分間保持）であり，平均溶出量の範囲はA社で0.4～0.8ng/ml，B社で0.3～1.0ng/mlであった．若干のばらつきはあるものの，すべての回で同程度のBPAが溶出し，回数の増加に伴い溶出量が増減するような傾向は認められなかった．このことから，このレベルの量はこの溶出条件では常に溶出してくるものと推察される．この推察は，使用済みほ乳びんからの溶出試験において，A,B,Cの3施設の値（表1.）が一定の範囲内であったことからも支持されるものと考える．また，水（95℃，30分間室温放置）では，A,B両社ともnd～0.6ng/mlの範囲の溶出量を示し，前条件に比べて溶出量の低下が見られた．これは，溶出量が水温低下に伴い減少することを示している．0.5%クエン酸溶液による溶出ではすべて定量限界以下であった．*n*-ヘプタンによる溶出では煮沸消毒の初期に0.2～0.7ng/mlのBPAの溶出が見られたが，14回以降はすべて定量限界以下であった．

なお，試験に用いたほ乳びんと同一ロット品の材質中に含まれるBPAを，食品衛生法「器具及び容器包装の規格基準」の材質試験[1]に準じて測定したところ，A社製品で7.2 μg/g，B社製品で30.5 μg/gであった．また360回煮沸消毒を行った後，ほ乳びんの一部につき材質中のBPAを測定したところ，平均でA社製品中15 μg/g，B社製品中24 μg/gであった．このことから，360回の煮沸消毒では樹脂の加水分解はほとんど起こっていないものと思われた．ただし，一部のほ乳びんでは外表面がこすれて白くなったり，ほ乳びん同士がぶつかる部分に細かいクラックが発生しており，物理的劣化はわずかながら認められた．

3．ほ乳びんからの電子レンジ消毒バッグ使用による溶出

ほ乳びん消毒の手軽さから，電子レンジ消毒バッグの使用が増えてきている．そこで，これを用いて消毒した際のほ乳びんからのBPAの溶出について検討し，その結果を表3.に示した．

消毒初期には消毒廃液の方に多量のBPAの溶出が認められた．特に消毒廃液への溶出は，B社製品に比べてA社製品の方が高い値を示したが，消毒回数を重ねるに従い急激に減少した．A社製品の高い値の原因については明らかにできなかったが，製品に使用された原材料の違いによるものと思われる．

消毒後のほ乳びんからの溶出試験では，A,B両社間ではほとんど差は認められず，初期にわずかな溶出が認められたものの，回を重ねるごとに減少する傾向が見られ，5回以降は両社とも定量限界以下であった．実際の消毒温度が約80℃であったことから，前述の煮沸消毒に比べて電子レンジによる消毒温度が若干低めであったため，表2.で示した水（95℃，30分間室温放置）の値に比較

表2．ポリカーボネート製ほ乳びんからのビスフェノールAの溶出に与える煮沸消毒の影響

煮沸回数	水（95℃，保持） A社製 平均値(範囲)	水（95℃，保持） B社製 平均値(範囲)	水（95℃，室温放置） A社製 平均値(範囲)	水（95℃，室温放置） B社製 平均値(範囲)	0.5%クエン酸溶液（室温放置） A社製 平均値(範囲)	0.5%クエン酸溶液（室温放置） B社製 平均値(範囲)	*n*－ヘプタン溶液（室温放置） A社製 平均値(範囲)	*n*－ヘプタン溶液（室温放置） B社製 平均値(範囲)
0	0.8 (0.6−0.9)	0.8 (0.7−1.0)	0.3 (0.3)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	0.4 (0.2−0.5)	0.4 (0.3−0.6)
1	0.5 (0.3−0.7)	0.7 (0.6−0.9)	0.3 (0.3−0.4)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	0.5 (0.3−0.7)	0.5 (0.4−0.7)
5	0.7 (0.6−0.8)	0.8 (0.8−0.9)	0.4 (0.3−0.6)	0.5 (0.4−0.6)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd−0.3)	0.3 (0.2−0.4)
10	0.6 (0.5−0.7)	0.8 (0.6−1.0)	0.3 (0.2−0.4)	0.3 (0.2−0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd−0.4)	nd (nd)
14	0.7 (0.6−0.8)	1.0 (0.9−1.0)	0.3 (0.3)	0.3 (0.2−0.5)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
23	0.7 (0.6−0.7)	0.6 (0.5−0.7)	0.4 (0.4)	0.4 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
28	0.5 (0.4−0.6)	0.3 (0.3)	0.2 (0.2−0.3)	0.3 (0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
45	0.7 (0.6−0.8)	0.5 (0.0−0.6)	0.3 (0.3−0.4)	0.4 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
60	0.7 (0.6−0.8)	0.7 (0.6−0.8)	0.4 (0.3−0.4)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
75	0.8 (0.6−0.9)	0.7 (0.6−1.0)	0.3 (0.2−0.4)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
90	0.6 (0.6−0.7)	0.6 (0.5−0.7)	0.3 (0.3−0.4)	0.3 (0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
105	0.7 (0.6−0.7)	0.8 (0.6−0.9)	0.4 (0.3−0.4)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
120	0.6 (0.5−0.7)	0.7 (0.7−0.8)	0.3 (0.3−0.4)	0.4 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
150	0.5 (0.4−0.5)	0.5 (0.5−0.6)	nd (nd−0.2)	0.3 (0.2−0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
180	0.5 (0.4−0.5)	0.6 (0.6−0.7)	nd (nd−0.2)	0.3 (0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
210	0.6 (0.4−0.7)	0.7 (0.6−1.0)	nd (nd−0.3)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
240	0.5 (0.5−0.6)	0.6 (0.5−0.7)	nd (nd)	0.3 (0.2−0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
270	0.5 (0.5)	0.6 (0.5−0.7)	nd (nd)	0.3 (0.3−0.4)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
300	0.5 (0.5)	0.5 (0.5−0.6)	nd (nd)	nd (nd−0.2)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
330	0.4 (0.4−0.5)	0.5 (0.4−0.5)	nd (nd)	0.3 (0.2−0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)
360	0.5 (0.4−0.5)	0.5 (0.4−0.5)	nd (nd)	nd (nd−0.3)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)	nd (nd)

試料数： n=5/溶出条件
単　位： ng/ml
nd　：　定量限界以下(<0.2ng/ml)

して，BPAの溶出量が若干低い傾向を示したものと思われる．

したがって電子レンジ消毒バッグを用いて未使用のポリカーボネート製ほ乳びんを消毒する場合には，使用開始前に，数回消毒を繰り返してから使用した方が，溶出してくるBPAの量を減らすことができるものと思われる．

以上の結果から，ポリカーボネート製ほ乳びんからのBPAの溶出は，煮沸開始初期に溶出量が若干多い傾向が見られるものの，全体としてはおおむね一定のレベルで推移するものと思われる．また，その溶出量は溶出液の種類によるよりは，溶出液の温度に影響され，溶出温度が高い程多く溶出するものと推察される．この傾向は河村らの報告[5]とほぼ同様であった．

4．使用済み給食器からの溶出

学校給食及び病院給食等で使用されていた給食器190個を収集し，BPAの溶出試験を行い，その結果を表4．に示した．

全ての給食器からBPAが溶出された．溶出量は様々であったが，「はし」を除く約7割の試料では1～5ng/mlの溶出値に集中し，その傾向は表4.の分布数に示した通りである．とりわけ高い溶出値を示したのは「はし」であり，平均で39.6ng/ml，最高で120ng/mlの値を示した．「はし」を蛍光X線分析法で調べたところ，顔料に含まれる鉄及びチタンが検出されたほかケイ素及びカルシウ

表3．ポリカーボネート製ほ乳びんからのビスフェノールA溶出に与える電子レンジ消毒バッグ消毒の影響

溶出回数	A社製（ng/ml） 溶出液	A社製（ng/ml） 消毒廃液	B社製（ng/ml） 溶出液	B社製（ng/ml） 消毒廃液
1	0.4	743	0.4	29.4
2	0.3	115	0.3	5.9
3	0.3	47.7	nd	2.1
4	0.2	22.8	nd	1.4
5	nd	16.5	nd	1.5
6	nd	4.9	nd	0.8
7	nd	4.9	nd	0.9
8	nd	3.2	nd	0.4
9	nd	3.1	nd	0.5
10	nd	2.6	nd	0.5

nd　：定量限界以下（<0.2ng/ml）
溶出条件：電子レンジで3分間加熱消毒後、水（95℃）で溶出（30分間室温放置）

表4．使用済みポリカーボネート製給食器からのビスフェノールAの溶出

		深皿	小皿	仕切皿	ボール	汁わん	はし	計
試料詳細	試料数（個）	20	20	30	60	30	30	190
	使用年数（年）	4	3.5−4.5	3.5−4.5	3.5−4.5	0.5−3.5	2.5	
	内容積量（ml）	400−450	160	180	350−450	310−450	160/2本	
溶出量	平均値（ng/ml）	7.8	2.9	6.1	3.1	3.1	39.6	9.8
	標準偏差	20.7	1.3	5.1	2.1	2	33.1	11
	範囲（ng/ml）	0.4−87.5	0.9−4.9	1.1−18.6	0.7−10.8	0.7−8.3	5.9−120	0.4−120
	（ng/ml）							
範囲内分布数	0.4≦x<1.0	7	1	0	2	2	0	12
	1.0≦x<2.0	7	5	4	19	7	0	42
	2.0≦x<5.0	3	14	14	30	16	0	77
	5.0≦x<10.0	1	0	6	8	5	3	23
	10.0≦x	2	0	6	1	0	27	36

溶出条件　：　水（95℃），30分間保持

表5．ポリカーボネート製給食器からのビスフェノールAの溶出（経時変化）

使用日数	試料数	水（ng/ml）		4％酢酸（ng/ml）		*n*−ヘプタン（ng/ml）	
		平均値	範囲	平均値	範囲	平均値	範囲
0	5	0.2	nd−0.3	nd	nd	nd	nd
1	5	2.0	0.7−6.2	nd	nd	0.2	nd−0.4
3	5	0.5	0.2−1.4	nd	nd	nd	nd−0.2
7	5	0.6	0.3−1.1	nd	nd	nd	nd
14	5	0.9	0.4−1.9	nd	nd	nd	nd
30	5	1.7	1.4−2.0	0.2	nd−0.5	nd	nd
60	5	1.4	0.9−2.0	nd	nd	nd	nd
90	5	2.2	1.8−2.6	nd	nd	nd	nd
120	5	1.3	0.6−3.1	nd	nd	nd	nd

溶出条件：水　　（95℃），30分間室温放置
　　：4％酢酸　　（25℃），30分間放置
　　：*n*−ヘプタン　（25℃），30分間放置
なお，溶出は水，4％酢酸，*n*−ヘプタンの順で行った．

ムが検出された．他の給食器の内表面は透明なポリカーボネートが使用され，顔料が含まれていないことから，「はし」は他の給食器とは原材料がやや異なるものと思われた．使用形態から考えると，BPAの摂取にどの程度影響を与えるのかは不明であるが，高い溶出値を示す器具を給食器に使用することは不適切であると思われる．「はし」を除いた他の給食器のBPA溶出量は平均で4.2 ng/mlであり，ほ乳びんの値と比較するとやや高い値であった．これは製造原料の違いによるものか，あるいは内表面に傷がつく可能性のある使われ方の有無によるものであると推察される．

5．給食器からの経時的使用による溶出量の変化

未使用の給食器を給食施設に持ち込み，普段の給食と同じ条件で使用することによるBPA溶出の経時変化を検討した．その結果，表5.に示すようにばらつきはあるものの，使用日数が増えるに従い水によるBPA溶出量の最高値が増える傾向が認められたが，平均値で見る限りでは必ずしも増加傾向があるとは認められなかった．これは使用日ごとに異なる5試料をサンプリングしてくるために，試料ごとのばらつきが影響しているものと推察される．しかし，使用日数が増えるに従い給食器の表面が傷ついたり劣化したりしてくる可能性は高く，そのためにBPA溶出量の最高値が増える傾向を示したものと考えられる．表4.に示した使用済み給食器では，「はし」を除く全体の約7割のBPA溶出量が1～5 ng/mlの範囲に集中しており，今回実験に用いた給食器の溶出値も，このまま使い続けるといずれこの範囲に近づいて来るものと推察される．

以上，ポリカーボネート製ほ乳びん及び給食器についていくつかの検討を加えた結果，BPAの溶出は溶出溶媒

(水) の温度が高いと溶出量は増加する傾向にあり，水(95℃，30分間保持) の条件では微量ではあるがすべての試料からBPAが溶出された．

今回の試験で検出されたBPAの溶出量は，現段階では日本の食品用ポリカーボネート製品の食品衛生法による規格値2.5mg/l (フェノール及び*p-t*-ブチルフェノールを含む溶出規格) を大幅に下回る値である．しかし，BPAの内分泌かく乱化学物質としての評価が未だ定まっていない現状では，BPAの摂取を出来るだけ減らすため，使用にあたってはアルカリ性の洗剤を使用しないことや高温で使用しないなど，使用者への啓発を行い，適切に食品用ポリカーボネート製品を利用すべきであろう．

まとめ

1．都立病院等3施設の使用済みほ乳びんでは，全ての溶出試料から微量ながらBPAが検出され，その値は0.3～2.5ng/mlであった (水，95℃，30分間保持)．また参考として行った1施設では，ほ乳びんの使用経歴や保存状態が不明確なものの，比較的高い濃度のBPAが検出され，平均で42ng/ml，最も高い値は132ng/mlを示し，取り扱い方次第では高濃度のBPAが溶出してくる可能性が示唆された．

2．ほ乳びんの360回繰り返し煮沸試験では，(水，95℃，30分間保持) の溶出条件で，全ての回で同程度のBPAの溶出が認められ，平均溶出量の範囲は0.3～1.0ng/mlであった．

3．電子レンジ消毒バッグ使用によるほ乳びんからのBPA溶出は，消毒廃液中のBPA量が高濃度を示したものの，ほ乳びん本体からの溶出量は少なく，使用回数を重ねる毎に減少した．

4．使用済み給食器では全ての試料からBPAが溶出され，「はし」を除いた他の給食器のBPA溶出量は平均で4.2ng/mlであった．「はし」では比較的高い溶出が認められ，平均で39.6ng/ml，最高で120ng/mlの値を示した．

5．未使用の給食器を使用したBPA溶出の経時変化では，使用日数が増えるに従い溶出量の最高値が増加傾向を示したものの，平均値では必ずしも増加傾向は認められなかった．

(本調査は食品環境指導センターの先行調査として実施した．)

文　献

1) 厚生省生活衛生局食品保健課，乳肉衛生課，食品化学課監修：食品衛生小六法，平成11年版，1073-1074, 1999，新日本法規出版㈱，東京．

2) Krishunan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., et. al.：*Endocrinology*, **132**, 2279-2286, 1993.

3) 井口泰泉：生殖異変，36-50, 1998，かもがわ出版，京都府

4) 本間精一　編：ポリカーボネート樹脂ハンドブック，338-361, 1992，日刊工業新聞社，東京．

5) 河村葉子，小谷野有希，武田由比子，他：食衛誌，**39**, 206-212, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 208-214, 1999

食品用ポリスチレン製器具・容器包装のスチレンダイマー，トリマー残留量及び溶出量調査

金子令子*，渡辺悠二*，船山恵市*，樺島順一郎
斉藤和夫*

Survey of Styrene Dimers and Trimers in Polystyrene Equipment and Packages for Food

REIKO KANEKO*, YUJI WATANABE*, KEIICHI FUNAYAMA*, JUNICHIRO KABASHIMA* and KAZUO SAITO*

Styrene monomer, dimers and trimers contained in polystyrene equipment and food packages and their migration into food simulating solvent from their material, were investigated. These were determined by GC-FID. A total of 51 samples collected from commercial markets were examined. Trimers were detected from 51 samples and their contained levels were between 150 and 7,310 ppm (average 3,953 ppm). Also dimers and monomer were detected from 50 samples and their contained levels were between 60～1,180 ppm (average 336 ppm), and 30～760 ppm (average 317 ppm). The migration test into food simulating solvent was carried out. Using the migration test into water (60℃, 95℃) for 30 minutes , dimers and trimers were not detected from every sample. Using the migration test into 20 % ethanol (60℃) for 30minutes, trimers were detected from 2 samples and their migration levels were less than 3 ppb. Using the migration test into n-heptane at room tempeture for 1 hour , trimers were detected from every sample and their migration levels were between 3 and 16,068 ppb (average 739 ppb). In a similar manner as above, dimers were detected from 46 samples and their migration levels were between 1 and 1,225 ppb (average 54 ppb), and monomer were detected from 22 samples and their levels were between 10 and 324 ppb (average 34 ppb). From these results, it was suggested that styrene monomer, dimers and trimers in polystyrene equipment and food packages migrated into oils or fatty foods.

Keywords：スチレンモノマー styrene monomer, ：スチレンダイマー styrene dimer, スチレントリマー styrene trimer, スチレンオリゴマー styrene oligomer, ポリスチレン polystyrene

緒　言

ポリスチレンは優れた成形加工性，耐水性，色がつけやすい，断熱性（発泡のもの）などの理由からカップ麺容器，弁当総菜容器，乳製品容器など各種食品用プラスチックに多く使用されている．しかしポリスチレン中には重合せずに残留したスチレンモノマー（以下モノマーと略す）や製造時の副反応により生成するスチレンダイマー（以下ダイマーと略す）やスチレントリマー（以下トリマーと略す）などのスチレンオリゴマーが存在する[1]．モノマーについては食品衛生法[2]のポリスチレンの個別規格に揮発成分として，トルエン，エチルベンゼン，iso-プロピルベンゼン，n-プロピルベンゼンとの合計で5000ppm以下（熱湯を用いるものは2000ppm以下）と限度値が定められているが，ダイマー，トリマーには規制がない．近年ダイマー，トリマーは，ヒトや野生動物に対する内分泌かく乱作用を有する疑いがあるとして環境庁より公表された67種類の化学物質のうちのひとつであり[3]，モノマーも米国環境保護庁では疑わしいと公表し

* 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

ている[3]．現時点では内分泌かく乱作用について未解明な点も多いが，生体に極微量で作用することが推測されているため，食品用器具容器の残留量及びこれらからの溶出量のデータを把握しておくことが必要である．また東京都は平成10年「東京都環境ホルモン取り組み方針」を策定し，現状把握の推進として「食品等から溶出する物質にに関する調査」を行うとしている．そこで市販ポリスチレン製品中のモノマー，ダイマー及びトリマーの残留量及び食品疑似溶媒を用いた溶出量の実態調査を行ったので報告する．

実験方法

1．試料

市販食品用ポリスチレン製器具，容器全51検体

カップめん容器：26検体（うち発泡ポリスチレン25），乳製品容器：5検体，業務用容器（弁当，総菜用）：5検体（うち発泡ポリスチレン2），使い捨て食器具：5検体，家庭用食器具：10検体，以上の試料は東京都食品環境指導センターが収集したものである．

2．試薬

cis-1,2-diphenylcyclobutane, 2,4-diphenyl-1-butene, trans-1,2-diphenylcyclobutane, 2,4,6-triphenyl-1-hexene, le-phenyl-4e(1'-phenylethyl)tetralin, la-phenyl-4e(1'-phenylethyl)tetralin, le-phenyl-4a(1'-phenylethyl)tetralin, la-phenyl-4a(1'-phenylethyl)tetralin 各10ppm標準溶液（トルエン溶媒）：シグマアルドリッチジャパン㈱スペルコ事業部，クロロホルム，メタノール，エタノール，無水硫酸ナトリウム：特級，和光純薬工業㈱製，n-ヘプタン：高速液体クロマトグラフ用，ナカライテスク㈱製，n-ヘキサン：残留農薬試験用，関東化学㈱製，1,3-dipheny propane：一級，東京化成工業㈱製

3．装置

フーリエ変換赤外分光光度計：日本バイオ・ラッドラボラトリーズ㈱製FTS175型，水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ：ヒューレットパッカード社製HP 6890型

4．材質鑑別

試料をクロロホルムに溶解し，ガラス板上に塗布し，溶媒を蒸発させた後，残ったフィルム状の試料をはがし，赤外線吸収スペクトル（透過法）を測定した．得られたスペクトルを標準品と比較することにより材質鑑別を行った．

5．GC測定条件

5.1 ダイマー及びトリマー

カラム：HP-5 (0.32 mm i.d.×30 m，膜厚0.25 μm)，カラム温度：120℃(5min)→10℃／min→250℃(10min)，注入口温度：280℃，検出器温度：280℃，キャリヤーガス流量：1.5 ml/min，注入量：1 μl（材質），4 μl（溶出液），注入モード：スプリットレス（材質），高圧注入スプリットレス（溶出液）

5.2 モノマー

カラム：HP-WAX (0.25mm i.d.×30m，膜厚0.25 μm)，カラム温度：60℃(1 min)→4℃/min→100℃(0 min)，注入口温度：230℃，検出器温度：230℃，キャリヤーガス流量：1.4ml/min，注入量：4 μl，注入モード：高圧注入スプリットレス

6．試験溶液の調製

6.1 材質試験

6.1.1 ダイマー及びトリマー：試料0.5gにクロロホルム10mlを加え溶解する．次いでメタノール50mlを加え，遠心分離を行い，上澄液全量を分取する．この液を減圧下で2 ml程度まで濃縮し，メタノールを加えて5mlとした．これをクロマトディスク(孔径0.45 μm)でろ過し，試験溶液とした．

6.1.2 モノマー：試料0.5gにクロロホルム10mlを加え溶解する．メタノールを加え全量50mlとした後，これをクロマトディスク(孔径0.45 μm)でろ過し，試験溶液とした．

6.2 溶出試験

溶出条件は試料に1 cm^2当たり2 mlの割合で以下1）～4）の条件の溶出液をみたし，恒温そうで一定温度，時間を保持した．モノマーについては，4）のn-ヘプタン，室温，1時間の溶出条件のみを用いた．

1）水，60℃，30分：乳製品容器，業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具，2）水95℃，30分：カップめん容器，業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具，3）20%エタノール，60℃，30分：業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具，4）n-ヘプタン，室温，1時間：カップめん容器，乳製品容器，業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具

これらの溶出条件により得られた溶出液を，以下に示すように処理して試験溶液とした．

ダイマー及びトリマーの場合，水及び20%エタノール溶出液は溶出液100mlをとりn-ヘキサン各50mlで2回抽出し無水硫酸ナトリウム3 gを加えろ過した後，抽出液を減圧下で2 ml程度まで濃縮した．さらに窒素気流下で1 mlまで濃縮したものを試験溶液とした．n-ヘプタン溶出液では溶出液100mlを減圧下で2 ml程度まで濃縮し，さらに窒素気流下で1 mlまで濃縮したものを試験

溶液とした.

モノマーの場合，n-ヘプタン溶出液をそのまま試験溶液とした.

結果及び考察

1．測定法の検討

1.1 検量線

測定対象としたダイマー及びトリマーをTable 1.に示した（以下このTable 1 に示した略号を使用する）．これらは河村ら[4]が報告している食品用ポリスチレン製品中に存在する4種類のダイマー，8種類のトリマーである．モノマー，ダイマー4種（D1～D4），トリマー5種（T1～T5）の検量線は，0.1～100ppmの範囲で直線性を示した．T6，T7及びT8は標準品が市販されていないため入手できなかった．しかし5種のトリマーT1，T2，T3，T4，T5のピーク面積値がほぼ同等であることから，T1の検量線を使用して測定を行った．定量限界は材質試験で10ppm，溶出試験でダイマー，トリマー1ppb，モノマー10ppbであった.

1.2 材質試験

材質中のダイマー，トリマー及びモノマーを迅速簡易に測定するため検討を行った．材質中に含まれるダイマー及びトリマー全量を測定するには，試料を完全に溶媒に溶解しGCに注入する方法が適当である．しかし注入口が高温であることから溶媒中に存在するポリマーや注入口ライナーに付着したポリマーが熱分解，熱重合し正確に測定できない可能性が考えられた．そこで試料をクロロホルムに溶解した後，メタノールによりポリマーを再沈殿させ，クロマトディスクでろ過することにより，ポリマーを除去した.

1.3 溶出試験

1.3.1 GC条件：内分泌かく乱物質は生体に極微量で作用することが推測されるため，できる限り低濃度までの測定が要求されている．GCへの注入は高圧注入法を用いることによって，通常より多い4 μl注入を行った．さらにダイマー及びトリマーについては100倍まで濃縮を行い，検出限度を1 ppbとした．モノマーは揮発性であり減圧濃縮できないため，検出限度は10ppbであった.

1.3.2 溶出条件：食品衛生法の合成樹脂規格に準じ[2]，各試料に実際の使用条件（溶出液，液量，時間，温度）を想定して適用した．すなわち溶出液は，pH 5 を超える水性の食品では水，酒類では擬似溶媒として20%エタノール，油脂及び脂肪性食品では擬似溶媒としてn-ヘプタンを使用した．また高温で使用する可能性のあるカップ麺容器，業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具は水，95℃，30分の条件を用いた．また今回分析対象とした試料は脂肪性食品に使用される可能性があることやモノマー，ダイマー及びトリマーは脂溶性であることを考慮して，すべての試料にn-ヘプタン，室温，1時間の条件を用いることとした.

Table 1. List of Determinated Dimers and Trimers

	Code	
Styrene dimers	D1	1,3-diphenylpropane
	D2	cis-1,2-diphenylcyclobutane
	D3	2,4-diphenyl-1-butene
	D4	trans-1,2-diphenylcyclobutane
Styrene trimers	T1	2,4,6-triphenyl-1-hexene
	T2	1e-phenyl-4e(1'-phenylethyl)tetralin
	T3	1a-phenyl-4e(1'-phenylethyl)tetralin
	T4	1a-phenyl-4a(1'-phenylethyl)tetralin
	T5	1e-phenyl-4a(1'-phenylethyl)tetralin
	T6	triphenylcyclohexane
	T7	unknown styrene Trimer
	T8	unknown styrene Trimer

2．市販食品用ポリスチレン製器具，容器の測定結果

2.1. 材質鑑別結果.

51検体中ポリスチレン49検体，メタクリル酸メチル-ブタジエン-スチレン共重合体2検体（乳製品類）であった.

2.2. 材質中の残留量.

測定した結果をTable 2 に，分析した試料のガスクロマトグラムの一例をFig.1 に示した．ダイマーは51検体中50検体から60～1,180ppm，平均336ppm検出された．D1，D2は平均13及び14ppmと少なかったが，D3，D4は平均146及び163ppm検出された．トリマーは全51検体から150～7,310ppm，平均3,953ppm検出された．T6，T7及びT8はそれぞれ平均33，158，48ppmと少なかったが，T1，T2，T3，T4及びT5は，それぞれ平均994，794，916，567，444ppm検出された．ダイマー及びトリマーの合計は150～8,490ppm，平均4,290ppmであった．種類別に平均値で比較すると，ダイマー及びトリマーの合計では使い捨て食器具類が最も多く，家庭用食器具類，業務用容器類，カップ麺類，乳製品類の順であった．モノマーは51検体中50検体から30～760ppm 平均317ppm検出された．種類別に含有量を平均値で比較すると，家庭用食器具類が最も多く，使い捨て食器具類，カップ麺類，乳製品類，業務用容器類の順であった.

ダイマー，トリマー及びモノマーとも発泡ポリスチレンの検体では，押し出し法シート成型品と製法の異なる

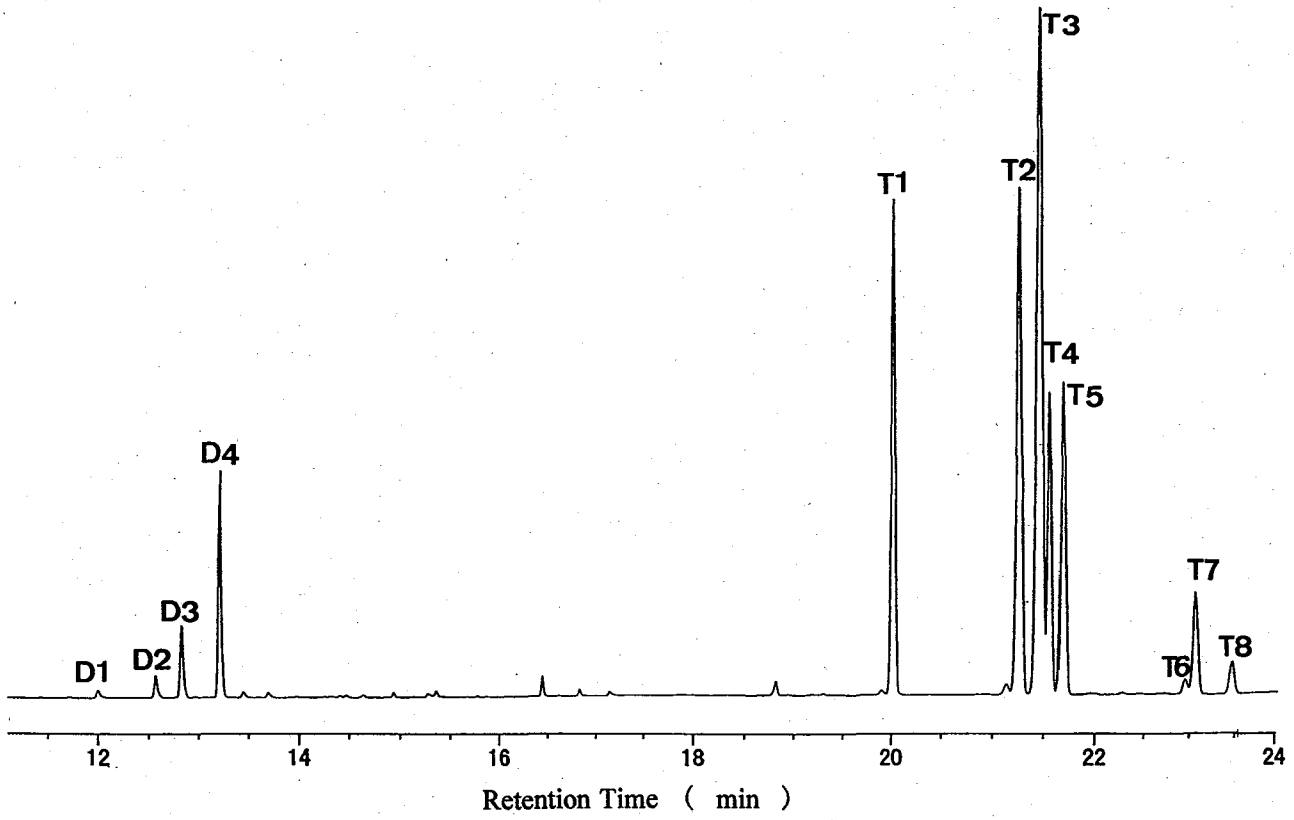


Fig. 1. Typical Chromatogram of Polystyrene Equipment for Food
Peak codes correspond to Table 1.

ビーズ製法ポリスチレンビーズ発泡成型品であるカップ麺容器類No. 11, 12, 13, 21, 24の残留量は，ダイマー及びトリマー計500ppm以下，モノマー40ppm以下と少なかった．しかしそれ以外は同じ種類の試料でも残留量に差がみられた．

2. 3. 食品擬似溶媒への溶出量

水による溶出では60℃，95℃条件ともにダイマー及びトリマーは検出限度以下であった．しかし業務用容器，使い捨て食器具，家庭用食器具は使用温度が70～85℃以下とされているため，使い捨て食器具3検体に変形を起こしたものが認められた．

20%エタノール溶出液では家庭用食器具2検体よりトリマーが3 ppb（T1,T2,T3計）及び1 ppb（T1）検出された．

n-ヘプタンへの溶出試験の結果をTable 4 に示した．ダイマーは51検体中46検体から1～1,225ppb，平均54ppb検出された．D1，D2は平均3及び2 ppbと少なかったが，D3，D4は平均19及び31ppb検出された．トリマーは全51検体から3～16,068ppb，平均739ppb検出された．T6，T7，T8はそれぞれ平均4，36，10ppbと少なかったが，T1及びT2，T3，T4，T5は，それぞれ平均141，129，166，172，79ppb検出された．ダイマー及びトリマーの合計は3～17,293ppb，平均792ppbであり，1,000ppb以上の溶出量を示したものが7検体（カップ麺容器4，乳製品容器2，業務用容器1）認められた．また乳製品（メタクリル酸メチル-ブタジエン-スチレン共重合体）1検体は17,293ppbと多量のダイマー及びトリマーが検出され，溶出試験中に容器本体が膨潤し著しい変形が認められた．モノマーは51検体22検体から10～324ppb，平均34ppb検出された．

種類別に溶出量を平均値で比較すると，ダイマー，トリマー及びモノマーともに乳製品類が最も多く，業務用容器類，カップ麺類，使い捨て食器，家庭用食器具類の順であった．乳製品類，業務用容器類が平均値で高い値を示したのは，非常に高濃度の試料が含まれていたためである．また内側にスチレン系樹脂がラミネートされている発泡ポリスチレンのカップ麺No.9, 10, 19, 22, 業務用容器No.2は溶出量が多かった．しかしそれ以外は同じ種類の試料でも残留量と同様に，溶出量に大きな差がみられた．また材質中の残留量の少ないものであっても溶出量が多いものもあり，材質中の残留量と溶出量の関連は認められなかった．特にくり返し使用する家庭用食器具

Table 2. Content of Styrene Monomer, Dimers and Trimers in Polystyrene Equipment and Packages for Food

	No.	Samples	(ppm) D1	D2	D3	D4	Dimers Total	(ppm) T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	Trimers Total	Oligomers Total	(ppm) Monomer
Instant Foods Cup	1	Noodle cup	20	20	130	210	380	700	1240	1630	580	650	40	230	60	5130	5510	430
	2	Noodle cup	10	ND	150	120	280	1300	790	1120	390	450	20	150	50	4270	4550	300
	3	Noodle cup	20	20	250	190	480	1510	1450	ND	2320	840	20	290	90	6520	7000	260
	4	Noodle cup	10	10	160	120	300	1270	970	1330	470	540	20	180	60	4840	5140	230
	5	Noodle cup	10	ND	80	110	200	580	1220	1580	580	630	30	220	60	4900	5100	280
	6	Noodle cup	10	20	100	180	310	1070	780	1110	380	450	20	150	50	4010	4320	270
	7	Noodle cup	20	20	80	200	320	1090	950	1620	460	530	20	180	60	4910	5230	400
	8	Noodle cup	20	ND	170	100	290	900	690	920	320	360	20	120	40	3370	3660	310
	9	Noodle cup	10	20	60	250	340	610	1190	1620	550	600	60	220	70	4920	5260	320
	10	Noodle cup	20	ND	40	60	120	510	480	800	240	260	60	130	30	2510	2630	300
	11	Noodle cup	ND	ND	70	10	80	240	10	30	ND	ND	ND	ND	ND	280	360	40
	12	Noodle cup	ND	ND	70	20	90	240	10	30	ND	ND	ND	ND	ND	280	370	30
	13	Noodle cup	ND	ND	50	10	60	170	20	40	ND	200	ND	ND	ND	430	490	30
	14	Noodle cup	20	ND	150	120	290	1170	1250	1660	600	680	20	230	70	5680	5970	270
	15	Noodle cup	30	20	220	190	460	1460	1440	ND	2290	820	30	280	90	6410	6870	260
	16	Noodle cup	ND	30	90	350	470	950	1110	1530	530	630	30	210	70	5060	5530	260
	17	Noodle cup	10	ND	120	110	240	940	930	1240	450	510	20	170	60	4320	4560	220
	18	Noodle cup	20	ND	210	70	300	1140	610	830	290	340	10	110	30	3360	3660	280
	19	Noodle cup	30	ND	230	110	370	1280	1390	ND	2170	770	80	340	80	6110	6480	290
	20	Noodle cup	20	ND	160	80	260	980	560	770	270	310	60	140	30	3120	3380	280
	21	Soup cup	ND	ND	60	10	70	230	10	30	ND	ND	ND	ND	ND	270	340	30
	22	Soup cup	30	ND	190	120	340	1090	1090	1490	560	600	20	200	60	5110	5450	310
	23	Rice cup	10	30	110	330	480	1050	970	1440	490	560	30	180	60	4780	5260	360
	24	Rice cup	ND	10	40	20	70	160	30	60	10	20	ND	ND	ND	280	350	30
	25	Rice cup	10	20	70	220	320	1040	970	1630	470	540	70	240	60	5020	5340	380
	26	Japnese siruko cup	10	ND	190	130	330	1610	870	1230	470	500	20	170	50	4920	5250	300
		Mean	13	8	125	132	279	896	809	913	573	453	27	159	47	3877	4156	249
Dairy Products	1	Ice cream cup	20	ND	80	80	180	90	200	260	1210	100	ND	30	10	1900	2080	ND
	2	Ice cream cup	20	ND	280	110	410	1680	730	1030	350	420	10	140	40	4400	4810	320
	3	Ice cream cup	ND	40	30	170	240	520	870	1150	410	460	40	170	50	3670	3910	210
	4	Ice cream cup	ND	ND	ND	ND	ND	40	30	30	10	10	20	ND	10	150	150	60
	5	Jelly cup	ND	20	90	90	200	460	210	310	90	110	ND	30	10	1220	1420	390
		Mean	8	12	96	90	206	558	408	556	414	220	14	74	24	2268	2474	196
for Business use	1	Food case	ND	ND	90	80	170	780	560	770	270	310	230	290	40	3250	3420	200
	2	Food case	20	30	270	250	570	1240	1240	1620	580	650	270	350	130	6080	6650	60
	3	Food case	ND	40	60	130	230	410	450	630	510	250	30	90	30	2400	2630	200
	4	Food case	30	20	150	320	520	1080	1190	1640	730	670	30	230	70	5640	6160	240
	5	Food case	10	ND	120	140	270	1030	910	1300	450	520	20	170	60	4460	4730	180
		Mean	12	18	138	184	352	908	870	1192	508	480	116	226	66	4366	4718	176
Dispoable Ware	1	Food case	20	30	160	320	530	1340	820	1150	440	480	40	180	50	4500	5030	420
	2	Food case	10	30	120	310	470	1060	1300	1850	640	770	40	250	80	5990	6460	250
	3	cup	40	ND	340	210	590	1670	690	960	310	370	20	110	40	4170	4760	500
	4	cup	10	20	70	200	300	860	1080	ND	1660	580	30	200	60	4470	4770	230
	5	spoon	20	10	230	200	460	1690	710	1050	350	440	20	140	50	4450	4910	590
		Mean	20	18	184	248	470	1324	920	1002	680	528	30	176	56	4716	5186	398
Table Ware	1	measuring spoon	20	ND	220	120	360	1550	550	750	260	290	ND	90	30	3520	3880	760
	2	measuring spoon	10	ND	350	240	600	2020	1230	1660	590	680	20	230	70	6500	7100	610
	3	measuring spoon	10	10	180	220	420	1590	840	1240	420	520	20	170	70	4870	5290	410
	4	cutting board	ND	10	70	40	120	500	240	360	120	150	ND	50	20	1440	1560	230
	5	butter case	30	ND	480	120	630	2090	870	1180	390	450	ND	150	50	5180	5810	470
	6	food case	20	10	140	210	380	1240	850	1160	400	460	20	150	50	4330	4710	710
	7	shumai maker	10	20	140	210	380	1220	850	1150	400	460	20	140	40	4280	4660	680
	8	egg cutter	20	10	200	150	380	1190	1030	1420	510	590	20	210	70	5040	5420	480
	9	food case	20	ND	240	60	320	860	200	300	90	110	ND	30	ND	1590	1910	960
	10	food case	ND	200	100	880	1180	1200	1800	ND	2830	990	60	330	100	7310	8490	530
		Mean	14	26	212	225	477	1346	846	922	601	470	16	155	50	4406	4883	584
	51	samples Mean	13	14	146	163	336	994	794	916	567	444	33	158	48	3953	4290	317

ND < 10ppm

Code numbers correspond to Table 1.

T6,T7 and T8 determined by T1 calibration curve.

Table 3. Migration of Styrene Monomer, Dimers and Trimers into n-Heptane (2ml/cm²) from Polystyrene Equipment and Packages for Food

	No.	Samples	(ppb) D1	D2	D3	D4	Dimers Total	(ppb) T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	Trimers Total	Oligomers Total	(ppb) Monomer
Instant Foods Cup	1	Noodle cup	ND	1	2	2	6	12	39	56	20	23	ND	9	3	161	167	15
	2	Noodle cup	ND	ND	6	6	12	54	34	54	18	22	1	7	4	194	206	12
	3	Noodle cup	ND	1	13	2	16	42	40	ND	22	26	ND	10	4	144	160	30
	4	Noodle cup	ND	ND	6	4	9	49	26	42	14	17	ND	6	3	158	167	ND
	5	Noodle cup	ND	ND	2	2	4	11	22	33	11	13	ND	5	2	98	102	22
	6	Noodle cup	ND	ND	4	4	8	19	12	20	7	8	ND	3	2	71	79	19
	7	Noodle cup	ND	ND	3	4	6	28	19	38	10	12	ND	4	2	113	119	16
	8	Noodle cup	ND	ND	4	1	6	22	12	19	6	7	ND	3	2	71	77	ND
	9	Noodle cup	ND	10	7	92	108	138	328	486	175	189	10	68	21	1415	1523	98
	10	Noodle cup	3	ND	9	66	77	199	333	491	171	195	11	72	23	1495	1572	324
	11	Noodle cup	ND	ND	11	2	12	8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	20	ND
	12	Noodle cup	ND	ND	7	1	8	6	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	6	14	ND
	13	Noodle cup	ND	ND	8	3	11	6	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	8	19	ND
	14	Noodle cup	ND	ND	12	7	19	63	32	52	15	22	ND	9	4	196	215	15
	15	Noodle cup	ND	ND	6	2	8	25	28	ND	15	18	ND	7	3	95	103	48
	16	Noodle cup	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	1	ND	ND	ND	ND	0	3	3	53
	17	Noodle cup	ND	ND	2	2	4	18	18	27	8	12	ND	374	ND	456	460	ND
	18	Noodle cup	ND	ND	7	1	8	29	13	20	6	8	ND	3	2	80	88	19
	19	Noodle cup	4	ND	24	145	173	749	752	ND	463	472	24	169	74	2703	2876	279
	20	Noodle cup	ND	ND	6	10	16	35	17	26	9	11	ND	4	2	104	120	13
	21	Soup cup	ND	ND	1	1	3	12	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	14	17	68
	22	Soup cup	9	ND	80	38	127	470	213	345	199	138	2	47	19	1433	1560	22
	23	Rice cup	1	ND	ND	1	2	2	1	2	ND	1	ND	ND	1	7	9	ND
	24	Rice cup	ND	1	1	1	3	2	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	4	7	ND
	25	Rice cup	ND	ND	2	4	6	29	22	46	11	13	ND	5	2	128	134	ND
	26	Japnese siruko cup	ND	ND	3	2	4	25	13	20	7	8	ND	3	2	77	81	ND
		Mean	1	1	9	16	25	79	76	69	46	47	2	31	7	355	381	41
Dairy Products	1	Ice cream cup	124	ND	475	626	1225	2810	2100	3000	6240	1300	ND	447	174	16071	17293	17
	2	Ice cream cup	ND	ND	ND	ND	ND	12	6	10	5	2	ND	ND	ND	35	35	ND
	3	Ice cream cup	ND	56	32	193	281	460	831	1250	428	505	25	176	57	3732	4012	272
	4	Ice cream cup	ND	ND	ND	ND	ND	21	11	19	4	5	8	ND	ND	68	68	31
	5	Jelly cup	ND	ND	1	1	3	6	3	6	1	3	ND	ND	ND	19	22	167
		Mean	25	11	102	164	302	662	591	856	1336	362	7	124	46	3984	4286	97
for Business use	1	Food case	ND	ND	ND	1	1	12	12	19	6	7	ND	3	1	60	61	10
	2	Food case	13	ND	182	301	495	1580	1450	2170	767	888	99	365	108	7427	7919	199
	3	Food case	ND	ND	1	1	2	11	6	11	9	4	ND	ND	ND	40	42	ND
	4	Food case	ND	1	2	6	10	18	24	36	12	16	ND	6	3	115	125	ND
	5	Food case	ND	ND	ND	ND	ND	9	10	16	6	6	ND	ND	ND	48	48	ND
		Mean	3	0	37	61	101	327	300	450	160	184	20	75	22	1537	1639	42
Dispoable Ware	1	Food case	1	ND	8	3	12	47	39	55	40	22	ND	9	3	215	227	ND
	2	Food case	ND	ND	ND	1	1	4	6	10	3	4	ND	2	ND	29	30	ND
	3	cup	ND	ND	1	2	3	15	10	15	5	6	ND	2	1	53	56	ND
	4	cup	ND	1	3	7	11	35	49	ND	26	30	1	11	4	156	166	ND
	5	spoon	ND	ND	ND	ND	ND	8	5	7	2	4	ND	1	ND	27	27	ND
		Mean	0	0	2	3	5	22	22	17	15	13	0	5	2	96	101	0
Table Ware	1	measuring spoon	ND	ND	1	2	3	9	6	9	3	4	ND	2	1	34	36	ND
	2	measuring spoon	ND	ND	ND	2	2	10	4	8	2	3	ND	ND	ND	27	29	ND
	3	measuring spoon	ND	ND	1	1	2	5	3	5	2	2	ND	ND	ND	17	19	ND
	4	cutting board	ND	1	9	ND	11	14	ND	3	14	ND	ND	ND	ND	31	42	ND
	5	butter case	ND	ND	2	1	3	15	7	11	3	4	ND	2	1	43	46	ND
	6	food case	1	ND	1	2	4	12	11	16	6	7	ND	3	2	54	59	ND
	7	shumai maker	ND	ND	ND	1	1	7	8	13	4	5	ND	2	1	40	41	ND
	8	egg cutter	1	4	6	4	15	8	11	20	6	8	ND	3	3	58	74	ND
	9	food case	1	ND	ND	1	2	6	2	4	1	1	ND	ND	ND	14	16	ND
	10	food case	ND	ND	ND	1	1	3	7	0	3	4	ND	1	1	20	21	ND
		Mean	0	1	2	2	4	9	6	9	4	4	0	1	1	34	38	0
		51 samples Mean	3	2	19	31	54	141	129	166	172	79	4	36	10	739	792	34

Styrene dimers and trimers ND < 1ppb, monomer ND < 10ppb

Code numbers correspond to Table 1.

T6,T7 and T8 determined by T1 calibration curve.

類は残留量が比較的多いにもかかわらず，溶出量は少ない傾向がみられた．一回限りで使い捨てる容器類に比較して，家庭用食器具類は厚みがあるためダイマー，トリマー及びモノマーがポリスチレン樹脂内部に閉じこめられやすく残留量は多いが，材質が硬いことから分子構造が密であるためn-ヘプタンが浸透しにくく溶出量は少なかったのではないかと推測した．なおn-ヘプタンは油脂の擬似溶媒であるが，試料を膨潤させるなど，油脂より抽出力が強いため[5]，実際に油脂への溶出量はn-ヘプタンへの溶出量より少ないと考えられる．

まとめ

食品用ポリスチレン製品材質中のスチレンダイマー、トリマー及びモノマー残留量とこれらの疑似溶媒への溶出量調査を行った．

その結果，残留量ではダイマーが51検体中50検体から平均336ppm，トリマーが51検体から平均3,953ppm，モノマーが50検体から平均317ppm検出された．ポリスチレンビーズ発泡成型品であるカップ麺容器類５検体の残留量は少なかった．水への溶出では，ダイマー及びトリマーは60℃，95℃ともに51検体すべて検出限界以下であった．20%エタノールへの溶出では，２検体からトリマーがわずかに３及び1ppb検出された．n-ヘプタンへの溶出では，ダイマーが46検体から平均54ppb，トリマーが全51検体から平均739ppb，モノマーが22検体から平均34ppb検出された．材質中残留量とn-ヘプタンへの溶出量はともに，D1, D2, T6, T7, T8が少なく，D3, D4, T1, T2, T3, T4, T5が多く同様の傾向を示した．内側にスチレン系樹脂がラミネートされている発泡ポリスチレン５検体の溶出量は多かった．乳製品類，業務用容器類，カップ麺類，使い捨て食器などの一回限りで使い捨てる容器類に比較して，くり返し使用する家庭用食器具類は残留量が多いにもかかわらず，溶出量は少ない傾向がみられた．n-ヘプタンへの溶出量が多かったことから，ダイマー，トリマー，モノマーの油脂及び脂肪性食品への溶出が推測された．

(本調査は食品環境指導センター食品機動監視班第４班の先行調査として実施したものである.)

文　献

1）河村葉子，杉本直樹，武田由比子，他：食衛誌，**39**, 110－119, 1998.
2）厚生省生活衛生局：食品衛生小六法，平成10年度版，984－1020, 1999，新日本法規出版，東京.
3）中澤裕之，井之上浩一，加藤嘉代子：フードケミカル，**1999-6**, 129－131, 1999.
4）環境庁リスク対策研究会：外因性内分泌攪乱物質問題に関する研究班中間報告書，67－88, 1997，環境新聞社，東京.
5）河村葉子，河村麻衣子，武田由比子，他：食衛誌，**39**, 199－205, 1998.
6）藤井正美，山木清史，茂木幸夫：総説食品用プラスチック，16－17, 1998，日本食品衛生協会，東京.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 215-219, 1999

台所用抗菌スポンジタワシ中のチアベンダゾールの分析

青柳陽子*, 田口信夫*, 大石充男*, 鈴木助治*

Determination of Thiabendazole for Antimicrobial Agent in Sponge Brushes Used as Kitchen Ware

YOKO AOYAGI*, NOBUO TAGUCHI*, MITSUO OISHI* and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：スポンジタワシ sponge brush, チアベンダゾール thiabendazole, 抗菌防臭抗カビ剤 antimycotic agent, 台所用品 kitchen ware

はじめに

近年，生活環境の多様化と清潔感にこだわる消費者の生活意識の変化，さらにO157，サルモネラ等の食中毒事件が多発したことなどから，「抗菌防臭加工」を表示した製品が数多く出回るようになった．これら表示のある製品は，衣食住に関連した日用品や家庭用品をはじめ電子部品，光学用機器等のプラスチックに至るまで広範囲にわたっている.特にスポンジタワシなどの台所用品や浴室用品は水周りで使用されることから，カビや細菌の増殖を押さえ，ぬめり，黒ずみ等の発生防止を目的に抗菌抗カビ加工が施されているものと思われる.しかし，これらの製品には抗菌防臭剤の物質名の表示のないものが多く，実際にどのような抗菌剤や防カビ剤等が使用されているか，その実態は不明である.

今回著者らは「抗菌防臭加工」の表示のある台所用品について抗菌抗カビ処理剤の分析を行ったところ，一部のスポンジタワシからチアベンダゾール（TBZ）が検出された．そこで，台所用品へのTBZの使用実態を明らかにすることを目的として高速液体クロマトグラフィーによるTBZの分析法を検討し，市販スポンジタワシ中のTBZの使用実態調査を行った.

実験方法

1．試　　料

都内で市販されていたスポンジタワシでいずれも抗菌加工表示のある国産品43試料を用いた.

2．試　　薬

1）TBZ標準品：和光純薬工業㈱製，食品添加物試験用，純度99.6%以上.

2）TBZ標準溶液：TBZ100mgを精密にはかり，メタノールに溶解して100mlとした．これを適宜50%メタノールで希釈して0.5，1.0，2.0，3.0，4.0及び5.0 μg/mlの濃度の標準溶液系列を調製した.

3）ラウリル硫酸ナトリウム（SDS）：関東化学㈱製，鹿一級.

その他の試薬は和光純薬工業㈱製，試薬特級品を使用した.

3．装　　置

1）高速液体クロマトグラフ（HPLC）：日本分光工業㈱製ポンプ（880-PU），蛍光検出器（821-FP），㈱島津製作所製データ処理装置（C-R6A）.

2）ガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）：㈱島津製作所製GC-17A及びGCMS-QP 5050.

3）フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）：PERKIN ELMER社製，Spectrum 2000型, ASI SensIR Technologies社製，DuraSamplIR）

4．試験溶液の調製

試料を細切し，その1gを300ml容の三角フラスコにとり，4%酢酸溶液を200ml加え，室温で1時間放置してTBZを抽出した．抽出液を適宜メタノールで希釈したものをメンブランフィルター（ポアサイズ　0.45 μm）でろ過し，ろ液を試験溶液とした.

5．定　　量

HPLC測定条件は中里等[1]の条件に従った．すなわち

カラム：Finepak SIL　C18（4.6mm i.d.×250mm, 5 μm日本分光工業㈱製），移動相：アセトニトリル・メタノール・水(40：25：35)混液に最終濃度が0.01mol/Lとなるようにを添加し，リン酸でpH2.5に調整した溶液，流速：1.0ml/分，カラム温度：室温，検出波長：

* 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 Metroporitan Research Laboratory of Public Health, 3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

Ex305nm, Em350nm, 注入量：20μl.

試験溶液について上記HPLC測定条件に従って測定し，TBZの濃度は標準溶液系列から得られた検量線より求めた.

6．確　　認

TBZを検出した試料は全てGC/MSにより，TBZの確認を行った.

GC/MS用試験溶液の調製

試料1gを25ml容共栓試験管にとり，メタノール20mlを加え，室温で1時間放置後軽く振り混ぜ，上清を適宜メタノールで希釈後メンブランフィルターでろ過したろ液をGC/MS用試験溶液とした.

GC/MS測定条件

カラム：DB-1（0.25mm i.d.×30m, 0.25μm, J&W Scientific社製），カラム温度（昇温プログラム）：40℃（1分）-20℃/分-180℃（0分）-10℃/分-280℃（10分），注入口温度：250℃，キャリアーガス：He（100kpa），注入量：1μl（スプリットレス），イオンモード：EI（70eV），検出法：SCAN.

7．材質の鑑別

試料を異なる材質と思われる層別に分離し，全反射吸収スペクトル法（ATR法）により赤外吸収スペクトルを測定した．得られたスペクトルと各種材質の合成樹脂標準品のスペクトルと比較することにより，試料の材質鑑別を行った.

FT-IR測定条件

測定方法：ATR法（ダイアモンドATR，1回反射），Resolution：4 cm^{-1}, Apodization：Strong, Ditecter：MIRTGS, Number of Scan：16, Scan Interval：1 cm^{-1}

結果及び考察

1．抗菌抗カビ剤の分析

「抗菌加工」の表示のあるスポンジタワシ43試料にメタノールを加えて1時間加熱還流して得られた抽出液について，サリチル酸，ソルビン酸，安息香酸，デヒドロ酢酸及びパラオキシ安息香酸エステル類（メチル，エチル，プロピル，イソプロピル，ブチル，イソブチル）を衛生試験法の液体クロマトグラフィー法により分析し[2]，ビフェニル，o-フェニルフェノール，TBZ及びイマザリルを中里等[1]の方法で分析した．その結果，10試料よりTBZが検出された．TBZ標準溶液及びスポンジタワシの試験溶液のクロマトグラムを図1に示した．しかし，TBZ以外の上記13化合物は検出されなかった.

2．TBZの分析法の検討

スポンジタワシからのTBZの分析方法について検討することとし，まず試料からのTBZの抽出条件について検討した．なお，試料はTBZの検出されたスポンジタワシを細切混合したものを使用した.

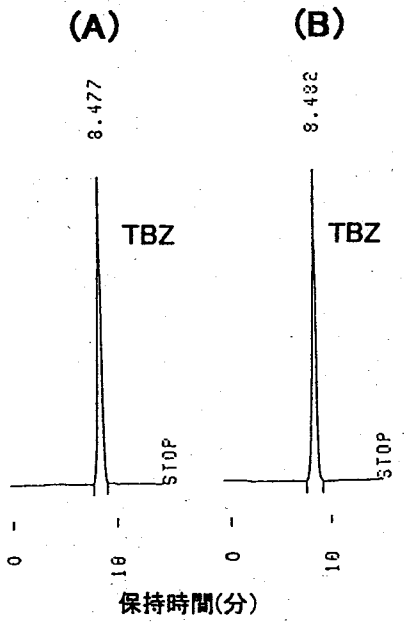


図1．標準溶液及び試験溶液の液体クロマトグラム
A：TBZ標準溶液(0.2μg/ml)，B：試験溶液(試料No.10)

(1)抽出操作の検討

TBZの抽出方法としては，雨宮等の繊維製品からメタノール溶液による還流法[3]，中里等の柑橘類の酢酸エチル溶液によるホモジナイズ抽出[4]，山嶋等の割り箸のメタノール溶液による振とう抽出[5]，観等の家庭用品のメタノール溶液による加熱還流法[6]等，様々な方法が行われている．今回は試料量1g，抽出溶媒をメタノールとし，(A) 加熱還流（溶媒量200ml，加熱温度80℃），(B) ソックスレー抽出（溶媒量150ml，加熱温度80℃），(C) 浸漬し静置（溶媒量200ml，室温）及び (D) 浸漬後5分おきに10秒間振とうし静置（溶媒量200ml，室温）の4方法で各々1時間抽出を行い，HPLCで抽出液のTBZ

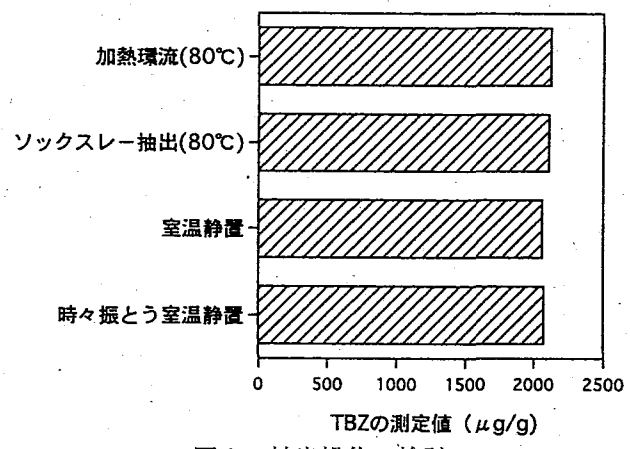


図2．抽出操作の検討
試料：No.10(1g)，溶媒：メタノール，抽出時間：1時間

量を測定した．その結果，図２に示したように，試料１g当たりのTBZ測定値にはほとんど差異が認められなかった．したがって，抽出操作は最も簡便な室温下に静置する方法で行うことにした．

(2)抽出溶媒及び抽出温度の検討

抽出溶媒として，n-ヘキサン，アセトン，アセトニトリル，エタノール，メタノール，酢酸エチル，水，４％酢酸溶液及び0.05mol/L 水酸化ナトリウム溶液を使用し，試料１gに各溶媒200mlを加えて浸漬し，室温下に１時間静置して得られた抽出液中のTBZ量を測定した．その結果，図３に示したようにエタノール，メタノール，酢酸エチル及び４％酢酸の４種類の溶媒でTBZ抽出量の高いことがわかった．

次に，これら４種類の溶媒を抽出溶媒とし，抽出温度を40℃又は60℃と変え，同様の抽出操作を行った．その結果，試料から抽出されるTBZ量は抽出温度に影響されず，室温で抽出した場合との差異は認められなかった．そこで抽出溶媒としては，環境への影響が少なく，操作がしやすい４％酢酸溶液を用い，室温で抽出することとした．

次に抽出溶媒として用いる酢酸溶液の酢酸濃度について検討した．すなわち，酢酸濃度を０～10%まで変えた酢酸溶液200mlを試料１gに加えて浸漬してTBZを測定した．その結果，図４に示したように，TBZ測定値は酢酸濃度が上昇するに従って増加し，酢酸濃度３％以上でほぼ一定の値となった．そこで，酢酸濃度は４％とすることとした．

(3)抽出時間の検討

抽出時間の検討を行った．試料１gに４％酢酸溶液200mlを加えて浸漬し，抽出溶液中のTBZを経時的に測定した．その結果，図５に示したように，TBZ測定値は，抽出開始直後から急速に上昇し，45分以後はほぼ一定となったので，スポンジタワシからの抽出時間は１時間とすることとした．

(4)試料採取量

一つのスポンジタワシでも部位によりTBZ含有量に差があることが考えられる．そこで試料採取量について検討した．図６に示したようにスポンジタワシ（試料No.10）を縦横に60分割してそれぞれの分割片を細切し，それぞれ0.1gについてTBZ量を測定した．その結果，TBZ測定値はスポンジタワシの部位により大きなバラツキを示し，983～2,520μg/g，平均1,893μg/g，変動係数(SD) 16% (n=60) であった．そこで無作為に試料10個

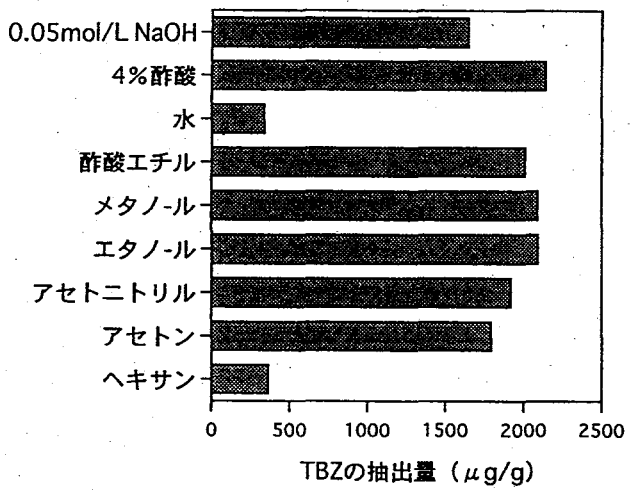


図３．抽出溶媒の検討
試料：No.10(1g)，抽出操作：室温静置

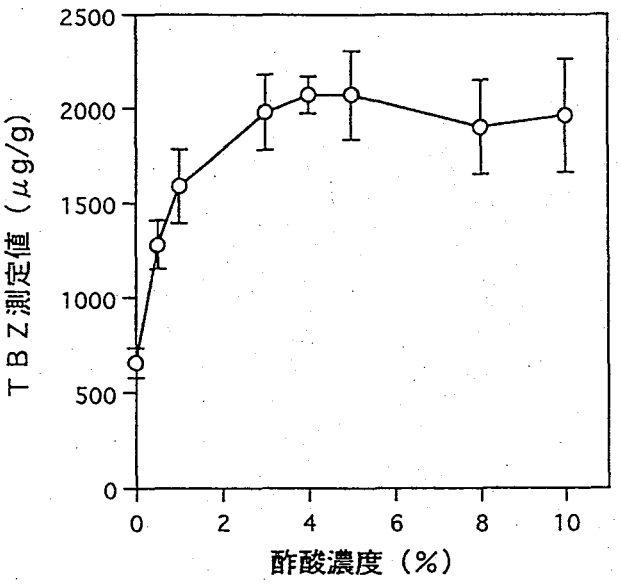


図４．酢酸濃度の検討
試料：No.10(1g)，抽出操作：室温静置
各値は平均値±標準偏差（n=5）

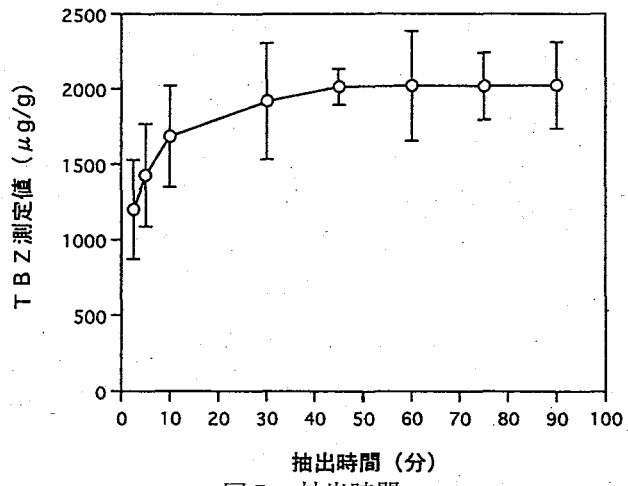


図５．抽出時間
試料：No.10(1g)，抽出操作：４％酢酸溶液で室温静置
各値は平均値±標準偏差（n=5）

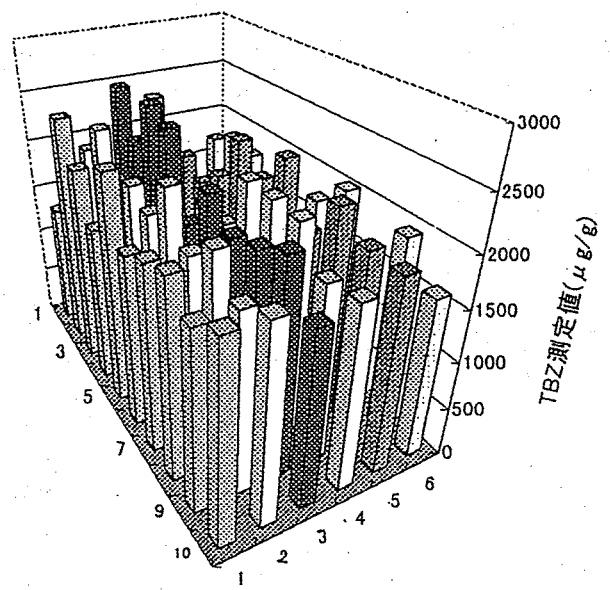


図６．縦，横に60分割したスポンジタワシ中のTBZ測定値
試料：No.10(0.1g)，抽出操作：４％酢酸溶液で室温静置

分を取って１gとし測定した結果，SDは５％（n=6）となり，バラツキは0.1gの場合の約1/3に減少した．したがって，試料採取量を１gとした．なお，本法の定量限界は，試料濃度として0.8μg/gであった．

３．市販品の調査結果

「抗菌防臭加工」の表示のある市販スポンジタワシ43試料について本法に従ってTBZの分析を行った．その結果，表１に示したように10試料（23%）から11～2,700μg/g，平均1,034μg/gのTBZが検出された．なお，TBZを検出したスポンジタワシはすべてTBZを添加している旨の表示は見られなかった．スポンジタワシは使用後に水分を多くふくんだまま放置されるため，カビが増殖する可能性が高く，これを防止する目的でTBZが使用されたものと思われる．

スポンジタワシの構造は柔らかい材質の層と比較的堅い材質の層の２ないし３層から成り立っているものが多い．そこで，これらの層がどのような材質からできているのかを鑑別し，各層毎のTBZ量との関係を調べた．表１に示したように，試料No.１～７及び10の8試料は２層目にTBZが712～3,300μg/gと多く，これらはいずれも材質がポリウレタンフォームやセルロースの柔らかい素材の層であった．試料No.２の３層目とNo.10の１層目においても材質がポリウレタンフォーム層であり，TBZが多く検出された．これに対してポリ塩化ビニリデン及びナイロンの堅い素材の層からはTBZはほとんど検出されなかった．また，柔らかい層の単位体積当たりの吸水量は，実験的に堅い層の10倍以上であった．以上の結果より，TBZはスポンジタワシの堅い層よりも高い吸水機能を有する柔らかいスポンジ部分に多く含有していることがわかった．

４．食器洗浄に使用したときのTBZ量の減少

スポンジタワシを食器洗浄などに使用した場合，添加されたTBZが溶出して減少する可能性がある．そこでTBZの検出されたスポンジタワシを実際に食器（陶器製の皿，直径20cm）洗いに使用したときのスポンジタワシ中TBZ残存量の変化を調べた．なお，洗浄方法は，（A）約20℃の流水で３分間洗浄する水洗浄，（B）約40℃のお湯を流したままで３分間洗浄するお湯洗浄，（C）台所用中性洗剤を用いて３分間約40℃のお湯を流したままで洗浄する洗剤洗浄の３つの方法で行い，全て手洗いで各々繰り返し洗浄を行った．スポンジタワシは各１回の洗浄毎に40℃で24時間乾燥後，本法でTBZ残存量を測定した．その結果，図７に示したように，スポンジタワシに添加されていたTBZ量は，１回の使用だけで（A）の水洗浄で使用前の50%減少し，（B），（C）ではさらに大きく60～70%減少した．スポンジタワシ中のTBZ残存量は，いずれの場合も洗浄使用を繰り返し行うことにより速やかに減少することがわかった．TBZは多くの

表１．TBZの検出した市販スポンジタワシの層別材料及びTBZ定量値

試料No.	スポンジタワシ全体	１層目		２層目		３層目		物質名表示
	TBZ（μg/g）	TBZ（μg/g）	材質[1)]	TBZ（μg/g）	材質[1)]	TBZ（μg/g）	材質[1)]	
1	418	0	PVDC	2,325	PUR	0	PVDC	−
2	2,710	58	PA	3,332	PUR	3,671	PUR	−
3	196	38	PA	712	CE	−	−	−
4	854	0	PVDC	1,090	PUR	−	−	−
5	718	14	PA	2,186	PUR	−	−	−
6	1,500	0	PA	2,817	PUR	−	−	−
7	1,640	0	PA	2,434	PUR	−	−	−
8	94	17	PA	0	PUR	0	PUR	ヒノキチオール
9	11	0	UP	2	PUR	−	−	−
10	2,200	883	PUR	2,600	PUR	2,286	PUR	−

1）PVDC(ポリ塩化ビニリデン)，PA(ナイロン)，UP(ポリエステル)，PUR(ポリウレタンフォーム)，CE(セルロース)

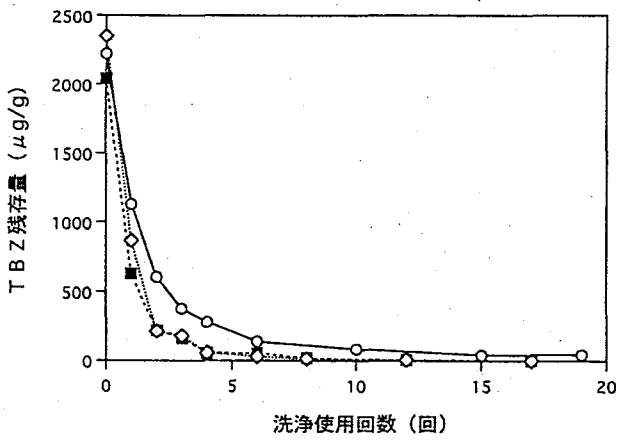


図7．洗浄使用によるスポンジタワシの中のTBZ残在量の変化

スポンジタワシ（試料No.10）で食器を3分間，流水洗浄することを洗浄使用1回とした．

—○— 水　　洗　　浄（約20℃），┈◇┈お湯洗浄（約40℃）

--■-- お湯＋洗剤洗浄（約40℃）

カビに対する最小発育阻止濃度が10μg/g程度といわれており[7)~9)]，洗浄使用時のTBZの急速な減少傾向を併せて考えると，抗カビ効果をできる限り長く保持させる目的で高濃度（表1）に付加したものと推察される．

まとめ

①抗菌・抗カビ加工された台所用スポンジタワシ中のTBZの簡易な分析方法を開発した．

②本法を用いて市販の抗菌抗かび加工表示のあるスポンジタワシを対象に，その使用実態調査を行った．その結果，43試料中10試料より，11～2,700μg/g（平均1,034μg/g）のTBZが検出された．これらはいずれもTBZを添加している旨の表示は見られなかった．また，スポンジタワシは2～3層の異なる材質のスポンジで構成された物が多いが，その層毎にTBZ含有量に大きな差のあることもわかった．

③スポンジタワシを食器洗浄に使用して残存するTBZ量の変化をみたところ，洗浄使用によりスポンジタワシ中のTBZは急激に減少することがわかった．

文　献

1）中里光男，斉藤和夫，菊地洋子他：衛生化学，**34**，401-407，1988.

2）衛生試験法・注解・追補，1525-1527，1990，金原出版㈱，東京．

3）雨宮敬，酒井正美，森謙一郎他：東京衛研年報，**35**，133-137，1984.

4）中里光男，只野敬子，小川仁志他：衛生化学，**41**，392-397，1995.

5）山嶋裕季子，田口信夫，斉藤和夫他：東京衛研年報，**47**，164-168，1996.

6）観照雄，岩崎由美子，山野辺秀夫他：東京衛研年報，**47**，53-56，1996.

7）日本防菌黴学会編，防菌防黴ハンドブック，413，1986，技報出版，東京．

8）冨岡敏一，荒川正澄，西野敦：抗菌剤の科学　パート(1)，(2)，124-147，1996，工業調査会，東京．

9）内堀毅：抗菌抗カビ技術と応用，29-41，1996，シーエムシー，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 220-228, 1999

Petrifilm™ Test Kit-HEC をスクリーニングに応用した食肉からの大腸菌O157：H7の検査法

石崎直人，金子誠二，宮崎奉之

Detection of *Escherichia coli* O157 from Meat using Petrifilm™ Test Kit-HEC for Screening

NAOTO, ISHIZAKI, SEIJI KANEKO, TOMOYUKI MIYAZAKI

The Petrifilm™ Test Kit-HEC (PF method) was evaluated for the screening in inoculated minced beef of *E. coli* O157:H7 and applied to commercial meat. The PF method was based on enzyme immunoassay for detection of *E. coli* O157:H7 in food.

1. The PF method permitted detection of *E. coli* O157:H7 inoculated into minced beef (10^0cfu per 10g) after incubation with mEC broth containg novobiocin at 40℃, 24h.

2. A total of 227 samples of naturally contaminated commercial meat were analysed. Fourteen of these samples were positive by the PF method, and isolated strains were agglutinated with O157 antiserum from 5 samples, and one strain was conserved *VT* gene and produced VT.

3. The result was a reduced analysis time, and the PF method improved to detect *E. coli* O157:H7 inoculated into minced beef (10^0cfu per 10g) after incubation with mEC broth containing novobiocin at 40℃, 4h.

4. In the case of the PF method gave a positive result, *E. coli* O157:H7 was effectively picked up from the EC plate directly.

These results recoginized that the PF method could screen and detect the naturally contaminated meat with *E. coli* O157:H7 rapidly.

