東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

21

1969

はじめに

昭和44年東京都立衛生研究所において行なった調査研究をまとめて研究年報第21号としてここに報告いたします。

これまで20年にわたり年報という名で各年間の日常検査業務，調査研究，その他衛生研究所における一切の業務の実績を報告してきましたが，今回から調査研究に関する年間報告と，それ以外の業務の年間報告を分離し，前者は研究年報として，後者は事業概要として毎年報告することにしました。その方が事務処理上合理的であるとの結論によるものであります。

最近になって特に大気汚染，水質汚濁等のいわゆる公害の人体に及ぼす影響調査，食品添加物などの取締りなど公衆衛生上の緊急問題についての行政のニード，都民の世論等を背景に衛生研究所の試験検査業務は量的に著しく膨張するとともに質的にも極めて精密複雑化して参りました。このような状況下にありながら，職員諸君は困難に耐えながら，できるだけ調査研究もつづけて参りました。

この年報の中には，他の専門雑誌等に原著として発表したものは，その抄録を収めるに止め，重複して掲載することを避けました。

つぎに，当所の英文名は設立時 Tokyo-to Laboratories for Medical Sciences とし，現在まで使われて参りましたが，設立当時と現状とでは著しく事情が変ってまいりまして，名称が実態を現わしていない点などもありましたので，この度 Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health に変えることにしました。

なお，先般美濃部知事が当所を視察された際，職員に与えられた挨拶は，衛生究研所のあり方の基本にふれる重要な意義をもつ所があると思われますので，知事の了承を得て，本年報に掲載し，所の今後のために残しておくことにいたしました。

昭和45年11月20日

東京都立衛生研究所長

辺野喜　正　夫

知事あいさつ

前から衛生研究所をおたずねしようと思っていましたが，今回やっとおたずねすることができました。

私達は，都民のための都政に従事しているもので，常に都民のためを考えなければなりません。

都政における最も重要な施策は「都民の生命と健康を守る」ことであります。とりわけ，皆さんのお仕事は，衛生行政に科学的裏付けを与える重要なものであり，これから更に拡充していかなければならないと思います。

皆さんは，試験，検査業務を行なうかたわら，個人的に基礎的研究を行なっていると思います。私も学者でありましたので基礎的研究の重要性は十分認識しています。しかし，都政に密着した研究もそれに劣らず重要であります。従来はこの面での研究は人の生活とはおよそかけ離れた大学の研究室で行なわれていましたが，これこそ衛生研究所とか，公害研究所とか，行政機関と結びついた研究機関で行なわれなければならないと思います。

そのために，皆さんには将来研究時間の余裕を今よりも多くしてあげたいし，学会にもどしどし出席して勉強してもらいたい。

更に海外留学や国際会議に出席する機会も多くしてあげたいと思います。又，食品添加物やうそつきの食品等が現在，特に問題になっていますが都民のための衛生行政を推進するために毒性研究部の設置等，衛生研究所を拡充強化していくつもりです。

以上のように，試験研究機関の重要性は今後ますます重くなり，皆さんのお仕事もこれから増えていくものと思いますが，どうか頑張ってやって頂きたいと思います。

44.12.23

衛生研究所視察に際して

目　　次

1　腸炎ビブリオ溶血毒の精製およびその性状について……一言　広　諸角　聖… 1
太田　建爾　善養寺　浩

2　腸内ウィルス感染症の実態は握に関する研究（第２報）……岩崎　謙二　柏木　義勝… 9
1969年１～12月における東京都内の未処理下水からのウィルス分離について　山田　澄夫　坂井冨士子
藪内　清　根津　尚光
大里　一夫　宮崎友治郎

3　1969年４月から1970年２月にかけて東京都内に発生したインフ……坂井冨士子　岩崎　謙二…15
ルエンザのウィルス学的血清学的検索成績　藪内　清　柏木　義勝
山田　澄夫　根津　尚光

4　1969年度東京都における疑似日本脳炎患者の血清学的検索成績……藪内　清　岩崎　謙二…19
および疫学的調査　坂井冨士子　柏木　義勝
山田　澄夫　根津　尚光
渡辺　賢哉　森脇　康一

5　Negative 染色法によるインフルエンザウィルスの電顕観察法 ……前木　吾市　坂井冨士子…25
藪内　清　岩崎　謙二
根津　尚光　辺野喜正夫

6　1969年東京都民の風疹ＨＩ抗体保有状況について……岩崎　謙二　坂井冨士子…31
藪内　清　山田　澄夫
柳沢　靖子　佐々木憲子
伊藤　忠彦　佐々木路子
根津　尚光

7　ペーパーデスク法における阻止円形成に及ぼす２，３の影……松本　昌雄　神保　勝彦…35
響について　春田三佐夫

8　食品における Pseudomonas fluorescens の分布と酸素活性……直井家寿太　小久保弥太郎…41
について　二島太一郎　松本　茂

9　サイクラミン酸のペーパークロマトグラフ上の顕色法およびペ……西垣　進　西島　基弘…45
ーパークロマトグラフィーによる人工甘味料の一斉分析につ　田村　行弘　松本　茂
いて

10　レッドチェリー缶詰の貯蔵中におけるキサンテン系色素の変化……田村　行弘　西島　基弘…47
について　西垣　進　松本　茂

11　合成樹脂製容器包装材料中の化学物質の食品への移行性に関す……藤居　瑛　佐藤弥代子…53
る研究　上田　工　松本　茂
塩化ビニル樹脂製の器具および容器包装について行なった規格試験結果の考察

12　添加物分析における食品成分の影響……二島太一郎　松本　茂…59
亜硫酸試験法について（Ⅰ）

13　添加物分析における食品成分の影響……松本　茂　二島太一郎…63
亜硫酸試験法について（Ⅱ）　永瀬　誠　蔵内　正行

14　ポーラログラフィー法による人工甘味料製剤中のサッカリン……遠藤　英美　青柳健太郎…67
の定量法　井口　光恵　広門　雅子

15　清涼飲料水用容器材としてのポリスチレンについて……遠藤　英美　大畠　敏子…71
藤居　瑛　青柳健太郎

16 人工肉の栄養学的検討……道口 正雄 五島 孜郎…79

17 発熱性物質に関する研究 Ⅱ……下平 彰男…83
化学的物質による体温変動

18 甘味料の呈色試験法について……松本 茂…89

19 有害性元素に関する衛生化学的研究（第一報）……戸谷 哲也 原田 裕文…93
紫外部吸収によるセレンの微量定量法 観 照雄 鈴木 助治

20 多量の Fe(Ⅲ) 共存下における鉛の定量法……戸谷 哲也 原田 裕文 101
観 照雄 鈴木 助治
山添 律子

21 月経処理用タンポン基準註解……西田 茂一 109

22 東京都における各種大気汚染物質間の相関および因子分析……野牛 弘 倉科 周介 115
鈴木 重任 佐藤 泰仁

23 有料道路料金所環境の料金収受員に及ぼす影響について……野牛 弘 両角 清 129
小林 正武 山崎 爽治
佐藤 泰仁 池田 真悟

24 水道水中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の同時検出につ……木村 康夫 山崎 堅吉 147
いて（第二報） 中村 弘

25 BOD 試験を妨害する物質について……三村 秀一 山崎 堅吉 151
笹野 英雄

26 土壌中における大腸菌の推移……松本 淳彦 159

27 依頼試験を中心としてみた三多摩地区浅層地下水の動向(1)……藤沢 正吉 斉藤 節子 165
鈴木 静

他誌に発表した論文および著書等 …… 171

CONTENTS

PURIFICATION AND PROPERTIES OF HEMOLYSIN FROM VIBRIO PARAHEMOLYTICUS ..... Hiroshi HITOKOTO, Satoshi MOROZUMI, Kenji OHTA and Hiroshi ZEN-YOJI··· 1

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON ENTEROVIRUS INFECTIONS (II) Virus isolations from untreated sewage of Tokyo 1969 ····· Kenji IWASAKI, Yoshikatsu KASHIWAGI, Sumito YAMADA, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI, Naomitsu NEZU, Kazuo OSATO and Tomojiro MIYAZAKI··· 9

VIROLOGICAL AND IMMUNOGICAL OBSERVATIONS ON THE PREVALENCE OF INFLUENZA IN TOKYO IN 1969····· Fujiko SAKAI, Kenji IWASAKI, Kiyoshi, YABUUCHI, Yoshikatsu KASHIWAGI, Sumito YAMADA and Naomitsu NEZU···15

ECOLOGICAL SURVEY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AND SEROLOGICAL CONFIRMATION OF ITS INFECTION ON SUSPECTED PATIENTS IN TOKYO IN 1969·····Kiyoshi YABUUCHI, Kenji IWASAKI, Yoshikatu KASHIWAGI, Sumito YAMADA, Naomitsu NEZU, Kenya WATANABE and Yasukazu MORIWAKI···19

NEGATIVE STAINING TECHNIQUE FOR ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF INFLUENZA VIRUS····· Goichi MAEKI, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI, Kenji IWASAKI, Naomitsu NEZU and Masao BENOKI···25

INCIDENCE OF HI ANTIBODY AGAINST RUBELLA VIRUS AMONG INHABITANTS OF TOKYO IN 1969····· Kenji IWASAKI, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI, Sumito YAMADA, Yasuko YANAGISAWA, Noriko SASAKI, Tadahiko ITO, Michiko SASAKI, and Naomitu NEZU···31

FACTORS AFFECTING ON THE FORMATION OF CLEAR ZONE IN THE DISK ASSAY METHOD·····Masao MATSUMOTO, Katsuhiko ZINBO and Misao HARUTA···35

DISTRIBUTION OF PSEUDOMONAS FLUOLESCENS IN FOODS AND OF ITS ENZYMATICS ACTIVITIES·····Yasuta NAOI, Yataro KOKUBO, Taichiro NISHIMA and Shigeru MATSUMOTO···41

STUDIES ON A NEW DETECTION METHOD OF CYCLAMATE ON THE PAPER CHROMATOGRAM AND ITS APPLICATION ON THE ANALYSIS OF SYNTHETIC SWEETENINGS IN FOODS·····Susumu NISHIGAKI, Motohiro NISHIZIMA, Yukihiro TAMURA and Shigeru MATSUMOTO···45

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE REDUCTION OF XANTHENE DYES DURING THE STORAGE OF CANNED RED CHERRIES····· Yukihiro TAMURA, Motohiro NISHIZIMA, Susumu NISHIGAKI and Shigeru MATUMOTO···47

STUDIES ON THE ELUTION OF CHEMICAL SUBSTANCES CONTAINING IN THE POLYVINYL CHLORIDE-PACKING MATERIALS FOR FOOD·····Teru FUJII, Yayoko SATO, Ko UEDA and Shigeru MATUMOTO···53

I NFLUENCE ON SOME NATURAL FOODS STUFF CONSTITUENTS AND ITS DERIVATIVES ON THE DETECTION OF FOOD ADDITIVES
Review made on the detection Procedures for SO_2 (1) ····· Taichiro NISHIMA and Shigeru MATUMOTO···59

INFLUENCE OF SOME NATURAL FOOD STUFF CONSTITUENTS AND ITS DERIVATIVES ON THE DETECTION OF FOOD ADDITIVES
Review made on the detection Procedures for SO_2 (2) ·····Taichiro NISHIMA, Shigeru MATUMOTO, Makoto NAGASE and Masaki KURAUCHI···63

STUDIES ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF SACCHARRINE IN ARTIFICIAL SWEETENERS BY PORAROGRAPHY ····· Fusayoshi ENDO, Kentaro AOYAGI, Mitue IGUCHI and Masako HIROKADO···67

STUDIES ON POLYSTYRENE FOR SOFT DRINK'S RECEPTACLES
····· Fusayoshi ENDO, Toshiko OHATA, Teru FUJII and Kentaro AOYAGI···71

NUTRITIVE EVALUATION OF MEAT ANALOGUE
····· Masao DOGUCHI and Shiro GOTO···79

STUDY ON FEVER-PRODUCING SUBSTANCES II
(Body Temperature with administration of Chemical Substances)·····Akio SHIMOHIRA···83

ON THE COLOR REACTIONS OF SWEETENENS·····Sigeru MATUMOTO···89

HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON HARMFUL ELEMENTS (1)
Microdermination of Selenium by Ultraviolet Absorption Spectrophotometry
····· Tetuya TOTANI, Hirofumi HARADA, Teruo KAN and Sukeji SUZUKI···93

DETERMINATION OF LEAD IN THE PRESENCE OF LARGE AMOUNTS OF IRON Ⅲ ····· Tetuya TOTANI, Hirofumi HARADA, Teruo KAN, Sukeji SUZUKI and Ritsuko YAMAZOE 101

THE EXPLANATORY NOTE of STANDARD OF MENSTRUAL TAMPON
····· ShigekazuNISHIDA 109

CORRELATION AND FACTOR ANALYSIS OF AIR POLLUTANTS IN TOKYO
·····Hiroshi YAGYU, Syusuke KURASHINA, Shigeto SUZUKI and Yasuhito SATO 115

ENVIRONMENTAL CONDITIONS AT A TOLL-GATE BOOTH AND OF THEIR INFLUENCE ON THE LABORS' HEALTH·····Hiroshi YAGYU, Kiyoshi MOROZUMI, Masatake KOBAYASHI, Soji YAMAZAKI, Yasuhito SATO and Shingo IKEDA 129

SIMULTANEOS DETECTION OF AMMONIA AND NITRITE NITROGEN IN TAP WATER (II) ·····Yasuo KIMURA, Kenkichi YAMAZAKI and Hiroshi NAKAMURA 147

STUDIES ON GROWTH INHIBITORS OBSTRUCTING BOD TEST
····· Shuichi MIMURA, Kenkichi YAMAZAKI and Hideo SASANO 151

HYGIENIC STUDIES ON ESCHERICHIA COLI IN SOILS ····· Atuhiko MATUMOTO 159

THE CHEMICAL RESEARCH AND MOVING DEGREE OF POLLUTION FOR SHALLOW GROUND OF SANTAMA DISTRICT IN THE METROPOLIS OF TOKYO
..... Masayoshi FUJISAWA, Setsuko SAITO and Sizuka SUZUKI 165

腸炎ビブリオ溶血毒の精製およびその性状について

一言　広*　諸角　聖*
太田建爾*　善養寺浩*

Purification and Properties of Hemolysin from Vibrio parahaemolyticus

Hiroshi HITOKOTO, Satoshi Morozumi
Kenji Ohta, and Hiroshi, Zen-Yoji

(Department of First Bacteriology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

The purification of a hemolysin produced by V. parahaemolyticus 4750 strain was accomplished by the three successive steps: i) precipitation with ammonium sulfate, ii) fractionation on DEAE-Cellulose column chromatography and iii) gel filtration by using of Sephadex G-100.

The hemolysin showed hemolytic activity against human erythrocytes and not against horse ones.

The hemolysin obtained finally on the gel filtration by using of Sephadex G-100 was not sufficiently purified and formed two precipitation bands against the corresponding antiserum on immuno-gel diffusion. However, this had remarkable lethal effect to mice (MLD 0.62μg N/mouse) and also its MHD against human erythrocytes was a 4096 fold.

The activity of the hemolysin against the erythrocytes from various kinds of animals was activated by the addition of Ca^{++}, and the hemolysin was thermostable in a treatment at 100°C for 10-20 min.

Additionally, from the results of chemical examination, it was concluded that the hemolysin was consisted of protein free from polysaccharides, lipids and organic phosphorus.

