調査資料

しょう油のパラコート汚染例について

(昭和 51 年 9 月 29 日受理)

上田 雅彦* 田 植 栄* 竹林 生夫*
岡 林 久* 山 本 義男*

The Paraquat Contamination in Soy Sauce

Masahiko UYETA, Sakae TAUE, Ikuo TAKEBAYASHI, Hisa OKABAYASHI
and Yoshio YAMAMOTO

(Kochi Prefectural Public Health Laboratory: 4-1, Marunouchi 2-chome, Kochi)

まえがき

昭和 50 年 1 月高知県幡多郡三原村におけるすきやきが原因食と考えられる食中毒例が報告された。患者は山林労務に従事する一家族の夫 (60 歳)、妻 (58 歳) の 2 人で、潜伏時間約 20 時間後、発熱、嘔吐を伴わない腹痛、下痢の症状を呈し二、三の病院で受診したところ、糖尿病、急性腎炎、胃腸炎、高血圧症などと診断された。夫は発病 8 日後に発作を起こして死亡し、死因は脳卒中、糖尿病と報告され、妻は急性腎炎で加療した。その後の調査により、調理に使用したしょう油がすきやき中のこんにゃくを紫色に変色させたことが判明し、そのことからしょう油の使用残品が食中毒被検試料として研究機関に送付され、検査の結果、除草剤パラコートが検出された。パラコートは商品名をグラモキソンといい、マウスの経口 LD₅₀ が 53 mg/kg で、医薬用外劇物指定の非ホルモン性、接触タイプのピピリジウム系除草剤で、苗代、休閑田、畑、果樹園などの雑草の駆除に使用される。製剤は濃度が 24%、特異な臭気をはなつかっ色の液剤で、昭和 48 年度生産量は 3,000 KL とされているが、他の農薬と同様、諸外国でも我が国でも多くの人身事故例が報告されている。この食中毒事例におけるしょう油の汚染原因は現在なお不明のままであるが、極めて特殊な農薬汚染事例と考えられるのでその検査の概要を報告する。

実験方法

試料

しょう油 3 検体。未開封の同一メーカー製品 (No. 1)、同時購入品 (No. 2)、変色要因をもつ使用残品 (No. 3) の 3 種類。共に淡青色透明 1.8 L ガラスビン入の濃口しょう油で愛媛県宇和島市の醸造会社の製品。原材料として脱脂大豆、小麦、食塩、アミノ酸液、調味料、合成甘味料、合成保存料を使用した旨の標示があった。外観は 3 種のうち、使用残品ですきやきの変色要因となつたと称される検体にかすかに異臭とあわ立ちが多いことを認めた他は、色沢、味などに特に異常は見いだされなかった。

検査方法

1. 化学分析

(1) 一般成分: “食品検査法”¹⁾により比重、pH、滴定酸度、食塩量、総窒素、エキスなどを求めた。

(2) 合成保存料: エーテル抽出物を GC で分析した²⁾。

(3) 有害性金属: ロ紙上で乾燥した 200 mg の試料についてけい光 X 線分析法³⁾により水銀、ヒ素、鉛、カドミウム、クロム、銅、亜鉛などを分析した。

(4) 有機塩素、有機リン農薬: Multiple residue method⁴⁾により BHC, DDT, ドリン系農薬、PCB、ダイアジノン、パラチオン、EPN などの検出を行った。

(5) その他の有害物質: 遊離シアンをピリジンピラゾロン比色法⁵⁾で、総フッ素をランタンアリザリンコンプレクソン比色法⁶⁾で分析した。

* 高知県衛生研究所: 高知市丸の内 2-4-1

(6) しょう油中のパラコートの確認: 水溶液における 258 nm の UV 吸収, 酸性, 中性, アルカリ性下へキサン, ベンゼン, エーテル, クロロホルムに不溶, 水, アルコールへの溶解, 透析性でアルカリに不安定, 水溶液における反応性陽イオンの形成, アルカリ性下の青紫色呈色反応⁷⁾, メタノール, 水可溶部の陽イオンフラクションの赤外吸収スペクトル⁸⁾ によって確認した。