Keywords：Petrifilm™ Test Kit-HEC *E. coli* O157 検出用ペトリフィルム，酵素抗体法 Enzyme Immuno Assay，大腸菌O157：H7 *Escherichia coli* O157：H7，食肉 Meat

緒　　言

大腸菌O157：H7は病原大腸菌の分類のうち，腸管出血性大腸菌感染症の原因菌である腸管出血性大腸菌（Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*：EHEC）に属している．本菌はベロ毒素（Vero cytotoxin：VT）を産生し，感染した患者に対して出血性大腸炎等典型的な症状を引き起こす．乳幼児や老人および基礎疾患を有するヒトでは，溶血性尿毒症症候群を併発し死に至る場合もある．

本菌による感染症は1996年５月に岡山県邑久町で，７月には大阪府堺市で大規模な事件となり，その後も全国各地で猛威を振るった．その後この様な大規模感染事件数は発生していないが，検査体制の整備や社会全体の関心の高まりにより，1998年においても本菌の感染により散発例を中心に有症保菌者1,455人，無症保菌者712人，入院患者数706人，死亡者数4人が報告されている[1]．しかし，これらの事例で，原因食品や感染源が明確に特定された例は数えるほどであった．今までの疫学調査から，牛挽肉やローストビーフ等の牛肉を使用した食品が強く関与していることが明らかにされており，その汚染源として牛が示唆されている[2~4]．

従来から，食品や環境中の大腸菌O157：H7の疫学調査は培養法で行っていた．しかし，効率のよい増菌培地

＊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

や分離培地が開発されなかったため，分離培地上に大腸菌O157：H7に類似した多くの集落が出現し，最終的な同定に多くの時間と労力が必要とされてきた．

現在，分離・同定に伴う時間と労力を節約する目的で，大腸菌O157：H7に汚染された食品を迅速に特定するための簡易キットが多数開発され市販されている．酵素抗体法（EIA法）を利用したキットではPetrifilm™ Test Kit-HEC，mini VIDAS bio Merieux，Path Stik E. coli O157，NOW E. coli O157:H7 TestおよびEHEC-TEK ELISA test systemなどがあり，PCR法を用いたキットではBAX™ スクリーニングなどが挙げられる．これらの中で，最も多く使用されているのはEIA法を応用したキットである．これらの簡易キットのうち，われわれはPetrifilm™ Test Kit-HEC（3M社　米国，発売元：スリーエムヘルスケアー株式会社）を市販牛挽肉の大腸菌O157：H7検査に適用することにより，スクリーニング法として大腸菌O157：H7の汚染が疑われる食肉を迅速に特定することが可能か実験的に検討するとともに市販食肉に応用した．

材料および方法

1．供試菌株

供試菌株は患者由来の大腸菌O157：H7 E90131株(VT1&VT2)および牛肉由来の159-2株(VT1 & VT2vp)，EH101-6株（VT2vp）の計3株である．

2．供試食肉

供試食肉は市販の牛肉100件，豚肉73件，鶏肉49件および牛豚合挽肉5件の計227件である．

3．使用培地

本実験で使用した培地は，選択増菌培地としてノボビオシン加mEC broth（栄研化学），分離培地としてCT加SMAC寒天培地（日水製薬）およびBCM O157寒天培地を用いた．確認性状試験は，シモンズクエン酸ナトリウム培地，チトクローム・オキシダーゼ試験紙，TSI寒天培地，LIM培地，CLIG培地およびVP半流動培地を用い，分離菌株の凝集試験はO157抗血清およびH7抗血清（デンカ生研）を用いた．供試菌株の10倍階段希釈液はBrain Heart Infusion broth（BHI：Difco）で37℃，24h培養後，ペプトン食塩緩衝液で調整した．

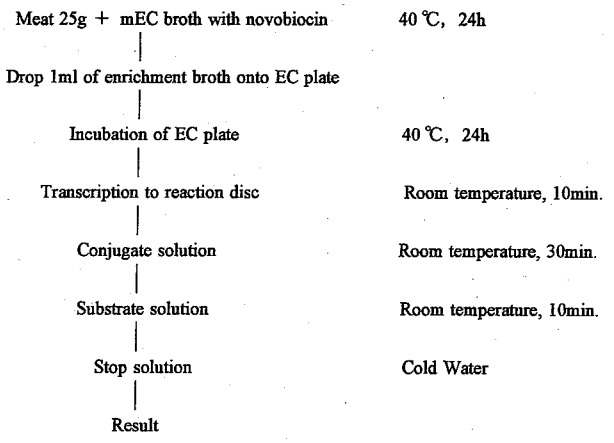


Fig. 1. Schematic Procedure of Petrifilm™ Test Kit-HEC Method

4．Petrifilm™ Test Kit-HEC（PF法）の操作手順

PF法の操作手順をFig.1に示した．まず食肉25gにノボビオシン加mEC brothを225ml加え40℃，24時間増菌培養した．次に，この増菌培養液1mlをECプレートに滴下して拡散させた後40℃，24時間培養した．

ECプレートはβ-Glucuronidaseに特異的に反応する合成酵素基質を添加したviolet red bile agarを基礎としている[4,5]．Fig. 2-1Bに示すように，大腸菌O157：H7はβ-Glucuronidase陰性のため気泡を伴う赤色のコロニーを形成し，その他の大腸菌は気泡を伴う青色のコロニーを形成した（Fig. 2-1A）．

培養後，ECプレートの上部フィルムを静かに持ち上げ，ピンセットを用いて大腸菌O157抗体がコートされている反応ディスクをくぼみの部分に気泡が入らないように置き，10分間抗原を転写させた．その後，上部フィルムを持ち上げ，反応ディスクをゲル部から取り除き，ビーカーに入れ洗浄液で3回洗浄操作を行った．次に，このビーカーの中に酵素抗体複合体溶液を4 ml添加し30分間室温で反応後，同様に洗浄操作を3回行った．最後に，基質溶液を2 ml添加し室温で15分間反応後，冷水を添加し反応を終了させた．大腸菌O157:H7が増菌培養液中に存在する場合は，Fig.2-2Bに示したように反応ディスクと反応し灰色または黒色のスポットを形成し陽性と判定した．大腸菌O157：H7が存在しない場合はFig.2-2Aのように全くスポットが確認されなかった．

5．PF法陽性検体の増菌培養液およびECプレートからの大腸菌O157:H7の分離

PF法で陽性と判定した場合の，大腸菌O157：H7の確認手順をFig.3に示した．まず増菌培養液1mlから免疫磁気ビーズで集菌し，CT加SMAC寒天培地およびBCM O157寒天培地を用いて分離培養を行った．分離培地上に発育した疑わしいコロニーについて，一次確認性状試験のオキシダーゼ試験およびクエン酸塩利用能試験を行い，各性状が陰性の場合O157抗血清でスライド凝集試験を行った．凝集を示した分離株についてPCR法とRPLA法（デンカ生研）を用いてVT遺伝子とVT産生性

を確認した後に，H7抗血清による試験管凝集試験および二次確認性状試験を実施した．

ECプレートからの検出は，反応ディスク上の陽性スポットに対応するECプレート上の疑わしい集落から直接釣菌しCT加SMAC寒天培地およびBCM O157寒天培地に塗抹して，分離操作を行った．

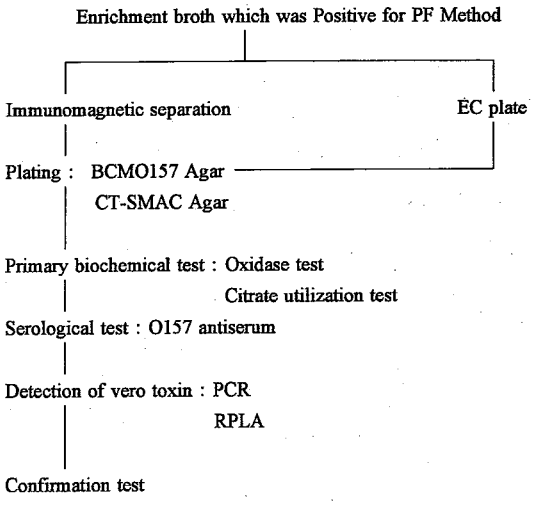


Fig. 3. Procedure for the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Petrifilm™ Test Kit-HEC Positive Samples

6．免疫磁気ビーズ法の操作手順

免疫磁気ビーズ法は対象とする微生物に対する抗体を磁気ビーズの表面にコート処理し，マグネットにより補足する濃縮法である．PF法で陽性と判定された検体の増菌培養液1mlに大腸菌O157抗体がコート処理されたビーズ（Dynal社）20μlを添加し，10分間混和した．その後，マグネットMPC-Mでビーズを吸着し3分間放置後上清を取り除き，これを洗浄液1mlで3回洗浄した．最後に，集菌されたビーズを100μlの洗浄液で浮遊し，CT加SMAC寒天培地およびBCM O157寒天培地で分離操作を行った．

7．PCR法の条件およびアガロースゲル電気永動

PCR法で使用したプライマーはKarchら[6]が報告したVT遺伝子の225bpを増幅するMK-1/2およびTAKARAのVT遺伝子検出用プライマーEVT1/2（VT1型，404bp），EVS1/2（VT2型，349bp）である．

PCR反応は，反応液23μlに鋳型DNAを2μl加えて混合後，94°Cで1分間，55°Cで1分間，72°Cで1分間反応させた．この1連の過程を1サイクルとし30回繰り返した．

PCR産物の確認はTBE buffer(89mM Tris-HCl，89mM Borric Acid，2mM EDTA(pH8.0)）に2％に溶解したアガロースゲル（Nusieve 3：1 Agarose）を作製して，ミニゲル電気泳動システム（Mupid-2）を用いた電気泳動法で行った．電気泳動用緩衝液にはTBE bufferを用い，100Vで約1時間泳動後，ゲルを0.5μg/mlのエチジウムブロマイド溶液に侵して15分間染色し，紫外線照射下で観察し写真撮影を行った．

8．大腸菌ベロトキシン検出用キット操作手順（RPLA）

RPLA法は，O157抗血清に凝集を示しPCR法陽性の菌株について実施した．分離菌株をCA-YE（Casamino Acid Yeast Extract）培地に接種し37℃，18～24時間振とう培養し，その培養液を3,000rpmで30分間遠心し上清を検査対象とした．この上清を2倍階段希釈し，1：2～1：128の希釈系列を1検体につき3系列作製した．各系列にそれぞれ感作ラテックスVT1，感作ラテックスVT2および対照ラテックスを滴下し，ミキサーで振とうし室温に18～20時間静置後，対照ラテックスでは凝集せず，感作ラテックスにのみ凝集が認められた場合陽性と判定した．

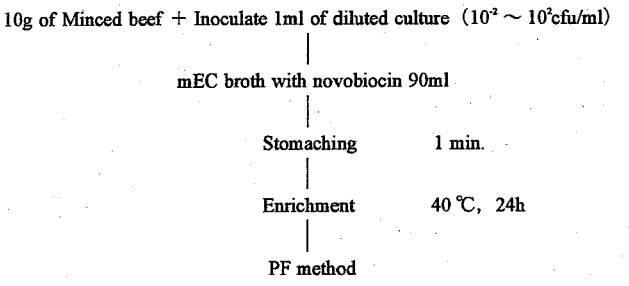


Fig. 4. Procedure for the Detection *Escherichia coli* O157: H7 from artificially Contaminated Minced Beef Using Petrifilm™ Test Kit-HEC Method

成　　績

1．大腸菌O157:H7接種牛挽肉からのPF法による検出

牛挽肉中における大腸菌O157：H7の汚染菌量がどの程度であれば，増菌培養後PF法で検出が可能となるかについてFig.4に示した方法で検討した．大腸菌O157：H7が存在しないことを確認した市販牛挽肉10gに階段希釈した供試菌株3株の各培養液1ml（10^{-2}～10^{2}cfu）を接種した．これに，90mlのノボビオシン加mEC brothを加えストマッキング後40℃，24時間増菌培養し，各増菌培養液についてPF法を実施した．E90131，159-2およびEH101-6の3菌株とも，牛挽肉10g当たり数個の菌が存在すれば陽性となった（Table 1）．しかし，これ以下の菌数では必ずしも陽性となるとは限らなかった．

Table 1. Recovery of *Escherichia* coli O157：H7 from artificially Contaminated Minced Beef Using Petrifilm™ Test Kit-HEC Method

Strain	Number of bacterial cells in 10g of minced beef				
	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2}
E90131	−	+	+	+	+
159-2	−	−	+	+	+
EH101-6	−	+	+	+	+

2．PF法を用いた市販食肉のスクリーニングおよび大腸菌O157:H7の分離件数

市販食肉を対象としたスクリーニングを牛肉100件，豚肉73件，鶏肉49件および牛豚合挽肉５件の計227件に実施した（Table 2）．この結果，牛肉６件，豚肉7件および鶏肉1件の計14件が反応ディスクにスポットを形成し陽性と判定された．これらのPF法陽性検体について分離を試みたところ，牛肉２件および豚肉３件の計５件からO157抗血清に凝集を示す菌株が分離された．これら5株について，PCR法によるVT遺伝子保有の確認とRPLA法によるVT産生性試験を実施したところ，牛肉から分離した1株がVT遺伝子を保有しており，また，VT毒素の産生も確認できた．この分離菌株は，PCR法ではMK-1/2プライマー使用時に227bp(VT1)，224bp(VT2)のDNAが，TAKARAのプライマーEVT1/2およびEVS1/2ではそれぞれ404bp(VT1)，349bp(VT2)のDNAの増幅が確認できた．RPLA法の結果は，感作ラテックスVT1に対して1：64希釈まで凝集を示したが，感作ラテックスVT2では凝集を示さなかった．以上の結果から，本株はVT1，VT2 variant産生株であることが確認できた．他の4株はいずれもVT非産生のO157：H－であった．

Table 2. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Using Petrifilm™ Test Kit-HEC Method and Isolation of *Esherichia coli* O157:H7 in Naturally Contaminated Commercial Meat

Specimens	Number of samples	Number of positive		
		PF method	O157[1]	EHEC[2]
Beef	100	6	2	1
Pork	73	7	3	0
Chicken	49	1	0	0
Mixture of beef and pork	5	0	0	0
Total	227	14	5	1

1) Agglutination against O157 antiserum
2) Positive of PCR and RPLA

3．PF法に移行するまでの増菌培養時間の検討

PF法は他のEIA法に比べて操作時間が１日間多く必要となる．そこで，操作時間を短縮するために，増菌培養を少なくとも何時間行えばPF法で陽性と判定できるかについて更に検討を加えた．１で述べた同様の方法で，牛挽肉に菌液を接種し０，４，８および16時間培養後PF法を実施した．培養直後にPF法を実施した場合では，3菌株ともに食肉10g当たり10^{1}cfu以上接種した場合に反応ディスク上にスポットが数個認められ陽性と判定された．４時間以上の増菌培養を行うと，牛挽肉10g当たり数個の菌量でも陽性と判定されるようになった．しかし，それ以下の菌数では菌株によって異なるが，培養時間が長くても陽性とは判定されなかった（Table 3）．

Table 3. Relationship Between Incubation Time and Positive Results of Petrifilm™ Test Kit-HEC Method

Strain	Incubation time	Number of bacterial cells in 10g of minced beef				
	(h)	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2}
E90131	0	−	−	−	+	+
	4	−	−	+	+	+
	8	−	−	+	+	+
	16	−	+	+	+	+
159-2	0	−	−	−	+	+
	4	−	−	+	+	+
	8	−	−	+	+	+
	16	−	−	+	+	+
EH101-6	0	−	−	−	+	+
	4	−	−	+	+	+
	8	−	−	+	+	+
	16	−	+	+	+	+

考　察

PF法を食肉の大腸菌O157：H7のスクリーニングに応用したところ，スクリーニング法として十分使用できることが実験的にも実際の食肉を用いても確認された．さらに，増菌培養時間を6時間程度としてPF法を実施することにより，迅速かつ確実に大腸菌O157：H7汚染食肉が特定できると考えられた．

大腸菌O157：H7の感染源として牛などの家畜が早期から重要視されており，保菌状況を調査した報告も多い．米国では0.28～6.8%[7]，ドイツでは0.83～10.6%[8,9]，英国では1.0～15.7%[10,11]分離されている．また，牛以外の家畜では羊からも2.2%～4.1%分離されたと報告されている[9,10]．日本における汚染実態調査でも牛から0.2%～3.4%分離されている．牛のと畜場での解体時における二次汚染が原因と考えられる食肉からの本菌の分離例も報告されているため，農場・食肉処理場・消費者へ届く

までの流通の各段階において高い衛生管理が必要とされる．

これらの調査および食中毒発生時における感染源，原因食品，感染経路の究明には多大な時間と労力が必要とされてきた．迅速かつ的確に処理することにより，汚染された食肉の市場への流出を防止することができるため，迅速法の導入が有効と考えられる．厚生省は平成9年7月4日に，腸管出血性大腸菌O157：H7の汚染実態調査の実施依頼を通達し，同時に検査法も示した[12]．しかし，ここで示した食品からの腸管出血性大腸菌O157：H7の検査法は，従来の方法と同様にかなりの労力を要したため，精度の高い簡易キットによる検査時間の短縮および労力の削減を検討する必要があり，今回PF法の導入を検討した．

3M社により開発されたPF法は，ECプレート上に発育した大腸菌O157：H7を大腸菌O157抗体がコートされている反応ディスクで補足するサンドイッチEIA法であり，USDA/FSIS検査法としても採用されている．従来のEIA法と比較すると洗浄操作は同様に必要だが，判定が肉眼で可能であり，比色計など特別な機器類を必要としない簡易なキットである．

これまでに市販された，大腸菌O157：H7検出用キットの大部分はポリクローナル抗体を使用してることから，特異性の点で問題視されており，類属反応を示す菌種として*Escherichia hermanii, Yersinia enterocolitica* O9, *Salmonella* group N, *Brucella abortus*等が挙げらている[13-16]．PF法もポリクローナル抗体を用いているが，Okrendら[17]による調査では，類属反応は*Salmonella* group Nだけであった．今回のPF法によるスクリーニングでも，227件中陽性検体が15件で，そのうち類属反応が9件にしか認められずPowerら[18]の報告と同様に類属反応は低く特異性が高いと考えられた．

大腸菌O157：H7を接種した牛挽肉からのPF法による検出では，牛挽肉10g当たり数個の場合でも24時間の増菌培養により陽性と判定でき，他の報告と同様に良好な結果が得られた[19,20]．

他のEIAキットは2日目には判定が可能であるが，PF法はECプレートによる培養操作が必要なため判定に3日を必要とする．そこで判定までの操作時間を短縮するために，ノボビオシン加mEC brothによる増菌培養時間を検討した．その結果，食肉中の菌量が10g当り数個でも4時間の増菌培養で陽性を示し，他のキットと同様の迅速性が確認できた．今回検討はしなかったが，増菌培養後に免疫磁気ビーズ法を行い，PF法へ移行することによりさらに操作時間を短縮できると考えた．

今回データは示さなかったが，PF法の検出感度は10^0cfuであり他社のEIAキットは10^4～10^7cfuで陽性となることから極めて感度の高いキットであると考えられた．この検出感度の高さから，選択増菌培養を省き，操作時間を短縮した検討が報告されている[5]．しかし，増菌培養時間を検討した実験からは，大腸菌O157：H7接種時においては，牛挽肉10g当たり10^1cfuでなければ陽性と判定できなかった．実際の食品中における大腸菌O157：H7の汚染菌量は極めて少量であり，また，冷凍や冷蔵時の損傷および他の夾雑菌の存在により，直接ECプレートで培養し検出することは困難であり，選択増菌培養は省略出来ないと考えられた．

従来のEIAキットは判定後に，増菌培養液から大腸菌O157:H7を分離しなければならない．しかし，PF法は反応ディスク上のスポットに対応したECプレート上に発育した大腸菌O157：H7を直接釣菌し分離することが可能であるという他のキットにはない利点が認められた．

以上のことから，PF法は大腸菌O157：H7に汚染された食肉のスクリーニング検査のみならず，食中毒発生時における感染源，原因食品の究明および感染経路の究明などにも応用することにより，汚染源や原因食品の特定が可能であると考えられた．

文　献

1）食品衛生研究，**49**(6), 111-116, 1999.

2）甲斐明美，尾畑浩魅，伊藤　武，他：臨床と微生物，**23**, 827-834, 1996.

3）Chapman,P.A., Siddons,C.A., Wright,D.J., *et al.*：*Epidemiol. Infect.*, **111**, 439-447, 1993.

4）Matner, R.R., Fox, T. L., Mciver, D. E., *et al.*：*J. Food Prot.*, **53**(2), 145-150, 1990.

5）Calicchia,M.L., Reger, J.D., Wang, I.N., *et al.*：*J. Food Prot.*, **57**(10), 859-864, 1994.

6）Karch, H., Meyer.T.：*J. Clin. Microbiol.*, **27**(12), 2751-2757, 1989.

7）Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., *et al.*：*Epidemiol. Infect.*, **113**(2), 199-207, 1994.

8）Richards,M.S., Corkish, J.D., Sayers, A.R., *et al.*：*Epidemiol. Infect.*, **120**(2), 187-192, 1998.

9）Heuvelink, A.E., van den Biggelaar, F.L., de Boer, E., *et al.*：*J. Clin. Microbiol.*, **36**(4), 878-882, 1998.

10）Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, D.J., *et al.*：*Epidemiol. Infect.*, **111**(3), 439-447, 1993.

11）Chapman, P.A., Siddons, C.A., Gerdan, M.A.T., *et al.*

: *Epidemiol. Infect.*, **119**(2), 245-250, 1997.

12) 厚生省生活衛生局食品保健・乳肉衛生課長連名通知,「腸管出血性大腸菌O157の検査法について平成9年7月4日」

13) Dodds,K.L., Perry, M.B. and McDonald, I.J.: *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2679-2687, 1987.

14) Perry,M.B., Bundle, D.R. and MacLean, L., *et al.*: *Carbohydr. Res.*, **156**, 107-122, 1986.

15) Perry, M.B., Bundle, D.R.: *Infect. Immun.*, **58**, 1391-1395, 1990.

16) Todd, E.C.D., Szabo, R.A., Peterkin, P., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(10), 2536-2540, 1988.

17) Okrend, A.J.G., Rose, B.E. and Matner, R.: *J. Food Prot.*, **53**(11), 936-940, 1990.

18) Power, C.A., McEwen, S.A., Johnson, R.P., *et al.*: *J. Food Prot.*, **61**(4), 402-408, 1998.

19) Woody, J.M., Stevenson, J.A., Wilson, R.A., *et al.*: *J. Food Prot.*, **61**(1),, 110-112, 1998.

20) Bennett, A.R., MacPhee, S. and Betts, R.P.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**(6), 375-379, 1995.

(本研究の概要は日本食品衛生学会第73回学術講演会1997年5月で発表した.)

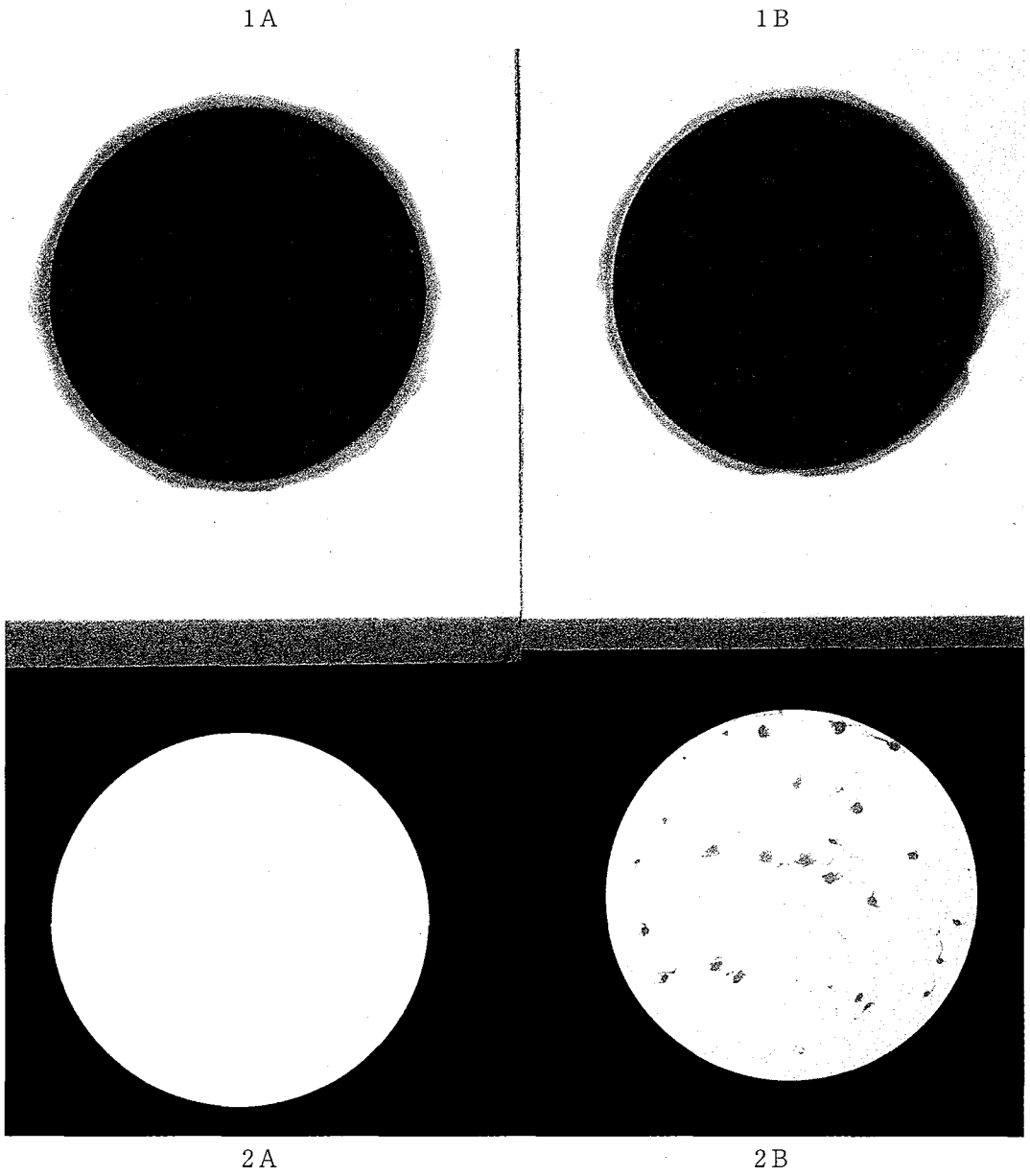


Fig. 1. Results of *Escherichia coli* Growth on EC Plate(1A～1B) and Reaction Disc(2A～2B)

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 229-232, 1999

＜資料＞ 生物農薬の１つであるBacillus thuringiensis（Bt菌）の飲用茶類中での残留（汚染）実態の検討（Ⅰ）

庭 山 邦 子

A Survey of Residues (Contamination) of Bacillus thuringiensis (Bt), a Microbial Pesticide, in Tea and blend Tea (I)

KUNIKO NIWAYAMA

Keywords：微生物農薬 Microbial Pesticides，バチルス チュリンギエンシス *Bacillus thuringiensis*，バチルス チュリンギエンシス クースタキ *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*，茶及び混合茶 Tea and blend Tea

はじめに

輸入食品の種類の増加，及び国民の健康志向の高まりで，日常的に飲用される茶類に加えて健康茶，減肥茶等々と名付けられた茶類商品の販売，輸入が増加し国民が身近に利用出来るようになってきている．

一方，化学農薬の使用はその残留性，人畜への有害性から使用が差し控えられる傾向となってきている現在，直接人畜に危害が無く，残留性が無いとして天敵微生物が使用されるようになった．欧米ではすでに使用されていたが，日本でも1981年（昭和56年）から*Bacillus thuringiensis*（以下，Bt菌と略す．）の製剤が販売され，使用されてきている．

飲用茶類の原料となる植物が直接，あるいは自然界において間接にＢＴ剤の影響を受けている可能性は国内のみならず輸入原料でも否定できず，それらについての残留（汚染）の有無については全く調査されていない．

ＢＴ剤が人畜に無害と現在はされているが，人体への影響が皆無とするには不明の点が多い[1]．よって，摂取する前に洗浄や，加熱調理する事が無く，また長期に飲用する可能性のある茶類を安心して食品として利用することの出来るように，今回，市販の飲用茶類53品目55検体についてＢＴ菌の残留（汚染）について検討を行った．

実験材料および方法

1）検体

検体とした飲用茶類は都内の主として，新宿，東京，有楽町，渋谷，大久保，秋葉原各駅周辺，及び銀座の7か所の薬局・薬店で購入した53品目55検体を用いた．

2）使用菌株

Bacillus thuringiennsis serovar *kurstaki*（B. t. k と略す．）のパイロット株及び *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*（B. t. a と略す．）を用いた．

3）検出方法

市販品からのBt菌の検出は，表示してある飲用方法のうち手軽に利用できる方法を主として用いた．

a． テイーバッグ１包を滅菌ビーカーに入れ，熱湯200ml～300mlを加え3～5分間抽出し，その抽出液を硫酸ポリミキシンＢ添加の卵黄加MYP（Mannitol Yeast-extract Phenol-red agar）寒天及び普通寒天平板へ各1.0ml塗抹し，コンラージ棒で接種後，37℃，20時間培養した．その他，「煮出す」表示のみの市販品は，１lの熱湯にテイーバッグあるいは所定の用量の茶類を入れ5分間以上煮出し，同じく煮出し液各1.0mlを2種類の平板に培養した．

b． 37℃，20時間培養後，卵黄反応陽性のコロニーを芽胞形成培地に接種した．３～４日後，菌をスライドグラスに塗抹し，殺虫性結晶毒素の産生をBuffalo Black染色法に準じ，1.5% Buffalo Black 染色液で染色・水洗し，ついで0.5%サフラニン溶液で染色した．水洗後鏡検し，判定した．

4）免疫血清の作成[2]

a．B. T. k の鞭毛(H)抗原の作成：Craigie管の入っ

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

た半流動寒天培地を通過した運動性の良好な，2代以上継代培養した菌を肉エキスブイヨンに接種し，30℃，18時間緩く振とう培養した．その後，ホルマリンを0.3%の濃度となるように加え一夜静置し，処理した死菌液を3,000rpm，10分間遠心分離した．下層部分を滅菌生理食塩水で2回洗浄し，生理食塩水で再浮遊させ，抗血清作成用死菌液とした．

b．免疫方法

鞭毛（H）血清の作成：　前記で準備した菌液を約3.0kgの家兎に4~5日間隔で0.5ml，1.0ml，2.0ml，3.0ml耳静脈投与し，最終投与から1週間後に全採血を行った．得られた血清は56℃，30分間非働化した．

c．耐熱性菌体（O）抗原の作成：B. T. k 菌の2代以上継代培養した菌液を普通寒天平板に接種し，37℃，1夜培養後，滅菌生理食塩水で集菌し，100℃，2時間加熱処理し，3,000rpm，10分間遠心分離する．上清を除き，生理食塩水で2回洗浄後，遠心分離し沈殿物を抗原として用いた．

5）吸収試験

抗H血清1.0mlを前記O抗原に加え，生理食塩水を4.0ml加え，混和する（血清は5倍希釈となる）．37℃，1時間反応後遠心分離し，この吸収操作を2回行った．
上層の血清部分はO抗原との凝集が生じなくなった．

6）因子血清の作成

B. t. a.の鞭毛抗原は，運動性良好な菌を2代以上継代培養し，M broth（Difco）に接種し，37℃，6時間培養後，ホルマリン処理する．死菌液を生理食塩水で洗浄，遠心分離し，下層の沈殿した死菌部分を得た．これに，前記のO抗原を吸収したB. t. kの抗H血清1.0mlを入れ，生理食塩水1.0mlを加え（抗血清は10倍希釈となる），混和する．一夜静置後遠心分離し，のせガラス凝集反応でB. t. a菌のH抗原と凝集が認められなくなるまで，吸収を繰り返した．

結果及び考察

1．検討を行った55検体から卵黄反応陽性を示した菌株を分離し，Buffalo Black　染色を行ったところ，16検体（29%）から分離した株に殺虫性結晶毒素の産生が観察された．（表）

2．16検体からの分離株を半流動寒天培地中のCraigie管に通過させ，運動性の良好な菌をM brothで培養後，新鮮な菌液を用い因子血清とのせガラス凝集反応及び試験管凝集反応を行ったが，自発凝集が生じた菌株も見られた．

3．*B. thuringiensis*の分類には鞭毛（H）抗原の血清学的型別法が最も容易で特異的な方法とされている[3]．*B. t.* serovar *kurstaki* のH抗原の血清型は3，亜血清型は3a3bであり，同じ血清型の*B.t.* serovar *alesti*の亜血清型は3aであることから，B. t. k.のパイロット株の抗H血清の凝集素価は，O抗原で吸収前，及び吸収後共に12,800倍以上の凝集が認められたが，B. t. aのH抗原を吸収させた後の因子(3b)血清の凝集素価は1600倍であった．この因子血清とB. t. a　のH抗原との間に凝集は認められなかった．

4．殺虫性結晶毒素産生株をB. t. k　因子血清でのせガラス凝集反応及び試験管凝集反応を行った．　自発凝集の見られたものは，大庭の方法[2]に従い，のせガラス凝集を150倍で鏡検し，凝集の有無，運動の活発さを調べた．

16検体すべてから結晶毒素産生株が分離され，そのうち11検体からの分離株はB. t. kの因子血清で凝集が認められた．残り5検体についてはさらに慎重な検討が必要と思われる．今回は16検体からB. t.菌が分離されたが，検出方法の確立により飲用茶類中のＢｔ菌の陽性数がさらに増加することが考えられ，現在引き続き検討を加えている．

現在の日本においては食糧不足は感じられないが，世界全体では人口の増加や気候の不順等により食糧不足は解決されていない．食糧の増産に,化学農薬が使用されてきたが，農産物の輸出入の際に世界各国共に厳しい規制を行ってきているため，安易に農薬の使用量を増し増産しても食糧として流通過程から外され，あるいは使用者の健康にも影響を及ぼすため，その使用は特に先進国において減少傾向となってきている．化学農薬に代わるものとして，天敵生物の使用が幅広く研究され，実用化が進められてきている．Bt菌については，その害虫抵抗性遺伝子を植物の体内に組み込む操作法をすでに実用化しているが，最近の報告では遺伝子操作された植物の体内で作られたBt毒素が害虫でない昆虫の生命及び成長にも影響を及ぼすことがわかり[4]，環境及び生態系への影響も懸念が強まってきている．日本においては遺伝子を組み換えた大豆，トウモロコシ等22品種の輸入量は多いが，栽培に関しては組み換えた種子の輸入を現在のところ禁止している．そのような中で，ＢＴ剤は果樹，街路樹，アブラナ科野菜，茶，タバコ，それに花卉等に利用されてきている．ＢＴ剤は微生物農薬の代表的なものであり，世界各国で使用されていることから[5]，今回検討した飲用茶類の原材料は日本に限らず，商品に表示されている原産国やその他の国から輸入された材料を加

表：検体の表示及びBt菌の検出結果

検体番号	名称	原材料数	原産地	Bt菌の検出
1	健康茶	4 (種類)	中華人民共和国	+
2	野草混合茶	6	表示なし	+
3	健康茶	10	表示なし	+
4	野草混合茶	5	表示なし	+
5	野草混合茶	13	日本・中国・インド	
6	茶類	10	表示なし	
7	表示なし	1	中華人民共和国	
8	混合茶	10	日本・中国・インド	+
9	茶類	4	表示なし	+
10	ダイエット茶	4他	中華人民共和国	+
11	混合茶	16	日本・中国・インド・フィリピン	
12	混合茶	16	日本・中国・インド・フィリピン	
13	茶類	1	表示なし	
14	老茶	1	中華人民共和国	+
15	混合茶	9	日本・中国・インド	+
16	減肥茶	1	中華人民共和国	+
17	野草ブレンド茶	9	表示なし	
18	健康茶	8	中国・トルコ	
19	野草混合茶	6	表示なし	+
20	野草ブレンド茶	12	表示なし	
21	表示なし	2	中華人民共和国	
22	植物混合茶	30	日本・中国	
23	健康茶	1	表示なし	
24	表示なし	1	表示なし	
25	茶類	1	表示なし	
26	表示なし	2	中国	+
27	表示なし	11	中国	
28	茶類	12	日本・中国	+
29	茶類	12	日本・中国・インド	
30	茶類	1	中国	
31	表示なし	3	アメリカ	
32	黒まめ茶	1	日本（北海道）	
33	表示なし	4	日本・中華人民共和国	+
34	茶類	10	日本・中国・インド	
35	混合茶	2	日本・中国	
36	混合茶	6	日本・中国	
37	混合茶	2	日本・中国	
38	混合茶	9	日本・中国・インド	
39	混合茶	6	中国・インド	
40	混合茶	7	中国・トルコ・エジプト・ポルトガル	
41	混合茶	14	中国・日本・アメリカ	
42	茶類	6	中国・日本・南アフリカ	
43	茶類	11	日本・中国・タイ・インドネシア	
44	混合茶	9	日本・中国・インド	
45	表示なし	10	表示なし	
46	表示なし	2	中国	+
47	茶類	1	表示なし	
48	混合ガルシニア・カンボジア茶	6	中国・日本・インド	
49	グアバ茶	1	中国	
50	茶	6	表示なし	
51	表示なし	5	表示なし	
52	茶	7	表示なし	+
53	表示なし	1	中華人民共和国	
54	混合茶	3		
55	表示なし	1	日本（静岡）	

えて混合茶となっている商品が多いことを考えあわせると，国外で使用されているＢＴ剤の影響を受けている可能性が充分考えられ，国内でのＢＴ剤使用量で商品中の残留（汚染）を判断出来るものでない．　原材料の輸入

に際して，BT剤の検査は行われておらず，飲用茶類商品での残留（汚染）実態は不明である．　減肥茶，減糖茶等々はその効果を期待して利用する事を考えれば，飲みやすく調合してあり，長期的に飲用する可能性がある．また，体内に摂取した場合，排泄されて自然界に定着してゆくことも無視できなくなる．それ故，BT剤の人体への影響については不明な部分があり[1]，飲用茶類の安全性確保には飲用茶類での残留（汚染）実態を監視し把握することが第一に必要である．

結　　論

自主的に選択して購入した飲用茶類商品55検体について，微生物農薬として世界各国で使用されている *Bacillus thuringiensis*（Bt菌）の残留（汚染）実態を検討した．今回は，商品に表示されている飲み方に従い調査したところ，16検体（29%）からBt菌が検出された．そのうち11検体からの分離株は*B.t.* serovar *kurstaki*から*B.t.* serovar *alesti*の因子抗原を吸収した因子血清で凝集がみられた．

文　　献

1）Samples, J.R., Buettner, H.：*J. Infect. Dis.*, **148**, 614, 1983.

2）大庭道夫：***Bacillus thuringiensis***の血清学的手法によるタイピング，岡田斉夫他，植物防疫，特別増刊号(No. 2)，185-191，　平成5年(1993)，日本植物防疫協会，東京．

3）de Barjac., H. and Frachon., E.：*Entomophaga*, **35**, 233-240, 1990.

4）Losey, J.E., Rayor, L.S. and Carter, M. E.：*Nature*, **399**, 214, 1999.

5）三菱化成安全科学研究所編；微生物農薬の現状と安全性評価，21-39，1993，化学工業日報社，東京．

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８編の報文が掲載されている．このうち室内空気の揮発性有機化合物や大気汚染の指標となる降下煤塵に関するものが３編，水道水，地下水等の飲用水の無機化合物に関するものが２編，生活用水や環境水の微生物汚染に関するものが３編である．

近年，シックハウス症候群や化学物質過敏症などの原因物質として室内環境に放出される揮発性有機化合物（ＶＯＣ）が問題視されているが，その汚染実態など不明な場合が多く，ＶＯＣの実態解明が急務となっている．ここでは捕集法として騒音が発生するコンプレッサーを一切使用しないで，一般家庭でも容易に可能な室内空気のパッシブサンプリングを検討し，この捕集法で得たＶＯＣをＧＣ／ＭＳで測定する分析法を開発している．

次に，1995年～1998年の約３年間について新築住宅の室内空気の実態調査を進め，ホルムアルデヒド及びＶＯＣの経時的変化を観察し，それらの化学物質の推移を追跡している．これらの成果は，東京都の健康・快適居住環境の確保対策事業に反映されている．

大気汚染調査の一環として東京都では1945年から毎年継続して降下煤塵の観測を行ってきた．今回の報告は1989年～1998年の10年間の降下煤塵量の推移をまとめたものであり，降下煤塵量の最近の動向を論じている．

東京都内島嶼における水道水及び水道原水中のホウ素について調査を行っている．その結果，火山活動のある島で濃度が高く，水道水水質基準の監視項目で規定された指針値を超えている場合が認められた．ホウ素の濃度分布に関して３年以上に渡る経時変化やその他の水質検査項目との相関の有無についても調べている．

水素化物発生原子吸光光度法による飲用水中のセレンの測定は四価のセレンだけが検出される．しかし，水道水などは残留塩素によってセレンが酸化を受け，六価として存在し，そのため予め六価から四価への還元が必要となる．今回，前処理として塩酸による予備還元が有効であることが分かり，この方法により多摩地域の井戸水や湧水を調査した結果，水道水水質基準以下であるが，微量セレンの検出を報告している．

1998年度における生活用水のレジオネラ属菌の調査を行っている．特別養護老人ホームの施設の調査では，レジオネラ検出率は「２４時間風呂」の浴槽水が最も高く，次に「加熱装置のない循環ろ過装置を装着した風呂」の浴槽水が高い．これに対して毎日全換水する「普通の風呂」の浴槽水からは全く検出されないと報告している．これらの結果から，レジオネラ対策として塩素処理（遊離塩素濃度0.1mg/L以上）が有効であり，ろ過装置はレジオネラの生息場所であることを示唆している．

水試料中の原虫クリプトスポリジウムの検出法として「暫定試験方法」が定められているが，この方法は水道水以外の環境水試料への適用性に問題がある．そこで，暫定試験法を基本に改変した高濁度の試料水にも適用可能なオーシストの濃縮・精製法を用い，水道水，河川水や井戸水の水道原水，雑用水等のクリプトスポリジウム汚染を調査した．その結果，合計１４８検体の試料からクリプトスポリジウムは検出されず，本原虫による汚染が進んでいないことがうかがわれた．

また，同様にクリプトスポリジウムのオーシストを効率的に回収を図る目的で無機物，有機物，微生物等の多い高濁度の汚泥試料水について３種の濃縮法と２種の精製法を組合わせた６種の検査方法を比較検討した．その結果，セルロース吸着・凝集法による濃縮と密度勾配遠沈法による精製の組合わせが最も有効であると報告している．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 235-239, 1999

住宅の室内ホルムアルデヒド及び揮発性有機化合物濃度の経時変化

斎藤育江*, 瀬戸博*, 多田宇宏*, 長嶋親治*,
竹内正博*, 土屋悦輝*

The Relationship between Concentration of Indoor Air Chemicals and The Age of Houses

IKUE SAITO*,HIROSHI SETO*, TAKAHIRO TADA*, CHIKAHARU NAGASHIMA*,
MASAHIRO TAKEUCHI* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords：ホルムアルデヒド formaldehyde，揮発性有機化合物 volatile organic compounds，室内空気 Indoor air，健康阻害 health complaints

緒　言

平成8年度の建設白書によれば，日本の住宅の平均寿命は26年で，これはイギリスの75年，米国の44年に比べるとかなり短い数字である[1]．住宅の寿命が短いことは，言い換えれば住宅全体に占める新築住宅の割合が多いことを示しており，近年，室内空気中の化学物質による健康影響が問題となってきた背景にはこうした住宅事情があると考えられる．

著者らは室内空気の実態を把握する目的でこれまでに延べ250軒余りの住宅について測定を行ってきた．本報では，これらの結果について室内濃度の経時変化という観点から解析を行い得られた知見を報告する．

実験材料及び方法

1．調査方法

1995年4月～1998年9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及び揮発性有機化合物（以下VOCと略す）濃度の調査を行った．なお，日常生活での濃度レベルを把握する目的から，濃度測定時には特に換気等の条件を設けず，普段通りの生活状況でサンプリングを行った．また，一部の調査では測定と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

アクティブDNPH法（300ml/min, 5h採取）[2] またはパッシブAHMT法（24h採取）[2] により測定した．

2）VOC

ORBO－91Lチューブを用いたアクティブ法（100ml/min, 24h採取）[3]，Sep－Pak Plus PS－2カートリッジを用いたアクティブ法（300ml/min, 5h採取）[4] 又はステンレス製加熱脱着チューブを用いたパッシブ法（24h採取）[5] のいずれかにより測定した．

3）統計処理

築後6ヶ月以内の住宅を「新築」住宅とし，それ以上経過したものを「既設」住宅として解析を行った．なお，各物質濃度のヒストグラムは対数正規分布に近似されたため，検定及び解析には自然対数に変換した値を用いた．

結　果

1．新築住宅と既設住宅との濃度比較

ホルムアルデヒド及び38種のVOCについて「新築」「既設」それぞれ7軒で測定を行った．各物質の幾何平均値と幾何標準偏差を表1に示す．これらの結果についてt－検定を行ったところ，ウンデカン，ドデカン，トルエン，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及びブタノールの8物質は「新築」で有意に高濃度だった．7軒の建築様式の内訳は，「新築」が戸建住宅6軒に対し集合住宅1軒，「既設」が戸建住宅1軒に対し集合住宅6軒であった．一般的に戸建住宅に比べて集合住宅では室内濃度が高い傾向が見られるが[6]，本調査では「既設」で集合住宅の割合が高かったにもかかわらず，やはり「新築」で濃度の高い物質が多く見られた．また，測定と同時に行った健康に関す

* 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．住宅の室内ホルムアルデヒド及びVOC濃度

単位：ppb

物質名	新築住宅（戸建6／集合1）		既設住宅（戸建1／集合6）	
	G.M.	G.S.D.	G.M.	G.S.D.
ホルムアルデヒド	52.0	2.61	30.2	1.34
ヘキサン	1.8	2.88	3.2	3.57
ヘプタン	0.39	1.65	0.94	2.77
オクタン	0.25	2.71	0.43	2.29
ノナン	0.64	2.85	0.38	1.55
イソオクタン	0.03	1.76	0.05	2.32
デカン	1.3	2.44	0.60	1.95
ウンデカン	1.0	2.40	0.34	2.15
ドデカン	0.87	2.99	0.25	2.85
トリデカン	0.61	2.87	0.26	2.34
テトラデカン	0.32	2.78	0.43	2.48
ペンタデカン	0.14	2.27	0.24	2.55
ヘキサデカン	0.08	1.80	0.16	2.67
2,4-ジメチルペンタン	0.05	1.72	0.08	1.72
ベンゼン	0.91	1.35	2.0	2.31
トルエン	36.4	4.10	8.6	1.86
エチルベンゼン	7.3	4.37	4.8	6.38
p-,*m*-キシレン	8.2	3.76	5.4	5.91
o-キシレン	2.9	3.72	2.3	6.95
スチレン	3.0	4.51	0.79	3.07
1,3,5-トリメチルベンゼン	0.38	2.35	0.47	4.33
1,2,4-トリメチルベンゼン	1.4	2.70	1.4	3.74
1,2,3-トリメチルベンゼン	0.35	2.13	0.35	3.44
α-ピネン	2.7	2.32	0.70	6.32
リモネン	1.8	4.39	2.3	2.25
トリクロロエチレン	0.48	1.60	0.40	1.80
テトラクロロエチレン	0.15	1.23	0.25	3.04
クロロホルム	0.17	2.55	0.28	2.22
1,1,1-トリクロロエタン	0.03	1.55	0.12	3.13
1,2-ジクロロエタン	0.05	2.20	0.11	2.22
1,2-ジクロロプロパン	0.04	1.33	0.06	2.31
p-ジクロロベンゼン	6.3	6.73	5.1	2.19
四塩化炭素	0.02	1.15	0.04	1.61
酢酸エチル	4.6	2.95	2.1	1.48
酢酸ブチル	4.1	3.61	0.38	2.84
メチルエチルケトン	2.9	3.11	0.75	2.03
メチルイソブチルケトン	1.7	2.99	0.19	1.94
ブタノール	6.2	4.14	2.1	2.11

G.M.：幾何平均値　G.S.D.：幾何標準偏差

るアンケート調査では，「新築」のうち4軒で咳やかゆみなどの室内空気によると思われる不快な症状が見られており，上記8物質と健康影響との関連が疑われた．

2．新築住宅における築後1年間の室内濃度変化

2軒の新築住宅（A宅及びB宅）について引渡し直後から1週間～2ヶ月の間隔で，ホルムアルデヒド及び5

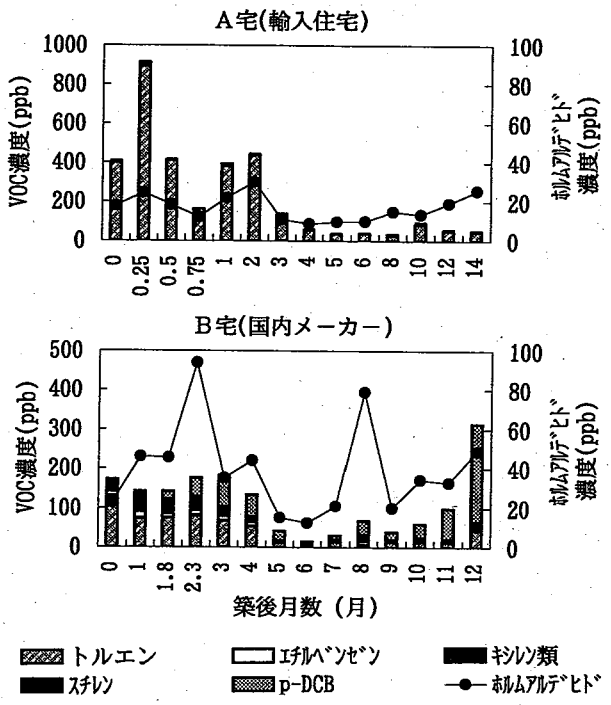


図1．新築住宅におけるホルムアルデヒド及びVOC濃度の経時変化

種のVOC濃度（トルエン，エチルベンゼン，キシレン類，スチレン及びパラジクロロベンゼン（以下*p*-DCBと略す））を約1年間測定した．濃度の経時変化を図1に示す．なお，キシレン類は*p*-キシレン，*m*-キシレン及び*o*-キシレンの合計を表す．2軒はいずれも木造一戸建で，A宅は97年7月築のメープル無垢材を使用した2×4工法によるカナダ輸入住宅，B宅は97年12月築の国内メーカー2×4住宅であった．

A宅では，ホルムアルデヒド濃度は調査期間を通していずれも30ppb以下と低かったが，トルエン濃度は非常に高く，新築直後は最高で891ppb（3,443 μg/m^3）を示した．これは新築住宅平均値（表1）の17倍であり，原因として，フローリングの床を張る際に多量に使用した接着剤にトルエンが含まれていたことが判明している．その他のVOCについては新築住宅平均値に近い濃度であった．

一方，B宅ではホルムアルデヒド濃度が最高で93.8ppbと指針値（80ppb）を超え，VOCについては*p*-DCB以外の物質で，新築直後の値が新築平均値の2倍から4倍高濃度であった．*p*-DCBについては築後12ヶ月目に最高を示しており，これは衣類の防虫剤由来と考えられた．

次にこれらの濃度推移と築後月数との相関を調べたところ，築後6ヶ月までの期間でA宅ではトルエン及びエチルベンゼン，B宅ではトルエン，エチルベンゼン及びキシレン類で，築後月数と濃度との間に有意な負の相関

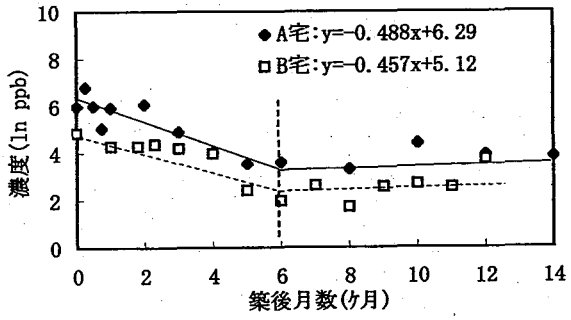


図２．新築住宅のトルエン濃度変化

が見られた．一例として図２に築後月数とトルエン濃度の関係を示す．こうした減少率は物質によって多少の差はあるが，築後約1.5ヶ月で1/2，６ヶ月では約1/15の濃度に減少する傾向が見られた．ホルムアルデヒド，スチレン及び*p*-DCBについては築後月数と濃度との間に有意な相関は見られなかった．

３．長期的な濃度推移

長期的にみた室内濃度の推移について，これまで測定した住宅のデータからリフォーム１年以内のものを除いて，ホルムアルデヒドと10種のVOC（トルエン，エチルベンゼン，キシレン類，スチレン，*p*-DCB及び５種のハロゲン化炭化水素）について築後年数と濃度との関連について解析を行った．

トルエン，エチルベンゼン及びキシレン類については，築後６ヶ月までは急速に減少することが明らかになったので，６ヶ月以降のデータについて解析を行った．築後年数と濃度との関係を図３に示す．３物質とも築後６ヶ月以降は築後年数との相関は見られず，長期間かけてわずかに減少するものの，ほぼ一定の濃度で推移する傾向が見られた．

クロロホルム，1,1,1-トリクロロエタン，四塩化炭素，トリクロロエチレン及びテトラクロロエチレンの５種のハロゲン化炭化水素及び*p*-DCBでは，築後年数と濃度との相関は見られず，新築直後でも築後20年でも同程度の濃度であった（図４）．

ホルムアルデヒド及びスチレンについては，築後６ヶ月までの期間では明らかな減少傾向は見られなかったが，長期的にみた場合には，築後年数と濃度との間に有意な負の相関が見られた．ホルムアルデヒドと築後年数との関係を図５に，スチレンのそれを図６に示す．ホルムアルデヒドについてはこのように長期的に濃度が減少することは知られていたが，スチレンにも同様の傾向があることが明らかになった．

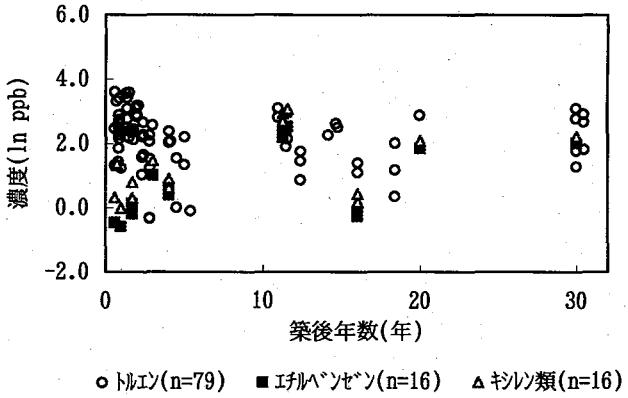


図３．築後年数とVOC濃度(1)

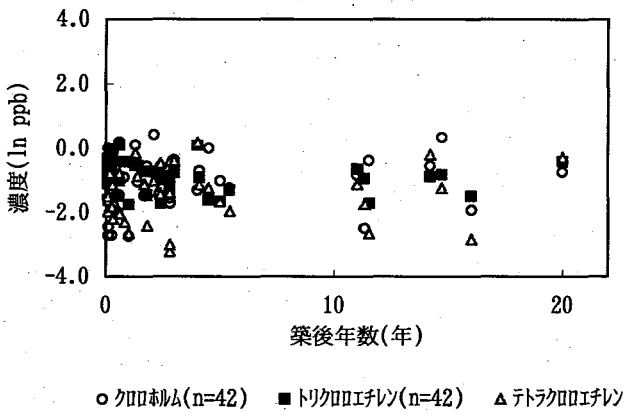


図４．築後年数とVOC濃度(2)

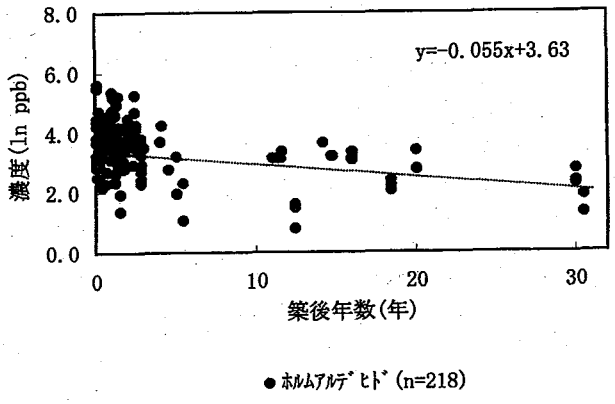


図５．築後年数とホルムアルデヒド濃度

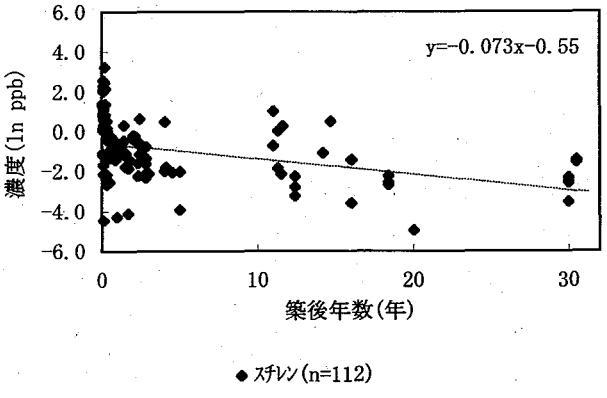


図６．築後年数とスチレン濃度

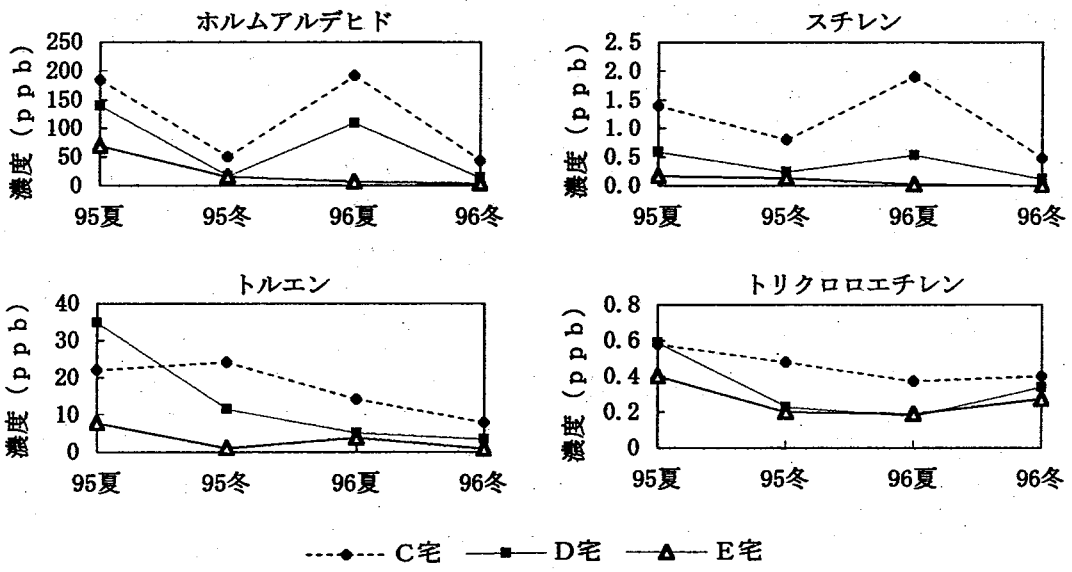


図７．ホルムアルデヒド及びVOCの季節変化

４．季節による濃度変化

季節による濃度変化を調べるために，３軒の住宅（C宅，D宅及びE宅）で２年間，夏と冬にホルムアルデヒド及び８種のVOC（トルエン，スチレン，*p*-DCB及び５種のハロゲン化炭化水素）について測定を行った．建築様式はC宅が鉄筋の集合住宅，D宅及びE宅が木造の戸建住宅であった．C宅とD宅は同時期に建てられたもので，測定開始時に築後１年５ヶ月経過しており，E宅は４年経過していた．各物質濃度の季節変化を図７に示す．トルエン及びトリクロロエチレン等のハロゲン類では，季節的な変動傾向は見られなかった．一方，ホルムアルデヒド及びスチレンについては，夏期に高く，冬期に低いという変動を繰り返す傾向が見られた．したがって、この２物質は季節変動を繰り返しながら，長期間かけて徐々に減少していくものと考えられた．

考　　察

今回調査を行った2軒の新築住宅の例からもわかるように，建材による室内汚染の状況は，個々の住宅に使用されている部材，接着剤，塗料等により全く異なっている．トルエン，エチルベンゼン及びキシレン類については壁紙やフローリング材を貼る接着剤に使用されていることが多く，換気を良くしておけば，比較的短期間に濃度を減少させることができる．しかし，ホルムアルデヒドやスチレンについては，建材から徐々に放散されるため，長期間に渡って汚染が続く．これらの室内濃度を低減させるためには，建築時の部材選びが最も重要と考えられるが，現在のところ建材のVOCに関する情報は少なく，住宅メーカーも消費者のニーズに応えて情報収集に動き出したところである．

ホルムアルデヒドについては，97年に厚生省の指針値が示されたことから，この２～３年でそれによると考えられる苦情例は減少の傾向にある．また，住宅メーカーはVOCの中でも量的に多いトルエン及びキシレン類の低減に向けて自主的な対策を進めている．しかし，それらの代替として使用される物質については何の規制もないことから，今までに見られなかった物質による苦情例が起きているのも現状である．したがって，今後とも室内空気中の化学物質濃度を測定し，データを提供していくことは，健康で快適な居住環境を確保するうえで重要と考えられた．

まとめ

1995年４月～1998年９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及び揮発性有機化合物濃度を調査し，各物質濃度と住宅の築後年数との関連について解析を行なった．

築後６ヶ月以内の「新築」住宅（n=7）と，それ以上経過した「既設」住宅（n=7）の室内濃度とを比較すると，ウンデカン，ドデカン，トルエン，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及びブタノールの８物質は「新築」で有意に高濃度であった．測定と同時に行なった健康に関するアンケート調査では，「新築」の4軒で室内空気によると思われる不快な症状がみられており，上記8物質と健康影響との関連が疑われた．

トルエン，エチルベンゼン及びキシレン類は，新築直後から築後６ヶ月までの築後月数と濃度との間に有意な負の相関がみられ，短期間のうちに急速に濃度が減少することがわかった．

クロロホルム，トリクロロエチレン及び四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素及び*p*-DCBについては，築後年数との相関は見られなかった．

ホルムアルデヒド及びスチレンについては，築後年数と濃度との間に有意な負の相関が見られ，夏期に高く冬期に低いという季節変動を繰り返しながら，徐々に減少する傾向が見られた．

（本研究の概要は第1回室内環境学会総会　1998年12月で発表した．）

文　献

1）平成8年度建設白書：建設省，1996年8月

2）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏他：東京衛研年報，**48**, 250－254, 1997.

3）斎藤育江，瀬戸博，竹内正博：東京衛研年報，**49**, 225－231, 1998.

4）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏他：東京衛研年報，**48**, 255－260, 1997.

5）瀬戸博，斎藤育江，竹内正博：東京衛研年報，**50**, －, 1999.

6）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏，他：第38回大気環境学会要旨，473, 1997.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 240-244, 1999

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法

瀬戸　博*, 斎藤育江*, 竹内正博*, 土屋悦輝*

Passive Sampling and Analysis of Indoor Volatile Organic Compounds Using a Diffusive Sampling Tube and Thermal Desorption GC/MS

HIROSHI SETO*, IKUE SAITO*, MASAHIRO TAKEUCHI* and YOSHITERU TSUCHIYA*

Keywords：揮発性有機化合物 volatile organic compound，室内空気 indoor air，パッシブサンプリング passive sampling，加熱脱着 thermal desorption

緒　言

住宅建材や家庭用品等に由来するホルムアルデヒドや揮発性有機化合物（以下VOCと略す）による室内空気汚染が社会問題になっている．健康影響調査や汚染防止対策には，対象住宅やサンプリングポイントを多く設定し，緻密な実態調査をすることが不可欠である．しかし，ポンプを使用するサンプリング法（アクティブサンプリング）では，ポンプ，流量計，積算流量計等の装置が必要である．これらの機材を個人の住宅に持ち込むには搬送手段，設置スペース，電源，騒音等の制約があるのが実情であり，小型軽量のパッシブサンプラーが望まれている．

著者らは労働環境での個人モニタリング用に開発された加熱脱着チューブ（以下チューブと略す）を用いた室内空気の分析法について検討を行ったので報告する．

実験方法

1．材料及び装置

試　薬　メタノール，トルエン（残留農薬測定用，和光純薬），エチルベンゼン，*o*－キシレン，*m*－キシレン，*p*－キシレン，パラジクロロベンゼン（以下*p*-DCBと略す），ブタノール（特級，和光純薬），スチレン（悪臭分析用，和光純薬），トルエン-d_8（関東化学）．

捕集管　ステンレス製チューブ（ATD-400用，Perkin-Elmer）にTenax TA 200mg（60/80メッシュ，Phase Separations）を充填し，純窒素を毎分100ml流しながら250℃で3時間加熱し，最初のコンディショニングを行った．2回目以降は，純ヘリウムを毎分50ml流しながら，230℃で10分間加熱してコンディショニングを行い，その後直ちに両端に黄銅キャップをはめ，活性炭の入ったデシケーターに入れて使用直前まで室温で保存した．捕集管の構成（捕集時）を図1に示す．

装　置　加熱脱着装置：ATD-400（Perkin-Elmer），ガスクロマトグラフ/質量分析計（以下GC/MSと略す）：GC-17A，QP-5000（島津製作所）．

ATD-400の分析条件を表1に，GC/MSの分析条件を表2に示す．

2．検量線

室内空気中に見られる主なVOC 8物質（トルエン，エチルベンゼン，*o*-キシレン，*m*-キシレン，*p*-キシレン，スチレン，*p*-DCB，ブタノール）の標準液を同量混合して混合標準原液を調製した．これをメタノールで希釈して濃度1.5 μg/ml～330 μg/mlの標準系列を調製し，各1 μlをチューブに添加した後，清浄空気を3秒間通気した．次に内部標準物質として，トルエン-d_8溶液（50 μg/ml　メタノール）を各チューブに1 μl添加し，清浄空気を3秒間通気した後，加熱脱着装置によりGC/MSに導入して分析した．GC/MSクロマトグラムから内部標準物質のピーク高に対する各物質のピーク高比を求め，この値と添加量より検量線を作成した．

3．アップテイクレートの算出

パッシブサンプリングにおいては，VOCの空気中濃度を計算する上でアップテイクレート（Uptake rate，以下Upと略す）が必要である．Up（ng・ppm^{-1}min^{-1}）は，単位濃度当たり及び単位時間当たりにチューブに吸

* 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

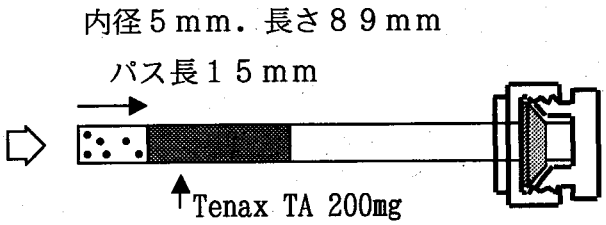


図１．加熱脱着チューブの構成

表１．ATD-400の分析条件

オーブン温度	:	230℃
脱着時間	:	5min
脱着流量	:	50ml/min
２次トラップ	:	Tenax TA
２次トラップ温度	:	10℃
２次脱着温度	:	230℃
２次脱着時間	:	3min
２次スプリット比	:	１：６
トランスファライン	:	200℃
バルブ温度	:	120℃

表２．GC－MSの分析条件

カラム	:	DB-1(60m×0.25mm i.d. 1μm)
カラム温度	:	40℃(5min)－10℃/min－300℃
キャリアーガス	:	He(カラムヘッド圧 100Kpa)
インターフェース温度	:	250℃
マルチプライヤー	:	1500V
検出モード	:	SCAN

測定対象物質	定量用イオン	確認用イオン
トルエン	91	92
エチルベンゼン	91	106
p-キシレン	91	106
m-キシレン	91	106
o-キシレン	91	106
スチレン	104	103
p-DCB	146	148
ブタノール	56	43
トルエンd_8	98	

着されるVOCの重量を表し，言い換えればVOCのサンプリング速度を意味する．

VOC８物質についてUpを算出するために，パッシブ法とアクティブ法を平行して室内空気を採取した．パッシブ法ではチューブを床からの高さ約1.2mに設置し，分子拡散の原理により室内空気を24時間採取した．採取後のチューブは直ちに黄銅キャップをはめ，活性炭の入ったデシケーターに入れて分析直前まで室温で保存した．分析時には内部標準物質として，トルエン－d_8溶液(50μg／ml　メタノール）を各チューブに１μl添加し，清浄空気を３秒間通気した後，加熱脱着装置（ATD-400）によりGC/MSに導入して分析した．空試験については，未使用のチューブを用い同様の操作を行なった．アクティブ法はSep-Pak Plus PS-2を用いる方法１）（流量100ml／min，24時間）により測定を行なった．

パッシブ法でチューブ上に捕集された物質重量（ng）と，アクティブ法から求められた空気中濃度（ppm）から，次式によりUpを算出した．

Up＝W／（C＊T）

ここにW：チューブ上に捕集された物質重量（ng）

C：空気中濃度（ppm）

T：サンプリング時間（min）

4．検出限界

６本の未使用チューブを用いて操作ブランク値を求め，24時間パッシブサンプリングしたとして，計算により求めた空気中濃度の標準偏差の10倍を検出限界とした．

5．測定値の変動

パッシブサンプリングによる測定値の変動を見るため，6本のチューブを同時に同一場所に設置し，室内空気を24時間採取した．採取後，３の方法によりVOC濃度を測定した．

6．拡散キャップ（メッシュ）の効果

開口部付近での空気層のかく乱を防止するためステンレスメッシュ構造の拡散キャップが開発されている．この拡散キャップの効果を評価するため室内及び室外空気のサンプリング時における拡散キャップを付けた場合と付けない場合での捕集量を比較した．

7．住宅室内濃度の測定

チューブを用いて，築後８ヶ月の戸建て住宅の室内空気を24時間採取し，室内VOC濃度を測定した．

結　　果

1．検量線

８種のVOCにおける検量線を図２に示す．いずれの物質についても添加量とピーク高比との間に直線関係が得られた．

2．VOC８物質のUp

パッシブ法によりチューブ上に捕集された物質量とアクティブ法により求められた空気中濃度との相関の一例（トルエン）を図３に示す．トルエン以外の物質についても相関係数0.97以上の高い相関が得られ，傾きからUpを求めた．各VOCの相関係数（r）とUp及び拡散係数[2]から算出した理論値Up*を表３に示す．計算式を下記に示す．

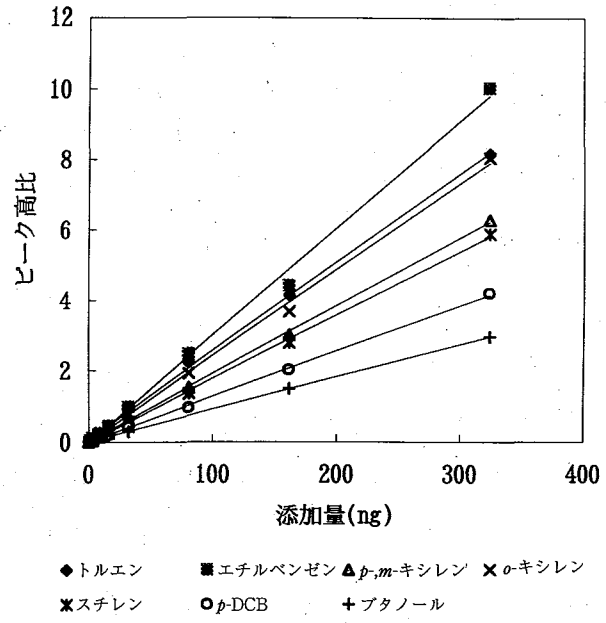


図２．VOCの検量線

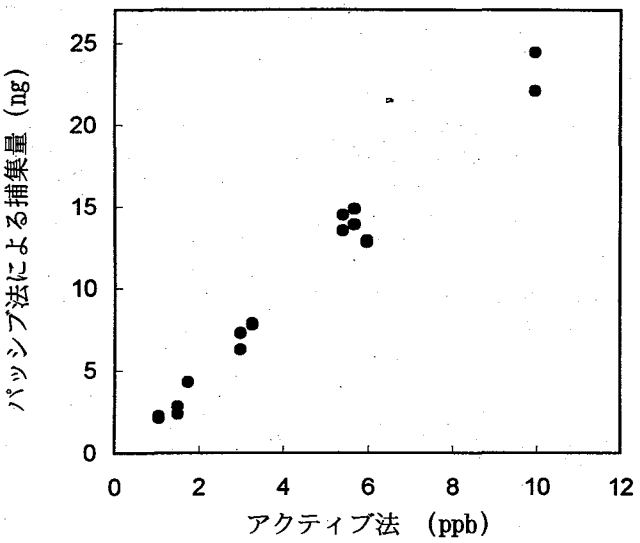


図３．アクティブ法とパッシブ法の相関（トルエン）

$Up^*=60*D*A*MW/(24.45*Z)$

ここに

D：空気中における被測定気体の拡散係数（cm^2/sec）

A：チューブの断面積（$0.2cm^2$）

MW：被測定気体の分子量

Z：拡散距離（1.5cm）

24.45：25℃，1013hPaにおける気体のモル体積（L）

実験により求めたUpと拡散係数から算出したUp^*とはほぼ一致していた．

3．検出限界

各物質の検出限界を表４に示す．最小はスチレンで0.08ppb，最大はトルエンで0.56ppbであった．

4．測定値の変動

６本のチューブで同時にサンプリングを行い，求めた濃度の平均値，標準偏差及び変動係数を表５に示す．スチレン以外の物質については，変動係数が3.0％～7.7％とおおむね良好な結果が得られた．スチレンついては，変動係数が10％と比較的大きな値となったが，これは空気中濃度が低く，操作ブランク値の変動の影響を受けやすいためと考えられた．

5．拡散キャップの効果

室内空気のサンプリング時において拡散キャップを付けた場合と付けない場合のVOC８種類の捕集量を比較すると，拡散キャップを付けた場合には付けない場合よりも捕集量が少なく，平均で92.8％（n=3）であった．一方，屋外では，86.5％（n=3）でさらに少なかった．

表３．アクティブ法とパッシブ法の相関係数(r)とアップテイクレート(Up)

	トルエン	エチルベンゼン	*p*-キシレン	*m*-キシレン	*o*-キシレン	スチレン	*p*-DCB	ブタノール
r	0.990	0.979	0.979	0.976	0.981	0.985	0.971	0.972
Up	1.66	2.20	2.25	2.09	2.34	1.71	2.22	1.54
Up^*	2.56	2.62	2.33	2.39	2.53	－	－	－

Up：$(ng\cdot ppm^{-1}min^{-1})$　Up^*：拡散係数から算出したUp

表４．VOCの検出限界

物質名	検出限界(ppb)
トルエン	0.56
エチルベンゼン	0.10
p-,*m*-キシレン	0.34
o-キシレン	0.14
スチレン	0.08
p－DCB	0.12
ブタノール	0.39

表５．加熱脱着チューブを用いたVOC測定の繰り返し性(n=6)

	室内空気(ppb)		
	平均値	S.D.	CV(%)
トルエン	27.27	0.82	3.0
エチルベンゼン	3.99	0.14	3.5
p-,*m*-キシレン	7.69	0.38	4.9
o-キシレン	2.42	0.09	3.7
スチレン	0.59	0.06	10.0
p-DCB	0.89	0.07	7.7
ブタノール	6.86	0.45	6.6

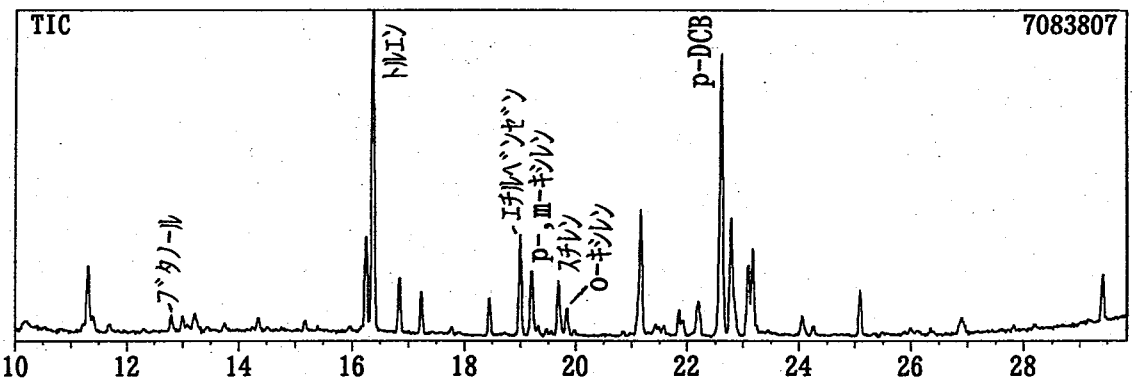


図4．24時間パッシブサンプリングによる住宅室内のVOCクロマグラム（築後8ヶ月一戸建）

表6．築後8ヶ月の一戸建て住宅室内のVOC濃度

物質名	検出限界(ppb)
トルエン	55.7
エチルベンゼン	10.7
p-,*m*-キシレン	8.7
o-キシレン	3.0
スチレン	7.6
p−DCB	36.6
ブタノール	9.2

6．住宅室内濃度の測定

築後8ヶ月の戸建て住宅で測定した室内空気のGC/MSクロマトグラムを図4に示す．トルエン，キシレンの他，40種類以上のVOCが検出された．測定対象物質の濃度を表6に示す．

考　察

本報告は，労働環境測定では実績のあるチューブによるパッシブサンプリング法を一般室内環境測定に適用することを目的とし検討したものである．労働環境においては，GC-FID（水素炎イオン化検出器）を用いて数ppmから数百ppmという高い濃度を測定対象範囲としているのに対し，一般室内環境における測定範囲はサブppbレベルから1ppm程度の非常に低濃度レベルである．また，一般室内環境においては苦情原因を解明するために多成分の分離分析がしばしば必要となる．したがって，本法を一般室内環境測定に適用する上で感度，選択性，同定能力及びブランク値が問題となる．このうち感度，選択性及び同定能力については，キャピラリカラムを分離用カラムとするGC/MSを使用し，SCANモード分析することによりほぼ満足できる結果が得られた．一方，ブランク値についてはいくつか解決すべき課題があった．特に重要なことは次の3点である．第一に，チューブを十分にエージングすること，第二に保存中の汚染をできるだけ少なくすること，第三にキャリアガス中の不純物をできるだけ少なくすることである．今回これらのブランク低減化対策を徹底することにより実用上全く支障のないレベルに抑えることが出来た．

検量線については300μg程度まで，原点付近を通る良い直線関係が得られたことから加熱脱着装置の条件設定，GC/MS装置の条件設定が適当であると判断される．

アクティブ法とパッシブ法で得られたデータの相関は非常に良好であった．このことは一般室内環境のような低濃度領域においても，パッシブサンプルチューブ内での分子拡散が理論（Fickの法則）どおりに実際上も成り立っていることを示している．また，表3に示すように拡散係数から算出したUp*ともほぼ一致していた．

Perkin-Elmer社のサンプルチューブをパッシブサンプリングに使用する場合は拡散キャップを付けるのが標準で，毎秒0.2mの風速までは影響を受けない[3]．拡散キャップは，風速の影響を少なくするための器具だが，通常，室内では無風ないし微風と考え，今回の実験では使用せずに種々の検討を行った．しかし，拡散キャップを付けて室内サンプリングをすると，92.8%と付けない場合よりも捕集量がやや低値を示した（VOC8種類の平均）．これは，ステンレスメッシュによる抵抗のために断面積がみかけ上減少すること及び拡散距離の増加という物理形状の変化に伴う必然的なものと考えられた．外気サンプリングにおいて拡散キャップを付けると86.5%とさらに6.3%低値を示した．これは拡散キャップを付けない場合には測定値がさらに6.3%増加したとみなされ，この増加分については風の影響を受け，取り込み空気量が多くなったためと推察された．したがって，サンプリング場所にはなるべく空気の流れの少ない場所を選ぶべきである．外気測定や個人モニタリングでは風速が大きく変化することも予測されることから拡散キャップを付けることが必要であると判断された．

なお，今回は検討しなかった湿度の影響についても考慮しておく必要がある．ポリマー系吸着剤を使用したパ

ッシブチューブは湿度の影響を受けることが比較的少ない[3]とされているが極端な高湿度環境での使用は避けるべきであろう．

同一場所での複数サンプリングにより，測定値の変動をみたところ，スチレン以外の物質については，変動係数が3.0%～7.7%とおおむね良好な結果が得られた．スチレンついては，変動係数が10%と比較的大きな値となったが，これは空気中濃度が低く，操作ブランク値の変動の影響を受けやすいためと考えられた．

市販されている他のパッシブサンプラー（活性炭系吸着剤，溶媒抽出型）ではフッ素樹脂系の拡散膜内に吸着剤を入れた構造のものがある．このようなサンプラーでは断面積が広く，拡散距離が短い，したがってアップテイクレートが大きい利点がある．しかし，溶媒による希釈が避けられず，GC/MSへの実質注入空気量は少ない[4]脂肪族炭化水素やアルデヒド類等の一部でブランク値が高い物質があり注意を要する[4]．高分子膜特有の拡散速度の温度依存性や製品間ばらつき等の点でも考慮すべき課題がある．また，活性炭系吸着剤が使用されており，スチレンについては溶媒による脱着効率が良くない欠点がある[4]．

以上の結果から，本加熱脱着チューブは室内空気中の主要なVOCを測定するための簡易なパッシブサンプラーとして有用である．但し，試料の加熱脱着は一回だけ可能であるのでデータの信頼性を確保するために必ず複数本のチューブを同時に設置し，これを別々に分析し測定値が一致することを確認しておく必要がある．本分析法は多成分の分離・分析・同定が可能なことから苦情原因を解明するためのスクリーニング法としても有効であると考えられた．

本研究は，当所プロジェクト研究「居住環境の安全性に関する研究」及び衛生局生活環境部環境指導課の「健康・快適居住環境の確保対策」事業の一環として，環境指導課と協力して実施したものである．

文　献

1）斎藤育江，瀬戸博，多田宇宏他：東京衛研年報，**48**, 255－260, 1997.
2）Lugg, G.A.：*Anal. Chem.*, **40**, 1072-7076, 1968.
3）Perkin-Elmer：Thermal Desorption Applications No.1, 1991.
4）斎藤育江，瀬戸博:地方衛生研究所全国協議会，関東甲信静支部第10回理化学部会，1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 245-248, 1999

東京都における降下煤塵量の推移 1989年から1998年まで

大澤誠喜*, 福田雅夫*, 牧野国義*, 関　比呂伸*,
栗田雅行*, 大橋則雄*, 渡辺伸枝*, 竹内正博*

Changes of the Amount of Fall Dust in Tokyo Area 1989—1998

MASANOBU OHSAWA*, MASAO FUKUDA*, KUNIYOSHI MAKINO*,
HIRONOBU SEKI*, MASAYUKI KURITA*, NORIO OHASHI*,
NOBUE WATANABE*and MASAHIRO TAKEUCHI*

Keywords：降下煤塵 amount of fall dust, 不溶性成分insoluble fraction, 可溶性成分soluble fraction, 季節変動 seasonal alteration

緒　言

大気汚染の健康影響が懸念されている中，東京都は，都民の健康と，生活環境の保全を図るため種々の大気汚染調査を行ってきている．とりわけ降下煤塵の観測は，大気汚染調査における基本的方法の一つとして，古くから実施されてきたが，今日まで継続している例はほとんどない．

当衛生研究所においては，1954年より測定を開始し，以来，現在まで継続観測を行っており，これまでの調査結果については斉藤ら[1~8]，脇坂ら[9~11]，中野ら[12]，佐藤ら[13]，大澤ら[14]が報告している．今回は前報に続く，1989年から1998年までの10年間の，東京都における降下煤塵量の推移についてまとめたので報告する．

測定地点及び測定方法

観測は都内とその周辺に設定した測定地点に簡易式降下煤塵計を設置し，定期的に回収，測定する方法によって行った．測定地点は表-1に示した．区部24地点，及び立川市，八王子市，青梅市，伊豆大島の4地点を含む計28地点で，降下煤塵計を建造物の屋上に設置する必要上，保健所，区役所，学校などの公共施設の所在地を中心に

表1．測定箇所名称一覧

1.千代田区	都庁有楽町庁舎	15.中野区	中野保健所
2.千代田区	東京都がん検診センター	16.杉並区	荻窪地域区民センター
3.中央区	都立築地産院	17.豊島区	豊島池袋保健所
4.港区	区立麻布図書館	18.北区	赤羽保健センター
5.新宿区	都立衛生研究所	19.荒川区	区立荒川図書館
6.文京区	小石川保健所	20.板橋区	板橋高等技術専門学
7.台東区	台東区役所	21.練馬区	練馬保健所
8.墨田区	区立向島児童館	22.足立区	足立区中央本町保健
9.江東区	江東都税事務所	23.葛飾区	葛飾区役所
10.品川区	区立戸越小学校	24.江戸川区	江戸川都税事務所
11.目黒区	目黒区役所	25.青梅市	青梅保健所
12.大田区	糀谷保健福祉センター	26.八王子市	市立第一小学校
13.世田谷区	都立母子保健院	27.立川市	都立衛生研究所多摩支所
14.渋谷区	渋谷区役所	28.大島	島しょ保健所大島支所

* 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
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3－24－1, Hyakuninncho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

選定した.