緒　言

腸炎ビブリオが溶血毒を産生することは，本菌が発見された当時から認められていた。加藤・小原ら[1]は，その溶血毒は耐熱性のたん白質から成り，ヒト血球は溶血するがウマ血球を溶血せず，マウスに対して強い毒性を有すると報告している。

その後，坂崎ら[2]は患者由来株の96%に溶血株が認められるのに対し，海水あるいは海水魚介類由来の株においては，わずか1%しか溶血株が認められず，さらに，非溶血株の人体投与実験を行なったところ，それらの株によって発症した例は1例も認められなかったと報告している。

また，宮本ら[3]は患者由来株の88～95%は溶血性を示すが，海水あるいは海水魚介類由来の株においては0.48～0.54%に溶血性が認められるにすぎない，したがって，本菌の病原性と溶血性との間には，何らかの相関々係が存在するらしいと述べている。

しかし現在までのところ，これらの点については何ら解明されていない。

そこで，著者らは，本菌の病原性あるいは起病性因

* 東京都立衛生研究所細菌第一部

子としての溶血毒の果す役割を検討する目的をもって，ヒト血球を溶血し，ウマ血球を溶血しない溶血毒の精製を試み，さらにその精製溶血毒の性状について検討を加えたので報告する。

実験方法

1) 使用菌株：

溶血毒の産生に用いた菌株は，患者から分離した株のうち，特に強い溶血毒を産生する V. parahaemolyticus 4750株（神奈川県衛生研究所・小原博士より恵与された）を用いた。

2) 培地：

溶血毒強産生集落の分離のために，ヒト血球の40%生理食塩水浮遊液を5%に加えた3% NaCl 加 BHI ヒト血球平板を使用した。

また，菌株の保存には，同じ培地組成の斜面寒天を使用し，1ヶ月毎に継代し，氷室に保存した。

また溶血毒産生用培地は菌の発育を極力おさえ，溶血力価の高い材料を得るために，BHI ブイヨン（Difco）を使用した。

3) 強溶血毒産生集落の選出：

溶血毒の分離のために，その産生能の強い集落をつぎの方法によって選出した。すなわち，4750株を3% NaCl 加 BHI ヒト血球平板に接種し，37°Cで18時間培養後，集落の形状ならびに透過光による溶血帯を観察し，その中で最も強い溶血能を示した集落を選出した。その集落は原株に比べて小さく，R-変異株で，溶血環の大きさは，その集落の直径の約3倍であった。

4) 培養条件：

強溶血毒産生集落を，BHI ブイヨンに0.2mg/ml に浮遊したものの0.2ml を容積500ml の三角フラスコ中の100ml の BHI ブイヨンに接種し，37°C，10時間，振幅10cm，振とう速度100回/分で振とう培養した。この培養液を 18,000×g，15分間遠沈したのち，ミリポアフィルター（NIHON MILLIPORE LTD. Tokyo, HA-Type）でろ過し，これを溶血毒精製の出発材料とした。

5) 溶血力価の測定：

毒素標品の最少溶血量の測定はつぎの方法で行なった。

試料を精製水で2倍希釈した系列を作り，その各 0.5ml に 0.15M $CaCl_2$ および 0.3M NaCl 加 0.02M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）の 0.5ml，さらに 0.02M Tris-HCl 緩衝生理食塩液に1%にヒト血球を浮遊させたものを 0.5ml 加え，37°C，2時間反応後，1夜氷室に保存して，完全溶血を示した最高希釈倍数を肉眼により判定し最少溶血量として，希釈倍数で表わした。

6) 硫安分画法：

遠沈およびミリポアフィルターによるろ過により，菌体を除去した培養上清に4°C の条件で 184.02g/l (30%飽和)の硫安を加え，4°Cで一夜静置後，18,000×g, 15分間遠沈した。その上清分画について，再度同量の硫安添加により生じた沈降物を集め，硫安30～60%飽和分画を得た。その分画を 0.005M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）に溶解したのち，4°Cで100倍量の同緩衝液を用いて外液を数回交換しつつ，48時間透析を行ない，pH7.5に補正した後，氷室に保存した。

7) Diethylaminoethyl（DEAE）セルロースによる分画法：

DEAE-セルロース（Brown 社製：exchange capacity 0.9 meq/g）を4°Cで0.1M NaCl 加 0.005M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）中で 20×2.5cm のカラムにつめ，硫安分画を 10ml 吸着させたのち，上記緩衝液300ml で非吸着画分を洗い，さらに0.25M食塩水，0.4M および 1.0M NaCl 加 0.005M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）を用いて step-wise elution を行なった。溶血活性とたん白濃度を測定した。ここで溶血活性の集中した分画をカーボワックス（10B）で最初の量に濃縮した。

8) セファデックスG-100によるゲルろ過：

セファデックス G-100 (Pharmacia Uppsala Sweden, particle size 40～120μ) を精製水で洗浄し，粒度をそろえたのち，0.005M Tris-HCl 緩衝液で5回洗浄したのち，4°Cで37×2.5cmのカラムにつめ，D-Ⅲ分画 10ml を約1/2量に濃縮したものを注入したのち，流速 10ml/hr で上記緩衝液を流し，各管5mlづつ分画した。これらの各画分の溶血力価とたん白量を測定したのち，活性の集中した画分を集め約100倍量の精製水で透析を行ない，コロジオンバッグ（Sartorius-Membran-filter GmbH）で濃縮し最初の量にもどし pH 7.0 に補正したのち凍結保存した。

9) 免疫電気泳動：

免疫電気泳動は Sheideger[4] の法に準じておこなった。すなわち pH8.6 Veronal 緩衝液（μ=0.05）の3容に水を1容加えたものに1%に寒天を溶解し，スライドグラス1枚に3 ml 流し使用した。

泳動には pH 8.6 Veronal 緩衝液（μ=0.05）を使用し，試料 0.02 ml を平板中央にスポットし，2mA/cm で2時間泳動したのち，密閉容器内で37°C，一夜おいたのち，抗粗溶血毒血清と反応させ，沈降体の有

無を観察した。

10) 寒天ゲル電気泳動による溶血活性の確認：

各分画を免疫電気泳動と同じ方法で泳動したのち，そのプレート上に5％ヒト血球を加えた BHI 寒天を重層し，37°C で2時間反応させた後，氷室（4°C）に一夜保存し，生じた溶血像から，溶血毒の存在を確認した。

11) 耐熱性試験：

各分画 2 ml を小試験管にとり，沸とう水浴中で，試料温度が100°Cに達したのち，10分間加熱した。その後直ちに4°Cに冷却後18,000×g 15分間遠沈し，またその上清の一部について同様な加熱処理をくり返し，その各々の上清部分について溶血毒力価の測定，マウスに対する致死毒性試験および寒天ゲル内沈降反応[5]を行ない，これらの溶血毒の熱に対する安定性を検討した。

12) 毒性試験：

各分画のマウスに対する致死毒性を検討するために，各分画およびその加熱処理（100°C 10分間：1回および2回）したもの各0.5mlを1群5匹のDD系白色，体重約20gのマウスの腹腔内に接種して，死亡時間を測定した。

13) 化学組成の検討：

たん白質濃度の測定は Bieuret 反応[6]により，有機リンは Allen の法[7]で，一般糖は Molish の法[8]で，脂質は paper chromatography で展開したのち，Rhodamin B染色および紫外線照射により判定した。また，たん白態チッ素は micro kjeldahl 法[9]で測定した。

14) 抗粗溶血毒血清の作製：

溶血力価32倍の C.F. 分画を60°C，30分加熱処理後，凍結保存し，免疫用抗原とした。この抗原を家免に6日間隔で10回総量 29.8ml を耳静脈より接種し，最終免疫後7日に全採血を行ない血清を得た。血清は非動化した後，−24°Cで凍結保存した。

15) 抗 G-100 分画血清

G-100分画に対する抗血清は，溶血力価 4,096 倍の G-100 分画と Freund の adjubant（Difco complete：）との等量混液を抗原として，5日間隔で4回，総量 5 ml を家兎の筋肉内に接種することにより得た。抗血清力価の測定および全採血後の処置は抗粗溶血毒血清の場合と同様に行なった。

16) 溶血毒中和抗体価の測定：

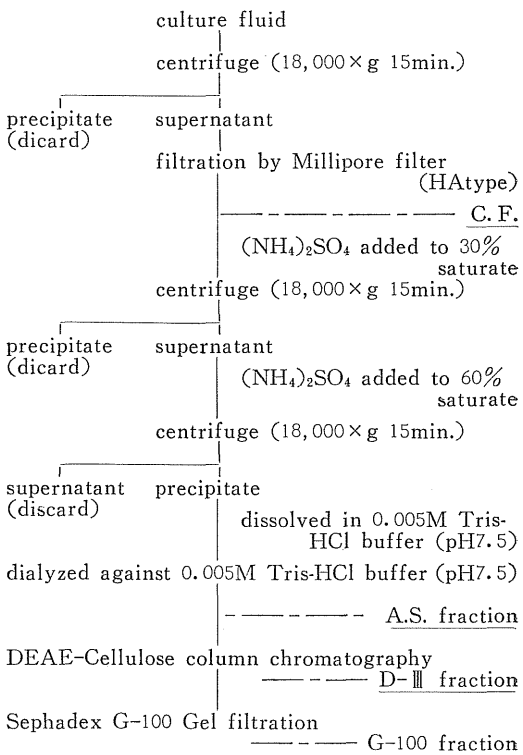
溶血毒中和抗体価の測定は以下の方法で行なった。すなわち，C.F. 分画の16倍力価（100％溶血力価の2倍量）の 0.25ml に 0.15M $CaCl_2$，0.3M NaCl 加 0.02M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）を0.5ml，および抗粗溶血毒血清の生理的食塩液による2倍希釈系列の各 0.25ml を加え 37°C に15分間保ったのち，1％ヒト血球および 0.145M NaCl 加 0.02M Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）の 0.5ml を加え，37°C 2時間反応後，4°C の氷室内に一夜おいたのち，100％溶血を阻止した最高希釈倍数をその血清の力価とした。

実験成績

精製方法：

溶血毒の精製は Fig.1 に示したように，3つの主な

Fig. 1 Process of Purification



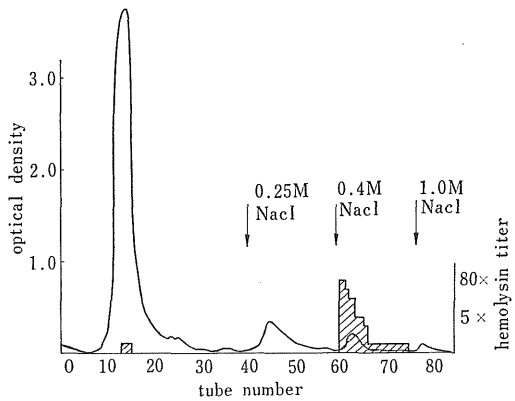
段階によって行なった。すなわち，3％食塩加血液寒天平板上から選出した強溶血毒産生集落を BHI ブイヨンに接種したのち，37°C 10時間振とう培養を行ない，その遠沈上清をミリポアフィルターでろ過した菌体除去上清（C.F.）を出発材料として，1)硫安分画法 2) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび 3)セファデックス G-100 によるゲルろ過により精製した。

培養上清の硫安分画では30～60％飽和分画に溶血活性の大部分が集中した。この分画を A.S. 分画と称し

た。

DEAE セルロース・カラムクロマトグラフィーではFig.2に示したように，280mμ吸光曲線から3つのたん白ピークが認められた。これらのピークのうち溶血活性は3番目のピークに集中的に見られた，これを

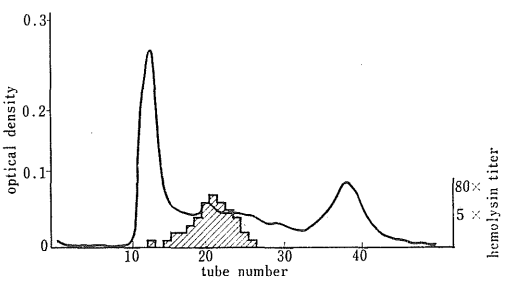
Fig. 2 Fractionation of A.S. fraction by use of DEAE-Cellulose,



Column size, 50 by 2.5cm ; material, 10ml of A.S. fraction ; starting buffer, 0.1M sodium chloride added to 0.005M Tris-HCl buffer (pH7.5) of 300ml ; eluants, 0.25M, 0.4 M and 1.0M sodium chloride solution of each 200ml ; flow rate, 100ml/hr ; eluate volume, 10ml/tube ; solid line, protein contents at 280 mμ (O.D.) ; hatched area, hemolysin activities.

D-Ⅲ分画とした（0.4 M NaCl 加 0.005M Tris-HCl 緩衝液 pH7.5 溶出分画)。これらの各ピークと抗粗溶血毒血清との間でゲル内沈降反応をおこなったところ，2番目のピークに3本の沈降帯の形成が認め

Fig. 3 Gel filtration patterns of D-III hemolysin with Sephadex G-100.



Column size, 37 by2.5cm ; material, 5ml of D-III fraction ; buffer, 0.005M Tris-HCl buffer (pH7.5) ; flow rate, 10ml/hr ; eluate volume, 5ml/tube ; solid line, protein contents at 280mμ (O.D.) ; hatched area, hemolysin activities.

られた。

つぎに，このD-Ⅲ分画をセファデックスG-100を用いてゲルろ過を行なった。その結果Fig.3に示したように溶血活性は第2のたん白ピーク（フラクション：No.16～26）に集中していることが認められた。この分画をG-100分画とした。さらに，これらについてゲル内沈降反応を行なった結果，D-Ⅲ分画に比べて，さらに精製された鮮明な2本の沈降帯の形成が認められた。

精製度の比較：

以上述べたC.F.，A.S.，D-ⅢおよびG-100の各分画を同一寒天平板上でゲル内沈降反応を行なったものをFig.4に示した。この図から，以上述べた精製方法による各段階の精製の効果が明らかに認められた。

Fig. 4 Agar gel diffusion patterns of the hemolysin preparations on each purification step.

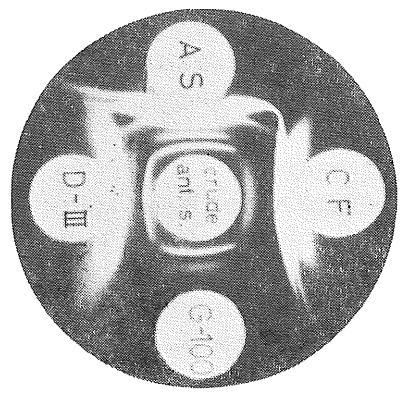


Fig. 5 Micro-immunoelectrophoretically pattern of G-100 preparation (upper) and it's hemolytic spot formation after agar gel electrophoresis (lower).