(7) しょう油中のパラコートの赤外吸収スペクトルの測定: 試料 50 g をとり, メタノール 200 ml を加えて生ずる沈殿をろ過し, ろ液を減圧濃縮した後, 残留物を水 20 ml に溶かす。再びメタノール 200 ml を加えてろ過, ろ液を濃縮した後, 残留物を水 10 ml に溶かす。さらにもう一度この操作を繰り返して残留物を水に溶かして 10 ml とする。この液を Dowex 1X-2, 2×10 cm のカラムに流し, 水で溶出する。最初の 10~30 ml を取り, 減圧で濃縮するとき, 淡黄色ロウ状物 39 mg を得た。これを(株)島津製作所製赤外分光光度計 IR-27G を用いた KBr-disk 法による IR スペクトルを得た。

(8) しょう油中のパラコートの定量: 258nm の UV 吸収および, 次亜硫酸ナトリウムの 0.1N 水酸化ナトリウム溶液 (1%) による発色法^{7), 10)} によった。

2. 細菌検査

(1) 生菌数: 標準寒天培地で 37°, 24 時間混釈培養した後, コロニー数を測定した。

(2) 殺菌作用試験: 三つの試料のうち変色要因しょう油に生菌が検出されなかったので, このしょう油の殺菌作用を問題視し, *E. coli* O-136 株および対象しょう油から検出したグラム陽性大桿菌 1 株を使用し, 各種の倍率に希釈した試料を加え, ブイヨンにて 37°, 96時間

殺菌作用を観察した。

3. 毒性試験

(1) 経口投与試験: dd Ys 系 4 週令, 体重 15~21 g のマウスのオス 3 匹, メス 2 匹計 5 匹を 1 群とし, 3 種類のしょう油を 1 日 1 回 0.3 ml ずつ胃ゾンデを用いて強制経口投与した。飼料は日本配合飼料(株)固形飼料 CE-2 を与え, 7 日間観察した後, 剖検に付した。なおグラモキシソンの 2.7% 溶液についても同様に行った。

(2) 病理組織検査: ホルマリン固定の肺, 肝, 心, 腎, 脾の各臓器について, パラフィン包埋, 切片のヘマトキシリン・エオシン染色標本を作製, 顕微鏡による病理所見を得た。

実験結果および考察

1. 化学分析について

化学分析によって得られた結果を Table 1 に, 確認のためのしょう油抽出物の IR スペクトルを Fig. 1 に, 定量に利用するしょう油中のパラコートのアルカリ性下の発色を示す可視スペクトルを Fig. 2 にそれぞれ示した。

Table 1 から被検しょう油は共にごく一般的な組成をもつ製品とみられるが, Fig. 1 および 2 から除草剤の一種パラコートが検出されたことになる。

この食中毒事例は, 潜伏時間, 症状などからは必ずしも有毒化学物質は推定し得ないので, まず一般的な有害物質の分析を進めたが, 中毒原因となるべき有害性金属, 農薬, シアンなどはほとんど検出されなかった。パラコート検出のヒントになったのは, このしょう油をそのまま水で希釈した場合の 258 nm における強い吸収と, イオン交換樹脂に対する挙動, すなわち, Dowex

Table 1. Chemical Analysis of Soy Sauce

Measured parameter	Soy sauce-1 (control)	Soy sauce-2 (control)	Soy sauce-3 (discolored)	Notes
sp. gr., 15°C	1.146	1.138	1.133	1.183*
NaCl, %	18.48	17.61	17.32	18.17
Total-N, %	0.54	0.62	0.52	1.40*
Titrn acidity	8.90	9.00	7.30	18.05*
pH	4.63	4.75	4.73	4.69*
Extract, %	21.64	20.84	20.06	
Benzoic acid, ppm	3.4	4.2	362	
Hg, As, Pb, Cr, Cu, Zn	ND	ND	ND	
BHC, ppm	ND	ND	0.023	
DDT, dieldrin, endrin	ND	ND	ND	
Diazinon, EPN, parathion, malathion	ND	ND	ND	
Free-CN	ND	ND	ND	
F, ppm	9.7	7.4	7.9	
Diquat	ND	ND	ND	
Paraquat, %	ND	ND	(0.72 as paraquat 2.7 as Gramoxon formulation)	

* The values in reference 1

Fig. 1. IR spectra of soy sauce extracts

Fig. 2. Absorption spectra of Gramoxone and paraquat in soy sauce by AOAC method.