煤塵計は口径14.5cm，内容積6Lのポリ製簡易式降下煤塵計を特注し用いた．これに蒸留水2Lと，腐敗及び藻の発生を防ぐため0.5%硫酸銅水溶液10mlを添加した後，建造物の屋上に設置した．ただし，クーリングタワーなど降下煤塵量に直接影響を与える設備がない場所に，屋上床面よりの風による粉塵巻き上げを防ぐため高さ1mの架台に乗せた．このように設置した煤塵計は概ね1ヶ月毎に回収した.

回収後の降下煤塵分析は衛生試験法[15]に準じた．すなわち，煤塵ビン内壁をシリコーンゴム製ヘラでこすり落とし，No.5Aろ紙を用いて，残渣とろ液に分け，ろ紙上に残った煤塵以外の物，毛髪，虫，糸くずなどをピンセットで取り除き,ろ紙を90℃で恒量になるまで乾燥後，秤量し，不溶性成分量とした．ろ液は湯浴上で蒸発乾固させ，恒量化したのち秤量し可溶性成分量とした．降下煤塵総量は不溶性成分と可溶性成分を合したもので，1km^{2}当たり30日間の降下煤塵量に換算して表示した.

結果及び考察

東京都における降下煤塵量の各年の月平均値を図-1に示した．1989年から1991年までは総量が8トンを越える月があるが，1992年以降は越えることがなく，減少傾向を示しており，ここ3年間の総量平均値は4.5トンで比較的安定した数値となっている．降下煤塵量の変化は季節変動の影響を受けやすく，冬期から春期にかけて高い数値を示し,夏期から秋期にかけて低い数値を示している．これは，冬期から春期が乾燥期で，煤塵が舞上がり易いことと，降雪によるタイヤチェーンの使用で道路から削られた砂塵や，大陸から偏西風で運ばれた黄砂なども捕集されるためと推測される．この期間は不溶性成分が多く，可溶性成分が少ない現象でも裏付けられる.

可溶性成分はこの10年間で3.3から2.0トンの間で大きな変動はなく，夏期から秋期にかけては，不溶性成分と可溶性成分との間に同量か，僅かに逆転する傾向が見られる.

測定地点の地域用途別を東京都統計年鑑[16]に準じ，商業地区（千代田，中央，港，新宿，文京，台東，渋谷，豊島区の9ヶ所），工業地区（墨田，江東，品川，大田，北，荒川，板橋，足立，葛飾，江戸川区の10ヶ所），住居地区（目黒，世田谷，中野，杉並，練馬区の5ヶ所）に区分けし，それぞれの降下煤塵総量を図-2に示した．商業地区，及び工業地区はほとんど同レベルであり，住居地区は両地区に比べわずかに低い数値を示している．降下煤塵のデータを見る限り東京都は20年ほど前から既に混在地域であり，住居地域の両地域数値への接近は，交通量の増加などが考えられる.

東京都における降下煤塵量の変動は，石炭から石油へのエネルギーの変換，田畑の減少，道路舗装率の増加などにより，煤や，土砂の舞上がり量が減ってきたためと推測され，今後も大きな変動はないであろう.

結　語

1989年から1998年までの降下煤塵量の動向は以下の通りである.

降下煤塵量はわずかづつながら減少傾向を示し，ここ3年間の平均値は4.5トンでほゞ横這い状態である．降下煤塵量は季節変動に左右され，不溶性成分に依存する.

地域用途別の変動は，東京都が混在地域のためその差がなくなりつつある.

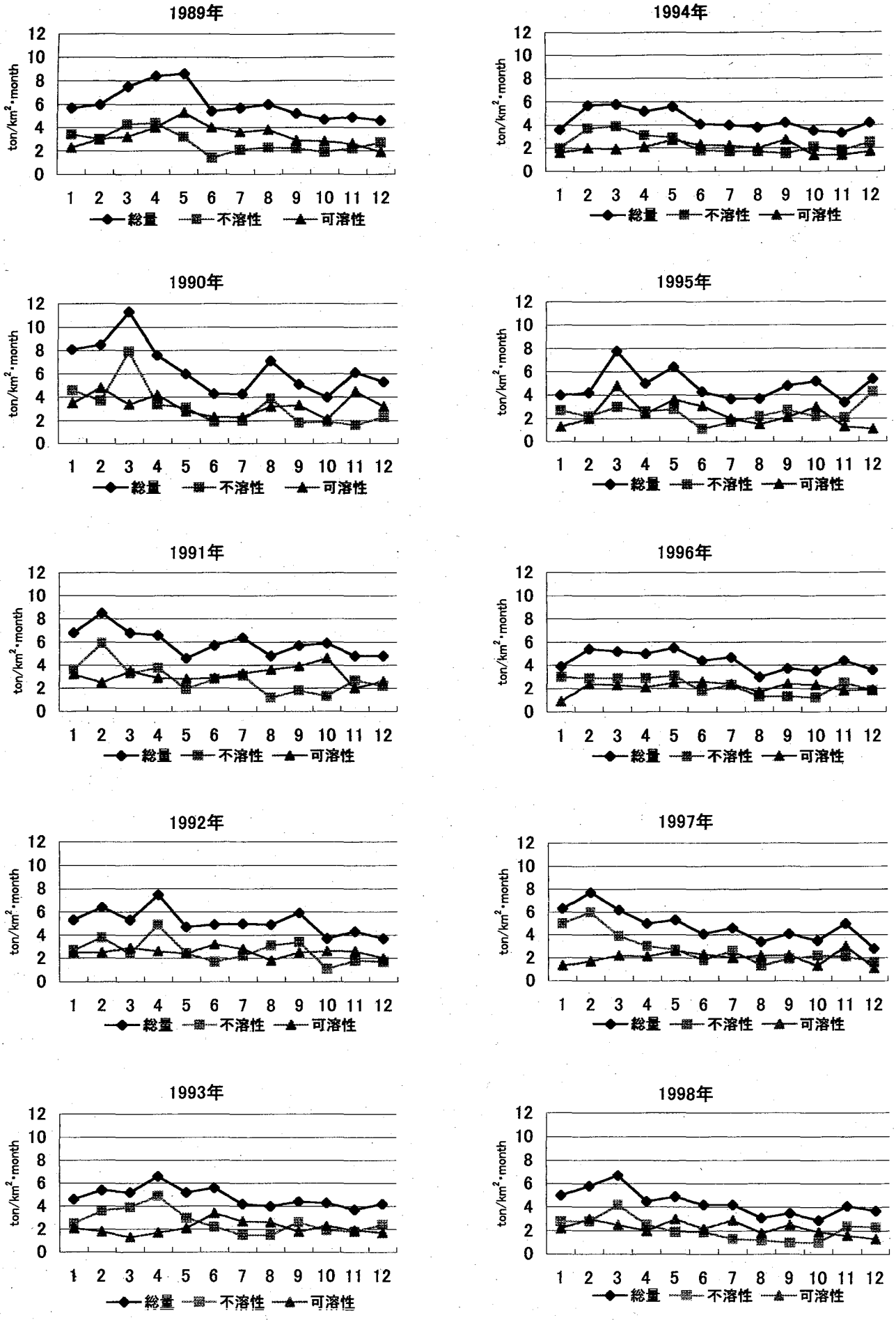


図１．各年における降下煤塵量月平均値

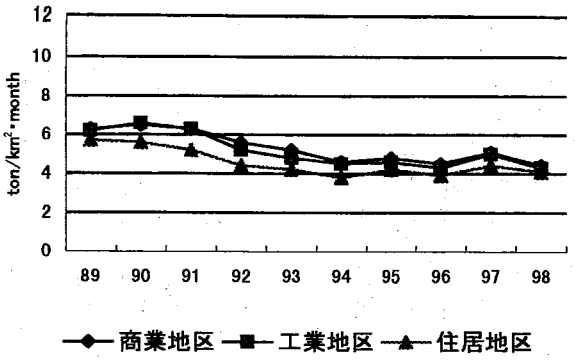


図２．地域用途別降下煤塵総量

文　献

1）斉藤　功，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**6**，51，1954

2）斉藤　功，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**7**，30，1955

3）斉藤　功，両角　清，小林正武：東京衛研年報，**8**，35，1956

4）斉藤　功，小林正武，斉藤喜佐夫，他：東京衛研年報，**9**，59，1957

5）斉藤　功，小林正武，中山袈裟夫，他：東京衛研年報，**10**，45，1958

6）斉藤　功，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**11**，60，1959

7）斉藤　功，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**12**，71，1960

8）斉藤　功，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報：**13**，55，1961

9）脇坂一郎，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**14**，62，1962

10）脇坂一郎，瀬戸孝博，両角　清，他：東京衛研年報，**15**，66，1963

11）脇坂一郎，両角　清，小林正武，他：東京衛研年報，**16**，72，1964

12）中野欣嗣，瀬戸孝博，山崎爽治，他：東京衛研年報，**18**，121，1966

13）佐藤泰仁，牧野国義，狩野文雄，他：東京衛研年報，**26-1**，265，1975

14）大澤誠喜，池田眞悟，福田雅夫，他：東京衛研年報，**35**，296，1984

15）日本薬学会編：衛生試験法注解，1004－1006，1980，金原出版，東京

16）東京都総務局統計部編：東京都統計年鑑，1989～1996

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 249-253, 1999

水道水および水道水中のホウ素

栃本　博*, 高橋保雄*, 中神千穂*,
中川順一*, 真木俊夫*

Boron in Raw Water and Finished Water

HIROSHI TOCHIMOTO*, YASUO TAKAHASHI*, CHIHO NAKAGAMI*,
JUNICHI NAKAGAWA* and TOSHIO MAKI*

Keywords：ホウ素 boron, 水道原水 raw water, 水道水 finished water, 地下水 ground water, 火山島 volcanic island, 分布 distribution

緒　言

1992年に水道水水質基準が改訂され，省令で定められた水質基準に関する事項に加え，監視項目が制定された．これにともなって，1993年から水道水の監視項目についての調査が全国的行われている．当研究所でも1994年から東京都内の水道原水および水道水の監視項目についての調査を実施してきた．その結果，伊豆諸島のA島の水道原水および水道水からホウ素濃度指針値0.2mg/L（現在1mg/L，1998年6月改正）を越えるホウ素が検出された．わが国では水道原水や水道水についてホウ素を主とした調査事例は少なく，限定された地域で地下水を水道原水として利用している地域のホウ素濃度の調査はみられない[1]．

今回は，水道原水および水道水中のホウ素濃度の東京都内島嶼等における分布，火山活動の影響を受けた地下水を水道原水としたA島の水道原水および水道水中のホウ素濃度の分布，経時変化，他の水質項目との関係および浄水場の原水中のホウ素濃度に及ぼす脱塩処理の影響を調査したので報告する．

調査方法

水道水水質監視項目の一つとしてホウ素を水道原水および水道水について，伊豆諸島30ヵ所，小笠原諸島4ヵ所，多摩地域8ヵ所を1996年から1998年の各2月に調査した．

また，A島のN浄水場の水道原水15ヶ所，S浄水場の水道原水4ヶ所，N,S浄水場の原水および浄水の合計23ヶ所の検体を対象に1995年9月から1999年1月まで4ヵ月毎に11回測定した（ただし1998年は5月の代わりに4月に実施，一部地点調査不可の時期あり）．

測定項目は，ホウ素，pH,色度,濁度,過マンガン酸カリウム消費量,蒸発残留物,ナトリウム,硬度,塩素イオン,硝酸性窒素および亜硝酸性窒素の合計10項目である．分析方法は上水試験方法[2]に準じ，ホウ素,硬度,ナトリウム：ＩＣＰ発光分光分析法（poly scan 61E JA），pH，色度：比色法，濁度：透視比濁法，硝酸性窒素および亜硝酸性窒素，塩素イオン：イオンクロマトグラフ法（ダイオネックス DX-120）で行った．統計分析は，マイクロソフトエクセルの分析ツールを用いて行った．

結果および考察

1．東京都内における島嶼等の水道原水および水道水中ホウ素の分布

表1に1995年から1998年の各2月に調査した東京都内における島嶼等の水道原水および水道水中のホウ素濃度を示した．A, C, D, J, K島では，水道原水および水道水からホウ素が検出され，A島では各年とも他の島よりも高い濃度で検出された．E, F, G, H, I島では検出限界(0.02mg/L)または検出限界以下であった．多摩地域のL町,O町では検出されなかった．

地表水中のホウ素は通常我が国では0.01mg/L以下と少ない[3]．地下水，地表水の高い濃度レベルは，火山地帯の地下水，温泉水からの混入，金属表面処理，ガラス等の工場排水が原因している[4]．わが国の温泉水中のホウ素については，メタホウ酸として1キログラム中に5ミリグラム以上（ホウ素として1.23mg）含むものは温

* 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

泉法に定められている「温泉」に該当するため測定されている．中央温泉研究所の報告によるとわが国の温泉水に適合する地下水319件のホウ素濃度の平均値は5.32mg/Lであった[1]．今回のようなホウ素濃度の結果が得られたのは，東京都内における島嶼，伊豆諸島および小笠原諸島が富士火山帯に位置し，A島では活火山が近年噴火(1986年)[5]したためと推定された．

表1．東京都内における島嶼等の水道原水および水道水中ホウ素濃度(mg/L)

島町村	種類	No.	1995	1996	1997	1998	島町村	種類	No.	1995	1996	1997	1998
A島	原水	1	0.27	0.28	0.29	—	G島	原水		ND	ND	ND	0.13
		2	0.30	0.40	0.37	0.32		水道水		ND	ND	ND	0.13
		3	0.19	0.20	0.22	—	H島	原水	1	ND	ND	ND	ND
		4	0.33	0.34	0.40	—			2	ND	0.02	ND	ND
		5	—	—	—	0.29			3	ND	0.02	ND	ND
	水道水	1	0.26	0.37	0.31	0.35		水道水	1	—	0.02	ND	—
		2	0.15	0.24	0.26	0.34			2	ND	0.02	0.04	ND
B島	原水		—	—	ND	ND	I島	原水		ND	0.02	ND	ND
	水道水		—	—	ND	ND		水道水		ND	ND	ND	ND
C島	原水	1	0.02	0.03	0.02	0.02	J島	原水		0.04	0.05	0.05	0.04
		2	0.02	0.04	0.03	0.03		水道水		0.04	0.05	0.06	0.04
	水道水	1	0.03	0.02	0.02	0.02	K島	原水		0.04	0.05	0.04	0.02
		2	0.03	0.03	0.03	0.03		水道水		0.04	0.05	0.06	0.02
D島	原水		0.03	0.02	0.03	0.03	L町	原水	1	ND	ND	ND	ND
	水道水		0.02	0.02	0.02	0.02			2	ND	ND	ND	ND
E島	原水		ND	0.02	ND	0.02			3	ND	ND	ND	ND
	水道水		ND	0.02	ND	0.02		水道水	1	ND	ND	ND	ND
F島	原水	1	—	0.03	0.12	—			2	ND	ND	ND	ND
		2	—	—	—	ND	M村	原水	1	ND	—	ND	ND
		3	0.09	—	—	—			2	—	ND	—	—
	水道水		0.16	0.09	0.13	0.14		水道水		ND	ND	ND	ND

ND:<0.02，－：未測定

表2．A島水道原水および水道水中ホウ素濃度(mg/L)

種類		1995	1996			1997			1998			1999	平均	最大	最小	最大/最小
		9月	1月	5月	9月	1月	5月	9月	1月	4月	9月	1月				
N浄水場水道原水	1	1.67	2.18	1.73	2.10	2.23	2.29	2.19	2.16	2.18	2.16	2.07	2.09	2.29	1.67	1.4
	2	0.74	0.97	—	1.18	1.03	1.12	1.13	1.13	1.12	0.11	0.10	0.86	1.18	0.10	11.8
	3	0.61	0.65	0.61	0.62	0.64	0.65	0.62	0.60	0.48	0.58	0.63	0.61	0.65	0.48	1.4
	4	0.40	0.45	0.48	0.50	0.53	0.53	0.54	0.51	0.55	0.53	0.48	0.50	0.55	0.40	1.4
	5	0.33	0.39	0.35	0.42	0.44	0.47	0.46	0.45	0.47	0.45	0.41	0.42	0.47	0.33	1.4
	6	0.36	0.34	0.38	0.37	0.38	0.39	0.37	0.34	0.37	0.33	0.37	0.36	0.39	0.33	1.2
	7	0.30	0.33	0.34	0.35	0.35	0.36	0.35	0.34	0.35	0.35	0.36	0.34	0.36	0.30	1.2
	8	0.29	0.32	0.34	0.34	0.35	0.36	0.33	0.32	0.34	0.32	0.34	0.33	0.36	0.29	1.2
	9	—	—	0.07	0.12	0.11	0.12	0.35	0.33	0.38	0.32	0.30	0.23	0.38	0.07	5.4
	10	0.17	0.21	0.24	0.26	0.26	0.26	0.26	0.24	0.26	—	—	0.24	0.26	0.17	1.5
	11	0.23	0.25	0.23	0.25	0.25	0.26	0.25	0.23	0.26	0.23	0.20	0.24	0.26	0.20	1.3
	12	0.10	0.11	0.10	0.13	0.03	0.04	0.14	0.15	0.18	0.10	0.11	0.11	0.18	0.03	6.0
	13	0.12	0.10	0.07	0.12	0.11	0.12	0.10	0.10	0.09	0.11	0.11	0.10	0.12	0.07	1.7
	14	0.10	0.11	0.11	0.12	0.10	0.12	0.09	0.10	0.12	0.13	0.10	0.11	0.13	0.09	1.4
	15	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.03	0.04	0.02	2.0
N浄水場	原水	0.40	0.49	0.45	0.36	0.37	0.39	0.35	0.36	0.39	0.32	0.30	0.38	0.49	0.30	1.6
	浄水	0.45	0.50	0.49	0.33	0.39	0.39	0.37	0.38	0.40	0.33	0.31	0.39	0.50	0.31	1.6
S浄水場水道原水	1	0.36	0.44	0.35	0.47	0.44	0.44	0.44	0.43	0.41	0.48	0.45	0.43	0.48	0.35	1.4
	2	0.24	0.32	0.21	0.21	0.31	0.31	0.31	0.15	0.31	0.30	0.32	0.27	0.32	0.15	2.1
	3	0.19	0.21	0.13	0.15	0.22	0.22	—	0.28	—	0.20	0.23	0.20	0.28	0.13	2.2
	4	0.13	0.28	0.27	0.30	0.14	0.14	0.15	0.22	0.15	0.14	0.14	0.19	0.30	0.13	2.3
S浄水場	原水	0.31	0.36	0.32	0.44	0.38	0.38	0.38	0.38	0.31	0.42	0.39	0.37	0.44	0.31	1.4
	浄水	0.34	0.36	0.34	0.38	0.36	0.39	0.39	0.37	0.31	0.43	0.39	0.37	0.43	0.31	1.4

－：未測定

2．A島の水道原水および水道水のホウ素の分布

表2に1995年9月から1999年1月にA島のN,S浄水場の水道原水および浄水のホウ素濃度を調査した結果を示した．水道原水中のホウ素濃度は取水地点によって大幅に異なり，最大と最小は70倍ほど異なった．N浄水場の水道原水15ヶ所の平均濃度は0.44mg/L，S浄水場の水道原水4ヶ所の平均濃度は0.27mg/Lで，N浄水場の水道原水の方が高かった．全水道原水19ヶ所のホウ素濃度は平均0.40mg/Lであった．これらの水道原水中のホウ素濃度は，水道水水質監視項目のホウ素の旧指針値（0.2mg/L）に比較してN浄水場の水道原水では15ヶ所の水源のうち11ヶ所が，S浄水場では4ヶ所のうち3ヶ所が上まわった．現在の指針値と比較するとN浄水場の水道原水の2ヶ所が上まわっているだけである．N浄水場の水道原水の取水地点No.1, 2, 3, 4の濃度が特に高かったが，これらの取水地点は近年噴火のあった火口近くに位置している．No.15の濃度は特に低かったが，この水道原水は他と異なり湧水で，近年の噴火口から最も離れている．S浄水場の水道原水で最も高かったNo.1は，元火山の火口に最も近く位置している．海水中にはホウ素は今回検出された最高濃度以上に含まれている（4.8mg/L[6]）が，A島の水道原水中のホウ素は火山に近い地点から高く検出されることからも火山活動由来であることが推定された．N,S浄水場の原水,浄水の濃度はほとんど同じで，浄水場は違っても濃度は同程度であった．これらの濃度は旧指針値を2倍ほど上まわっており，新指針値以下で，またWHOガイドライン0.3mg/L[3]よりやや高かった．

北海道全域で行われた水道原水と水道水中ホウ素の分布調査によると，全サンプル（温泉近くの水道原水68地点および水道水49地点）の平均値は0.05mg/Lで，旧指針値を超過したものは水道原水では5ヶ所(7％)，水道水では4ヶ所(8％)であった[1]．この調査と比較して，A島の水道原水および水道水中のホウ素濃度が非常に高いことがわかる．しかし，海外の飲料水中のホウ素濃度[7]をみると，アメリカ：0-0.74mg/L,平均0.12mg/L，オランダ：<0.005-0.61mg/L,平均0.02mg/L，ソ連：0.6-6.0mg/L，シェラレオネ：4.6-18.1mg/Lであり，A島の水道水中濃度より高い濃度の飲料水を使用しているところは少なくない．南米チリの鉱山都市アントファガスタ市では，ホウ素濃度が我が国新指針値の5倍濃度の5mg/L前後の飲料水を使用しているが，過去において人体に対して障害になった事例は報告されていない[8]．

次に，今回の3年半の調査期間における経時的傾向をみると，N浄水場の水道原水15ヶ所の内12ヶ所は最大／最小が2以下と変動が少なかった．しかし，他のNo2, 9, 12の濃度(平均0.11-0.86mg/L)の最大／最小は5以上と高く，経時変動が顕著にみられ，No.2では減少，No.9では増加，No.12では減少と増加がみられた．S浄水場の水道原水では，No.1では最大／最小は1.4でほとんど変動はみられず，他の水道原水では最大／最小は2.1-2.3であった．N,S浄水場の原水および浄水の濃度は最大／最小がそれぞれ1.6，1.4で，ほとんど変動がみられなかった．

ホウ素濃度の経年変化の資料については，A島の数ヶ所の温泉水について数年間にわたり調査した報告[9]があり，最大／最小はほとんど2.5倍以上の濃度差がみられている．K県の温泉水の調査では，井戸の掘削後急激に減少した[10]．ホウ素濃度の経時変化の要因は，火山活動による自然現象的な要因と取水による人為的要因が考えられている[9]．

3．A島の水道原水中のホウ素濃度と他の水質との関係

表3に1997年5,9月，1998年1月のA島の水道原水19ヶ所のホウ素濃度と他の水質を平均値で，ホウ素濃度の高い順に示した．項目別にみると，ホウ素濃度は14ヶ所で旧指針値を上まわり，2ヵ所で新指針値を上まわっていた．水道水水質基準値を上まわっているのは，塩素イオン：10ヶ所，蒸発残留物：9ヶ所，硬度：7ヶ所，ナトリウム：6ヶ所，濁度：2ヶ所，色度：1ヶ所であった．水道原水の取水地点別にみると，特にホウ素濃度が高いNo.1は色度,濁度,蒸発残留物,ナトリウム,硬度,塩素イオンが水道水水質基準値を上まわっていた．この地点の水温は，1998年4月，1999年1月の調査では他の地点がそれぞれ24, 23℃以下であったのに対して39, 35℃と高く，火山活動の影響を強く受けているためと考えられる．比較的ホウ素濃度が高いNo.2-6(0.44-1.13mg/L)は，蒸発残留物，ナトリウム，硬度，塩素イオンが，No.8, 11, 12(0.25-0.35mg/L)は蒸発残留物，塩素イオンが，No.9, 14(0.25-0.34mg/L)は蒸発残留物だけが基準値を上まわっていた．ホウ素濃度が低い(0.2mg/L以下)No.16は濁度,蒸発残留物,ナトリウム,硬度,塩素イオン，No.18は蒸発残留物,硬度,塩素イオンが水質基準値を上まわっていた．また，表4は同データを統計処理してホウ素濃度と他の水質項目との相関係数（pH以外は対数変換）を算出したものである．ホウ素とナトリウム，蒸発残留物，塩素イオンおよび硬度は$p<0.001$で弱い正の相関が，過マンガン酸消費量は$p<0.05$で弱い正の相関が認められた．ホウ素とpHは$p<0.001$で比較的強い負の相関が，硝

表3．A島の水道原水中ホウ素と他の水質項目濃度（3回平均：1997年5，9月,1998年1月）

原水	ホウ素 mg/L	pH	色度	濁度	KMnO4 mg/L*	蒸残物 mg/L**	Na mg/L	硬度 mg/L	Cl^- mg/L	窒素*** mg/L
1	2.21	6.7	15	24	9.2	2938	830	471	1300	0.2
2	1.13	6.3	5	<1−2	3.4	2151	475	535	849	0.3
3	0.62	6.6	<1−3	<1	0.8	511	54	279	40	0.7
4	0.53	6.5	<1−2	<1−1	3.1	1233	223	393	429	0.7
5	0.46	6.6	<1−2	<1−1	3.8	1558	253	498	590	0.8
6	0.44	6.9	<1−1	<1	5.4	1784	458	451	850	0.7
7	0.37	7.2	<1−2	<1	1.0	434	60	186	93	1.2
8	0.35	7.0	<1−1	<1	1.7	691	95	253	223	1.6
9	0.34	7.1	<1−2	<1	1.8	622	94	221	180	1.6
10	0.27	6.9	1	<1	0.8	290	38	164	31	2.1
11	0.26	7.2	<1−3	<1	1.9	618	106	199	254	0.5
12	0.25	6.7	<1−1	<1	2.1	793	112	283	252	2.0
13	0.25	7.2	1	<1−1	1.4	480	69	187	136	1.0
14	0.25	7.1	<1−1	<1	1.5	507	88	166	98	0.7
15	0.17	7.3	<1−1	<1	0.9	294	34	123	32	0.7
16	0.11	7.4	6	5	8.3	2695	347	1021	1158	1.0
17	0.11	7.5	<1−3	<1−1	0.9	243	27	127	37	1.4
18	0.10	7.3	<1−1	<1	5.3	1833	178	812	752	1.8
19	0.02	7.5	2	<1−1	1.1	139	11	49	10	1.0

* ：過マンガン酸カリウム消費量

** ：蒸発残留物

***：硝酸性窒素および亜硝酸性窒素

表4．A島の水道原水中のホウ素濃度と他の水質項目との相関

pH	−0.760**
有機物等	0.319*
窒素	−0.538**
塩素イオン	0.527**
ナトリウム	0.674**
硬度	0.479**
蒸発残留物	0.581**

*$p<0.05$, **$p<0.001$, n=56

酸性窒素および亜硝酸性窒素は$p<0.001$で弱い負の相関が認められた．ホウ素濃度とナトリウム，蒸発残留物，塩素イオン，硬度，過マンガン酸カリウム消費量が正の相関を示したのは，ホウ素とともにこれらの水質も火山活動の影響を受けているためと推定される．ちなみに，硬度はカルシウム濃度とマグネシウム濃度から算出したが、どの地点もマグネシウム濃度よりカルシウム濃度のほうが高く，温泉水としての性質を示した[11]．（海水はカルシウム濃度よりマグネシウム濃度の方が高い[6]．）ホウ素濃度とpHが負の相関を示したのは，通常井戸水はpH6.0-7.0の弱酸性を示し，地表水は7.0-7.2を示すが[12]，今回のpHも大体これらの値の範囲(6.5-7.5)を示し，A島ではpHが低いほど火山活動の影響を受けた地下水としての性質を示す傾向があるためと考えられる．また，ホウ素と硝酸性窒素および亜硝酸窒素が負の相関を示したのは，硝酸性窒素および亜硝酸性窒素は，無機肥料の使用，腐敗した動植物，生活排水等に起因し[5]，A島のその濃度は通常の地表水の濃度程度で[5]，A島では火山活動の影響が強い地点ほど動植物が少なく，この濃度が低くなる傾向があるためと推定された．

4．A島の水道原水の脱塩処理の影響

A島では湧き水等はほとんどなく，従来飲み水を雨水に依存していた．しかし，生活用水量の増加にともなって，地下かん水のイオン交換膜電気透析法によるかん水脱塩処理場が建設された[13]．表5にN，S浄水場の原水とそれを脱塩処理した浄水（生産水）のホウ素等10項目の水質測定結果（1997年5，9月，1998年1月）を示した．ホウ素は全く除去されていないが，硝酸性窒素および亜硝酸性窒素,塩素イオン，硬度は80％以上,蒸発残留物は70％以上,ナトリウムは60％以上除去された．近年，膜技術の進歩に伴い逆浸透膜を利用した海水淡水化法が淡水資源が十分でない離島で使用されるようになった．これによると，ホウ素が70-90％程度除去されることが報告されている[1,8]．A島の水道原水も逆浸透膜法により処理すればホウ素濃度の大幅な削減が可能であると推定さ

表5．水道原水の脱塩処理（1997年5，9月,1998年1月）

浄水場	月	種類	ホウ素 mg/L	pH	色度	濁度	KMnO4 mg/L*	蒸残物 mg/L**	Na mg/L	硬度 mg/L	Cl^- mg/L	窒素*** mg/L
N浄水場	5月	原水	0.39	6.7	<1	<1	5.7	1760	246	640	748	1.1
		浄水	0.39	6.3	<1	<1	1.3	452	121	80	127	0.2
	9月	原水	0.35	6.7	1	<1	2.7	1670	246	572	571	0.9
		浄水	0.37	6.1	<1	<1	0.9	439	100	80	110	0.1
	1月	原水	0.36	6.7	1	<1	6.1	1910	252	660	778	1.1
		浄水	0.38	6.1	1	<1	1.6	465	96	87	135	0.2
S浄水場	5月	原水	0.38	7.1	<1	<1	4.4	1526	345	386	731	0.6
		浄水	0.39	6.1	1	<1	1.3	352	100	20	72	<0.1
	9月	原水	0.38	7.0	<1	<1	2.3	1400	313	380	522	1.5
		浄水	0.39	6.5	<1	<1	0.4	410	111	24	82	0.1
	1月	原水	0.38	7.1	1	<1	3.3	1260	258	274	543	0.6
		浄水	0.37	6.4	1	<1	0.9	390	101	22	72	0.1

* ：過マンガン酸カリウム消費量

** ：蒸発残留物

***：硝酸性窒素および亜硝酸性窒素

れる．

まとめ

1）水道原水および水道水中のホウ素は，東京都内島嶼でほとんど検出され，特にA火山島が高かった．

2）A島19ヶ所の水道原水中のホウ素濃度は，0.02-2.09mg/L，平均0.40mg/Lで，火山の火口近くの取水地点で高く検出された．3年半の調査で水道原水中のホウ素濃度の変動がみられた地点は少なかった．A島浄水場の水道原水および浄水のホウ素濃度は0.37-0.39mg/L程度で，経時変動はほとんどみられなかった．

3）A島の水道原水中のナトリウム濃度,蒸発残留物，塩素イオン濃度および過マンガン酸カリウム消費量はホウ素濃度と正の相関が，pH，硝酸性窒素および亜硝酸性窒素は負の相関がみられた．

4）A島浄水場の水道原水中のホウ素は，イオン交換膜透析法による脱塩処理により除去されなかった．

謝辞　採水等に御協力いただいた東京都内島嶼等の町村水道担当の方々に感謝します．

文献

1）厚生省：平成6年度水質管理調査報告書　調査対象ホウ素．

2）厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法1993年版，日本水道協会．

3）World Health Organization Geneva：Guidelines for Drinking-Water Quality 2nd ed. Addendum Volume 2 Health Criteria and Other Supporting Information 1996.

4）厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法解説編1993年版，日本水道協会．

5）伊豆大島火山博物館：ご神火－伊豆大島火山博物館通信，1996，No.2.

6）文部省国立天文台編：理科年表　CD-ROM 99，1999　丸善株式会社．

7）World Health Organization Geneva：Guidelines for Drinking-Water Quality 2nd ed. Volume 2 Health Criteria and Other Supporting Information 1996.

8）宮腰博明，山崎安正，村田直人，他：造水技術，22，(2)，39-46，1996.

9）中央温泉研究所，東京都八丈町,三宅村,神津村,新島村および大島町　温泉基礎調査報告書　平成6年3月．

10）石坂伸之，栗屋透，平野富雄：神奈川県温泉地学研究所報告，17，(5)，115-126，1986.

11）岩崎岩次：温泉工学会誌，26，22-54，1998.

12）岡沢和義：用水と廃水，16，1369-1373，1974.

13）東京都大島町水道課，大島町脱塩浄水場概要．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 254-258, 1999

水素化物発生原子吸光光度法による飲用水中のセレンの分析法の検討

小西浩之*, 五十嵐剛*, 矢口久美子*, 近藤治美*,
鈴木俊也*, 稲葉美佐子*, 鈴木助治*

Study on Determination Method of Selenium in Drinking Water by Hydride-Generation Atomic Absorption Spectrometry

HIROYUKI KONISHI*, TUYOSHI IGARASHI*, KUMIKO YAGUCHI*, HARUMI KONDO*,
TOSHINARI SUZUKI*, MISAKO INABA*and SUKEJI SUZUKI*

Keywords：セレン selenium, 飲用水 drinking water, 多摩地域 Tama district, 水素化物発生原子吸光光度法 hydride-generation atomic absorption spectrometry

緒　言

セレンは，地球上に広く分布する元素で，整流器や色ガラスの製造，殺虫剤や有機合成化学の酸化剤・触媒など、各種工業部門において用いられている．セレンは生体にとって必須元素であるが，過剰に摂取すれば胃腸疾患，関節障害などを引き起こす．また，セレンを高濃度に含む野草，野菜を常食している家畜の慢性中毒症が地方病として知られている．

平成４年12月に公布された水道法に基づく水道水水質基準の改定で，新たにセレンが基準項目に加えられて基準値（10μg/L以下）が設定された．上水試験方法に定められたセレンの測定方法[1]は，水素化物発生－原子吸光光度法（以下HG-AAS法と略す）又はフレームレス－原子吸光光度法である．HG-AAS法はフレームレス－原子吸光光度法より感度が優れていることから，飲用水中の微量のセレンの分析に多く使用されている．この方法は，還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを用い，還元気化されたセレン化水素を加熱石英管に導き，セレンの吸光度を測定する．生体試料，食品[2]，下水試料[3]等については，試料を硝酸－過塩素酸分解して有機セレン等を六価の無機セレン（以下Se(Ⅵ)と略す）とし，更に塩酸で還元して四価のセレン（以下Se(Ⅳ)と略す）としたものを測定する．

水道法による水質試験は上水試験方法に従って行うが，上水試験方法ではSe(Ⅵ)からSe(Ⅳ)への予備還元についての記述はない．しかし，HG-AAS法ではSe(Ⅵ)は検出されず，Se(Ⅳ)のみが測定される[4]ため，試料中にSe(Ⅵ)が存在する場合には，あらかじめSe(Ⅳ)への予備還元が必要である．飲用水中の無機セレンの形態は不明であるため，予備還元を行わない場合，全セレンを測定していない可能性が考えられる．そこで著者らはHG-AAS法における飲用水中のセレン測定上の問題点及び予備還元法について検討した．その結果を応用して東京都多摩地域で利用率の高い井戸水及び湧水395検体を対象にして地下水に含まれるセレンの濃度調査を行い，更にセレンの存在形態とその濃度を求めたので報告する．

実験方法

1．試薬

Se(Ⅳ)標準溶液（100μg/L）：原子吸光分析用セレン標準原液（東京化成工業㈱製，1000mg/L）を精製水で希釈して調製した．この標準溶液を用いて，6 mol/L塩酸濃度になるようにブランク，1.0, 2.0, 3.0及び4.0μg/Lの濃度範囲で検量線用標準系列を調製した．

水素化ホウ素ナトリウム（原子吸光分析用），塩酸（S.S.G., 35.0～37.0%），臭化ナトリウム（特級），次亜塩素酸ナトリウム溶液（化学用）は，和光純薬工業㈱製を用いた。硝酸性窒素標準原液（イオンクロマトグラフィー用，100mg/L），塩化物イオン標準液（化学分析用，1000mg/L），硫酸イオン標準液（化学分析用，1000 mg/L）は，関東化学㈱製を用いた．

* 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, 3－16－25, Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo, 190-0023 Japan

2．装置

原子吸光光度計は，パーキンエルマー社製3300型を水素化物発生装置はパーキンエルマー社製FIAS 400型（加熱石英管付属）を用いた．

3．HG-AAS測定条件

原子吸光光度計－原子化：加熱石英管法，ランプ波長：196nm，ランプ電流：16mA，スリット幅：2.00nm

水素化物発生条件－試料量：500μl，アルゴンガス流量：50ml/min，塩酸濃度：1.2mol/L，水素化ホウ素ナトリウム溶液：1％(w/v)

4．分析方法

セレンの測定は1993年度版上水試験方法のHG-AAS法[1]に従った．

予備還元：Se(Ⅵ)からSe(Ⅳ)への予備還元は，塩酸[5]又は臭化カリウム[6]による還元法に準じた。塩酸による還元では，試料100mlに塩酸2mlを加え，ホットプレート上で沸騰しないように濃縮後，精製水で50ml定容とし，その5mlに塩酸5mlを加えて6mol/L塩酸濃度とし，90℃の水浴上で30分間加熱したものを放冷後，HG-AAS法によりセレンを測定した．

臭化カリウムによる還元法は，試料50mlに塩酸2ml及び臭化カリウム0.75gを加え，ホットプレート上で沸騰しないように約60分間加熱して35mlまで濃縮し，放冷後，塩酸12mlを加え，精製水で50ml定容としHG-AAS法によりセレンを測定した．

本法の検出限界は0.5μg/Lであった．

5．多摩地域の地下水中のセレンの調査

多摩地域の井戸水375検体，湧水20検体について調査した．調査対象井戸水は表4に示すように多摩地域全域から採水した．調査期間は平成10年4月から平成11年3月までの1年間である．

6．飲用水中無機セレンの存在形態別測定

「4．分析方法」の塩酸による予備還元法を応用し，飲用水中のセレンがSe(Ⅳ)又はSe(Ⅵ)であるかの検討を行った．その際，試料100mlを塩酸酸性で濃縮後，10ml定容とし，以下同様に処理して0.1μg/Lの濃度まで測定した．また試料は，多摩地域で採水した水道水17検体，井戸水16検体及び沢水3検体を用いた．

結果及び考察

1．HG-AAS法によるセレンの添加回収試験

上水試験方法では，セレン標準溶液として二酸化セレン（Se(Ⅳ)）を溶かして調製することになっている．水道水及び井戸水各4検体にSe(Ⅳ)を10μg/L添加し，試料調製2時間及び24時間後にHG-AAS法で測定し，回収率を求めた．表1に示すように2時間後のSe(Ⅳ)回収率は，水道水，井戸水とも①ほぼ100%のもの（水道水4，井戸水3，4）と，②大きく減少したもの（水道水1，2，3，井戸水1，2）の2つのグループに分かれた．調製24時間後では，①のグループの回収率に変化はなく，②のグループでは全く検出されなくなった．表2に添加回収試験に使用した試料水の主な理化学試験結果を示した．表1及び2の結果から，残留塩素が検出された検体ではセレン回収率が低下し，残留塩素が不検出のものは24時間後においても回収率が変わらないことがわかっ

表1．HG-AAS法によるSe(Ⅳ)の添加回収試験

試料	回収率（%）	
	2時間後	24時間後
水道水1	50	ND
水道水2	7	ND
水道水3	53	ND
水道水4	94	106
井戸水1	18	ND
井戸水2	ND	ND
井戸水3	103	100
井戸水4	102	106
精製水	100	100

Se(Ⅳ)添加濃度：10μg/L　ND：0.5μg/l未満

表2．試料水の理化学試験結果

	残留塩素 (mg/L)	硝酸性窒素 (mg/L)	塩素イオン (mg/L)	硫酸イオン (mg/L)	pH	過マンガン酸カリウム消費量 (mg/L)
水道水1	0.19	0.7	5.3	10.1	7.4	0.7
水道水2	0.36	3.1	12.3	26.3	7.6	0.5
水道水3	0.25	0.7	5.8	11.2	7.2	0.7
水道水4	ND	3.2	10.7	15.7	7.3	0.3
井戸水1	0.37	0.7	4.5	8.5	8.0	0.3
井戸水2	0.41	ND	6.6	15.0	8.2	0.4
井戸水3	ND	7.3	15.9	16.8	6.2	0.5
井戸水4	ND	8.8	10.0	38.3	6.4	0.4

残留塩素　ND：0.02mg/L未満　　硝酸性窒素　ND：0.1mg/L未満

た.

2．HG-AAS法によるセレン回収率に及ぼす共存イオンの影響

表2に示すように試料水中には，残留塩素の他に硝酸性窒素，塩素及び硫酸の各イオンも共存していたことからセレンの測定に及ぼす共存イオンの影響について検討した．精製水に次亜塩素酸ナトリウムを加えて残留塩素濃度が0.02～0.5mg/Lとなるように段階的に調製し，各々にSe(Ⅳ)を10μg/L添加して2時間及び24時間後のセレンの回収率を求めた．その結果を図1に示した．残留塩素濃度が0.2mg/Lの試料では調製2時間後に回収率が低下し、24時間後には80%となり，さらに0.5mg/Lでは24時間後の回収率は5%以下になった．表1及び2に示した水道水及び井戸水の残留塩素濃度に対する回収率低下と比較すると，低下速度は遅かったが，図1の結果からも試料中の残留塩素がHG-AAS法のSe(Ⅳ)の測定に影響を与えることが明らかになった．また，同様に精製水に市販の各イオン標準液を添加し，硝酸性窒素1～20mg/L，塩素イオン10～100mg/L及び硫酸イオン10～100mg/Lに調製した水溶液にSe(Ⅳ)を10μg/L添加し，24時間後のセレン回収率を求めたところ，図2に示したように硝酸性窒素20mg/L，塩素イオン100mg/L及び硫酸イオン100mg/L濃度の共存で本法によるセレンの測定に影響しないことがわかった．

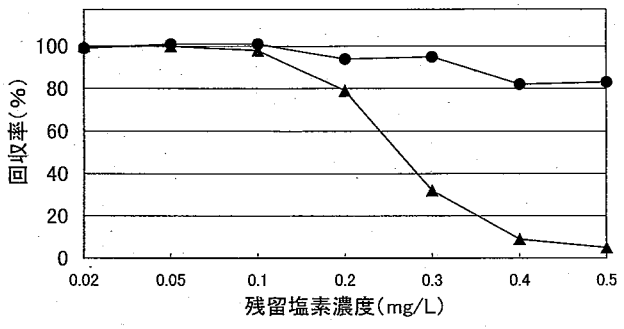


図1．HG-AAS法によるセレンの回収率に及ぼす残留塩素の影響
●：添加2時間後，▲：添加24時間後

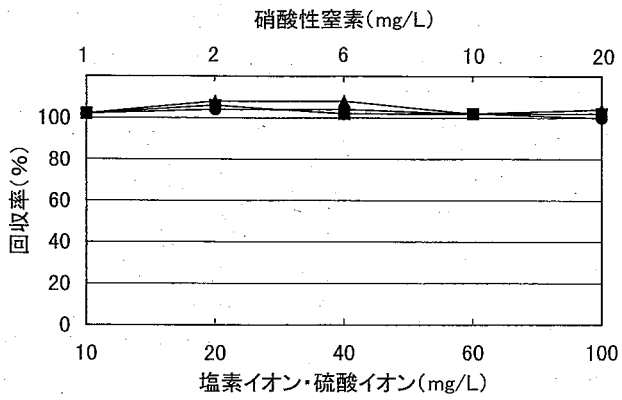


図2．HG-AAS法によるセレンの回収率に及ぼす塩素イオン，硫酸イオン及び硝酸性窒素の影響
●：硝酸性窒素，▲：塩素イオン，■：硫酸イオン

3．予備還元法の検討

Se(Ⅵ)が存在する水試料においてもHG-AAS法によりセレンを測定可能にするためにSe(Ⅵ)からSe(Ⅳ)への予備還元法について検討した．還元法は，6mol/L以上の塩酸溶液を90℃で加熱する方法[5]及び臭化カリウムにより還元する方法[6]について比較した．水道法では，セレンの基準値は10μg/L以下で検出限界1μg/Lを求められているため，実験は1μg/L濃度について行った．即ち，精製水，水道水及び井戸水にSe(Ⅳ)を1μg/L添加し，遮光して室温に24時間放置後，予備還元したものについてHG-AAS法で測定し、これを予備還元しない場合と比較した．表3にその結果を示した．水道水に加えたセレンは予備還元しない場合，検出されなかった．これは残留塩素の影響と考えられる．しかし，塩酸で予備還元したものは100%回収され，臭化カリウムによる方法では今回の実験条件では十分に還元されない場合があった．

以上の結果から，HG-AAS法により飲用水中のセレンを測定するためには，試料中に残留塩素がある場合及びSe(Ⅵ)として存在する可能性がある場合にはSe(Ⅵ)からSe(Ⅳ)への予備還元が必要であり，その還元法としては塩酸による方法が適切であると考えられた．

4．多摩地域の地下水中のセレンの調査結果

多摩地域では，飲用水として地下水の利用率が高いことから，今回検討した塩酸による予備還元を行った後，HG-AAS法で測定し，多摩地域内の井戸水375検体及び湧水20検体についてセレンの濃度調査を行った．表4にその結果を示した．井戸水13検体からセレンが検出され，その濃度は1.0～1.7μg/Lで水質基準値の10μg/Lを超えるものはなかった。いずれも多摩地域北部の井戸水であり，その井戸の深さは多摩地域の帯水層から分類する[7]と20m以内の浅井戸8ヵ所，50m以上の深井戸2ヵ所，深さ不明3ヵ所であった．しかし，検出件数も少なく，基

表3．予備還元法におけるSe(Ⅳ)の回収率

(%)

	塩酸法	臭化カリウム法	予備還元無し
精製水	100±8	100±5	100±4
水道水	100±8	40±11	ND
井戸水	100±8	100±8	100±5

平均値±標準偏差（n=5），Se(Ⅳ)添加濃度1 μg/L
ND：検出限界未満

準値の1/10程度であることから，検出の原因は地質由来であるか，工場廃水等による汚染であるかどうかは不明であった．なお，湧水からは検出されなかった．また，調査した井戸水のおよそ3/4の検体より定性的にセレンの吸収が認められた．

5．飲用水中無機セレンの存在形態別測定

今回の調査の結果から，多くの検体に微量のセレンの吸収が認められたことから，新たに水道水16，井戸水17及び沢水3検体を採水してそれらの存在形態と濃度の把握を試みた．そこで，試料を加熱濃縮して0.1μg/Lまで定量した．HG-AAS法による分析では予備還元を行った場合は全無機セレンが測定され，行わない場合はSe(Ⅳ)のみが測定されることを利用して，飲用水中の無機セレンの存在形態について検討を行った．表5にその結果を示した．水道水16検体のうち，5検体からセレンが0.2～0.4μg/L検出され，その形態はすべてSe(Ⅵ)であった．井戸水については17検体のうち14検体から0.1～0.3μg/L検出され，水道水と同様にすべてSe(Ⅵ)であった．また沢水については3検体のみ行ったが，1検体からSe(Ⅳ)が0.2μg/L検出された．これらの結果から，多摩地域の水道水や井戸水中には0.1～0.4μg/Lのセレンが含まれ，その形態はSe(Ⅵ)であることがわかった．塩素処理が行われていない井戸水においても，セレンはすべて六価であり，地下水中のセレンは六価の存在形態である

表4．多摩地域の地下水中のセレンの調査結果

市町村名	井戸水			湧水	
	調査数(件)	検出数(件)	濃度範囲(μg/L)	調査数(件)	検出数(件)
昭島市	6	0		—	—
あきる野市	26	0		6	0
稲城市	3	0		2	0
青梅市	5	0		—	—
清瀬市	12	2	1.1～1.7	—	—
国立市	3	0		1	0
小金井市	6	0		—	—
国分寺市	16	0		2	0
小平市	20	0		—	—
狛江市	5	0		—	—
立川市	12	0		—	—
田無市	10	2	1.0	—	—
調布市	7	0		—	—
八王子市	61	0		1	0
東久留米市	29	3	1.1～1.2	1	0
東村山市	32	0		—	—
東大和市	14	1	1.0	—	—
日野市	3	0		6	0
府中市	10	2	1.0～1.1	—	—
福生市	2	0		—	—
保谷市	18	1	1.5	—	—
町田市	12	0		—	—
三鷹市	21	0		—	—
武蔵野市	26	2	1.0～1.2	—	—
武蔵村山市	4	0			
奥多摩町	—	—		—	—
日の出町	9	0		—	—
瑞穂町	3	0		—	—
檜原村	—	—		1	0
合計	375	13	1.0～1.7	20	0

—：未調査

表5．飲用水中の無機セレンの存在形態別濃度

水試料	調査数 (件)	Se(Ⅳ) 検出数 (件)	Se(Ⅳ) 濃度範囲 (μg/L)	Se(Ⅳ) 平均値 (μg/L)	Se(Ⅵ) 検出数 (件)	Se(Ⅵ) 濃度範囲 (μg/L)	Se(Ⅵ) 平均値 (μg/L)	残留塩素 検出数 (件)	残留塩素 濃度範囲 (μg/L)	残留塩素 平均値 (μg/L)
水道水	16	0			5	0.2～0.4	0.3	16	0.01～0.52	0.26
井戸水	17	0			14	0.1～0.3	0.2	0		
沢　水	3	1	0.2	0.2	0			0		

と考えられる．このことからも水道水，井戸水，湧水，沢水等の飲用水中のセレンの分析をHG-AAS法で行う場合は，塩酸による予備還元が必要である．

ま と め

1．水素化物発生原子吸光光度法による飲用水中セレンの分析方法について検討した結果，セレンは残留塩素により六価セレンに酸化されること及び井戸水などの地下水中のセレンは六価セレンであったことからセレンを測定する場合，必ず予備還元が必要であることがわかった．予備還元法としては6mol/Lの塩酸酸性下で加熱する方法が優れていた．

2．多摩地域の395検体の井戸水及び湧水についてセレンの濃度調査を行った結果，多摩地域北部の13ヵ所の井戸から1.0～1.7μg/Lのセレンが検出されたが，いずれも水道水水質基準値10μg/L以下であった．

3．飲用水中無機セレンの存在形態別測定を行った結果，沢水で1検体からSe(Ⅳ)が検出されたが、水道水及び井戸水から検出されたセレンはすべてSe(Ⅵ)であった．

文　献

1）厚生省生活衛生局監修：上水試験方法，300-303，1993，日本水道協会，東京．

2）日本薬学会編：衛生試験法・注解，557-558，1990，金原出版，東京．

3）建設省都市局・厚生省生活衛生局監修：下水試験方法（下巻），219-220，1997，日本下水道協会，東京．

4）玉利祐三，吉田昌子，高木　晋，他：分析化学，**41**，T77-T81，1992．

5）渡辺信久：環境化学，**4**，313-324，1994．

6）玉利祐三，小椋広道：分析化学，**46**，313-317，1997．

7）矢口久美子，大橋則雄，渡辺　学，他：東京衛研年報，**35**，363-370，1984．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 259-263, 1999

生活用水からのレジオネラ属菌の検出状況（平成10年度）

矢野一好*, 保坂三継*, 真木俊夫*

Distribution of *Legionella* Species in Domestic Water

KAZUYOSHI YANO*, MITSUGU HOSAKA*
and TOSHIO MAKI*

Keywords：生活用水 domestic water，レジオネラ属菌 *Legionella* species，一般細菌 standard plate count bacteria，大腸菌群 coliforms，老人ホーム home for the aged

緒　言

レジオネラは，1979年に命名された呼吸器系病原細菌である．我々は，これまでに本菌が冷却塔水をはじめ，給湯水や「24時間風呂」の浴槽水中に生息していることを明らかにしてきた[1]．

本菌の感染症は，感染しても発症率が低いことや発症しても適切な治療（抗生物質の投与など）を行えば重篤な臨床症状を呈することが少ないことから，日和見感染と位置づけられている[2]．しかし，1996年７月に発生した慶応大学病院の院内感染事例と，「24時間風呂」のレジオネラ汚染の実態（検出率80％以上）が判明したことから，我が国における本菌による感染症の発生が危惧されていた[3]．

1999年２月15日には，都内の特別養護老人ホーム入所者が同ホームの設備である「24時間風呂」に生息していたレジオネラが原因と考えられる肺炎によって1998年５月に死亡していた事例が報道された．

我々は，このような背景をもとに衛生局生活環境部が企画した「特別養護老人ホームの施設・設備を対象としたレジオネラ生息調査」の一環として採取された生活用水からの本菌検査の概要と，平成10年度中に採取した老人ホーム以外の環境水について行った検査の結果を報告する．

材料と方法

１．試料水

都の市町村に所在する特別養護老人ホーム131施設で平成11年３月に採水された浴槽水及び給湯水など合計225試料をレジオネラ，一般細菌及び大腸菌群試験に供した．採取した試料の内訳は，「24時間風呂」の浴槽水94試料，その他の浴槽水55試料，給湯水69試料，加湿器の水５試料及び冷却塔水，人工池水各１試料であった．

また，平成10年度全期間を通じて当研究科に持ち込まれた老人ホーム以外の試料水454件をレジオネラ検査に供した．試料の内訳は，冷却塔水149試料，「24時間風呂」浴槽水35試料，一般風呂の浴槽水5試料，給湯水195試料，加湿器の水7試料，シャワー水16試料，雑用水41試料及び水泳プール水６試料であった．

２．レジオネラ試験

採取した試料水１Lを上水試験方法記載のフィルター法[4]に従って試験した．すなわち，試料水１Lを孔径0.22 μmの滅菌メンブランフィルターでろ過し，フィルター上の捕捉物を滅菌精製水５mLで洗い出した後，0.2MのHCl-KCl溶液（pH2.2）５mLを添加して15分間酸処理した．この処理液0.5mLをレジオネラ選択培地であるWYO α寒天培地に塗抹し36℃で1週間培養した．結果の判定は，青みを帯びた灰白色の湿潤集落を計数した後，ラテックス凝集反応（OXOID社，*Legionella Latex Test Kit*）及び免疫血清（デンカ生研，レジオネラ免疫血清「生研」）を用いた凝集反応を各集落について行い、陽性となったものをレジオネラとした。

３．一般細菌及び大腸菌群試験

試料水１mLを試料とし，上水試験方法[4]記載の標準寒天培地法によって一般細菌試験を，デソキシコール酸寒天培地法によって大腸菌群試験を行った．

* 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

表1．特別養護老人ホームで採取した水試料からのレジオネラ検出状況

試料水	試料数	検出件数	検出率(%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～
24時間風呂	94	59	62.8	10	15	24	10
その他の風呂							
ろ過あり	21	7	33.3	4	1		2
ろ過なし	34	0					
給湯水	69	1	1.4			1	
加湿器	5	0					
冷却塔水	1	1				1	
人工池	1	0					
合　計	225	68	30.2	14	16	26	12

表2．「24時間風呂」*浴槽水の細菌検査結果

検査項目	検出件数(検出率%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	59 (62.8)	10	15	24	10
一般細菌 ≧1 CFU/mL	76 (80.9)	30	25	13	8
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	6 (6.4)	6			
試料数	94				

*：浴槽水の保温と循環ろ過装置が装着された形式の風呂
一般的に全換水の間隔が長い（数週間）

表3．遊離塩素がない「24時間風呂」浴槽水の細菌検査結果

検査項目	検出件数(検出率%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	50 (84.7)	10	12	22	6
一般細菌 ≧1 CFU/mL	55 (93.2)	19	17	11	8
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	4 (6.8)	4			
試料数	59				

結果と考察

1．特別養護老人ホームの調査結果

特別養護老人ホーム131施設で採取した水試料225件について行ったレジオネラ属菌の分離状況を試料水ごとに整理して表1にまとめた．レジオネラの検出率は，合計で30.2%になった．検出された菌数は10^3レベル，すなわち，1,000～9,900CFU/100mLの範囲が最も多かった．

1）「24時間風呂」浴槽水の検査結果

1996年12月に通産省が指摘して以来，大きな社会問題となっている循環式浴槽，いわゆる「24時間風呂」の浴槽水の細菌検査結果を表2にまとめた．

レジオネラは，94試料中59試料（検出率62.8%）から，一般細菌は，76試料（80.9%）から，大腸菌群は6試料（6.4%）から検出された．

この結果を我々が既に報告した家庭用の「24時間風呂」浴槽水のレジオネラ検査結果[5]と比較すると，検出率，検出菌数共に低い値であった．すなわち，前回行った家庭用「24時間風呂」からのレジオネラ検出率は，82.5%を示しており，検出菌数も陽性試料中の約40%が10^4レベル（今回は約40%が10^3レベル）を示した．このことから，今回調査した老人ホームの「24時間風呂」の浄水性能は，前回調査した家庭用の「24時間風呂」より優れているようにみえる．しかし，今回調査した「24時間風呂」のうち，浴槽水から遊離塩素がまったく検出されなかった試料からの検出率は，84.7%（表3）を示しており，塩素処理が施されていなければ前回行った「24時間風呂」と比較して浄水性能に差がないことから，塩素処理がレジオネラ対策として有効であることが示唆された．なお、浴槽水の塩素濃度と細菌検査の結果については後段にまとめた．

2）ろ過器を装着した浴槽水の検査結果

この風呂の形式は，「24時間風呂」の保温機能を省略したような機構を有しており，ヒトが使用することによって浴槽内に混入する浮遊物をろ過によって除去し，浴槽水の外観をきれいに保持する方式である．従って，浴槽水の全換水は毎日行われることが多いが，ろ過器の洗浄頻度は24時間風呂と同程度と考えられる．

細菌検査の結果は，表4に示したとおりで，レジオネラは，21試料中7試料（検出率33.3%）から，一般細菌は，16試料（76.2%）から，大腸菌群は3試料（14.3%）から検出された．なお，21試料中2試料からは遊離塩素が確認された．

浴槽水からのレジオネラの検出率及び検出菌数は，

「24時間風呂」に比較して低い．しかしながら，「24時間風呂」と同様，ろ過材に捕捉された有機物やアメーバ類を栄養源として，ろ過装置内にレジオネラが生息する可能性が高い．従って，可能な限り頻繁にろ過材を洗浄する等，適切な維持管理が必要である．

3）ろ過器のない浴槽水の検査結果

この風呂の形式は，いわゆる「普通の風呂」と同様，毎日全換水し清掃を行う風呂である．この形式の浴槽水34試料からは，一般細菌，大腸菌群は検出されるが，レジオネラはまったく検出されなかった（表5）．この結果は，既報[5]の調査結果とも一致しており，ろ過器等を装備しない普通の風呂は，レジオネラの生息環境にはならないことが再確認された．

4）給湯水の検査結果

我々は，レジオネラが生息するもう一つの水環境として，給湯設備に着目し，その実態調査を行い，既に結果を報告した[5]．既報を要約すると，給湯水からのレジオネラ検出状況は，給湯方式と給湯温度によって大きく異なることである．すなわち，遊離塩素が残留するような「瞬間湯沸かし方式」の給湯水からはレジオネラがまったく検出されないこと，貯湯式や循環式の場合は給湯温度が低いと検出されるが，給湯温度を55℃以上にすると検出されなくなることを報告した[5]．

表4．「ろ過器を装着した風呂」*の浴槽水の細菌検査結果

検査項目	検出件数 (検出率%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～	5～
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	7 (33.3)	4	1		2	
一般細菌 ≧1 CFU/mL	16 (76.2)	4	3	3	2	4
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	3 (14.3)	3				
試料数	21（うち遊離塩素が確認されたもの：2件）					

＊：保温機能はないが浴槽水を循環ろ過する形式の風呂

表5．「ろ過器のない風呂」*の浴槽水の細菌検査結果

検査項目	検出件数 (検出率%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～	5～
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	0 (0.0)					
一般細菌 ≧1 CFU/mL	26 (76.5)	18	4	3		1
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	7 (20.6)	7				
試料数	34（うち遊離塩素が確認されたもの：6件）					

＊：ろ過装置等の装備がなく，毎日全換水する一般的な風呂塩素処理を併用している場合もある

このような背景をもとに，今回の調査対象である特養老人ホームの施設においても給湯水を試料としてレジオネラ検査を行った．その結果は，表6にまとめたとおりで，レジオネラは69試料検査してわずか1試料から検出されたのみであった．この試料は水温が42.5℃（貯湯槽の水温は不明）と比較的低温であったため，レジオネラが検出されたものと推測した．その他の試料の給湯温度は，栓出水で最低41℃であり，貯湯槽の水温はほとんどの施設で55℃以上を保持していた．

一般細菌数は，水道法による飲料水としての基準（100個以下/mL）を満たさないものが1試料あったが，大腸菌群は全ての試料で不検出であった．

5）試料水の遊離塩素濃度と細菌検出状況

供試した試料水のうち，遊離塩素濃度の測定データが完備している201試料について，遊離塩素濃度のレベルと細菌の検出状況を対比させて表7に示した．その結果，遊離塩素濃度が0.1mg/L以上あれば，1例を除いて今回の調査項目としたレジオネラ，一般細菌，大腸菌群の検出は認められなかった．この結果から，浴槽水の遊離塩素濃度を0.1mg/L以上に保持することが，レジオネラ対策として効果的であると考えられた．しかし，例外と考えられた1試料の遊離塩素濃度は，0.7mg/Lとなってい

表6．給湯水の細菌検査結果

検査項目	検出件数 (検出率%)	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	1 (1.4)			1*	
一般細菌 ≧1 CFU/mL	14 (20.3)	13	1		
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	0 (0.0)				
試料数	69				

＊給湯温度：42.5℃

表7．試料水の遊離塩素濃度と細菌検出状況

検査項目	遊離塩素濃度(mg/L) 0	0<～<0.1	0.1～<0.2	0.2～<0.5	≧0.5	合計*
レジオネラ ≧2 CFU/100mL	53 (43.4)	4 (15.4)	0	0	1 (6.3)	58 (28.9)
一般細菌 ≧100CFU/mL	50 (40.1)	5 (19.2)	0	0	0	55 (27.4)
大腸菌群 ≧1 CFU/mL	12 (9.8)	3 (11.5)	0	0	1 (6.3)	16 (8.0)
試料数	122	26	18	19	16	201

＊：遊離塩素濃度の測定データがあった試料
（ ）内の数値は，各塩素濃度ごとの試料数を母数とした検出率(%)を示す

表8．塩素以外の殺菌・除菌処理と細菌の検出状況

処理方法	件数	一般細菌*1	大腸菌群*2	レジオネラ*3
オゾン	27	15	1	23(85.2)
銀イオン	6	2	2	1(16.6)
紫外線照射	1	1		
銅イオン	1	1		1
麦飯石	1	1		1
塩素	201	55	16	58(28.6)

＊1：試料1mLあたり100CFU以上の試料数
＊2：試料1mLあたり1CFU以上の試料数
＊3：試料100mLあたり2CFU以上の試料数
( )内の数値は検出率(%)を示す
各処理方法とも処理方式・濃度等の詳細は不明

表9．浴槽水から検出されたレジオネラの血清群

L. pneumophila 血清群	株数*	検出菌数(log) ≧1～	2～	3～	4～
1	10(14.3)	4	3	3	
2	1(1.4)			1	
3	24(34.3)	4	7	10	3
4	1(1.4)				1
5	29(41.4)	5	7	12	5
6	2(2.9)		1		1
不明	3(4.3)	2		1	
合　計	70	15	18	27	10

＊：同一試料で複数の血清群が検出されたものを含む
( )内の数値は総株数に対する検出率(%)を示す

た．このことは，細菌が水中の有機固形物等に付着した状態で水中に浮遊していて，塩素の殺菌効果が十分に反映しきれなかったためと考える．

6）塩素以外の方法による殺菌・除菌効果

今回の調査対象となった施設では，浴槽水の殺菌・除菌方法として小数例ではあるが塩素以外の方法を採用している浴槽があった．それらの方法と細菌類の検出状況を表8に示した．

比較的例数が多かったオゾン処理の効果をレジオネラの検出状況を指標にみると，27事例中23事例（85.2%）からレジオネラが検出されており，オゾンによる殺菌効果は認められなかった．オゾンによる水中微生物の一般的な殺菌効果は，塩素の数倍であるというのが定説[6]であるので，今回調査した浴槽水での結果は理解しがたい．詳しいデータがないので断言はできないが，おそらく，オゾンの吹込濃度と吹込時間が極端に短い（1日に15分程度）のではないかと思われる．また，オゾン処理の実用化に向けては，オゾン発生器のコスト，電気代等の維持費，余剰ガスの浴室内への充満など，様々な課題がある．

銀イオンによる処理では，6事例中1事例のみレジオネラが検出されており，殺菌効果が期待できそうであるが，実用化に向けては，処理濃度や対象微生物についての詳細な検討が必要であろう．

その他，紫外線照射，銅イオンの添加，麦飯石によるろ過処理等の事例もあるが，その効果については引き続き検討する必要がある．

7）浴槽水から検出されたレジオネラの血清群

今回の調査で浴槽水から検出された*L.pneumophila*の血清群を整理して表9に示した．検出されたレジオネラは，現在市販されている*L.pneumophila*の抗血清及びラテックス凝集反応キットで同定し血清群の分類を行った．今回分離した70菌株は，すべてが*L.pneumophila*と同定され，その内の67株は血清群の分類ができた．群別できなかった残りの3株もラテックス凝集反応によって2群から14群のいずれかであると推定された．

今回調査した浴槽水からの検出頻度は，5群が41.4%と最も高く，次いで3群（34.3%），1群（14.3%）であった．この傾向は，既報[5]の結果とも一致した．すなわち，既報では，5群が38.8%，次いで3群（26.3%），1群（13.8%）となっており，浴槽水から高頻度に検出される血清群は酷似していた．

これに対して，冷却塔水からは1群が高頻度（81.3%）に検出される[5]傾向にあり，両者に明らかな違いがみられる．その原因として，現段階では推測の域を脱しないが，試料水の水温との関連が考えられる．すなわち，冷却塔水は最高水温でも35℃を越えることが少なく，絶えず外気温に影響されて水温が変動するが，浴槽水は40℃程度で一定しているため，温度条件によって特定の血清群が淘汰されるのではないかと考えられる．

2．その他の環境水からのレジオネラ検出状況

本報に記載した特養老人ホームの調査を除いて，平成10年度中に当研究科が試験した環境水からのレジオネラ検出状況を表10にまとめた．検査総数は，454試料であり，レジオネラの検出率は19.8%であった．検出率の高い試料は，冷却塔水と「24時間風呂」の浴槽水である．しかし，いずれも30%程度の検出率であり平成9年度までの検出率[5]に比較して低率である．すなわち，平成9年度までのデータでは，冷却塔水50%，「24時間風呂」83%となっている．このことは，冷却塔や「24時間風呂」の維持管理が改善されてきたとも考えられるが，別の観点から推測すると，いずれの設備も検査が義務づけられていないので，維持管理の悪い施設の設備は検査すら実施せず，維持管理の良好な施設の試料水が集中した可能

表10. レジオネラ属菌の検出状況（平成10年度）

試料水	試料数	陽性数	検出率(%)	菌数/100mL
冷却塔水	149	43	28.9	18～22,000
24時間風呂	35	10	28.6	260～24,000
一般風呂	5	0		
給湯水	195	36	18.5	2～26,000
加湿器	7	1	14.3	120,000
シャワー	16	0		
雑用水	41	0		
プール水	6	0		
合　計	454	90	19.8	

性もある.

検査件数が最も多い給湯水からは，18.5%の検出率を示しており，既報[5]の12.5%と大差ない結果となった.

給湯水のレジオネラ対策は，我々のこれまでの調査[5]によって，給湯温度を55℃以上に保つことで改善されることがわかっているので，関連各機関等を通じた情報提供サービスが必要であると考える.

結　論

平成10年度に水質研究科に搬入された水試料について，レジオネラ等の検査を行い以下の結果を得た.

1）東京都の市町村に所在する特別養護老人ホーム131施設で採取した水試料225件について，レジオネラ，一般細菌及び大腸菌群試験を行った.

レジオネラは，「24時間風呂」浴槽水94試料中59試料（62.8%）から検出された．試験に供した94試料のうち遊離塩素が確認されない浴槽水（59試料）は，84.7%（50試料）の検出率であった．このことから，浴槽水のレジオネラ汚染防止対策としては，塩素処理が有効であると考えられた．24時間風呂とは形式が異なる「加熱装置はないが循環ろ過装置を装着した風呂」の浴槽水21試料からは33.3%（7試料）の検出率であった．一方，毎日全換水する「いわゆる普通の風呂」34試料からはまったく検出されなかった．この結果からも，生物浄化作用があるろ過装置がレジオネラの生息場所となっている可能性が示唆された．浴槽水から検出されたレジオネラ70株の血清群は，*L.pneumophila*の5群が29株（41.4%）と最も多く，次いで3群24株（34.3%）であった.

給湯水69試料では，1試料からレジオネラが検出されたのみであった．また，検査試料数は少数であるが，加湿器の水5件及び人工池の水1件からは不検出であり，運転休止中の冷却塔水1件からは検出された.

一般細菌の検出率は風呂の形式に関係なく76～90%の検出率であり，大腸菌群は6～20%の検出率であった.

2）特養老人ホーム以外の試料水454試料からのレジオネラ検出率は19.8%であった．検出率の高い試料水は，「24時間風呂」浴槽水28.6%（35試料中），冷却塔水28.9%（149試料中），給湯水18.5%（195試料中）であった.

謝辞　本調査に供した試料水の採水は，都保健所及び食品環境指導センターの環境衛生監視員によって行われたことを記して関係各位に深甚なる謝意を表する.