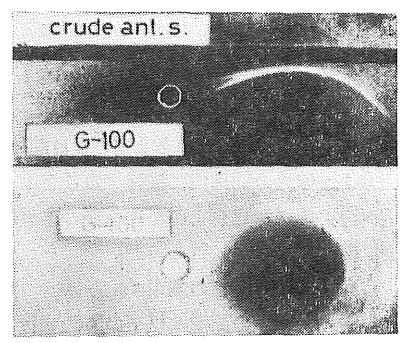


Table 1 Comparison of hemolysin from V. parahaemolyticus

fraction	Nmg/ml	MHD/mgN	hemolysin titer	purification rate
C. F.	3.336	9.53	32	1
A. S.	3.242	631.70	2,048	66
D-Ⅲ	0.280	14,628.57	4,096	1,535
G-100	0.160	25,600.00	4,096	2,686

また，免疫電気泳動像はFig.5に示したようにG-100分画は電気的移動度の異なる2つの分画に分かれ，これらの2二つの分画は，ともに(+)極に移動する物質であることが明らかになった。さらに寒天ゲル電気泳動ののち，その泳動プレート上に血液寒天を重層し溶血帯産生の有無を検討した結果，溶血能をもつ物質は，そのうちの移動度の大きい方のみであることを確認した。

これら各分画の精製率をTable 1に示した。すなわち，G-100分画の精製率は2,686というきわめて高い値を得た。

熱に対する安定性：

これらの各分画の熱に対する安定性を100°C，10分間の加熱処理により検討した。すなわち，Table 2に示したように，A. S.（256MHD）およびD-Ⅲ（128 MHD）の両分画は，100°C，10分間2回の加熱処理に対してもきわめて安定で，活性の減弱は認められなかった。しかし，G-100分画（512MHD）では100°C，10分間の処理で，その活性は1/2となり，さらに同処理をくり返し行なうと，さらに活性の減少がみられた。このことから，本溶血毒は精製度が進むにつれ，熱抵抗性の減弱がみられるが，ほぼ耐熱性の物質であると考えられる。

Table 2 Heat stability of hemolysin preparations.

fraction	hemolysin titer		
	not treated	100°C 10min. once treated	100°DC 10min. twice treated
A.S.	256 (3.242mgN/ml)	256	256
D-Ⅲ	128 (0.061mgN/ml)	128	128
G-100	512 (0.040mgN/ml)	256	64

マウスに対する致死毒性の検討：

これらの各分画およびその加熱処理分画の各0.5mlをマウス腹腔内に接種してマウスに対する致死毒性を検討した。その成績をTable 3に示した。その結果マウスに対するこれら各分画の致死毒性は，C.F. 分画では5匹中4匹のマウスを斃すためにほぼ24時間を要した。しかし，A.S. 分画では，その毒性はきわめて強く9～30分以内に完全にマウスを死亡せしめた。またこの分画は100°C，10分の加熱処理による影響はほとんど認められなかった。

Table 3 Toxic effect of hemolysin preparations in mice.

injected material (0.5ml)	number of mice	mortality
C.F.(1.678mgN/mouse) not treated	5	4
A.S.(1.621mgN/mouse) not treated	5	5
100°C10min. once treated	5	5
100°C10min. twice treated	5	5
D-Ⅲ(0.030mgN/mouse) not treated	5	5
100°C10min. once treated	5	5
100°C10min. twice treated	5	4
G-100(0.020mgN/mouse) not treated	5	5

さらに精製度の進んだD-Ⅲ分画でも，無処理の場合では12～43分で死亡せしめるのに対し100°C，10分の加熱処理の場合は，1回目の処理では19分～24時間で，2回目の処理では38分～24時間とその斃死に要する時間に著差は認められなかった。またG-100分画のマウス致死毒性もA.S. およびD-Ⅲの両者と大差ないものと考えられる。

以上の成績から，本溶血毒のマウスに対する致死性は極めて強いことを確認した。またG-100分画のMLDは0.62μgN/mouseであった。

各種動物血球に対する溶血能：

ヒト血球に対して1,280 MHDの溶血活性を示すG-100分画を用いて，各種動物赤血球に対する溶血能を測定した。すなわち，ラットに対しては最も高い10,240 MHD，イヌに対しては5,120 MHD，マウスおよびサルに対しては2,560 MHD，ウサギおよびモ

ルモットに対しては640 MHD さらにニワトリに対しては160 MHD の各溶血力価を示した。これに対して，ヒツジおよびウマに対しては全く溶血性を示さなかった。この成績をTable 4 に示した。

Table 4 Relative sensitivity of erythrocytes from various animal species to G-100 preparation

Animal (common name)	MHD Value
Rat	10,240
Dog	5,120
Mouse	2,560
Monkey	2,560
Human	1,280
Rabbit	640
Guinea pig	640
Chicken	160
Sheep	(−)
Horse	(−)

化学的性質：

G-100分画の化学的組成を定性的にしらべた結果，有機リン，多糖類および脂質はいずれも含まれておらず，たん白質のみ証明された。したがって，本溶血毒は単純たん白質から成り立っていることが明らかとなった。

考　　察

V. parahaemolyticus の溶血能は主に患者由来株に認められ，海水または海水魚介類由来株にはほとんど認められないという成績[2~3]から，本菌の溶血能と起病性因子との間に何らかの関連性の存在が考えられる。

川村ら[10]は本菌の溶血性について，菌自体の溶血性はLecithinase の作用と関連性があり，培養ろ液の溶血性は酵素によるものではなく，非たん白性耐熱性の物質によるものであると述べている。

加藤ら[1]は，ヒト血球を溶血し，ウマ血球を溶血しない耐熱性のたん白性溶血毒を分りした。このものは Ca^{++} イオンにより溶血活性が増強され，マウスに対して強い致死性を有する物質であると報告している。

また，坂崎ら[11]の報告では，菌体をアルカリ処理して得た分画はヒト血球に対して著明な溶血作用を示し，ウマ血球に対しても溶血性を示すが，その作用はヒト血球に比べていちじるしく弱いと述べている。

さらに柳ケ瀬ら[12~13]は，本菌の溶血毒として，phospholipase A および lysolecithinase を分りし，さらに別の菌株からは phospholipase C 様物質を分離したと報告している。

しかし，これらの報告例にある溶血毒の相互関係は何ら明らかにされていない。

今回精製した溶血毒は，ヒト血球を溶血するが，ウマ血球には作用せず，最終産物としてのG-100分画は免疫学的に未だ不純であるが，マウスに対してMLD：0.62μgN/mouse という極めて強い毒性を有し，加藤らの成績とよく一致した溶血態度を示すことから，本菌の起病性因子の1つとも考えられる。

また，この物質は直接溶血因子であること，Ca^{++}イオンにより特異活性の増強されることおよび耐熱性であることなどから考えて，このものが phospholipase Cではないかとも考えられる。しかし，これまでに phospholipase C 単独で，ある種の菌の病原性因子として報告された例は未だみない。

これらの問題を含めて，今後さらに病原性因子としての本溶血毒の役割を追求する考えである。

結　　論

1) V. parahaemolyticus 4750 株の培養上清からヒト赤血球に対して溶血能を示すが，ウマ赤血球に対しては作用しない溶血毒を分離精製した。この精製溶血毒は免疫学的に未だ不純であるが，培養上清に対して2,686の精製度を有する物質である。

2) この溶血毒の溶血活性は 50μg N/ml の溶血毒を用いた場合，ラットの赤血球に対して10,240MHD，イヌ血球に対して5,120 MHD，ヒト血球に対して1,280MHD およびウサギ血球に対して 640MHDの溶血価を示すが，ヒツジおよびウマ血球に対しては溶血活性を示さない。

3) この溶血毒はマウスに対して致死毒性を示し，そのMLD は 0.62μgN/mouse である。

4) この物質は100°C，10分間の加熱にじゅうぶん耐える物質である。

5) この物質は有機リン，脂肪および多糖類を含まない，単純たん白から成る物質である。

文　　献

1) 加藤貞治，小原寧，一戸治江，山井志郎，長島喜美子，坂崎利一：日本細菌学雑誌，21，442 (1966)

2) Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamai, S. and Hobo, K.: Jap. J. Med. Sci. Biol., 21, 325 (1968)

3) Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K. and Yamai, S.: J. Bact.,

100, 1147 (1969)
4) Schiedeger, J. J.: Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103-110 (1955)
5) Ouchterlony, O.: Acta Pathol. et Microbiol. Scand., 26, 507-570 (1949)
6) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M.: J. Biol.Chem., 177, 751 (1949)
7) Allen, R. J. L.: Biochem. J., 34, 858 (1940)
8) Koch, F. C. and Hanke, M. E. "Practical Methods in Biochemistry", pp14, (1948)
9) Ballentine, R. and Gregg, J. R., Anal. Chem.: 19, 281 (1947)
10) 川村　修：日本細菌学雑誌，19，511 (1964)
11) 坂崎利一，田村和満：Modern Media, 15, 28～29 (1969)
12) 柳ケ瀬康夫：Modern Media, 13, 30～31 (1968)
13) 柳ケ瀬康夫，天野恒久，井上公蔵：日本細菌学雑誌，24，515～516 (1969)

腸内ウイルス感染症の実態は握に関する研究（第2報）

1969年1～12月における東京都内の未処理下水からのウィルス分離について

岩崎謙二* 柏木義勝*
山田澄夫* 坂井冨士子*
藪内清* 根津尚光*
大里一夫** 宮崎友治郎**

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON ENTEROVIRUS INFECTIONS (II)
VIRUS ISOLATIONS FROM UNTREATED SEWAGE OF TOKYO IN 1969

Kenji IWASAKI, Yoshikatu KASHIWAGI, Sumio YAMADA,
Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI, Naomitsu NEZU,
Kazuo OSATO and Tomojiro MIYAZAKI

われわれは，東京都民間に発生しつつある腸内ウイルス感染の実態およびその経過推移を能率的には握し，流行予測への手がかりを得ようとの目的で，1967年6月以来，都内の下水処理場に集められた未処理下水（生下水）からのウイルス分離調査をつづけてきた。

1969年3月以前の検索成績については，すでに報告した[1,2,3]。下水ウイルスの疫学的意義は健康都民ならびに患者材料からのウイルス検出状況との対比の形で検討し，両者間に緊密な関連のあることを明らかにした。これは欧米の報告[4,5]とも一致した結論であった。また処理下水からのウイルス検出率の低下は，下水処理過程中におけるウイルスの沈澱汚泥への吸著に起因するものであろうことも考察した。

本報では1969年1～12月の検索結果ならびに下水の検索成績から過去2カ年間都内における腸内ウイルスの主流行ウイルスと考えられたコクサッキーB群ウイルスの血清疫学的調査結果について報告し，若干の考察を加える。

実験材料および方法

検体採取場所，採取方法，ウイルス分離・同定法は前報[1,2,3]の記載と同じであるので略記する。

検体採取場所：新宿区内にある東京都下水道局落合処理場において検体素材を採取した。同場の排水区域は都の城西地区で，面積として約6,200ha，人口は約1,230,000人を容している。

中野・杉並両区の大部と新宿，世田谷，渋谷，豊島，練馬各区の一部の排水は同場高段沈澱池に，新宿，中野両区の一部排水は低段沈砂池に流入している。両池の下水は同一導水渠を通って，曝気槽に導かれ活性汚泥処理をうけ，第2沈澱池で汚泥を沈澱させたあと上清のみが神田川に放流される（図1）。

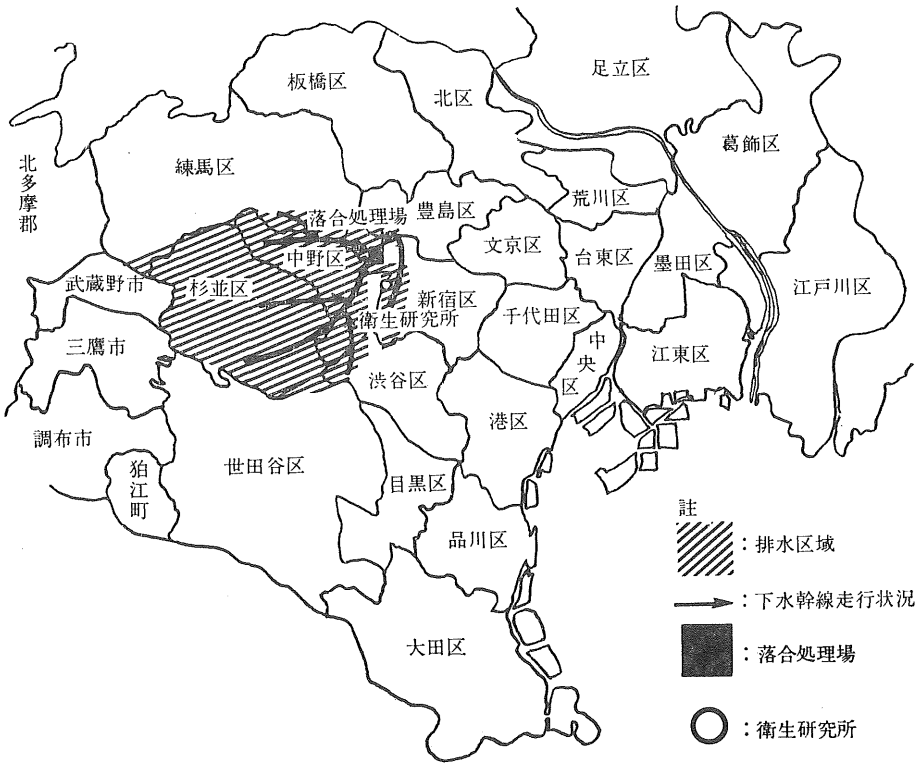
下水検体の採取と処理：麻紐をつけた滅菌綿タンポンを下水処理場内の検体採取地点に設置し，2日間下水の流れに浸漬した後，引上げたタンポンよりしぼり出した下水を検体素材とした。

タンポン設置地点は高段，低段両沈砂池，導水渠および第2沈澱池の4カ所で，前3地点で採取した下水は生下水であり，第2沈澱池の下水は処理下水である。沈澱汚泥は第2沈澱池底から逆送されるものを採取した。

採取した検体素材に1/10量のEarle's BSSを加え，3,000rpm30分間の遠心沈澱操作を2回施した後，更に10,000rpm30分間遠心沈澱を行ない，その上清にペニシリン，ストレプトマイシンを添加して接種材料とした。接種材料は−80°Cのフリーザー内に凍結保存した。

* 衛生研究所ウイルス部
** 東京都下水道局落合処理場

図1　東京都下水道局落合処理場の所在位置とその排水区域



ウイルスの分離・同定：培養細胞として，FL，He La，Hep2の各継代細胞とサル腎細胞の初代培養を使用した。

検体を接種した細胞培養試験管は37°C のフラン器内で回転培養を行なった。

ウイルスの検出有無はＣＰＥを目標に判定した。1週間の観察でＣＰＥがみられなかった培養は，新しい同種細胞培養試験管に継代した。継代培養は3～4代までつづけた。

分離ウイルス株中，腸内ウイルスおよびレオウイルスは Schmidt のプール血清を用い，中和試験によって同定した。アデノウイルスはまず補体結合試験によりアデノウイルス群に属することを確認した後，単味の免疫血清を用い中和試験によって型を同定した。

都民血清のコクサッキーB群ウイルスに対する中和試験：1967年9～10月，68年6月，同年9～10月，69年6月，同年9～10月に採取した健康都民血清を使用した。被検血清は－20°C に凍結保存した。

1：4に希釈した後，56°C 30分加温により非働化した血清をそれぞれ4分し，コクサッキーB群ウイルス1，3，4，5型の各 ProtoType 株を混和し，37°C に3時間静置した後，混和液を各2本のＦＬ細胞培養試験管に接種して回転培養した。混和ウイルス量は 100ＴＣＩD_{50} であった。ＣＰＥの出現有無によって中和抗体の有無を判定した。

実験成績および考察

1)　下水からのウイルス検出状況

1969年1～12月までの1年間に行なった落合処理場下水検体60件のウイルス検出状況を表1に示した。

処理前の生下水（高段・低段両沈砂池，導水渠）は36件中22件からウイルスを検出したが，沈澱汚泥は12件中10件と前者をはるかにしのぐ高頻度にウイルスを検出した。一方，処理下水（第2沈澱池）は12件中わずかに2件からウイルスを検出したにすぎなかった。

検出ウイルスを種別にみると，ポリオウイルス1型2株，2型10株，3型2株，コクサッキーB群ウイルス1型19株，3型3株，4型1株，エコーウイルス7型1株，レオウイルス1型2株，アデノウイルス7株計47株であった。