50W-2 のような強酸性樹脂に極めて強く吸着され、N-塩酸のような強酸でも溶離しないが、逆に Dowex 1X-2 のような強塩基性樹脂では全く吸着されないでそのまま通過すること、なかでも最も特異なのはこのしょう油が

アルカリ性下に美麗な青紫色に発色することであった。この発色は還元剤の存在下でやや安定し定量に利用され、その機構は Fig. 2 に示したようにパラコートが1個の電子を受容してフリーラジカルとなり、発色すると

されている^{10),11)}. このことからすきやき中のこんにゃくの発色も説明可能であろう.

しょう油が青紫色に発色することなど予想もしなかったし、分析担当者は忘れ得ぬ経験であったが、パラコートに到達するまでに約20日間を要しており、有害毒物検索に関する適当なデータ集などがあればもっと速やかに検出することができたと思われる. なおしょう油のメタノール抽出物の IR スペクトルは Fig. 1 にみるように標品とよく一致し、最終的にパラコートと同定された. またパラコートの定量法は比色法^{7),9),11)}, けい光法¹²⁾, GC 法^{13)~16)}, HLC 法¹⁶⁾など各種の方法があるが, UV 258 nm の吸収および AOAC 法^{7),9)}の定量値はよく一致し, 変色要因しょう油中のパラコートとして 0.72%, グラモキソン液剤として 2.7% を検出した.

2. 細菌試験について

標準寒天平板の生菌数は対象しょう油が 1100~1800/ml で, 主としてグラム陰性桿菌およびグラム陽性大桿菌を検出したのに比べ, 変色要因しょう油には生菌を認めなかったの, ハートインヒュージョンブイヨンで増菌を試みたが, なお菌の発育がみられなかった. そこでこのしょう油の殺菌性について試験したところ, *E. coli* については試料の3倍液まで, グラム陽性大桿菌については100倍液まで陰性でしょう油中に若干の殺菌作用をもつ物質の混入が疑われた. このことはパラコートが第4級アンモニウム塩基のためであろうと推定される.

3. 毒性試験について

マウスの経口投与試験において2種の対照しょう油投与群は対照群に比し, 成長がやや抑制されたのみで外観, 剖検所見に異常を認めなかった. しかし変色要因しょう油は投与開始後4~6日までに全例死亡し, 死亡時の体重は開始時に比べ平均24.8%減少した. 死亡例は外観にほとんど変化をみないが, 剖検により全例肺に著明なうっ血を認めた. 肝重量は対照群に比して変化なく, 肺以外の肝, 心, 腎, 脾など他臓器に肉眼的に著変を認めなかった.

2.7% グラモキソン液剤投与群も3~5日以内に全例死亡し, 死亡時の体重は開始時に比し平均22.5%減少した. 死亡例は外観にほとんど変化を認めないが, 剖検により5例中3例に肺のうっ血を認めた. また肝重量は対照群に比し変化なく, 肺以外の肝, 心, 腎, 脾などの他臓器には肉眼的に著変を認めなかった.

これらの投与実験からしょう油中にはマウス致死毒があり, その毒物は主に肺を標的臓器として毒性を発揮することがみられ, 2.7% グラモキソン液剤投与例によってその毒性要因を追認した結果となった.

次いで変色要因しょう油投与による死亡マウス5例と2.7% グラモキソン投与による死亡マウス2例計7例について病理組織検査を行った. 7例共その程度に多少の差はあるが, 共に上表にみるような共通した病変が認め

臓器	病 理 所 見
肺	うっ血肺, 漏出性肺出血, 一部肺水腫
肝	うっ血肝, 肝細胞顆粒状変性, 一部空胞変性, 肝細胞崩壊
心	心筋顆粒状変性, 横紋の消失
腎	うっ血腎, 一部漏出性尿細管内出血, 尿細管上皮細胞の顆粒状変性と一部崩壊
脾	うっ血脾

られた.