文　献

1）古畑勝則，他：日本公衛誌，**41**, 1073-1083, 1997.
2）藪内英子：医学細菌学，第2巻，*Legionella*, 1987, 菜根出版，東京.
3）藪内英子：環境感染，**11**(3), 221-227, 1996.
4）日本水道協会：上水試験方法，520-523, 1993，日本水道協会，東京.
5）古畑勝則：防菌防黴，**25**(6), 369-377, 1997.
6）水環境学会「水中の健康関連微生物研究委員会」：水中の健康関連微生物シンポジウム講演集，48-120, 1995.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 264-268, 1999

水環境試料中のクリプトスポリジウムの検出方法並びに検査結果（平成９年度，10年度）

保坂三継*, 矢野一好*, 眞木俊夫*,
鈴木淳**, 村田理恵**, 村田以和夫**

Survey of *Cryptosporidium* Oocysts in Environmantal Water Samples (Apr. 1997～Mar. 1998)

MITSUGU HOSAKA*, KAZUYOSHI YANO*, TOSHIO MAKI*,
JUN SUZUKI**, RIE MURATA** and IWAO MURATA**

Keywords：クリプトスポリジウム *Cryptosporidium*, 原虫 protozoa, ジアルジア *Giardia*, 水道水 drinking water, 水道原水 raw water, 浮遊分離 flotation separation, 沈殿分離 sedimentation separation, 間接免疫蛍光抗体染色 indirect immunofluorescent antibody staining

緒　言

1996年６月に埼玉県越生町で原虫クリプトスポリジウム *Cryptosporidium* による下痢症が集団発生[1]したことを契機に，水道水等のクリプトスポリジウム汚染に対する関心が高まっている．東京都においては，都水道局が管理する浄水場の原水・浄水については水道局自らが検査しているが，多摩地区や島嶼など都内のそのほかの水道に関しては衛生局生活環境部の「水道における感染性微生物の実態調査」の一環として当研究所が検査を行っている．また，水道水や河川水以外にも，都市環境水によるクリプトスポリジウム水系感染防止の観点から，雑用水等についても検査を行っている．

水中にごくわずかしか存在しないクリプトスポリジウムのオーシストを検出するための公定法は定められておらず，様々な試験法が現在も開発途上にある．厚生省は，水道水を原因とするクリプトスポリジウム症集団発生時の試験方法として「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」（以下「暫定試験方法」という）を通知している[2]．この「暫定試験方法」はその名の通り，暫定的に定められた方法であり，また水道水以外の環境水試料に適用するにはいくつかの問題がある．そのため，多くの機関によって様々な改良の試みがなされ，それぞれに独自の修正を加えた試験方法が用いられている．したがって，各機関での検査結果の評価はそれぞれの試験方法の理解の上に行わなければならない．さらに，今後のクリプトスポリジウム試験方法の統一や公定法化を指向した試験方法の開発・発展に資するためには，各機関で実施している現行の試験方法について明らかにしたうえで，それによる試験結果が公表されることが必要である．こうしたことから，本稿では現在筆者らが用いている試験方法(図１のフローチャート参照)について，「暫定試験方法」との比較検討を加えるとともに，平成９年度並びに10年度のクリプトスポリジウム検査結果についても考察した．

材料と方法

１．試料水

１）水道水及び水道原水　平成９年６月～平成10年３月及び平成10年６月～平成11年１月の間に，東京都多摩地区及び島嶼（伊豆諸島，小笠原）並びに東京都外の水道施設から採取された浄水53検体及び原水67検体（河川水47検体，井戸水20検体）について試験した．

２）雑用水　平成９年４月～10月及び平成10年４月～平成11年10月の間に都内で採取された逆浸透（RO）膜ろ過処理された下水再生水14検体及びこれを利用した親水河川水14検体について試験した．

２．クリプトスポリジウムオーシスト検査方法

水試料からのクリプトスポリジウムオーシストの検出フローを図１に示す．

＊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微生物部細菌第二研究科

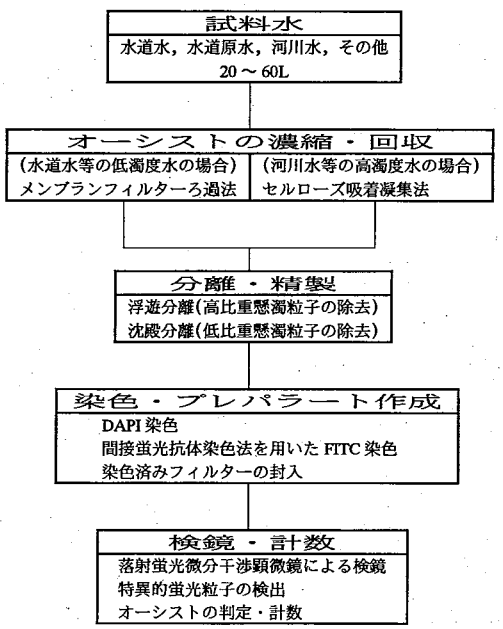


図1．水試料からのクリプトスポリジウム試験フロー

1）試料水の濃縮　水道水等の低濁度試料水についてはポリカーボネート製メンブランフィルター（直径90mm，孔径1.0μm，CORNING）でろ過し，このフィルターをPBS（リン酸塩緩衝食塩水，pH7.4），次いで0.1%Tween80加PBS中で超音波処理して懸濁粒子を回収した．河川水等の高濁度試料水については筆者らがすでに報告した「セルロース吸着凝集法」[3]で濃縮した．

2）オーシストの分離・精製　濃縮試料からのクリプトスポリジウムオーシストの分離精製は，佐野ら[4]の「浮遊分離」と「沈殿分離」の組み合わせ処理によって行った．すなわち，比重1.2のショ糖液を用いた浮遊分離法によってオーシストよりも比重の大きな粒子を除去した後，0.01%Tween80を添加した比重1.05ショ糖PBS中で遠心処理する沈殿分離法により，オーシストよりも比重の小さい粒子を液層に懸濁させたまま，沈査中にオーシストを沈殿回収した．

3）オーシストの蛍光染色　オーシストの蛍光染色は猪又ら[5]の方法で行った．すなわち，精製試料を沸騰水中で加熱処理した後，親水性PTFE（ポリテトラフルオロエチレン）メンブランフィルター（直径25mm，孔径1.0μm，ADVANTEC）でろ過し，フィルター上の全面に精製試料を保持したまま，DAPI（4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride，0.4μg/mL）による核染色並びに染色キット（HYDROFLUOR-Combo Kit，Ensys Inc.)を用いたFITC(Fluorescein-5-isothiocyanate)によるオーシスト壁の染色を施した．染色済みのフィルターはスライドガラス（35×76mm）に載せ，水系封入剤（フルオプレップ，bioMerieux）を滴下，ネールエナメルでカバーガラス（26×26mm）を封じてプレパラートとした．

4）オーシストの判定と計数　蛍光染色したプレパラートは微分干渉落射蛍光顕微鏡（OLYMPUS製BX-50及びNIKON製E1000）で検鏡し，「暫定試験方法」に示されたクリプトスポリジウムオーシストの染色像並びに微分干渉像の特徴に基づいて判定と計数を行った．すなわち，

①縁辺部に強い青りんご色の特異蛍光があり，中央部の蛍光は弱い，

②直径約5μm（3.5μm～6.5μm）の類円形，

③内部が赤色や黄色を呈さない，

という3条件をすべて満たすものを特異的蛍光粒子として検出し，さらに，

①蛍光抗体染色像又は微分干渉像で明らかに縫合栓が確認される，

②微分干渉像でスポロゾイト（1～4個）が確認される，

③DAPI染色でスポロゾイトの核（1～4個）が明瞭に観察される，

という3条件のいずれかに該当するものをクリプトスポリジウムオーシストと判定した．

結果及び考察

1．水試料からの懸濁粒子の濃縮法

1）水道水等の低濁度試料水の場合　平成9年度及び10年度の一部の試料については，セルロース混合エステル製メンブランフィルターでろ過し，このフィルターをアセトンで溶解して懸濁粒子を回収する方法を用いてきた．この方法は「暫定試験方法」で標準法とされているが，フィルターの溶解を完全に行うためにアセトン処理を繰り返す必要があり，これに伴ってアセトン廃液が大量に出ることなど，クリーンアナリシスの観点からは好ましい方法ではない．アセトン処理によってクリプトスポリジウムオーシストが濁質とともにコロイドに埋もれてしまう可能性[6]も指摘されている．またセルロース混合エステル製のメンブランフィルターはその構造上，捕捉された粒子が細孔内部に入り込んでしまう[7,8]ため，5分間の超音波処理後もオーシストが完全に回収されないことが報告されている[9]．一方，ポリカーボネート製メンブランフィルターによるろ過法はUSEPA（米国環境保護庁）のクリプトスポリジウム検査方法の1997年草案[10]に示されており，「暫定試験方法」でも濃縮法の一つとなっている．このタイプのフィルターは細孔の孔径が均一で表面が平滑であるため，懸濁粒子はフィルターの表

面で捕捉され，剥離が容易である．ポリカーボネート製メンブランフィルターに捕捉されたクリプトスポリジウムオーシストは１分間の超音波処理で完全に回収することができる[9]．ただし，懸濁粒子の表面捕捉性が良い反面，目詰まりしやすいため，フィルターの交換は早めに行う必要がある．またフィルターホルダーのベースのタイプ(例えばメッシュスクリーンタイプのもの)によっては支持基材とフィルター下面の細孔開口部が密着し，ろ過効率が低下する．これを防ぐため，フィルターとフィルターベースの間に合成樹脂製の中間パッドを挿入してその効果を検討した．その結果，フィルターの密着による影響の小さい焼結ガラスベースを用いて井戸水のような濁質の少ない水をろ過した場合でも，20Lのろ過所用時間は中間パッドを挿入することで最大で１／２に短縮できることが明らかとなった．(表１)．

２)環境水等の高濁度試料水の場合　濁りの多い水や，かならずしも高濁度ではなくとも無機，有機の様々な微細懸濁物が含まれている原水等の環境水の濃縮はフィルターろ過法では困難である．こうした水に対してはすでに報告したセルロース吸着凝集法[3]を用いている．本法によれば，大量（40～60L）の河川水などでも短時間に効率的に濃縮することが可能で，特段の機械装置も不要である．

「暫定試験方法」はもともと環境水を対象にしていないが，これに対応する方法としては遠心沈殿法が記されている．遠心沈殿法の回収効果はよいが，大量の水を処理するには大型遠心機や連続遠心機などの特殊な遠心分離機が必要であり，また処理に長時間を要する．

２．オーシストの分離精製

特に水道原水や河川水などの環境水中には微細藻類や細菌類，自由生活性原生動物，それらの死骸や破片，あるいは有機性コロイドなど，オーシストよりも低比重の懸濁粒子が多量に存在するため，「暫定試験方法」に記載された「密度勾配遠心法（浮遊法)」ではこれらを除去することができず，以後の処理工程や検鏡作業に対して著しい妨げとなっている．また，誤陽性の原因となる危険もある．これらを除去する方法として，佐野ら[4]は「浮遊分離」と「沈殿分離」の組み合わせ処理を行い，良好な結果を得ていることから，この方法を採用した．なお，「暫定試験方法」には「免疫磁性体粒子法（磁気ビーズ法)」が記されているが，磁気ビーズ法は河川水濃縮物のような高濁度試料あるいは下水性（有機性）懸濁物質を多量に含む試料では分離効果が低下することや，製品によって分離効果が著しく異なることがわかっており[11-13]，またクリプトスポリジウムと同じく水系感染する病原性原虫であるジアルジア*Giardia*を同時精製できる製品は限られている．

表１．ポリカーボネート製メンブランフィルターによる試料水ろ過時間への中間パッド挿入の効果(*)

	中間パッドの有無によるろ過所要時間		
	有り	無し	所要時間比(有：無)
都内井戸水A	50分	105分	1：2.1
都内井戸水B	25分	30分	1：1.2
都内井戸水C	28分	47分	1：1.7
衛研新館水道水	35分	45分	1：1.3

(*) 孔径1.0μm，直径90mmのポリカーボネート製メンブランフィルターを焼結ガラスベースのホルダーに装着して使用．
試料水各20Lを水流アスピレーターで吸引ろ過．

３．オーシストの蛍光染色

平成９年度及び10年度の一部の試料では，精製試料をさらに精製水とアセトンで処理した後，スライドグラス上に塗布・固定し，これを直接蛍光抗体法で染色していた．その後，透明化処理の不要な親水性PTFEメンブランフィルターを用い，フィルターホルダーに装着したフィルター上の全面に精製試料を保持したまま，吸引操作によってDAPIとFITCによる二重染色を行う方法に変更した．この方法はスライドグラス法のように染色や洗浄操作に伴うオーシストの剥離・流出の心配がなく，「暫定試験方法」のように染色や洗浄の度ごとにフィルターをホルダーから取り外して湿箱に移し，また再びホルダーに戻すといった操作が不要で，操作ミスや事故によって試料を損失する危険がない．また，フィルター上に撥水ペンで直径約15mmの円を描き，その円内で精製試料のろ過や染色処理を行う「暫定試験方法」に比べてろ過面積が大きく，それだけ検鏡時間は要することになるが，懸濁粒子が広い面積に分散するので，懸濁粒子の重なりによってオーシストの観察が妨げられる危険が小さい．

DAPIによる核染色は，蛍光抗体染色法による蛍光陽性粒子をオーシストと判定するための重要な処理であるが，新鮮なオーシストはむしろDAPIで核が染まらないことが報告されている[14]．「暫定試験方法」ではこの問題に対する解決法に触れていないが，筆者らは猪又ら[5]の検討結果に基づき，染色前に精製試料を沸騰水中で５分間加熱する処理を導入して良好な染色像を得ている．

４．検鏡とオーシストの判定

微分干渉落射蛍光顕微鏡による蛍光染色プレパラートの検鏡とオーシストの判定は，基本的には「暫定試験方法」に従っている．なお，現在用いている蛍光染色キッ

表2．環境水からのクリプトスポリジウム試験概要（平成9年度）

試料水	試料数	供試水量別内訳 20L	40L	60L	陽性件数
水道原水					
河川水	19	10	9		0
井戸水	13		8	5	0
浄水	17		15	2	0
雑用水					
RO膜処理水(*)	7			7	0
親水河川水	7			7	0
合　計	63	10	32	21	0

（*）逆浸透膜処理した下水処理水

表3．環境水からのクリプトスポリジウム試験概要（平成10年度）

試料水	試料数	供試水量別内訳 20L	40L	60L	陽性件数
水道原水					
河川水	28	26	1	1	0
井戸水	7	1	6		0
浄水	36	1	34	1	0
雑用水					
RO膜処理水(*)	7			7	0
親水河川水	7			7	0
合　計	85	28	41	16	0

（*）逆浸透膜処理した下水処理水

トはクリプトスポリジウムのオーシストとジアルジアのシストの同時染色が可能であり，ジアルジアのシストについても「暫定試験方法」に示された判定基準に基づいて検出と計数を行っている．

5．クリプトスポリジウム検査結果

平成9年度と10年度に行ったクリプトスポリジウム検査結果を表2及び表3に示す．水道原水としての河川水及び井戸水，浄水，並びに雑用水としてRO膜処理水と親水河川の水について，平成9年度は合計63検体，平成10年度は合計85検体を試験した．結果は，すべての検体でクリプトスポリジウムのオーシストは不検出だった．このうち，河川水の一部の試料では蛍光抗体陽性粒子が見られたが，これらはいずれもオーシストと判定する要件を満たしていなかった．なお，ジアルジアのシストについても，河川水のいくつかの試料でシストのサイズの範囲にある蛍光抗体陽性粒子が見られたが，これらについてもジアルジアのシストとして判定する要件には一致しなかった．

6．水道原水（河川水）の汚染評価

クリプトスポリジウムによる汚染のおそれの判断として，厚生省の「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」[15]では糞便性大腸菌群や大腸菌，糞便性連鎖球菌，嫌気性芽胞菌などの糞便汚染指標細菌の検査が記されている．平成10年度に試験した28件体のうち21検体では原虫試験と同時にこれらの汚染指標細菌の分析を行った．大腸菌は陽性率15／21，検出菌数の範囲は，例外的に4,900MPN/100mLと多かった1検体のほかは4.5～240MPN/100mLであった．また嫌気性芽胞菌では陽性率8／21，検出菌数の範囲は1～12CFU/100mLであった．橋本ら[16]は相模川水系の多くの地点で最大100Lの河川水を用いた原虫試験と汚染指標細菌の分析を行っている．そこで，汚染指標細菌の検出状況から判断して，橋本らの調査地点のうち最も糞便汚染が小さいと考えられる3地点を選び，筆者らの河川水の分析結果と比較した(表4)．その結果，汚染指標細菌の検出範囲については相模川水系の3地点と筆者らの河川水はほぼ同様であった．しかし，相模川水系でクリプトスポリジウムが検出されなかった半原地点でもほとんどすべての検体から汚染指標細菌が検出されていたのに対して，筆者らの河川水では大腸菌については3割，嫌気性芽胞菌については6割の検体で不検出であり，汚染指標細菌の陽性率が小さいことが明らかとなった．このことから，筆者らが調査した河川水は，今回分析した試料に基づく限り，現状では糞便汚染があまり進んでおらず，そのためクリプトスポリジウム等による汚染程度も比較的低かったのではないかと考えられる．

しかしながら，今回報告した水道原水の河川水については，表2及び表3で示した通り，その約8割が20Lで原虫類の試験を行ったものである．USEPAは飲料水由来の病原微生物感染の許容感染確率として10^{-4}/年（年間1万人に1人が感染する確率）以下を提案しており，Haasら[17]はクリプトスポリジウムによる感染リスクモデルに基づいて，感染確率10^{-4}/年以下に抑えるための水道原水中のクリプトスポリジウム許容濃度として3オーシスト/100L以下という値を提示している．したがって水道水のリスク評価の観点からは，20L規模の河川水の試験ではUSEPAの許容感染確率を評価するには十分とはいえない．クリプトスポリジウムによる水道水のリスクをより詳細に評価するためにはさらに大量の水についての試験が求められ，そのためにも効率的で迅速な試験法の開発に取り組む必要がある．

結　論

厚生省による水道水のための「暫定試験方法」を基本としつつ，これまでの報告を参考にして環境水への適用

表4．水道原水（河川水）における糞便汚染指標細菌と原虫の検出状況

			糞便汚染指標細菌		原虫		
			大腸菌	嫌気性芽胞菌	*Cryptosporidium*	*Giardia*	備考
水道原水[*1]		検出範囲[*2]	4.5～240(4,900)[*4]	1～12	不検出	不検出	多摩地区
（河川水）		陽性率[*3]	15/21	8/21	0/21	0/21	及び島嶼
中津川	半原地点	検出範囲[*2]	8～130	0.2～12	不検出	1	
		陽性率[*3]	8/9	9/9	0/9	1/9	
相模川	昭和橋地点	検出範囲[*2]	20～610	2～58	1～8	1～3	橋本ら(1999)[16]
		陽性率[*3]	5/5	5/5	3/5	4/5	から抜粋
	相模湖地点	検出範囲[*2]	7～790	4～23	1～22	2～13	
		陽性率[*3]	5/6	6/6	4/6	3/6	

＊1　平成10年度の試料．
＊2　単位は大腸菌MPN/100ml，嫌気性芽胞菌CFU/100ml，*Cryptosporidium* oocysts/100L，*Giardia* cysts/100L．
＊3　陽性件数/試験件数．
＊4　1検体で例外的に4,900MPN/100mlを検出．

が可能なものとして修正した試験方法を用いて，水試料からのクリプトスポリジウムの検出を行った．平成9年度及び10年度に試験した水道水53検体，水道原水（河川水，井戸水）67検体，逆浸透膜ろ過した下水処理水14検体と親水河川水14検体の総計148検体から，クリプトスポリジウムは検出されず，クリプトスポリジウムの汚染が進んでいないことをうかがわせた．しかし，水道水のリスク評価のためにはさらに大量の水について詳細に調査する必要があると考えられた．

文　献

1）埼玉県衛生部:クリプトスポリジウムによる集団下痢症－越生町集団下痢症発生事件－報告書，1997.
2）平成8年10月4日付け衛水第248号厚生省生活衛生局水道環境部長通知の別添の別添3．
平成10年6月19日付け衛水第49号厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長通知の別添により改正.
3）鈴木淳，村田以和夫，矢野一好，他：日食微誌，**13**(3), 137-141, 1996.
4）佐野茂，押味明子，佐藤誠一，他：平成9年度日水協関東地方支部水質研究発表会講演集，13-15, 1997.
5）猪又明子，押味明子，田中繁樹：日水協誌，**68**(4), 32-36, 1999.
6）小田琢也，小野一男，宇賀昭二，他：第49回全国水道研究発表会講演集，558-559, 1998.
7）関文威：生態学研究法講座11，水界微生物生態研究法，22-23, 1976，共立出版株式会社，東京.
8）木暮一啓：2.1 直接計数法，門田元・多賀信夫(編)，海洋微生物研究法，33-40, 1985，学会出版センター，東京.
9）馬場記代美，木村憲司，橋本温，他：第48回全国水道研究発表会講演集，560-561, 1997.
10）USEPA：Method 1622(Draft), EPA 821-D-97-001, 1997.
11）馬場記代美，木村憲司：第49回全国水道研究発表会講演集，554-555, 1998.
12）井上亘，宇賀昭二，Shiba Kumar，他：第49回全国水道研究発表会講演集，556-557, 1998.
13）諏訪守，鈴木穣：第1回日本水環境学会シンポジウム講演集，123-124, 1998.
14）Jenkins, M. B., Anguish, L. J., Bowman, D. D., *et al.*：*Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3844-3850, 1997.
15）平成8年10月4日付け衛水第248号厚生省生活衛生局水道環境部長通知の別添.
平成10年6月19日付け生衛第1039号厚生省生活衛生局水道環境部長通知により改正.
16）橋本温，河井健作，西崎綾，他：水環境学会誌，**22**, 282-287, 1999.
17）Haas, C. N., Crokett, C. S., Rose, J.B., *et al.*：*JAWWA*, 88(9), 131-136, 1996.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 269-272, 1999

クリプトスポリジウム添加有機性懸濁質試料水からのオーシストの濃縮・精製法の検討

村田理恵*, 鈴木　淳*, 村田以和夫*

Evaluation on Several Methods of Concentration and Purification for Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts from the Water, Prepared with Organic Suspended Solids

RIE MURATA*, JUN SUZUKI* and IWAO MURATA*

Keywords：クリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum*, 回収率 recovery rate, 濃縮・精製法 concentration and purification method

はじめに

1996年埼玉県越生町で発生した水道水による集団下痢症[1]の原因として，クリプトスポリジウム原虫が注目されて以来，厚生省は「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」[2]（以下暫定試験方法）を定め，水道原水及び浄水の全国調査を実施してきた．検査を実施するにあたり，環境水中には多種多様の無機物，有機物，微生物等が存在しているために，これら夾雑物がクリプトスポリジウム（*Cryptosporidium parvum*）・オーシスト（以下オーシスト）の検出を妨害することがある．このため，夾雑物が多い場合にはオーシストを選択的に分離する必要がある．

現在厚生省が示している「暫定試験方法」の濃縮・精製法は，水道浄水・原水への適応を目的としたものであり，本法での環境水からのオーシストの分離・精製は極めて困難な場合が多い．

更に顕微鏡検査にあたっては，1）夾雑物の影響による見落としを防ぐために1試料水当たりのスライドグラスの枚数が多くなる，2）夾雑物が重層された場合にはスポロゾイトや残体等オーシストの内部構造が確認できないといった問題が生じる．

そこで今回，有機物，微生物等の多い高濁質の汚泥試料水を用いて，オーシストの効率的な回収を図ることを目的として，3種の濃縮法と2種の精製法を組合せた6種の検査方法により精製濃縮液を作製し，蛍光抗体染色法を用いて添加オーシストの回収率を求めるとともに，各方法における作業効率についても比較検討したので報告する．

材料と方法

1．免疫磁性体粒子法による予備的回収試験

1）オーシスト試料液の調整

厚生省の暫定試験方法に準じて，100μl中のオーシスト数が100～400個オーダーとなるように，製造メーカー及び下痢便等由来の異なる以下のオーシスト浮遊液A～Dを精製水で希釈し，回収試験に用いるオーシスト試料液を作製した．

用いたオーシスト浮遊液は，A：クリプトスポリジウム浮遊液（Tech Lab），B：Cryptosporidium Oocysts 蛍光抗体染色用試薬（FL Crypt-a-Glo 付属陽性コントロール液；WATERBORNE），C：大阪市立大学医学部　井関基弘博士から供与されたクリプトスポリジウム症患者便のホルマリン固定液，D：クリプトスポリジウム検出キット用陽性コントロール（和光純薬）である．

加えて，A：クリプトスポリジウム浮遊液（Tech Lab）については，No.1～No.4の4ロットを用いて，ロット間における回収率の差も比較検討した．

2）免疫磁性体粒子法によるオーシストの回収

オーシスト試料液100μlに精製水を加え10mlとし，Dynabeads anti-Cryptosporidium kit（DYNAL）を用いてオーシストの回収を行った．試料水に免疫磁性体粒子を緩衝液と共に加え，専用ミキサーを用いて混和し，磁性体粒子上の抗クリプトスポリジウム・オーシスト抗体にオーシストを捕捉させた．次いで，免疫磁性体粒子・オーシスト複合体を磁石を用いて回収した．更に，免疫

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科　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

磁性体粒子・オーシスト複合体を0.1N塩酸を用いて解離し，内径13mmの区画付きのAPSコート・スライドグラス（松浪硝子）上で1N水酸化ナトリウムを滴下，中和し，風乾後メタノール固定を行った．これを直接蛍光抗体法（Cryptosporidium Oocysts　蛍光抗体染色用試薬FL Crypt-a-Glo；WATERBORNE）で染色後，落射蛍光顕微鏡でオーシストを計数し，回収率を求めた．

2．高濁質試料水中のオーシストの濃縮・精製法

1）汚泥試料水の調整

まず，有機汚泥を精製水で希釈して，濁度100度/500mlに調整した．次いで，汚泥試料水中にオーシストが認められないことを確認後，オーシスト試料液Bを100μl加え共通の試料水とした．

2）試験方法

表3に示したごとく，3種の濃縮法と2種の精製法を組合せ，a～fの6種の条件で検査方法の検討を行った．

(1) 濃縮法

遠心沈殿法　試料水を，3,000rpmで20分間遠心，上清を吸引除去後，沈渣を回収した．

セルロース吸着・凝集法　鈴木ら[3]が考案した方法により，ウォーターコンセル[クリコン]（日研生物医学研究所）を用いて試料水の濃縮を行った．試料水に0.1N水酸化ナトリウム及び0.1N塩酸で活性化したDEAE－セルロースを125mg加え，混和後，アニオン系高分子凝集剤を2.5ml添加，混和して，セルロースと試料水中に混入している有機固形物を凝集させた．スイケンバックでセルロースをろ過後，手で軽く絞り脱水し，このバックを誘出液（0.1% Tween 80，1% NaCl，pH 9）50ml中で軽くもみ洗いした．ろ液を3,000rpmで20分間遠心，上清を吸引除去後，沈渣を回収し，精製水を全量が45mlとなるように加え攪拌後，3,000rpmで20分間遠心，沈渣を回収した．

カートリッジフィルター法　U.S.Environmental Protection Agency[4]により推奨されている方法である．吸引ポンプを用いてエンバイロチェックサンプリングカプセル（Gelman Science）で試料水の吸引ろ過を行った．ハウジング内に誘出緩衝液（ラウルス－12希釈液）約120mlを入れ，リストアクションシェーカーを用いて600rpmで5分間浸とうさせ，その全量を回収した．同一操作を繰り返し，両回収液を3,000rpmで20分間遠心，上清除去後，精製水を全量が45mlとなるように加え，3,000rpmで20分間遠心，上清除去し，沈渣を回収した．

(2) 精製法

免疫磁性体粒子法　各濃縮法により回収された沈渣について，1－2）の方法によりオーシストの精製を行った．キット1回分で使用できる沈渣量は0.5ml以下であるため，沈渣量に応じてキットの使用量を変えた．

密度勾配遠沈法　各濃縮法により回収された沈渣について，厚生省の暫定試験方法に準じてオーシストの精製を行った．容量15mlの遠沈管1本に対し0.5ml以下の沈渣にPBSを加え全量を3mlにし，よく攪拌後，直ちに蔗糖液（比重1.2）2mlを遠沈管底部にゆっくり注入して2重層とした．重層境界面が乱れないように注意して3,000rpmで10分間遠心した後，まず2層境界面の絮状沈殿物，次いでPBS層全量，高比重液層上層部1/4～1/2をそれぞれ回収した（1回目の回収）．遠沈管に残った沈渣に4倍量のPBSを加えよく攪拌し，高比重液2mlを遠沈管底部にゆっくり注入して再び2重層とした．これを3,000rpmで10分間遠心した後，1回目の回収と同様に，絮状沈殿物，PBS層，高比重液層上層部を回収して，1回目の回収液に加えた．

回収した液は，メンブレンフィルター（孔径0.8μm，直径47mm，セルロース混合エステル）で吸引ろ過した．フィルターにアセトンを約12 ml加えて溶解し，3,000 rpmで10分間遠心，上清除去後，再度アセトンを約12 ml加え攪拌し，3,000 rpmで10分間遠心した．次いで，上清を捨て，沈渣にエタノールを約12 ml加え，3,000 rpmで10分間遠心，同様に上清を捨て，精製水を約12 ml加え，3,000 rpmで10分間遠心して，上清を吸引除去し，沈渣を回収したものを精製濃縮液とした．

(3) 顕微鏡検査

得られた精製濃縮液をAPSコート・スライドグラスの区画内に塗抹した．これを風乾後メタノール固定を行い，直接蛍光抗体法で染色して，落射蛍光顕微鏡でオーシストを計数後，得られた値から回収率を求めた．

結果と考察

1．免疫磁性体粒子法によるオーシスト回収成績

精製水に加えた製造メーカー及び下痢便等由来の異なるオーシスト試料液A～Dを免疫磁性体粒子法で回収した結果を表1に示した．諏訪ら[5]は免疫磁性体粒子法が，鉱質または有機濁質の相違など水質により，密度勾配遠沈法より回収率の劣る場合があると報告している．しかし，今回の実験では，人工的に試料水の水質を均質化した条件でも，オーシストの由来の違いにより，免疫磁性体粒子法による回収率は，A：4.6%，B：82.0%，C：15.2%，D：72.3%と著しい差が認められ，B及びDで高く，A及びCで低い値であった．その理由として，下痢便中のオーシスト壁には分泌抗体が結合しており，蛍光

表1．免疫磁性体粒子法における由来の異なるオーシスト浮遊液間の回収率

オーシスト浮遊液	添加濃度 (個/100μl)	回収個数 (個)	回収率 (%)
A	153	7	4.6
B	133	109	82.0
C	105	16	15.2
D	238	172	72.3

A：クリプトスポリジウム浮遊液（Tech Lab）
B：Cryptosporidium Oocysts 蛍光抗体染色用試薬（FL Crypt-a-Glo付属陽性コントロール液；WATER BORNE）
C：大阪市立大学医学部　井関基弘博士から供与されたクシプトスポリジウム症患者便のホルマリン固定液
D：クリプトスポリジウム検出キット用陽性コントロール（和光純薬）

抗体試薬付属陽性コントロールとしてキット化されたB及びDは，抗体結合力を高めるためpH調整か何らかの方法で分泌抗体・オーシスト複合体を解離処理した状態にあって，オーシスト壁にはフリーのレセプターが露出していること．また他方，A及びCは分泌抗体・オーシスト複合体が形成されたままで，フリーのレセプターがB及びDより少ないことなどが考えられる．

次に，ロットの異なる4種のクリプトスポリジウム浮遊液（A；Tech Lab）により作製したオーシスト試料液を用いて回収率を比較した結果を表2に示した．各ロットの回収率はNo.1：75.6%，No.2：4.6%，No.3：62.0%，No.4：93.9%と差が認められた．試供品として提供されたオーシスト浮遊液No.1の回収率は75.6%と高く，初期に輸入されたNo.2はユーザーから，スポロゾイトが脱嚢している等苦情の多かったもので，オーシストの回収率は4.6%と著しく低かった．その後輸入されたオーシスト浮遊液No.3，No.4では，精製法や固定法等製造工程に改善がなされたものと思われ，それぞれ62.0%，93.9%と高い回収率が得られた．

今回，免疫磁性体粒子法によるオーシストの回収率は，オーシストの由来の違いにより大きな差が認められた．この結果は，今後実際のオーシスト陽性試料により，オーシストの精製に免疫磁性体粒子法の使用が有効であるかを更に検討する必要のあることを示していると考えられる．

2．各濃縮・精製法の組合せによる回収率の比較

1）濃縮法の比較

遠心沈殿法，セルロース吸着・凝集法及びカートリッジフィルター法の3種の濃縮法と，免疫磁性体粒子法及び密度勾配遠沈法の2種の精製法を組合せた場合の回収率を比較した成績を表3に示した．遠心沈殿法と免疫磁性体粒子法の組合せ（a）では31.6%，セルロース吸着・凝集法と免疫磁性体粒子法の組合せ（c）では12.2%，カートリッジフィルター法と免疫磁性体粒子法の組合せ（e）では30.6%の回収率であった．免疫磁性体粒子法でオーシストの精製を行った場合，遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法は，セルロース吸着・凝集法と比べ30%台の高い回収率が得られた．

表2．免疫磁性体粒子法における同一メーカーロット間の回収率の比較

ロット	添加濃度 (個/100μl)	回収個数 (個)	回収率 (%)
No.1	160	121	75.6
No.2	153	7	4.6
No.3	329	204	62.0
No.4	313	294	93.9

メーカーA：クリプトスポリジウム浮遊液（Tech Lab）

作業効率に影響を及ぼす沈渣量について比較した結果を表4に示した．セルロース吸着・凝集法で得られた沈渣量は約0.1mlと，遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法の約2.0～2.5mlに対し，約1/20以下であった．更に，セルロース吸着・凝集法を用いた場合，試料水を10倍に増やしても，沈渣量は約0.3mlと少なく，試料水中の夾雑物を著しく減少させるため，極めて濃縮効率が良い．

また，免疫磁性体粒子法に使用される試薬消費量は，沈渣量の違いから，セルロース吸着・凝集法ではキット1回分であったのに対し，遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法では5回分を必要とした．このため，セルロース吸着・凝集法では遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法と比べ試薬消費量を1/5量に節約することができた．更に，免疫磁性体粒子法で精製を行った場合，セルロース吸着・凝集法は，遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法と比較して，回収率が12.2%とやや劣るものの，試料水中の夾雑物を減少させることができるため，もっとも煩雑な検鏡時間を1/5に短縮できる利点がある．

実際の環境水や水道原水の検査にあたっては，試料水を暫定試験方法の「10L以上」から60～100Lに増量することによって検出率の向上が期待できる．また，免疫磁性体粒子法の試薬量を1/5に節約できるためコストの点からも，セルロース吸着・凝集法は有利な方法と考察された．

表3．各濃縮・精製法の組合せにおける回収率と塗抹に要したスライドグラスの区画数

No.	濃縮法	精製法	回収率(%)	スライドグラス(区画数)
a	遠心沈殿法	免疫磁性体粒子法	31.6	5
b	遠心沈殿法	密度勾配遠沈法	2.0	18
c	セルロース吸着・凝集法	免疫磁性体粒子法	12.2	1
d	セルロース吸着・凝集法	密度勾配遠沈法	8.2	6
e	カートリッジフィルター法	免疫磁性体粒子法	30.6	5
f	カートリッジフィルター法	密度勾配遠沈法	2.0	16

表4．各濃縮法で得られた沈渣量

濃縮法	沈渣量（ml）
遠心沈殿法	2.0～2.5
セルロース吸着・凝集法	0.1
カートリッジフィルター法	2.0～2.5

2）精製法の比較

セルロース吸着・凝集法による濃縮法と，免疫磁性体粒子法及び密度勾配遠沈法の2種の精製法を組合せた場合の回収率を比較した成績を表3に示した．セルロース吸着・凝集法と免疫磁性体粒子法の組合せ（c）では12.2%，セルロース吸着・凝集法と密度勾配遠沈法の組合せ（d）では8.2%を示し，免疫磁性体粒子法において密度勾配遠沈法より高い回収率が得られた．

次に作業効率を比較検討する目的で，精製濃縮液全量を塗抹するのに必要なスライドグラスの区画数を検討した結果を表3に示した．セルロース吸着・凝集法で濃縮を行った場合，免疫磁性体粒子法で得られた精製濃縮液は1区画分相当量，密度勾配遠沈法では6区画分に相当する量であった．これは密度勾配遠沈法では，比重1.2より軽い粒子は浮遊したため，夾雑物が多くなったものと推察された．

密度勾配遠沈法による作業行程の煩雑さは，夾雑物の沈渣量に比例するため，各濃縮法で得られた沈渣量を測定した．その結果を表4に示した．遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法で得られた沈渣量は，約2.0～2.5mlとなり，容量15mlの遠沈管5本を必要とし，1本当りの沈渣量は約0.5mlと多かった．セルロース吸着・凝集法で得られた沈渣量は約0.1mlと少なく，遠沈管1本で処理できる量であった．今回，沈渣量の多かった遠心沈殿法と密度勾配遠沈法の組合せ（b），及び，カートリッジフィルター法と密度勾配遠沈法の組合せ（f）の回収率は2.0%とセルロース吸着・凝集法と密度勾配遠沈法の組合せ（d）より低率を示した．この成績は武田ら[6]の報告に見られる，遠沈管1本当りの沈渣量が密度勾配遠沈法における回収率に影響を与えることを追認するものと考察された．

まとめ

1．免疫磁性体粒子法を用いた精製法は試料水中の夾雑物を著しく減少可能であった．しかし，使用したオーシストの製造メーカーやロットの相違により回収率に差が認められたため，その実用性については再検討が必要であると考えられた．

2．汚泥試料水を用いた今回の比較試験では，免疫磁性体粒子法でオーシストの精製を行った場合，セルロース吸着・凝集法は遠心沈殿法及びカートリッジフィルター法より回収率が低かった．しかし，セルロース吸着・凝集法は試料水中の夾雑物を著しく減少させることができ，作業効率を高め供試する試料水量を増やすことが可能となるために検出率の向上が期待できる．

3．有機物，微生物が混入する高濁質の環境水からオーシストを検出するためには，濃縮法にはセルロース吸着・凝集法を，精製法には密度勾配遠沈法の組合せがもっとも有効であると考えられた．本法では試料水を増量することにより検出率及び作業効率を更に向上させることができる．

文　献

1）埼玉県衛生部クリプトスポリジウムによる集団下痢症－越生町集団下痢症事件－報告書，平成9年3月．

2）厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長「水道に関するクリプトスポリジウムのオーシストの検出のための暫定的な試験方法」，平成10年6月19日，衛水第49号．

3）鈴木淳，村田以和夫，矢野一好，他：日食微誌，**13**(3)，137-141，1996.

4）U.S.Environmental Protection Agency."Method 1622 Cryptosporidium in Water by Filtration /IMS/FA",EPA 821-R-97-023,December 1997.

5）諏訪守，鈴木穣：日本水環境学会，123-124，1998.

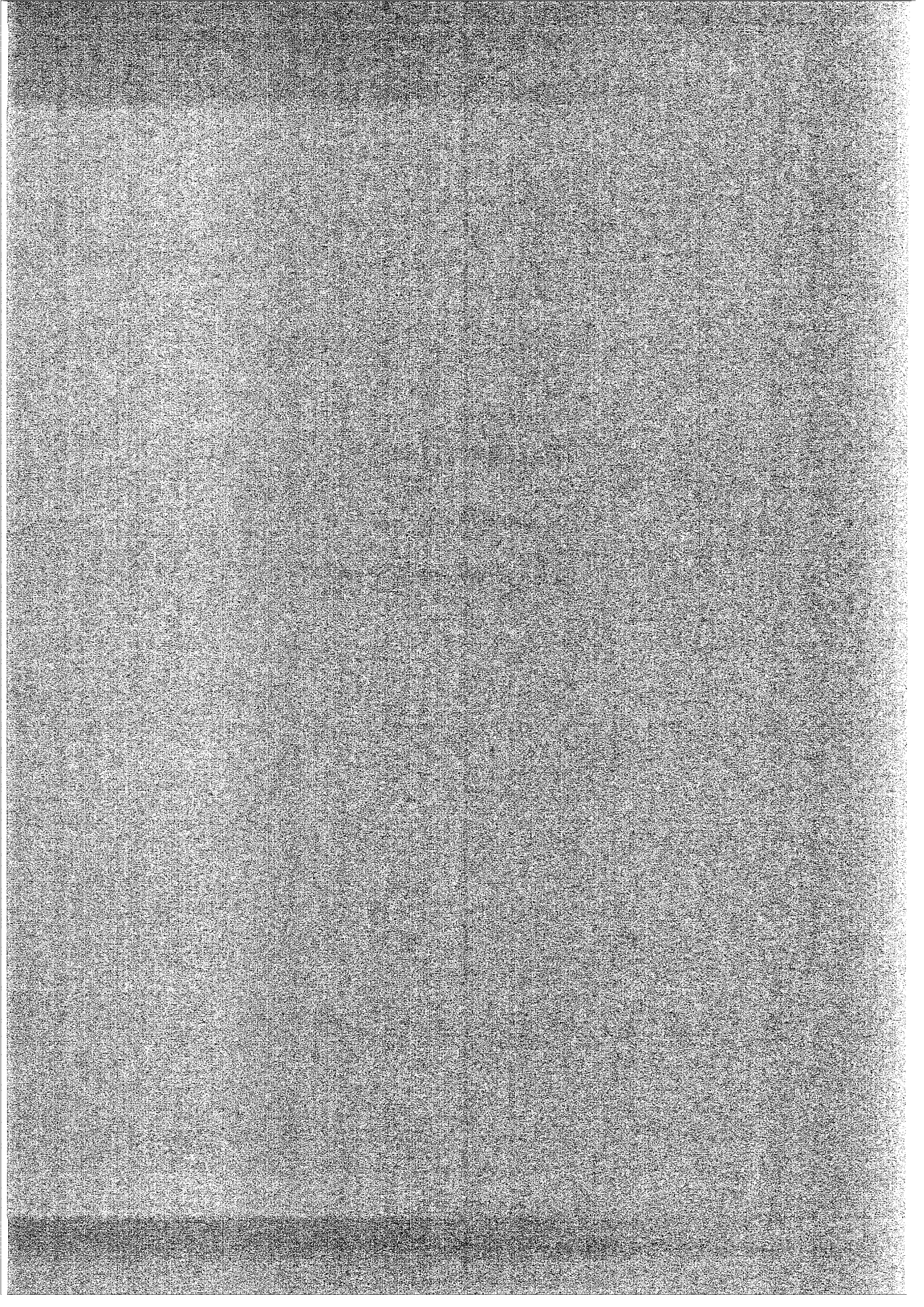
6）武田章江，福田孝子，関口忠男：平成10年度地方衛生研究所全国協議会　関東甲信静支部　理化学研究部会総会・研究会，53-56，1999.

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

「酸化ストレスの四逆散連続経口投与ラットの抗酸化系に及ぼす影響」の報告では，漢方方剤である四逆散エキス懸濁液をラットに連続強制経口投与した後に，酸素チャンバーで飼育し，四逆散の酸素ストレスに対する体内抗酸化系への影響を検討している．その結果，大気暴露時，四逆散エキス末投与において抑制された肝臓のカタラーゼ活性は，高濃度酸素暴露時，四逆散エキス末投与により弱いながら抑制傾向を示した．また，脳と肺におけるアルファ・トコフェロール値は四逆散エキス末投与，大気暴露時，増加ないし無変化であったが，高濃度酸素暴露時対照群は低下を示し，四逆散エキス末45mg/Kg投与群においては有意な上昇が認められた．これらの結果よりラットの脳，肺，肝臓において部分的ではあるが四逆散エキス末は抗酸化ストレス効果を示すことが推察された．

「マウス腎皮質のミトコンドリアの機能に対するチアベンダゾール（TBZ）の影響」の報告では，輸入柑橘類・バナナの防かび剤，家庭用防かび剤，工業製品の防かび剤などとしても広く用いられているTBZを，マウスに1,000あるいは2,000mg/kgの投与量で経口的に投与した時に，腎皮質のミトコンドリアの機能に及ぼす影響を，投与後３，６，16時間の時点で検討している．腎皮質中のTBZ濃度は投与後３時間が６，16時間後に比べて高かったが，ミトコンドリアの呼吸速度は６時間後から抑制されはじめ，16時間後にはさらに顕著となった．イソクエン酸脱水素酵素活性やATP量も16時間後で低下を示しており，TBZの投与はミトコンドリアの機能障害を引き起こすことが示唆された．

「環境汚染物質の体内動態に関する生理学的シュミレーションモデルによる解析」の報告では，これまで開発してきた生理学的モデルに基づく薬物動態予測プログラム(PPP)をダイオキシンの関連物質である2-Chlorodibenzofuran の体内動態について応用し解析を試みている．シュミレーションの結果，①見かけの半減期は，ラットで約６時間と短いが，組織によっては80時間以上の長半減期成分も存在する可能性．②胆汁中への累積排泄量は，腸肝循環のため，投与量の1.5倍にのぼる可能性．③ラットの実験結果をヒト女子に外挿した結果，全身の残存量は，連続投与した場合，ラットに比べ14日後で3.8倍ほど高く単に機械的に外挿することは，毒性を過小評価する恐れのあることなどが示唆された．また，環境汚染物質の毒性評価に，長半減期成分，腸肝循環量などの指標を取り入れた量的解釈の必要性を示した．

「電子顕微鏡による精子観察のための基礎的条件の検討」の報告では，透過電顕及び走査電顕を用いて，未処置のラットとマウスの精巣並びに精巣上体尾部から採取した精子の形態観察を行っている．超薄切片法は精巣内での精子形成に関与する細胞の変化の観察に有効であり，平板法は，精子の全体像が把握できるため，外形異常並びにその割合等を調べるのに有効であった.精巣の固定にはグルタールアルデヒドが良く，平板での精子の固定にはパラホルムアルデヒドが適当であった.今後，これらの試料作製条件を考慮に入れ，内分泌かく乱作用が疑われる物質の検索に活用が期待される．

「食品添加物のエームス試験における既知変異原の変異原性に対する影響（第２報）」の報告では，変異原性を検出するためのエームス試験を用い，既知変異原物質である4NQO，AF-2，T-P-1及びBPが持つ変異原性を，食品添加物が変動させる効果を検討している．56種の食品添加物の変異原性に対する影響について検討した結果，既知変異原物質の変異原性を増加または減少させた食品添加物は４化合物であった．シンナムアルデヒドは，T-P-1の変異原性を増強した．ナトリウムメトキシドは，4NQO及びAF-2の変異原性を抑制した．更にピロリン酸ナトリウム及びピロリン酸カリウムは，T-P-1の変異原性を増強した．

「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.Ⅲ.しらこたん白抽出物」の報告では，マウスの胚

仔を母体外に取り出し，培養液中で生存発生させる全胚培養法を用い，天然添加物であるしらこたん白抽出物（ＭＰ）がマウス胚仔に及ぼす影響について検討している．妊娠８日にマウス胚仔を摘出し，48時間の培養を行い，培養開始から24時間後に培養液中に０（対照），250，500，1000μg／mlの濃度でMPを投与した．胚仔の発育の指標となる卵黄嚢径，卵黄嚢血液循環，胚仔頭臀長，胚仔体節数，心拍数及び胚仔の型を観察したが，全ての指標において対照群と処置群との間で有意の差を認めなかった．MP処置の何れの群にも異常胚仔は認められなかった．これらの結果はＭＰはマウス胚仔に対して催奇形性がないことを示している．

「天然添加物フェルラ酸のラットにおける急性経口毒性」の報告では，天然添加物として用いられるフェルラ酸の急性経口毒性をF344ラットで検討している．フェルラ酸を投与したラットで自発運動の抑制，立毛及び流涙が認められた．投与後14日間の観察中，最初の24時間に，体重1Kgあたり1,929mg以上のフェルラ酸投与で，ラットの死亡が認められた．フェルラ酸は投与後24時間以内に腺胃及び小腸の出血を生じさせた．フェルラ酸の半数致死量（LD50）は雄で体重1Kgあたり2,445mg，雌で体重1Kgあたり2,113mgであった．

「ヒト病態モデルマウスによる十全大補湯添加飼料投与実験ー自己免疫疾患マウス（MRL/Mp-lpr/lpr)における腎糸球体病変の病理組織学的観察」の報告では，自己免疫疾患モデルマウスのMRLマウスを用い漢方薬である十全大補湯の添加飼料による13週間投与試験を行い，自己免疫病変の一つである糸球体病変に対する十全大補湯の作用を組織学的に観察している．実験では十全大補湯を0.2および3.2%の濃度で添加した飼料を摂取させた．動物数は対照群及び投与群とも雄雌各１２匹を用いた．終了時，雌雄対照群及び雄0.2%群では全ての動物が存在していた．その他の群の生存率は雄3.2%群11/12，雌0.2及び3.2%群では各々11/12，10/12であった．体重，腎重量及び糸球体腎炎の組織学的変化については対照群と投与群との間に差がなかった．これらの結果より，生存例においては十全大補湯のMRLマウスにおける腎糸球体病変に対する影響は認められなかったが，十全大補湯の作用を明らかにするためにはさらに長期間の投与試験と途中死亡例の観察が必要と考えられた．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 275-279, 1999

酸素ストレスの四逆散連続経口与ラットの抗酸化系におぼす影響

市川久次*, 牛尾房雄*, 門間公夫*, 植田忠彦**,
佐藤和恵***, 浦野四郎****

Effects of Oxygen Stress on the Antioxidative System in the Rat Given Shigyaku-san

HISATSUGU ICHIKAWA*, FUSAO USHIO*, KIMIO MONMA*,
TADAHIKO UEDA**, KAZUE SATOH*** and SHIRO URANO****

We studied the effects of Shigyaku-san on the antioxidative system in rats. F344/Ducrj male rats, 9-weeks old, were given Shigyaku-san extract at doses of 0, 45(usual dose in human) and 225 mg/kg b.w./day by gavage for 1 month. After continuous administration, each dose group was further separated into 2 groups; one group was exposed to high(100%)oxygen for 2 days and the other one was exposed to the atmospere. The levels of catalase, superoxide dismutase (SOD), α-tocopherol (α-Toc), TBARS, cholesterol and phospholipids in the brain, lung and liver were examined.

The levels of catalase in the liver and α-Toc in the brain and lung showed a trend of consistent change. Catalase ($p<0.0304$-0.0197) in the atmosphere exposed and Shigyaku-san treated groups deceased or tended to decreae,while those in the high oxygen exposed and Shigyaku-san treated groups tended to decrease. α-Toc in the atmospere exposed and Shigyaku-san treated groups increased or did not changed, while those in the high oxygen exposed control group decreased ($p<0.0081$) or tended to decrease and those in 45mg/kg b.w. of Shigyaku-san treated groups were increased ($p<0.0248$-0.0702). Antioxidaive effects of Shigyaku-san extract on the oxygen stressed rats were shown partially.

Keywords：四逆散 Shigyaku−san，酸素ストレス oxygen stress，抗酸化系 anti-oxidative system，ラット rat

はじめに

好気性生物は，酸素を酵素の制御の基に活性化し，生命維持に利用している．反面，生体内では，過酸化反応により脂質の過酸化，蛋白変性，ＤＮＡ損傷等が生ずるが，これらは，動脈硬化，癌等の成人疾患を引き起こすと考えられている．一方，近年これらの成人病疾患に対しては，漢方薬の効能が認められつつあるが，この効能を説明する機序の一つとして，天然の植物成分が有するフリーラジカルあるいは活性酸素の消去作用が注目されてきている．

今回我々は，吉川ら[1]のスピントラッピング法による研究により活性酸素（フリーラジカル）消去作用が認められ，また消化性潰瘍の治療[2]に用いられている漢方方剤・四逆散エキス懸濁液をラットに連続強制経口投与した後，酸素チャンバーにて飼育し，四逆散の酸素ストレスに対する体内抗酸化系への影響を検討した．その結果，若干の知見を得たので報告する．

＊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
＊＊東京都立環境科学研究所
＊＊＊昭和大学薬学部分析センター
＊＊＊＊芝浦工業大学工学部

材料および方法

(1) 使用動物：日本チャールスリバー社産生の生後6週齢の雄ラット（F344/DuCrj，体重120-140g）を購入し，一般状態に異常の無いものを選択して1群6匹とし，ステンレス製網ケージにて3週間固形飼料（日本クレア製，CE-2）で飼育した．

(2) 被験物質：四逆散エキス末は当研究所瀬戸らにより調製されたもので，柴胡5，芍薬4，枳実2，甘草1.5gの比率の混合物を15倍の水で煎出した抽出液を凍結乾燥して得た粉末である．

(3) 投与方法ならびに投与期間：被験物質（四逆散キス末）を精製水に懸濁し，ラットに（1群6匹），0，45（おおよそヒトの1日の服用量に相当），225mg/kg体重の用量で4週間連続強制経口投与した．投与期間終了後，3匹を酸化ストレス（酸素暴露）群，残り3匹を大気暴露群とした．水は自由に摂取させ，室温25±1℃，湿度55±5%に調整された飼育室内にて飼育した．

(4) 酸素暴露Fig. 1に示すように，25cmx40cmx18cmのケージにラットを3匹ずつ入れ，これを密閉した後100%酸素を流量2.0l/minでボンベより送気した．水および飼料は自由に摂取させ，48時間飼育した．大気暴露群は(3)の大気暴露群と同様に飼育した．

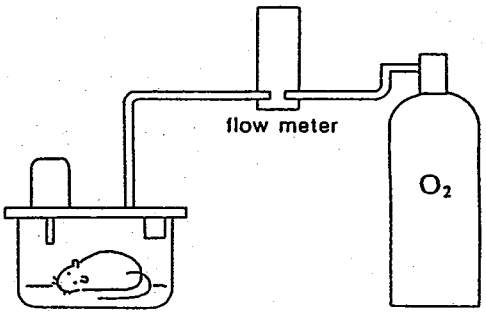


Fig. 1. Method of Exposuring to 100 % Oxygen

(5) 組織ホモジネートの調製：ラットをエーテル麻酔下背位に固定して開腹し，下腹大動脈よりヘパリン処理した注射器を用いて採血した．次いで組織（脳，肺，肝臓）を摘出し，0.1Mカリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄し，水分を濾紙で除去後秤量し，9倍量の0.1Mカリウム-リン酸緩衝液（pH7.0）を加え，テフロンーガラスホモジナイザーでホモジナイズして各種測定用の試料とした．なお，カタラーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性の測定にはこのホモジネートを遠心(3000rpm，10min)し，上清15に対して1%TritonX-100を1の割合で混じたものを供した．また，α-トコフェロール測定用として血漿および組織ホモジネート各400μlに6%ピロガロールエタノール溶液1.0mlを加えて混和した後，測定時まで−20℃で保存した．

(6) カタラーゼ活性の測定[3]：(5)で得られた組織ホモジネート20-50μlを石英製キュベットに取り5mMカリウムーリン酸緩衝液（1mMEDTA·2Na含有，pH7.0)を加えて2.0mlとし攪拌した後，30mM$H_2O_2$1mlを加えて再び攪拌した後240nmにおけるH_2O_2の吸光度の1分間の減少を測定し，その傾きに0.003（反応液容量(1)）/43.6（H_2O_2のモル吸光係数）を乗じて，減少したH_2O_2のモル数を算出した．

(7) スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性の測定[4]：65mMリン酸緩衝液（pH8.2）0.2ml，0.5mMヒポキサンチン0.2ml（水溶液），10mMヒドロキシルアミン・HCl-1 mg/ml−ヒドロキルアミン−O−スルフォン酸混液0.1ml，精製水0.2mlを少試験管中で混和する．(5)で得られた組織ホモジネート(試料)0.1mlを加え，37℃で5分間インキュベートする．次いで，5 x 10^{-3}U/mlのキサチンオキシダーゼ（0.1Mカリウム-リン酸緩衝液（pH7.0）で希釈）0.2mlを加えてボルテックスし，37℃で30分間インキュベートする．発色液（30μM N-ナフチルエチレンジアミン・HCl，3mMスルファニル酸，25%氷酢酸混液）2mlを加え，ボルテックスした後，室温で30分放置後550nmにおける吸光度を測定する．希釈率の逆数と吸光度に関してプロットし，ブランクは試料の代わりに精製水を用いて同様に行い．ブランクの吸光度の1/2を50%阻害として外挿する．

(8) α−トコフェロールの測定[5]：(5)で得た血漿および組織ホモジネート試料にエタノール1mlおよび60%KOHを200μlを加えて混和し，70℃で30分間ケン化した．氷水中で冷却し，さらに1%NaCl溶液を4.5ml加え，抽出溶媒として10%酢酸エチル・n-ヘキサン溶液3mlを加えて，振盪抽出した．3000rpmで，10分遠心し，酢酸エチル・n-ヘキサン層2mlをとり，5%n-デカンーn-ヘキサン溶液1mlを加えた．次いで，40℃以下の水浴中で加温しながらN_2を通気し，n-デカンを少量残して溶媒を留去した．残査にn-ヘキサンを200μlを加えて溶解し，このうち20μlをとりＨＰＬＣ法によりα-トコフェロールの量を測定した．

(9) 過酸化脂質(TBARS)の定量[6,7]：(5)で得られた血漿および組織ホモジネート500μlをネジ蓋付きガラス製遠心管に取り，3mlの1%（v/v）リン酸と1mlの0.67%チオバルビツール酸（TBA）を加えて攪拌し，沸騰水浴

中で45分間加熱した．加熱後直ちに氷水中に浸して冷却後室温に戻した．ｎ－ブタノール3mlを加えて振盪抽出し，4℃，2800rpmで10分間遠心後上層のn-ブタノール層を取り535nmにおける吸光度を測定した．ＰＢＳ（pH7.4）500μlをブランクとして使用した．過酸化脂質（TBARS）量はモル吸光係数1.56x10^{5}を用いて算出した．

⑽ コレステロールの定量[8-10]：(5)で得られた組織ホモジネート20μlにデタミナーTC555コレステロール定量試薬３mlを加えて37℃，5分間インキュベートし550nmにおける吸光度を測定した．0.1Mカリウム-リン酸緩衝液（pH7.0）20μlをブランクに用い，検量線よりmgタンパク質当たりの量を算出した．

⑾ リン脂質の定量11）：(5)で得られた組織ホモジネート20μlにデタミナーPLリン脂質定量試薬3mlを加えて37℃，5分間インキュベートし500nmにおける吸光度を測定した．0.1Mカリウム-リン酸緩衝液（pH7.0）20μlをブランクに用い，検量線よりmgタンパク質当たりの量を算出した．

⑿ タンパク質の定量[12-15]：(5)で得た組織ホモジネートの50倍希釈液（0.1Mカリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)）100μlを試験管に取り，５倍希釈の発色試薬(Coomassie Brilliant Blue G-250試薬）３mlを加えて攪拌し，５分－１時間以内に595nmにて吸光度を測定した．0.1Mカリウム-リン酸緩衝液（pH7.0）100μlをブランクとし，ウシ血清アルブミンをスタンダードに用い，検量線よりタンパク質量を算出した．

⒀ 統計処理：有意差検定はFisherのPLSD（protected least significant difference）法を用いて行った。

結果および考察

１．カタラーゼ活性におよぼす影響

Fig.２に示した如く，脳と肺においてほとんど変化は認められなかったが，が肝臓において，カタラーゼ活性は大気暴露時，四逆散エキス末投与により抑制（$p<0.05$）が認められた．このことより，四逆散エキス末は肝臓においてカタラーゼ活性の抑制あるいはH_2O_2分解の減少を起こすことが推察された．一方，高濃度酸素暴露時には四逆散エキス末群は抑制傾向を示しただけであった．これらのことより，四逆散エキス末は酸素ストレスに対して，非常に弱いが抑制的に作用することが推察された．

２．スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性におよぼす影響

Fig.３に示した如く，脳、肺においてSOD活性は大気暴露時，エキス四逆散末投与により抑制（$p<0.01$)ないし抑制的に作用することが認められ，高濃度酸素暴露時，上昇した活性は四逆散エキス末投与により低下（$p<0.01$，0.001)ないし低下傾向を示した．このことより，四逆散エキス末は酸素ストレスに対して，ラットの脳，肺において抑制的に作用することが推察された．特に，高濃度酸素曝露時，四逆散エキス末225mg/kg投与群の活性低下は著しく，活性阻害の可能性も推察された．

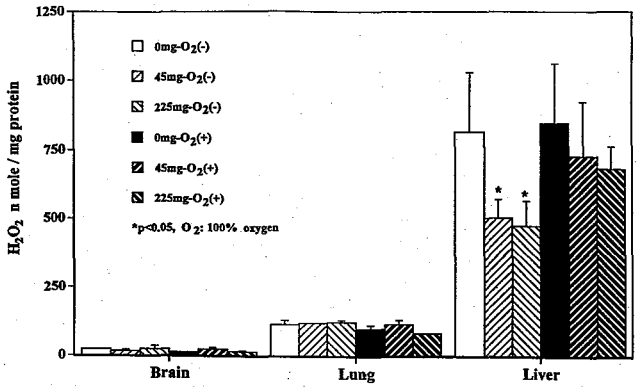


Fig. 2. Effects of Shigyaku-san on Catalase Activity in Atmospheric and High Oxygen Ambience

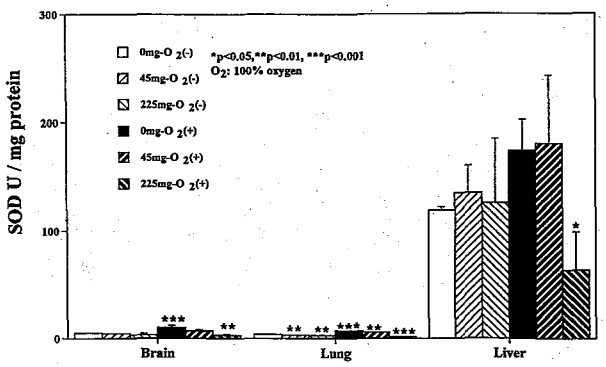


Fig. 3. Effects of Shigyaku-san on Superoxide Dismutase (SOD) Activity inAtmospheric and High Oxygen Ambience

３．α-トコフェロール量におよぼす影響

Fig.4.に示したごとく，大気暴露時，脳と肺のαートコフェロール量は増加傾向ないし無変化であったが，高濃度酸素暴露時対照群において減少した（肺では$p<0.05$）．αートコフェロール量が四逆散エキス末投与（45mg/kg群）により有意な増加（$p<0.05$)が認められた．脳は体全体の酸素消費量の20%を消費し，肺は直接酸素に曝される臓器であることから，高濃度酸素暴露時に，四逆散エキス末がαートコフェロール量を増加させたことは，酸素ストレスに対する作用として，その機序は不明ではあるが，非常に興味深い．

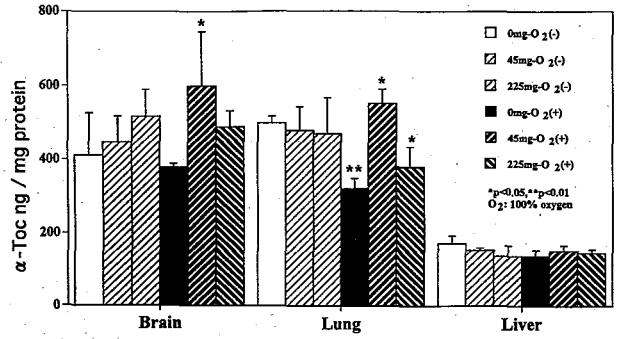


Fig. 4. Effects of Shigyaku-san on Amount of α-Tocopherol in Atmospheric and High Oxygen Ambience

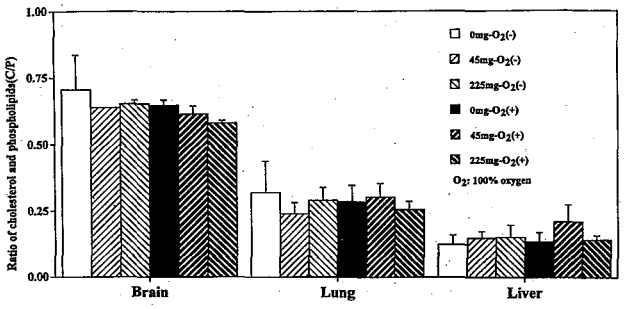


Fig. 6. Effects of Shigyaku-san on Rate of Cholesterol and Phospholipids(C/P) in Atmospheric and High Oxygen Ambience

4．過酸化脂質（TBARS）値におよぼす影響

Fig.5.に示した如く，脳においては高濃度酸素暴露時四逆散エキス末投与は，TBARS値の抑制傾向を示したが，肺，肝臓，特に肝臓においては四逆散エキス末投与によりTBARS値の上昇が見られた．一般に，抗酸化性物質はその濃度により抗酸化(低濃度)あるいは酸化促進(高濃度)性を示す場合があるといわれており[16]，肝の結果は，この現象の可能性が推察された。

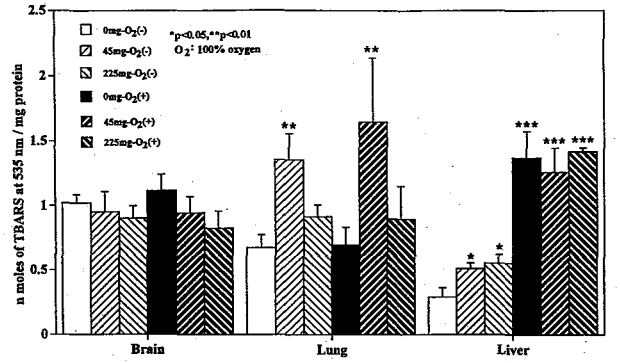


Fig. 5. Effects of Shigyaku-san on Amount of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) in Atmospheric and High Oxygen Ambience

5．コレステロール量（C）／リン脂質量（P）（C／P値）におよぼす影響

Fig.6.に示したごとく，四逆散エキス末投与および高濃度酸素暴露による各組織内のC／P値への影響は殆どみられなかった．一般に，過酸化により高度不飽和脂肪酸を多く含むリン脂質は大きな影響を受けるが，コレステロールは過酸化の影響を殆ど受けないことからリン脂質が過酸化を受けることにより除去されれば，C／P値は大きくなることになる．従って，四逆散エキス末投与および酸素暴露により脳中のリン脂質はほとんど減少しなかったと考えられる．

結　　論

一定の変化あるいは傾向がみられたのは，肝臓におけるカタラーゼ活性ならびに脳と肺におけるα-Toc値であった．すなわち，大気暴露時，四逆散エキス末投与おいて抑制されたカタラーゼ活性は，高濃度酸素暴露時，四逆散エキス末投与により弱いながら抑制傾向を示した．また，脳と肺におけるα-Toc値は四逆散エキス末投与，大気暴露時，増加傾向ないし無変化であったが，高濃度酸素暴露時対照群は低下を示し，四逆散エキス末45mg/kg投与群においては有意な上昇が認められた．これらの結果よりラットの脳，肺，肝臓において部分的ではあるが四逆散エキス末は抗酸素ストレス効果が推察された．

文　　献

1）吉川英敏，高橋周史，近藤元治: *Prog. Med.*, **11**, 502-506, 1991.

2）水野修一，尾崎恒雄：カレントテラピー，4, 460-46, 1986.

3）Aebi, H.: Catalase in Vitro. *In* Packer, L, *Methods in Enzymology*, vol. 105, 121-126, 1984, Academic Press, London.

4）Elnster,E.F. and Huepel,A.: *Anal.Biochem.*, **70**, 616-620, 1976

5）Ueda, T. and Igarashi, O.: *J. Micronutr. Anal.*, **3**, 185-198, 1987

6）Uchiyama, M. and Mihara, M.: *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278, 1970

7）Buege, J. A. and Aust, S. D.: Microsomal lipid peroxydation. In Fleischer, S. and Packer, L., *Methods in Enzymology*, **52**. 302-310, 1978, Academic Press, London.

8）Richimond, W.: *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **29**, *Suppl.* 126, 1972.

9) Allain, C. Charles, Poon, S. Lucy, Chan S. G. Cicely *et al.*: *Clin. Chem.*, **20**, 470-475, 1974.

10) 加瀬澤信彦，村上博美：医学のあゆみ，**127**, 646-652, 1983.

11) 北村元仕，仁科甫啓: リン脂質，北村元仕，仁科甫啓編，実践臨床化学（増補版），572-583, 1982. 医歯薬出版.

12) Bradford, M. Marion: *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.

13) Reisner, A.H., Patty Nemes and Carolyn Bucholtz : *Anal. Biochem.*, **64**, 509-516, 1975.

14) St Groth, de S. Fazaks and Webster, R. G. Datyner: *Biochem. Biphs. Acta.*, **71**, 377-391, 1963.

15) Sedmark, J. James and Grossberg, E. Sidney: *Anal. Biochem.*, **79**, 544-552, 1977

16) Sakagami, H and Satoh, K: *Anticancer Res.*, **17**, 221-224, 11976.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 280-290, 1999

マウス腎皮質のミトコンドリアの機能に対するチアベンダゾール（TBZ）の影響

藤谷知子*, 多田幸恵**, 米山允子*

Effects of Thiabendazole (TBZ) on Mitochondrial Function in the Renal Cortex of ICR Mice

TOMOKO FUJITANI*, YUKIE TADA**, MASAKO YONEYAMA*

The effects of thiabendazole (TBZ), *in vivo* and *in vitro*, on the mitochondrial function of the renal cortex were studied. Mice were given 1000 or 2000mg TBZ/kg body weight by gavage and the state-3, state-4 or DNP-uncoupled respiratory rates of renal cortical mitochondria were measured at 3, 6 or 16 hours after dosing. The state-3 and DNP uncoupled respiratory rates were dose-dependently depressed at 6 hours after dosing. The depression was more marked at 16 hours after dosing. There was no depression in these respiratory rates of the renal cortical mitochondria at 3 hours after dosing, although the renal cortical TBZ concentration was higher than at 6 or 16 hours after dosing. These respiratory rates of the renal cortical mitochondria were not depressed at 16 hours after dosing of 250 or 500 mg TBZ/kg body weight. TBZ, *in vitro*, also depressed the state-3 and DNP-uncoupled respiratory rates of mitochondria isolated from the renal cortex of non-treated mice, at 20 to 50 μg TBZ/ml. Histochemically, inhibition of NAD-linked isocitrate dehydrogenase, a marker enzyme of mitochondria, was observed in renal cortical tubules at 16 hours after dosing of 1000 or 2000 mg TBZ/kg body weight. Furthermore, the renal cortical ATP level was depressed at 16 hours after dosing of 1000 or 2000 mg TBZ/kg body weight. The results indicate that administration of TBZ at 1000 or 2000 mg/kg body weight caused mitochondrial dysfunction in renal cortical tubules of mice.

Keywords：チアベンダゾール Thiabendazole, 腎毒性 nephrotoxicity, ミトコンドリア障害 mitochondrial dysfunction, マウスmice, 駆虫剤 anthelmintic, 防かび剤 fungicide

緒　言

チアベンダゾール [2-(4'-thiazolyl)benzimidazole]（以下TBZと略す）は，種々の線虫症に効果があり，人や家畜に駆虫剤として用いられている．TBZは，輸入柑橘類・バナナの防かび剤として，また，家庭用防かび剤および工業製品の防かび剤としても広く用いられている．

TBZの毒作用については，人間では，寄生虫駆除のためのTBZ投与の副作用として肝臓内胆汁うつ滞・血尿・暗褐色尿などが報告されている[1-6]．実験動物では，2年間TBZを投与された犬[7]および13週間TBZを投与されたラット[8]で，貧血が観察されている．マウスにおける亜慢性（13週間）経餌投与試験では，貧血の他，肝臓および腎臓の障害が見られた[9]．TBZは，妊娠9-12日のマウスへの経口投与によって，胎児に四肢減形成奇形を引き起こす[10]．さらに，TBZは，オルトフェニルフェノールナトリウム（OPP-Na）によるラットにおける膀胱癌の発生頻度を，増加させる[11]．

TBZは，反復経口投与[12]あるいは単回経口投与[13, 14]により，マウスにおいて腎毒性をあらわす．TBZの腎毒性は，多尿・糖尿・タンパク尿，腎重量の増加，腎切片への有機酸・有機塩基の取り込みの阻害，血中尿素窒素濃度の上昇（腎機能障害），腎の近位尿細管細胞の壊死な

* 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

どによって特徴づけられる．肝ミクロソーム代謝酵素系の誘導剤（フェノバルビタール，β－ナフトフラボン，3－メチルコランスレン）あるいはその阻害剤（SKF-525A，ピペロニルブトキシド）を用いた実験で，TBZによる腎尿細管の傷害は，血中のTBZ代謝物（5－水酸化TBZ，アセチルベンツイミダゾール）よりむしろ，血中TBZ濃度と深く関連し，TBZ自体によって引き起こされることが推測された[13]．

TBZの急性経口投与後のマウスの死亡の原因と考えられる腎尿細管の壊死は，TBZ（1000あるいは2000 mg/kg体重）の投与後24時間から観察され，投与後2－3日で顕著になる．また，腎機能障害の指標である血中尿素窒素濃度も，投与後1－3日で有意に上昇する[14]．ところが，妊娠マウスにおけるTBZ経口投与後の吸収・分布・排泄の報告では，血漿中の^{14}C－TBZは投与後30分以内に最高に達し[15]，その後，急速に低下する．また，若令雄マウスにおいても，TBZの吸収・排泄は速やかで，投与後24時間には，血中にTBZは検出されなくなった[13]．すなわち，TBZは，その血中濃度が低下した後，腎尿細管壊死や腎機能障害を引き起こした．そこで我々は，TBZ投与後24時間以内の腎尿細管の生化学的変化の解明が，TBZによる腎毒性の作用機序を明らかにするうえで必要であると考えた．TBZの投与は，24時間後に，マウス腎近位尿細管細胞のミトコンドリアの形態変化を起こした[14]．ミトコンドリアは，細胞内のエネルギー生産の重要な機関であり，その形態および機能の変化は細胞自体の生死に密接に関わると考えられるので，TBZ投与後，経時的に，腎皮質ミトコンドリアの機能の変化を生化学的・組織病理学的に検査し，TBZによる腎毒性とミトコンドリア機能障害との関係を明らかにした．

実験材料と方法

実験材料および実験動物：ミクロファインTBZ（lot No. BZA 540；純度98.5%）は，Merck Sharp and Dohme International (Rahway, NJ, USA) から購入した．その他の試薬は，すべて特級品を用いた．

日本チャールス・リバー㈱より雄のCrj：CD-1 (ICR)マウスを10週令で購入し，11から12週令（34-41 g体重）で実験に用いた．マウスは，チップをしいたポリカーボネート製ケージに一匹ずつ収容し，室温25±1℃，湿度50－60%，照明12時間／日，換気毎時10回の飼育室にて，標準固形飼料CE-2（日本クレア製）および細菌濾過器を経た水道水を自由に摂取させて飼育した．

投与方法：TBZはオリーブ・オイル（日本薬局方）に懸濁させ，一夜餌抜きをしたマウスに，体重kgあたり10mlの容量で，胃ゾンデを用いて強制経口投与した．対照群のマウスには，オリーブ・オイルを投与した．

マウス腎皮質からのミトコンドリアの分離およびミトコンドリア呼吸の測定：断頭屠殺したマウスより左右の腎臓を取り出し，氷冷した濾紙上で速やかに腎皮質を採取・秤量し，直ちに，氷冷したミトコンドリア分離用緩衝液[16]（0.25M Sucrose，1 m M EGTA，10mM Tris-HCl，pH7.4）に浸した．ミトコンドリアは，分離用緩衝液中で，解剖用小鋏で細切し，Pedersonらの遠心分画法[17]で分離した．アデニン二燐酸（以下ADPと略す）燐酸化反応に共役した酸素消費（以下State 3呼吸と略す），ADP燐酸化反応に供役しない酸素消費（以下State 4呼吸と略す）およびジニトロフェノール（以下DNPと略す）で脱共役した酸素消費（以下DNP脱共役呼吸と略す）を，クラーク型ミクロ酸素電極（5300型，Yellow Springs Instrument）を用いて25℃で測定した．あらかじめ25℃に暖めた2 mlの反応液（0.25M Sucrose，15 mM KCl，1 mM EDTA，5 mM MgCl，10 mM 燐酸，50 mM Tris-HCl，pH7.4）に，約25－30μ l のミトコンドリア懸濁液（およそ200μ g のミトコンドリア蛋白質を含む）を加え，基質として50μ lの400mMコハク酸（pH7.4）を加えてState 4呼吸を測定した．その後，10μ lの20mM ADP（pH7.4）を加えて，State 3呼吸を測定した．ADPが消費されてState 4呼吸に戻ってから，10μ lの10mM DNPのエタノール溶液を加えて，DNP脱共役呼吸を測定した．これらの測定は，ミトコンドリアの分離後2時間以内に行った．それぞれの呼吸は，ミトコンドリア蛋白質1 mgあたりの1分間の酸素消費量（μ mole O_2／mg Protein/min.）で表した．呼吸調節率（RCR）は，State 3呼吸／State 4呼吸で算出した．

TBZ投与後のマウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸：腎皮質のミトコンドリアの分離と呼吸の測定には，時間および使用機器による試料数の制限があるため，まずはじめに，高投与量における経時変化を観察した．マウスに，0（オリーブ・オイル），1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与し，3，6および16時間後に各群5匹ずつからミトコンドリアを分離し，呼吸を測定した．

高投与量による経時変化の実験で，呼吸の低下が，投与後16時間に最も顕著に観察されたので，低投与量による呼吸の変化は，投与後16時間のみで測定した．マウスに，0（オリーブ・オイル），250あるいは500 mg/kg体重のTBZを投与し，16時間後に各群5匹ずつからミトコンドリアを分離し，呼吸を測定した．

マウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸に対する試験管

内でのTBZ曝露の影響：未処置のマウスの腎皮質よりミトコンドリアを分離し，反応液中に，0（エタノール），10，20，30，40あるいは50μg/ml（いずれも最終エタノール濃度0.8%）になるようにTBZのエタノール溶液を加え，呼吸を測定した．

TBZ投与後のマウス腎皮質およびミトコンドリア分画中のTBZ濃度：マウスに，500，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与し，0.5，1，3，6，16および24時間後に各群5匹ずつを断頭屠殺し，腎皮質を採取・秤量し，メタノールで10%ホモジネートにし，遠心分離し，上清中のTBZ量を，高速液体クロマトグラフィー[18]で測定した．

腎皮質からのミトコンドリアの分離の際，皮質ホモジネートあるいは，分離されたミトコンドリア懸濁液の一部に等容量のメタノールを加えて遠心分離し，上清中のTBZ量を，高速液体クロマトグラフィーで測定した．

TBZ投与後のマウス腎皮質のミトコンドリア酵素の組織化学的観察：ミトコンドリアの標識酵素[19]である，ニコチンアミドジヌクレオチド（以下NADと略す）依存性イソクエン酸脱水素酵素の活性を，組織化学的手法で観察した．マウスに0，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与し，3，6および16時間後に断頭屠殺し，腎臓を速やかに取り出し，直ちに液体窒素で凍結した．組織化学的観察およびヘマトキシリン・エオジン観察用に，4－6μmの厚さの連続切片をクリオスタットで切り出した．組織化学的観察のための切片は，スライドグラス上で室温で乾燥し，37℃の反応液（20mM イソクエン酸Na，50mM ベロナール緩衝液，pH7.4，0.25 mg/ml ニトロブルーテトラゾリウム，0.125 mg/ml NAD，0.5mM $MgCl_2$，25mM $MnCl_2$）に浸した．反応液は直前に遮光して調整し，反応も遮光下で行った．反応条件をそろえるため，対照群と投与群の試料は，同じ反応液で同時に反応させた．反応後，スライドグラス上の切片は，10%ホルマリン液で10分間固定し，洗浄後，グリセリンゼリーで封入した．腎皮質の尿細管のNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の活性は，光学顕微鏡下で，青ないし青紫色の色素の沈着により，観察された．組織化学的観察用の切片と隣り合った切片を，常法に従って病理組織学的観察用にヘマトキシリン・エオジンで染色し，光学顕微鏡下で観察した．

TBZ投与後のマウス腎皮質のATP量：マウスに，0（オリーブオイル），500，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与し，16時間後に各群5匹ずつを断頭屠殺し，左右の腎臓を取り出し，氷冷した濾紙上で速やかに腎皮質を採取・秤量し，直ちに氷冷した3M過塩素酸でホモジナイズした．遠心分離した上清中のアデノシン三燐酸（以下ATPと略す）量をJonesの高速液体クロマトグラフィー法[20]で分析した．腎皮質中のATP量は，蛋白当たりのATP量（μmole ATP/mgProtein）で表した．

蛋白量の測定：蛋白量の測定は，牛血清アルブミンを

Table 1. The respiration rates and respiration control ratio (RCR) of renal cortical mitochondria from ICR mice at 3, 6 or 16 hours after single oral administration of 0, 1000 or 2000 mg TBZ/kg body weight.

after dosing (hours)	dose of TBZ (mg/kg b. w.)	Mitochondrial protein yield (%)	Respiratory rate (O_2 μmole/mg protein/min.) State 3	State 4	DNP	RCR (State 3/State 4)
3	0	15.5±1.4	118.8±1.6	34.4±0.5	100.4±5.6	3.45±0.07
	1000	15.3±2.0	114.2±8.4	33.8±1.4	100.3±7.2	3.37±0.16
	2000	17.0±2.7	115.8±10.4	32.6±1.8	108.2±9.3	3.55±0.19
6	0	13.2±2.0	123.9±2.7	35.3±1.6	101.5±2.2	3.51±0.15
	1000	11.2±1.0	113.2±3.1**	36.1±2.0	83.8±5.8	3.14±0.12**
	2000	12.3±0.7	95.0±6.4**	32.4±2.5	64.9±14.4**	2.92±0.17**
16	0	12.6±1.2	101.6±9.1	32.1±2.2	75.7±8.0	3.15±0.14
	250	12.1±0.8	102.6±11.4	31.0±0.8	74.9±7.8	3.29±0.29
	500	14.2±3.2	88.6±7.8	28.9±2.1	63.7±3.8	3.06±0.14
	0	11.2±2.3	105.9±4.9	30.0±1.4	61.8±2.8	3.50±0.16
	1000	11.3±0.4	71.3±9.2**	27.9±3.3	38.3±6.5**	2.56±0.21**
	2000	11.7±1.9	69.8±13.1**	26.1±4.6	38.1±10.4**	2.68±0.23**

Values are Mean±SD for 5 mice of each group and those marked with asterisks (* or **) differ significantly ($p<0.05$ or 0.01) from those of the control(0 mg/kg body weight) group.