最も高い頻度に検出されたコクサッキーB群1型ウイルスは，1～7月と9月に下水から検出されており，患者材料からの検出状況などを考慮すると，この

表1　検体下水および患者材料からの腸内ウイルス，アデノウイルス，レオウイルスの検出成績

年	月	生下水 高段沈砂池	生下水 低段沈砂池	生下水 導水渠	生下水 沈澱汚泥	処理下水	患者材料（検出地区）
1969	1		CB1	AD	CB1, AD		AD(青梅)
	2	CB1			CB1	CB1	
	3			CB1	CB1, AD2		
	4	CB1, P3	P1	CB1, P1, P2, AD	P2	CB1, P2	
	5	CB1		CB1, P2	CB1		
	6	CB1	CB1	CB1	CB1, P2, AD		CB1(牛込・立川) AD(練馬)
	7			CB1			CB1(牛込・田無)
	8				CB3		
	9	E7		AD	CB1, AD		AD3(高井戸)
	10	Reo1	P2, Reo1	P2			
	11	CB3		CB3	P2		
	12	P2	Reo 1	P2	CB4, P2, P3		CB3(杉並)

注：CB1；コクサッキーB群，AD；アデノウイルス，E；エコーウイルス，P；ポリオウイルス，各数字は血清型を示す。

表2　下水検体接種後の細胞培養継代数および培養細胞種類とウイルス検出との関係

ウイルス種と型＼細胞種類と継代数		FL 1	FL 2	FL 3	HeLa 1	HeLa 2	HeLa 3	Hep2 1	Hep2 2	Hep2 3	サル腎 1	サル腎 2	サル腎 3	計 1	計 2	計 3
ポリオウイルス	1	1									1			2		
	2	3	2		3	2		1	1					7	5	
	3	1	1								2			3	1	
コクサッキーB群ウイルス	1	7	3		5	1		3	1		1			16	5	
	3	1			2									3		
	4	1				1								1	1	
	5															
エコーウイルス	7								1		1			1	1	
アデノウイルス	2															
	5															
	未			2			1			4						7
レオウイルス	1						1					2			2	1

1年間都民の間で流行主役を演じた腸内ウイルスは，コクサッキーB群1型ウイルスであったろうと考えられた。この推測は後述する血清疫学的調査結果によって確証された。

ついで高頻度に検出されたポリオウイルスは，4～6月と10～12月に限って検出された。これは春秋2回の生ワクチン投与の時期と一致していた。検出ポリオウイルスはワクチン由来のものと考えられる。

過去2カ年間の検索[1,2,3]で検出されなかったコクサッキーB群ウイルス3型が8月と11月に，同4型が12月に検出された。68年の主流行株であった同5型ウイルスが67年9月に，69年の流行主役であった1型ウイルスが68年8月に先行して検出された事実を思うと，3型ウイルスの70年における流行が注目される。

同一検体から異なった2種以上のウイルスを同時に検出した例は10例で，これはウイルス検出陽性例34例の1/3.4にあたる。

2）下水ウイルス検出率と検体接種後の細胞培養継代数との関係

ウイルス検出率と検体接種後の細胞培養継代数との関係をまとめて表示すると表2のようになる。

ポリオウイルス，コクサッキーB群ウイルス，エコ

表3　下水ウイルスの検出状況と健康都民のコクサッキーB群ウイルスに対する中和抗体保有状況

年　月	下水から検出されたウイルス種類	Cox. B1 中和抗体					Cox. B3 中和抗体				
		2～5才	6～10	11～15	16～20	21～30	2～5才	6～10	11～15	16～20	21～30
1967 6	AD2										
7	E7, AD5										
8	E7										
9	CB5, E7	a									
10	P1, P2	0/5	6/37	11/46	11/26	9/16					
11	P2										
12											
1968 1	AD5										
2	Reo1										
3											
4	CB5, Reo1										
5	CB5	b									
6	CB5, P2	1/46	8/59	17/63	5/12	15/34					
7	CB5										
8	CB1, CB5										
9	CB5	a					a				
10	P1, P2, P3	4/29	5/45	10/25	10/23	3/16	2/38	17/43	12/19	15/21	7/16
11	CB5										
12	AD										
1969 1	CB1, AD										
2	CB1										
3	CB1, AD2										
4	CB1, P1, P2, P3, AD										
5	CB1, P2	b									
6	CB1, P2, AD	1/43	5/66	27/65	1/5	23/45					
7	CB1										
8	CB3										
9	CB1, AD	a					a				
10	P2, Reo1	8/11	12/30	25/61	11/21	8/15	1/14	13/28	37/62	16/19	6/12
11	CB3, P2										
12	CB4, P2, P3, Reo1										

年　月	下水から検出されたウイルス種類	Cox. B4 中和抗体					Cox. B5 中和抗体				
		2～5才	6～10	11～15	16～20	21～30	2～5才	6～10	11～15	16～20	21～30
1967 6	AD2										
7	E7, AD5										
8	E7										
9	CB5, E7						a				
10	P1, P2						0/5	13/37	13/46	9/26	2/16
11	P2										
12											
1968 1	AD5										
2	Reo1										
3											
4	CB5, Reo1										
5	CB5						b				
6	CB5, P2						0/44	16/58	14/63	1/7	5/30
7	CB5										
8	CB1, CB5										
9	CB5	a					a				
10	P1, P2, P3	9/28	27/43	12/19	19/21	10/16	12/28	26/46	6/24	6/23	
11	CB5										
12	AD										
1969 1	CB1, AD										
2	CB1										
3	CB1, AD2										
4	CB1, P1, P2, P3, AD										
5	CB1, P2						b				
6	CB1, P2, AD						10/43	22/66	21/64	3/5	10/46
7	CB1										
8	CB3										
9	CB1, AD	a					a				
10	P2, Reo1	8/14	15/28	40/62	17/19	11/12	8/17	8/29	25/55	4/21	3/14
11	CB3, P2										
12	CB4, P2, P3, Reo1										

保有率：陽性例数/検査例数　a：採血地区　渋谷，荒川，　b：採血地区　八王子，小金井，梅ヶ丘，糀谷，浅草，足立

ーウイルスは2代までに全例検出されたが，レオウイルスは2～3代で，アデノウイルスは全例3代で検出された。

したがって，下水のウイルス検索には，とくにアデノウイルスを検索対象とするときは少なくとも3代までの継代培養が必要であると考えられる。

E. Lunds[6]の検索結果をみると，1代の培養で検出されたウイルスは179株，2代が136株，3代が64株であり，われわれの結論と同じように，下水ウイルスの検出に継代培養が必要であることを述べている。

3） 下水ウイルスの検出率と検体培養細胞種類との関係

前回の調査[1,2,3]の際に使用したFL，HeLa，およびサル腎の3細胞のほかに，今回は新たにHep2細胞を加えて試験を行なった。試験結果は表2に示した。

総体的なウイルス検出率をみると，FL細胞は22/60，HeLa細胞は16/60，Hep2細胞は11/48，サル腎細胞は7/60であった。FL細胞の検出率は前回の調査同様最も高率であったが，今回の調査ではサル腎細胞の検出率が最も低率であった。サル腎細胞での検出率がこのように不安定であるのは，サルの個体差に関連する何らかの因子が検出率に大きな影響を与えているものと思われる。

検出ウイルスを種類別にみると，ポリオ，コクサッキーB群ウイルスの検出はFL細胞で，アデノウイルスはHep2細胞で，レオウイルスはサル腎細胞で最も高率であった。

このように宿主細胞に対するウイルス特異性はその組み合わせ如何によって大きな差があり，ルーチンに使用できる理想的な単一細胞が現在のところ見つかっていないことから派生する多くの悩みはあるが，このような差が細胞株間にあることは，いくつかの異種ウイルスが混在している検体からそれぞれのウイルスを単離して検出するのには都合のよい反面でもある。

4） 健康都民のコクサッキーB群ウイルス1，3，4，5型に対する中和抗体保有状況

1967年，68年，69年に採取した健康都民血清について，69年，68年の都内流行の主役であった1，5型ウイルスと最近数年ぶりで散発的に検出された3，4型ウイルスに対する中和抗体保有状況を調査した。その調査結果は，下水からのウイルス検出状況と対比させて表3に示した。

抗体保有率の逐時変せん様相は弱年令層とくに2～5才群において著明にみられ，11才以上の年令層ではみられなかった。

下水からのウイルス検出状況から推察してきた69年の1型ウイルスの流行，68年の5型ウイルスの流行は，今回の血清疫学的な調査結果によって裏づけられた。また過去2カ年の1，5両型ウイルス流行時の主な感染対象が2～5才年令層にあったことも明らかとなった。

ウイルス検出状況の項で，前記した3型ウイルスの70年における流行の可能性は，69年9～10月時点での2～5才年令層の同型ウイルスに対する中和抗体保有率がかなり低いので，充分に考えられることである。

結　　論

1969年1～12月までの1年間の落合処理場における下水ウイルスの検索結果ならびに下水ウイルス検索結果から68，69年の2カ年間，都内の腸内ウイルス流行の主役を演じたと考えられたコクサッキーB群ウイルスに対する健康都民の抗体保有状況の調査結果について述べ，考察を加えた。

1） 生下水検体36件中22件から，沈澱汚泥12件中10件から，処理下水12件中2件からウイルスを検出した。

ポリオウイルス14株（1型2，2型10，3型2），コクサッキーB群ウイルス23株（1型19，3型3，4型1），エコーウイルス1株（7型），レオウイルス2株（1型2），アデノウイルス7株計47株を検出した。

最多の頻度で検出されたコクサッキーB群1型ウイルスは1～7月と9月に検出された。ポリオウイルスは春秋2回の生ワクチン投与の時期にのみ検出された。

2） ポリオ，コクサッキーB群，エコーの各ウイルスは，検体接種後の細胞培養継代2代までに全例検出されたが，レオウイルスは2～3代で，アデノウイルスは全例が3代で検出された。

3） 総体的なウイルス検出率をみると，供試培養細胞中最も高率であったのはFL細胞22/60で，ついでHeLa細胞16/60，Hep2細胞11/48，サル腎細胞7/60の順であった。

ウイルス種別にみると，ポリオ，コクサッキーB群ウイルスの検出にはFL細胞が，アデノウイルスの検出にはHep2細胞が，レオウイルスの検出にはサル腎細胞が最もすぐれていた。

4） 下水ウイルスの検出状況から68，69年の都内における腸内ウイルス流行の主役と目されたコクサッキーB群ウイルスに対する健康都民の中和抗体保有状況を調査した。抗体保有率の逐時変せん経過は弱年令層とくに2～5才において明らかで，11才以上の年令層

においてはほとんど変化がみられなかった。

1および5型ウイルスに対する2～5才層の中和抗体保有率の上昇時期は，下水ウイルス検出状況から考えられた流行時期とよく対応していた。

文　　献

1) 岩崎謙二他：東京都立衛生研究所年報，20，35（1969）
2) 岩崎謙二他：モダンメディア，16，60（1970）
3) 柏木義勝他：東京都衛生局学会誌，42，50(1969)
4) Bloom, H. H., et al : J. Infect. Diseases, 105, 61 (1959)
5) Pittler, H., et al : Zntbl, Bakt., I. Abt, Orig. 204, 33 (1964)
6) Lund, E., et al : Water Research, 3, 823 (1969)

1969年4月から1970年2月にかけて東京都内に発生したインフルエンザのウイルス学的血清学的検索成績

坂井冨士子* 岩崎謙二*
藪内清* 柏木義勝*
山田澄夫* 根津尚光*

VIROLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE PREVALENCE OF INFLUENZA IN TOKYO IN 1969

Fujiko SAKAI, Kenji IWASAKI, Kiyoshi YABUUCHI, Yoshikatsu KASHIWAGI, Sumio YAMADA and Naomitsu NEZU

(Department of Virology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.)

東京都においては毎年冬期にインフルエンザ（以下「イ」と略す）ウイルスを主因とする集団かぜが発生し，われわれはそのつどこれをウイルス学的，血清学的立場から追及しその検索成績についてはすでに報告してきた[1~11]周知のとおり1968年末より1969年初頭にかけて従来のA2型とは抗原構造が著しく異なるといわれた「イ」A2香港型ウイルスの初めての流行があったが危惧されていたほどの大流行にならなかったこともあり二回目の流行期である今冬期すなわち1969年末より1970年初頭にかけての流行状況が再び注目されていた。

前報[11]においては1969年3月までの検査成績について報告したので今回はそれ以後1970年2月までに得られた成績について報告する。

検査材料および方法

検査材料とその処理法，ウイルス分離同定試験法，血清学的検査法およびその診断基準はすべて既報[10]のとおりである。

検査成績および考察

表1は1969年4月から1970年2月までの間に当研究所に送付された「イ」様患者材料の検索成績の概要である。すなわち，本期間中36集団，227名の患者についてうがい水よりウイルス分離を試みたところ「イ」ウイルス52株，その他のウイルス18株を検出した。

「イ」ウイルスに関しては1969年4月から10月までは分離されておらず，この間にはアデノ14型，3型，コクサッキーB群1型，ポリオⅡ型ウイルス等種々のウイルスが分離されている。11月に入って11日に立川保健所管内立川第六小学校の患児12例のうがい水より8株のウイルスを分離したのがわれわれの検査し得た範囲では今冬流行期の最初の「イ」の確認である。これらのウイルスはニワトリ免疫血清を用いたHI試験（赤血球凝集抑制試験）によってすべてA2香港型と同定された。その後1970年2月まで引続き流行があり計52株のA2香港型のウイルスを分離した。またウイルスは分離されなくても患者の急性期および回復期の対血清についてS抗原による補体結合反応を行なったところ「イ」A型の抗体の有意上昇を認めたものが67例中30例あり，ウイルス分離試験と併せて「イ」A型と診断されたものは82例であった。また本期間中は患者うがい水よりのウイルス分離試験によっても，対血清の血清反応（S抗原による補体結合反応）によっても「イ」B型は1例も認められず前報[11]において報告したように前回の様なA2香港型とB型の混合流行は認められなかった。

次に「イ」A2香港型ウイルスを分離した患者の中に「イ」のワクチン（1969年度の「イ」ワクチンは香港型としてA2/愛知2/68株，B型としてB/鹿児島1/68株およびB/東京7/66株の3株混合）2回接種を完了しているものがあることに注目しウイルス分離陽性者

* 東京都立衛生研究所ウイルス部

表1　1969年4月から1970年2月にかけて東京都内に発生したインフルエンザ様患者の検索成績

	検体採取時期（年・月）	集団数	ウイルス分離試験 検体数	インフルエンザ・ウイルス	その他のウイルス	血清学的試験（CF—S） 検体数	インフルエンザ A	インフルエンザ B	AD	インフルエンザと診断されたもの
集団発生例	69・4	1	6	0	0					0/6
	〃・5	2	12	0	0					0/12
	〃・6	4	60	0	AD14型1株・？1株，CB1型6株，P2型1株	9			0	0/60
	〃・7	3	18	0	AD 3型 1株					0/18
	〃・8	1	2	0	0					0/2
	〃・9	1	8	0	AD 3型 6株					0/8
	〃・10									
	〃・11	7	40	A2/香港 19株	0	19	8	0	0	27/40
	〃・12	7	30	A2/香港 15株	CB 3型 2株	12	7	0	0	22/30
	70・1	8	42	A2/香港 15株	0	22	12	0	0	27/42
	〃・2	2	9	A2/香港 3株	0	5	3	0	0	6/9
	計	36	227	A2/香港 52株	18株	67	30	0	0	82/227

の急性期血清のA2/愛知2/68株に対するHI価を測定しワクチン接種歴との関係について調査したところ表2に示すような成績を得た。すなわち43例中過半数の22例はHI価<32倍でHI価の上では全く抗体をもっておらず，かつ残りの半数以上である13例は32倍または64倍であった。特にワクチン未接種，1回のみ接種あるいは接種不明の者はすべてこの≦64倍の中に含まれてしまう。そこで個人のレベルでは血中HI価が128倍以上あれば一応罹患をまぬがれるであろうことが推察される，しかしこれらはすべて自然感染によると思われる，すなわちワクチン接種によって得られたのではないHI抗体価の場合である。ここで注目したいのはワクチン接種を2回終了した者の中には少数ながらかなり高いHI抗体価，すなわち512倍，256倍という例があり，この様な高いHI価の持主からもウイルスが検出されるということである。血中HI抗体と感染防御の関係については種々の論議のあるところであるが，この成績はワクチン接種によって得られた