これらの病理所見からしょう油中の毒物は各臓器に著明なうっ血をもたらし, 心, 肝, 腎には実質毒として作用し, 細胞の変性, 高度の場合は細胞崩壊をきたす場合もあり, 直接的には心筋の変性による心不全で死をきたしたものと思われ, しょう油による死亡例とグラモキソンによる死亡例との病理所見には質的にはほとんど差はないと考えられた.

これらのマウスによる毒性試験の結果は, ヒトの事故例^{17)~22)}に比べてもかなりよく符号し, 化学分析によるパラコートの検出を十分に支持し, 変色要因しょう油中の毒性物質の同定を裏づけた.

結 論

昭和50年1月高知県幡多郡三原村におけるすきやきを原因食とする食中毒事例は, 使用したしょう油の化学分析, 毒性試験の結果よりみて, 除草剤パラコート0.72%, 24% グラモキソン液剤として2.7%が検出され, 事実上これが中毒原因物質と推定された.

このような全く不明の有害性化学物質の分析に当たり, 多くの有害毒物の化学的性状, 分析方法などを集積したデータ集の必要性と, 大量生産される製品の単独中毒例は, ややもすれば軽視され原因不明のまま終わるケースが多いが, その解明については十分慎重な配慮が必要だと痛感した.

なお本報の要旨は昭和50年5月15日, 日本食品衛生学会第29回学術講演会(東京)で発表した.

文 献

- 1) 日本食品衛生学会編: “食品検査法” p. 12 (1965), 金原出版.
- 2) 西本孝男, 上田雅彦: 食衛誌. 6, 231 (1965); 8, 118 (1967).
- 3) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 289 (1973), 金原出版.
- 4) “Methods of Analysis-A.O.A.C.” 12th Ed. p. 518 (1975), A.O.A.C. Washington, D.C.
- 5) 通産省: JIS KO102, 29.1.1.2 (1971).
- 6) 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 320 (1973), 金原出版.
- 7) “Method of Analysis-A.O.A.C.” 12th Ed. p. 116 (1975) A.O.A.C. Washington, D.C.

- 8) Haque, R., Lilley, S.: J. Agr. Food Chem., **20**, 57 (1972).
- 9) Pobe, J.D., Beuner, J. E.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **57**, 202 (1974).
- 10) White-Stevens, R.: "Pesticides in the Environment" **1**, part I, 60 (1971), Marcel Dekker Inc., N.Y.
- 11) Yuen, S.H., Bagness, J.E., Myles, D.: Analyst, **92**, 375 (1967).
- 12) Freed, V.H., Rokert, E., Hughes, Jr.: Weed Sci., **7**, 364 (1959).
- 13) 鵜飼茂夫, 広津一雄, 河瀬章司: 衛生化学, **19**, 281 (1973).
- 14) Khan, S. M.: J. Agr. Food Chem., **22**, 863 (1974).
- 15) Soderquist, C.J., Crosby, D.G.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., **8**, 363 (1972).
- 16) Kawano, Y., Audino, J., Edlund, M.: J. Chromatogr., **115**, 289 (1975).
- 17) Bullivant, C.M.: Brit. Med. J., **1**, 1272 (1966).
- 18) Carson, E.D.: J. Forens Sci., **12**, 437 (1972).
- 19) 中村 功, 前田光雄, 森 允之, 三木章三, 寺西慶郎: 日内科誌. **62**, 1394 (1973).
- 20) 山下貢司, 青山 栄, 生田伸也, 三宅隆生, 相馬和雄: 日農医誌. **23**, 27 (1974).
- 21) Copland, G.M., Kolin, A., Shulman, H.S.: N. Engl. J. Med., **291**, 290 (1974).
- 22) Smith, P., Heath, D.: Thorax, **29**, 643 (1974).