Table 2. The *in vitro* effects of TBZ on the respiration of renal cortical mitochondria of ICR mice.

TBZ concentration	Respiratory rate (O_2 μ mole/mg protein/min.)			RCR
(μg/ml)	State 3	State 4	DNP	(State 3/State 4)
0	91.1±0.9	28.3±1.4	94.4±0.8	3.22±1.40
20	84.0±6.4	26.9±2.8	84.5±0.8*	3.14±3.00
30	79.3±2.8*	29.7±1.5	81.7±4.3**	2.67±0.30*
40	74.6±2.2**	27.4±0.8	78.4±4.6**	2.73±1.60*
50	69.8±5.4**	26.4±0.8	73.6±4.3**	2.65±2.60*

values are Mean±SD for 3 measurement and those marked with asterisks (* or**) differ significantly ($p<0.05$ or0.01) from the corresponding control (0 μg/ml) value.

標準物質として，Lowryらの方法[21]によって測定した．

統計学的分析：対照群と投与群間の差の統計学的分析は，Scheffeの多重比較検定[22]を用いて行った．

結　果

TBZ投与後のマウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸：1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZの投与後，3，6および16時間での，腎皮質のミトコンドリアの呼吸をTable－1に示した．投与後3時間では，State 3呼吸，State 4呼吸 およびDNP脱共役呼吸のいずれにおいても，対照群と投与群の間に有意な差は見られなかった．投与後6時間で，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスからの腎皮質ミトコンドリアのState 3呼吸が，対照群に比べて用量に相関して有意に低下していた．また，投与後6時間では，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスからの腎皮質ミトコンドリアの，DNP脱共役呼吸も，用量に相関して低下しており，2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスにおいては，対照群と比べて有意差が認められた．投与後16時間になると，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスからの腎皮質ミトコンドリアの，State 3呼吸とDNP脱共役呼吸の両方が，対照群に比べて，有意に低下していた．1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質ミトコンドリアの，呼吸調節率は，投与後3時間では有意な低下は見られず，投与後6および16時間で有意に低下していた．

1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質ミトコンドリアにおける，State 3呼吸およびDNP脱共役呼吸の低下が，投与後16時間に最も顕著であったので，250あるいは500 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質ミトコンドリアの呼吸を，投与後16時間で測定した（Table－1）．250あるいは500 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質ミトコンドリアの呼吸は，State 3呼吸，State 4呼吸およびDNP脱共役呼吸のいずれにおいても，対照群と比べて，有意な差は無く，呼吸調節率においても有意差はなかった．

Table 3. The level of TBZ in renal cortex after single oral administration of 500, 1000 or 2000 mg/kg b.w.

TBZ dose(mg/kg b.w.) after dosing(hours)	500	1000	2000
0.5	28.1±4.2	31.9±8.3	43.8±9.8
1	26.0±14.0	38.0±11.7	47.5±22.7
3	6.5±2.0	22.2±11.2	37.0±11.4
6	12.3±5.4	13.1±8.0	33.4±20.6
16	N.D.	13.9±15.6	19.4±13.6
24	N.D.	N.D.	9.1±5.3

The levels of TBZ in renal cortex were expressed as μg/mg wet weight.
Values are Mean±SD for 5 mice.
N.D.: Not detected.

マウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸に対するTBZの影響：未処置のマウス腎皮質から分離したミトコンドリアに対する，反応液中でのTBZの影響を，Table－2に示した．反応液中のTBZ濃度10μg/ml以下では，State 3呼吸，State 4呼吸およびDNP脱共役呼吸のいずれにおいても，対照（0μg/ml）と有意な差はなかった．反応液中のTBZ濃度20μg/ml以上でDNP脱共役呼吸が濃度に相関して有意に低下し，反応液中のTBZ濃度の30μg/ml以上でState 3呼吸が濃度に相関して有意に低下した．呼吸調節率においては，反応液中のTBZ濃度の30μg/ml以上で有意な低下が見れられた．

TBZ投与後のマウス腎皮質およびミトコンドリア分画中のTBZ濃度：1000あるいは2000 mg/kg体重のＴＢＺ投与後のマウス腎皮質のTBZ濃度は，Table－3に示したように，投与後1時間で最高値に達し，以後，急速に低下した．500 mg/kg体重のTBZの投与後のマウス腎皮質のTBZ濃度は，投与後0.5時間が最高で，以後，低下していた．

1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZの投与後のマウス腎皮質のミトコンドリア分画のTBZ濃度を，Table－4に示した．Table－3に示したマウス腎皮質のTBZ濃度と

Table 4. Amount of TBZ in renal cortical homogenate or mitochondrial fraction from renal cortex of ICR mice after singl oral administration of 1000 or 2000 mg TBZ/kg body weight.

after dosing (hours)	TBZ dose (mg/kg b.w.)	renal cortical homogenate (ng/mg protein)	mitochondrial fraction (ng/mg protein)
3	1000	160±92	126±67
	2000	327±159	216±70
6	1000	147±36	94±30
	2000	263±82	180±37
16	1000	89±99	66±59
	2000	103±70	87±63

Values are Mean±SD for 5 mice.

同様に，腎皮質ホモジネートまたはミトコンドリア分画のTBZ濃度は，3時間後が比較的高く，6および16時間後に低下していた．また，分離されたミトコンドリア分画中の濃度は，ミトコンドリアを分離する前の腎皮質ホモジネート中の濃度より低かった．250あるいは500 mg/kg体重のTBZの投与後16時間のマウス腎皮質のホモジネートおよびミトコンドリア分画にはTBZは検出されなかった．

腎皮質のNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素に対するTBZ投与の影響：1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZ投与後3あるいは6時間では，マウス腎皮質のNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の活性は，対照群と比べて，変化はなかった．投与後16時間で，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質の近位尿細管の当酵素の活性は，対照群と比べて，阻害されていた（Fig. 1） 当酵素の活性の阻害は，腎の切片の皮質の1/3から1/2の部分に特に顕著に観察され，皮質のその他の部分では，対照群と比べて阻害は顕著ではなかった．顕著に阻害の見られる部分の中でも，近位尿細管の曲部が，直部より強く阻害されていた．ヘマトキシリン・エオシン染色により，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスで，腎皮質の尿細管の拡張が，投与後3時間から見られ，投与後6および16時間でより顕著となった．腎皮質の尿細管の拡張は，主に，腎の切片の1/3から1/2の部分に観察され，投与後16時間では，当酵素の活性の阻害が見られた部分と一致していた．1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZ投与後3，6および16時間には，腎皮質の尿細管の壊死は見られなかった．

腎皮質のATP量に対するTBZ投与の影響：TBZ投与後の呼吸の阻害およびNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の活性の阻害が，投与後16時間に顕著に見られたので，ミトコンドリアの機能の間接的指標であるATP量を，TBZ投与後16時間のマウスの腎皮質で測定した（Table−5）．1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZを投与されたマウスの腎皮質のATP量は，対照群と比べて，有意に低下していた．

Table 5. The level of ATP in renal cortex of ICR mice at 16 hours after single oral administration of TBZ.

Dose of TBZ (mg/kg b. w.)	ATP (μ mole/mg protein)
0	8.74±1.29
500	8.17±1.67
1000	6.03±0.48**
2000	6.28±0.51**

Values are Mean±SD for 5 mice and those marked with asterisks(**) differ significantly ($p<0.01$) from that of control group.

考　　察

我々は前報で，TBZが，雄マウスへの単回強制経口投与の24時間後に，腎近位尿細管細胞の壊死と同時に，腎近位尿細管細胞のミトコンドリアの膨張およびミトコンドリア内部構造の変化を引き起こす事を明らかにした[14]．しかし，マウス腎近位尿細管のミトコンドリアにおいて，TBZにより引き起こされる生化学的変化については，ほとんど解明されていない．さらに，ミトコンドリアの形態学的変化が尿細管細胞の壊死と同時に観察されただけでは，ミトコンドリアの機能の低下が尿細管細胞の壊死の原因とは言えない．TBZの腎毒性の発現におけるミトコンドリア傷害の重要性を示すためには，TBZによるミトコンドリアの機能障害が，尿細管細胞の崩壊の形態学的証拠より前に証明されなければならない．そこで，TBZ投与後24時間以内の腎皮質のミトコンドリアの機能

を経時的に観察した．

TBZ投与後の腎皮質のTBZ量が投与後1時間からのち低下しているにもかかわらず，腎皮質より分離したミトコンドリアの呼吸の阻害は，投与後6時間で初めて観察され，16時間後には，さらに顕著になった．この結果は，TBZ投与後に観察されたミトコンドリア呼吸の阻害が，腎皮質からミトコンドリアを分離する段階（例えばホモジネーションや遠心分離の間）での，TBZへのミトコンドリアの曝露によるものではない事を示している．TBZはまた，腎皮質から分離したミトコンドリア分画中にも検出されるので，この分画に含まれるTBZが，呼吸の測定中に反応液中で呼吸の阻害を引き起こす可能性も考えられる．しかし，TBZ投与後の腎皮質ミトコンドリア分画中に含まれるTBZ濃度は，反応液中に直接ＴＢＺを加えた場合にミトコンドリア呼吸の阻害の見られない最高濃度（10μg/ml反応液）より低く，ミトコンドリア呼吸の測定反応液中では，さらに希釈されるので，ミトコンドリア分画中のTBZが，呼吸の測定中に反応液中で呼吸の阻害を引き起こす可能性はほとんどないと思われる．また，TBZ投与後のミトコンドリア呼吸の阻害は，ミトコンドリア分画のTBZ量が高い3時間後では見られず，ミトコンドリア分画のTBZ量が低くなってきた6ないし16時間後に顕著であったので，TBZ投与後に観察された腎皮質ミトコンドリア呼吸の阻害が，ミトコンドリア分画中のTBZによる反応液中での阻害によるものではないと考えられる．このように，TBZ投与後に観察された腎皮質ミトコンドリア呼吸の阻害は，ミトコンドリア分離中あるいは分離後の人工的曝露によるものではなく，腎尿細管細胞内で引き起こされたものである．

TBZは，呼吸測定の反応液に20μg/ml以上の濃度で加えると，マウス腎皮質のミトコンドリア呼吸を直接阻害する．この試験管内での直接の呼吸阻害は，TBZ投与後の腎皮質で見られたのと同じく，State 3呼吸とＤＮＰ脱共役呼吸に見られ，State 4呼吸では見られなかった．予備実験では，TBZの代謝物である5－水酸化TBZあるいは2－アセチルベンツイミダゾールは，TBZ投与後に確認される血中の濃度[13]においては，このような，試験管内でのミトコンドリア呼吸の阻害を引き起こさなかった．このことから，TBZ投与後のマウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸阻害の原因となっているのは，これらの代謝物ではなく，TBZ自体であると考えられる．500 mg/kg体重のTBZの投与後0.5および1時間で，試験管内で直接の呼吸阻害を引き起こす濃度を越えた腎皮質内TBZ濃度が確認されている（Table 3）が，500 mg/kg体重のTBZの投与後1時間[23]あるいは16時間（Table 1）には，腎皮質のミトコンドリア呼吸の阻害は見られない．さらに，1000あるいは2000 mg/kg体重のTBZ投与後のマウス腎皮質のミトコンドリアの呼吸阻害は，腎皮質のTBZ量の高い投与後1ないし3時間には観察されず，逆に，腎皮質のTBZ量の低下した投与後6時間以降に観察された．このように，TBZ投与による腎皮質のミトコンドリア呼吸への影響は，試験管内での直接の阻害だけで単純に推測できないことが示された．

我々の以前の報告[13]では，500ないし1000 mg/kg体重のTBZの投与後1ないし5時間で，マウスの腎切片への有機塩基（テトラエチルアンモニウム：TEA）の取り込みが低下していたが，有機酸（パラアミノ馬尿酸：PAH）の取り込みは，同じ，投与後1あるいは5時間後には，低下していなかった．TBZ投与後1および5時間では，TBZの血中濃度が高かったことから，この時間における有機塩基の取り込みの低下は，弱塩基であるTBZによる競合阻害によるものと考えられた．さらに，有機塩基輸送システムの阻害剤（Ｎ－メチルニコチンアミドあるいはチアミン）の前処置は，TBZ投与後24時間における腎尿細管の病理学変化を軽減したが，有機酸輸送システムの阻害剤（プロベネシド）の前処置は，TBZ投与後24時間における腎尿細管の病理学変化を軽減しなかった．有機塩基輸送システム阻害剤の前処置による，TBZの尿細管細胞への取り込みの阻害が，TBZによる病理学変化の軽減をもたらしたと考えられた．このように，TBZは，投与後1から5時間に，尿細管細胞の有機塩基輸送システムによって尿細管細胞に取り込まれると推測される．今回の実験で，1000ないし2000 mg/kg体重のTBZ を投与されたマウスの腎皮質のTBZ量は投与後1時間が最も高く，それ以後，低下している．このようなTBZ量の低下にもかかわらず，腎皮質のミトコンドリア呼吸の阻害は6時間後にはじめて有意となり，さらに，16時間後に顕著になった．投与後数時間のあいだの腎尿細管細胞内におけるTBZへの曝露が，どのような作用機序でその後のミトコンドリア呼吸の阻害に結びつくのかは不明である．

1000ないし2000 mg/kgのTBZ投与後16時間で，腎皮質ミトコンドリアのState 3呼吸とDNP脱共役呼吸の両方が，対照群の約60%に低下していた．また，1000ないし2000 mg/kgのTBZ投与後16時間における，腎皮質のATP量は，対照群の約70%に低下していた．さらに，1000ないし2000 mg/kgのTBZ投与後16時間のNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の阻害も，腎皮質全体ではな

く，皮質の1/2から1/3の部分の，特に近位尿細管に顕著で，それより下位の尿細管（ヘンレの係蹄，遠位尿細管など）には見られなかった．腎皮質のすべての尿細管が傷害されたわけではないという，この組織化学的所見は，腎皮質全体から分離したミトコンドリアの呼吸阻害や腎皮質全体で測定したATP量の低下が，対照群の1/3程度にしかあたらないという結果と良く一致している．

250あるいは500 mg/kg体重のTBZの投与後24時間で，マウス腎臓の腎盂から表面に向かった扇形の部分が肉眼観察で白く見られ[1,2]，光学顕微鏡観察および電子顕微鏡観察では，その部分の尿細管が拡張し，拡張した尿細管内には変性した細胞の崩壊片が多く見られた[2-3]．さらに，今回の実験でも，尿細管の拡張は3時間から観察されている．変性・剥離した尿細管細胞の崩壊片による下位尿細管における閉塞が，尿細管内の尿の貯留と尿細管腔の拡張を引き起こしたと考えられる．米山らは，マウスに強制経口投与した^{14}C－TBZの主な排泄経路は尿であり，投与後24時間以内の尿に投与量の約50%が排泄されると報告している[24]．閉塞し拡張した尿細管の管腔に貯留した尿は，閉塞・拡張が見られない尿細管を流れる尿よりも，高い濃度のTBZを含んでいる可能性がある．このような，より高い濃度のTBZへの，より長い時間の曝露により，拡張の見られる部分の尿細管細胞内でのNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の阻害が起こるのかもしれない．

腎皮質のミトコンドリア呼吸の有意な阻害およびATP量の有意な低下は，1000ないし2000 mg/kg体重のTBZを投与したマウスに見られ，250あるいは500 mg/kg体重のTBZを投与したマウスには見られなかった．多田らは，1000ないし2000 mg/kg体重のTBZの投与後24時間で，腎尿細管細胞の壊死が多く見られるが，500 mg/kg体重のTBZの投与では，腎尿細管細胞の壊死は10匹中1匹に軽度に見られるのみで，250 mg/kg体重以下のTBZの投与では，腎尿細管細胞の壊死は全くみられないと報告している[14]．このように，腎皮質のミトコンドリア呼吸の有意な阻害およびATP量の有意な低下が見られる投与量と腎尿細管細胞の壊死が見られる投与量は一致していた．しかし，注目すべきは，1000ないし2000 mg/kg体重のTBZの投与後24時間の腎尿細管細胞の壊死の頻度と程度が用量に相関していたのに対して，腎皮質のミトコンドリア呼吸の阻害およびATP量の低下については，1000 mg/kg体重のTBZの投与後16時間のそれらが，2000 mg/kg体重のTBZの投与後16時間のそれらとほぼ等しかったことである．TBZの投与は，ミトコンドリア呼吸の阻害やATP量の低下以外にも，生化学的な変化をもたらし，その結果，用量に相関した尿細管細胞の壊死を引き起こすのかもしれない．

TBZの投与により，マウス腎皮質のミトコンドリアのState3呼吸とDNP脱共役呼吸が有意に阻害され，State4呼吸は阻害されなかった．また，呼吸測定の反応液中での直接のTBZ曝露によっても，同様の阻害パターンが見られた．中川らは，ラットの分離肝細胞へのTBZの試験管内曝露によって，ミトコンドリアのState 3呼吸が阻害され，State 4呼吸は阻害されなかったと報告している[25]．このような，TBZによるミトコンドリア呼吸の阻害パターンは，TBZがミトコンドリア呼吸に及ぼす影響の作用機序を示唆している．State 3呼吸とDNP脱共役呼吸の両方への阻害は，一般には，チトクローム呼吸鎖にそった電子伝達への介入を意味すると考えられている．この作用機序は，腎毒性を有する化合物として知られるゲンタマイシン[26]や塩化水銀[27]が，腎皮質のミトコンドリアの機能障害を引き起こす作用機序と同じである．一方，TCAサイクルに含まれる酵素の一つであるNAD依存性イソクエン酸脱水素酵素の腎皮質尿細管での阻害は，ミトコンドリアの中のTCAサイクルの回転が，TBZの投与により抑制されたことを示している．真菌のミトコンドリアの様々な酵素に対するTBZの阻害効果の報告の中で，AllenとGottlieb[28]は，ミトコンドリアにおけるTBZの主な作用点は，おそらく電子伝達系であり，その他の作用は二次的なものだと結論している．マウス腎皮質のミトコンドリアにおけるTBZの作用機序は，真菌のミトコンドリアにおけるのと同じであろう．

これまでの，マウスにおけるTBZの腎毒性に関する我々の研究から，経口投与され体内に吸収されたTBZは，腎皮質の尿細管細胞へ有機塩基輸送システムによって取り込まれた後，ミトコンドリアの呼吸を阻害し，その結果，細胞内のATPの枯渇と，ついには，近位尿細管細胞の壊死を引き起こす事が示唆された．

参考文献

1）Pawlowski Z.S. and Skrzypinska K.：*Trans. R. soc. Trop. Med. Hyg.*, **66**, 512, 1972.
2）Golden T.A., McElveen F.J., Jupia J.E. et al.：*Arch. Dermatol.*, **110**, 295, 1974.
3）Rex D., Lumeng L., Eble J. and Rex L.：*Gastroenterology*, **85**, 718-721, 1983.
4）Manivel J.C., Bloomer J.R. and Snover D.C.：*Gastroenterology*, **93**, 245-249, 1987.
5）Davidson R.N., Weir W.R.C. Kaye G.L. et al.：*Trans.*

R. soc. Trop. Med. Hyg., **82**, 620, 1988.

6) Roy M.A., Nugent F.W. and Aretz H.T. : *Dig. Dis. Sci.*, **34**, 938-941, 1989.

7) Robinson H.J., Stoerk H.C. and Graessle O.E. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **7**, 53-63, 1965.

8) 三栗谷久敏，林田志信，高橋博，他；東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **32**-2, 5-15, 1981.

9) Tada Y., Fujitani T. and Yoneyama M. : *Fd. Chem. Toxicol.*, **34**, 709-716, 1996.

10) Ogata A., Ando H., Kubo Y. et al. : *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**, 509-520, 1984.

11) Fujii T., Mikuriya H., Kamiya N. et al. : *Fd. Chem. Toxicol.*, **24**, 207-211, 1986.

12) Tada Y., Yoneyama M., Kabashima J. et al. : *Fd. Chem. Toxicol.*, **27**, 307-315, 1989.

13) Tada Y., Fujitani T. and Yoneyama M. : *Fd. Chem. Toxicol.*, **30**, 1021-1030, 1992.

14) Tada Y., Fujitani T. and Yoneyama M. : *Toxicol.*, **94**, 41-55, 1994.

15) Yoneyama M., Ogata A., Fujii T. et al. : *Fd. Chem. Toxicol.*, 22, 731-735, 1984.

16) Singh G. : *Toxicol.*, **58**, 71-80, 1989.

17) Pedersen P.L., Greenawalt J.W., Reynafarje B. et al. : *Methods in Cell Biology*, **20**, 411-481, 1978.

18) Fujitani T., Yoneyama M., Ogata A. et al : *Fd. Chem. Toxicol.*, **29**, 265-274, 1991.

19) Ernster L. and Navazio F. : *Exp. Cell Res.*, **11**, 483-510, 1956.

20) Jones D.P. : *J. Chromat.*, **225**, 446-449, 1981.

21) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.

22) Gad S.C. and Weil C.S. : Statistics for toxicologists. In : A. Wallace Hayes (Ed), *Principles and Methods of Toxicology*, Raven Press, New York, pp. 273-320, 1982.

23) Fujitani T., Tada Y., Saitou Y. et al. : *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **20** (suppl. 1), 263, 1997.

24) 米山允子，小縣昭夫，藤井孝，他；東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.*, **34**, 337-342, 1983.

25) Nakagawa Y. and Moore G.A. : *Life Sciences*, **57**, 1433-1440, 1995.

26) Simmons C.F. Jr., Bogusky R.T. and Humes H.D. : *J. Pharmacol. Exp Ther.*, **214**, 709-715, 1980.

27) Weinberg J.M., Harding P.G. and Humes H.D. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 60-67, 1982.

28) Allen P.M. and Gottlieb D. : *Applied Microbiology*, **20**, 919-926, 1970.

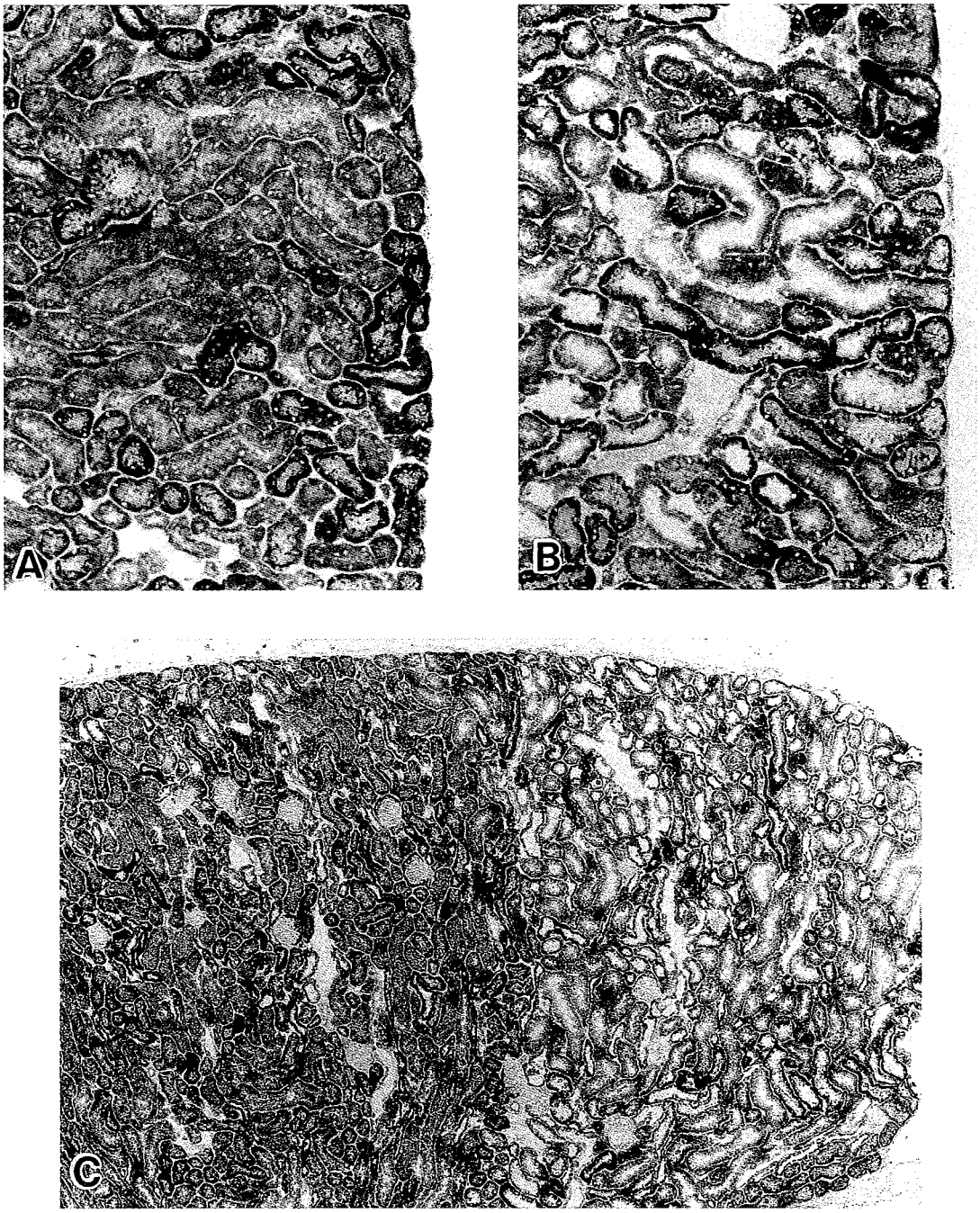


Fig. 1. Effect of TBZ on the activity of NAD-linked isocitrate dehydrogenase in renal cortex of mice at 16 hours after dosing.
NAD-linked isocitrate dehydrogenase was inhibited in the tubular cells of mouse (B) given 2000 mg TBZ/kg body weight, compared with control mouse (A). Inhibition of the enzyme was shown in a right portion in the kidney of mouse given 2000 mg TBZ/kg body weight, while inhibition was mild in a left portion (C). ×125(A,B), ×50(C).

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 291-295, 1999

環境汚染物質の体内動態に関する生理学的シミュレーションモデルによる解析

深野駿一*

Toxicokinetics of Environmental Pollutants Based on Physiological Pharmacokinetic Model

Shunichi Fukano*

Keywords： 生理学的モデルPBPK Model, コンピューターシミュレーション computer simulation, リスクアセスメントrisk assessment, ダイベンゾフラン dibenzofuran, 組織濃度 tissue concentration, 環境汚染物質 environmental pollutants

はじめに

安全性評価において，これまで動物実験での無影響量等に安全係数100を乗じる方法が採用されてきたが，定量的には疑問であり，動物実験の結果の精度が生かされていない．動物実験はその結果をヒトに外挿して初めて意味があるが，外挿に関する吟味は一部の専門家に限られており，動物実験を行う研究者には一般的に疎遠であった．米国環境保護庁（Environmental Protection Agency）は最近，リスクアセスメントの計算に生理学的モデル（Physiologically Based Pharmacokinetic Model：以下PBPK Modelと略す）を一部の物質に適用し始めており，また薬物評価の国際的統一の必要性から日・米・EC三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション（International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use）は動物実験のヒトへの外挿に関してファーマコキネティクスによる，より合理的な解釈を求めている．PBPK Modelによるシミュレーションは動物実験の結果を容易にヒトに外挿することができ，現在最も信頼できる手段と考えられている．そこで多くの人が活用できるように，生理学的データ（組織・血液分配係数，血流量，組織容積など）を入力するのみで，薬物の体内分布を予測し，グラフ化するプログラム（以下*PPP*と略す）を開発してきた[1-3]．ここでは，環境汚染物質のPBPK Modelの特徴と，*PPP*の応用例として，最近，環境汚染物質として話題となっているダイオキシンの関連物質である2-Chlorodibenzofuran（以下2-CL-DBFと略す）の体内動態について解析を試みたので報告する．

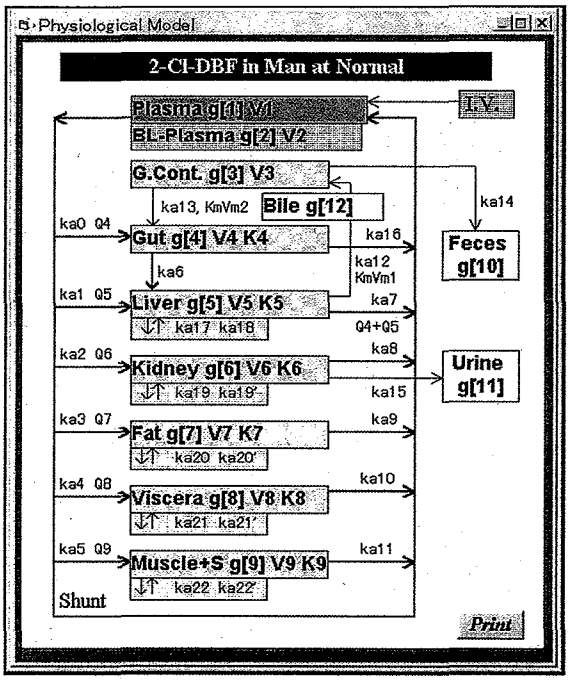


図1．2-CL-DBFの生理学的モデル（PBPK Model）

環境汚染物質のPBPK Model

PBPK Modelは，吸収された薬物が血管によって各組織に運ばれ，その組織又は臓器と血液との間で，一定の分配係数で薬物が分布することを前提としている．更に薬物の代謝に酵素反応（KmVm:Michaelis-Menten式の定数）やクリアランスの概念を導入し，解剖学的な面ばかりでなく生理学的な知見を取り入れた，生体を模したモデルである．環境汚染物質は，一般的に脂溶性物質が多く，一般の薬剤の体内動態とは性質を異にしている．そこでPBPK Modelでは，一般的に考慮されていない①

* 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
* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

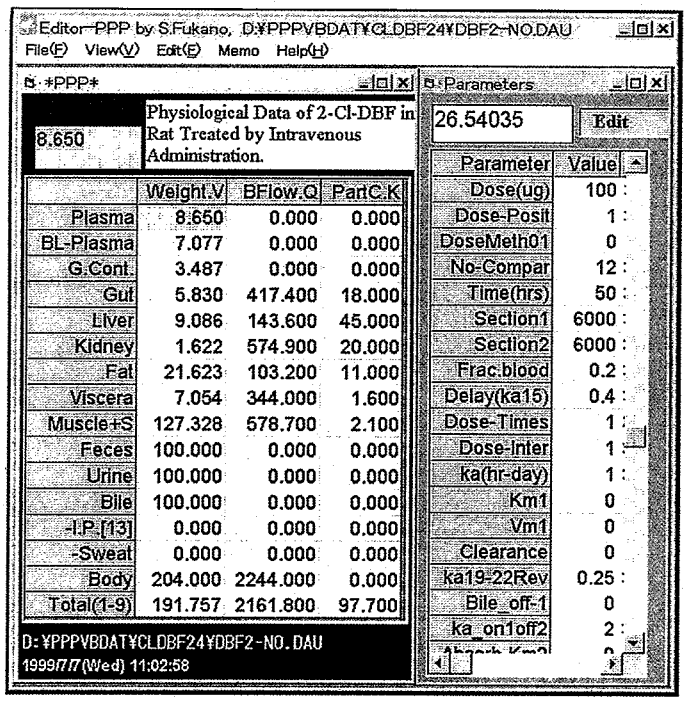


図2．シミュレーションに使用した生理学的データ及びパラメータ

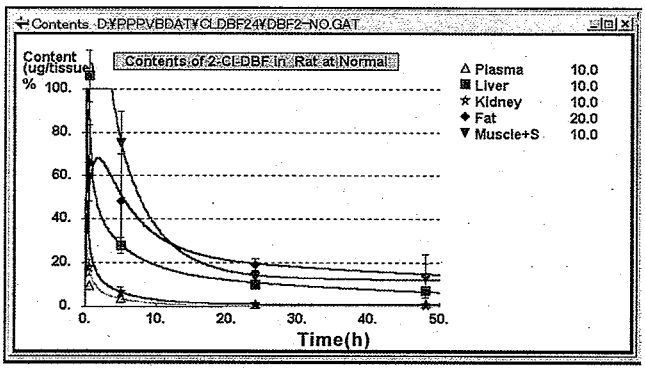


図3．2-Cl-DBFのシミュレーション結果（曲線）と実験値（平均値±標準偏差）雄性Wistarラットへ100μg/Rat静脈内投与
▲：血清，■：肝臓，★：腎臓，◆：脂肪，
▼：筋肉＋皮膚

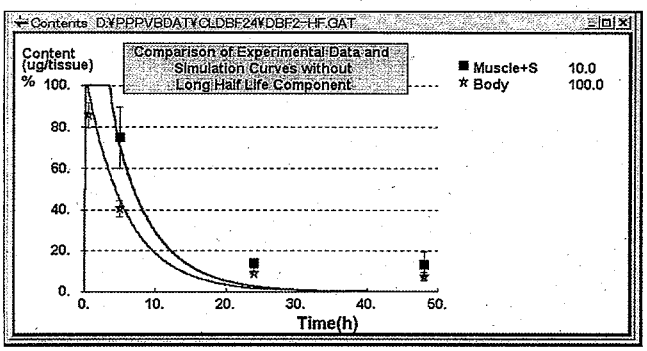


図4．長期半減期成分を考慮しない場合のシミュレーション結果と実験値
■：筋肉と皮膚の実験値
★：全身の実験値

腸管から乳ビ管を経て血中に入る吸収経路（ka16），②腸肝循環の経路（ka12），③蓄積には，短半減期成分と長半減期成分が観察されるため，ka17～ka22までの組織深部への移行経路，を加えた（図1）．これらの経路を加えることにより，各臓器の蓄積のタイムコースをより正確に解釈することができた．

プログラムの構成

生理学的データ及びパラメーター入力部：組織名，組織重量，血流量量，組織・血液分配係数，投与方法，投与組織，投与量，投与回数，投与間隔，予測期間，移行係数，血液中非結合型分率，遅延時間，KmVm値，クレアランス値，腸肝循環の有無，組織深部移行係数，ステップ数（計算上の精度に関係）などを入力すると条件に応じたPBPK Modelを作成する．図2に今回使用したパラメーターを示した．**計算部**：パラメーター入力後コマンドボタンを押すのみで，自動的に体内分布を計算する．微分方程式及びプログラミングの知識は，一切必要ない．**グラフ化部**：各組織毎の濃度，含有量，半減期等のタイムコースを表示する．外挿による結果を比較するため，組織毎の個体間の比較も表示することができる．また血中の濃度下面積（濃度曲線とX, Y軸で囲まれた面積，以下AUCと略す），平均滞留時間（以下MRTと略す）ばかりでなく標的臓器のAUC, MRTも表示できる．なお操作はサンプルデータを変更する方式をとっており，必要に応じて項目を選択すれば目的を達成でき，極めて簡便である．

2-CL-DBFの蓄積

環境汚染物質の薬物動態の特徴を2-Cl-DBFを例に取り，*PPP*を用いて以下，解析を行った．

【動物実験及び最小2乗法】動物実験値は，国立環境研究所，遠山千春博士から個人的に入手したデータと，その文献[4]を使用した．^{14}Cでラベルした2-Cl-DBFを6週令の雄性Wistarラットの静脈内に投与し，経時的に臓器を採取し，蓄積量を測定した．これらの実験値から最小2乗法により，各組織の組織・血液分配係数（K）及び移行係数（ka）を求め，シミュレーションを行い，結果（曲線）を，実験値（平均値，標準偏差）と共に図3に示した．なお，ラットの血流量は，杉山ら[5]の値を使用した．

【ラットのシミュレーション結果】ラットの組織への蓄積は，長半減期成分を考慮することにより，計算値と比較的良く一致している（図3）．図中，縦軸は，100μgを投与したときの組織含有量を示し，組織名の右の数値は，フルスケール時の縦軸の値を表す．静注後5時間及

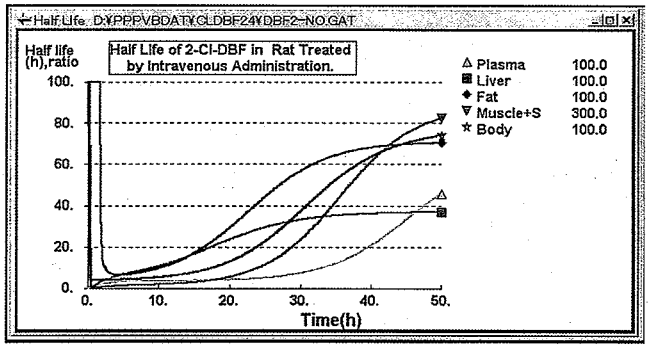


図５．静脈内投与時の各組の半減期の変位
▲：血清，■：肝臓，◆：脂肪，▼：筋肉＋皮膚
★：全体

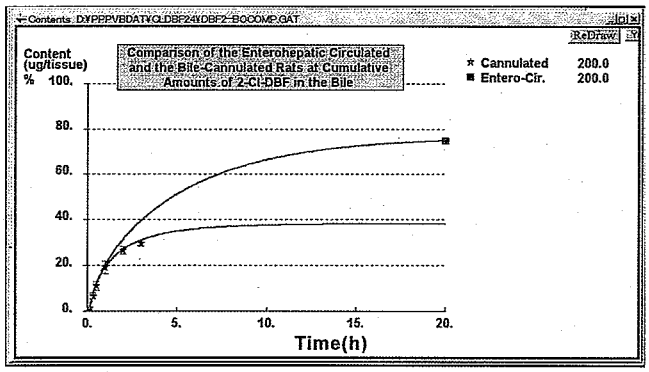


図６．静脈内投与時の胆汁中の累積排泄量
★：カニューレを挿入した場合のシミュレーション結果と実験値
■：腸肝循環をしている場合の蓄積排泄量

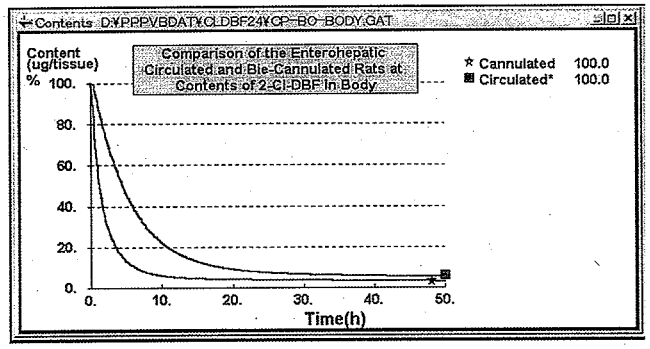


図７．ラット（全体）中の2-CL-DBFの残留量の比較
★：腸肝循環を断ち切った場合
■：腸肝循環をしている場合（正常時）

び24時間までに，それぞれ投与量の約53%及び86%が，糞及び尿に排泄され，１塩素化物のためか比較的排泄は速く，見かけの半減期は短かった．なお，ラットにおける2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランの半減期は約２日[7]，2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシンのそれは数ヶ月といわれている．

【組織への薬物の残留と長半減期成分】組織深部への薬物の移行（長半減期成分）を考慮しない場合のシミュレーション結果とラットにおける実験結果を比較し，図４に示した．24時間以降の計算値は実験値の1/5以下で一致せず，組織・血液分配係数だけでは実験結果を解釈することはできない．脂溶性物質など代謝が遅い薬物では，長半減期成分を考慮する必要があることを示している．

各組織の減衰曲線から，各時間での半減期を求め，各組織のタイムコースを図５に示した．縦軸は，半減期の時間を示す．但し，図の組織名の右の値が100の場合は，フルスケールの値が100時間であり，300の場合は，フルスケールの100の値が300時間となる．投与初期では各組織の蓄積は減衰状態にないため，無限大として表している．減衰が始まり，その値が見かけ上一定となり（ここでは約2から15時間），その後長半減期成分の影響により半減期が長くなっている．シミュレーションをしない場合には，見かけ上一定となっている間の半減期を一般的に半減期としている．このみかけの半減期は6時間であるが，投与初期の半減期であることを示している．20時間以降では，組織によって80時間以上の半減期成分も観察されている．したがって長期暴露の場合は，投与初期の見かけの半減期ばかりでなく，長半減期成分による薬物の残留も考慮する必要がある．このように組織の半減期は一定ではなく，長半減期成分のあることが環境汚染物質の特徴となっている．

【腸肝循環】胆管にカニューレを挿入し，腸肝循環がない状態での，ラットの胆汁への累積排泄量（平均値，標準偏差）とシミュレーション値（曲線）を図６に示した．腸肝循環がない場合，静注後，20時間までに約70%が胆汁中に排泄されているが，腸肝循環がある場合（正常時）では，胆管を通過する累積量は，投与量の150%にのぼり，再循環量の多さが確認できる．しかし正常時（腸肝循環あり）では，糞中に排泄されるのは48時間後で，胆汁への累積排泄量の約1/3の45%に過ぎない．このことからも腸管から再吸収されていることが確認できる．汚染物質の体内蓄積を減らすには，この腸肝循環量を減らすことが必要である．腸肝循環を断ち切った場合，最大どこまで蓄積を減らせるか，体全体のシミュレーション結果を図７に示した．５時間後の蓄積量で比較すると，腸肝循環を断ち切った場合は1/3以下となった．50時間全体の負荷量を見るために，AUCで比較すると，腸肝循環を断ち切った場合は約1/2以下となり，その効果を量的に知ることができる．ダイオキシンのような長半減期の薬物は，その効果は更に大きいものと考えられる．また環境汚染物質は，肝臓での代謝産物の毒性が強い場合も観察される．このような場合は，腸肝循環により絶

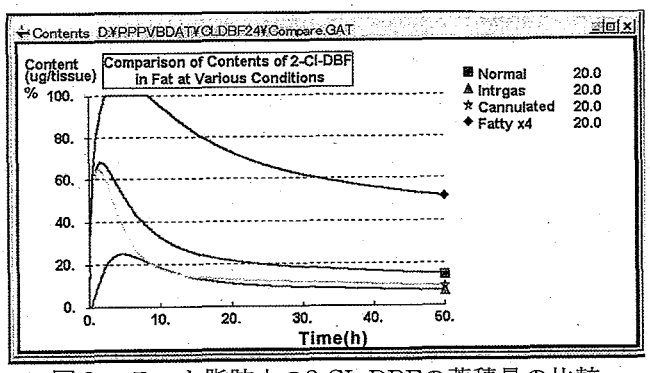


図８．ラット脂肪中の2-CL-DBFの蓄積量の比較
（100μg/Rat投与）
★：正常時
▲：経口投与
★：腸肝循環を断ち切った場合
◆：肥満（脂肪量×４）

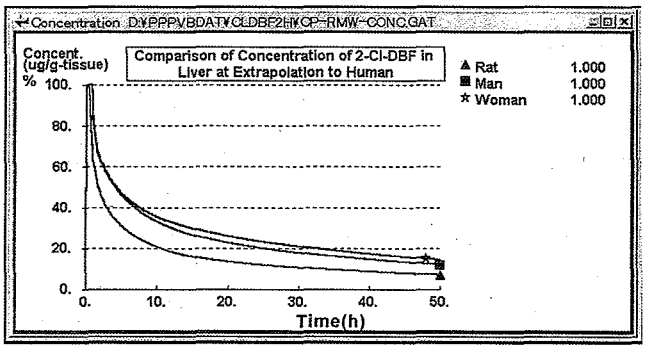


図９．ラットからヒトへの外挿
2-CL-DBFを血中１回投与時（500μg/kg）における肝臓中の濃度
▲：ラット，　■：男，　★：女

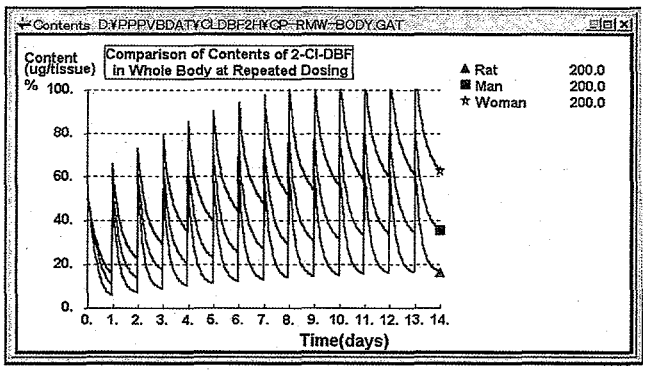


図10．ラットからヒトへの外挿
2-CL-DBFを14日間連続投与時（100μg/day）における全身の蓄積量比
▲：ラット，　■：男，　★：女

えず毒物が産成されることになるため，その循環量を知ることは毒性評価上重要となってくる．

【投与条件の差異による比較】ラットへの①血中１回投与実験を基にして，②経口投与した場合，③腸肝循環を断ち切った場合，④脂肪組織が４倍に増加した場合（体重では1.3倍），の脂肪組織中の蓄積量のシミュレーション結果を図８に示した．その結果，経口投与は，血中投与と比べ吸収率の関係で最も低く，次に腸肝循環を断ち切った場合は，0.6倍に低下した．当然ではあるが肥満している場合は，蓄積量が４倍ほど高くなった．PBPK Modelを使用すると，パラメータ等を変えることにより，いろいろな条件下の体内分布を簡単に予測することが出来る．なお投与量が極めて低い場合の分布がどうなるかは，実際の実験で投与量による効果を求めていないため，その差異を予測することはできない．しかし，投与後，時間が経過し，蓄積濃度が低下した場合の半減期は，長期半減期成分の項で示したよう，見かけの半減期の約10倍となるなど，注意すべき知見が得られている．

【ヒトへの外挿】ラットの実験結果を基にヒトに外挿し，結果を図９，10に示した．ヒトへ外挿するときに使用した組織容積及び血流量は，主に杉山ら[5]及びReference Man[6]によった．Reference Manは，70kg, 170cm, 20-30才，Reference Womanは，58kg, 160cm, 20-30才を想定している。図９は，肝臓中の濃度変位を予測したもので，ヒト男子でラットの1.7倍，ヒト女子で2.1倍の濃度増加が見られた．50時間までのAUCで比較するとヒト男子でラットの1.6倍，ヒト女子では1.74倍である．肝臓への負荷量という意味では，AUCの方が濃度より正確であり，毒性評価上今後利用されて行くことを期待している．環境汚染物質の場合は，常に暴露されている場合もあるため，血中に100μg，14日間連続投与した場合の全身の蓄積量のシミュレーション結果を図10に示した．ヒト女子では，ラットに比べ3.8倍ほど高く，また脂肪組織中の蓄積量では4.5倍ほど高くなることが予想された．また男子の全身の蓄積量で比較すると，ラットの2.2倍ほど高かった．これらの値は，単に機械的に外挿することは，毒性を過小評価する恐れのあることを示している．2-Cl-DBFは半減期も短く（短半減期成分，約6時間）蓄積しにくい物質であるが，連続投与した場合，長半減期成分（80時間以上）もあるため，蓄積する可能性もあることが示唆された．

【おわりに】動物実験からヒトへの外挿は，薬物の代謝機構が異なり，困難であるとの意見もある．しかし医薬品と異なり，農薬や環境汚染物質のヒトへの投与実験は困難であり，より正確な外挿の必要性が求められている．種間の差異は，

標的臓器における種間の蓄積量の差異＝代謝機構上の質的差異 X 形態学あるいは生理学上の量的差異

として表すことができる．したがって代謝機構上の差異を知っただけでは，不十分であり，生理学上の量的差異を知ることにより，初めて種間の差異を知ることができる．シミュレーションは，この生理学上の量的差異を正確に外挿するものであり，ヒトへの投与実験のできない薬物の安全性評価においては必要性が高いと考えられる．安全係数（不確実係数）を決定する際，これらの外挿値を参考にすることにより，より正確な許容量が推定されることを期待している．

以上，今回開発したプログラムは微分方程式などの知識は必要なく，各種の命令を選択するのみで結果が得られるため，環境汚染物質のリスクアセスメントの他，動物実験計画，薬物投与計画など多方面に渡り活用できるものと思われる．

要　約

環境汚染物質あるいは薬剤の安全性評価において，コンピューターシミュレーションは必要ではあるが，数学やコンピューターなどの余分な知識が必要なため，専門家に限られ，一般化していない．そこで生理学的モデルに基づく薬物動態予測プログラム（*PPP*）を開発した．*PPP*は，Microsoft Windows95上で動き，微分方程式やプログラミングの知識を必要とすることなく，薬物の体内分布曲線を容易に求めることができる．この*PPP*を利用して，環境汚染物質として最近話題となっている，ダイオキシンの関連物質である2-Chlorodibenzofuran の体内動態について解析を試みた．その結果，以下の知見が得られた．①見かけの半減期は，ラットで約6時間と短いが，組織によっては80時間以上の長半減期成分も存在した．②胆汁中への累積排泄量は，腸肝循環のため，投与量の1.5倍にのぼり，再循環量の多さが確認された．③ラットの実験結果をヒト女子に外挿した結果，全身の残存量は，連続投与した場合，ラットに比べ14日後で3.8倍ほど高く単に機械的に外挿することは，毒性を過小評価する恐れのあることが示唆された．また，環境汚染物質の毒性評価に，長半減期成分，腸肝循環量，AUCなどの指標を取り入れ，量的解釈の必要性を示した．

謝　辞　本研究を遂行するに当たり，2-Cl-DBFの動物実験データを提供していただいた国立環境研究所の遠山千春博士に感謝致します．

文　献

1）深野駿一：日本動物実験代替法学会大会要旨集，第7回，60-61, 1993，第9回，118-119, 1995，第11回，105-106, 1997.

2）Fukano S：*AATEX*, **4**, No1,51-52, 1996.

3）Fukano S：*Porphyrins.*, **7**, No2, 3, 176-181, 1998.

4）Tohyama C, Hirano S, Suzuki T：*Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud., Jpn.*, **No.129**, 89-101, 1991.

5）杉山雄一，澤田康文：ファーマコキネテックス，入門編，花野学編集，77-78, 1987，南山堂，東京.

6）*Report of the task group on reference man, ICRP Publication* **23**, 1975, Pergamon Press, Oxford

7）Birnbaum LS, Decad GM, Matthews HB：*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **55**, 342-352, 1980.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 296-302, 1999

電子顕微鏡による精子観察のための基礎的条件の検討

福森信隆*, 青木直人*

A Comparison of Basic Conditions for Electron Microscopic Observations of Spermatozoa

NOBUTAKA FUKUMORI* and NAOTO AOKI*

Conditions for electron microscopic examinations of rat and mouse spermatozoa were compared. Transmission electron microscopic examinations of the ultrathin sections were suitable for the fine structural observation of the testicular cells. Using a glass plate method, the overall sperm shape was observed in scanning electron microscopic examinations of the sperm obtained from epididymides. This method is considered suitable to detect shape abnormalities of the sperm. Glutaraldehyde was a suitable fixative for the testicular tissues. Paraformaldehyde was a suitable fixative for the sperm on glass plates.

Keywords：精子 spermatozoon, 微細構造 ultrastructure, 電子顕微鏡観察 electron microscopic observation, 方法 method

緒　　言

精子の形態変化は，精巣での精子形成の機能障害及び精巣上体での成熟不全等で発現する．この構造異形は，精子濃度あるいは運動性と密接な関連がみられ，受精機能へ著しい影響を及ぼしている．これまでに精子の外形異常を検索した報告が多くみられ，精子頭部の異形から，化学物質の発癌性や変異原性との比較を検討した総説がある[1]．焦げた肉の抽出物[2]や水銀化合物[3]で精子の形態異常が認められ，また農薬の殺菌剤であるジラムやチラムの変異原性及び発癌性の検出のために精子の形態観察を行っている[4]．これらの報告は，精子頭部の核を染色して光学顕微鏡で異形を鏡検しているため，形態の分析に際し正確さに問題があった．

これに対して電子顕微鏡は，電子線の波長が極めて短いことから，高分解能を持つという特色があり，微細構造の変化を把握することが可能である．殊に，初期変化や軽度な微小変化の観察に適している．

一方，環境中に内分泌かく乱作用を持つ物質が存在することが最近問題になっている．微量でホルモン様作用を持つために，これまでの試験法ではその変化をとらえることが難しい．2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は精巣機能に影響を与えて，ライディヒ細胞の萎縮を引き起こすことが知られている[5]．内分泌かく乱作用による機能障害を起こす生殖器系組織での微細構造に及ぼす詳細な影響については，あまり解明されていない．更に精子の外形異常に関しては，変異原性や発癌性の検出という観点ではなく，内分泌のかく乱作用からとらえた構造の変化が考慮される．

電子顕微鏡の試料作製法の一環として，通常の方法では細切が困難な精巣で，形成過程の精子を透過型電子顕微鏡（透過電顕と略す）を用いて観察した．また，精巣上体から採取した精子を平板に積載して，走査型電子顕微鏡（走査電顕と略す）で立体構造を調べた．今回，基礎的方法を検討するために，未処置の動物を使用して正常な構造を観察するとともに，試料作製の最適な方法についても考察した．

実験方法

1．透過電顕のための試料作製法

精巣は成熟したラット及びマウスから摘出した．通常の細切法では軟らかすぎて組織の保持が困難であるため，幅約3 mmの厚さで精巣を輪切りにした．口径の広い固定びんに固定液を多めに入れ，3日間の前固定を行った．前固定液は，比較のため冷2.5%のグルタールアルデヒドあるいは冷3%パラホルムアルデヒドを用い，

* 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

共にpH7.3の0.1M燐酸緩衝液中に調整した．前固定の終了後組織を燐酸緩衝液で十分に洗浄してから，再度細切を行った．この時，トリミングを正確に行うために樹脂包埋での方向性を付けておく必要がある．後固定は，燐酸緩衝液で調整した1%オスミウム酸で2時間の浸漬固定を行った．その後，エタノール脱水を行い，エポン樹脂に包埋し，超薄切片を作製した．切片は，酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重電子染色を施した．

観察は加速電圧75kVの透過電顕（日立H-7000型）で行い，できるだけ広視野で鏡検するため，100メッシュ及び200メッシュの標準グリッドとスロットタイプの単孔グリッドを用い，電子線による試料切片の強度を比較した．

2．走査電顕のための試料作製法

動物は実験1と同様に未処置のラットとマウスを用い，精巣並びに精子の外形観察のために精巣上体を摘出した．精巣は厚めに両端を切り，冷2.5%グルタールアルデヒドあるいは冷3%パラホルムアルデヒドで3日間前固定を行った．続いて前固定液を緩衝液で十分に洗浄した後，カミソリを用いて輪切りにして断面を露出した組織とピンセットで割断したものとを作製した．後固定は，1%オスミウム酸で2時間行い，帯電を少なくするためにタンニン酸による導電染色を実施した．その後エタノール脱水，酢酸イソアミルで置換し，臨界点乾燥を行い，白金・パラジウムの金属蒸着を施した．

精巣上体尾部を切開して採取した精子塊は，生理食塩水で1,000倍に希釈した．あらかじめ0.1%のpoly-L-lysine[6]を塗布したカバーグラスに希釈した精子液を3滴量（約0.05ml）落とし，ガラス面に広げた．15分間室温に放置後，生理食塩水で2回洗浄した．乾燥しない程度に洗浄液を落とし，適量の冷2.5%グルタールアルデヒドあるいは冷3%パラホルムアルデヒドを試料の上に滴下して，シャーレに入れ一晩室温で前固定を行った．固定液を燐酸緩衝液で軽く洗った後，1%オスミウム酸で1時間の後固定を実施した．以下常法に従ってガラス平板のまま脱水及び乾燥を施し，走査電顕用の試料台に張り付けた．

観察は白金・パラジウムの金属蒸着をやや厚めに行い加速電圧15kVの電界放射型走査電顕（日立S-800型）で鏡検した．

実験結果

1．透過電顕のための試料作製法の比較

超薄切片法では，一般に固定される試料の大きさは約1mm四方に細切する必要がある．しかし精巣の組織は，非常に軟らかく細切が困難である．また物理的圧迫により形態の破壊が考えられたため，厚く輪切りにした状態で前固定液に浸漬した．その後，グルタールアルデヒドとパラホルムアルデヒドで固定した組織を比較すると，3日間の固定期間でパラホルムアルデヒドは組織が固くならずに，再度容易に細切することができなかった．そのため，透過電顕用の精巣の固定にはグルタールアルデヒドが形態を保持した状態で細切するのに適していることが分かった．

透過電顕による精巣内の精子の観察は，全て2.5%グルタールアルデヒドの前固定液を使用した．Fig.1はラット精巣の精子細胞の核膜で，精子の頭部を覆っているアクロゾームの形成過程の初期像を示した．Fig. 2では精細管で形成された精子は，管腔側に集まり多数の集合塊を作っていた．細長い電子密度の高い黒色部は精子の頭部を示し，太い中間部の断面の周囲ではミトコンドリアが鞭毛を囲繞している像がみられた．更に小さな断面は精子尾部の線毛構造を示した．Fig.3がその部位の強拡大像である．中央に2本の中心軸糸があり，細胞膜に沿って9本の周辺軸糸が左回りに配置されているのが確認できた．周辺軸糸にはGibbonsの腕と言われる2本の突起が認められた．Fig. 4は精細管の管腔内でみられた尾部の縦断面と横断面の線毛の微細構造である．切片像では一部の領域しかとらえることができないが，それぞれの軸糸が連続していることが示された．Fig. 5と6にマウスの精細管内での精子の頭部と中間部及び尾部を示した．Fig.5の頭部はラットに比べて丸形で，核が中央で大きな割合をしめていた．Fig.6の写真の上位は太い中間部で軸糸の周囲にはラセン鞘が認められた．下位では尾部の細長い連続した軸糸が観察された．これらの精子の正常像は，グルタールアルデヒドが顕著な細胞の破壊を起こさず，微細構造の保持に良いことを示していた．

広視野観察に関して，格子のある標準グリッドと格子のない単孔グリッドで電子線による強度を比較したところ，単孔グリッドでは薄切した切片が破れてしまったが，比較的格子の穴の大きい100メッシュ及び小さい200メッシュのグリッドでは載せた切片が破れず安定であった．

2．走査電顕のための試料作製法の比較

走査電顕は透過電顕と比べて高倍率の像が得られないが，広範囲で外形形態の表面構造が観察できる．したがって走査電顕では，精子の全体像の観察が可能となる．精巣での前固定は，実験1と同様にパラホルムアルデヒドでは割断が困難であったため，2.5%グルタールアルデヒドで行った．精巣上体から採取した精子の平板での

固定は，グルタールアルデヒドでは，精子の頭部と尾部の分断像が3％パラホルムアルデヒドに比べて特にマウスで多く認められた．

精巣内精子の割断による立体構造の前固定には，全てグルタールアルデヒドを使用した．Fig. 7はラット，Fig.8はマウスにおける精細管の精子細胞から形成された精子の頭部に近い領域を示したものである．これらはカミソリを用いて精巣を割断した時の像であるが，大部分の精子は尾部が絡み合い，真っ直ぐな配列がみられなかった．カミソリとピンセットでの割断法の相違は，精巣内の細胞面が平滑化を呈していることを除いて，精子の立体構造を観察する上で大差を認めなかった．ラットとマウスの精子を比較してみると，ラットの頭部はやや細長く，先端が鋭角を示しているに対して，マウスでは長球形を呈していた．Fig. 9は，ラットの精巣をカミソリで割断した精細管の管腔の像である．精子細胞側に位置する頭部がみられるが，中央部の精子の多くは欠落していた．Fig 10は，ピンセットで割断した時のマウス精細管内の精子群を示した．糸巻き状に絡まった無数の精子の中間部や尾部が観察された．

精巣上体から採取した精子は，ガラス平板で全体像を観察することが可能であり，頭部の外形構造や中間部及び尾部の表面構造が明らかになった．精子が比較的多量に載っているガラス平板では，尾部の絡み合いがみられ，折れ曲がったり輪状を呈する像が散見された．特にマウスでは，頭部が頸で分断されて離れた精子が時折みられ，球形あるいは無定形を呈する頭部が認められた．平板法での前固定液は，グルタールアルデヒドに比較してパラホルムアルデヒドで頭部の分断が少なく，正常な形状を多く呈していた．Fig. 11は，3％パラホルムアルデヒドで前固定したラットの正常な精子の拡大像で，頭部の長さが約16μm，幅が約2μm，頸部からの尾の長さが140-160μmの大きさを示した．またFig. 12のマウスでは，ラットに比べて頭部が球形を呈し，その長さは約9 μm，幅が約2.5μm，頸部からの尾の長さが90-110 μmを示した．ラット及びマウスとも先端が反り上がった特徴的な形状が観察された．

考　　察

精子の形態異常に関しては，遺伝子の制御機構に関連することから，変異原や発癌，奇形との関係が示唆され検討がなされてきた[1]．また3種類の精神安定剤をマウスに投与して精子の頭部の外形異常を検索したところ，異形に有意差が認められ，このことは薬物動態の違いによるという報告がみられる[7]．内分泌かく乱作用を持つ物質が生殖器系に各種の好ましからざる影響を及ぼしているといわれており，雄に対しては，精巣重量や精子数の減少，精子運動率の低下，精細管の萎縮，精子の形態異常等を報告した文献がみられる[8]．しかし光学顕微鏡を用いた報告が多く，機能と形態変化との詳細な関連は明らかではない．電子顕微鏡的には，システインを与えたラットの精巣のセルトリ細胞で核膜や滑面小胞体及び粗面小胞体の拡張やミトコンドリアの変化がみられるとの報告があり，更に精子細胞では，核やアクロゾームの変化を認めている[9]．このような微細構造の変化は今後機能との関連を論ずる時，重大な要素と考えられる．精巣での精子形成過程において，黄体化ホルモンがライディヒ細胞と，卵胞刺激ホルモンがセルトリ細胞と密接に関与していることから，それらの細胞の形態変化が精子形成能に大きくかかわっていると推察される．

透過電顕と走査電顕で精巣内及び精巣上体からの精子を観察したところ，超薄切片法では，細部まで構造の検索ができるが部分的であり，全体像をとらえることが不可能であった．これに反して，走査電顕は分解能が低いが精子の外形を全体像として鏡検することができるため，頭部や尾部の変化あるいは形態異常数の割合等の検索に利用できる．したがって，精巣での精子形成過程を形態的に調べるには，精巣内細胞との関連は超薄切片法で，精子の外形は主に平板法で全体像を観察するのが適切だと考える．

これに関して，組織への浸透性の異なるグルタールアルデヒドとパラホルムアルデヒドの前固定液を比較すると，精巣を細切したりあるいは割断する時には，組織を固く固定するグルタールアルデヒドが良く，また平板での固定時には，あまり固くならないパラホルムアルデヒドが適当と思われる．

鞭毛を持つ細菌では，グルタールアルデヒドの固定は菌体と鞭毛が分離する傾向があり，このことは精子の固定にも同様に考察される．マウスで一部に頭部が離断した像が観察されたのは，ラットに比べ球形で大型のためとも考えられるが明らかではない．運動性が残っている状態で平板に付着させたことも頭部が分断した理由と思われる．前もって精子の希釈液の中に固定液を入れて運動を停止させてから，平板に付着させる方法が頭部の分断を少なくすると考える．

走査電顕による観察で，精巣内の精子と平板上での精子の形態に若干の差異が認められた．精巣での精子は，頭部が幾分丸い形状を呈していた．形成されたばかりの精子は，機能的に未熟な細胞であるといわれ，精巣上体

を通過する過程で完成することから[10]，精巣での形状は成熟した精子像ではないと推察される．

精巣の割断による精子像は，管腔内に無数の束として認められるが，両方法とも一定の像が得られなかった．腎臓の糸球体は，鋭利なカミソリよりもピンセット等で粗雑に割断した時，糸球体が破壊されないで残っている．この方法を精巣で試行したが，精細管では良い結果が得られなかった．

超薄切片を載せるグリッドは，広視野観察ができることが望ましい．先の報告[11]で，広視野像を得るためにグリッドの種類の検討を行った結果，単孔グリッドで十分に強度が保持されると思われたが，今回の超薄切片では破れてしまった．精子の頭部等の電子密度の高い像が多かったためと思われる．このような場合，鏡検に際し，試料を載せたグリッドを液体窒素で十分に冷却する必要があると考える．

今後，これらの試料作製条件を考慮に入れ，内分泌かく乱作用が疑われる物質の検索に活用が望まれる．

結　語

透過電顕及び走査電顕を用いて，未処置のラットとマウスの精巣並びに精巣上体尾部から採取した精子の形態観察を行った．観察は，超薄切片法では精巣内での精子形成に関与する細胞の変化の検索，また平板法では，精子の全体像が把握できるため，外形異常並びにその割合等を調べるのが有効であった．精巣の固定にはグルタールアルデヒドが良く，平板での精子の固定にはパラホルムアルデヒドが適当であった．

文　献

1) Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J.G., *et al.*: *Mutat. Res.*, **115**, 1-72, 1983.

2) Kumar, S., Zinyu, R., Chetia, M., *et al.*: *Cancer Lett.*, **64**, 51-53, 1992.

3) Chowdhury, A. R., Makhija, S., Vachhrajani, K. D., *et al.*: *Toxicol. Lett.*, **47**, 125-134, 1989.

4) Hemavathi, E. and Rahiman,M.A.: *J.Toxicol. Environ. Health*, **38**, 393-398, 1993.

5) Johnson, L., Dickerson, R., Safe, S.H., *et al.*: *Toxicology*, **76**, 103-118, 1992.

6) Tsutsui, K., Kumon, H., Ichikawa, H., *et al.*: *J.Electron Microsc.*, **25**, 163-168, 1976.

7) Kar, R.N. and Das,R.K.: *Cytobios*, **36**, 45-51, 1983.

8) 東京都立衛生研究所毒性部：内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の生体影響 データ集，1-258, 1999, 東京都，東京．

9) Bernacchi, A.S., Ferreyra, E.C., Castro, C.R., *et al.*: *Biomed. Environ. Sci.*, **6**, 172-178, 1993.

10) 年森清隆：電子顕微鏡，**25**, 89-96, 1990.

11) 福森信隆，青木直人，佐々木美枝子：東京衛研年報，**49**, 305-310, 1998.