表3　剖検例からのインフルエンザウイルス分離試験成績

	検体採取時期（年・月）	検体数	ウイルス分離試験 インフルエンザ・ウイルス	その他のウイルス
剖検例（肺）	69・11	2	0	0
	〃・12	3	0	0
	70・1	14	A2/香港10株	0
	〃・2	3	A2/香港 1株	0
	計	22	A2/香港11株	0

表2　A2/香港型ウイルスを分離した患者の急性期血清のHI価とワクチン接種歴

（1969.11～1970.2）

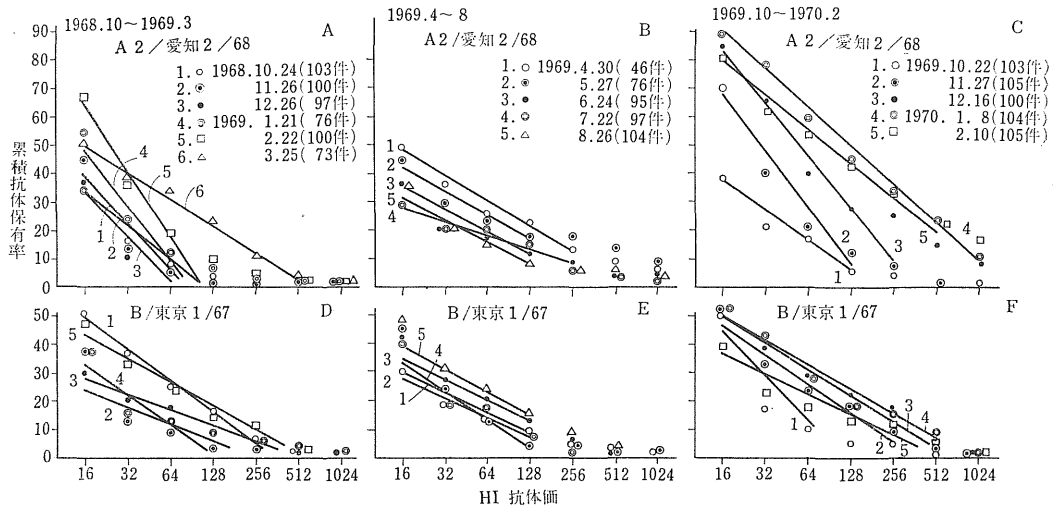
HI価（A2/愛知2/68）	ワクチン接種歴 1回接種	2回接種	未接種	不明	検査件数
512×		1			1
356×		2			2
128×		4		1	5
64×	1	4	1	2	8
32×		1	3	1	5
<32×	3	3	15	1	22
計	4	15	19	5	43

注：1.　ワクチン接種時期は1969年11月下旬から12月上旬。
2.　急性期血清はうがい水と同時期に採取した。

と考えられる高い血中HI価は必らずしも感染ないし発病防御に結びつかない場合のあることを少数例ながら示している。これらの高い抗体価はいつ産生されたか，つまり感染前か，後かという問題については今回の観察では明らかにすることが出来なかったので本質論については今後の研究課題としたい。

表3は東京都監察医務院より「イ」様肺炎の疑いで検査を依頼された剖検例の肺よりのウイルス分離試験の成績である。1969年11月より1970年2月までの間に22例検査を行ない中11例より「イ」A2香港型ウイルスを分離した。今回のこの剖検例の肺よりの「イ」ウ

図1　都民のインフルエンザウイルスに対するHI抗体保有状況の逐月変動



イルス分離の成績は例数は少ないがこれまでわれわれが行なった範囲内では最も陽性率が高く50%にのぼっている。

以上はすべてわれわれの手もとに送られてきた患者材料を対象にした検査成績であってこれのみでは東京都全体の「イ」流行状況の実態をは握することは困難であるのでわれわれが多年行なってきている血清疫学的解析によって流行状況の全ぼうを探ろうとした。すなわち保健所を通じて都内各地から偏りなく集められた成人血清から毎月一定時期に約100件宛抽出しそれについて「イ」各型ウイルスに対するHI抗体価を測定し集団のHI抗体保有状況の変動をみた。縦軸に陽性率を，横軸に抗体価を目盛った正規確率紙または等間目盛のグラフ紙上に各抗体価別に算出した累積陽性率をプロットしそれらの各点を通る直線を画く，正規確率紙上にプロットされた各点はきれいに一直線上にのるが，等間目盛グラフ上では陽性率が20～80%ぐらいの範囲に限って一直線上にのる。しかし両紙上の線分の位置や傾きはほぼ同じ傾向を示す。図1(A, B, C, D, E, F)は等間目盛のグラフを用いたものでA2/愛知2/68株，B/東京1/67株に対する都民のHI抗体保有状況の推移をみたものである。A2/愛知2/68株に対してはAに示した前回の流行後はBに示すように1969年4月から8月までは陽性率，抗体価ともにほとんど変動がなく流行閑期であることを示している。今回の流行期であるCでは10月から11月にかけて低抗体価における陽性率のみが大きく上昇し，12月から1月にかけて高い抗体価における陽性率が上昇し流行のピークが過ぎたことを示している。これを前回の流行であるAとくらべると比較的短期間に広範囲に拡がったことが推測される。B型に関してはEに示すように1969年4月から8月まではA2香港型と同様ほとんど平衡状態を保っているがFに示した10月から1970年2月にかけての成績ではわずかながら変動がみられ前述したごとく患者のウイルス学的，血清学的検査成績では「イ」B型は証明されなかったが，この様な血清疫学的見地からは，この間若干の散発的な発生を否定することは出来なかった。

結　　論

1969年4月から1970年2月にかけて東京都内に発生したインフルエンザ様疾患患者材料についてウイルス学的，血清学的検査を行ないまた一方都民血清標本のインフルエンザウイルスに対する抗体保有状況の逐月調査を行なった結果次の結論を得た。

1)　検索期間中に患者材料よりアデノ14型ウイルス1株，同3型ウイルス7株，コクサッキーB群1型ウイルス6株，同3型ウイルス2株，ポリオⅡ型ウイルス1株を分離した。また1969年11月から1970年2月の間に限ってインフルエンザA2香港型ウイルスを患者うがい水より52株，死亡例の肺より11株を分離し，その他血清学的にインフルエンザAと診断されたものが30例あったが全期間を通じてインフルエンザB型は患者材料からは証明し得なかった。

2)　A2香港型ウイルスを分離した患者43例の急性期血清のA2/愛知2/68株に対するHI価は大部分が≦64倍であったが，ワクチン2回接種を完了している

者の中にのみ512倍1例，256倍2例，128倍4例と高いＨＩ価をもつものがあった。

3） 都民のインフルエンザ抗体保有状況の逐月消長調査結果からみると今冬期のＡ２香港型の流行は前回すなわち本型の初めての流行時よりむしろ短期間に広範囲に拡がったことが推察された。またインフルエンザＢ型に関しては患者材料からは証明されなかったが本調査結果からみると今冬期も若干の散発的発生があったのではないかということが推測された。

文　　献

1） 辺野喜正夫他：都衛研年報，(9)，47（1957）
2） 坂井冨士子：都衛研研究報告，(21)（1961）
3） 岩崎謙二他：東京都衛生局職員業務研究会報告書，(29)，69（1962）
4） 藪内清他：日伝染会誌，35（10）667（1961）
5） 坂井冨士子他：日伝染会誌，36，(6) 282(1962)
6） 根津尚光他：東京都衛生局学会誌，(35)，117（1965）
7） 根津尚光他：都衛研年報，(16)，47（1964）
8） 根津尚光他：都衛研年報，(17)，71（1965）
9） 坂井冨士子他：都衛研年報，(18)，67（1966）
10） 柏木義勝他：都衛研年報，(19)，67（1967）
11） 坂井冨士子他：都衛研年報，(20)，53（1968）

1969年度東京都における疑似日本脳炎患者の血清学的検索成績および疫学的調査

藪内　清*　岩崎謙二*
坂井冨士子*　柏木義勝*
山田澄夫*　根津尚光*
渡辺賢哉**　森脇康一**

ECOLOGICAL SURVEY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AND SEROLOGICAL CONFIRMATION OF ITS INFECTION OF SUSPECTED PATIENTS IN TOKYO IN 1969

Kiyoshi YABUUCHI, Kenji IWASAKI, Fujiko SAKAI,
Yoshikatsu KASHIWAGI, Sumio YAMADA, Naomitsu NEZU,
Kenya WATANABE and Yasukazu MORIWAKI

(Department of Virology, Tokyo Metroporitan Research Laboratory of Public Health.)
(Metropolitan Tama Meat Inspection Station.)

われわれは，1962年以来東京都における日本脳炎（以下日脳と略す）の疫学を，主として と場ブタのＨＩ抗体保有状況を中心とした面から調査し，その大要はすでに報告[1~7]している。

本1969年も，疑似日脳患者血清について血清学的検索をおこなうと共に，と場ブタの日脳ＨＩ抗体保有状況ならびにコガタアカイエカの消長およびおとり動物などについて調査したのでその概要を報告する。

材料および方法

1）　患者血清

1969年５月８日から11月６日までの間に，都立各伝染病院から送付された，疑似日脳患者血清12名分延45件で，検査を実施するまで－20°Ｃに凍結保存した。

2）　ウイルス抗原

日脳補体結合（ＣＦ）用抗原は，中山株（武田薬品製）を，血球凝集抑制反応（ＨＩ）用抗原はJaGAr 01株（武田薬品製）を用いた。その他のＣＦ用抗原としては，ポリオⅠ，Ⅱ，Ⅲ，コクサッキーＢ１，Ｂ２，Ｂ３，Ｂ４，Ｂ５，ムンプス，アデノ，エコー６型（以上自家製）およびヘルペス（予研製）の12抗原を使用した。

3）　ＣＦ反応，血球凝集抑制（ＨＩ）反応およびブタ血清

すべて前報[7]に準じた。

4）　コガタアカイエカの採集

ライトトラップを用いて採集した。すなわち，５月中旬から10月中旬まで毎週１回夕方17時から翌朝７時まで運転し，採集したカは数時間室温に放置したのち－70°Ｃに保存し分類した。

5）　おとり動物

ブタおよびウサギを用いた。すなわち，あらかじめ日脳ＨＩ抗体を保有しないことをたしかめた個体について，５月中旬から10月中旬まで毎週１回採血した。

6）　日脳ウイルス分離同定試験

と場ブタ血清の一部（６月下旬から10月下旬までに採血したものの中で，ＨＩ抗体価10倍以下のもの），コガタアカイエカの雌およびおとりブタ血清の一部について，乳のみマウスを使用して日脳ウイルス分離試験をおこなった。分離・同定試験は大谷ら[10]の方法に準じた。

検査成績および考察

1）　疑似日脳患者の血清学的検索成績

被検査者中血中抗体の有意上昇をみとめたものの成

* 東京都立衛生研究所ウイルス部
** 東京都多摩食肉衛生検査所

績を表1にしめす。すなわち，疑似日脳患者の血清学的検索成績を，日脳研究会の診断基準[7]に従って判定すると，被検査者12名中血清学的に日脳と診断できたものは1名のみで，この患者の発病は8月16日であった。この真性日脳患者は岐阜市の居住者で，たまたま上京の車中発病したもので，本年の岐阜県の日脳汚染地区指定は8月7日であり（東京都の日脳汚染地区指定は9月8日），発病日からしても感染地は岐阜市であることはまずまちがいない。従って，本1969年度は東京都においては真性日脳患者発生は皆無であったといえる。

また，日脳陰性であった11名については，日脳ウイルス以外で，無菌性髄膜炎をおこす可能性のあるウイルス抗原を使用してその病因を追及したところ，ムンプスウイルスとヘルペスウイルスに対して血中抗体の有意上昇をしめしたものがそれぞれ1名づつあり，この2名の患者は当該ウイルスによる髄膜炎と診断された。

他の9名については，われわれの検索した範囲内ではその病因を明らかにすることはできなかった。

2) と場ブタのHI抗体保有状況ならびにコガタアカイエカの消長およびおとり動物の調査

1969年度立川と場で採血した都内産のブタの日脳HI抗体保有状況は表2の通りである。すなわち，9月1日から8日にかけて急激な抗体保有率の上昇がみられ，都内におけるブタの日脳ウイルスによる汚染開始が確認され，9月8日に本都は日脳汚染地区に指定された。この1969年度のと場ブタにおけるHI抗体保有状況を過去の年のそれと比較するため，JaGAr 01株に対するHI価≧1：10の陽性率について図示すると図1のようになる。HI抗体価保有率の上昇時期が早い年ほど患者数が多く，おそくなるに従って少なくなることはすでに前報[7]で報告したが，本1969年は過去7年の中で1968年についでおそく，傾向としては昨1968年のそれと酷似していた。すなわち，一度上昇してからも抗体保有率に大きな変動がみられ，本年の真性患者が皆無であったこととあわせ考えると，昨年同様ウイルス散布がうすかったであろうことが推定される。

また，8月25日採血のブタ血清から4株，9月8日採血分から1株計5株の日脳ウイルスを分離同定した。

都下国分寺市に飼育したおとりブタならびに当研究所鶏舎で飼育したおとりウサギ，およびカの成績は表

表1　1969年度東京都における疑似日本脳炎患者の血清学的検査成績

病院	衛研受付No.(69)	患者氏名	年令	性	採血月/日	病日	日本脳炎 HI 中山	日本脳炎 HI JaGAr 01	日本脳炎 CF	CF ポリオ Ⅰ	ポリオ Ⅱ	ポリオ Ⅲ	CF コクサッキーB群 1	2	3	4	5	CF ムンプス	CF アデノ	CF エコー6	CF ヘルペス	血清学的診断
墨	652	梅○　○	30	♂	Ⅷ/19	4	80	160	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	日本脳炎
	653	〃	〃	〃	Ⅷ/25	10	1280	≧2560	16	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	701	〃	〃	〃	Ⅸ/ 1	17	1280	≧2560	8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	704	〃	〃	〃	Ⅸ/12	28	1280	≧2560	16	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	705	〃	〃	〃	Ⅸ/22	38	640	≧2560	32	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
	731	〃	〃	〃	Ⅸ/29	45	1280	≧2560	32	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	
東	740	近○親○	8	♂	Ⅹ/ 6	3	<10	<10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	*ムンプス
	741	〃	〃	〃	Ⅹ/16	13	<10	<10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16	<8	<8	8	
	761	〃	〃	〃	Ⅺ/ 1	29	<10	<10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	8	
荏	419	和○英○	57	♂	Ⅴ/30	9	20	80	<4	正常抗原に反応するため判定不能											4	
	420	〃	〃	〃	Ⅵ/ 2	12	20	80	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16	
	421	〃	〃	〃	Ⅵ/ 7	17	20	160	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64	
	422	〃	〃	〃	Ⅵ/16	26	40	160	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64	ヘルペス
	626	〃	〃	〃	Ⅶ/21	61	20	160	<4	<8	<4	<4	<4	<8	<4	<4	<4	<4	<4	<4	≧64	
原	627	〃	〃	〃	Ⅶ/28	68	20	160	<4	<8	<4	<4	<4	<8	<4	<4	<4	<4	<4	<4	≧64	
	628	〃	〃	〃	Ⅷ/ 4	75	20	160	<4	<8	<4	<4	<4	<8	<4	<4	<4	<4	<4	<4	≧64	