Legend for figures

Fig. 1. The appearance of acrosome (arrows) in the rat spermatid. (TEM, 2.5%GA, ultrathin section) X4,100

Fig. 2. A number of spermatozoa in the lumen of the rat seminiferous tubule. (TEM , 2.5%GA, ultrathin section) X3,700

Fig. 3. The high magnification of a section at the flagella of rat spermatozoa. (TEM, 2.5%GA, ultrathin section) X46,800

Fig. 4. The cross and longitudinal section of the tail in the rat sperm. (TEM, 2.5%GA, ultrathin section) X7,850

Fig. 5. The nucleus (N) of head of the sperm in the mouse testis. (TEM, 2.5%GA, ultrathin section) X9,950

Fig. 6. The longitudinal section of midpiece and principal piece in the mouse sperm. (TEM, 2.5%GA, ultrathin section) X16,800

Fig. 7. The three dimensional structure of the spermatozoa in the rat seminiferous tubule. (SEM, 2.5%GA, cracking with razoredge) X3,250

Fig. 8. A scanning electron micrograph of the spermatozoa in the mouse seminiferous tubule. (SEM, 2.5%GA, cracking with razoredge) X2,400

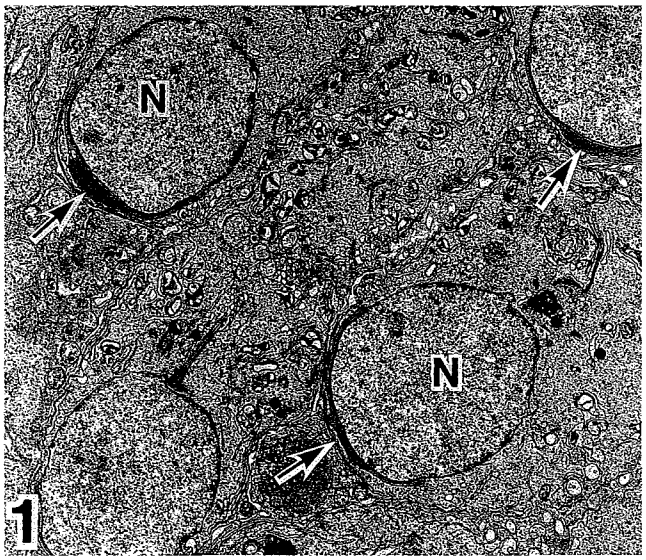
Fig. 9. The spermatozoa in the lumen of the rat seminiferous tubule. (SEM, 2.5%GA, cracking with razoredge) X700

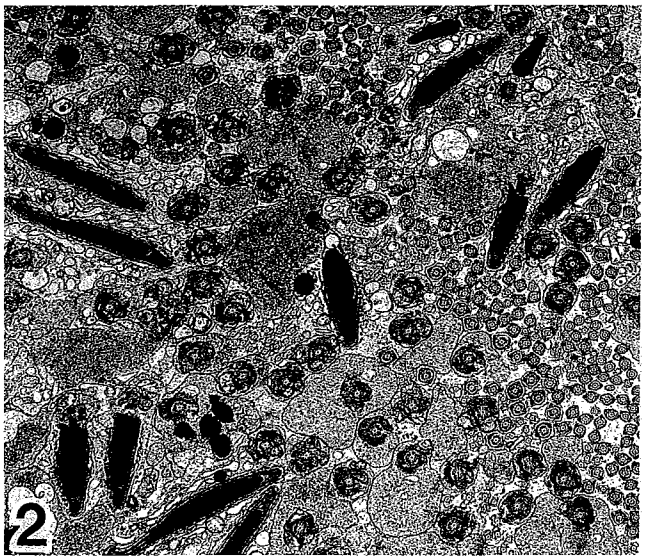
Fig. 10. A bundle of spermatozoa in the seminiferous tubule of the mouse testis. (SEM, 2.5%GA, cracking with pincette) X690

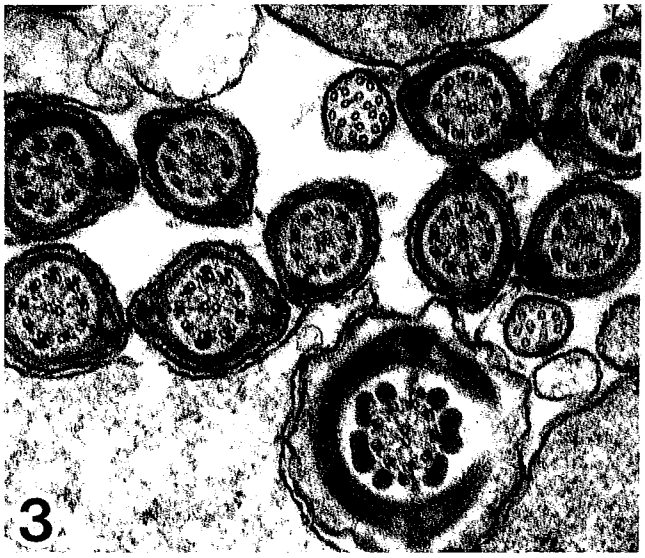
Fig. 11. The heads of spermatozoa in the rat. (SEM, 3%PA, glass plate) X2,900

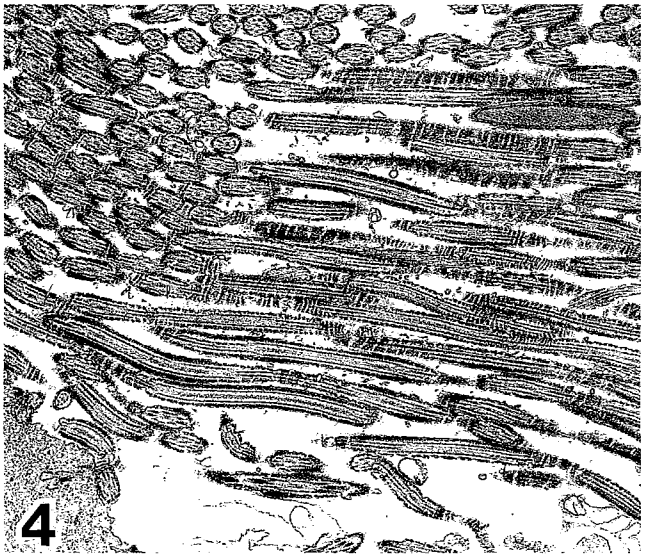
Fig. 12. The heads of spermatozoa in the mouse. (SEM, 3%PA, glass plate) X4,800

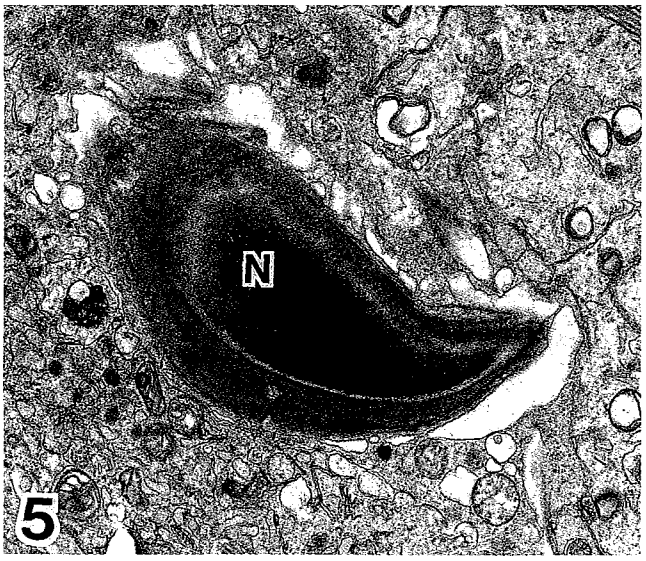
TEM：transmission electron microscope
SEM：scanning electron microscope
GA：glutaraldehyde prefixative
PA：paraformaldehyde prefixative

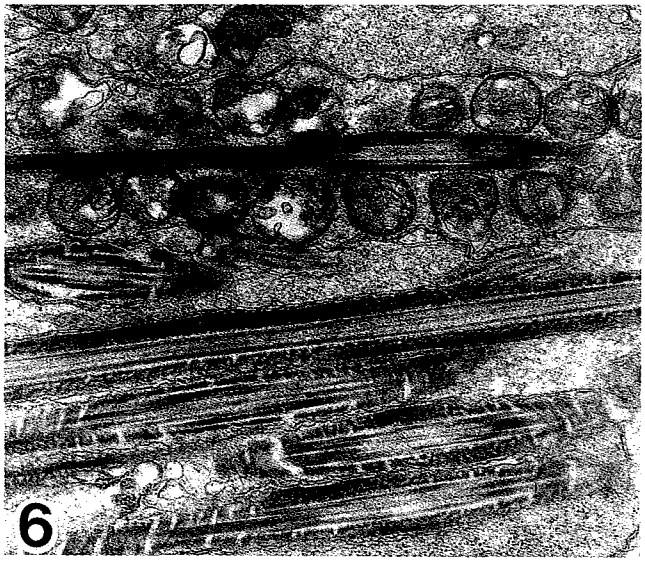

N
N
1


2

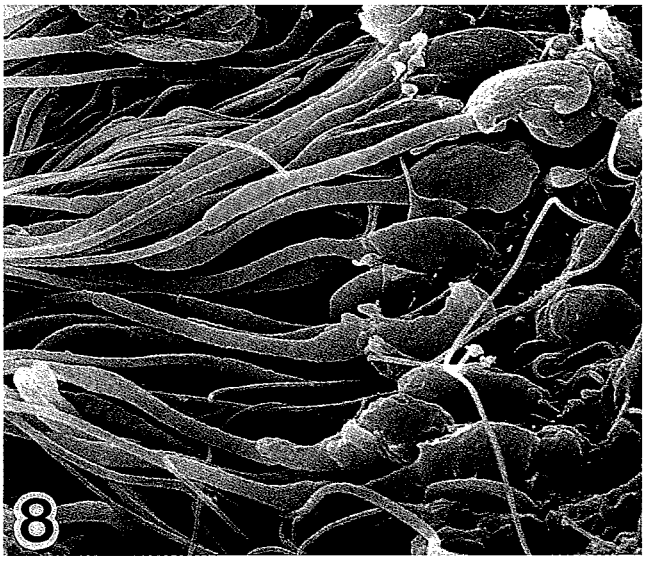

3

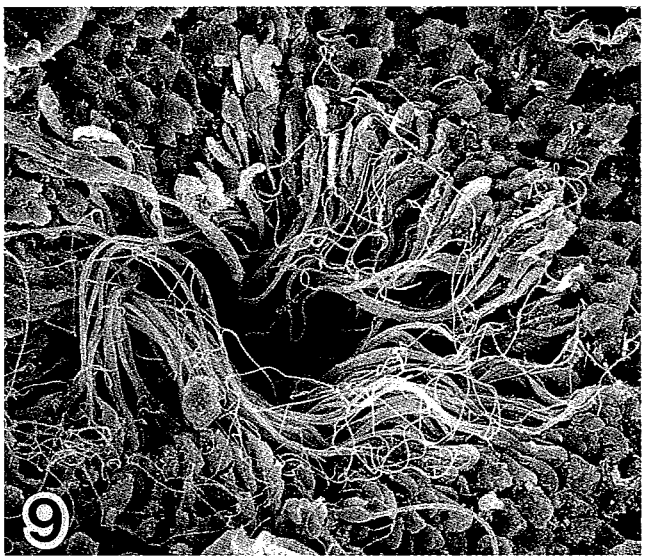

4

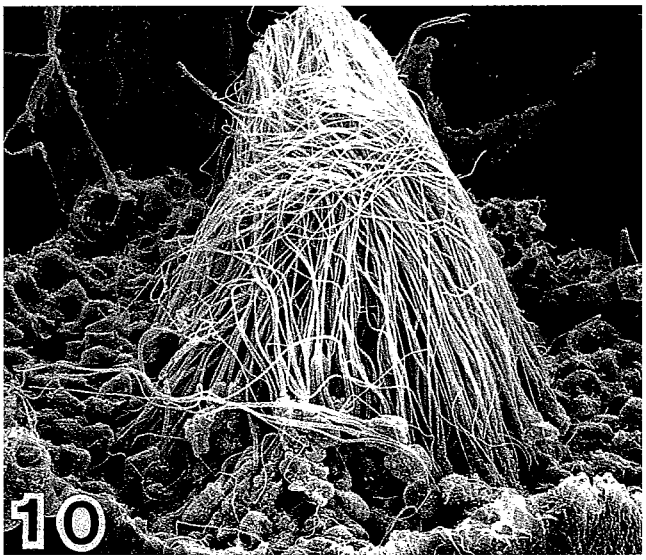

N
5

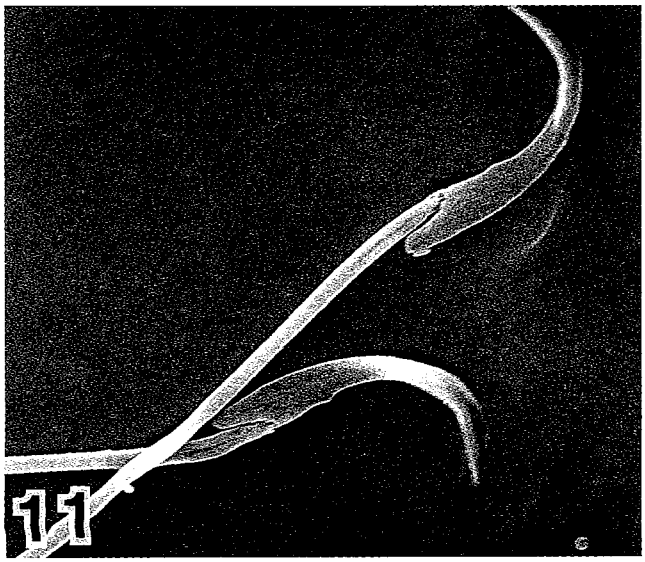

6

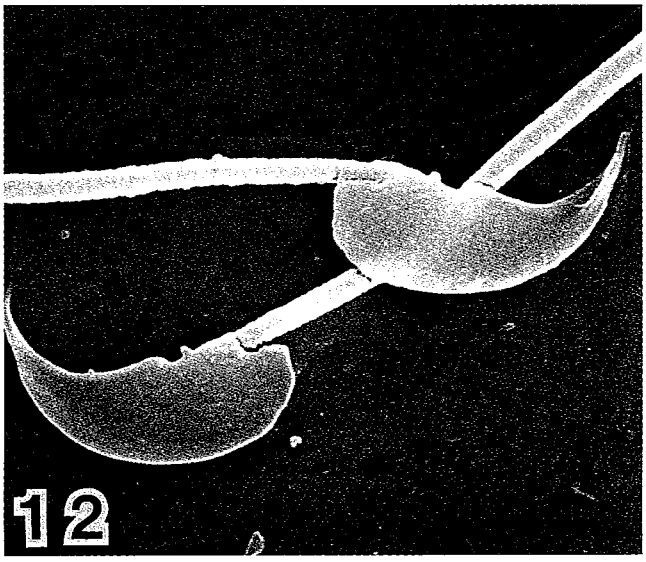
7


8


9


10


11


12

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 303-307, 1999

食品添加物のエームス試験における既知変異原の変異原性に対する影響（第2報）*

藤田　博**, 青木直人**

Modulation of Mutagenic Actibity of the Known Mutagens by Food Additives in the Ames Test (Ⅱ)*

HIROSHI FUJITA** and NAOTO AOKI**

Keywords：抗変異原性 antimutagenicity, 助変異原性 co-mutagenicity, 食品添加物 food additives, エームス試験 ames test

化学物質の遺伝毒性を明らかにするために変異原性試験が行われている．変異原性を検出するために種々の試験法が開発されてきたが，その中でもAmesら[1-3]が開発した，いわゆるエームス試験が最も多用されている．使用されるTA系の菌株[1-3]は，DNA損傷を修復する遺伝子などに突然変異を起こさせることにより，正常細胞に比べ変異原に対する感受性が非常に高くなっている．さらに，試験対象化合物が生体中で代謝された後の変異原性について知るため，ラットの肝臓ホモジネート（S9[2,3]）を併用することにより，多くの変異原の検出ができるようになっている．非常に多くの化学物質について試験が行われてきたが，食品添加物についても多くの情報が提供されている[4,5]．

一方，ある種の化学物質には変異原性を変動させる効果があることも知られている．すなわち，変異原性を抑制する抗変異原や増強する助変異原である．我々を取り巻く環境中では多くの化合物が混在することから，変異原の検出に加えて変動効果を示す化合物についての情報も重要である．

変異原性を変動させる化合物としては，植物中に含まれる様々な成分によるTA系菌株に対する変異原性の抑制効果がよく知られている[6-8]．一方，魚のこげの中に見いだされたノルハルマン[9]は，TA系菌株に対する変異原性を増強することが報告されている．食品添加物として利用されている化合物中ではアマランス[10]及びビタミンA[11,12]がTA系菌株に対する変異原性の抑制を示し，シンナムアルデヒド[13]及びバニリン[14]が大腸菌を用いた試験系において変異原性の抑制効果を示すことが報告されている．食品添加物は，合成によるものだけでも300種類以上が許可されており，これらの中に変異原性の変動効果を示す化合物が含まれている可能性があることからエームス試験を用い4種の既知変異原に対する変動効果の有無について検討することにした．

前報[15]では52種類の食品添加物について試験を行ったところ，8化合物に変異原性を変動させる効果が見られた．今回56種類の食品添加物について追加試験を行ったところ4化合物に変動効果が見られたので報告する．

実験材料及び方法

試　料　56種類の食品添加物は，表1に記載した．酢酸メンチル（東京化成）以外の試料は，和光純薬製である．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）に溶解した．

変異原物質：4-ニトロキノリン-1-オキシド（4NQO，岩井化学製），フリルフラマイド（AF-2，上野製薬製），ベンツ(a)ピレン（BP，和光純薬製）及びトリプ-P-1（T-P-1，和光純薬製）をDMSOに溶解し用いた．

菌　株　*Salmonella typhimurium* TA98（*hisD*$^-$, *uvrB*$^-$, *bio*$^-$, *gal*$^-$, *rfa*$^-$, pKM101）[1]及びTA100（*hisG*$^-$, *uvrB*$^-$, *bio*$^-$, *gal*$^-$, *rfa*$^-$, pKM101）[1]を普通ブイヨン（Nutrient broth No. 2, OXOID）で一夜培養し用いた．これらの

* 東京衛研年報，**48**, 303-308, 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．食品添加物の既知変異原の変異原性に対する影響

化合物	最高濃度a)	4NQO	AF-2	BP	T-P-1	化合物	最高濃度a)	4NQO	AF-2	BP	T-P-1
アジピン酸	10	−	−	−	−	シクロヘキシルプロピオン酸アリル	0.1	−	−	−	−
アルギン酸プロピレングリコール	1	−	−	−	−	シトラール	0.1	−	−	−	−
L-イソロイシン	1	−	−	−	−	シトロネラール	0.1	−	−	−	−
塩化第一鉄	1	−	−	−	−	シトロネロール	0.1	−	−	−	−
オイゲノール	0.1	−	−	−	−	1.8-シネオール	0.1	−	−	−	−
オレイン酸ナトリウム	10	−	−	−	−	DL-酒石酸	10	−	−	−	−
カルボキシメチルセルロース	1	−	−	−	−	L-酒石酸	10	−	−	−	−
ギ酸ゲラニル	0.1	−	−	−	−	硝酸カリウム	10	−	−	−	−
クエン酸	10	−	−	−	−	硝酸チアミン	1	−	−	−	−
クエン酸鉄	10	−	−	−	−	硝酸ナトリウム	10	−	−	−	−
クエン酸鉄アンモニウム	10	−	−	−	−	シンナムアルデヒド	0.1	D	−	−	I
ケイ皮酸	0.1	−	−	−	−	DL-トリプトファン	1	−	−	−	−
ケイ皮酸エチル	0.1	−	−	−	−	L-トリプトファン	1	−	−	−	−
ケイ皮酸メチル	0.1	−	−	−	−	DL-トレオニン	10	−	−	−	−
ゲラニオール	0.1	−	−	−	−	L-トレオニン	10	−	−	−	−
コハク酸	10	−	−	−	−	ナトリウムメトキシド	0.5	D	D	−	−
コンドロイチン硫酸ナトリウム	10	−	−	−	−	ピロリン酸カリウム	10	−	−	−	I
酢酸イソアミル	1	−	−	−	−	ピロリン酸ナトリウム	10	−	−	−	I
酢酸ゲラニル	0.1	−	−	−	−	プロピレングリコール	10	−	−	−	−
酢酸シクロヘキシル	0.1	−	−	−	−	ポリアクリル酸ナトリウム	1	−	−	−	−
酢酸シトロネリル	0.1	−	−	−	−	ポリリン酸ナトリウム	10	−	−	−	−
酢酸テルピニル	0.1	−	−	−	−	D-マンニトール	10	−	−	−	−
酢酸フェネチル	0.1	−	−	−	−	メタリン酸カリウム	10	−	−	−	−
酢酸ブチル	1	−	−	−	−	メタリン酸ナトリウム	10	−	−	−	−
酢酸ベンジル	1	−	−	−	−	メチルセルロース	1	−	−	−	−
酢酸メンチル	0.1	−	−	−	−	硫酸アルミニウムアンモニウム	10	−	−	−	−
酢酸リナリル	0.1	−	−	−	−	硫酸アルミニウムカリウム	10	−	−	−	−
サッカリン	10	−	−	−	−	リン酸二水素カルシウム	1	−	−	−	−

a)：mg／プレート．D：変異原性の抑制効果が見られた．I：変異原性の増強効果が見られた．4NQO：0.1μg／プレート，TA100．AF-2：0.02μg／プレート，TA100．BP：5μg／プレート，TA100．T-P-1：0.1μg／プレート，TA98．

株は，B. N. Ames 教授（カリフォルニア大）より分与を受けたものである．

TA98は，フレームシフト型の変異原に感受性が高いことから，今回の試験ではT-P-1の変異原性の検出に用いた．また，TA100は，塩基置換型の変異を持ち，比較的多くの変異原に感受性が高いことから，今回の試験においては，4NQO，AF-2及びBPの変異原性を検出するのに用いた．

変異原性試験　Ames法の変法であるプレインキュベーション法[3,16]により行った．代謝活性化には，アロクロール1254（ジーエルサイエンス）により薬物代謝酵素を誘導した雄性CD系ラット（Crj：CD　日本チャールス・リバー）の肝臓ホモジネートから調製したS9[3]を用いた．S9mix[3,16]中のS9量は，10%（50μl/プレート）とした．

変異原溶液0.1ml及び試料溶液0.05mlを小試験管に入れ，変異原がT-P-1及びBPの場合にはS9mix 0.5ml，4NQO及びAF-2の場合にはリン酸緩衝液（pH 7.4）0.5mlを加えた．更に4NQO，AF-2及びBPの場合にはTA100，T-P-1の場合にはTA98の一夜培養菌液を0.1ml加え，37℃で20分間の前培養を行った．これに45℃に保温した軟寒天[3] 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．同時に試験菌株の生存状況を知るためにローン（lawn）の観察を行った．

最初に3濃度段階，1枚のプレートでスクリーニング試験を行い，変動効果を持つ可能性がありそうな化合物を選定した．その後確認実験を各濃度にプレート2枚を用い，5濃度段階で行った．統計解析は，Mooreら[17]のプログラムによる回帰分析を行い，用量相関が有意な場合，試料化合物に変異原性を変動させる効果があると判断した．

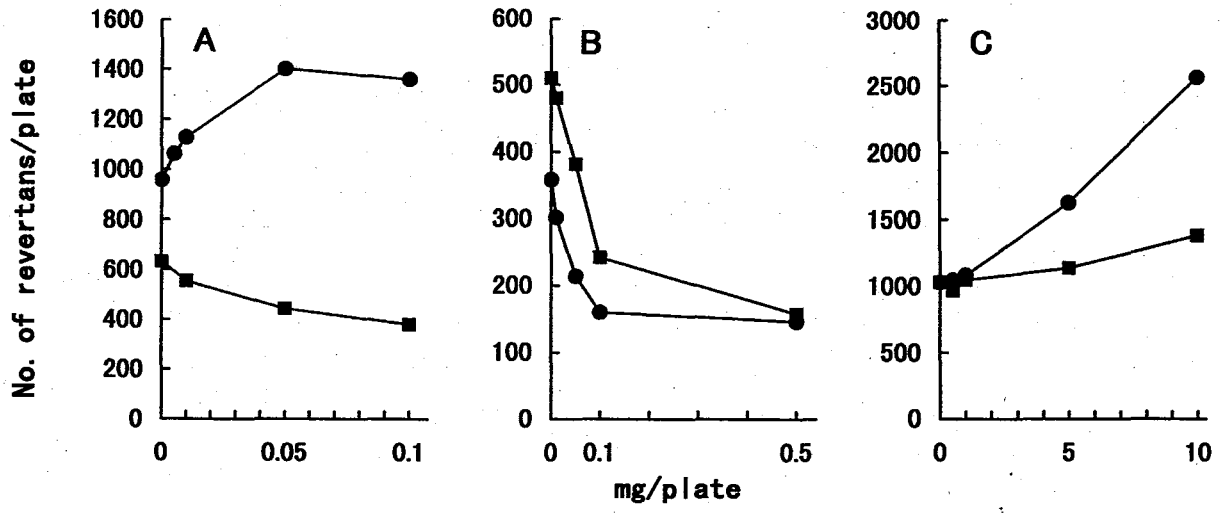


図1．変異原性に対する影響．
A：シンナムアルデヒド ●；T-P-1, ■；4NQO, B：ナトリウムメトキシド ●；AF-2, ■；4NQO, C：●；ピロリン酸カリウム T-P-1, ■；ピロリン酸ナトリウム T-P-1.
変異原濃度と菌株：T-P-1；0.1 μg／プレート TA98, 4NQO；0.1μg／プレート TA100, AF-2；0.02μg／プレート TA100.

結　果

56種の食品添加物による4種の既知変異原（4NQO, AF-2, BP及びT-P-1）に対する影響について定性的に検討した試験結果を表1に示した．変異原単独の時の復帰コロニー数が食品添加物を加えることにより増加または減少した化合物は4化合物であった．シンナムアルデヒドは，T-P-1において増加，4NQOではやや減少，ナトリウムメトキシドは，4NQO及びAF-2において減少，ピロリン酸カリウム，ピロリン酸ナトリウムは，T-P-1において復帰コロニー数が増加した．なお，復帰コロニー数が減少した化合物は，さらに数種類見られたが，ローンの観察によっていずれも試験菌株に対する抗菌性が見られたことから，変異原性の抑制ではないものと判断した．

次に変異原性に影響を与えた化合物について定量的にその効果を検討した結果を図1に示した．シンナムアルデヒドは，T-P-1では復帰コロニー数が50μg／プレートで1.5倍に増加，100μg／プレートでは抗菌性により復帰コロニー数は，50μg／プレートより減少した．また，4NQOではコロニー数はやや減少した．ナトリウムメトキシドは，4NQO及びAF-2において復帰コロニー数が著しく減少し，0.5mg／プレートでは対照群のコロニー数となり，抑制効果は100%であった．ピロリン酸は，カリウム塩及びナトリウム塩ともに増加を示したがカリウム塩のほうがやや増加率は高く10mg／プレートで約3倍の増加であった．

考　察

56種の食品添加物について試験を行った結果，4化合物に変動効果が見られたが，ピロリン酸塩は，ナトリウム塩及びカリウム塩で反応が同様であることから，ピロリン酸の作用と考えられ実際には3化合物と考えても良いであろう．

今回，変動効果を見るために用いた4種の変異原は，変異原としては大変よく知られた化合物であり，エームス試験などを用いた変異原性の変動効果を示す化合物についての報告も多い．4NQOの変異原性を抑制する化合物としてはTA100でスルフィドリル化合物[18]，大腸菌でシンナムアルデヒド[13]，バニリン[14]が報告されている．AF-2については，大腸菌を用いた試験系でシンムアルデヒド[19]やショウガ抽出物による抑制[20]の報告があり，BPについてはTA98でリボフラビン[21]やBHT[22]による抑制の報告が見られる．T-P-1については，増強する化合物にはTA98においてノルハルマン[9]が，抑制する化合物にはTA98においてメイラード反応生成物[23]，ビタミンA[24]などの報告が見られる．これらの増強及び抑制の作用機構については，化合物相互の直接的反応[23]，S9中の薬物代謝酵素の阻害[21]及び菌株のDNA傷害を修復する酵素の阻害[19]などが考えられてはいるが未解明な点が多い．

シンナムアルデヒドは，抗変異原としては良く知られており多くの報告がある[13,19,25-27]．大腸菌での4NQO, AF-2などに対する抑制[19]に加えて培養細胞を用いた場合にメチルメタンスルホネート[26]やアミノメチルイミダ

ゾキノリン（IQ）[27]の変異原性を抑制することも報告されている．しかし，今回の試験ではシンナムアルデヒドは，T-P-1において変異原性が増強され全く異なっていた．TA系菌株における反応性の違いが原因のように思われるが，4NQOでは多くの抗変異原性の報告同様やや抑制の傾向が見られたこと，de Silvaら[28]の報告でも4NQOのTA100における変異原性は抑生されていることから，菌株の問題ではないと考えられる．代謝活性化が必要な変異原にS9が関与した場合にシンナムアルデヒドがS9中の代謝酵素に影響を与え変異原の産生を高めているのかもしれない．CHO細胞においてマイトマイシンCによる姉妹染色分体交換（SCE）の出現を増加させるという報告[29]が見られ，シンナムアルデヒドは，抗変異原としてだけではない多様な作用を持っているのではないかと推察される．

ピロリン酸塩に見られたT-P-1の増強効果はかなり強いものであった．カリウム塩が高くナトリウム塩は少し効果が少ない．前報[15]のピロリン酸第一鉄では変動効果が見られず，ピロリン酸の塩の状態で効果が異なるのはイオン化の違いによるものであろうか．ピロリン酸にはラットの尿路上皮細胞での4NQOによる不定期DNA合成の阻害作用が報告[30]されており，変異原性を変動させる効果があるものと考えられる．

ナトリウムメトキシドの変異原性の抑制効果は明確であった．4NQOとAF-2の様に代謝活性化を必要としない変異原に限られる作用の様である．変動効果に関する報告は見られず，今後多くの試験系での検討が効果の確認に必要であろう．

今回，56種の食品添加物による変異原性の変動効果について検討したところ，何らかの効果を示す4化合物が見いだされた．前報[15]では52化合物について検索し，8化合物に変動効果が見いだされ，合計12化合物となり変異原と関りがある化合物がかなり存在する可能性が示唆された．ただし，これらの変動効果は，エームス試験における反応であって，食品中や生体中での反応については明らかではなく，更にこれらの化合物による変異原性を変動させる作用機構についても今のところ明らかではない．化合物相互反応，薬物代謝酵素阻害またはDNA修復酵素阻害などが考えられ，今後これらの点についても検討していきたい．

ま と め

56種の食品添加物の4NQO，AF-2，T-P-1及びBPの変異原性に対する影響についてエームス試験を用い検討した．食品添加物を加えることにより変異原性が増加または減少した化合物は4化合物であった．シンナムアルデヒドは，T-P-1の変異原性を増強した．ナトリウムメトキシドは，4NQO及びAF-2の変異原性を抑制した．更にピロリン酸ナトリウム及びピロリン酸カリウムは，T-P-1の変異原性を増強した．

文 献

1）McCann, J., Spingarn, N. E., Ames, B. N., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 979-983, 1975.
2）Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, **31**, 347-364, 1975.
3）Maron, D. M. and Ames, B. N.: *Mutation Res.*, **113**, 173-215, 1983.
4）Ishidate, Jr, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., et al.: *Fd Chem. Toxic.*, **22**, 623-636, 1984.
5）藤田 博，青木直人，佐々木美枝子：東京衛研年報，**46**，258-264，1995.
6）Morita, K., Hara, M. and Kada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1235-1238, 1978.
7）Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., et al.: *Mutation Res.*, **341**, 71-75, 1994.
8）Uenobe, F., Nakamura, S. and Miyazawa, M.: *Mutation Res.*, **373**, 197-200, 1997.
9）Nagao, M., Yahagi, T., Kawachi, T., et al.: *Proc. Japan Acad.*, **53**, 95-98, 1977.
10）McCalla, D. R., Kaiser, C., Lu, C., et al.: *Mutation Res.*, **82**, 201-211, 1981.
11）Busk, L. and Ahlborg, U. G.: *Toxicology Letters*, **6**, 243-249, 1980.
12）Bhattacharya, R. K., Francis, A. R. and Shetty, T. K.: *Mutation Res.*, **188**, 121-128, 1987.
13）Kakinuma, K., Koike, J., Kotani, K., et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1905-1906, 1984.
14）Watanabe, K., Ohta, T. and Shirasu, Y.: *Mutation Res.*, **218**, 105-109, 1989.
15）藤田 博，青木直人，佐々木美枝子：東京衛研年報，**48**，303-308，1997.
16）矢作多貴江：蛋白質核酸酵素，**20**, 1178-1189, 1975.
17）Moore, D. and Felton, J. S.: *Mutation Res.*, **119**, 95-102, 1983.
18）De Flora, S., Rosenkranz, H. S. and Klopman, G.: *Mutagenesis*, **9**, 39-45, 1994.
19）Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M., et al.: *Mutation Res.*, **107**, 219-227, 1983.

20) Nakamura, H. and Yamamoto, T. : *Mutation Res*, **103**, 119-126, 1982.
21) Terwel, L., van der Hoeven, J. C. M. : *Mutation Res*, **152**, 1-4, 1985.
22) Calle, L. M., Sullivan, P. D., Nettleman, M. D., et al. : *Biochem. Biophis. Res. Commun.*, **85**, 351-356, 1978.
23) Yen, G.-C., Tsai, L.-C. and Lii, J.-D. : *Fd Chem. Toxic.*, **30**, 127-132, 1992.
24) Busk, L., Ahlborg, U. G. and Albanus, L.: *Fd Chem. Toxic.*, **20**, 535-539, 1982.
25) Ohta, T.: *Critical Reviews in Toxicology*, **23**, 127-146, 1993.
26) Fiorio, R. and Bronzetti, G.: *Mutation Res.*, **324**, 51-57, 1994.
27) Sanyal, R., Darroudi, F., Parzefall, W., et al. : *Mutagenesis*, **12**, 297-303, 1997.
28) de Silva, H. V. and Shankel, D. M.: *Mutation Res.*, **187**, 11-19, 1987.
29) Sasaki, Y.F., Imanishi, H., Ohta, T., et al.: *Mutation Res.*, **189**, 313-318, 1987.
30) Wang, C. Y., Linsmaier-Bendnar, E. M. and Garner, C. D.: *Chem.-Biol. Intractions*, **42**, 79-84, 1982.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 308-310, 1999

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. Ⅲ しらこたん白抽出物

小縣昭夫*, 安藤　弘*,
久保喜一*, 青木直人*

Effects of Natural Food Additive on Mouse Embryos with the Use of Whole Embryo Culture Method. Ⅲ. Milt Protein

AKIO OGATA*, HIROSHI ANDO*,
YOSHIKAZU KUBO* and NAOTO AOKI*

To study the effects of milt protein(MP) 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), 250, 500 or 1000 μg/ml of MP.

Yolk sac diameter, blood circulation of the yolk sac, crown-rump length of the 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 all parameters. Anomalous embryos were not observed in any groups treated with MP. These results suggest that MP has no teratogenic effects on mouse embryos.

Keywords：マウス mouse, 全胚培養 whole embryo culture, 天然添加物 natural food additive, 保存料 preservative, しらこたん白 milt protein

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．

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

* 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

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3mg/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

実験に用いたしらこたん白抽出物は日本食品添加物協会より入手し，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77.5%のデキストリンを含んだものを使用した．しらこたん白抽出物は125，250，500mg/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当たりのしらこたん白抽出物量は250，500，1000μg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3-5mm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．

表1．しらこたん白抽出物のマウス胚子に及ぼす影響

投与量（μg/ml）	0	250	500	1000
観察胚子数*	10	10	11	11
		培養開始時（妊娠8日）		
卵黄嚢径（mm）*	2.2±0.3	2.1±0.2	2.2±0.3	2.1±0.2
心拍数／分*	37.6±17.0	35.9±10.1	33.4±11.6	34.4±13.8
		開始24時間後（妊娠9日）		
卵黄嚢径*	3.7±0.4	3.7±0.3	3.7±0.3	3.6±0.5
心拍数*	110.8±23.2	106.2±21.5	109.6±14.9	113.6±17.0
卵黄嚢血液循環	＋	＋	＋	＋
		開始48時間後（妊娠10日）		
卵黄嚢径*	5.5±0.4	5.3±0.4	5.5±0.5	5.4±0.6
胚子頭臀長（mm）*	5.1±0.3	5.1±0.5	5.1±0.3	5.1±0.5
心拍数*	80.0±47.3	80.7±48.8	112.9±32.2	93.8±51.2
体節数*	32.0±0.9	32.1±1.9	32.5±2.2	32.7±2.0
卵黄嚢血液循環	－（3）[a]	－（1）	－（3）	－（3）
	±（1）	±（3）	±（3）	±（2）
	＋（6）	＋（6）	＋（5）	＋（6）
胚子型	G（10）	G（10）	G（11）	G（10），C（1）

＊平均±S.D.

a（ ）内胚子数

しらこたん白抽出物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，心拍数，卵黄嚢血液循環のいずれの指標においても対照群（蒸留水のみ投与）と比べて処置群に遅延傾向は認められなかった．また胚子の外表異常も対照群と処置群共に認められなかった．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，しらこたん白抽出物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，1000μg/mlより大量の投与ではしらこたん白抽出物が完全に蒸留水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1000μg/mlに設定した．

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しらこたん白抽出物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外表異常胚子を誘発している．

本実験から得られた結果はしらこたん白抽出物の催奇形性を疑わせるものではなかった．唯一，1000μg群で見られた胚子C型の1匹の発育遅延は他の理由を考えた方が妥当であろう．その理由の一つとして1000μg投与群において他の10匹の胚子に発育遅延を伺わせる傾向は全く認められず，対照群と殆ど同程度かそれ以上の成長を示していた．C型を示した胚子については例えばこのボトルだけガスの供給が良くなかった等，培養時の条件の変動が考えられた．

しらこたん白抽出物の主な成分であるプロタミン（塩基性たん白）の催奇形性及び生殖毒性に関する報告は知られておらず，当所の多田ら[4]が行ったラットを用いて大量を摂取させた亜慢性毒性試験においても異常は認められていない．

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しらこたん白抽出物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）多田幸恵，池田虎雄，高橋博，他：東京衛研年報，**49**, 267-276, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 311-313, 1999

天然添加物フェルラ酸のラットにおける急性経口毒性

多田幸恵, 田山邦昭, 青木直人

Acute Oral Toxicity of Ferulic Acid, Natural Food Additive, in Rats

YUKIE TADA, KUNIAKI TAYAMA, NAOTO AOKI

The acute oral toxicity of ferulic acid, a natural food additive, was examined in F344 rats.

Suppression of motility, piloerection and lacrimation were observed in rats after administration of ferulic acid. The death of rats occurred within the first 24 hours of the 14-day period of observation after administration of the ferulic acid at a single dose above 1929mg/kg body weight. Ferulic acid caused hemorrhage of the glandular stomach and small intestine within 24 hr after administration. The medium lethal dose(LD50) of ferulic acid is 2445mg/kg body weight in the male and 2113mg/kg body weight in the female rat.

Keywords：フェルラ酸 ferulic acid, 急性経口毒性 acute oral toxicity, ラット rat, 天然添加物 natural food additive, 酸化防止剤 antioxidant

緒　　言

天然添加物は消費者の自然・天然指向を背景にしてその開発及び利用が進み，一般食品及び健康食品に広範に利用されている．平成7年の食品衛生法改正により，天然添加物も化学的合成品と同様指定制度下に置かれることとなったが，これまで使用されてきた天然添加物については，引き続きその使用が認められることとなり，安全性の確認が早急に求められている．当所では，平成7年からプロジェクト研究「天然添加物の品質に関する研究」を進めている．本報告はプロジェクト研究の一環として行ったフェルラ酸の急性経口毒性試験の結果である．

フェルラ酸（4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid）はイネ科植物の細胞壁に多く含まれ[1]，抗酸化作用を有することから[2-4]，酸化防止剤として食品に利用される．その生体影響に関しては抗変異原作用[5]，腫瘍発生の抑制効果[6-7]，放射線障害の防護効果[8]等の報告がある他，遺伝毒性[9]，生殖毒性[10]などの報告がある．しかしながらフェルラ酸の急性及び慢性毒性はこれまで報告されていない．

実験方法

実験試料：米糠原油より抽出，精製したフェルラ酸(製造メーカーより入手；トランス型，純度99.9%)を，投与容量が10ml/kg体重となるよう0.5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ使用した．投与濃度は予備試験の結果を参考に，Table 1に示した1608～4000mg/kgの6段階とした．

実験動物及び飼育環境：日本チャールス・リバー(株)より雌雄のF344/DuCrjラットを6週齢で購入し，2週間予備飼育後8週齢で発育良好なものを実験に用いた．ラットはステンレス製ケージに5匹ずつ収容し，室温24-26℃，湿度50-60%，照明12時間，換気回数毎時10回の飼育環境下で飼育した．

投与及び観察法：OECDのガイドラインに従い[11]雌雄それぞれ各群5匹のラットを使用，投与前日の午後3時より除餌し水のみを自由に与え，当日午前9時から10時までの間にフェルラ酸を胃ゾンデを用いて強制経口投与した．対照群にはフェルラ酸を含まない溶媒を同様に投与した．投与後3時間目より飼料（CE-2）を自由に摂取させた．一般症状及び生死の観察は，12時間までは1時間毎に，以降14日までは朝夕2回観察した．死亡ラットは直ちに剖検，生存ラットは毎日午前9時に体重測定し，

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

Table 1. Mortality of Rats after Administration of Ferulic Acid suspended in 0.5% Aqueous Solution of Gum Arabic

Sex	Dose (mg/kg B.W.)	Initial body weight(g)	No. of dead rats								Mortality
			Time after administration (hr)								
			0 − 3	− 6	− 9	− 12	− 24	− 48	− 72	− 96	
Male	0	176.2±7.3									0/5
	1608	176.2±5.2									0/5
	1929	176.8±9.6		1							1/5
	2315	175.0±6.1		1			1				2/5
	2778	176.2±6.3		3							3/5
	3333	175.4±8.8	3	2							5/5
	4000	176.2±8.5	2	2	1						5/5
Female	0	118.8±2.4									0/5
	1608	118.2±7.0									0/5
	1929	118.0±6.5		3							3/5
	2315	117.4±3.8		2			1				3/5
	2778	117.6±4.3		2		1	1				4/5
	3333	116.6±3.4	3	1			1				5/5
	4000	117.8±6.8		4			1				5/5

投与後14日目に剖検した．LD50は14日間の死亡率からMoving Average 法[12]で算出した．

結果及び考察

投与時の平均体重，死亡数及び死亡時期をTable 1に示した．死亡開始は投与後1時間40分，死亡ピークは投与後３～４時間，最終死亡は投与後12時間以降24時間に観察された．雌雄間の死亡時間及び死亡数に大差はなかった．

投与後の生存ラットの平均体重をFig. 1に示した．雌雄とも中濃度投与以上で投与後１日ないし２日まで体重の減少が認められたが，以後順調に回復した．

一般症状は，対照群では投与直後に，立毛，うずくまり及び自発運動の抑制が見られたが，３時間後に飼料を与えるとすぐに摂餌を始め，24時間後には，一夜絶食により減少した体重もほぼ回復し，その後も発育は順調であった．フェルラ酸投与群では投与直後から立毛，うずくまり，自発運動の抑制及び目のしょぼつきが見られ，個体により，投与後１時間より流涙が見られた．流涙が見られたラットの多くは，その後不動状態となり死に至った．

死亡動物の剖検所見は各投与群のラットでほぼ共通し，腺胃部の粘膜に点状出血，小腸粘膜に広範な出血が認められた．十二指腸～盲腸までの腸管内容物は暗赤色の粘液様で，試験紙により潜血反応を確認した．投与後12時間以降24時間までの死亡個体では盲腸内部にも暗赤

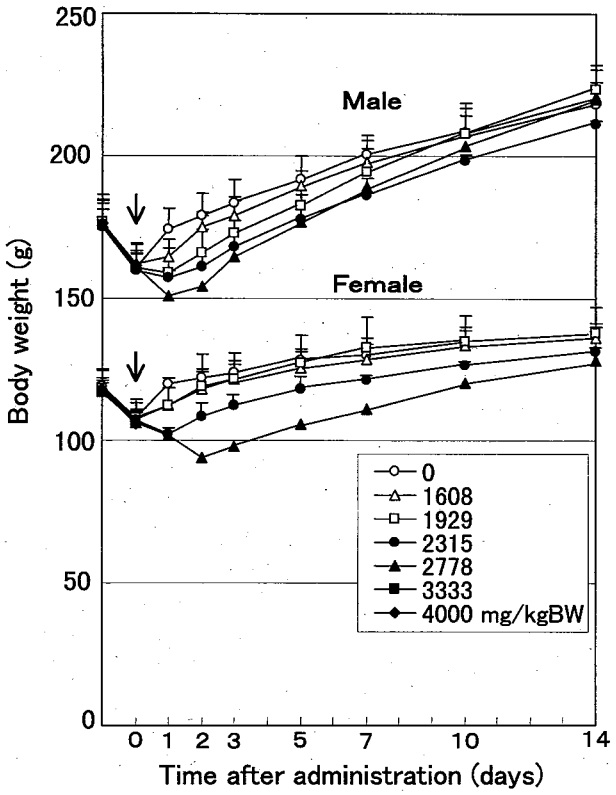


Fig. 1. Body weight changes of survived rats after administration of ferulic acid suspended in 0.5% aqueous solution of gum arabic. values are mean± SD
Arrow : Administration of ferulic acid

Table 2. LD50 of Ferulic Acid in F344 Rats

Sex	LD50 (mg/kg B.W.)	Confidence limit[a] (mg/kg B.W.)
Male	2445	2094-2854
Female	2113	1810-2467

a) P=0.05

色の粘液物が認められた．フェルラ酸のアラビアゴム懸濁液の水素イオン濃度を測定すると，pH4.2～pH4.4の酸性を示した．フェルラ酸のアラビアゴム懸濁液が消化管粘膜に対して示した刺激作用は，この液性が影響した可能性も考えられる．その他の器官，組織には異常所見は認められなかった．投与後14日目に行った生存ラットの解剖では，異常所見は認められなかった．

14日間の死亡率に基づいて求めたLD50値（半数致死量）及び95%信頼限界をTable 2に示した．雄で2445mg/kg（2094-2854mg/kg），雌で2113mg/kg（1810-2467mg/kg）とほぼ一致し，雄の方が雌よりもやや大きな値を示した．急性毒性に関しては，太田らのマウスにおける腹腔投与でのLD50が>194mg/kgの報告があるが[8]，ラットにおける経口投与での急性毒性は報告されていない．

謝辞 本研究のデータ解析にご協力いただいた，財団法人残留農薬研究所毒性第一部の小坂忠司先生に感謝いたします．

文 献

1) 西澤知恵子，太田剛雄，江頭祐嘉合，他：日本食品科学工業会誌，**45**, 499-503, 1998.

2) Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C.：*Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 324-325, 1992.

3) Chen, J. H. and Ho, C. T.：*J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2374-2378, 1997.

4) Uchida, M., Nakajin, S., Toyoshima, S., *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 623-626, 1996.

5) Yamada, J. and Tomita,Y.：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 328-329, 1996.

6) Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., *et al.*：*Carcinogenesis*, **14**, 1321-1325, 1993.

7) Lesca,P.：*Carcinogenesis*, **4**, 1651-1653, 1983.

8) 太田節子，古川真知子，篠田雅人：薬学雑誌，**104**, 793-797, 1984.

9) Stich, H.F., Rosin, M.P., Wu, C.H., *et al.*：*Cancer Lett.*, **14**, 251-260, 1981.

10) Berger, P.J., Sanders, E.H., Gardner, P.D., *et al.*: *Science*, **195**, 575-577, 1977.

11) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修：OECD毒性試験ガイドライン，7-11, 1991，薬業時報社，東京.

12) Gad S.C.and Weil C.S.：Statistics for Toxicologists, *In* Hayes A.W.(eds.), *Principles and Methods of Toxicology*, 299-305, 1982, Raven Press, New York.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 314-318, 1999

ヒト病態モデルマウスによる十全大補湯添加飼料投与実験－自己免疫疾患マウス(MRL/l)における腎糸球体病変の病理組織学的検査結果

坂本義光*, 長澤明道*, 矢野範男*,
湯澤勝廣*, 青木直人*

Study on the Effect of Jyuzen-Taiho-to using Experimental Model Mice for Human Disease－Histological Findings in Renal Glomerular Lesions in Autoimmune MRL/lpr Mice

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, AKEMICHI NAGASAWA*, NORIO YANO*
KATSUHIRO YUZAWA* and NAOTO AOKI*

MRL/Mp-lpr/lpr mice (MRL mice) spontaneously develop autoimmune disease. The effects of Jyuzen-taiho-to, a Chinese medicine, on renal glomerularlesions of MRL mice were histologically examined. MRL mice were fed a diet containing 0%(control), 0.2% and 3.2% Jyuzen-taiho-to for 13 weeks. The dose of 0.2% Jyuzen-taiho-to corresponds to a therapeutic dose for humans. The numbers of animals were 12 males and 12 females in control and dosed groups. Following the completion of the experiment, all animals of both sexes in control group and all of the males in the 0.2% group survived. The survival rate of the males in the 3.2% group was 11/12 and the survival rates of females in the 0.2% and 3.2% group were 11/12 and 10/12, respectively. There were no dose-related changes in body weight and kidney weight. Concering the survived animals, the severity and incidence of glomerular lesions in both sexes of dosed groups were similar with those of the control group. Although there was no influence of Jyuzen-taiho-to on the autoimmune glomerular lesions in the survived MRL mice, further long term observation and examination of the dead animals would be necessary to clarify Jyuzen-taiho-to's effects.

Keywords：漢方薬 chinse medcine, 十全大補湯 jyuzen-taiho-to, MRL/lprマウス MRL/lpr mice, 自己免疫疾患 autoimmune desease, 糸球体病変 glomerular lesions, 13週間投与試験13 week feeding test

緒　言

当所東洋医学プロジェクト研究である「漢方方剤の安全性及び有効性の評価に関する研究」の一環として十全大補湯（Juzen-taiho-to：Shi-Quan-Da-Bu-Tang）のラットによる投与実験を行い，明らかな障害作用のないことを報告した[1, 2]．今回ひきつづき十全大補湯の有効性など生物学的効果を検討することを目的として，ヒト病態モデルの一つである自己免疫疾患マウス（MRL/Mp-lpr/lpr; MRLマウス）による13週間投与実験を実施した．MRLマウスは加齢にともない糸球体腎炎，間質性肺炎，血管炎，関節炎などの自己免疫病変を発現することから，自己免疫疾患の発現機構に関する研究や薬物のスクリーニングに用いられている[3-6]．著者らも六味丸の有効性についてMRLマウスを用いた投与実験を行い，その結果を既に報告した[7]．十全大補湯には種々の免疫機能亢進作用[8-11]があることが知られているが，今回はMRLマウスが発症する病変のうち糸球体腎炎の発現に対する十全大補湯の作用の有無について組織学的に観察した結果を報告する．

実験材料および方法

被験物質：十全大補湯エキス末（㈱ツムラ製）は人参，黄耆，蒼朮，茯苓，当帰，芍薬，地黄，川キュウ，桂皮を各3，甘草1.5の割合で配合され，乳糖の含まれていないものを用いた．

* 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

動物および飼育条件：MRL/Mjp-lpr/lpr マウス（MRLマウス），4週齢，雌雄を日本チャールスリバー㈱より購入，1週間予備飼育後実験に用いた．動物の飼育条件は前報[7]と同様である．

投与方法および期間：十全大補湯は0.2及び3.2%の濃度で粉末飼料（CE-2；日本クレア製）に添加し摂取させた．なお0.2%はラットによる投与試験[1]においてヒト1日薬用量（5g）に相当する濃度であるが今回の実験でも低濃度として設定した．動物数はCE-2のみの対照群を含め，雌雄各12匹を用い，投与期間は13週間とした．試験飼料はいずれも固形化したものを投与した．

組織標本作製：投与終了後，摘出した左右の腎は秤量後10%緩衝ホルマリンで固定し，常法によりパラフィン切片を作製，HE染色及び過ヨウ素酸メセナミン銀（PAM）染色を行い観察した．

統計学的分析：実験終了時体重および腎重量については前報[2]に示した方法で行った．

結　果

生存率及び体重：Table 1 に示すように雌雄の対照群及び雄0.2%群では投与終了時まで全例が生存した．その他の群の生存率は雄3.2%群で11/12（12例中11例），雌0.2%群で11/12，3.2%群で10/12であった．死亡例は雄0.2%群の1例は投与開始後12週目に，雌0.2%群の1例は10週目，3.2%群では各々9，10週目に認められた．実験終了時体重は雌雄ともに各投与群で対照群と差がなかった．

腎重量：実験終了時生存例の重量をTable 2に示した.雌雄の各投与群で絶対重量，相対重量ともに対照群と差はなかった．

組織学的観察：今回の実験では生存例についてのみ観察を行った．対照群及び投与群に共通して，腎糸球体の主な変化はメサンギウム（MG）細胞の増生およびMG基質の増加であった．変化の程度は個々のマウスや同一腎の糸球体にによって多少差が見られた．糸球体係蹄における変化の範囲は正常と同様な程度の弱いものから糸球体全体に及んでいる強いものまで見られた．変化が強い例では細胞成分の増加に比べMG基質成分の増加が勝っていた．変化の見られた糸球体では，毛細管管腔内に好中球の存在やエオジン好性物の沈着なども認められた．さらに以上の変化に加えてボーマン嚢上皮細胞の層状性の増生による半月体形成及び腎小体周囲における線維の増生やリンパ球の浸潤を見る例が認められた．以上の糸球体の変化を前報[7]で示したように以下の4段階に分類した．すなわちMG細胞および基質の変化に基づき grade 1：正常に近い軽度な変化（minimal change），grade 2：糸球体の一部（分節性；segmental）に見られる変化（moderate change），grade 3：糸球体全体（全体的；global）におよんでいる変化（sever change）の3段階に，さらに半月体の形成を伴うものを grade 4とした．上記4段階の分類に基づき，個々の腎臓について100個の糸球体を観察し，最も多い発生数を示したグレードをその個体の糸球体病変の程度とした.雌雄の病変の発現数及び程度をTable 3に示した．変化の強さを各群で比較すると，雄では対照群及び投与群ともに糸球体の変化はgrade 1～2がほとんどで，grade 3 は対照群と3.2%群にそれぞれ2/12（12例中2例），1/11に認められた．糸球体毛細血管内に好中球や単核球などの浸潤は

Table 1. Survival and Mean Body Weights

Dose	Survival	Mean body weights(g) initial	final
Male			
0%(Control)	12/12[a]	24.7±1.5	47.6±0.6
0.2%	12/12	24.8±1.8	46.1±3.4
3.2%	11/12	24.0±1.9	45.1±5.3
Female			
0%(Control)	12/12	22.4±1.5	40.0±5.7
0.2%	11/12	21.9±1.4	41.9±3.9
3.2%	10/12	21.7±1.3	39.2±4.1

Values are means ± SD.
a) Number of mice surviving/initial number in group.

Table 2. Kidney weights

Dose		right	left
Male			
0%(Control)	(12)[a]	376± 43[b]	383± 49
		(789± 78)[c]	(805± 88)
0.2%	(12)	376± 52	385± 60
		(818±109)	(835±120)
3.2%	(11)	370± 54	367± 52
		(823±106)	(817±101)
Female			
0%(Control)	(12)	264± 39	262± 38
		(665± 84)	(660± 89)
0.2%	(11)	258± 17	258± 16
		(616± 23)	(618± 30)
3.2%	(10)	261± 23	269± 24
		(671± 76)	(690± 74)

Values are means ± SD.
a) Number of mice weighed. b)Absolute weight(mg).
c) Relative weight (mg)/100g body weight.

Table 3. Incidence and Severity of Renal Glomerular Lesion

Dose	No.of mice examined	Severity[a]			
		1	2	3	4
Male					
0%(Control)	12	1[b]	9	2	0
0.2%	12	2	10	0	0
3.2%	11	2	8	1	0
Female					
0%(Control)	12	3	7	1	1
0.2%	11	3	6	1	1
3.2%	10	1	6	1	2

a) Severity : grade 1;normal or minimal lesions, grade 2;moderate lesions, grade 3;severe lesions, grade 4;crecsent formation.
b) Number of mice with lesion.

対照群3/12，0.2%群3/12，3.2%群4/11に認められた．また半月体の形成を示す糸球体の存在はいずれの群においても，それぞれ1例に見られた．雌では雄同様メサンギウムの増殖性および硬化性の変化が主で，その程度も対照群，投与群ともに雄と同様であった．さらに雌では半月体の形成を見る糸球体が多いgrade 4と判定した例が対照群1/12，0.2%群1/11，3.2%群2/10に認められた．またgrade1～3とした例のうち，対照群と0.2%群でそれぞれ2例，3.2%群で1例に半月体の形成を伴う糸球体の存在が見られた．毛細血管内への細胞浸潤は各々3/12，2/11，3/10に見られた．糸球体病変の発現率や程度には，雌雄ともに対照群と投与群で明らかな差はなかった．

考　　察

MRLマウスの腎炎についてHewickerら[4]は組織学的に，focal glomerulonephritis（GN），diffuse GN，membrano-proliferative（MP）GN，crescentic GN及びmembranous（Mem）GNの5つのタイプに分類している．このうちメサンギウム（MG）細胞の増生およびMG基研究質の増加による糸球体病変（いわゆるMGの増殖性，硬化性病変）はMRLマウスに最も顕著に見られる糸球体病変であり，この変化が観察した糸球体の80%以下に見られる場合をfocal GN，それ以上に見られる場合をdiffuse GNと分類し，さらに半月体形成が観察した糸球体の80%以上に見られる病変をcrescentic GNとしている．1～24ヶ月齢までのMRLマウスの糸球体病変を観察した結果，1ヶ月齢で既に100%のマウスに発症しており，また4～5ヶ月齢マウスでの変化はほとんどがdiffuse GNに分類される病変であった．さらに5ヶ月齢雌では半月体の形成を示す糸球体腎炎の発現が見られ，この変化が雌で多発することを報告している．MRLマウスにおける糸球体腎炎は自己免疫疾患の一指標として薬物の作用の観察，評価のために適していると考えられる．今回の実験で観察された糸球体病変のうちgrade 1～3の変化は基本的には同じ性質の病変でありdiffuse GN，grade 4はcrescentic GNに相当すると考えらる．また今回観察したマウスの年齢は18週齢に相当するが，Hewickerら[4]によって報告されている4～5ヶ月齢における結果とよく一致してる．Hewicker[4]らはさらに進行した腎炎としてMPGNとMemGNをあげているが，発現率は非常に低く，今回の実験ではこの病変を示す糸球体の存在は明らかでなかった．

MRLマウスにおける糸球体腎炎は異常T及びB細胞の出現及び過形成にともなって産生されるIgGを主体とした自己抗体や抗原抗体免疫複合体の糸球体基底膜やメサンギウム細胞への沈着が原因となって発現すると考えられている[4,12]．一方十全大補湯にはマクロファージ活性化作用，抗体産生作用及びB細胞増殖作用などの免疫機能亢進作用があることが報告されている[8-11]．今回の実験ではMRLマウスの免疫機能異常によって起こる糸球体腎炎の発現に対する十全大補湯の影響の有無に注目した．その結果生存例の雌雄では，糸球体病変の現れ方には差はあるものの，対照群と投与群間では発現率および程度に差がなかった．また腎重量にも変化がなく，十全大補湯の免疫機能亢進作用はMRLマウスのおける自己抗体及び免疫複合体の産生や，さらには糸球体病変を軽減又は増悪させる様な影響は生存例においては観察されなかった．しかし今回の実験では投与群にのみ途中死亡が認められた．死亡例について組織観察を行っていないが，MRLマウスの死因は腎不全によるとされている[13]．また前実験[7]での途中死亡例の糸球体病変はいずれも程度の強い例であった．今回の途中死亡例についても強い腎病変を伴っている可能性があり，十全大補湯によって自己免疫疾患の発現がより強められた可能性も否定できない．今回用いたマウスの生育場のデータ[14]によればMRLマウスの平均寿命は雄で22，雌で17週齢であり，15週齢より死亡の発生が見られている．今回の実験において実験終了時マウスは18週齢に相当するが，対照群では死亡例はなく，用いたマウスは病変の発現及び進展がやや遅れていたとも考えらる．十全大補湯の作用を明らかにするためには，投与期間を延長し，死亡発現の多い期間を選んで死亡例を含め観察する必要があると思われる．

文　献

1）藤井 孝，三栗谷久敏，矢野範男，他:東京衛研年報，**46**, 243-253, 1995

2）坂本義光，池田虎雄，高橋　博，他：東京衛研年報，**48**, 327-338, 1997

3）Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S.et.al.: *J.Exp. Med.*, **148**, 1198-1215, 1978

4）Hewicker, M. and Troutwein, G.: *J. Vet. Med. B.*, **33**, 727-739, 1986

5）Koizumi, T., Nakano, Y., Matsui, T., Nakagawa, T., et. al.: *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, **77**, 396-404, 1985

6）上出利光:第12回和漢医学会大会要旨集， pp128, 1995

7）坂本義光，長澤明道，矢野範男，他：東京衛研年報，**47**, 314-319, 1996

8）伊藤　均，志村圭志郎：漢方医学，**8**, 14-17, 1984

9）丸山博文，川村秀樹，武元則人，他：炎症，**8**, 461-465, 1988

10）小松清弘，武元則人，丸山博文，他：炎症，**6**, 405-406, 19 89

11）武元則人，丸山博文，川村秀樹，他：炎症，**9**, 137-140, 19 89

12）Kolaja, G.J. and Fast, P.E.: *Vet.Pathol.*, **19**, 663-668, 1982

13）安倍千之：*Exp. Med*, **30**, 161-172, 1981

14）MRL/MpJUmmCrj-lpr/lprマウスの生物学的特性，1989，日本チャールス・リバー

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６編の報告を掲載している．その内容は，臨床試験の外部精度管理に関するもの１編，都保健所で行っている健康診断に関するもの２編，公衆衛生情報を利用したデータ解析に関するもの１編，情報ネットワークに関するもの１編及びGLP内部点検調査に関するもの１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検査所の生化学検査室を対象として精度管理調査を実施してきた．本報告では血液型検査を取り上げ，1989年度～1998年度の血液学的検査についての調査結果と今後の課題について述べている．調査対象施設は東京都衛生検査所の精度管理調査に参加した都内の衛生検査所延べ749施設である．調査方法は年１回，ABO式血液型検査（おもて検査とうら検査）及びRho (D)式血液型検査について，オープン方式とブラインド方式で行った．調査試料はABm型試料，Ａ亜型試料，及びＡ型試料の調製混合試料を用いている．調査結果は，ABO式血液型検査について，おもて検査とうら検査及び総合判定の回答を求める様になってから，全検査所の100％正解率を得るまでには８年を要した．またABO式血液型の亜型の検査については知識技術ともに十分な検査所がある反面，改善の必要がある検査所が散見された．Rho式血液型検査では，陽性例の判定についてはすべての検査所について問題点はなかったが，陰性例の判定ではD”型の確認を行っていない検査所があったと報告している．本報告は以上の結果より，衛生検査所の的確な検査精度を維持するためには，精度管理調査により血液型検査の水準を引き続き観察し，立ち入り検査で検査精度の向上のための改善策を具体的に指導・助言することが必要であるとしている．

都保健所で行っている健康診断に関する報告には，健康診断における検査値の実態に関する報告と，女性の貧血と鉄欠乏状況に関する調査である．健康診断における検査値の実態に関する報告は，平成９年度及び10年度に多摩地区保健所において実施した血液化学検査や末梢血液検査の検査結果について，年次別受診者の全体像の把握を試みるとともに緊急報告値について検討を行ったものである．対象は一般健康診断及び小規模企業健康診断を受けた54,657名とし，検査項目は緊急報告値を設定している血液生化学検査（GOT，GPT，γ－GTP，血糖，尿酸，尿素窒素，クレアチニン，LDH）及び末梢血液検査（白血球数，赤血球数，血色素量，ヘマトクリット値，血小板数）である．本報は血液検査の結果について，各検査値の年代別平均値と基準範囲外者割合及び緊急報告者数について年代別，性別に比較検討を行い，報告している．基準範囲外者割合の高い血糖値で，男性の50代が他の報告よりも高かった等，東京都の特徴的な事柄を報告している．そして緊急報告該当者は全受診者数から見れば少数であるが，即治療を要する病体の者も含まれていることを考えればその報告の意味は大きいと結論づけている．

女性の貧血と鉄欠乏状況に関する調査は，末梢血液検査成績をもとに，血色素値及び平均赤血球恒数により，貧血の状況を分類し，さらにフェリチンを測定して，鉄欠乏性貧血者及びその予備軍の実体について述べたものである．平成10年度多摩地区保健所で実施した一般健康相談及び小規模企業受託検診を受診した女性11,068名を対象として，都民の貧血の状況把握とラテックス免疫比濁法を用いた血清フェリチンの測定により鉄欠乏の状況を報告している．著者らは血色素値12g/dl未満を貧血としたとき，40代をピークとして受診者の12.6％が貧血と推定されるとしている．また貧血者において，正球性正色素性貧血は年代別に差がみられなかったが，小球性低色素性貧血は年代別に差があり，40代が多数であったと報告している．そして血色素値とフェリチンの対比により貧血予備軍を確認でき，予備軍に対し適切な健康指導を行うことにより鉄欠乏貧血を減少することができると記している．

公衆衛生情報を利用したデータ解析に関する報文は，我が国の人口動態統計を用いて，東京都立衛生研究所で

開発した疾病動向予測システム（SAGE）により，日本における自殺の特性を分析し報告している．分析は日本全国の自殺の年次推移，年齢調整死亡率，15歳階級死亡率，世代マップ，死亡率比マップにより経年的かつ包括的に行われている．自殺の年次推移，戦争の影響，景気動向，世代による自殺特性，東京都における自殺の特性を各々検討し，最後に自殺の要因の一番大きなものは病気であり，公衆衛生及び精神衛生等の社会基盤の強化を目的とした行政施策により，自殺の大幅な減少が図られると結んでいる．

情報ネットワークに関する報文は，都道府県における健康危機管理のための地方衛生研究所を介した情報ネットワークのモデルを示し，運用にあたっての問題点を報告している．検討にあたっては衛生研究所を介して公衆衛生関連部局及び東京都所管保健所12カ所のインターネット接続を行い，各部署の利用状況を調査し，運用後の問題点についてアンケート調査を行っている．この結果，利用時間の多くはホームページの検索に使用され，回数では電子メールによる利用が多い．そしてインターネットの利用状況は地域により大きく異なるため，地域の実情に応じた費用対効果を考慮し，ネットワークシステムを構築することが必要であると結論づけている．

GLP内部点検調査に関する報文は，平成10年度に精度管理室が行った内部点検の結果に基づき，東京都におけるGLPの現況と今後の課題についてまとめた報告である．内部点検は食品衛生法に基づいた業務を行っている検査施設43カ所に対し，試験品取り扱い及び検査等に関わる文書の点検を中心として行ったが，いくつかの問題点はあるものの，ほぼ全ての施設で整備が図られていた．また著者らは，検査部門の現状を考慮し，GLPの弾力的運用の可能性について各施設と密接に協議し，効率的で効果的なGLPのあり方を検討したいと結んでいる．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 321-325, 1999

東京都衛生検査所精度管理調査における 1989～1998年度の血液型検査の結果

大石向江[*1], 蓑輪佳子[*1], 伊瀬郁[*1], 荻野周三[*1], 川合由華[*1], 神保勝彦[*1], 田村行弘[*1], 町田勝彦[*2], 高木康[*3], 河野均也[*4]

The External Quality Assessment for Blood Groups Tests at the Registered Clinical Laboratories in Tokyo in 1989-1998

HISAE OISHI[*1], KEIKO MINOWA[*1], IKU ISE[*1], SHUZO OGINO[*1], YUKA KAWAI[*1], KATSUHIKO JIMBO[*1], YUKIHIRO TAMURA[*1], KATSUHIKO MACHIDA[*2], YASUSHI TAKAGI[*3] and KINYA KAWANO[*4]

Keywords：外部精度管理調査 external quality assessment，血液型検査 blood groups tests，登録衛生検査所 registered clinical laboratories

緒　言

血液型検査の誤った報告は輸血に際し生命に危険な副作用を招くおそれがあるため，血液型検査では何にも増して正確な検査結果を提出することが大切となる．そこで，日常の検査体制に万全を期すとともに，精度管理調査を積極的に受けるなどして，日常の検査精度の確認をすることが必要である．

東京都では，1982年度から都内の登録衛生検査所の検査精度の向上を図るため，生化学的検査，血液学的検査，血清学的検査，微生物学的検査及び細胞診検査（1994年度開始）についてオープン方式とブラインド方式により精度管理調査を実施している[1,2]．血液型検査については，ABO式血液型及びRho式血液型の調査を両方式によって第１回から毎回実施しており，第１回（1982年度）から第７回（1988年度）までの結果についてはすでに報告した[3]．今回，その後の第８回（1989年度）から第17回（1998年度）までの血液学的検査の結果と今後の課題について報告する．

調査内容

１．対象施設

東京都衛生検査所精度管理事業の精度管理調査に参加した都内の衛生検査所（以下，検査所と略）を対象とした．対象検査所数は72～73所／年で，合計749検査所である．

２．調査方法

調査は1989年度から1998年度まで年１回，ABO式血液型検査（おもて検査とうら検査）及びRho(D)式血液型検査について，調査であることを検査所に明示して試料を配布するオープン方式と，調査であることを検査所に伏せて試料を配布するブラインド方式で行った．

ABO式血液型については，オープン方式ではおもて検査及びうら検査を調査し，1991年度からはそれに加えておもて検査及びうら検査の検査結果を合わせた総合判定を調査した．ブラインド方式では通常総合判定のみを検査報告書に記載するので，それを結果とした．一方，Rho式血液型についてもオープン，ブラインド両方式で

＊１　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
＊１　The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
３－24－１, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan
＊２　東京慈恵会医科大学医学部臨床検査医学教室
105-8461東京都港区西新橋3-25-8
＊３　昭和大学医学部臨床病理学教室
142-8555東京都品川区旗の台1-5-8
＊４　日本大学医学部臨床病理学教室
173-8610東京都板橋区大谷口上町30-1

同様の方法で調査した．

また，各検査所の血液型検査方法及び検査を自施設で行ったか，外注したかについてオープン方式で調査した．

3．調査試料

試料には新鮮血液を用いた．年度別のオープン方式とブラインド方式の調査試料の血液型を表1に示した．ただし，1989年度オープン方式にはAB型血清にA_1型Rho(D)陽性血球を浮遊させたABm型試料，1998年度オープン方式にはA型Rho(D)陽性の血液とO型Rho(D)陽性洗浄液を1:9の割合で混合したA亜型試料，1998年度ブラインド方式にはA型Rho(D)陽性の血液にAB型Rho(D)陽性の血清を添加したA型試料を用いた．これらの試料はいずれも作製後約2週間冷蔵保存し肉眼的に溶血を観察して検査に支障のないことを確認した．

4．評価方法及び改善指導

各検査所において日常実施している方法により検査された配布試料の血液型検査の結果について正誤を判定し，正解率を算定した．不正解の検査所に対しては立ち入り検査を実施し，正確な検査がなされるよう指導・助言を行った．

結果及び考察

1．参加施設

精度管理調査に参加した検査所数を表2に示した．

1989年から1998年度の10年間に，オープン方式へは444検査所が参加し，ブラインド方式へは305検査所が参加した．1994年度からオープン方式への参加検査所が若干増加したのに対し，ブラインド方式への参加が増えていないが，これは1992年度から参加した医師会立健診センターや他県で登録している検査所等の任意団体が増加したためである．

また，血液型検査を自施設で実施した割合を表3に示した．自施設で検査している検査所は参加検査所の82.6－90.7%で平均85.8%であった．外部へ検査を依頼している検査所は9.3－17.4%で平均14.2%であった．1992年度から外注している検査所が増える傾向が見られたが，その後大幅な増加はなかった．なお，外注する場合には検体の保管，取り扱い等に問題が生ずることが多いことから，外注している検査所に対してはこれらの点には特に注意するよう指導してきた．

表1．調査試料の血液型

年度	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
オープン方式										
ABO式	ABm	A_1	A_1	B	AB	A	B	A	AB	A亜型
Rh式	＋	－	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	＋
ブラインド方式										
ABO式	AB	O	O	O	O	AB	AB	B	B	A
Rh式	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋

表2．精度管理調査に参加した衛生検査所数

年度	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	計
オープン方式	43	43	42	42	43	47	47	46	46	45	444
ブラインド方式	31	29	31	31	33	28	29	31	31	31	305
計	74	72	73	73	76	75	76	77	77	76	749

表3．血液型検査を自施設で実施した数

年度	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	数(平均)
自施設	39	39	37	35	36	39	40	38	40	38	381
(%)	(90.7)	(90.7)	(88.1)	(83.3)	(83.7)	(83.0)	(85.1)	(82.6)	(87.0)	(84.4)	(85.8)
外注	4	4	5	7	7	8	7	8	6	7	63
(%)	(9.3)	(9.3)	(11.9)	(16.7)	(16.3)	(17.0)	(14.9)	(17.4)	(13.0)	(15.6)	(14.2)
調査した検査所数	43	43	42	42	43	47	47	46	46	45	444

表4．検査所で採用している血液型検査の方法

年度	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998
ABO式血液型										
A. おもて検査										
1. 試験管法	29	27	31	28	28	32	33	37	36	36
(%)	(67.4)	(62.8)	(73.8)	(66.7)	(65.1)	(68.1)	(70.2)	(80.4)	(78.3)	(80.0)
2. スライド法	8	11	7	10	10	9	8	3	4	2
(%)	(18.6)	(25.6)	(16.7)	(23.8)	(23.3)	(19.1)	(17.0)	(6.5)	(8.7)	(4.4)
3. カード法	6	5	4	4	5	6	6	6	5	6
(%)	(14.0)	(11.6)	(9.5)	(9.5)	(11.6)	(12.8)	(12.8)	(13.0)	(10.9)	(13.3)
4. カラム凝集法	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
(%)									(2.2)	(2.2)
B. うら検査										
1. 試験管法	43	43	42	42	43	47	47	46	45	44
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(97.8)	(97.8)
2. カラム凝集法	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
(%)									(2.2)	(2.2)
Rho式血液型										
1. 試験管法	40	41	37	40	41	45	45	45	44	42
(%)	(93.0)	(95.3)	(88.1)	(95.2)	(95.3)	(95.7)	(95.7)	(100)	(95.7)	(93.3)
2. スライド法	2	0	4	2	2	1	2	0	0	0
(%)	(4.7)		(9.5)	(4.8)	(4.7)	(2.1)	(4.2)			
3. カード法	1	2	1	0	0	1	0	0	1	2
(%)	(2.3)	(4.7)	(2.4)			(2.1)			(2.2)	(4.4)
4. カラム凝集法	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
(%)									(2.2)	(2.2)
検査所数計	43	43	42	42	43	47	47	46	46	45

2．検査所で採用している血液型検査の方法

各検査所で採用している血液型の検査方法を表4に示した．ABO式血液型検査の試験管法は1989年度の67.4%から1998年度の80.0%に増加している．これに対してスライド法は18.6%から4.4%へと漸次減少しており，カード法を採用している検査所は9.5%から14.0%の間にあって大きな変化がなかった．うら検査の方法としては全検査所で試験管法を採用しており，これは，本調査の第一回（1982年度）の調査時から指導してきた成果であると考えられる．Rho式血液型検査では試験管法を採用する検査所数はこの10年間で88.1%から100%の間にあって大きな変化はなかった．スライド法を使用する検査所は1996年度以降はなくなっており，カード法は1～2検査所に止まっている．また，1997年度からカラム凝集法を採用する検査所があったが，この方法では検査が自動化されているために，①検体・試薬の分注が均一化されること，②判定が客観的で個人差・施設間差がなくなること，③時間短縮が可能になること，等の長所を持つことから，今後この方法の増加することが推察される．

3．正解率

各回答の正解率を表5に示した．

1）オープン方式の成績

ABO式血液型において，総合判定の正解が100%になった年度は，1990，1991，1993，1995，1996，1997年度の6回あったが，1996年度までは，おもて検査あるいはうら検査のいずれか，または両方の正解率が100%とはならなかった．不正解の理由を該当年度の立ち入り検査時に確認したところ，転記の誤り，おもて・うら検査の結果が不一致でも検討しなかった，または原因不明によるものであった．そこで，検体の仕分けや結果の確認を複数で行うこと，検査過程の記録を確実に残し原因究明のできる体制をつくること，等の改善事項を具体的に助言，指導した．その結果，1997年度にはおもて検査，うら検査及び総合判定のすべてにおいて全検査所から正解を得ることができた．これは精度管理調査と指導・助言の成果によるものと考えられる．

そこで検査精度と技術をさらに向上させる目的で，1998年度オープン方式では，A亜型を試料とした調査を

表5．精度管理調査で配布した試料の血液型と検査結果

年度	オープン方式						ブラインド方式			
		ABO式			Rho式		ABO式		Rho式	
		おもて検査（%）	うら検査（%）	総合判定（%）		（%）	（%）			（%）
	型名				型名		型名		型名	
1989	ABm	43/43*1	41/43		+	42/43	AB	31/31	+	31/31
		(100)	(95.3)			(97.6)		(100)		(100)
1990	A_1	43/43	38/43	43/43	−	43/43	O	27/29	+	29/29
		(100)	(88.4)	(100)		(100)		(93.1)		(100)
1991	A_1	42/42	41/42	42/42	+	42/42	O	31/31	+	31/31
		(100)	(97.6)	(100)		(100)		(100)		(100)
1992	B	41/42	40/42	41/42	+	42/42	O	31/31	+	31/31
		(97.6)	(95.2)	(97.6)		(100)		(100)		(100)
1993	AB	41/43	41/43	43/43	−	43/43	O	33/33	+	33/33
		(95.3)	(95.3)	(100)		(100)		(100)		(100)
1994	A	46/47	45/47	44/47	+	47/47	AB	28/28	+	28/28
		(97.9)	(95.7)	(93.6)		(100)		(100)		(100)
1995	B	46/46	45/47	47/47	+	47/47	AB	28/30	+	30/30
		(100)	(95.7)	(100)		(100)		(93.3)		(100)
1996	A	46/46	45/46	46/46	+	46/46	B	31/31	+	31/31
		(100)	(97.8)	(100)		(100)		(100)		(100)
1997	AB	46/46	46/46	46/46	−	45/46	B	31/31	−	31/31
		(100)	(100)	(100)		(97.8)		(100)		(100)
1998	A亜型	2/45	45/45	5/45	+	45/45	A	24/31	+	31/31
		(4.4)	(100)	(11.1)		(100)		(77.4)		(100)
	A型*2	29/45	22/45							
		(64.4)	(48.9)							
	判定保留*2	14/45	18/45							
		(31.1)	(40.0)							

*1：正解の検査所数／参加した検査所数

*2：A亜型の試料に対して，A型及び判定保留と回答した検査所数／参加した検査所数

実施した．その結果，おもて検査で29検査所が「A型」，2検査所が「A亜型」，14検査所が「判定保留」と回答した．これは，回答用紙に追加情報として，A血球での部分凝集を記載し，亜型やキメラ・モザイクあるいは異型輸血の可能性を推測した検査所，あるいはレクチンによる反応性を検討し「A型とO型の混合血」とした検査所，「疑いもなくA型とした」，「疑いを持ちつつA型とした」，「疑いを持たず亜型・判定保留とした」，「疑いを持ち，他の方法で検索して亜型・判定保留とした」検査所など，検査所間で回答に対する大きな開きがあったものである．なお，疑いもなくA型と報告した検査所は，精査していたにもかかわらず回答用紙にその記載のなかった可能性があることが考えられるため，表中では回答の記載のみにとどめた．しかし，精査していない検査所については血液型検査に対する知識と理解を改めて早急に指導する必要があると考えられる．この試料のような亜型の発生頻度は0.1から0.4%でごく少ない[4,5]とはいわれているものの皆無ではないため，必要な検査過程を確実に実施するとともに，判断に迷う際には日赤へ相談する等の措置を講ずるよう指導する必要があると考えられる．

一方，Rho式血液型検査で100%の正解率を得たのは10年間に1990，1991，1992，1993，1994，1995，1996，及び1998年度の8回であった．1989年度の誤回答の理由は誤記入によるものであることが立ち入り検査時に判明したので，複数人での確認を実行するよう指導・助言した．また，1997年度のオープン方式におけるRho陰性の試料について誤りが1件あったが，結果に添えられた追加情報によると，事務的誤りではなく判定を誤ったものと判断された．ただし，Rho陰性の血液については特に

D^{u}検査を必ず実施する必要がある[6]が，D^{u}検査についての追加情報のあったのは1990年度で9，1993年度で16，1997年度で2検査所のみであった．これらのことから，肝要な検査を確実に実施することを今後さらに指導する必要があると考えられる．

2）ブラインド方式の成績

ABO式血液型検査について100%の正解率を得たのは1989，1991，1992，1993，1994，1996，1997年度の7回であった．1990及び1995年度における誤回答は誤記入によることが確認されており，複数人での確認を実施するよう指導・助言した．また，1998年度においては正解率が77.4%と低かった．これは，A型と回答すべき試料であったにもかかわらず，うら検査のB血球に対する凝集が弱く判定保留とした6検査所が不正解と判断され，さらに，おもて検査とうら検査の凝集の読みとりを逆に報告していた検査所が1ケ所あり，これについても不正解と判断されたためである．これらの検査所については，抗体の力価が個人によって異なること，骨髄腫や低γ-グロブリン血症または新生児などで抗体価の低下のみられることを認識し，さらに報告書への誤記入を避けるために複数人での確認を行う措置をとる必要があるので，それらの点について指導した．

一方，Rho式血液型検査の正解率については，10年間を通して100%であった．ただし，1997年度の陰性の試料についてはD^{u}検査を実施した追加報告が記載されてなく，オープン方式と同様，肝要な検査を確実に実施するよう指導する必要があると考える．

以上のことから，検査所における血液型検査については精度管理調査および立ち入り検査によって引き続き検査精度の向上を図る必要があると考えられる．

なお，医療機関への検査結果報告では，検査に使用したカードを添付する検査所の多いことが立ち入り検査時に確認されているが，感染予防のために表面にフィルムやシールを貼る等の措置を講ずるよう助言している．今後すべての検査所で採用されるよう注視したい．

まとめ

1．東京都衛生検査所精度管理調査のうち，1989年度から1998年度まで10年間の血液型検査の結果をまとめた．

2．ABO式血液型については，おもて検査及びうら検査の回答に加えて総合判定の回答を求める形式に改めてから8年目で全検査所から正解を得ることができた．これは，正確な報告がなされるよう調査で繰り返し注意を喚起したこと，立ち入り検査によって精度向上の指導・助言を具体的に行った成果と考える．

3．ABO式血液型の亜型の検査については，知識，技術ともに十分に備えた検査所があると判断される一方，改善の余地を残す検査所のあることがわかった．

4．Rho式血液型検査では，陽性例の判定については特に改善を要する問題点は認められなかった．しかし，陰性例の報告についてはD^{u}型の確認を行っていない検査所があった．

5．以上の結果から，衛生検査所精度管理調査において血液型検査の水準を引き続き注意深く観察するとともに，立ち入り検査で検査精度の向上のための改善策を具体的に指導・助言することが必要であると考えられる．

文　献

1）東京都：第1～9回（昭和57～平成2年度）東京都衛生検査所精度管理調査結果報告書，1983～1991.

2）東京都：第10～17回（平成3～10年度）東京都衛生検査所精度管理事業報告書，1992～1999.

3）大石向江，小林千種，蓑輪佳子，他：医学検査，1425-1430, 1990.

4）Boorman,K.,Dodd,B. and Lincoln,P.J.：Blood Group Serology, 6th ed., 1988, Churchill Livingstone, London.

5）中嶋八良：免疫血液学的検査－血液型検査－ABO式，松橋直，微生物検査必携免疫血清反応検査，第2版，89-99, 1979，日本公衆衛生協会，東京，

6）福岡良男，福岡良博，伊藤忠一，安藤清平：臨床免疫学，第2版，1989，東京．

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 326-331, 1999

都保健所での健康診断における検査値の実態について

渡邉泰男*, 秋場哲哉*, 安部昭子*, 磯貝スエ子*
廣瀬英生*, 前　潔*, 山田澄夫*, 上木隆人*

The Evaluation of Laboratory Value of Clinical-Biochemical Tests in Medical Care in Tama,Tokyo

YASUO WATANABE*, TETSUYA AKIBA*, AKIKO ABE*, SUEKO ISOGAI*
HIDEO HIROSE*, KIYOSHI MAE*, SUMIO YAMADA*, and TAKATO UEKI*

Keywords：臨床検査 clinical-biochemical test, 健康診断 medical care, 緊急報告値 critical value, 基準範囲 reference intervals

はじめに

衛生研究所多摩支所では平成９年度から，東京都12保健所で実施している一般健康相談，小規模企業及び受託検診，健康づくりフォローアップ指導事業（以下健康づくり）において血液生化学検査や末梢血液検査を実施している．その検査値を保健所に還元し，健康指導に役立てているが，その際健康障害が推測され，早めの対応が望ましいと思われる検査値が確認された場合は，緊急報告値として結果が出た時点で保健所に連絡している．

ここでは平成９年度と平成10年度の上記事業の検査結果において当所で緊急報告値を設定した血液生化学検査８項目＜GOT，GPT，γ-GTP，血糖（以下GLU），尿酸（以下UA），尿素窒素（以下BUN），クレアチニン（以下CRE），LDH＞と末梢血液検査5項目＜白血球数（以下WBC），赤血球数（以下RBC），血色素量（以下Hb），ヘマトクリット値（以下Ht），血小板数（以下PLT）＞について年次別に受診者の全体像の把握を試みるとともに，緊急報告値について若干の検討を加えたので報告する．

対象及び方法

１．対象者

平成９年度と平成10年度の受診者数を表１に示した．平成９年度28,338名，平成10年度26,319名を対象とした．

２．血液生化学検査

使用機器は日立7170血液自動分析装置を用いGOT，GPT，γ-GTP，GLU，UA，BUN，CRE，LDH，総コレステロール（以下T-C），中性脂肪（以下TG），HDL-コレステロール，アルカリホスファターゼ，チモール混濁試験，硫酸亜鉛混濁試験，総蛋白，血清鉄，不飽和鉄結合能，βリポ蛋白，及びカルシウムを測定した．今回はこのうち緊急報告値を設定した８項目（GOT，GPT，γ-GTP，GLU，UA，BUN，CRE，LDH）について集計した．

表１．対象者数

事　業	平成９年度	平成10年度
一般健康相談	16,193	11,067
小規模企業・受託検診	11,910	15,045
健康づくり	235	207
合計	28,338	26,319

３．末梢血液検査

使用機器はSysmex K－4500を用い，WBC，RBC，Hb，Ht，及びPLTの５項目を測定した．

４．基準範囲及び緊急報告値

表２に基準範囲及び緊急報告値を示したが，基準範囲については，GLUは日本糖尿病学会提示の基準範囲[1]を，その他の項目については使用試薬に添付されている基準範囲を用いた．

緊急報告値については松尾らの報告[2]を参考として設定した．

結果及び考察

１．年代別平均値

図１に平成10年度の末梢血液検査（WBC，RBC，Hb，Ht，PLT）及び血液生化学検査（GOT，GPT，γ-GTP，T-C，TG，GLU，UA）の年代別平均値を示した．なお

* 東京都衛生研究所　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 3-16-25,Shibazakicho, Tachikawa, Tokyo,190-0023 Japan

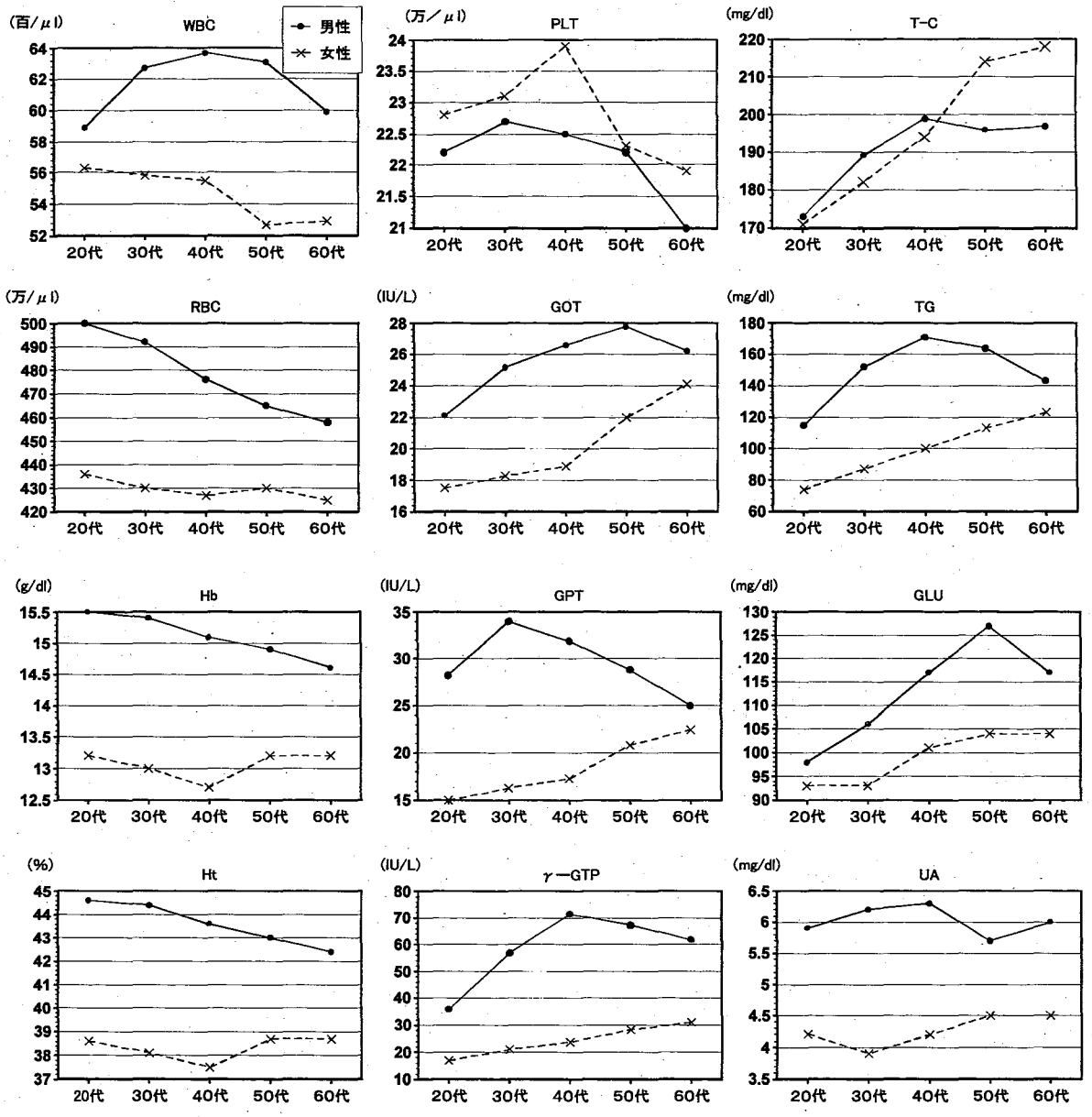


図1．平成10年度の末梢血液検査及び血液生化学検査における年代別平均値

BUN，CRE及びLDHについては例数が少なかったため図示しなかった．平成9年度もほぼ同様な結果であり,ここでは平成10年度の成績をもとに検討を加えた．

末梢血液検査ではPLTを除いて全ての項目で女性より男性が高値であった．貧血検査項目（RBC，Hb，Ht）では男性は年齢とともに値は低下するが，女性では40代がこれらの項目で低値を示した．このことは加藤らの女性の貧血者は40代で最多になるとした報告[3]と一致するものであった．

血液生化学検査項目では肝機能検査項目（GOT，GPT，γ-GTP）のうち，GPTで男性の30代，γ-GTPで男性の40代～50代で平均値が基準範囲の上限を超えていた．GPTは肝臓の細胞障害を反映[4]，またγ-GTPは飲酒の程度と相関があると言われていることから[4]，30代～50代男性におけるGPTやγ-GTPの上昇はアルコール多飲の影響であろうと考えられる．GLU，UAについては，全ての年代で男性が女性より高値を示し,特にGLUで男性の40代～60代では平均値が基準範囲上限を超えていた．

なお緊急報告値は設定していないが，血中脂質検査項目（T-C，TG）についてみると，男性では40代～50代で最も高値を示した．TGの年代別平均値の変化はγ-GTPとよく似ており，TGに変換されやすいアルコール摂取の影響が,ここからも窺われた．女性では，50代からT-Cの平均値が男性のそれを上回り基準範囲上限に近づいている．このことは，この年代の女性には更年期による性ホルモンの脂質代謝への関与を示すものであった．

表２．基準範囲及び緊急報告値

	項目	基準範囲	緊急報告値
末梢血液検査	WBC (/μl)	M 4,000～8,500 F 3,500～8,000	2,000以下，25,000以上
	RBC (万/μl)	M 430～565 F 380～500	250以下，650以上
	Hb (g/dl)	M 13.5～17.0 F 11.8～15.0	6以下
	Ht (%)	M 40.0～51.5 F 34.5～45.0	25以下
	PLT (万/μl)	15～40	4以下,100以上
血液生化学検査	GOT (IU/L)	10～27	500以上
	GPT (IU/L)	5～33	500以上
	γ-GTP (IU/L)	10～63	1,000以上
	GLU (mg/dl)	75～110	50以下,500以上
	UA (mg/dl)	M 3.0～8.3 F 2.5～6.3	M10.0以上 F9.0以上
	BUN (mg/dl)	8～20	
	CRE (mg/dl)	M0.6～1.2 M0.4～0.9	8以上
	LDH (IU/L)	106～211	2,000以上

２．基準範囲外者割合

表３に平成９年度及び平成10年度の基準範囲外者数及び緊急に報告した数を示した．また図２にBUN，CRE，LDHを除いた平成10年度の基準範囲外者の年代別割合を示した．血液生化学検査における，基準範囲外者割合の最も高い項目は両年ともGLU，次いで肝機能項目のGOT，GPT，γ-GTPであった．これらを年代別に見てみると，GLUでは男性の40代～60代の基準範囲外者の割合は35％を超えており，特に50代では47％と他の報告[5)6)]より高かった．このことは検査前の摂食の有無の影響も考えられるが，女性はそれほど高率ではなく，年代別平均値もそれ程高くないことから，基準範囲外者の割合が高い理由は，重要な検討課題であろう．肝機能検査項目の基準範囲外者割合については，東京都総務局健康管理課報告[6)]の都職員の肝機能低下17％とほぼ同様の結果であった．またCREの基準範囲外者は平成９年度の7.0％（68人）から，平成10年度では2.2％（24人）と大幅に減った．

次に，末梢血液検査においては，基準範囲外者の割合は平成９年度と平成10年度では大差ない結果であり，最も多くの基準範囲外者のみられた項目はWBCであった．また都保健所における貧血率は両年とも10％前後と推定され，東京都健康管理課報告[6)]の5.2％より高かった．年代別の変化を見ると，貧血検査項目で男性は年齢が高くなるごとに基準範囲を低値に外れる者の割合が増し，加藤ら[3)]及び宇佐見ら[5)]の報告と同様の結果であった．他方，女性では，HbとHtで基準範囲を低値に外れる者が40代で最も多くなり，生理的な出血や子宮筋腫，子宮内膜症等の病的な出血が貧血の一因と考えられた[7)]．

３．緊急報告値に基づく報告例

緊急報告数は表３に示すように，平成９年度は58名（68例），平成10年度は54名（72例）であり，総受診者に占める割合は両年とも0.2％であった．末梢血液検査と血液生化学検査における緊急報告数は平成９年度には同数であったが，平成10年度には末梢血液検査の方が多かった．これを検査項目別に見ると，両年とも末梢血液検

表3．基準範囲外者数及び緊急報告数

	平成9年度			平成10年度		
検査項目	総件数	基準範囲外者数	緊急報告数	総件数	基準範囲外者数	緊急報告数
WBC	27,560	3,495 (12.7)	1	25,905	3,255 (12.6)	8
RBC	27,560	2,396 (8.7)	7	25,905	2,349 (9.1)	6
Hb	27,560	2,975 (10.8)	3	25,905	2,546 (9.8)	7
Ht	27,560	1,721 (6.2)	12	25,905	2,283 (8.8)	24
PLT	27,560	1,580 (5.7)	11	25,905	1,504 (5.8)	6
GOT	26,820	4,292 (16.0)	4	25,501	3,924 (15.4)	3
GPT	26,882	4,41 4(16.4)	5	25,531	4,350 (17.0)	2
γ-GTP	26,649	4,423 (16.6)	17	25,399	4,224 (16.6)	13
GLU	2,458	532 (21.6)	1	3,559	724 (20.3)	1
UA	894	53 (5.9)	7	850	52 (6.1)	2
BUN	733	44 (6.0)	0	622	35 (5.6)	0
CRE	966	68 (7.0)	0	1,068	24 (2.2)	0
LDH	84	7 (8.3)	0	56	3 (5.4)	0

( ) 内は総件数に対する，基準範囲外者の％を示す

表4．緊急報告該当例の内訳

平成9年度

検査項目	小規模・受託		一般健康相談		健康づくり	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性
WBC	1(0)	0	0	0	0	0
RBC	0	2(2)	4(2)	1(0)	0	0
Hb	0	1	0	2	0	0
Ht	0	4	1	6	0	1
PLT	6(0)	1(0)	3(0)	1(0)	0	0
GOT	1	1	2	0	0	0
GPT	0	2	3	0	0	0
γ-GTP	7	0	10	0	0	0
GLU	0	0	1(0)	0	0	0
UA	4	0	3	0	0	0
合計	19	11	27	10	0	1

平成10年度

検査項目	小規模・受託		一般健康相談		健康づくり	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性
WBC	1(0)	2(0)	3(0)	2(0)	0	0
RBC	0	2(1)	2(1)	2(0)	0	0
Hb	0	1	0	6	0	0
Ht	2	7	2	13	0	0
PLT	1(1)	1(0)	2(0)	2(0)	0	0
GOT	0	0	3	0	0	0
GPT	0	0	2	0	0	0
γ-GTP	5	0	8	0	0	0
GLU	0	0	1(1)	0	0	0
UA	2	0	0	0	0	0
合計	11	13	23	25	0	0

高値側，低値側に設定のある項目については，高値側該当数を()内に再掲

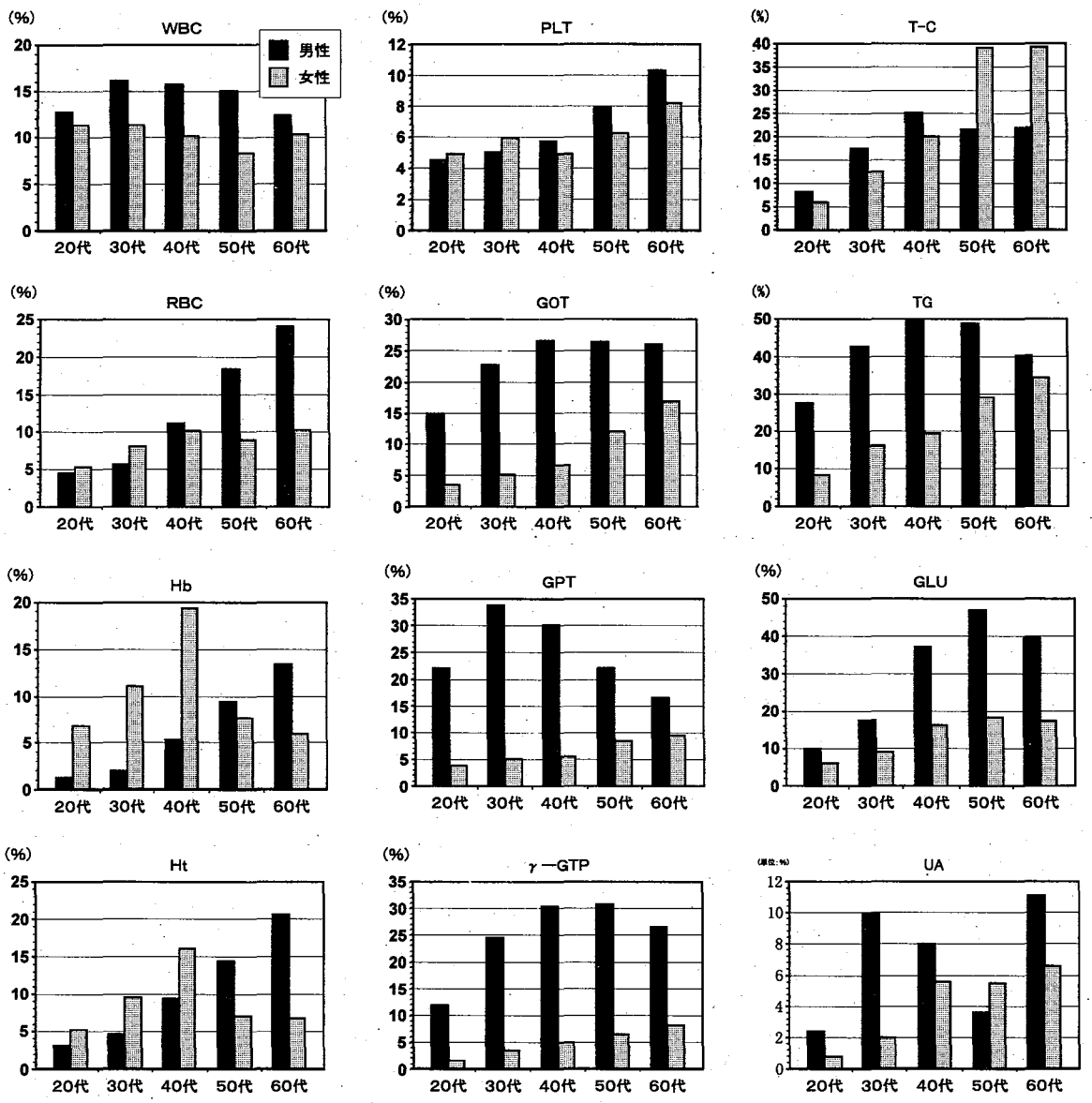


図２．平成10年度における基準範囲外者における年代別，性別割合

査ではHt，血液生化学検査ではγ-GTPが多く，特に前者は平成10年度で顕著で，24例を数えた．また，BUN，CRE及びLDHでは両年とも緊急報告例は認められなかった．

表４はこれら緊急報告例を事業別，性別にまとめたものである．事業別には，過半数が一般健康相談において確認されたものであり，平成９年度は68例中37例(54%)，平成10年度には72例中48例（66%）を占めた．項目別にはγ-GTPの緊急報告者は両年とも全て男性，逆にHtでは36例中31名が女性であったことが特徴的な点であった．

緊急報告者のうち，平成９年度10名，平成10年度14名の計24名が２項目以上で緊急報告値を呈した者であった．その内訳は２項目該当者22名（HbとHt9名，RBCとHt４名，WBCとPLT２名，RBCとPLT１名，GOTとGPT３名，GOTとγ-GTP２名，GPTとγ-GTP1名），３項目（WBCとRBCとPLT）及び５項目（WBCとRBCとHbとHtとPLT）該当者各１名であった．

以上のように,都保健所健診における血液検査の結果について,年代別平均値，基準範囲外者割合及び緊急報告者数を年代別，性別に比較してみたところ幾つかの事項で特徴的な事柄が認められた．また緊急報告該当者は全受診者数から見れば少数ではあるが，即治療を要する病態の者も含まれていることを考えれば，その報告の意味は大きいと言える．成人後の疾患は長期にわたる生活習慣から発症するものも多くその改善は都民の健康を確保するためには，大きな課題であろう．今後は飲酒，喫煙，運動等の生活習慣,職種あるいは血圧等との対比・解析が必要であろう．

文　献

1）葛谷健，中川昌一，佐藤譲，他：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告.
2）松尾収二：臨床検査，**13**, 1421-1425, 1996.
3）加藤誠実，鈴木政之，中山絹代，他：産業医学ジャーナル，**21**, 31-42，平成10.
4）Jacques Wallach：検査値ハンドブック第6版，223-230, 1997，医歯薬出版株式会社東京.
5）宇佐見隆廣，木村一元，橋田学：東京都予防医学協会年報，**28**, 83-90, 1991.
6）都総務局勤労部健康管理課：けんこう，24.
7）内田立身：内科，**82**, 427-430, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 332-336, 1999

都保健所健診における女性の貧血と鉄欠乏状況について

磯貝スエ子*, 安部昭子*, 廣瀬英生*, 秋場哲哉*, 渡邉泰男*,
前潔*, 山田澄夫*, 上木隆人*

Anemia and Iron Deficiency of Female in Tama ,Tokyo

SUEKO ISOGAI*, AKIKO ABE*, HIDEO HIROSE*, TETSUYA AKIBA*, YASUO WATANABE*,
KIYOSHI MAE*, SUMIO YAMADA* and TAKATO UEKI*

Keywords：貧血 anemia, 鉄欠乏性貧血 iron deficiency anemia, 血清フェリチン serum ferritin, 貧血予備群 anemia latent group, 血色素 hemoglobin

はじめに

女性にとっては，鉄欠乏性貧血は永遠の健康課題である．経済が豊かになり，栄養状態が改善された現代でも鉄欠乏性貧血は減少せず，むしろ増加しているとさえ言われている．特に有経期の女性における失血性の貧血は不可避であり，これに対して鉄剤投与による治療だけでなく，食生活の管理による改善も試みられている．しかし，貧血対策としての食事管理は，予防手段としての効果は大きいものの，鉄欠乏が進行し，末梢血液検査の結果によって強度の貧血が指摘されるような段階に至っては，なかなか改善効果は現れにくい．

保健所で実施されている健康診断における受診者の貧血の目安は血色素値（以下Hb値）であるが，Hb値のみでは貯蔵鉄欠乏や潜在性鉄欠乏及び鉄欠乏性貧血の判断は不可能である．これらを推定するには血清中に含まれるフェリチン（以下S-Fer）値を測定することが必要である．また，S-Fer値とHb値を対比することによって，S-Fer値は減少しているが末梢血液検査の結果にまでは現れない者，“いわゆる鉄欠乏性貧血予備群（以下予備群とする）”を早期に発見することも可能であろう．予備群の発見は食生活を中心とした生活習慣の予防的改善指導が可能となり，健診の意義はより大きいものになると考えられる．しかしながら，現状ではこれら予備群について，該当者を把握することが難しいだけでなく，その発生頻度など不明な点が多い．

そこで，今回我々は多摩地区保健所で実施した健診事業における末梢血液検査成績をもとに，Hb値及び平均赤血球恒数による受診者の貧血の状況や分類を試みた．更に一部のものについてS-Fer値を測定し，それを指標としてHb値との対比のもとに，鉄欠乏性貧血者及び予備群の実態について検討した．

材料及び方法

1．対象者

平成10年度都内多摩地区12保健所において，一般健康相談及び小規模企業・受託検診を受診した女性11,068名（10代244名，20代4,097名，30代1,843名，40代2,077名，50代2,129名，60代以上678名）を対象者とした．

また，S-Ferの検査は上記の中から年代別に抽出した71名（10代～20代15名，30代14名，40代15名，50代15名，60代12名）について実施した．

2．末梢血液検査

保健所で採血され，当研究室に搬入された末梢血液は，全自動血球計数装置Sysmex K-4500で，赤血球数，白血球数，Hb値，ヘマトクリット値，及び血小板数を測定した．また，平均赤血球容積（以下MCV）及び平均赤血球血色素濃度（以下MCHC）は，同器機において算定された．

3．S-Fer値の測定法

S-Fer値の測定はラテックス免疫比濁法（ヤトロン）を用い自動分析装置日立7170で測定した．S-Fer試薬の検査精度については，免疫コントロール血清（ヤトロン）標準物質を用いその測定値が表示値の±1.1%であることを確認した．

* 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 ,
3－16－25, Shibazakicho , Tachikawa , Tokyo , 190-0023 Japan

4. 血清鉄，不飽和鉄結合能（以下UIBC）測定法

鉄欠乏状況を確認するために，血清鉄値及びをUIBC値をバソフェナントロリン直接法で測定した．総鉄結合能（以下TIBC）とトランスフェリン飽和率（以下Tf飽和率）はそれらをもとに次式，TIBC＝血清鉄＋UIBC，Tf飽和率＝血清鉄/TIBC×100で算定した．

5．貧血の平均赤血球恒数による分類方法[1)]

Hb値12g/dl未満を示した被検対象者について平均赤血球恒数（MCV，MCHC）を求め，それにより小球性低色素性貧血（MCV＜80fl，MCHC＜30%），正球性正色素性貧血（MCV＝81～100fl，MCHC＝31～51%），大球性正色素性貧血（MCV＞101fl，MCHC＝31～35%）の3タイプに分類を行った．

6．Hb値とS-Fer値による貧血の進行状況の分類方法

Hb値とS-Fer値から，以下4群の分類を行った．すなわち，非貧血者（Hb≧12g/dl，S-Fer≧12ng/ml），予備群（Hb≧12g/dl，S-Fer＜12ng/ml），鉄欠乏性貧血（Hb＜12g/dl，S-Fer＜12ng/ml）と，その他の貧血（Hb＜12g/dl，S-Fer＞12ng/ml）である．

結　　果

1．Hb値による貧血の状況

図1は被検対象者の年代別平均Hb値を，同等の職域集団と思われる集団を対象に昭和63年に他の検査機関で測定されたもの[2)]と対比したものである．両者はほぼ同様の傾向を示し，保健所受診者でも25歳頃から低下し始め，40歳から49歳に最低値を示し，その後上昇に転じ，60代より再び低下傾向を示した．

Hb値12g/dl未満を貧血とした場合，11,068名中1,397名（12.6%）が貧血者に該当した．年代別にみると，10代（12.9%），20代（9.2%），30代（13.2%），40代

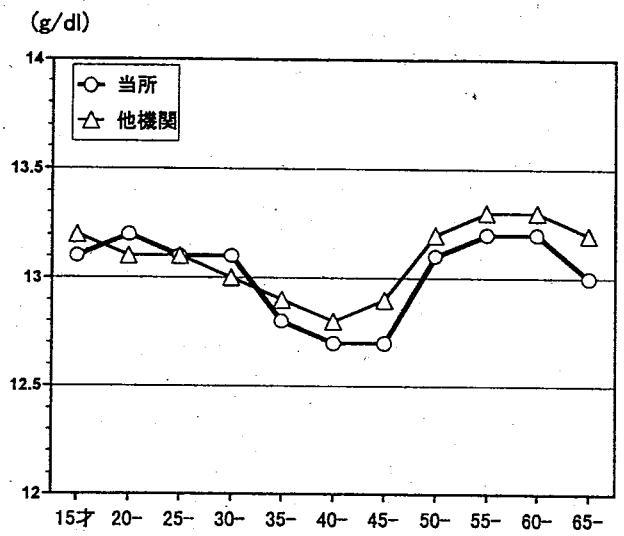


図1．年代別平均血色素値

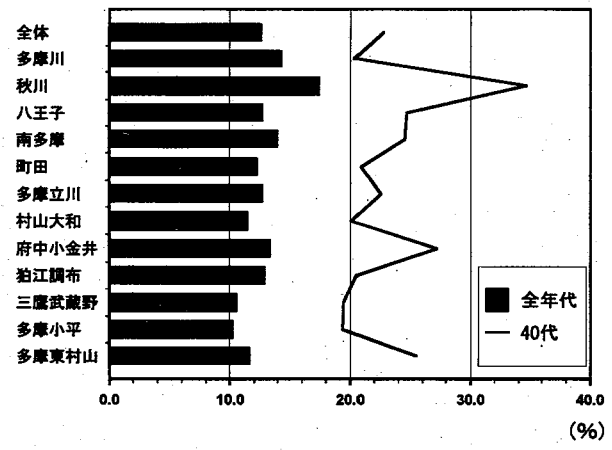


図2．貧血者割合の地域別比較

(22.7%)，50代（9.8%），60代（9.1%）であった．

次に，各保健所ごとの貧血の割合は，図2のように秋川保健所の17.5%から多摩小平保健所の10.3%の範囲内で大きな差は認めなかった．しかしながら貧血が最も多かった40代をみると，最高は秋川保健所の34.7%，最低は多摩小平保健所と三鷹武蔵野保健所の19.4%で保健所間の差を認めた．

2．平均赤血球恒数による貧血の分類

貧血と推定された1,397名をMCV及びMCHCをもとに分類すると，正球性正色素性貧血が854名（61.1%）と最も多く，次いで小球性低色素性貧血488名（34.9%）で，残り55名（4.0%）は大球性正色素性貧血であった．年代別にみると小球性低色素性貧血は，40代（9.9%）に最大となり50代（2.2%）60代（0.1%）と著しく減少した．一方，正球性正色素性貧血は年代ごとの差があまりみられなかった（図3）．

3. S-Fer測定結果及び鉄欠乏性貧血の予備群の検討

図4はS-Fer測定に供した71名のうち，Hb値12g/dl未

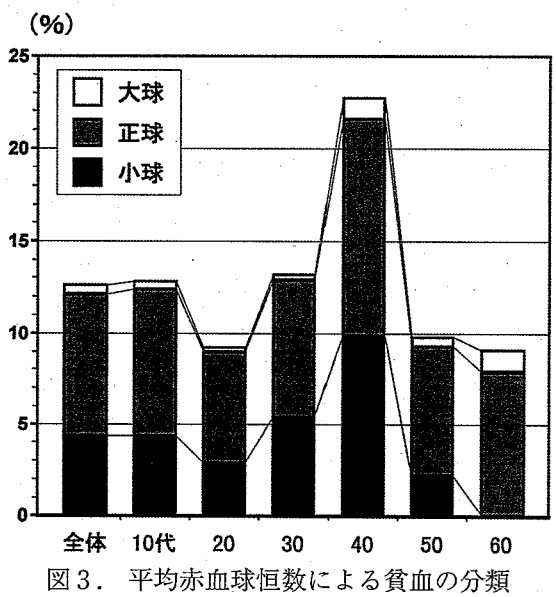


図3．平均赤血球恒数による貧血の分類

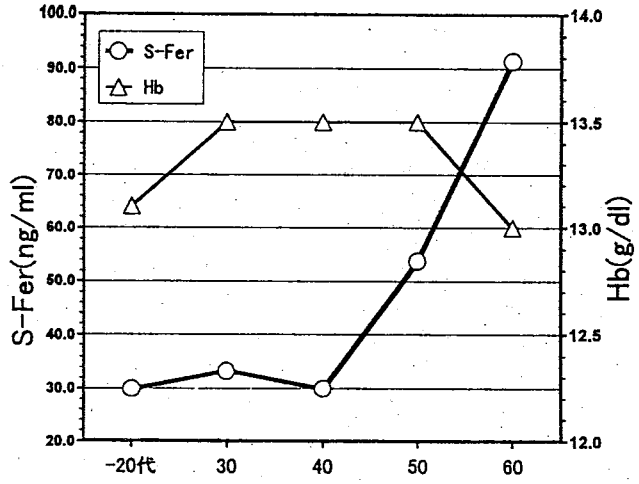


図４．平均Hb値と平均S-Fer値

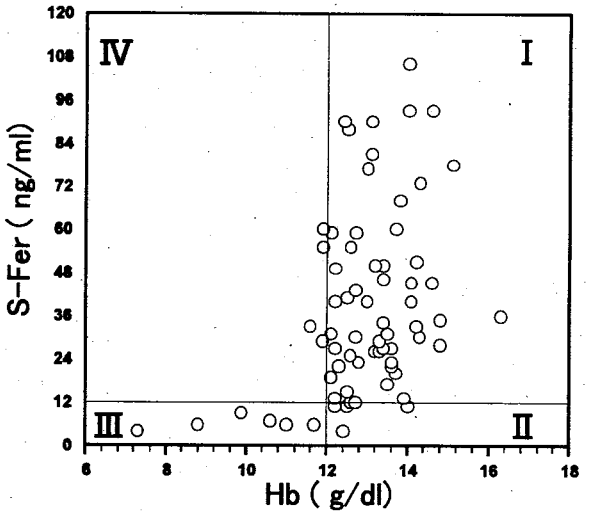


図５．S-Fer値とHb値の分布
Ⅰ：非貧血者，Ⅱ：予備群，Ⅲ：鉄欠乏性貧血
Ⅳ：その他の貧血

満を示した10名の貧血者を除外した61名についてS-Fer値とHb値を求め，その平均値を年代別にプロットしたものである．S-Fer値の平均値と標準偏差は43.7±28.5ng/ml，Hb値は13.3±0.9g/dlであった．年代別平均Hb値は20代13.1g/dl，30代13.5g/dl，40代13.5g/dl，50代13.5g/dl，60代13.0g/dlで，30代から50代が若干高かったが大差なかった．一方，S-Ferの平均値は，20代29.9ng/ml，30代33.3ng/ml，40代29.6ng/mlで差がなかったが，以後増加し50代53.7ng/ml，60代91.3ng/mlであった．

次に，被検者71名のS-Fer値とHb値の分布から，非貧血者（Ⅰ），予備群（Ⅱ），鉄欠乏性貧血者（Ⅲ）及びその他の貧血（Ⅳ）の各群の分類を試みた（図５）．非貧血者は55名（77.4%），予備群及び鉄欠乏性貧血は各６名（8.5%），分類基準に合わないその他の貧血が４名（5.6%）であった．なんらかの鉄欠乏のあることが推定された12名について，年代別内訳をみると鉄欠乏性貧血はその４名が30代から40代で，予備群の６名中５名は20代から30代であった．上記分類ごとにHb値，MCV，MCHC，S-Fer値，血清鉄値，TIBC値，及びTf飽和率のまとめたものが表１である．鉄欠乏の状況を各平均値でみてみると，非貧血者は血清鉄106.2μg/dl，Tf飽和率34.4%であったのに対し，予備群ではHb値12.7g/dlと基準値内であるがS-Fer値は9.8ng/mlと低値を示し，更に血清鉄70.3μg/dl，Tf飽和率19.4%でともに低値であった．しかしながら，予備群６名中３名が基準値以下のS-Fer値を示しTf飽和率も低下していたが，残り3人のTf飽和率は低下がみられなかった．

鉄欠乏性貧血６名及びその他の貧血４名について，MCV及びMCHCを用いて貧血を分類した結果，前者は全て小球性低色素性貧血であり，S-Fer値6.3ng/ml，血清鉄16.8μg/dl，Tf飽和率4.1%と低値であったが，TIBCが411.7μg/dlと高値であった．後者は正球性正色素性貧血3名と大球性正色素性貧血１名に分類され，その測定値はHb値が12g/dl未満であったが他項目は全て基準値内であった．

考　察

食事から吸収される鉄の量は１日に約１mgであり，生理的な赤血球の崩壊による鉄は再利用され，約１mgの鉄が体外に排出される．このバランスが保たれなくなったとき，鉄欠乏状態へ進行する．有経期の女性は１日に平均すると約２mgの鉄を喪失するため，体内貯蔵鉄

表１．各群の検査値（平均値±標準偏差）

検査項目	非貧血者 (55名)	予備群 (６名)	鉄欠乏性貧血 (６名)	その他の貧血 (４名)
Hb (g/dl)	13.4± 0.9	12.7± 0.6	9.9± 1.6	11.8± 0.2
MCV (fl)	91.0± 3.6	87.0± 2.5	72.0± 7.7	97.0± 9.3
MCHC (%)	34.1± 0.6	33.0± 1.0	31.0± 1.7	33.0± 0.8
S-Fer (ng/ml)	46.6±27.9	9.8± 2.9	6.3± 1.6	44.3±15.5
血清鉄 (μg/dl)	106.2±42.7	70.3±33.8	16.8± 6.6	85.8±35.6
TIBC (μg/dl)	312.4±45.2	372.3±30.1	411.7±21.4	281.0±20.2
Tf飽和率 (%)	34.4±13.6	19.4±10.5	4.1± 1.8	31.1±15.0

が減少しやすく鉄欠乏性貧血に移行しやすい．貧血の初期は正球性正色素性貧血であり，鉄の欠乏がさら進行すると小球性低色素性貧血へ移行する[3]．小球性低色素性貧血は，ほとんどが鉄欠乏性貧血であるといわれている．

今回，平成10年度東京都12保健所で実施した一般健康相談及び小規模企業・受託検診を受診した11,068名の女性を対象に，Hb値から貧血を判断した時全体の12.6%に相当する1,397名が貧血であると推定された．更に，これら貧血者をMCVとMCHCの平均赤血球恒数により分類を試みた結果，大部分が正球性正色素貧血（854名）と小球性低色素性貧血（488名）に相当することが確認された．更に興味のあることに，両者を年代別にみたとき正球性正色素貧血の割合は差が少ないが，小球性低色素性貧血は10代から30代では5%以下であるのに対し，40代では10%に増加，以後急激に減少していることが確認された．各年代における要因としては，10代は成長期における鉄の摂取不足やダイエットなどの栄養の偏りのための鉄吸収効率低下，30代40代においては婦人科系の疾患[4]などが考えられよう．また都民の鉄摂取量は女性の20代30代において約半数が不足ぎみであると国民栄養調査[5]において報告されている．

体内の総鉄量は3,000mgから4,000mgであり，2/3がヘモグロビンに含まれており，1/3が貯蔵鉄としてフェリチン及びヘモジデリンの状態で存在している．S-Ferの減少は貯蔵鉄の欠乏状態を最初に反映するものであり，鉄欠乏の進展はフェリチンの減少から始まり，進行すると血清鉄値も低下し貧血を伴わない予備群の時期が続き，次いでHb値の低下した貧血に移行すると考えられる．また，S-Ferの測定により内田らの報告[6]にあるように鉄欠乏の状態を，貯蔵鉄欠乏，潜在性鉄欠乏，鉄欠乏性貧血，及びその他の貧血に分類することが可能である．更にHb値とS-Fer値の対比によって，Hb値が基準値内のものの中に，S-Fer値の減少者，いわゆる貧血予備群の確認も可能であると考えた．そこで任意に選択した71名について，ラテックス免疫比濁法によりS-Ferの測定を試みた．Hb値が基準値内である61名の平均S-Fer値とHb値を年代別にみたとき，Hb値は30代から50代にかけて年代の差はみられなかったが，S-Fer値は20代から40代は60代の1/3と低値であることが確認された．これは有経期と閉経期の違いを示すもので，月経による鉄の喪失が大きくかかわっている背景が想像できる．

71名中55名はHb値及びS-Fer値とも基準値内の非貧血者（Ⅰ）であったが，残り16名は以下の３群に大別できた．すなわち，Hb基準値内でS-Fer低値群（Ⅱ）６名，Hb値及びS-Fer値とも低値群（Ⅲ）６名，Hb低値でS-Fer基準値内群（Ⅳ）４名であった．Ⅲ群の６名は平均赤血球恒数により小球性低色素貧血に分類され，更に血清鉄値，TIBC値，Tf飽和率から鉄欠乏性貧血と判断された．Ⅳ群のその他の貧血４名は，正球性正色素性貧血3名と大球性正色素性貧血１名に分類された．更にⅡ群は我々が考える予備群であり，それはS-Ferのみ低値の貯蔵鉄欠乏者及びTf飽和率も低値の潜在性鉄欠乏者各３名であることが確認された．予備群は20代から30代で多く，鉄欠乏性貧血は30代から40代に多く，年代のずれがあった．これは予備群の方が若年層に偏っており鉄欠乏性貧血になるまでに潜在期間があることが考えられる．鉄欠乏性貧血の予防対策として，S-Fer測定による予備群の確認，その後の指導が鉄欠乏性貧血者数の減少につながるであろう．

最後にS-Ferの測定について考察すると，S-Ferは非常に微量のために，RIA法が最初に開発された方法である．しかしながらRIA法は特定の施設や専用の機器が必要であり一般の検査室には不向きである．今回我々は一般の自動分析装置に導入できる検査方法としラテックス免疫比濁法を用いてみたが，上述したごとくその有効性が確認でき日常検査に導入できる可能性が示唆された．

まとめ

平成10年度多摩地区12保健所で実施した一般健康相談及び小規模企業・受託検診を受診した女性11.068名を対象に，その末梢血液検査成績から貧血の状況把握と一部の者については血清フェリチン（S-Fer）をラテックス免疫比濁法により測定し鉄欠乏状況の検討を試み以下の成績を得た．

１）．血色素値（Hb値）12g/dl未満を貧血としたとき，1,397名（12.6%）が貧血者と推定され，40代がピークであった．

２）．上記貧血者を平均赤血球恒数（MCVとMCHC）による分類を行った結果，正球性正色素性貧血854名(61.1%)，小球性低色素性貧血488名（34.9%），大球性正色素性貧血55名（4.0%）に分類された．正球性正色素性貧血は年代別差を認めなかったが，小球性低色素性貧血は40代に多く年代差を認めた．

３）．任意に選択した71名につきS-Fer値を測定しHb値を対比した時，非貧血者55名，予備群６名，鉄欠乏性貧血６名，その他の貧血４名を確認できた．S-Fer値とHb値の組み合わせによる予備群の確認は，その後の健康指導により鉄欠乏性貧血の減少につながると推察された．

文　献

1）田中信夫：臨床成人病，**28**, 384-389, 1998.
2）健診情報データベース研究会：健診データハンドブック，65-68, 1993，医学書院，東京.
3）内田立身：臨床成人病，**28**, 391-396, 1998.
4）内田立身：内科，**82**, 427-430, 1998.
5）東京都衛生局健康推進部：東京都民の栄養状況（平成７年国民栄養調査成績），77-78, 1997，東京都衛生局，東京.
6）内田立身：臨床血液，**33**, 1661-1664, 1992.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 337-344, 1999

日本における自殺の精密分析

池田一夫*, 伊藤弘一*

Precise Analysis of Suicide in Japan

KAZUO IKEDA* and KOICHI ITO*

Keywords： 人口動態統計 vital statistics, 自殺 suicide, SAGE SAGE, 世代マップ generation map, 死亡率比 mortality ratio, 年齢調整死亡率 age-adjusted death rates

研究目的

衛生行政の基本的な使命は生活環境の安全性の維持と向上を図ることにある．この使命を達成するに当たり，地域における生活環境の安全性と地域住民の健康損失の状況を定式的かつ継続的に観測するシステムの構築は非常に重要な意味を持つ．当研究所では，地域における疾病事象を把握し，衛生行政を支援するために疾病動向予測システム（以下SAGE[1)]と略す）を開発している[1-6]．

本論文では，日本における自殺の特性についてSAGEにより精密分析した結果を報告する．

研究方法

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．本研究では，この長期的・広域的データがそろっている人口動態統計を用い，自殺について精密分析することとした．

分析にはSAGEを用い，日本全国の自殺の年次推移（1899－1998），年齢調整死亡率（1950－1997），15歳階級死亡率[1)]（1950－1997），世代マップ[1)]（1950－1997：実数及び死亡率），死亡率比[1)]（Mortality Ratio：MR）マップ（東京／日本全国）を作成し，経年的かつ包括的に検討した．

結果及び考察

1．年次推移

日本における自殺の年次推移を図1に示した．20世紀の日本は，減少と増加を交互にくり返す自殺の波を過去3回経験している．最初は太平洋戦争突入直前の減少である．明治，大正，昭和初期と多少の増減をくり返しながらもほぼ単調に緩慢な増加を続けてきた自殺者の数が，1936年の男子9,766名，女子5,657名をピークに一転して減少傾向にはいる．戦争たけなわの1943年には，男子5,115名，女子3,669名とピーク時の約半分となった．人口動態統計が実施されなかった空白の3年間をはさんで，1947年から急速な増加が始まり，1958年には男子13,895，女子9,746名に達する．これが世に言う自殺の第一次ブームである．ブームが過ぎ減少の局面に入った自殺は，1967年の男子9,272名，女子5,474名を極小にまた増加に転じ，男子は1983年に16,876名のピークに達する．第二次ブームがこれである．第二次ブームでは女子の増加傾向はそれほど顕著ではない．第二次ブームが過ぎ再度減少局面に入り，1990年には男子12,316名とピーク時の75％程度にまで減少したが，それを底に増加傾向に転じ，1997年には男子15,901名，女子7,593名となり，1998年にはさらに急増し男子22,388名，女子9,396名となっている．男子の22,388名は，人口動態統計が開始された1899年以来最大の自殺数であり，女子の9,396名も1958年の9,746名に次ぎ歴代2位となっている．現在は自殺の第三次ブームに突入していると考えられる．

2．自殺と戦争

デュルケームは「戦争が自殺の増加に抑制作用をおよぼす」[7)]といったことで有名である．太平洋戦争の戦前，戦中における自殺の減少は，まさしく彼の説に一致する．さらに時代をさかのぼれば，日露戦争（1904－05）と第一次世界大戦（1914－18）の時も，小規模ながら自殺の減少が認められている．これらの点を考慮すれば，デュルケームの説は正しいといえよう．

* 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

3．自殺と景気動向

まず最初に好景気と自殺との関係を見てみる．1962年から1971年のちょうど10年間，男子の自殺数は1万人以下となり，第一次自殺ブーム最盛期の約2／3にまで減少した．この期間は，オリンピック景気（1963－64）といざなぎ景気（1965－70）というあいつぐ好景気に全国が沸き立っていた時期と一致する．さらに，1987年から1991年のバブル景気の時代も自殺数がピーク時の約3／4にまで減少している．

次に，不景気と自殺との関係を検討する．自殺の第一次ブームは1950年代後半で，これには1957年のなべ底不況が重なる．岩戸景気（1959－61）の到来とともにこのブームは終息し，所得倍増計画（1960）の発表に続く好況連鎖とともに自殺が減少した．1973年には，日本列島改造計画を発表し当時全盛を誇った田中内閣がオイルショックをきっかけにして倒れ，それから10年を越える不景気が続いた．第二次自殺ブームはこの景気低迷の後半期に発生している．そして，バブル景気（1986－91）の時代，自殺は減少し，バブル崩壊不況（1991－93）から現在まで，漸次自殺数が増加している．

自殺の状況を詳細に観測するために，男子10万人当たりの自殺の15歳階級死亡率を図2に示す．第一次ブーム，第二次ブームいずれにおいても15歳以上のすべての年齢域で死亡率の増加が見られる．さらに，第一次ブームでは15－29歳で，第二次自殺ブームでは45－59歳で死亡率の顕著な増加が観測される．男子では1994年以降，45－59歳と60－74歳で死亡率が増加し，30－44歳でも漸増している．女子ではこの時期，死亡率のこのような大きな変動は見られない．さらに，1998年の50歳代男子の死亡数は5,967名と1997年から一気に54％も増加した．40歳代男子では4,033名，60歳代男子では4,018名とそれぞれ前年比で33％，49％増加している．

これらの事実をみる限り，自殺の増減は景気の動向と密接に関連しているといえよう．

4．自殺の世代マップ

図3に日本男子の自殺の世代マップを3年3世代単位で示す．

歴史的にみて，日本における自殺は青年期型であった．単一の年度でみると，総数の4割から5割強が20歳代に集中し，3割前後が壮年期から初老期，すなわち50－60歳代に広く分布していた．第二次世界大戦前はずっとこのパターンが続き，戦後の第一次自殺ブームでそれが頂点に達する．それ以後，状況が大きく変化する．特に男子に限っていえば，青年期のピークはしだいに高齢側に裾野を広げていき，1974－76年になると40歳代後半に第二のピークが形成される．このピークは成長がはやく，1980－82年には同じ年における青年期のそれをしのぐまでになる．このピークは年齢依存型ではなく世代依存型である．つまり，1930年代前半生まれの世代で構成されているところに大きな特徴をもつ．

二度に及んだ男子の自殺ブームの極大における年内年齢分布のピークは，第一次が21－23歳，第二次が51－53歳を中心としている．30年の歳月を隔てたこのふたつのピークは世代位置（出生年）の中心が1932－34年であることから，同じ昭和戦前世代の寄与で形成されていることがわかる．すなわち，この世代の男子は青年期と壮年期の2度，自殺の多発を経験したことになる．これは，死亡率で観測しても同様の結果を得る（図4）．

死亡率の世代マップで特徴的なのが，1995年から97年の部分である．この時期，1923－70年生まれのすべての世代で，自殺の死亡率が直前世代の同年齢におけるそれよりも高いという特徴が見られる．特に1935－46年世代でそれが顕著である．リストラの対象者がこの年齢域に多かったことや景気動向を勘案すると，雇用不安が自殺の増加に寄与したであろうことが推察される．この現象は，1953－58年の第一次自殺ブームの時にも観測され，時代特性を表わすものと考えられる．

5．自殺における東京都の特性

東京都における自殺の特性を死亡率比で検討する．日本全国の3年3世代の死亡率を基準に東京都のそれを比較したのが図5である．男子では，1950年代後半までは死亡率比1.1以上のセルが点在する．しかし1960－70年代には，1.1を越えることは希となり，ほとんどのセルが0.9以下で，0.7以下のセルも散見できるようになった．1980年代にはいると，10歳代の低年齢層で1.1を越えるセルが発生すると同時に，70歳以上の高齢層で0.8以下のセルが優勢となった．ところが，1995－97年と1992－94年の情報を同一年齢で比較すると，ほとんどのセルで1995－97年の値が1992－94年のそれを上回り，特に50－60歳代ではすべてのセルでその傾向が観測される．

女子の死亡率比の世代マップを図6に示す．女子で特徴的なのが，60歳以上の高齢域で顕著に死亡率比が低いのに対し，青年期から中年前期にかけて，死亡率比の高い区域が終始存在することである．特に，1980年代以降，死亡率比1.1を越えるセルが青年期で増加し，1995－97年では20－50歳代のすべてのセルが1.1を越える状況になっている．青年期で死亡率比が高く，高齢域で死亡率比が低いという現象は，東京以外にも，大都市を抱える

大阪府と福岡県，さらに沖縄県でも観測される．この点から，都市部における青年期女子の高い死亡率比については，社会心理学的な考察の対象とすべき現象と考えられる．

6．自殺の動機と行政施策

自殺者数の極小を示す1967年と1990年において，自殺した男子の数は，直前の自殺ブームの約65%～75%程度となっている．自殺者の景気依存性は確かに観測されるが，その寄与は多く見積もっても約30%であり，1990年の男子死亡数12,316名から推測すると1998年頃のピークにおいても，16,000名程度と予測される．しかし，1998年の男子の自殺は22,388名とそれをはるかに超え，この自殺数の増加を景気変動だけで説明するのは困難である．

世代マップ（図3）を詳細に検討すると，50－70歳の年齢域において自殺のピークが観測される．このピークは戦前から現在まで一貫して存在し，年齢依存性を持つと考えられる．1947－49年生まれの団塊の世代がちょうど今，この年齢域に足を踏み入れつつある．この世代の人口は他の世代を圧倒する．自殺による死亡率が今までと同じであれば，必然的に自殺の実数は大幅に増加する．これが，自殺数増加の大きな原因の一つとなっていると考えられる．景気対策を実施すれば，自殺数を20～30%程度削減することができよう．しかし，それだけでは団塊の世代が自殺好発年齢域を通過し終わるまで，大幅に自殺者を減少させることは困難であろう．

自殺の動機を考えてみると，一般的に恋愛問題は20歳代，家庭の不和や経済問題は40歳代に多いが，なんと言っても筆頭原因は病気である．40歳代で総数の1／3，50歳代で1／2を占め，60歳以上では過半数が病気を動機としている[8]．20－30歳代の自殺でも，病気は恋愛問題や精神性疾患とならぶ重要な動機である．この傾向は，自殺ブームの時期でも基本的には変化しないと考えられる．不況と自殺の関係も，病気を媒介項とする間接的なものと考えることもできよう．つまり病気を減少させれば，不況になっても自殺はたいして増えない状況を創り出すこともできよう．社会基盤の強化が進めば，不況だろうが病気だろうが，自殺などしないで踏みこたえるだけの強さやゆとりが社会の中に生まれる可能性もある．

衛生行政の本来的な使命は生活環境の安全性の維持と向上にあると考えられる．自殺を大幅に減少させるためには，社会基盤の強化に努め0次予防[6]を図ることが極めて重要であると考える．

参考文献

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）池田一夫，上村尚：日本における死亡特性の分析，東京衛研年報，**49**, 321-328, 1998.
5）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，肝膵胆，**29**, 197-214, 1994.
6）倉科周介：病気のなくなる日－レベル0の予感－，1998, 青土社，東京.
7）デュルケーム：自殺論（1897），1985, 中央公論社，東京.
8）厚生省大臣官房統計情報部：自殺死亡統計，1999, 厚生統計協会，東京.

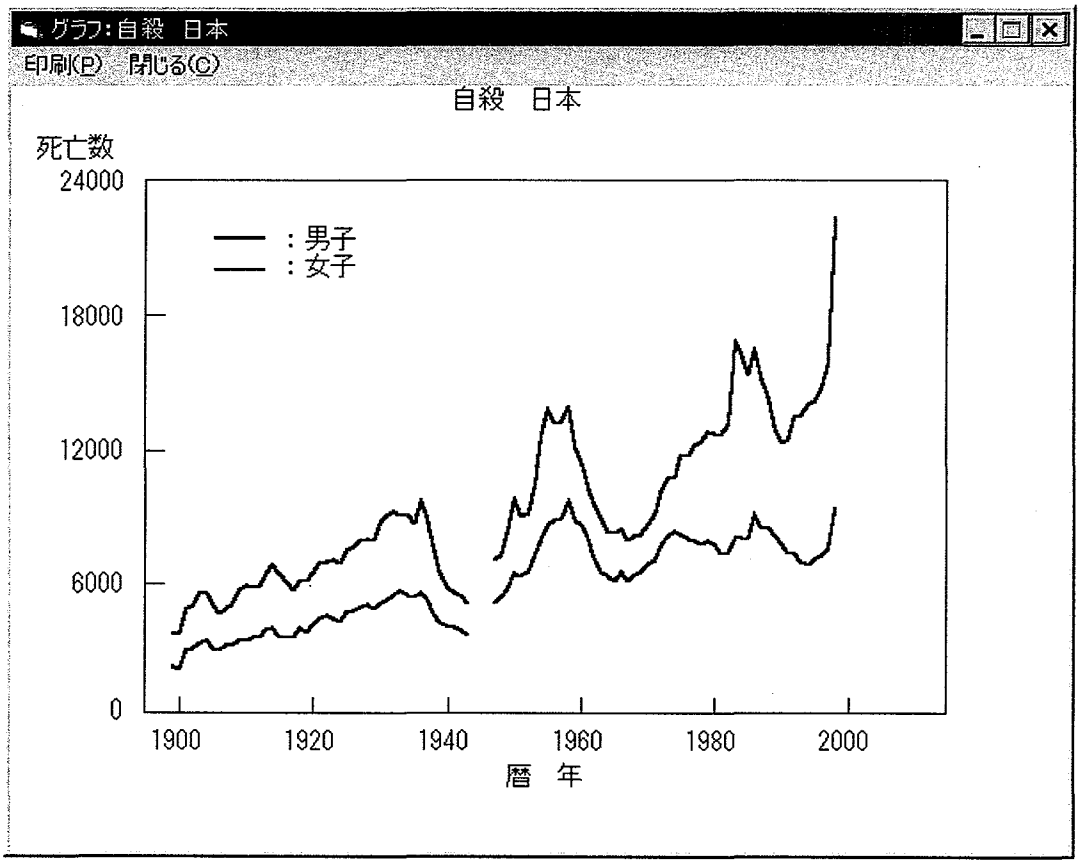


図１．自殺の年次推移（1899－1997）

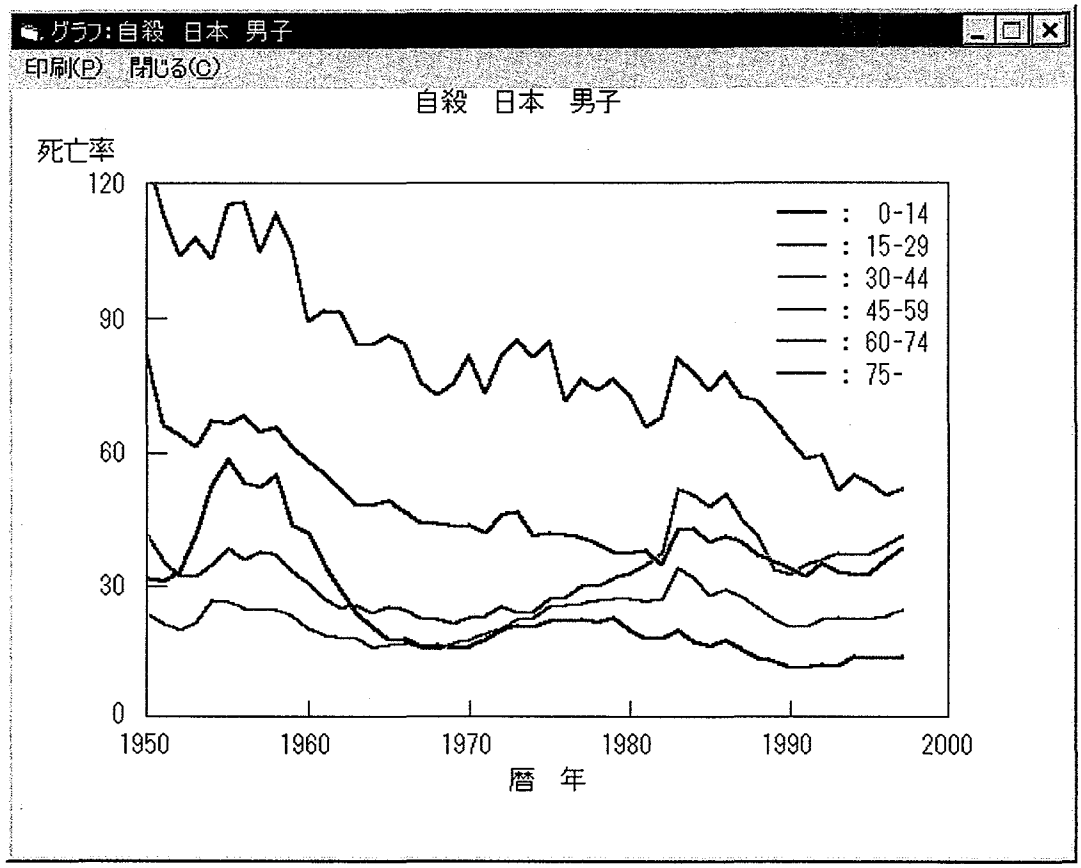


図２．自殺の15歳階級死亡率（対10万）の年次推移（1950－1997）（日本男子）

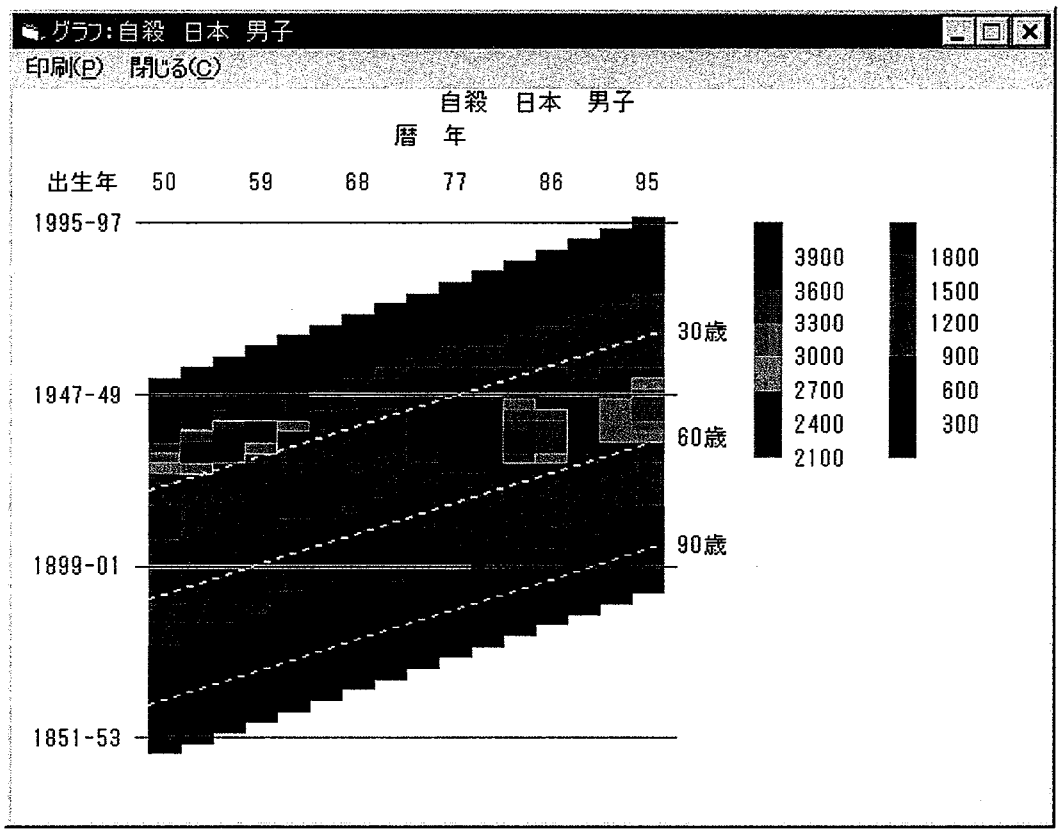


図３．自殺の世代マップ（実数，日本男子）

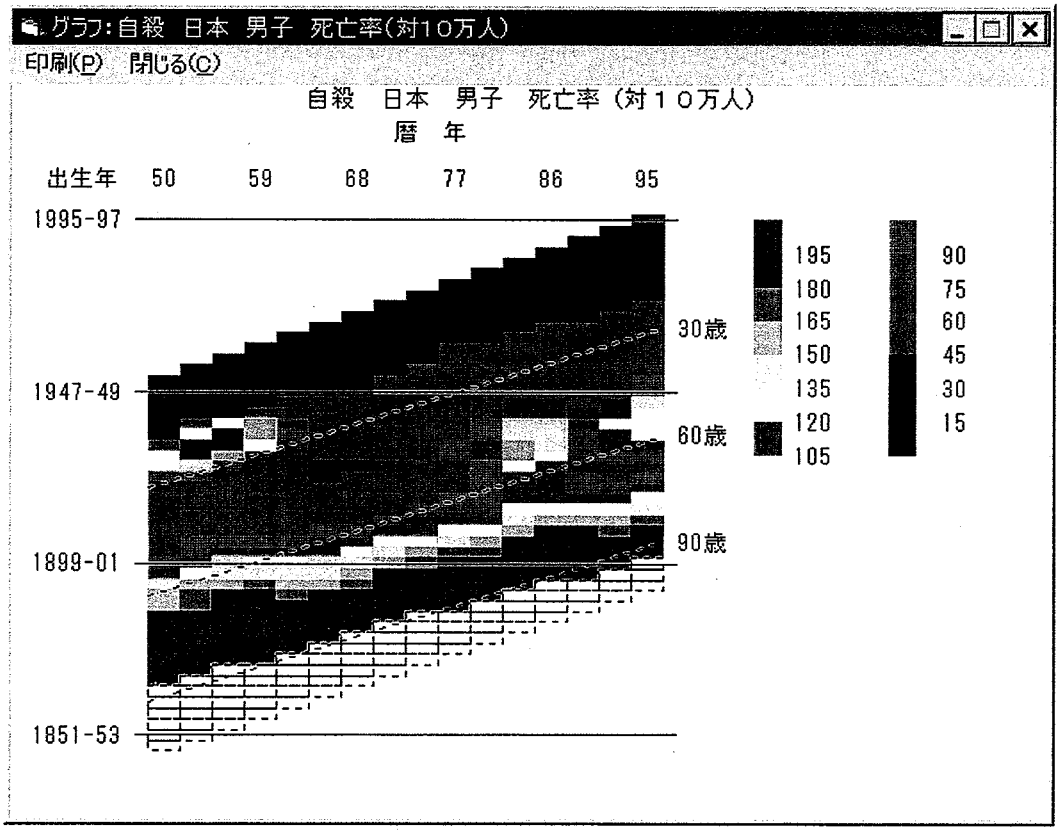


図４．自殺の死亡率の世代マップ（対10万，日本男子）

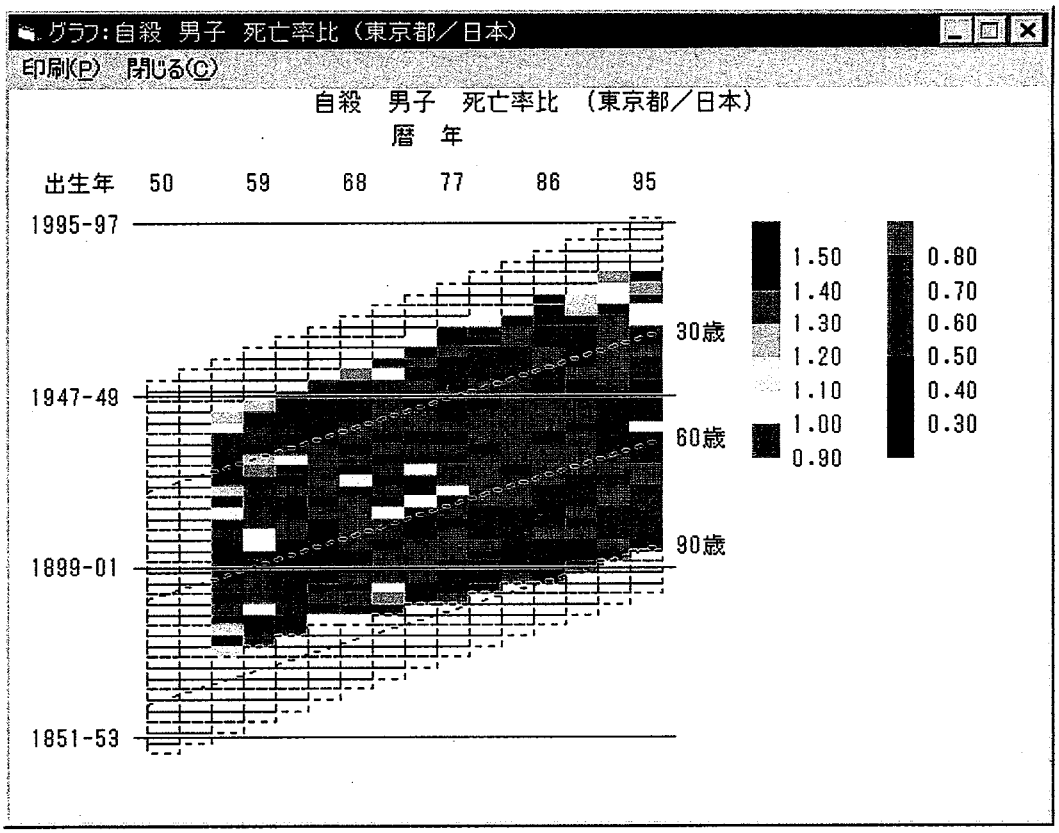


図５．自殺の死亡率比の世代マップ（東京／全国，日本男子）

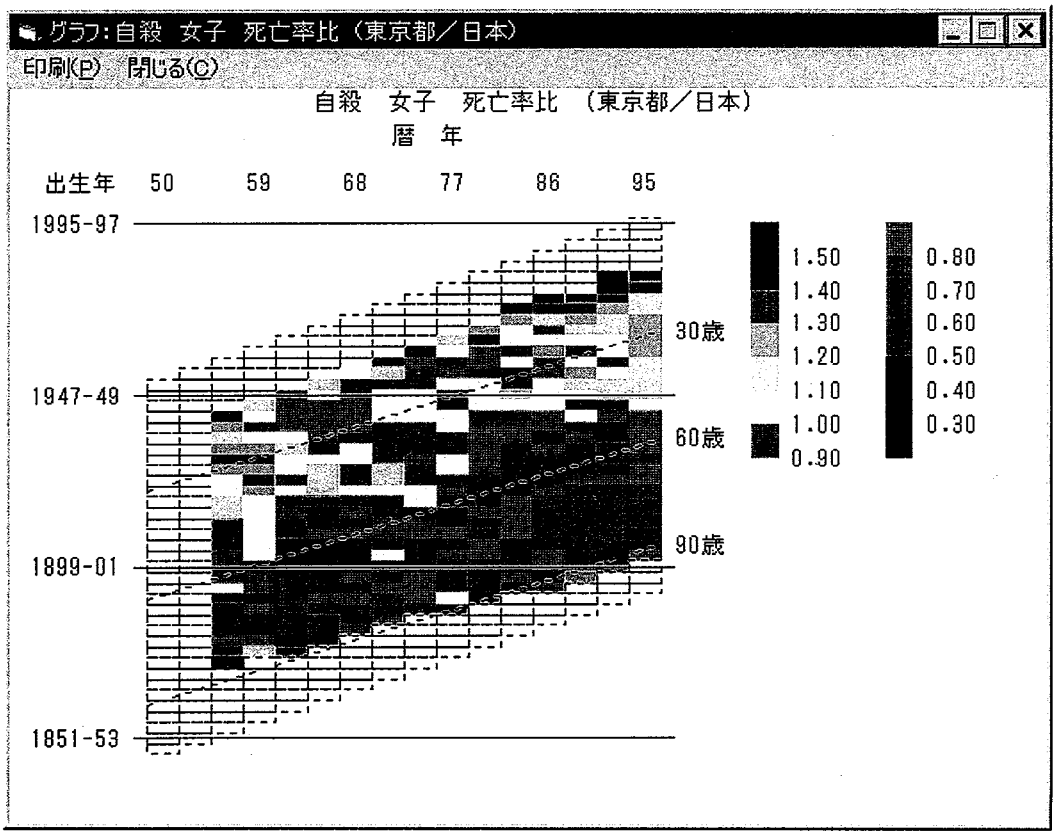


図６．自殺の死亡率比の世代マップ（東京／全国，日本女子）

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 345-349, 1999

都保健所のインターネットによるネットワーク化

池田一夫*, 神谷信行*, 伊藤弘一*

Studies on Proper Network System of Public Health Centers in Tokyo via Internet

KAZUO IKEDA*, NOBUYUKI KAMIYA* and KOICHI ITO*

Keywords：インターネット Internet，危機管理 risk management，保健所 public health center，ダイアルアップ daialup

研究目的

近年，行政が緊急に対応しなければならないような大規模な健康被害や事件が起きている．厚生省ではこれらの諸問題に対処するため，健康危機管理調整会議の設置をはじめとする各種の対応を実施している．一方，地方自治体では，自治体内外の情報交換を電話やFAXなどで実施しているのが現状である．電話やFAXで既知の健康被害に対処することは可能であろう．しかし，未知の健康危機に対応するには不十分である．未知の問題に遭遇することを考慮すると，監視網を広く厚くし，その観測結果を関係諸機関と迅速に交換できるものでなければならない．

地域の健康はまず第一に地域で守ることが必要である．地域の健康被害防止の拠点が保健所であり，衛生研究所である．これらの拠点を活用していくことが健康危機管理においては重要である．東京都では地域保健推進特別事業費により，東京都立衛生研究所をインターネットに接続した．この資源を利用した保健所ネットワークが地域における健康危機管理の基盤となると著者は考える．

本研究では，都道府県における健康危機管理のための，地方衛生研究所を介した情報ネットワークのモデルを示し，実際にそれを構築し，運用に当たっての問題点などを検討した．

研究方法

健康危機管理情報の交換を地域で迅速に行うためには，その基盤となる情報システムが必要である．そこで，まず最初に公衆衛生関連部局のインターネット接続を実施する．対象となる組織は，東京都衛生局総務部地域保健課並びに東京都所管保健所12か所である．

インターネットを介した健康危機管理情報交換システムとして，公衆衛生関連部局所属職員を対象とした健康危機管理メーリングリストを検討する．

結　果

1．実施経過

本研究を実施するにあたり，保健所の協力が不可欠であった．平成10年３月31日付けで，衛生研究所所長名で衛生局総務部地域保健課長あてに研究協力の依頼を行い，地域保健課の全面的な協力の下で本研究を実施した．研究の実施経過は，表１のとおりである．

2．地域保健課及び保健所のインターネット接続

地域保健課と保健所にはパソコンがすでに配置されていたため，衛生研究所を介したダイアルアップ接続でインターネットに接続することにした（図１）．接続に必要となるモデムは，衛生研究所が用意した．

地域保健課と保健所をインターネット接続するのに必要な技術知識の習得のため，平成10年７月31日に開催された「インターネット検討会（第３回）」で，インターネット接続説明会を実施した．この際，地域保健課，保健所，衛生研究所より構成されるメーリングリストの作成も合意された．

８月１日より地域保健課及び各保健所が順次インターネットに接続され，８月31日までには，すべての保健所及び地域保健課がインターネットに接続された．

3．利用時間及び回数

地域保健課は，保健所１か所あたり月５千円の通信経費（毎日１時間利用して20日分）を用意し，本研究に協力した．保健所別月別の利用時間のグラフを図２に示す．

* 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

表1．保健所ネットワーク化　実施経過

3月31日	衛生研究所長名で地域保健課長へ厚生科学研究事業への協力依頼
5月6日	地域保健課 保健所長会で厚生科学研究事業について各保健所に協力依頼
5月21日	地域保健課 保健保健推進室長会で厚生科学研究事業について各保健所に協力依頼
6月24日	地域保健課 「インターネット検討会（第1回）」開催 出席者　各保健所1～2名，地域保健課，保健情報課，衛生研究所　計22名 1　これまでの経緯 2　東京都におけるインターネット導入状況 3　衛生研究所におけるインターネット運用状況 4　インターネット接続に係る事項検討 5　その他
7月4日	地域保健課 「インターネット検討会（第2回）」開催 出席者　各保健所1～2名，地域保健課，保健情報課，衛生研究所 1　インターネット利用上の注意 2　インターネット接続に係る検討事項 ーインターネットを利用した情報提供 3　講習会について 4　その他
7月31日	地域保健課「インターネット検討会（第3回）」開催 出席者　各保健所1～2名，地域保健課，保健情報課，衛生研究所 1　インターネット利用上の注意 2　講習会（接続，設定，操作方法等） ダイアルアップ接続，ブラウザ，Eメール 3　職員向けの講習会の実施について 4　運用開始後のインターネット連絡会の実施について 5　その他
8月1日	地域保健課 各保健所の「インターネット接続依頼書」取りまとめ衛生研究所にインターネット接続依頼
8月中	各保健所インターネット接続作業実施，利用開始
8月24日 25日 27日	各保健所職員対象インターネット講習会 出席者各回約20名 内容　ブラウザを利用した情報検索法について
11月27日	地域保健課 「インターネット連絡会（第3回）」開催 出席者　各保健所1～2名，地域保健課，保健情報課（欠席），衛生研究所 インターネット利用状況調査の報告

月1,341分が最大で，最小は月13分であり，保健所により，利用時間に大きな差が認められた．

利用時間の多くはホームページの検索に使われたが，回数で見ると，電子メールによる利用が圧倒的に多かった．

ホームページの中で多くアクセスされたのが，厚生省，都立衛生研究所，東京都など地域保健に関わるページであった．

4．インターネット利用状況アンケート結果

インターネットの運用を開始して約3か月経過した11月中旬に保健所に対してアンケートを実施した．インターネットの利用状況等のアンケート結果の抜粋は次のとおりである．

(1) 電子メールについて

a. 保健所内の運用体制について

①担当（主に地域保健推進室計画調整係）が受信確認（1～数回／日）

②保健所代表アドレスのみ担当が確認（係や個人のアドレスは各自が随時確認）

③代表アドレスのみ使用

b. 活用例

①事業概要の様式（Excel）の配布等

②外部機関への問い合わせ

③各種事務連絡

④係長会などの会議の意見集約

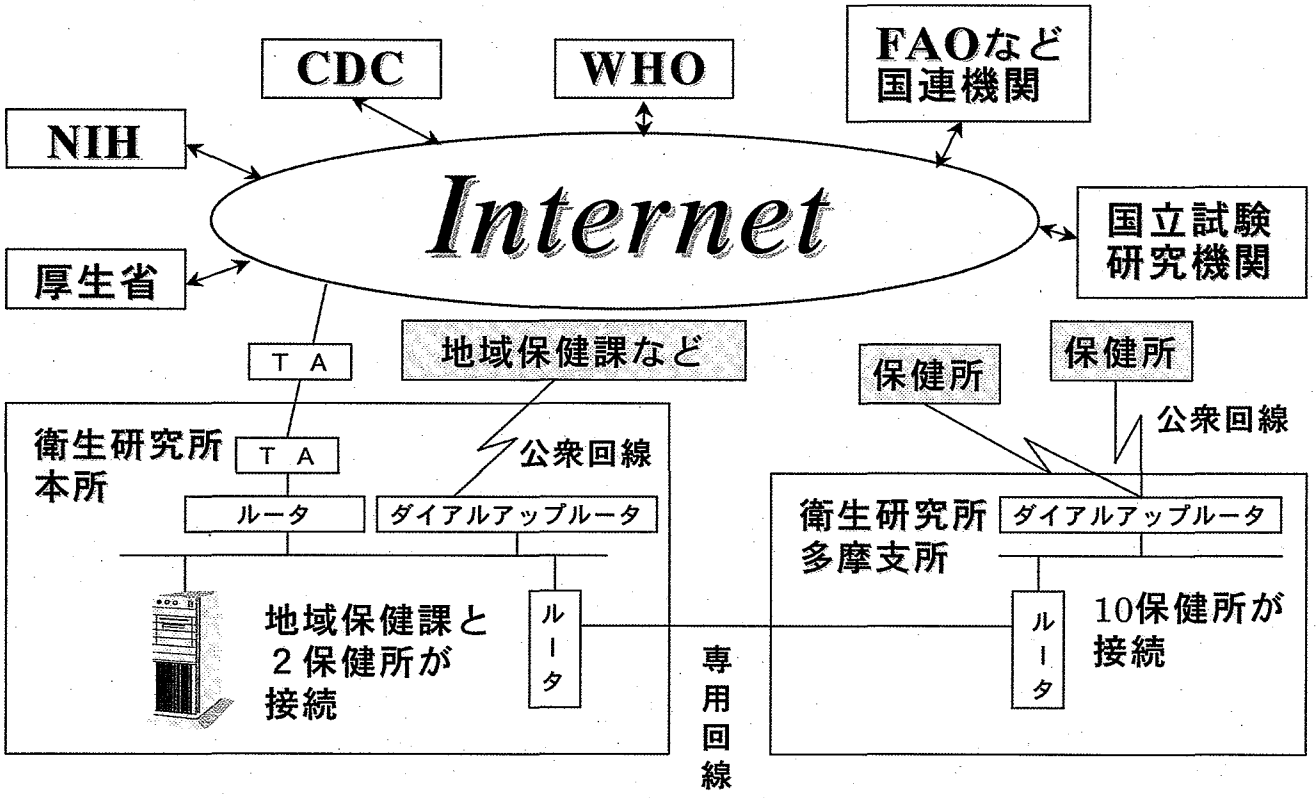


図１．保健所のダイアルアップ接続

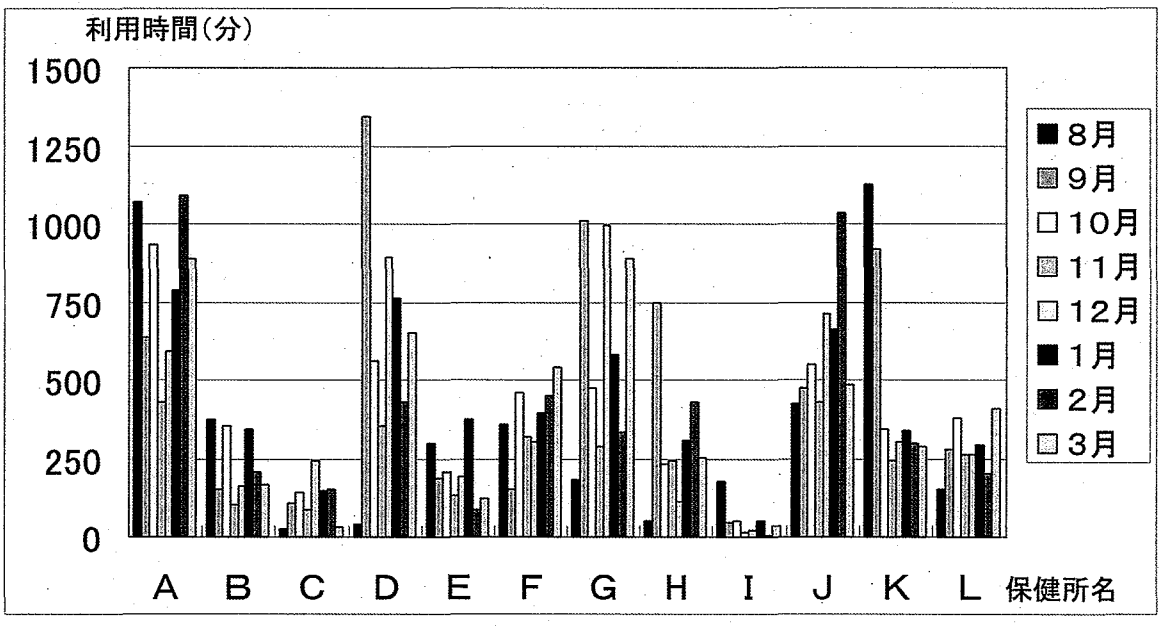


図２．保健所別月別利用状況

c. 問題点

①保健所，個人間のインターネット利用頻度の格差

②電話による受信確認

③急ぎの用件や重要な用件には使用できない

④課・係にパソコンの得意な職員がいる場合はよく利用しているが，ほとんど利用していない部署もある

d. 要望，意見等

①局からの情報伝達手段として，メールが十分に機能していない

②ファイルのやり取りには非常に有効であるので，局でも保健所への依頼等にメールを活用してほしい

③地域保健課だけでなく，保健所と関連する局内の各部署がメールアドレスを持ち，連絡手段としてメールを活用すれば，保健所でのメールの活用も増えるのではないか

(2) ホームページの閲覧について

a. 保健所内の運用体制（情報の収集，供覧の方法等）

①公衆衛生関連のホームページは担当(主に計画調整係)でチェック（1～数回／週）し，適宜所内供覧している

②所内におけるインターネット利用の普及を図るため，「所内インターネット情報」を不定期で発行している

③各自必要に応じて利用し，内容によって適宜回覧している

④今後，所内講習会を実施予定

⑤衛研，東京都，厚生省，新聞社等を中心に情報収集を行っている

b. 活用例（関連情報の収集等）

①衛研，東京都，厚生省，地元の自治体（市町村）等の行政機関の情報収集

②食品獣医衛生係において食中毒関係の情報収集

③保健衛生関係の書籍，専門語句の検索

④相談者への情報提供のための資料収集

⑤環境ホルモン等のテーマ検索

⑥外国人への対応（保健衛生に関する英語版説明の情報収集）

⑦エイズ関連最新情報

⑧HACCPに関する情報検索

c. 問題点

①担当者が不在時や多忙な場合があるので，定期的なホームページのチェック体制がとれない

②環境衛生関係では，民間企業等の情報を検索したが，意外に有効な情報が得られなかった

③どういう情報が，どこに入っているのかが分からない

④利用できるパソコンの不足

e. 要望，意見等

①本庁各部署から保健所への連絡事項を一覧できるページがあるとよい

②利用できるパソコン等の増設等，インターネット環境の拡充

考　　察

1．利用頻度の大きな差について

保健所別月別の利用時間は，最大1,341分，最小13分と大きな差が認められた．アンケートからこの原因として次のようなことが推察される．

①インターネット接続する必然性が無い

研究の一環としてインターネット接続したので，局の業務情報がメールで送られてくることはない．そのため，必然性が感じられない．

FAXで送られてくる情報で十分と考えている．

②インターネットの利用法が難しい

パソコンが得意な職員しか使えない．

手順が面倒．

電子メールに慣れていない．

必要な情報がどこにあるのか分からない．

検索サイトの使用法の習熟が必要．

③ハードウエアの整備不十分である

原則として保健所で1台のパソコンだけをインターネットに接続したため，パソコンの台数が不足していると感じている所もある．

2．インターネット利用促進方策について

保健所において危機管理などを実施していくには予めインターネットに接続し，必要なとき自由に利用できる環境を整備していくことが必要である．単にインターネット環境を整備しても，職員がそれを自由に利用できなければ，価値が半減する．保健所でのインターネット利用を促進するための方策を以下に示す．

(1) 業務への活用

現在，電話や文書で多くの業務情報が局から保健所へと伝達されている．多くの職員はこれで十分と考えている．しかし，電子メールで文書を添付ファイルとして送ると非常に便利であることは明らかである．業務のより効率的な運用も可能である．アンケート結果でも，

①ファイルのやり取りには非常に有効であるので，局でも保健所への依頼等にメールを活用してほしい．

②地域保健課だけでなく，保健所と関連する局内の各部署がメールアドレスを持ち，連絡手段としてメールを活用すれば，保健所でのメールの活用も増えるのではないか．

③地域保健課の個人情報開示，保健所事業実績等の定例報告等をメールで送付したい．

との提案がなされている．

現在，総務部地域保健課や生活環境部食品環境指導センターで業務情報などを電子メールでも収受する方向で検討が進められている．保健所の地域保健推進室間でもExcelファイルで業務情報の交換を行っている．電子メールを業務に活用することにより，保健所職員のインターネット利用技術の向上が期待される．

(2) 研修

ワープロ技術の習得に比すれば，電子メールやWWWサーバ情報検索の習得ははるかに容易である．多くの職員が研修によりワープロ技術を習得している点から，研修を活用すればインターネット技術を容易に習得することができる．さらに，アンケート結果にあるように，

①所内におけるインターネット利用の普及を図るため，「所内インターネット情報」を不定期で発行する．
②所内講習会を実施予定．
③インターネットの定着を図るため，業務に関するホームページを紹介した「インターネット通信」を暫定的に月１～２回程度発行する．
などの措置も有効である．

(3) ハードとソフトの整備

アンケート結果でも明らかなように，
①設備が不十分なため，利用したい時にすぐに利用できる状態にない．手近に利用できる状態にない．利用できるパソコンの不足．
②所で１台接続のため，他の目的（印刷等）での使用との兼ね合いで使えない場合がある．
③プリンタがモノクロなので，回覧する際，所内へのインパクトが弱い．

など，ハードウエアの整備が不十分との意見が多い．しかし，保健所によってはインターネット接続の必要性が感じられないとの意見もある．ハードウエアの整備については，今後十分に検討していく必要があると考える．

アンケート結果の中に，「Excel97やオアシスで作成された添付ファイルは展開できない」との意見がみられた．これは，局で整備したパソコンのソフトが納入された時期のままでバージョンアップされていないからである．バージョンアップには多大な経費が必要となる．バーションアップ対応が難しいときは，送付者への旧形式ファイルの送付依頼が必要である．

都道府県における財政危機を反映して，「財政危機，経費節減が叫ばれる中で，積極的にホームページを開き試行錯誤で情報収集することをすすめにくい．」，「使用頻度が高くなっていった場合の経費について不安がある．」という意見がある一方「データをダウンロードする場合の回線容量不足」も指摘されている．本研究では，衛生研究所を介したダイアルアップによりインターネット接続を実施したが，地域の実情に応じて，ケーブルテレビ接続や専用線接続なども視野に入れる必要もあると考える．しかし，専用線による接続はその維持管理に多大な経費を要する．保健所の専用線接続については，十分費用対効果を考慮した上で慎重に対処することが必要である．

結　論

地域の健康はまず地域で守ることが必要である．地域の健康被害防止の最前線が保健所であり，それをバックアップするのが衛生研究所の役目である．これらの拠点を活用していくことが健康危機管理においては重要である．本研究では，地域における健康危機管理の一手段として，東京都の12保健所を衛生研究所を介したダイアルアップによりインターネットに接続した．１保健所あたり最大10個の電子メールアドレスを組織や個人に配布し，メーリングリストを利用した情報交換についても検討した．利用時間の多くはホームページの検索に使われたが，回数で見ると，電子メールによる利用が圧倒的に多かった．

保健所を専用線接続で直接インターネットに接続することも可能ではあるが，多大の初期投資並びに運営経費を要する．まず最初に，ダイアルアップで接続し，地域の実情に応じ専用線接続化の是非を考えることが必要である．

謝　辞　本研究をすすめるにあたり，東京都12保健所地域保健推進室の皆様をはじめとする多くの保健所の方々のご協力をいただきました．特に，総務部地域保健課の田中敦子氏と樽見憲介氏には多大なご助力を賜りました．ここに感謝の意を表します．

参考文献

1）鈴木重任：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　総括・分担研究報告書（厚生科学特別研究事業），平成10年３月，1998.
2）中村清純：保健所のネットワーク化について，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率的運用に関する研究　総括・分担研究報告書（厚生科学特別研究事業），平成10年３月，11-15, 1998.
3）池田一夫，神谷信行，上村尚，他：地域における健康危機管理システム，東京衛研年報，**48**, 329-333, 1998.