*

衛研受付No.(69)	HI ムンプス
740	<16
741	256
761	512

表2　1969年度東京都におけると場ブタの日本脳炎HI抗体保有状況（立川と場）

採血月日	HI抗体価（JaGAr 01）										計	陽性率（≧10）%	2ME・S抗体保有率 %	*ウイルス分離試験
	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560				
5. 19	21		1								22	4.5	0	
6. 2	20	2									22	9.1	0	
9	21						1				22	4.5	0	
16	22										22	0	0	
24	22										22	0	0	
30	18	4									22	18.1	0	
7. 7	20	1	1								22	9.1	0	
14	22										22	0	0	
21	22										22	0	0	
28	22										22	0	0	0/22
8. 4	22										22	0	0	0/22
11	22										22	0	0	0/22
18	22										22	0	0	0/22
25	22										22	0	0	4**/22
9. 1	13		1			1				7	22	40.9	33.3	0/13
8	5	6	2			1	1		1	5	21	76.2	37.5	1***/11
16	1							1		20	22	95.5	4.8	0/1
22	9					1				12	22	59.1	30.8	0/9
29		1					1	2	2	16	22	100	18.2	0/1
10. 6	14						1		6	1	22	36.4	0	0/14
13	1		1						1	19	22	95.5	9.5	0/1
20	7							1	1	13	22	68.2	0	0/7
27	6	1		1			2		6	6	22	72.7	0	0/7

* HI抗体価<10，10のものについて，ちのみマウスを用いておこなった。（日脳ウイルス陽性数/検査数）
** JaTan469（SW12997），JaTan569（SW13002），JaTan669（SW13006），JaTan769（SW13007）
*** JaTan169（SW13053）

図1　東京都における過去7ケ年間（1963～69）のと場ブタの日脳HI抗体保有状況の比較

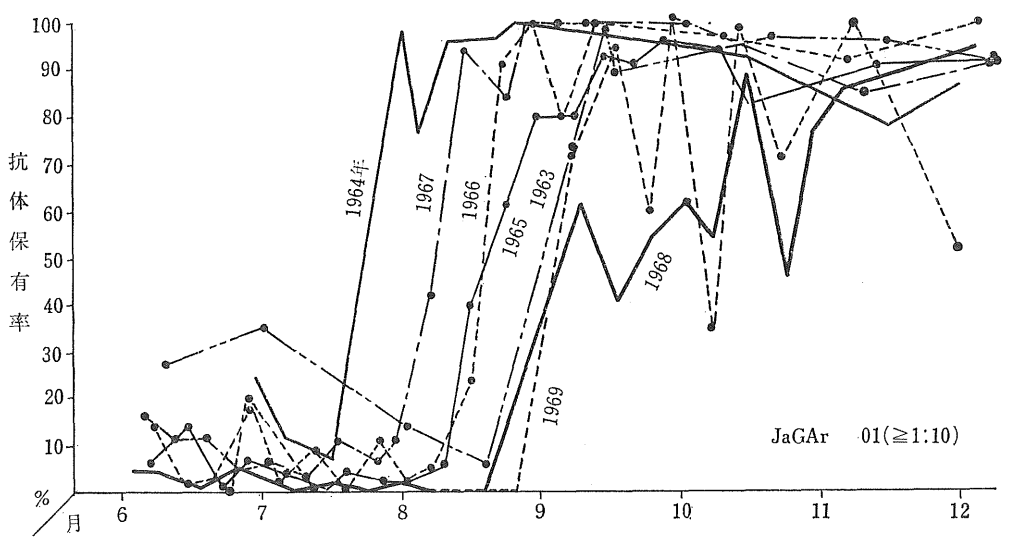


表3　1969年度東京都におけるおとり動物の日脳HI抗体出現状況

採血月日	おとりブタ No. 11 HI価	おとりブタ No. 11 ウイルス分離	おとりブタ No. 12 HI価	おとりブタ No. 12 ウイルス分離	おとりブタ No. 13 HI価	おとりブタ No. 13 ウイルス分離	採血月日	おとりウサギ No.275 HI価	No.278	No.279	No.280	No.281
4. 26	(−)		(−)		(−)		6. 11	(−)	(−)	20	40	(−)
5. 1	(−)		(−)		(−)		18	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
24	(−)		(−)		(−)		25	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
31	(−)		(−)		(−)		7. 2	(−)	(−)	(−)	死亡	(−)
6. 7	(−)		(−)		(−)		7	(−)	(−)	(−)		(−)
14	(−)		(−)		(−)		16	(−)	(−)	(−)		(−)
21	(−)		(−)		(−)		23	(−)	(−)	(−)		(−)
29	(−)		(−)		(−)		30	(−)	(−)	(−)		(−)
7. 6	(−)		(−)		(−)		8. 5	(−)	(−)	(−)		(−)
12	(−)		(−)		(−)		13	(−)	(−)	(−)		(−)
18	(−)		(−)		(−)		20	(−)	(−)	(−)		(−)
29	(−)		(−)		(−)		27	(−)	(−)	(−)		(−)
8. 4	(−)		(−)		(−)		9. 3	(−)	(−)	(−)		(−)
11	(−)	(−)	(−)		(−)		9	(−)	(−)	(−)		(−)
20	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	17	(−)	(−)	(−)		(−)
25	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	24	(−)	(−)	(−)		(−)
9. 4	(−)	(−)	(−)	(+) JaTan269	(−)	(−)	10. 1	(−)	(−)	(−)		(−)
11	≧2560		(−)	(−)	(−)	(+) JaTan369	7	(−)	(−)	(−)		(−)
26	≧2560		≧2560		≧2560		15	(−)	(−)	(−)		(−)

注：設置場所：ブタ＝都下国分寺市並木町　ウサギ＝新宿区百人町4—539 都衛研内
HIの項：(−)＝<1：10　抗原は JaGAr 01
分離ウイルス：JaTan269(OSW12, 9—4)　JaTan369(OSW13, 9—11)

表4　1969年度都衛研鶏舎における蚊の消長

採集月日	アカイエカ ♂	アカイエカ ♀	コガタアカイエカ ♂	コガタアカイエカ ♀	ウイルス分離
5. 16	0	0	0	0	
23	0	0	0	0	
30	0	0	0	0	
6. 6	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	
27	1	7	0	0	
7. 4	0	0	0	0	
11	23	35	0	13	(−)
18	10	27	0	25	(−)
25	20	20	1	27	(−)
8. 1	13	33	31	76	(−)
7	15	22	1	115	(−)
14	3	13	1	26	(−)
21	4	22	0	25	(−)
28	28	24	0	14	(−)
9. 5	19	61	0	26	(−)
12	5	31	0	7	(−)
19	4	28	0	2	(−)
26	2	25	0	0	
10. 3	1	19	0	0	
7	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	

3，4の通りである。

おとりブタについてはと場ブタのHI抗体保有率の上昇とほぼ同時期にHI抗体価の上昇をみとめ，その中2頭についてはウイルス血症を証明した。しかし，カからは日脳ウイルスを証明することはできず，おとりウサギについても，5頭全例全期間にわたって抗体価の上昇をみとめなかった。

これらの成績から，東京地区における日脳ウイルスの浸淫は，ヒトの感染発症とは関係なく，ここ数年その散布がうすくなってきているとはいえ，毎年確実に存在していることが判る。従って，真性患者発生数の多少にかかわらず，今後も防疫対策を強力におしすすめなければならないと考える。

結　　論

1969年度東京都における疑似日脳患者の血清学的検索および疫学的諸調査をおこない，次の結論を得た。

1)　被検査者12名中血清学的に真性日脳と診断されたのは1名のみであった。

2） この患者の発病日は８月16日で，感染地は岐阜市であろうと推定される。

3） 検査の結果日脳陰性と判定された11名の中１名はヘルペスウイルス，１名はムンプスウイルスに対してそれぞれ血中抗体の有意上昇をしめし，当該ウイルスの感染症と診断された。

4） と場ブタ血清の日脳ＨＩ抗体保有率の陽転時期をみるに，本1969年は過去７年の中で1968年についでおそく，９月８日であった。

5） ここ数年来本都における日脳患者発生は激減の一途をたどっているが，東京地区における日脳ウイルスの侵淫は，患者数には無関係に毎年確実に存在しているので，今後も防疫対策を強力に推進する必要がある。

謝辞：本調査をおこなうに当り，多大のご援助とご協力を賜った，東京都衛生局防疫課の関係各位に深甚の謝意を表する。また，おとりブタについては，日本獣医畜産大学大学院安藤泰正修士のご協力によった。記して謝意を表する。

文　　献

1） 根津尚光他：都衛研年報，(15)，160 (1963)
2） 根津尚光他：都衛研年報，(16)，52 (1964)
3） 根津尚光他：都衛研年報，(17)，76 (1965)
4） 村上一：都衛研事業報告，(204)，1 (1966)
5） 根津尚光他：都衛研年報，(18)，59 (1966)
6） 根津尚光他：都衛研年報，(19)，57 (1967)
7） 薮内清他：都衛研年報，(20)，39 (1968)
8） 日本公衆衛生協会：微生物検査必携，414(1966)
9） Okuno, T., Oya, A., and Ito, T.: Jap. J. Med. Science and Biol., 14(2), 51 (1961)
10） 国立予研学友会：ウイルス実験学各論，100 (1967)

Negative 染色法によるインフルエンザウイルスの電顕観察法

前木吾市* 坂井冨士子*
藪内清* 岩崎謙二*
根津尚光* 辺野喜正夫**

NEGATIVE STAINING TECHNIQUE FOR ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF INFLUENZA VIRUS

Goichi MAEKI, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI,
Kenji IWASAKI, Naomitsu NEZU and Masao BENOKI

Summary

The spike (or so called project), which is said to be acting as hemagglutinin, existing on the surface of myxo-virus particles was possible to observe on the electron micrograph by means of the negative staining technique. In this experiment crude virus suspension of A2 Hong-Kong type influenza virus, an isolate of 1969, was studied under the magnification of × 100,000。 As a consequence, the shape of the spike of influenza virus was easely differenciated from those of HVJ or adeno virus. Thus we concluded that negative staining is a advantageous technique for the identification of myxo-virus particles. The electron microscope used was a JEM 6C type with accelerating voltage of 80kV.

（I） 緒 言

インフルエンザの流行がウイルスによって起ることは，今日周知の事実であるが，そのウイルス粒子を直接電子顕微鏡下に観察するには，ウイルス精製法と電顕試料作製法の周到な準備が必要である。インフルエンザウイルスの一般的性質は，大きさ80～120mμで，孵化鶏卵で培養ができ更にトリ赤血球で凝集する等の特徴がある。したがって電顕による研究対象として最も取扱い易いウイルスということができる。

われわれが十数年来用いてきたインフルエンザウイルスの電顕による検索手段は，培養液を超遠心機によって分画遠心し，試料作製法としてシャドウ法を組み合わせるケースがほとんどであった。シャドウ法は粒子の外形や大きさを知る上で優れた面もあるが，ウイルス粒子の微細構造を覆いかぶしてしまい解像力の点で限界がある。

今日，ウイルス粒子の構造は超薄切片法とnegative染色法とによって研究される。とりわけ negative 染色法は，1959年 Brenner らにより開発されて以来，生物試料をみるための方法としては最高の分解能（20—30Å）が得られる特長を持っている。しかしこのオーダーでの観察には幾多の技術的制限が横たわり，実用化への道は険しい。 negative 染色法によるミキソウイルスの電顕研究については，わが国では深井，保坂[1]らによる業績が著名であるが，1969年天野ら[2]は電顕学会において，ウイルス粒子表面で赤血球凝集の働きをするスパイク（spike）の形態が，HVJ とインフルエンザとで明瞭な相違があることを明らかにした。われわれはかねてから negative 染色法の技法確

* 東京都立衛生研究所ウイルス部
** 東京都立衛生研究所長

立に努めてきたが，1969年9月天野博士による指導を契機として急速に実用化への見透しを得るに至った。

今冬流行したインフルエンザA2香港型ウイルスの電顕観察に当り，従来のシャドウ法に代り，negative染色法による検索を試みたところ，粗精製液にも拘らず明瞭なスパイクをもつウイルス粒子が容易に観察されることを見出した。対照として用いたHVJとアデノウイルスを含め，3種類のウイルスに施したnegative染色法の結果と，negative染色技法のキーポイントについて報告する。

（Ⅱ） 実験方法

1） ウイルス試料の精製法

i） インフルエンザA2香港型ウイルス

ウイルス培養後の孵化鶏卵漿尿膜液を3,000rpm，10分間軽く遠心する。上清を冷凍遠心機にて10,000rpm，1時間遠心し沈渣を試料とした。沈渣を再浮遊させる溶液として生理食塩水に替えて蒸溜水を用いてみた。食塩結晶の析出が視野観察を妨害するトラブルを起すのでそれを避けるためである。またこの精製における特徴は，従来行なってきた超遠心機による再精製の段階をわざと省略したところにある。狙いとするところは，negative染色法によるウイルス粒子の同定可能な限界内で，どこまで精製方法の簡略化，迅速化が行なえるか目安をつけるためである。

ii） 対照のHVJとアデノウイルス

HVJは44年9月天野（東北大）より分与された濃縮精製ウイルス液で，−20°Cに常時保存して使用した。正二十面体で知られるアデノウイルスは，日本電子KK松尾達也氏より分与されたものであるが，メッシュに載せてnegative染色処理済みの試料（4枚）である。

2） negative染色法

染色液は燐タングステン酸2％水溶液で，1％苛性カリでpH6.8に調整したものを使用した。褐色びんに保存し，常時10°Cの冷蔵庫内に保存している。

支持膜としてはトリヤホール製マイクログリッド[3]とカーボン蒸着膜補強コロジオン膜を使用した。マイクログリッド支持膜の作製法を簡単に述べると，先づ冷蔵庫を使用してトリヤホール製マイクログリッドをオベクトグラス上に作成する。次いでカーボン膜補強後，その上にコロジオン膜を張りメッシュに掬い上げ使用に供した。電子ビームに弱いコロジオン膜もプラスチックの細かいネットに裏打ちされて丈夫になり，negative染色用として最適の支持膜を構成する。

negative染色の原理をウイルスを例として略述すると次のようになる。すなわち通常のpositive染色に比べ対照的で，ウイルスそのものを化学的に染色するのでなく，電子ビーム不透過性の燐タングステン酸が，電子ビーム透過性のウイルスの周囲を包囲し，ウイルスを白く浮彫りにする物理的染色ともいうべき作用による。もしウイルス表面に凹凸の構造があれば，凹部に染色液が入り込みその表面構造を，ウイルス表層部に破れた個所があれば，そこから侵入して内部構造のコントラストを示すという具合になる。以上の染色原理からわかるようにnegative染色は，特異的反応による結び付きでなく単なる物理的作用にすぎないから，“像の解釈”が大きく問題とされる所以である。

染色手技は次の要領で行なった。適度に希釈したA2HKウイルス，HVJの各一滴を支持膜上に載せ，次で燐タングステン酸染色液（以下PTA液と略記する）の一滴をその上に重畳させる。30秒程放置した後炉紙で吸取り乾燥させる。炉紙での吸取り方の加減で，染色の濃淡の程度を調節する。カーボン補強膜上で染色処理をする場合は，カーボン膜が特に撥水性が強いので，慎重な操作が必要である。

3） 撮影条件

主なデータは次の通りである。

電顕機種　　JEM—6C

加速電圧　　80kV

直接撮影倍率　（×10,000），（×25,000）

ネガから10倍程度の引伸しを行ない，総合倍率10〜20万倍のプリント作成を目標とした。

前述したようにA2HKウイルス粒子の直径は約100mμなので，10万倍で10mmの大きさにしかならない。ウイルス粒子同定の目印となるスパイクの形態は，直接1万倍のネガから果してどの程度の鮮明さ，安定さをもって捕捉できるかが問題となる。