東京衛研年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.*, **50**, 350-354, 1999

平成10年度東京都食品衛生検査施設GLP内部点検調査報告

荻野周三[*1], 蓑輪佳子[*1], 大石向江[*1], 伊瀬郁[*2],
川合由華[*1], 神保勝彦[*1], 田村行弘[*1], 奥澤康司[*3]

Report of Internal Audits for GLP in 1998

SHUZO OGINO[*1], KEIKO MINOWA[*1], HISAE OISHI[*1], IKU ISE[*2],
YUKA KAWAI[*1], KATSUHIKO JIMBO[*1], YUKIHIRO TAMURA[*1], KOJI OKUZAWA[*3]

Keywords：GLP, Good Laboratory Practice, 内部点検 Internal Audit, 信頼性確保部門 Quality Assurance Unit

1．はじめに

近年，食品の安全性に関わる問題が複雑かつ多様化し，食品検査には一層高度な検査技術が要求されるようになった．さらに，食品の貿易の拡大により，国際的な基準に基づいた検査精度及び信頼性の確保が強く求められている．

このような状況のもと，食品衛生法が改正され[1]，平成９年４月より都道府県，政令指定都市及び特別区が設置する食品衛生検査施設に対して検査等の業務管理（以下，GLPと略す）が義務づけられた[2]．東京都では法律の施行に先立ち，平成８年４月より衛生研究所をはじめとした，各検査施設において，検査等の業務管理要領の策定と標準作業書等の業務管理に必要な文書の整備に着手した．平成９年３月，「東京都の食品衛生検査施設等における検査等の業務管理要綱[3]」が決定し，法律の施行に合わせて同年４月，衛生研究所及び衛生局生活環境部にそれぞれ信頼性確保部門責任者が設置され，前者は衛生研究所を，後者はその他の食品衛生検査施設のGLP業務を分掌することとなった．さらに,平成10年４月には衛生研究所内に新たに検査部門から独立した精度管理室が設置され，信頼性確保部門責任者に室長が，また「信頼性確保部門責任者が指定する職員」として副室長以下６名の室員及び衛生局生活環境部環境衛生技術担当副参事が任命された．この精度管理室は衛生研究所を含む，すべての都の食品衛生検査施設を対象としたGLP信頼性確保部門業務を行うこととなった．

本報では精度管理室が実施した平成10年度GLP業務の中から，特に内部点検の実施結果に基づき，東京都におけるGLPの現況と今後の課題について報告する．

2．対象施設

内部点検の対象施設を表1に示した．検査若しくは試験（以下，検査等という）実施施設として衛生研究所20，試験品採取（試験品収去）及び検査等実施施設として市場衛生検査所５，食肉衛生検査所２，試験品採取実施施設として食品環境指導センター２，東京都保健所12，試験品受付け実施施設として衛生研究所２の合計43施設を対象とした．

3．点検方法

内部点検は平成９年１月16日付，厚生省生活衛生局食品保健課長通知「食品衛生検査施設における検査等の業務管理要領[2]」が定める管理基準及び都における内部点検実施要領[4]に従い，さらに各検査施設が別途定めた標準作業書等に基づいて,平成10年７月29日から平成11年２月19日の間に実施した．

点検結果は記録簿に記録し保管した．また，平成10年度は全施設に対して改善措置を要請し，改善措置の報告を受けた後，講じられた改善措置の確認を行って，その記録を保管した．

4．点検項目

平成10年度の主な点検項目を表２に示した．

＊1 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
＊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微生物部細菌第二研究科
＊3 東京都衛生局生活環境部 163-8001 東京都新宿区西新宿２－８－１

表1．内部点検の対象施設及び実施日

施設名	点検実施日
衛生研究所	
庶務課　業務係	H10.10. 2
細菌第一研究科	
食品細菌研究室	H10.11.16
微量分析研究科	
有害物化学研究室	H10. 8.10
乳肉衛生研究科	
乳(理化学)研究室	H11. 1. 8
乳(細菌)研究室	H10.12.18
食肉魚介細菌研究室	H10.12.18
食肉魚介化学研究室	H10.12. 4
食品研究科	
食品化学第一研究室	H10. 9. 2
食品化学第二研究室	H11. 2. 1
食品化学第三研究室	H11. 2.19
食品化学第四研究室	H11. 1.14
中毒化学研究室	H10.10.12
農薬分析研究室	H11. 1.12
食品添加物研究科	
添加物第一研究室	H10. 7.29
添加物第二研究室	H10.10.29
容器包装研究室	H11. 2. 5
栄養研究科	
食品分析研究室	H10.11.30
栄養研究室	H10.11.24
多摩支所	
事業担当係	H11. 1.22
理化学研究科	
衛生化学研究室	H10. 9. 9
食品化学研究室	H10. 9.17
微生物研究科	
衛生細菌研究室	H11. 1.22
食品環境指導センター	H11. 1.14
多摩支所	H11. 1.22
市場衛生検査所	
検査課（微生物）	H10.11.19
検査課（理化学）	H10.11.19
大田出張所	H10.11.25
板橋出張所	H10.11.19
東久留米出張所	H10.11.19
芝浦食肉衛生検査所	
精密検査係	H10.11.10
八王子支所	H10.11.27
多摩川保健所	H11. 1.18
秋川保健所	H11. 1.18
八王子保健所	H11. 1.20
南多摩保健所	H11. 1.20
町田保健所	H11. 1.20
多摩立川保健所	H11. 1.18
村山大和保健所	H11. 1.18
府中小金井保健所	H11. 1.20
狛江調布保健所	H11. 1.20
三鷹武蔵野保健所	H11. 1.20
多摩小平保健所	H11. 1.18
多摩東村山保健所	H11. 1.18

今回の内部点検では試験品の取扱い及び検査等に係わる文書の整備と記録状況及び保管に関する点検を中心に行った．すなわち，食品環境指導センター及び東京都保健所に対しては試験品の採取及び搬送方法に関する点検，衛生研究所業務係に対しては試験品の受領に関する点検，試験品検査結果通知に関する点検，市場衛生検査所及び食肉衛生検査所に対しては試験品の採取，受領及び管理に関する点検，検査等の実施及び結果に関する点検，検査結果通知書に関する点検，試薬等及び機械器具に関する点検，衛生研究所研究室に対しては試験品の管理に関する点検，検査等の実施及び結果に関する点検，検査結果通知書に関する点検，試薬等及び機械器具に関する点検を行った．

5．点検結果と改善措置の要請及び確認

検査等及び試験品の取扱いに係わる標準作業書，記録簿等の文書は大多数の施設で整備されていたが，一部の施設に作成の遅れが見受けられ，早期の整備が望まれた．

点検の結果，改善を要すると判断された事項を表3に示した．

管理簿，記録簿等への記録方法に問題のあった施設が最も多く，鉛筆書きや修正液を使った訂正あるいは訂正印の押し忘れが37施設，必要事項の記載漏れや誤った記入が15施設，誤解されやすい記載が6施設，判読しにくい文字あるいは数字の記載が2施設であった．これらの施設に対しては，容易に改ざんできない記載方法及び明解な記載方法の必要性について説明したうえ，周知徹底するよう改善要請を行った．

次に多かったのは管理簿，記録簿及び生データ等の整理保管方法が適切でない施設で計24施設があった．これらの施設に対しては管理簿，記録簿等を整理し,保管すること,書類は確実に綴じて散逸しないようにすること,書類表題名は判りやすくする必要があることを指摘し,目的の試験品の記録を速やかに探し出せるように改善す

表2．主な内部点検項目

A. 各責任者の役割分担	
1）部門責任者	：検査結果通知書の確認，通知の承認
	標準作業書の作成及び改訂の承認
2）区分責任者	：標準作業書の作成及び改訂並びにその保管
	試験品収去，収去方法の確認
	試験品の取扱い，保管の確認
	試験品送付の確認
	機械器具，試薬等の管理の確認
	検査等の方法の選定
	検査等の実測値，結果の確認
	標本，データ，検査結果通知書の控えの保管
3）食品衛生監視員	：機械器具の保守点検の記録，保管
	試験品の採取,採取方法，外観の記録
	試験品の搬送条件，保存条件の記録
	試験品送付の記録
	検査結果通知書の確認，控えの保管
4）検査担当者	：試験品の取扱い，保管の確認
	機械器具，試薬管理の確認
	検査等の方法の選定
	検査等の実測値,結果の確認
	標本，データ，検査結果通知書の控えの保管
B. 機器,試薬等管理担当職員の指定	
1）機器の必要事項の確認	
2）試薬，試液，標準品，標準液，標準菌株,培地等の必要事項の確認	
C. 標準作業書の保管管理,活用	
1）食品衛生監視員及び検査担当者による活用方法	
2）作成状況,改訂の承認及び信頼性確保部門への提出	
D. 記録簿等の内容	
1）作成，保管，活用状況	
収去証，試験品送付書，試験品管理簿，検査実施記録簿，結果表，生データ，検査結果通知書，機械器具等使用時点検記録簿，機械器具等定期点検記録簿，機械器具等定期点検計画表，機械器具等異常時点検記録簿，標準品･試薬･培地等管理記録簿，標準溶液・試液・生培地等管理記録簿，標準菌株管理記録簿	
2）消せない方法での記入と押印の有無	
3）異常データへの対応,措置の記録	

るよう要請した．

試薬及び機械器具等の管理担当者を定めていない施設が21施設，また，検査区分責任者による管理簿，記録簿の確認が適切に行われていない施設が12施設あった．これらの施設に対しては早急に管理担当者を定め，点検を強化する必要があることを指摘し，検査区分責任者には管理簿，記録簿の確認を確実に行うよう要請した．

機械器具等の管理基準が曖昧であったり，あるいは実施不可能な基準を設定して使用時点検を行っている施設が19施設あった．これらの施設に対しては適切な管理基準を設けて，確実に点検を実施するように改善要請を行った．また，定期点検計画表を作成してない施設に対しても同様に改善要請を行った．なお,冷蔵庫，冷凍庫及び孵卵器等の温度管理が必要な機器についてはすべての施設で統一した管理基準を設定し，全施設が同じ方法で管理することが望ましいと思われる．管理基準の設定に当たっては，重要な管理項目を選定するとともに,現実に実施することが可能か否かについて十分に検討する必要がある．

その他の問題点としては検査担当者名の記入漏れ，試験品の所内又は科内移動記録の不備，検査開始日及び終了日の記載漏れ等が挙げられるが，これらは何れも検査担当者の努力によって,直ぐにも解決できるものと思われる．

改善要請を行った施設に対しては改善措置の報告を受けたのち，その確認のための点検を実施した．ほとんど

表3．内部点検の結果に基づく要改善事項（施設総数43）

	改善を必要とする事項	該当施設数
試験品の採取／搬送／受領／検査／成績通知等	未整備の標準作業書，管理簿，記録簿の早期整備	5
	新規作成あるいは改定した標準作業書の信頼性確保部門責任者への速やかな提出	3
	標準作業書の日常的な活用	1
	試験品管理簿における試験品の保存方法の明記	2
	試験品受領時における試験品の異常有無の確認	2
	試験品の移動に関する確認の徹底と記録	4
	試験品を保管期限以前に廃棄する場合の理由の明記	2
	結果表，生データ等への試験担当者名の記載	8
	検査実施記録簿における試験開始及び終了年月日の明記	4
	記入漏れ及び誤記入の防止	15
	誤解されやすい表記の防止	6
	成績書発行有無の確認方法の改善	1
	成績書への検出限界，SOPNo.の記載についての改善	1
	管理簿，記録簿についての検査区分責任者の確認の励行	12
	管理簿，記録簿への遅滞のない記載	1
	管理簿，記録簿への容易に改ざんできない方法での記載	36
	管理簿，記録簿への読みやすい文字，数字での記載	2
	管理すべき機械器具等のリスト化と管理担当者の適切な分担化	2
	機械器具等の異常時点検記録の確実な実施	1
	機械器具等の使用時点検の確実な実施	5
	機械器具等の定期点検計画の作成	6
	機械器具等の定期点検の確実な実施	6
	機械器具等の保守管理基準の設定	19
	機械器具等の保守管理基準の適正化	3
	冷蔵庫，冷凍庫，フラン器等の適切な温度管理	6
	試薬，機械器具等管理記録簿についての管理担当者の確認の徹底	1
	試薬，機械器具等管理担当者の選任	21
	試液等管理記録簿における調製者名の明記	3
	書類の保管方法の改善（書類表題の適正化を含む）	24
試験品の受付	管理簿,記録簿への容易に改ざんできない方法での記載	1
	研究室における試験品受付担当者氏名の確実な把握	1
	検査成績書発行の遅滞に対するﾁｪｯｸ機能の整備	1
	コンピュータシステム障害発生時における迅速な復旧対策	2

の施設において要請に基づいた十分な改善措置が講じられていたが，2施設については再度改善の必要があると認められたために，2度目の改善要請を行ったのち，改善措置の内容を確認した．

6．まとめと今後の課題

食品衛生法施行令並びに同施行規則に基づき，東京都食品衛生検査施設に対する信頼性確保部門の業務としてGLP内部点検を行った．

衛生研究所22，市場衛生検査所5，食肉衛生検査所2，食品環境指導センター2，東京都保健所12の合計43施設を対象に，試験品の取扱い及び検査等に係わる文書に関する点検を中心に行ったが，ほぼすべての施設で文書の整備が図られていた．短い準備期間内に，繁忙な日常業務に追われながらGLPに積極的に対応された各施設責任者並びに担当者には心より敬意を表したい．

文書の記録方法を初めとして，その保管あるいは機械器具等の管理方法にいくつかの問題点が見受けられたが，GLPに対する認識をさらに深め，努力願うことにより，東京都食品衛生検査施設におけるGLPの完成度は一層高まるものと確信する．また，この一年間の活動を通して，信頼性確保部門には多くの貴重な意見や助言が寄せられた．特に要望の強かった，検査部門の現状を考慮したGLPの弾力的運用の可能性については各施設と今後も密接に協議し，効率的で,しかも効果的なGLPのあり方を検討したい．また，GLPに対する意識の啓発と実践方法に関する研修会の開催の要請に対しても積極的に応

えていく考えである.

GLPに適合する機器の整備,定期点検に要する経費,検体及び書類の保管場所の確保には施設長を初め,事務部門の理解と努力が不可欠であり，精度管理室としても事務部門に強く働きかけていきたい.

7．文　献

1）厚生省生活衛生局長通知：食品衛生法施行令等の一部を改正する政令の一部の施行及び食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について，平成9年1月16日付衛食第7号，1997.

2）厚生省生活衛生局食品保健課長通知：食品衛生検査施設における検査等の業務管理について，平成9年1月16日付衛食第8号，1997.

3）東京都衛生局長通知：東京都の食品衛生検査施設等における検査等の業務管理要綱,平成9年3月31日付8衛生食第984号，1997.

4）東京都衛生局生活環境部長通知：東京都の食品衛生検査施設等における検査等の業務管理実施細目，平成10年7月1日付10衛生食第183号，1998.

著書及び他誌発表

PAPERS ON OTHER PUBLICATIONS

(1998.4 — 1999.3)

著書

吉川　翠（共），吉沢　晋，松本　恭治，水野弘之，中島　明子，田中　恒子，田中　一枝，滝沢　清治，菅原　文子，河原　武儀，有馬　百江：**快適で健康的な住宅に関するガイドライン**，株式会社ぎょうせい，厚生省生活衛生局監修，1998，東京．

吉川　翠（共），西川勢津子：**掃蕩家害小百科**，1998，日天出版社，台北県新店市．

吉川　翠（共），三好　彰，斉藤　洋三，三澤武幸，加藤大志朗，上田　伸男，白川　太郎，小出　良平，今野　昭義，尾登　誠，松井 猛彦，馬場康太郎，中田　道広：**鼻アレルギー**，p135, 1998，日本評論社，東京．

甲斐　明美：**大腸菌O157 LPS抗原**，臨床検査データブック，369-370, 1999，医学書院，東京．

甲斐　明美：**大腸菌ベロ毒素〔VT〕≪志賀毒素様毒素〔SLT〕≫**，臨床検査データブック，383, 1999，医学書院，東京．

甲斐　明美：**大腸菌ベロ毒素遺伝子検査**，臨床検査データブック，383-384, 1999，医学書院，東京．

甲斐　明美（共），伊藤　武：**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**，300-307, 1998，日本疫学会編．

大橋　則雄：**プール水のリスクの実態と評価**，水のリスクマネージメント実務指針，1998, P469，サイエンスフォーラム．

大橋　則雄：**ボトルド（ミネラル）ウォーターのリスクの実態・評価と対策技術**，水のリスクマネージメント実務指針，1998, P201，サイエンスフォーラム．

竹葉　和江（共），中澤　裕之，堀江　正一，岡　尚男，宮崎　奉之，村山　三徳，永田　知子，谷岡　圭子，伊藤　裕子：**FC新知識シリーズ　食品に残留する動物用医薬品の新知識**，寄生虫駆除剤，100-118, 1998，食品化学新聞社，東京．

竹葉　和江（共），中澤　裕之，伊藤　裕子，岡　尚男，永田　知子，堀江　正一，宮崎　奉之：**動物用医薬品データブック**，動物用医薬品データブック，147-191, 1998，林純薬工業㈱，大阪．

矢野　一好（共）：**水のリスクマネジメント実務指針（分担執筆）**，1998，サイエンスフォーラム．

保坂　三継：**細菌による水道水のリスクの実態**，水のリスクマネジメント実務指針，P89，サイエンスフォーラム，1998，東京．

保坂　三継：**生物の視点から水の安全性を考える**，ネットワーク，No.53, 29, 1998.

他誌発表論文

橋本　常生，永山　敏廣，小林　麻紀，羽石奈穂子，伊藤　正子，田村　康宏，友松　俊夫：**フォトダイオードアレイ検出HPLCによる農作物中のクロリムロンエチル及びトリベヌロンメチルの分析**，食品衛生学雑誌，**39, 5**, 324-328, 1998.

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, 1998.

和田真太郎，新垣　正夫，甲斐　明美，星谷　聡，高橋　信一，松田　基夫，伊藤　武：**我が国における薬剤耐性 *Helicobacter pylori* の現況―薬剤感受性試験と我が国における耐性菌の現状―**，Helicobacter Research, **2**, 5, 436-441, 1998.

郡山洋一郎，青木眞里子，豊岡　弥生，越野せつ子，中田　善樹，高橋　正樹，斉藤　香彦，甲斐　明美，五十嵐英夫：**腸管出血性大腸菌O157の一次鑑別のための「クロモカルト・コリフォーム／セロビオース分画鑑別平板」の評価**，日本食品微生物学会雑誌，**15**, 173-176, 1998.

高橋　保雄，森田　昌敏：**屋内プール水中のハロゲン化消毒副生成物**，環境化学，**8**, 473-479, 1998.

高橋　保雄，森田　昌敏：**加熱による水道水中のハロゲン化消毒副生成物の濃度及び組成変化**，環境化学，**8**, 465-472, 1998.

高橋　保雄，森田　昌敏：**小型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**，環境化学，**8**, 481-488, 1998.

高橋　保雄，森田　昌敏：**水道水中のハロゲン化消毒副生成物**，環境化学，**8**, 455-464, 1998.

佐藤かな子，瀬戸　隆子，宮武ノリエ，濱野　朋子，塩田　寛子，大西　和夫：**Determination of Sennoside A and Sennoside B in Formulation Using Capillary Electrophoresis**, YAKUGAKU ZASSHI, **119**(1), 88-92, 1999.

吉田　勲，林　志直，片山佳奈子，山田　澄夫：**東京都多摩地区における散発下痢症の細菌学的・ウイルス学検索成績（1991-1996）**，感染症学雑誌，**72**, 599-608, 1998.

小久保彌太郎（共），楠　博文，沈　恵忠，金子誠二，関山　泰司，植村　興：**アリルカラシ油による低温細菌の制御**，日本食品微生物学会雑誌，**15**, 107-112, 1998.

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実態調査（1994年4月～1997年3月）**，日本食品衛生学雑誌，**39**(3), 233-239, 1998.

松下　秀，工藤　泰雄：**我が国における最近の細菌性赤痢の発生状況と新血清型赤痢菌の検出例**，モダンメディア，**44**, 10, 312-320, 1998.

松下　秀，小西　典子，柳川　義勢，甲斐　明美，諸角　聖，森田　耕司，金森　政人，工藤　泰雄：**近年分離された *Shigella sonnei* について**，感染症学雑誌，**73**, 5, 414-420, 1999.

広門　雅子，平田　恵子，植松　洋子，安野　哲子，船山　惠一，伊藤　弘一，鈴木　助治：**食品用カラメル色素の品質調査**，食品衛生学雑誌，**39**(2), 148-152, 1998.

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油漬け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**，食品衛生学雑誌，**39**(2), 135-141, 1998.

植松　洋子：**食品添加物製剤の品質に関する研究（平成10年度日本食品衛生学会奨励賞）**，食品衛生学雑誌，**39**(6), J-464-467, 1998.

新藤　哲也，牛山　博文，観　公子，安田　和男：**キノコ中のシアン含有量及び調理による消長**，食品衛生学雑誌，**40**, 29-35, 1998.

神保　勝彦：**畜水食品中の残留抗菌性物質の微生物学的検査法**，動物用抗菌剤研究会報，**20**, 1-8, 1999.

水石　和子：**有機スズ化合物分析と海洋汚染**，化学と教育，**47**, 138, 1999.

宮武ノリヱ，上原　真一，鎌田　国広，安田　一郎，守安　貴子，大西　和夫：**キャピラリー電気泳動による医薬品製剤中の塩酸メチルエフェドリンの光学異性体分析**，医薬品研究，**29**, 417-422, 1998.

瀬戸　隆子，塩田　寛子，佐藤かな子，浜野　朋子，大西　和夫：**痩身効果を暗示する茶類からの医薬品成分センナ及びダイオウの検出**，衛生化学，**44**, 3, 195-203, 1998.

池田　一夫，上村　　尚：**インターネットによる人口動態統計情報の提供**，人口学研究，1998.

竹葉　和江：**寄生虫駆除剤と残留分析**，食品衛生学雑誌，**39**, 6, J-430, 1998.

田端　節子，井部　明広，小沢　秀樹，上村　　尚，安田　和男：**Aflatoxin Contaminaton in Foods and Foodstuffs in Tokyo 1991-1996**，食品衛生学雑誌，**39**, 444，1998.

藤川　　浩，丸山　文一，和宇慶朝昭，諸角　　聖，伊藤　　武：**発色基質培地クロモアガーカンジダを用いたサラダドレッシング汚染酵母の保存中における増殖の解析**，日本食品衛生学雑誌，**39**, 120-126, 1998.

楠　くみ子，潮田　　弘，神　真知子，新井　輝義，岩谷　美枝，石上　　武，山田　澄夫：**東京都多摩地区における市販生食用魚介類の細菌汚染調査成績（1986-1996）**，日本食品微生物学雑誌，**15**, 161-165, 1998.

萩原　輝彦，安野　哲子，鈴木　助治，斎藤　和夫：**Determination of aspartame and diketopiperazine in food by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry**，食品衛生学雑誌，**40**, 62-67, 1998.

矢野　一好：**水環境における微生物汚染の実態とその対策について**，ウォーター研究会会報，**5**, 1-11, 1998.

甲斐　明美：**腸管出血性大腸菌O157食中毒とその発生要因**，日本食品微生物学会雑誌，**15**(2), 91-95, 1998.

Akiko Nakama, Motoo Matsuda, Takeshi Itoh, Choji Kaneuchi：**Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* Isolated in Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis：The Journal of Veterinary Medical Science，60**, 749-752, 1998.

Hiroshi Fujikawa, Takeshi Itoh：**Thermal inactivation patterns of Aspergillus niger spores and mycelia**, Biocontrol Science, 3, 99-103, 1998.

Shunichi.Fukano：**Computer Simulations of Environmental Pollutants Based on Physiological Pharmacokinetics**, Porphyrins, **7**（**2-3**）, 176-181, 1998.

Takashi Iida, Masako Kanzaki, Akiko Nakama, Yataro Kokubo, Tsutomu Maruyama and Choji Kaneuchi：**Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans**, Animals and Foods, The Journal of Veterinary Medical Science, **60**, 1341-1343, 1998.

Akiko Nakama, Michinori Terao, Yataro Kokubo, Takeshi Itoh, Tsutomu Maruyama, Choji Kaneuchi, James McLauchlin：**A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-field gel**

electrophoresis, International Journal of Food Microbiology, **42**, 201-206, 1998.

Fusao Ushio, Marie-Helene Bani, Masahiro Tohkin,, and Morio Fukuhara : **Evidence for Involve of cAMP-Dependent Pathway in the Phenobarbital-Induced Expression of a Novel Hamster Cytochrome**, P450, CYP3A31, Arch. Biochem. Biophys, 1998.

Hiroshi Fujikawa, Takeshi Itoh : **Thermal inactivation analysis of mesophiles using the Arrhenius and z-value models**, Journal of Food Protection, **61**, 910-912, 1998.

Mitsuo.Oishi, Yuki.Ogasawara, Kazuyuki.Ishii, Shinzo. Tanabe : **Assay of nicotinamide deamidase activity using high-performance liquid chromatography**, Journal of Chromatography B, **720**, 59, 1998.

Naoto.Aoki (共), Kzuya.Hara, Chie.Sugimoto, Tadaichi.Kitamura, Naoto.Aoki, Fumiaki.Taguchi, Yoshiaki.Yogo : **Archetype JC virus efficiently replicates in COS-7 cells**, simian cells constitutively expressing simian virus 40 T antigen., Journal of Virology, **72**, 5335, 1998.

Nobue Watanabe, Yoji Oonuki : **Inhalation of Diesel Engine Exhaust Affects Spermatogenesis in Growing Male Rats**, Environmental Health Perspectives, **107**, 539-544, 1999.

Hideko Suzuki, Mariyo Watanabe, Yuping Wu, Tatsuya Sugita, Kazuko Kita, Takeyuki Sato, Xiao-Li Wang, Hideki Tanzawa, Souei Sekiya, Nobuo Suzuki : **Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells**, International journal of molecular medicine, **2**, 109-112, 1998.

Tomoko Fujitani, Yukie Tada, Masako Yoneyama : **Effects of Thiabendazole (TBZ) on Mitochondrial Function in Renal Cortex of ICR Mice**, Food and Chemical Toxicology, **37**, 145-152, 1999.

Toyohito Tanaka : **Effects of litter size on behavioral development in mice**, Reproductive Toxicology, **12**, 613-617, 1998.

Yoshio Nakagawa, Kuniaki Tayama : **Mechanism of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity induced by tropolones in isolated rat hepatocytes** : Chemico-Biological Interactions, **116**, 45-60, 1998.

安田一郎 (共), Yoshiki.Kashiwada, H. K. Wang, Tsuneatsu.Nagao : **Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid**, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids, Journal of Natural Products, **61**, 1090-1095, 1998.

Hidekazu Suzuki, Mikiji Mori, Akemi kai, Masayuki Suzuki, Makoto Suematsu, Soichiro Miura, Hiromasa Ishii : **Effect of Rebamipide on *H. pylori*-Associated Gastric Mucosal Injury in Mongolian Gerbils**, Digestive Diseases and Sciences, **43**, 9, 181-187, 1998.

Youko Miyao, Tatsuo Kataoka, Toshihide Nomoto, Akemi kai, Takeshi Itoh, Kikuji Itoh : **Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* harbored in the intestine of cattle in Japan**,Veterinary Microbiology, **61** (1998), 137-143, 1998.

Kenji.Ohtsuka, Yasushi.Nakamura, Masato. Hashimoto, Yumi. Tagawa, Masaki Takahashi, Kahiko. Saito, Nobuhiro. Yuki : **Fisher syndrome associated with IgG anti-GQ1b antibody following infection by a specific serotype of Campylobacter jejuni**, Ophthalmology, **105**, 7, 1281-1285, 1998.

森 慎一郎, 長島 真美, 佐々木由紀子, 森 功次, 田部井由紀子, 山崎 清, 平田 一郎, 関根 大正, 伊藤 武, 鈴木 重任：**A novel amino acid substitution at the receptor-binding site on the hemagglutinin of H3N2 influenza A viruses isolated from 6 cases with acute encephalopathy during the 1997-1998 season in Tokyo,** Arch Viorol, 1999.

Yoshio Nakagawa, Peter Moldeus：**Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes,** Biochemical Pharmacology, **55**,. 1907-1914, 1998.

萩原 輝彦, 安野 哲子, 船山 恵市, 鈴木 助治：**Determination of lycopene, σ-carotene and β-carotene in serum by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring,** Journal of Chromatography B, **708**, 67-73, 1998.

野尻 宗子, 斉藤 和夫, 田口 信夫, 大石 充男, 真木 俊夫：**Liquid Chromatographic Determination of Sugar Alcohols in Beverages and Foods after Nitrobenzoylation,** Journal of AOAC International, **82**, 134, 1998.

矢野一好（共）, M. Otaki, and S. Ohgaki：**Virus Removal in Membrane Separation Process,** Wat.Sci. Tech, **37**, 10, 107-116, 1998.

鈴木 俊也, 近藤 治美, 矢口久美子, 眞木 俊夫, 須賀 哲弥：**Estimation of leachability and persistence of pesticides at golf courses from point-source monitoring and model to predict pesticide leaching to groundwater, Environmental Science and Technology, 32**, 920, 1998

吉川 翠：**室内汚染物質**, ファーマウイーク, 7876, 10, 1999.

佐々木由紀子：**ウイルス性胃腸炎**, 東京都薬剤師会, 1999.

総説・解説

甲斐 明美, 工藤 泰雄：**Vero毒素産生性大腸菌の分離状況**, 診断と治療, **86**, 7, 1013-1017, 1998.

甲斐 明美：**食中毒の細菌検査**, JJPEN **20**, 10, 1003-1007, 1998.

甲斐 明美：**腸管出血性大腸菌感染症の細菌学的、免疫学的診断法**, 小児内科, **30**, 6, 751-755, 1998.

甲斐 明美：**腸管出血性大腸菌O157の対策、病原診断法の進歩**, INFECTION CONTROL '98, 7, 6, 572-576, 1998.

伊藤 武, 甲斐 明美：**食品からのサルモネラおよび腸管出血性大腸菌O157の簡易・迅速検出法**, 月刊フードケミカル, **1998-11**, 47-52, 1998.

門間 千枝, 柳川 義勢, 伊藤 武：**乳児ボツリヌス症**, 感染症症候群Ⅲ, 領域症候群シリーズ25, 115-119, 日本臨牀, 東京, 1999.

安田 一郎：**成分本質から薬事法違反に問われた健康食品**, 都薬雑誌, **20**, 49-54, 1998.

安田 一郎（共）, 開田 節子, 鎌倉 浩之, 浜野 朋子, 佐竹 元吉：**生薬中のAristolochicacidsについて**, 国立医薬品食品衛生研究所報告, **116**, 195-196, 1998.

加藤　玲，尾形　和恵，林　志直，吉田　勲，山田　澄夫：**東京多摩地区における散発下痢症からの腸管系病原体検索成績（1997年）**，病原微生物検出情報，**19**, 159, 1998.

吉川　翠：**繊維害虫類の生態と防除**，洗濯の科学，**44**(1), 10, 1998.

小久保彌太郎：**HACCPシステムによる食品の衛生管理**，東京都予防医学協会年報**28**, 224-229, 1999.

小久保彌太郎：**HACCPシステムによる食品の衛生管理**，獣医公衆衛生研究 **1**, 27-31, 1998.

小久保彌太郎：**第二段階を迎えたHACCPの方向：第二段階を迎えるに当たってもう一度食品衛生の原則に戻ってみよう**，月刊HACCP **5**, 32-34, 1999.

小久保彌太郎：**乳・乳製品を対象とした微生物制御の考え方**，ミルクサイエンス**47**, 201-212, 1998.

松下　秀：**サルモネラ食中毒とその発生動向**，看護，**50**, 11, 151-159, 1998.

松下　秀：**海外旅行者からの腸管系病原菌**，都医ニュース，**387**, 7, 1998.

荒川　英二，島田　俊雄，渡辺　治雄，村瀬　敏之，山井　志郎，松下　秀，伊藤　武：**1997年に発生した海外渡航歴のないコレラ患者から分離したコレラ菌の分子疫学的解析**，病原微生物検出情報，**19**, 5, 3-5, 1998.

藤川　浩，土戸　哲明：**食品衛生管理のための微生物増殖と殺菌についてのデータベース化と予測微生物学の導入**，食品工業**41**, 16-23, 1998.

藤川　浩：**予測食品微生物学とその現状**，日本防菌防黴学会，**26**, 423-437, 1998.

尾形　和恵，加藤　玲，森本　敬子，山田　澄夫：***Shigella sonnei*による感染例**，1998-東京都，病原微生物検出情報，**20**, 60-62, 1998.

保坂　三継：**原虫による汚染実態**，水のリスクマネジメント実務指針，**P356**，サイエンスフォーラム，東京，1998.

行政報告

吉川　翠（共），今野　金裕，郡山市環境衛生係職員，太神　和宏，野崎　淳夫，赤山　秀城，渡辺　賢一：**アトピー性皮膚炎と住環境（住居衛生対策事業実施結果報告書）**，p119，郡山市住居衛生対策事業協議会，1998.

吉川　翠（共），吉沢　晋，水野　弘之，松本　恭治，中島　明子，田中　恒子，田中　一枝，滝沢　清治，菅原　文子，河原　武儀，有馬　百江：**快適で健康的な住宅に関する検討会議報告書**，厚生省生活衛生局，1998.

高橋　保雄（共），中村　文夫，真柄　泰基，土屋　悦輝，安藤　正典，渡辺　義公，松田　奉康，入村　達郎：**屋内プール水中のハロゲン化消毒副生成物**，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，1998.

高橋　保雄（共），中村　文夫，真柄　泰基，土屋　悦輝，安藤　正典，渡辺　義公，松田　奉康，入村　達郎：**加熱による水道水中のハロゲン化消毒副生成物の変化**，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，1998.

高橋　保雄（共），森田　昌敏，安原　昭夫，奥村為男，門上希和夫，彼谷　邦光，川田　邦明，白石　寛明，高橋　保雄，福島　　実：**外因性内分泌撹乱化学物質調査暫定マニュアル（水質，底質，水生生物）**，環境庁水質保全局水質管理課，平成10年10月，1998.

高橋　保雄（共），中村　文夫，真柄　泰基，土屋悦輝，安藤　正典，渡辺　義公，松田　奉康，入村　達郎：**小型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**，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，1998.

高橋　保雄（共），中村　文夫，真柄　泰基，土屋悦輝，安藤　正典，渡辺　義公，松田　奉康，入村　達郎：**水道水中のハロゲン化消毒副生成物**，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，1998.

今野　金裕（共），吉川　　翠，太神　和宏，野崎淳夫，春山　秀城，渡辺　賢一：**アトピー性皮膚炎と住環境（住居衛生対策事業実施結果報告書）**，郡山市住居衛生対策事業協議会，1998.

坂本　朋子，鈴木　秀雄，真木　俊夫：**東京都における放射能調査（平成９年度）**，第40回環境放射能調査研究成果発表会抄録集，1998.

山田　澄夫，尾形　和恵，加藤　　玲，森本　敬子：**衛生研究所多摩支所における細菌学的検査成績**，保育園における赤痢の集団発生に関する記録，東京都八王子保健所，p37＆73, 1999.

竹内　正博，瀬戸　　博，斎藤　育江：**平成10年度生物モニタリング結果報告書（平成10年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書）**，環境庁環境保健部環境安全課，1998.

東京都衛生局：**平成10年度第17回東京都衛生検査所精度管理事業報告書**，1999.

矢野　一好（共），緊急時水源確保小委員会：**緊急時の水源確保**，空気調和衛生工学会，1998.

矢野　一好（共），災害用浄水装置等情報提供委員会：**災害用浄水装置等情報**，消防安全センター，1998.

学　会　発　表

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

(1998.4 – 1999.3)

学会発表

Kazuo Ikeda, Mieko Sasaki：**SAGE via Internet**, GINC International Conference, 1998.

安田　一郎, 宮武ノリエ, 寺島　　潔, 岸本　清子, 守安　貴子, 中嶋　順一, 上村　　尚：**いわゆる「合法ドラッグ」中の医薬品成分の分析(2)植物塩基性物質の定性・定量分析**, 日本薬学会第119年会, 1999.

安田　一郎, 鈴木　　淳, 西谷　　潔：**フェネチルアミン系薬物の合成と分析**, 日本薬学会第119年会, 1999.

安田　一郎, 浜野　朋子, 木島　孝夫, 高崎みどり, 徳田　春邦, 西野　輔翼：**各種桂皮の成分と抗発がんプロモーター作用の比較**, 第3回 Japanese Society for Food Factors, 1998.

安田　一郎（共）, 谷　　賢志, 香川　一浩, 大野　孝義, 鰍澤　照夫, 宮武ノリエ, 大西　和夫：**いわゆる「合法ドラッグ」の調査結果について**, 第31回日本薬剤師会学術大会, 1998.

安田一郎（共）, 鈴木　幸子, 岩崎由美子, 荒金真佐子, 福田　達男, 吉沢　政夫, 伊吹　直登, 中嶋　順一：**細辛の研究（第4報）ウスゲサイシンの種子形成と発芽特性について**, 日本生薬学会第45回年会, 1998.

伊藤　正子, 永山　敏廣, 小林　麻紀, 橋本　常生, 羽石奈穂子, 田村　康宏, 友松　俊夫：**HPLCによる農産物中アラニカルブの分析法**, 食品衛生学会第75回学術講演会, 1998.

伊藤　忠彦（共）, 萩原　敏且, 吉田　芳哉, 海保郁男, 根本　治育, 後藤　　敦, 益川　邦彦：**日本紅斑熱の発生状況ー調査票からの解析ー**, 第73回日本感染症学会総会, (1999, 3).

井部　明広, 藤川　　浩, 和宇慶朝昭, 諸角　　聖, 友松　俊夫, 森　　治彦：**真菌による食品用離型剤からの異臭発生条件の検討**, 第75回日本食品衛生学会, 1998.

稲葉美佐子, 鈴木　俊也, 矢口久美子, 鈴木　助治：**多摩地域における井戸水中の有機リン酸トリエステル調査**, 平成10年度地研協議会関東甲信静支部理化学研究部会, 1998.

遠藤美代子, 奥野　ルミ, 榎田　隆一, 下島優香子, 五十嵐英夫：**劇症型A群レンサ球菌感染症、最近の発生状況**, レンサ球菌談話会, 1998.

遠藤美代子, 奥野　ルミ, 榎田　隆一, 下島優香子, 村田以和夫, 五十嵐英夫：**小児科外来患者から分離された*S.aureus*のコアグラーゼ型別および毒素産生性に関する疫学的研究**, 日本感染症学会, 1998.

奥野　ルミ, 遠藤美代子, 榎田　隆一, 下島優香子, 村田以和夫, 五十嵐英夫：**わが国における劇症型レンサ球菌感染症の疫学調査**, 日本細菌学会, 1998.

奥野　ルミ, 遠藤美代子, 榎田　隆一, 下島優香子, 村田以和夫, 五十嵐英夫：**新生児発疹性疾患患者から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型**, 毒素産生性, ブドウ球菌研究会, 1998.

服部　絹代：**OPAポストカラム法HPLCアミノ代謝異常症スクリーニング**, 日本マス・スクリーニング学会, 1998.

横山　敬子, 新垣　正夫, 甲斐　明美, 斎藤　香彦, 五十嵐英夫, 伊藤　　武：***Campylobacter jejuni*によ**

る集団下痢症の疫学マーカーとしてのリボタイピング法について，第72回日本感染症学会総会，1998.

下島優香子，遠藤美代子，奥野　ルミ，榎田　隆一，村田以和夫，五十嵐英夫：**A群レンサ球菌の薬剤感受性と菌型（1996～1997）**，レンサ球菌研究会，1998.

加藤　　玲，尾形　和恵，森本　敬子，吉田　勲，林　　志直，伊藤　忠彦，山田　澄夫：**多摩地区における散発下痢症患者及び健康者から分離したサルモネラの血清型と薬剤耐性（1988－1997）**，第73回日本感染症学会総会，(1999. 3).

観　　公子，牛山　博文，新藤　哲也，上原　真一，安田　和男：**アブラソコムツによるヒスタミン中毒**，第76回日本食品衛生学会，1998.

岸本　清子，安田　一郎，寺島　　潔，宮武ノリヱ，守安　貴子，中嶋　順一，上村　　尚，大西　和夫：**都衛研におけるバリデーション支援事業への取り組み－中小軟膏剤メーカーへの対応－**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第11回理化学研究部会，1999.

吉川　　翠：**新省エネ住宅内でのダニ相変化**，第57回日本公衆衛生学会，1998.

吉田　　勲，加藤　　玲，森本　敬子，伊藤　忠彦，山田　澄夫：**多摩地区における梅毒血清反応検査成績と陽性血清のグロブリン解析の試み（1988-1997年）**，第73回日本感染症学会総会，(1999, 3).

宮武ノリヱ，安田　一郎，寺島　　潔，岸本　清子，守安　貴子，中嶋　順一，大西　和夫：**いわゆる「合法ドラッグ」中の医薬品成分の分析－エフェドリン類及びヨヒンビンの定量－**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

楠　　淳，甲斐　明美，横山　敬子，柳川　義勢，諸角　　聖，伊藤　　武，泉谷　秀昌，寺島　　淳：**食中毒由来サルモネラ血清型Typhimuriumの薬剤感受性の年次別推移**，第19日本食品微生物学会，1998.

甲斐　明美，尾畑　浩魅，畠山　　薫，伊藤　　武：**腸管出血性大腸菌O157による家族内感染の疫学解析**，第3回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム，1998.

甲斐　明美，畠山　　薫，尾畑　浩魅，小西　典子，松下　　秀，柳川　義勢，諸角　　聖，五十嵐英夫，伊藤　　武：**腸管出血性大腸菌O157による家族内感染事例の細菌学的・疫学的検討**，第73回日本感染症学会，1999.

楠　　淳，甲斐　明美，横山　敬子，柳川　義勢，諸角　　聖，伊藤　　武，泉谷　秀昌，寺嶋　　淳：**東京都内で発生した多剤耐性サルモネラ血清型Typhimurium DT104による食中毒事例**，第73回日本感染症学会，1999.

甲斐　明美，畠山　　薫，尾畑　浩魅，横山　敬子，門間　千枝，新垣　正夫，五十嵐英夫，伊藤　　武，工藤　泰雄：**東京都内における腸管出血性大腸菌O157感染症の疫学的・細菌学的検討成績**，第71回日本細菌学会総会，1998.

甲斐　明美，畠山　　薫，諸角　　聖，伊藤　武，宮尾　陽子，伊藤喜久治：**動物由来腸管出血性大腸菌O157株の下痢原性の検討**，第19回日本食品微生物学会，1998.

Wada S, Matsuda M, Shingaki M, kai A,Itoh T Watanabe K, Tokunaga K, Ninomiya H, Hoshiya S, Takahashi S：**AP-PCR patterns of clarithromycin resistance *Helicobacter pylori* in pre- and post-treatment**，第4回日本ヘリコバクター学会学術集会，1998.

和田真太郎，新垣　正夫，甲斐　明美，高橋　信一，松田　基夫，諸角　　聖，伊藤　　武：***Helicobacter pylori*** **のクラリスロマイシン耐性株の出現状況と遺伝子解析**，第72回日本細菌学会，1999.

結城　伸泰，古賀　道明，平田　幸一,高橋　正樹，斎藤　香彦：***Campylobacter jejuni*** **腸炎後ギラン・バレー症候群における抗ガングリオシド抗体**，第１回特定疾患に関する微生物研究班会議，1998.

高橋　正樹，斎藤　香彦，横山　敬子，新垣　正夫，柳川　義勢，諸角　聖：**PCR法による*Campylobacter jejuni*並びに*C. Coli*同定のための各種プライマーの評価について**，第73回日本感染症学会総会，1999.

高橋　保雄，竹内　正博，森田　昌敏：**加熱による水道水中のハロゲン化消毒副生成物の変化**，第７回日本環境化学学会，(1998，6).

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**，第７回日本環境化学学会，(1998，6).

佐藤　　寛，天川　映子，荻原　　勉，大橋　則雄，有松　真保，鎌田　国広，鈴木　助治：**野菜中の有機リン系の一斉分析法の検討**，平成10年度地研協議会関東甲信静支部理化学研究部会，1998.

佐藤　泰仁：**室内空気質の夏期と冬期の比較調査**，第57回日本公衆衛生学会，1998.

斎藤　育江，瀬戸　　博，竹内　正博：**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**，第39回大気環境学会，1998.

斎藤　育江，瀬戸　　博，竹内　正博：**住宅の室内ホルムアルデヒド及びVOC濃度の経時変化について**，第１回室内環境学会，1998.

広門　雅子，伊藤　弘一，安野　哲子，萩原　輝彦，平田　恵子，植松　洋子，鈴木　助治：**バイオ食品添加物α－アミラーゼの品質調査**，第75回日本食品衛生学会，1998.

山田　五月，小宮三紀子，鈴木　寿子，須田小百合，峰村　順子，赤塚　弘子，改木　郁子，鈴木　政敏，天野　湛美，深澤　啓治，篠原　　猛，小駒　兼昭，早藤知恵子，市川　久次：**骨粗鬆症教室３年後のフォローを実施して**，第100回東京都衛生局学会，1998.

片山佳奈子，林　　志直，吉田　勲，伊藤　忠彦，山田　澄夫：**多摩地区の９医療定点における散発下痢症の細菌学的・ウイルス学的検索成績**，第72回日本感染症学会総会，(1998，4).

山田　澄夫，松下　　秀，工藤　泰雄：**東京都における飲食物取扱業者を対象とした検便成績とその評価(1961-1997)**，第73回日本感染症学会総会，(1999，3).

山田　澄夫，尾形　和恵，加藤　　玲，森本　敬子，林　　志直，吉田　　勲，伊藤　忠彦：**保育施設において発生した*S. sonnei*による集団例－八王子市－**，第38回感染性腸炎研究会総会，(1999，3).

守安　貴子，安田　一郎，寺島　　潔，宮武ノリヱ，岸本　清子，中嶋　順一，上村　　尚：**輸入無許可医薬品中に含まれる男性ホルモンの検索**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第11回理化学研究部会，1999.

秋場　哲哉，渡邉　泰男，磯貝スエ子，藤原　恭子，入倉　善久，前　　潔，山田　澄夫，上木　隆人：**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**，第100回東京都衛生局学会，1998.

小久保彌太郎：**乳・乳製品を対象とした微生物制御の考え方**，酪農科学シンポジウム，1998.

小西　典子，松下　　秀，甲斐　明美，諸角　　聖，和田真太郎，伊藤　　武：**腸管出血性大腸菌O157の増殖と生存**，第19回日本食品微生物学会，1998.

小西　典子，松下　　秀，甲斐　明美，諸角　　聖：**東京都内某保育園におけるソンネ赤痢菌集団事例について**，第73回日本感染症学会，1999.

小野塚春吉：**PCB，カドミウム等の汚染問題の現在と複合化学汚染**，日本環境学会第24回研究発表会，1998.

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，高田千恵子，安田　和男：**HPLCによる農産物中ダイムロン分析法**，第75回日本食品衛生学会，1998.

松下　　秀，小西　典子，柳川　義勢，甲斐　明美，諸角　　聖，五十嵐英夫，森田　耕司，金森　政人，工藤　泰雄：**近年分離されたソンネ赤痢菌のコリシン型，薬剤耐性及びオルニチン利用性**，第73回感染症学会総会，1999.

松下　　秀，柳川　義勢，山田　澄夫，五十嵐英夫，森田　耕司，金森　政人，工藤　泰雄：**近年分離されたソンネ赤痢菌の諸性状**，第71回日本細菌学会総会，1998.

松下　　秀，野口やよい，柳川　義勢，五十嵐英夫，上田　泰史，橋本　　智，矢野　周作，森田　耕司，金森　政人，工藤　泰雄：**新血清型（仮称204/96）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72回感染症学会総会，1998.

松下　　秀（共），荒川　英二，村瀬　敏之，島田俊雄，山井　志郎，伊藤　　武，渡辺　治雄：**1997年に発生した海外渡航歴のないコレラ患者から分離したコレラ菌の分子疫学的解析**，第71回日本細菌学会総会，1998.

轡田　千佳，森田　耕司，渡辺　　登，和田　博志，飯塚　隆文，松下　　秀，金森　政人：***Shigella sonnei* のgyrA遺伝子とその変異**，第72回日本細菌学会総会，1999.

轡田　千佳，森田　耕司，渡辺　　登，飯塚　隆文，松下　　秀，金森　政人：***Shigella sonnei* のキノロン剤耐性**，第80回日本細菌学会関東支部総会，1998.

植松　洋子，平田　恵子，飯田　憲司，伊藤　弘一，斉藤　和夫：**HPLC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及び関連化合物の分析**，日本食品衛生学会第76回学術講演会，1998.

植松　洋子，広門　雅子，平田　恵子，鈴木　公美，伊藤　弘一，鈴木　助治：**ユッカフォーム抽出物中サポニンの比色定量法**，日本食品衛生学会第75回学術講演会，1998.

植松　洋子：**食品添加物製剤の品質に関する研究（平成10年度日本食品衛生学会奨励賞）**，日本食品衛生学会第75回学術講演会，1998.

新開　敬行，森　　功次，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正：**A型肝炎患者におけるふん便及び血清中のA型肝炎ウイルス（HAV）の消長**，第100回東京都衛生局学会，1998.

新開　敬行，森　　功次，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正：**二枚貝におけるウイルス分布**，第13回関東甲信静支部ウイルス研究会，1998.

新垣　正夫，横山　敬子，伊藤　　武，甲斐　明美，五十嵐英夫：**Campylobacter属および類似菌の同定のためのフマル酸分解試験**，ピラジンアミダーゼ試験の検討，第72回日本感染症学会総会，1998.

Masao Shingaki, Keiko Yokoyama, Akemi Kai, Takeshi Itoh：**Fumarate Hydration Test for Differentiation of *Helicobacter* Species**，第4会日本ヘリコバクター学会，1998.

新垣　正夫，横山　敬子，柳川　義勢，甲斐　明美，諸角　　聖，五十嵐英夫，伊藤　　武，星谷　　聡，渡辺　一宏，高橋　信一：**免疫磁気ビーズ法を用いた胃生検材料からの*Helicobacter pylori*の検出**，第73回日本感染症学会総会，1999.

新藤　哲也，牛山　博文，観　　公子，上原　真一，安田　和男：**イオンクロマトグラフィーによるエゾバイ科巻貝中テトラミンの分析法及び含有量調査**，第76回日本食品衛生学会，1998.

森　　功次，門間　公夫，佐々木由紀子，中村　敦子，長島　真美，新開　敬行，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正：**東京都における1997年度のSRSV関連食中毒の発生状況について**，第101回東京都衛生局学会，1998.

森　　功次，佐々木由紀子，中村　敦子，長島　真美，吉田　靖子，平田　一郎，関根　大正：**東京都におけるSRSVの検査体制について**，第13回関東甲信静支部ウイルス研究会，1998.

森本　敬子，尾形　和恵，加藤　　玲，林　　志直，吉田　　勲，伊藤　忠彦，山田　澄夫，松下　　秀，小西　典子，甲斐　明美：**1998年秋，都下で発生したソンネ赤痢菌による集団感染例における細菌学的検討成績について**，第11回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会，(1999, 2).

深野　駿一，平野靖史郎，遠山　千春：**薬物動態予測プログラム(PPP)の開発とその応用2 —Chlorodibenzofuranのヒトにおける体内動態—**，第71回日本産業衛生学会，1998.

水石　和子：**GCによる環境試料中の有機スズ定量(1) 東京湾の汚染モニタリング**，第47回日本分析化学会，1998.

瀬戸　　博，斎藤　育江，竹内　正博：**異臭のあった新築ビルの室内化学物質濃度について**，第39回大気環境学会，1998.

瀬戸　　博，斎藤　育江，長嶋　親治，多田　宇宏，竹内　正博：**指針値のない住宅室内揮発性有機化合物濃度をどう評価するか？**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第11回理化学研究部会，1998.

瀬戸　　博（共），木村　秀嘉，渡辺　博史，谷津寿夫，鴫原　　茂，小川　誠一，斎藤　育江，多田　宇宏：**ビルにおけるVOC等の実態調査**，第57回公衆衛生学会，1998.

瀬戸　　博（共），渡辺　博史，下間　志正，富田広造，中島二三男，橋本　憲一，野原　敏男，関根　和美，依田　昌樹，斎藤　育江，多田　宇宏，土屋　悦輝：**特定建築物における揮発性有機化合物の実態調査**，第100回東京都衛生局学会，1998.

青柳　陽子，田口　信夫，大石　充男，鈴木　助治：**台所用品の抗菌剤について—抗菌スポンジタワシ等のチアベンダゾールの分析—**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

早藤知恵子，市川　久次，鈴木とし子，高田知英子，宇田川京子，長野みさ子，長谷川　明：**運動実践教室受講前後の骨代謝と食生活及び身体状況**，第57回日本公衆

衛生学会総会，1998.

早藤知惠子，市川　久次，城所　敏英，鈴木とし子，長野みさ子，江島　有紀，窪山　　泉，伊藤　　挙，高橋たか子，山田　五月，深澤　啓治，山下　三雄：**東京都多摩地域の骨粗鬆症予防事業における尿中骨代謝マーカーの検討：第二報　年齢階級別評価**，第100回東京都衛生局学会，1998.

草野　友子，中村　　満，林谷　秀樹，小川　益男：**野生ネズミにおける薬剤耐性大腸菌とVERO毒素産生性大腸菌O-157の保有状況**，第125回日本獣医学会，1998.

大貫奈穂美，森　謙一郎，中村　義昭，横山　敏郎，松島　陽子，藤井　　孝：**キャピラリー電気泳動による化粧品中タール色素の一斉分析**，日本薬学会第119年会，1999.

大久保智子，長井二三子，牛山　慶子，加納　いつ：**タモキシフェン関連化合物のDNA傷害作用**，第57回日本癌学会総会，1998.

大橋　則雄，天川　映子，荻原　　勉，佐藤　寛，有松　真保，鎌田　国広，鈴木　助治：**野菜中の塩素系残留農薬の調査**，平成10年度地研協議会関東甲信静支部理化学研究部会，1999.

大山　謙一，鈴木　孝人：**カビ抗原によるIgE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**，第39回大気環境学会年会，1998.

大石　向江，蓑輪　佳子，伊瀬　　郁，諸角　　聖，池田　正幸，渡邊　泰男，菅野修一郎：**酵素活性測定標準化の試みー東京都・特別区衛生検査機関における生化学精度管理調査よりー**，第100回東京都衛生局学会，1998.

大石　向江（共），熊坂　一成，山口　恵三，蓑輪佳子，伊瀬　　郁，五十嵐英夫，諸角　　聖，河野　均也：**微生物検査外部精度アセスメントの現状と問題点ー第16回東京都衛生検査所精度管理調査結果報告ー**，感染症学会，1999.

池田　一夫，上村　　尚：**インターネットによる人口動態統計情報の提供**，日本人口学会第50回大会，1998.

竹葉　和江（共），伊藤　裕子，岡　　尚男，加賀美忠明，猪飼　誉友：**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3報）UV-HPLCによる肝臓中のペニシリン系抗生物質の分析**，第76回日本食品衛生学会，1998.

中川　好男，田山寿美子：**パラヒドロキシ安息香酸エステル類の肝細胞における代謝と毒性**，第13回日本薬物動態学会，(1998, 11).

田山寿美子，中川　好男：**没食子酸プロピルのCHO－K1細胞への細胞遺伝子学的作用**，第27回日本環境変異原学会，(1998, 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，上村　　尚，関田　節子，佐竹　元吉，西　孝三郎：**サボテン科ウバタマ中の麻薬成分メスカリン含量**，地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第11回理化学研究部会，1999.

長谷川道弥，吉田　靖子，田部井由紀子，平田　一郎，関根　大正：**エコー30型ウイルスによる無菌性髄膜炎の流行について**，第30回関東甲信静支部ウイルス研究会，1998.

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，味澤　　篤，増田　剛太：**HIV-1 RNA定量におけるサブタイプの影響**，第12回日本

エイズ学会総会，1998.

田端　節子，井部　明広，小沢　秀樹，宮川　弘之，貞升　友紀，安田　和男：**リンゴ加工品中のパツリンについて**，第76回日本食品衛生学会，1998.

田端　節子，上村　尚，田辺　信三：**亜硫酸水素ナトリウムによるアフラトキシンB1の変換生成物に関する検討(2)ー毒性ー**，日本薬学会第119年会，1999.

島村　保洋，菊地　洋子，広門　雅子，安田　和男，西島　基弘：**食品中のGenistin, Genistein, Daidzin及びDaidzeinの含有量調査**，第76回日本食品衛生学会，1998.

藤川　浩，和宇慶朝昭，五十嵐英夫，伊藤　武：**アレニウスモデルおよびZ値モデルによる中温微生物の熱死滅速度の解析**，第25回日本防菌防黴学会，1998.

藤川　浩：**カビによるココナッツ油からの香粧臭発生**，第25回カビ毒研究連絡会，大府市，1998.

藤川　浩，中里　光男，和宇慶朝昭，諸角　聖，伊藤　武，明田川　純，田村　弘志：**市販ミネラルウオーターに接種した真菌の増殖挙動**，第19回日本食品微生物学会学術総会，1998.

藤田　博，吉田　誠二，小縣　昭夫，安田　和男：**天然添加物の安全性試験（エームス試験，in vivo染色体異常試験，マウス全胚培養法試験による検討）**，第4回日本食品化学学会，1998.

萩原　輝彦，安野　哲子，船山　恵市，伊藤　弘一，鈴木　助治：**LC/APCI-MSによるしょう油中のアスパルテーム及びジケトピペラジンの分析**，第75回日本食品衛生学会，1998.

萩野　賀世，田口　信夫，山田　洋子，鈴木　助治：**生鮮野菜に使用されたリン酸の簡易定量法**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

畠山　薫，諸角　聖，伊藤　武：**小学校で飼育されていた家兎の破傷風**，東京都公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会，1998.

畠山　薫，甲斐　明美，尾畑　浩魅，諸角　聖，五十嵐英夫，伊藤　武：**東京都内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126回日本獣医学会，1998.

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：**毒素産生株と非産生株が同時に分離された大腸菌O169：H41による集団下痢症事例**，第72回日本感染症学会総会，1998.

飯田　孝，神崎　政子，宮崎　奉之：**各種小動物における人畜共通感染症起因菌の保有調査**，第126回日本獣医学会，1998.

尾畑　浩魅，柴田　幹良，畠山　薫，横山　敬子，新垣　正夫，門間　千枝，柳川　義勢，小西　典子，和田真太郎，松下　秀，甲斐　明美，諸角　聖，伊藤　武：**OK不一致の腸炎ビブリオ血清型O4：K68の新たな出現について**，第72回日本細菌学会総会，1999.

尾畑　浩魅，甲斐　明美，松下　秀，柳川　義勢，諸角　聖，伊藤　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**下痢症由来腸炎ビブリオ血清型O3：K6の推移とOK不一致O4：K68株の出現**，第32回腸炎ビブリオシンポジウム，1998.

尾畑　浩魅，畠山　薫，横山　敬子，門間　千枝，新垣　正夫，甲斐　明美，松下　秀，五十嵐英夫，伊

藤　武，太田　建爾，工藤　泰雄：**食中毒および海外旅行者下痢症から分離された腸炎ビブリオ血清型O3：K6について**，第71回日本細菌学会総会，1998.

尾畑　浩魅，小西　典子，畠山　薫，甲斐　明美，諸角　聖，五十嵐英夫，伊藤　武：**惣菜の調理過程と腸管出血性大腸菌O157の死滅**，第19回日本食品微生物学会学術総会，1998.

下島優香子，遠藤美代子，奥野　ルミ，榎田　隆一，村田以和夫，五十嵐英夫，三和　敬史，福山　真弓，酒井ルミ子：**過去2年間に新生児発疹性疾患患者から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型及び毒素産生性**，第80回日本細菌学会関東支部総会，1998.

平田　恵子，伊藤　弘一，広門　雅子，植松　洋子，鈴木　公美，鈴木　助治，斉藤　和夫：**キャピラリー電気泳動によるブドウ果皮色素及びベリー類色素中の亜硫酸の測定**，第75回日本食品衛生学会，1998.

牧野　国義：**学童の欠席率への浮遊粒子状物質の影響**，第57回日本公衆衛生学会，1998.

牧野　国義，栗田　雅行，佐藤　泰仁：**浮遊粒子状物質濃度の変動に関する検討**，第39回大気環境学会，1998.

木村　圭介，嶋村　保洋，福森　信隆，友松　敏夫，西島　基弘：**顕微鏡による人及び動物の毛の判別**，日本食品衛生学会第75回学術講演会，1998.

木村　圭介，広門　雅子，鈴木　敬子，貞升　友紀，勝木　康隆，安田　和男，西島　基弘：**食品中のキノン系及びフラボノイド系天然着色料の分析**，日本食品衛生学会第76回学術講演会，1998.

門間　千枝，柳川　義勢，新垣　正夫，横山　敬子，尾畑　浩魅，畠山　薫，柴田　幹良，諸角　聖，伊藤　武，松村美由起，岩田　誠，菊池　賢，志関雅幸，戸塚　恭一：**グリーンオリーブの塩漬けによるB型ボツリヌス食中毒事例**，第73回日本感染症学会，1999.

門間　千枝，畠山　薫，尾畑　浩魅，横山　敬子，新垣　正夫，甲斐　明美，柳川　義勢，五十嵐英夫，伊藤　武：**既知エンテロトキシン非産生ウェルシュ菌によると推定された食中毒事例について**，第72回日本感染症学会，1998.

門間　千枝，柳川　義勢，畠山　薫，尾畑　浩魅，横山　敬子，新垣　正夫，甲斐　明美，諸角　聖，五十嵐英夫，伊藤　武：**新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウェルシュ菌とその下痢原性毒素について**，第72会日本細菌学会総会，1999.

門間　千枝，柳川　義勢，畠山　薫，尾畑　浩魅，横山　敬子，新垣　正夫，甲斐　明美，諸角　聖，五十嵐英夫，伊藤　武：**新型エンテロトキシン産生ウェルシュ菌によると推定された食中毒事例と分離菌株の性状について**，第19回日本食品微生物学会，1998.

門間　千枝，柳川　義勢，新垣　正夫，横山　敬子，畠山　薫，柴田　幹良，諸角　聖，小久保彌太郎：**東京都内で発生したグリーンオリーブによるB型ボツリヌス食中毒事例**，平成10年度地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会第11回総会，1999.

仲本　敦，豊田　和正，新里　敦，健山　正男，小出　道夫，川上　和義，草野　展周，斎藤　厚，名嘉　恒守，久高　潤，門間　千枝，柳川　義勢：***Clostridium perfringens*** **type A（A型ウェルシュ菌）による集団食中毒事例の検討**，第73回日本感染症学会，1999.

松村美由起，近藤　裕美，竹内　　恵，内山真一郎，岩田　　誠，菊池　　賢，志関　雅幸，戸塚　恭一，相川　隆司，門間　千枝，柳川　義勢：**イタリア産グリーンオリーブによるB型ボツリヌス中毒の8症例**，第73回日本感染症学会，1999.

野尻　宗子，田口　信夫，大石　充男，鈴木　助治：**HPLCによる菓子類中の糖アルコールの分析法**，日本食品衛生学会，1998.

矢口久美子，鈴木　俊也，小西　浩之，五十嵐　剛，稲葉美佐子，近藤　治美，鈴木　助治：**ディスク型固相を用いた環境水中のアルキルフェノール及びビスフェノールAの分析**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

狩野　文雄，松本　　寛，酒井　茂克，北村　守次，柿本　　均，村橋　　毅，早川　和一，馬場　謙三，嵐谷　圭一，今野　　登，中明　賢二：**札幌，東京，金沢，北九州の大気浮遊粉塵の変異原性ーYG10008株（ＣＨＬ）による比較ー**，1998.

狩野　文雄，篠原　克明，浜崎　　浩，鈴木　幹雄，北林　厚生：**空調機吸い込み口フィルターの浮遊微生物捕捉効率に関する基礎的検討**，第25回日本防菌防黴学会，1998.

狩野　文雄，浜崎　　浩，菅又　昌実，木原　光城，中村　明子，篠原　克明，北林　厚生，小松　俊彦：**空調機内部の抗菌化による機内付着微生物数の低減効果**，第25回日本防菌防黴学会，1998.

狩野　文雄，斉藤　昌和，天野　雅則：**超音波式と気化式加湿器における細菌飛散機構と制御**，第25回日本防菌防黴学会，1998.

狩野　文雄，大河内正一，丸山　将宣，石原 義正：**熱量計によるMethyl-2-benzimidazole carbamateの抗カビ評価**，第26回日本防菌防黴学会，1999.

狩野　文雄，篠原　克明，浜崎　　浩，上薗 正行，印南　幸夫，北林　厚生，藤井　弘毅，杉山　和良：**中性能フィルターの浮遊微生物捕捉効率に関する基礎的検討**，第26回日本防菌防黴学会，1999.

狩野　文雄，浜崎　　浩，篠原　克明，戸倉 伯之，印南　幸夫，北林　厚生：**空調機吸い込み口フィルターの浮遊微生物捕捉効率に関する基礎的検討**，第14回日本環境感染学会，1999.

狩野　文雄，竹内　正博，土屋　悦輝，大塚　陽子，上田　豊甫：**大気関連化学物質のエストロジェン様活性**，第2回日本内分泌撹乱化学物質学会，1999.

矢野　一好：**ウイルス性食中毒の現状と検査法**，日本薬学会第119年会，1998.

矢野　一好，古畑　勝則，竹内　正博：**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**，日本防菌防黴学会，第25回年次大会，1998.

林　　志直，加藤　　玲，尾形　和恵，森本　敬子，吉田　　勲，伊藤　忠彦，山田　澄夫：**多摩地区の急性胃腸炎患者からのウイルス検索ー腸管アデノウイルスを中心にー**，第73回日本感染症学会総会，(1999, 3).

鈴木　俊也，,矢口久美子，小西　浩之，五十嵐　剛，稲葉美佐子，近藤　治美：**ディスク型固相を用いた環境水中のフタル酸エステル及びジカルボン酸エステルの分析**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

鈴木　　淳，西谷　　潔，吉村　直子，井上　佳子，

安田　一郎，村田以和夫：**アニサキス殺虫活性物質ジアリールヘプタノイド類の合成と構造活性相関**，日本薬学会第119年会，1998.

鈴木　仁，勝木　康隆，小川　仁志，鈴木　敬子，松本ひろ子，安田　和男：**イオンクロマトグラフィーによるミネラルウォーター中のフッ素及びその他の陰イオン物質含有量調査**，日本食品衛生学会第76回学術講演会，1998.

和宇慶朝昭：**低真空走査型電子顕微鏡による真菌観察**，第25回カビ毒研究連絡会，1998.

観　照雄，山野辺秀夫，都田　路子，藤井　孝：**衣料用防虫剤，トイレタリー製品中のパラジクロロベンゼンの調査結果**，第35回全国衛生化学技術協議会年会，1998.

小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，長澤　明道，青木　直人：**ツヤプリシン投与時におけるマウス胎児の発生異常についての観察**，第87回日本病理学会，1998.

小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，長澤　明道，小川　仁志，安田　和男，青木　直人：**天然添加物ヒノキチオールの催奇形性について**，日本食品衛生学会第75回学術集会，1998.

小縣　昭夫，安藤　弘，久保　喜一，長澤　明道，青木　直人：**天然添加物ヒノキチオールの催奇形性**，1998.

Seiji.KANEKO, Naoto. ISHIZAKI, Masato.HIGASHIDE, Chika. NAMEKATA：**Changes in Biotypes of *Yersinia enterocolitica* Serotype O3 Isolated from Humans in Japan**, Seventh International Congress on Yersinia, 1998.

Shunichi Fukano：**Computer Simulations of Environmental Pollutants Based on Physiological Pharmacokinetics**，第4回国際ポルフィリン・ヘムシンポジウム，1998.

Tadahiko. Ito（共），M.Kawahara, C.Suto, Y.Rikihisa, S. Shibata, T. Ito, H. Fujitak. Hirai：**Characterization of Ehrlichia spp. Isolated from wild mice and ticks**, serosurvey of humans and animals for exposure to monocytic Ehrlichia spp., Meeting of American Society for Microbiology,（1998, 5）.

Tomoko Fujitani, Yukie Tada, Masako Yoneyama：**Hemotoxicity of chlorpropham and its recovery**, XIIIth International Congress of Pharmacology, 1998.

Yataro Kokubo：**Application of HACCP Concepts to Meat Products in Japan**, 2nd. International Food Safety HACCP Conference, 1998.

Ichiro. Yasuda：**The Consumption and Usage Control of Herbal Medicine in Japan**, International Symposium on The Worldwide Herbal Industry, 1998.

Akemi Kai, Hiromi Obata, Kaoru Hatakeyama, Noriko Konishi, Shigeru Matsushita, Yoshitoki Yanagawa, Satoshi Morozumi, Takeshi Itoh and Yasuo Kudoh：**Epidemiological and bacteriological study on asymtomatic or intrafamilial cases of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Tokyo**, 34th Joint Conf. on Cholera, The U. S.-Japan Coop. M. S. P, 1998.

天川　映子：**輸入食品中の指定外添加物に関する衛生化学的研究**，第3回都立衛生研究所研究報告会，1998.

鈴木　俊也：**農薬による地下水汚染に関する調査研究，第3回都立衛生研究所研究報告会**，1998.

矢野　一好：**水の再利用とウイルスの制御**，試験研究機関等公開シンポジウム（ラボネット98），1998.

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

大　西　和　夫（委員長）

諸　角　　聖	伊　藤　弘　一
平　田　一　郎	青　木　直　人
藤　井　　孝	神　保　勝　彦
宮　崎　泰　之	鈴　木　助　治
齋　藤　和　夫	藤　田　清　二

2000年1月発行

登録番号11(17)

東京都立衛生研究所研究年報第50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）