東の著書[4]によれば，直接倍率1万倍以上の撮影では，液体窒素使用による試料汚染防止対策が絶対に必要であるという。高倍率観察ないし撮影では，強い電子ビームで試料を照射する結果，試料の損傷，コンタミが急激に増加するからである。

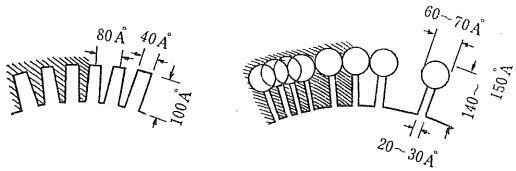
今回の実験は液体窒素を使わない状態のものであるが，一部アデノウイルスの観察では使用例があり，コンタミ減少の模様を経時的に追跡撮影した。

（Ⅲ） 実験結果

1） インフルエンザA2HKウイルスの観察結果

negative染色法による観察結果の一部を**写真**②〜④に示す。**第1図**は天野原図によるスパイクのシェーマであるが，写真②〜④にみられる球状，棒状ウイルス

図1　　図2



（天野原図）

の側面および表面に，密生するスパイクの存在が認められる。**写真①**は対照でPt—Pd(白金パラジウム）のシャドウ像であるが，スパイクの存在はつぶれて全く存在を窺い知ることが出来ない。精製の条件はシャドウ像，negative染色像ともにほぼ同じでかなり粗雑であったにも拘らず，negative染色像にのみスパイクが容易に見出せたことの意義は大きい。

スパイクの存在は，よいフォーカスで撮影した直接1万倍のネガ上に，安定に記録されることが判明した。10倍ルーペによるネガ観察若しくは10倍程度の引伸しプリントで確認することが出来，当初予想された「直接撮影倍率の低すぎ」の懸念は一応解消した。

2）HVJの観察結果

写真⑤～⑦に結果の一部を示す。**第2図**は天野原図によるHVJのシェーマであるが，スパイクの先端は丸く“たいこばち”状と形容されている。この事実は50万倍のシャープな電顕写真からの解析結果に基づくもので，通常の電顕技術では追試が覚付かない。

われわれの写真からスパイクの形状を判断すると，ウイルス周囲をとりまく層状構造として認められる場合が多い。時折独立した個々の突起としても認められたが，この際にはA2HKウイルスのスパイクと比較して，差異が認めにくい程酷似した場合もあった。天野は見え方の相違について，「スパイクの配列の仕方および観察の条件による」と指摘している。

HVJはその外形が写真にみるように多形性であり，溶媒の種類により膨潤したり，壊れやすい性質が知られている。**写真7**では，A2HKウイルスにおいては仲々観察し難いウイルス粒子内部のヌクレオキャプシッドの形態が散見されている。

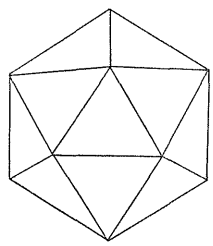
3）アデノウイルスの観察結果

写真⑧にnegative染色像の作例を示した。

第3図（保坂原図）にみるように，このウイルスは正二十面体の蛋白外被をもち，それは252個のcapsomereから構成されている。直径は80mμでA2HKウイルスと略々同じである。

写真⑧はウイルスの外形が六角形を呈し，ミキソウイルスと好対照を示している。正二十面体の結晶形はよく表現し得なかったが，ウイルス粒子表層のcapsomereの存在は，随所で観察することができた。このことはcapsomereの僅かな隙間に染色液が入り込んだことを示すもので，negative染色液の著しい滲透性を物語っている。

図3



正二十面体

（Ⅳ）考　察

インフルエンザウイルス等のnegative染色法が実用化の軌道に乗った原因として，次の諸点を挙げることができる。

1）ウイルス試料の低温保存に留意し，ウイルスの微細構造の保全に努めたこと。

2）溶媒として生理食塩水の使用を避け，蒸溜水を用いたこと。（蒸溜水に替えて燐タングステン酸溶液を用いれば，ウイルスの活性を保持することが出来る。）

3）マイクログリッド支持膜の自製ができるようになったこと。

4）染色手技の方法を改善したこと。前述したように，メッシュ上でインスタントに行なう方法が，簡単かつ効果的であることを知った。

5）自製した燐タングステン酸液の染色効果に自信をつけたこと。（天野により保証された）

6）高倍率撮影における電顕整備すなわち電子レンズの非点収差除去，鏡筒内および絞りのクリーニング，撮影時のフォーカス合わせ等に意を用いたこと。

7）液体窒素を使わない状態でもルーチンに，10万倍のプリントが得られるよう撮影条件を確立したこと。

反省される点で最大のものは，得られた写真が総体的に解像力不足なことである。対策としては，

① 液体窒素を採り入れ，試料汚染を防ぐこと。

② 電顕付属の試料汚染防止装置は効果が少いので，効率の良いアタッチメントと交換すること。

③ 現用のヘアピンフィラメントからポイントフィラメントの使用に切替える。

等が望まれる。

(V) 結 語

今冬流行したインフルエンザA2香港型ウイルスの電顕検索において，従来のシャドウ法に代えて negative 染色法を応用し，ウイルス同定の精度を著しく向上させることに成功した。その根拠は，ウイルス表面に存在するスパイクの有無を指標とする方法である。

また並行して高倍率撮影における，negative 染色法の実用化の方法について検討を進め，問題点を一つ一つ解明した結果，ルーチンに役立たせ得る技法の確立をみるに至った。今後の課題は，電顕写真の解像力向上への技術的対策と，得られた negative 染色像の解析法が目標となる。

終りに御指導賜った東北大・医・細菌，天野保二博士，日本電子KK松尾達也氏に厚く御礼申上げます。

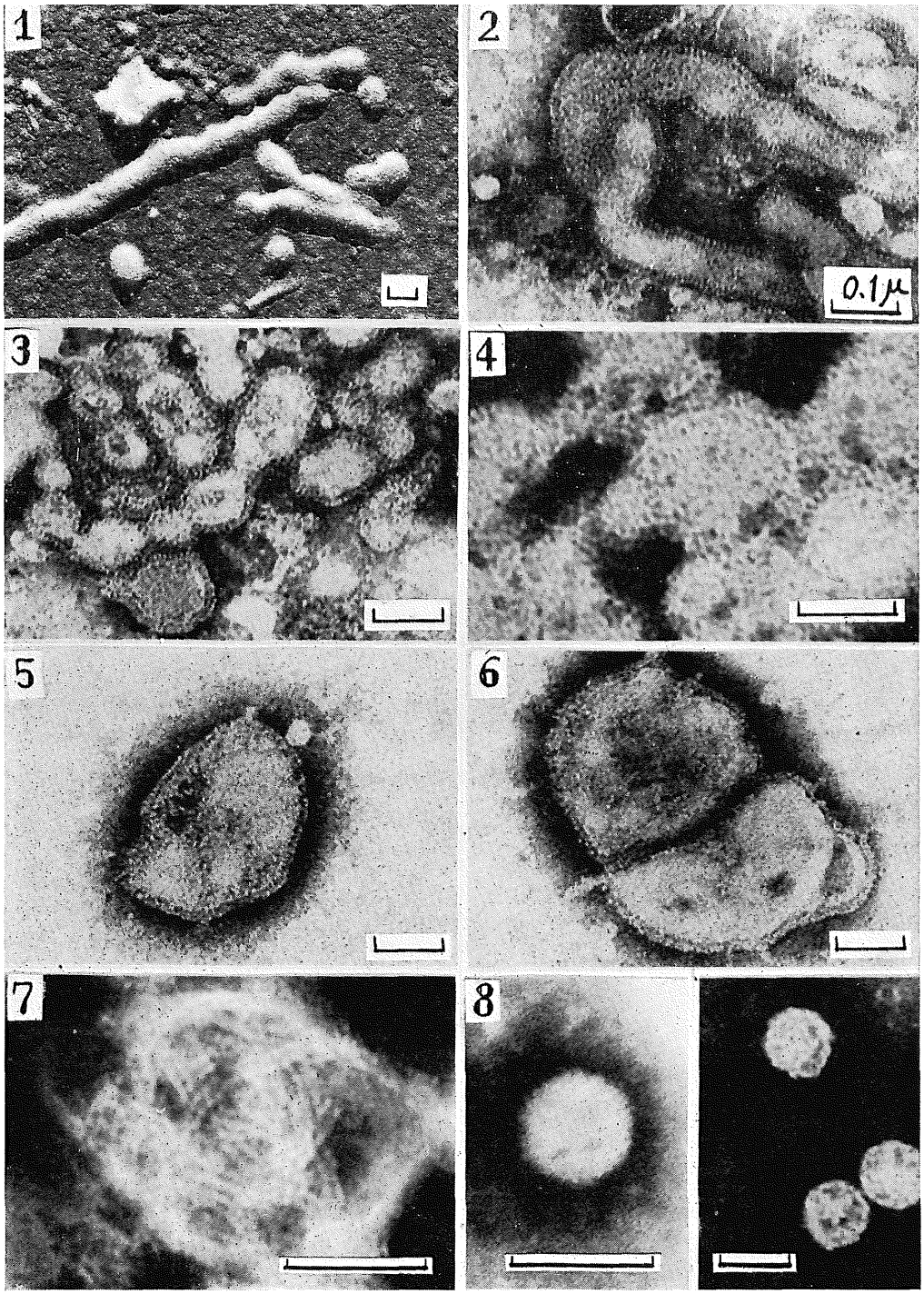
文 献

1) 保坂康弘：細胞 Vol. 1 (4), 13～20 (1969)
2) 天野保二，石田名香雄：第25回電顕学会講演予稿集，P109 (1969)
3) Fukami, A & Adachi, K : J. Electron Microscopy, 14, 112—118 (1965)
4) 東昇：医学生物学用電子顕微鏡学第3版，62頁 文光堂，東京 (1969)

写 真 説 明

スケールの単位は 0.1μ である。

1. インフルエンザA2香港型ウイルスの Pt—Pd シャドウイング像。10,000 rpm, 1時間遠心沈渣 (×40,000)
2. インフルエンザA2香港型ウイルスの negative 染色像。精製条件は1と同じ。長いウイルスの側面と表面に“スパイク”が認められ，同定に役立つ。(×100,000)
3. 試料は2と同じ。個々のウイルス粒子と顕著な側面のスパイク。(×100,000)
4. 試料は2と同じ。スパイクで覆われたウイルス粒子。×14引伸しで (×140,000)
5. HVJ (仙台ウイルス) の negative 染色像。スパイクは正確には“たいこばち”状であるが，通常の電顕ではこのようにウイルス粒子をとりまく層状構造として見えることが多い。(×100,000)
6. 試料は5と同じ。上部のウイルスは染色液がしみこんで，内部が稍透けて見える。(×100,000)
7. HVJ は壊れやすく，しみこんだ染色液の効果で観察されたウイルス内部のヌクレオキャプシッド (核蛋白)。(×200,000)
8. アデノウイルスの negative 染色像。ウイルスは正二十面体で，その外形は左の写真のようにほぼ六角形に見える (20万倍)。写真右は角張った外形の特徴をみせるウイルス粒子。試料が古くなり表面構造は壊れている。ミキソウイルスと異なり，スパイクは存在しない。(×100,000)


1
2
0.1μ
3
4
5
6
7
8

1969年東京都民の風疹HI抗体保有状況について

岩崎謙二* 坂井冨士子*
藪内清* 山田澄夫*
柳沢靖子* 佐々木憲子*
伊藤忠彦* 佐々木路子*
根津尚光*

INCIDENCE OF HI ANTIBODY AGAINST RUBELLA VIRUS AMONG INHABITANTS OF TOKYO IN 1969

kenji IWASAKI, Fujiko SAKAI, kiyoshi YABUUCHI,
Sumio YAMADA, Yasuko YANAGISAWA,
Noriko SASAKI, Tadahiko ITO, Michiko SASAKI
and Naomitsu NEZU

1965年以来わが国でも全国的に風疹の大流行が発生し，とくに沖縄では風疹による先天異常をもった新生児が多数発生し，従来この種の異常児の発生は少ないとされてきたわが国においても風疹は先天性異常の成因として強い関心がもたれるようになってきた。

現在，風疹は法定伝染病にも届出伝染病にもなっていないために，患者発生数をつかんで，流行の実態を把握することは困難である。近年になって，風疹ウイルスの血清学的手技術式がようやく確立され，改良簡易化され，血清疫学的調査研究にも盛んに利用されるようになった。それら調査研究の結果が風疹の流行実態を把握する強力な資料となっている。

著者らは，1969年6月に採取した健康都民血清345例について，風疹ウイルスに対するHI試験を行ない，都民の風疹抗体保有状況を，地域別，年令階層別，性別の面から解析検討した。

実験材料および方法

被検血清：1969年6月に，東京都内城南地区の糀谷，梅ケ丘，江東地区の足立，浅草，多摩地区の小金井，八王子計6保健所管内の健康住民から採取した血清345例を試験に供した。城南，江東の両地区は都心である区部に属し，多摩地区は都心を離れた郊外である。

被検血清を供血者性別にみると男177，女168で，年令階層別にみると，4～6才が49，7～9才が54，10～12才が45，13～15才が22，20～30才が48，31～40才が20，41～50才が39，51才以上が68である。

採取血清は－20°C のデープフリーザー内に凍結保存した。

HI試験：昭和44年度厚生科学研究費，風疹の疫学研究班の検査術式にしたがって，被検血清はアセトン処理を行ない，マイクロタイター法によって実施した。HA抗原は市販品（東芝化学工業KK）を使用した。

実験成績と考察

1） 地区別，年令階層別HI抗体保有状況について

HI価を測定した都民血清345例について，地区別（城南，江東，多摩の3地区）および年令階層別（4～6才，7～9才，10～12才，13～15才，20～30才，31～40才，41～50才，51才以上の8階層）に，抗体価別の累積抗体保有率（陽性率）を整理すると表1のようになる。

表1の成績から年令階層別に，3地区の抗体価別抗体保有率の平均値を算出して，正規確立紙上にプロットし，年令階層別の抗体保有状況のパターンをとらえるために，それぞれの傾向線を画くと図1のようになる。

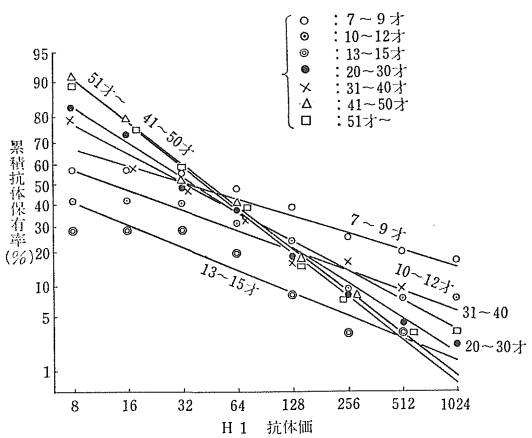
15才以下の各群は，パターンの上からはほぼ同一傾向を示した。すなわち陽性例中高い抗体価を示した例数の占める比率が高かった。これに反して，20才以上

* 東京都立衛生研究所ウイルス部

表 1　地区別，年令区分別および抗体価別に

地区別		城南地区								江東			
年令区分	HI価	4～6才	7～9	10～12	13～15	20～30	31～40	41～50	51～	4～6才	7～9	10～12	13～15
検査件数		19 件	20	14	6	13	8	15	24	18 件	19	17	4
抗体価別陽性率	8	0%	75.0	78.6	33.3	69.2	100.0	93.3	95.8	5.6%	68.4	11.8	25.0
	16	0	75.0	78.6	33.3	69.2	87.5	86.7	91.7	5.6	68.4	11.8	25.0
	32	0	75.0	78.6	33.3	46.2	50.0	60.0	79.2	5.6	68.4	11.8	25.0
	64	0	70.0	64.3	33.3	38.5	37.5	46.7	62.5	5.6	57.9	5.9	0
	128	0	55.0	57.1	16.7	15.4	12.5	33.3	29.2	5.6	52.6	5.9	0
	256	0	25.0	21.4	0	7.7	12.5	13.3	16.7	5.6	47.4	5.9	0
	512	0	20.0	21.4	0	0	12.5	0	8.3	5.6	36.8	0	0
	1024	0	10.0	21.4	0	0	0	0	8.3	5.6	36.8	0	0
	2048	0	5.0	14.3	0	0	0	0	4.2	0	26.3	0	0
	4096	0	5.0	7.1	0	0	0	0	0	0	15.8	0	0

図 1　年令階層別にみた都民の風疹HI抗体保有状況



の各群ではその比率が低率であった。

年令的にみて，風疹好発年令児の両親が多い31～40才の階層のパターンが15才以下の抗体保有パターンに近づいていることは興味のある知見である。

同型のパターンを示した15才以下の各群も，個々の抗体保有率をとってみると，7～9才，10～12才，13～15才の順に低下した。

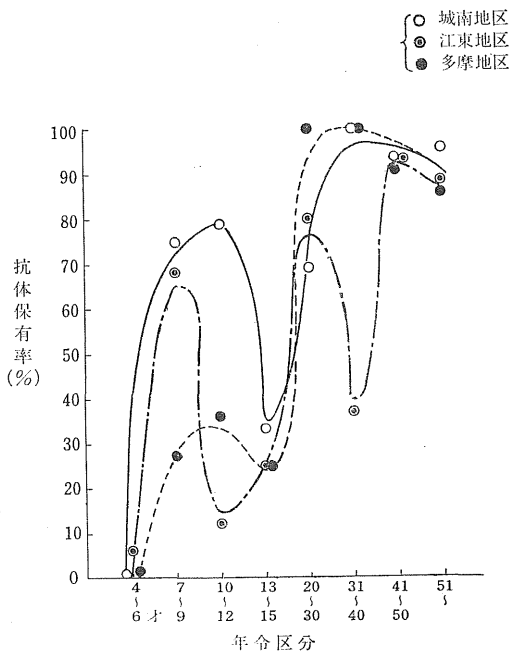
抗体価≧1：8の抗体保有率をみると，20才以上の各年令階層の抗体保有率は，15才以下のそれに比べてかなり高率であったが，それらの比率は抗体価1：64ないし1：512を境として逆転している。

このような年令階層別の抗体保有傾向線のパターンの変化は，実際の風疹ウイルスの初感染対象が15才以下の年令層に集中していることを反映しているものと思われる。

抗体価≧1：8の年令階層別抗体保有率を，地区別にグラフ紙上にプロットして，地区別抗体保有傾向線を画くと図2のようになる。

城南および多摩両地区の抗体保有傾向線のパターンは2峰性を示したが，江東地区は3峰性を示した。江東地区の3峰性パターンについては，検体数の偏りか

図 2　地区別，年令区分別にみた都民の風疹HI抗体保有率（≧1：8）



みた都民の風疹ＨＩ抗体保有率（累積値）

地区				多摩地区							
20～30	31～40	41～50	51～	4～6才	7 ～ 9	10～12	13～15	20～30	31～40	41～50	51～
19	7	14	16	12件	15	14	12	16	5	10	28～
80.0%	37.1	92.9	87.5	0%	26.7	35.7	25.0	100.0	100.0	90.9	85.7
55.0	28.6	85.7	62.5	0	26.7	35.7	25.0	93.8	60.0	63.6	71.4
40.0	28.6	57.1	56.3	0	20.0	28.6	25.0	56.3	60.0	36.4	39.3
30.0	14.3	42.9	25.0	0	13.3	21.4	25.0	43.8	40.0	27.3	25.0
25.0	14.3	7.1	6.3	0	6.7	7.1	8.3	12.5	20.0	9.1	10.7
10.0	14.3	0	0	0	0	0	8.3	6.3	20.0	9.1	3.6
5.0	14.3	0	0	0	0	0	8.3	6.3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	6.3	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

らくる誤差が考えられるので結論は控えたい。

4～6才の年令階層には抗体保有者がほとんどなく，7～9才ないし7～12才の階層にパターンの第1のピークがあり，このピークは最近の都内における風疹流行の実態が反映されていると考える。

この第1のピークには地区差が顕著に現われており，人口密度の高い区部に属する城南，江東両地区の抗体保有率は高率で，都心を離れた郊外の多摩地区の保有率は低率であった。大都市に比して小都市における風疹抗体保有率は低いという過去の報告例に一致する結果である。

第2のピークである20才以上の年令階層群では明らかな地区差は認め難い。

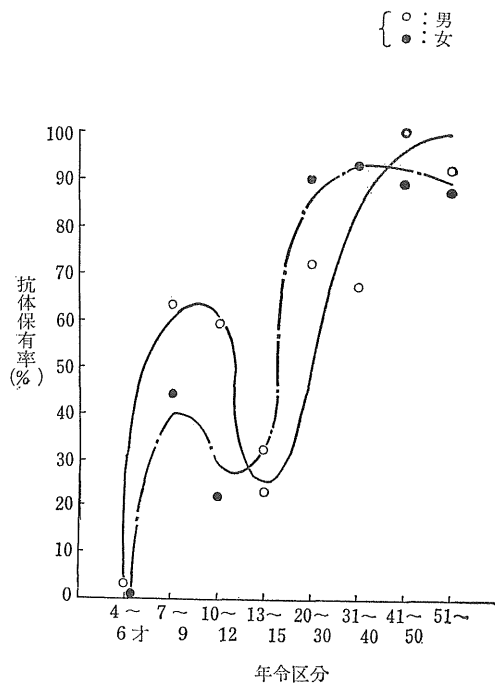
表1のデータを資料に，地区別差，年令階層別差，抗体価別差を因子として三元配置法によって統計的分析を行なったところ，1％の危険水準で，前記3因子はいずれも有意であったばかりでなく，地区別差と年令階層別差，地区別差と抗体価別差，年令階層別差と抗体価別差の各2因子間の交互作用も有意で，前記の結論は統計的分析の上からも裏づけられた。

2) 性別の抗体保有状況について

男177例，女168例の試験結果を，年令階層別および抗体価別に示すと表2のようになる。

抗体価≧1：8の保有率をグラフ紙上にプロットして，性別の抗体保有傾向線を画くと図3のようになる。12才以下の低年令階層においては男性が，20～40才の年令階層では女性がやや高率であった。20才以上の年令階層では，抗体保有率は男女ともにほぼ80％以上の高率を示していた。

図3 性別，別年令区分別にみた都民の風疹ＨＩ抗体保有率（≧1：8）



風疹抗体保有率の性別による差異は従来から強調されていない。前記のわれわれの調査結果における性別による差異も，風疹ウイルスに対する性別に由来する感受性の影響とは考えていない。幼少年令者の日常生活行動上における範囲とか患児に接触する両親の頻度・時間など生活環境上の諸要因が間接的に基因としているものと考える。

表 2　性別，年令区分別および抗体価別にみた都民の風疹 HI 抗体保有率（累積値）

性別		男								女							
年令区分		4～6才	7～9	10～12	13～15	20～30	31～40	41～50	51～	4～6才	7～9	10～12	13～15	20～30	31～40	41～50	51～
HI価	検査件数	30件	38	22	13	18	6	12	38	19件	16	23	9	31	14	28	30
抗体価別陽性率	8	3.3%	63.2	59.1	23.3	72.2	66.7	100.0	92.1	0%	43.8	21.8	33.3	90.3	92.8	89.2	86.7
	16	3.3	63.2	59.1	23.3	66.7	50.0	91.6	73.7	0	43.8	21.8	33.3	74.2	64.2	75.0	80.0
	32	3.3	60.6	54.6	23.3	27.8	50.0	58.4	55.3	0	43.8	21.8	33.3	58.1	42.8	50.0	60.0
	64	3.3	55.3	40.9	23.3	22.2	16.7	33.3	39.5	0	43.8	17.8	22.2	45.2	35.7	42.8	36.7
	128	3.3	42.2	27.3	7.7	16.7	0	8.3	18.4	0	37.6	17.8	11.1	19.4	21.4	21.4	13.3
	256	3.3	26.4	4.5	0	5.5	0	0	11.2	0	18.7	13.1	11.1	9.7	21.4	10.7	3.3
	512	3.3	21.3	0	0	0	0	0	5.3	0	18.7	13.1	11.1	6.5	14.3	0	0
	1024	3.3	18.4	0	0	0	0	0	5.3	0	12.5	13.1	0	3.2	0	0	0
	2048	0	13.3	0	0	0	0	0	2.6	0	6.3	8.7	0	0	0	0	0
	4096	0	7.9	0	0	0	0	0	0	0	6.3	4.4	0	0	0	0	0

表2のデータを，性別差，年令階層別差，抗体価別差を因子として統計的解析を試みたところ，単独での性別差は5％の危険水準で有意差をみとめられなかったが，性別差および年令階層別差の2因子の交互作用は1％の危険水準で有意差がみとめられた。

結　論

著者らは，1969年6月に採取した東京都内城南，江東，多摩3地区の健康住民血清345例について，風疹ウイルスに対するＨＩ抗体価を測定して，抗体保有状況の地域別差，年令階層別差，性別差などについて解析検討した。

1）抗体価≧1：8の抗体保有率をとって，年令推移をみると，4～6才の年令層には陽性例がほとんどなく，7～9才または7～12才を第1のピーク，20才以上を第2のピークとした2峰性の抗体保有パターンを示した。

第1のピークは最近の都内の風疹流行の反映であると考える。

2）年令階層別に抗体価別抗体保有パターンをみると，15才以下では高い抗体価を示した例数の陽性例数に対する比率が高く，20才以上になるとその比率は逆に低率であった。同様な抗体保有パターンを示した15才以下の各年令階層も，個々の抗体保有率は7～9才が最も高率で，10～12才，13～15才の順で低下した。

3）抗体価≧1：8の抗体保有率をとって，地区別差を検討すると，地区別差は12才以下の年令階層において顕著であった。都心の区部に位置する城南，江東両区間には殆ど差がなくともに高率であったが，郊外の多摩地区は前2地区に較べてはるかに低率であった。

20才以上の年令階層になると，都心，郊外の地区別差はみられなかった。

4）性別の抗体保有率（≧1：8）は，15才以下では男性が，20～40才では女性がやや高率であった。

参考文献

1）川上勝朗他：ウイルス，16，329（1966）
2）太田原美作雄他：日伝染会誌，41，412（1968）
3）同　上　　：同　上　，41，417（1968）
4）同　上　　：同　上　，41，434（1968）
5）早川　泰他：医学のあゆみ，61，227（1969）
6）平山宗宏他：同　上　，61，331（1969）
7）厚生科学研究費風疹の疫学研究班：風疹Ｈ1試験の術式（1969）
8）甲野礼作他：麻疹・風疹，朝倉書店，東京，141，（1969）
9）甲野礼作他：麻疹・風疹，朝倉書店，東京，206，（1969）
10）永山徳郎他：麻疹‥風疹，朝倉書店，東京，161，（1969）

ペーパーデスク法における阻止円形成に及ぼす2・3の影響について

松本昌雄　神保勝彦
春田三佐夫

FACTORS AFFECTING ON THE FORMATION OF CLEAR ZONE IN THE DISK ASSAY METHOD

Masao MATSUMOTO, Katsuhiko ZINBO and Misao HARUTA

(Depatment of Milk and Meat Hygiene, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

The disk assay method by using *Bac. stearothermophilus* var. *B. calidolactis* as sensitive organism for detection of antibiotics in milk and dairy-products were recommended by the International Dairy Federation in 1968.

In this method an agar medium heavily seeded with the test organism is poured into a Petri-dish and a small filter paper disk soaked in samples is then placed on the surface of the agar. After incubation for only 2.5 hours at 55°C, clear zone occure around the disks where antibiotics or other inhibitor has diffused into the medium. By comparison with known controls, the diameter of the zone of inhibition can be used to give a quantitative estimation of the antibiotics present in samples. Although this method seems to be very applicable, the formation of clear-zone be influenced by physical and biochemical factors. Therefore, the experimental observations on factors affecting on the formation of inhibitory zone were done, and the results obtained were as follows.

1) As to the sizes of the disk paper (8, 10 and 12mm of diameter), there was no significant differences in the results of the test.
2) The diameter of the clear zone increased with the lapse of incubation times.
3) The diameter of the clear zone decreased in inverse propotion to the thickness of agar layer.
4) Maximal multiplicity of the enrichment cultures of the organism was attained usually within 16 hours after incubation, when 1 m*l* of the suspension (10^7 cells per m*l*.) was inoculated into 100m*l* of enrichment medium.
5) Concentrations of agar in the media prepared for the test were 1, 1.25, 1.5, 1.75 and 2% respectively. The diameter of the clear zone was found to be consistently larger on the plate of lower concentration of agar than on that of higher ones.

(1) まえがき

牛乳および乳製品の需要の増大に関連して乳質改善が声を大にしてさけばれている折から，これに追い打ちをかけるかのように牛乳へのBHC残留問題が起り，牛乳の安全性が再びクローズアップされるに至った。

牛乳への残留移行薬物としては，農薬のほかに乳房炎の治療および予防時に投与される抗生物質があり，これもまた公衆衛生上大きな問題になっている。

牛乳中の残留抗生物質の検出法としては一般に微生

物学的検査法が利用されているが，それには液体培地法（色素還元法，例えば Neal & Calbert[1] の TTC 法）と固形培地法（例えばデスク法あるいはカップ法）とがある。ペニシリンの検出感度は TTC 法[1] で 0.05～0.01 IU/ml，ペーパーデスク法特に *B.calidolactis* を用いた Galesloot & Hassing 法（1962）[2),5)] では0.001～0.0025 IU/ml と言われている。

ペーパーデスク法はいずれの方法にしてもペーパー中に含滲している抗生物質がペーパーの周囲に拡散して試験菌の発育を抑制し，円形の透明な抑制帯を生成するところから，この抑制帯（阻止円）の大きさを計測することによって，試料に含まれる抗生物質の含有量を推定する方法である。

このようにペーパーデスク法は水平拡散現象を応用したものであるから，阻止円の直径の大きさは試料中の抗生物質の種類および濃度によって変化することは勿論のこと，そのほかの諸要因もまた拡散現象に強く影響すると考えられる。そこで今回，筆者等は1968年の国際酪農連盟年次会議において E. Green によって標準法として提案された Galesloot & Hassing のペーパーデスク法[3)~5)] をとりあげ，阻止円の直径におよぼす要因について若干の実験を行なったので，その結果を報告する。

（2） 実験及びその結果

（2—1） 寒天培地の寒天濃度の検討

（2—1—1） 実験条件

基礎培地：トリプトン（Difco 製）0.5%，酵母エキス（Difco 製）0.25%，グルコース（和光純薬，特級）0.1%，pH 7.0。

寒天濃度：Difco 製の粉末寒天を使用し，濃度は 1.0，1.25，1.5，1.75及び2.0%とした。

寒天注入量：底の内径8.6cm のペトリー皿に液体培養と混合した寒天培地を 8 ml 注入して平板を作成した。

供試菌及び菌量：*Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C 953 の 16時間の培養菌（菌量 4.3×10^7/ml）を使用した。

ペニシリン液：ペニシリンGカリウム(明治製菓株) 0.1 IU/ml を含む還元乳。

デスクペーパー：東洋沪紙(株)製の No. 27 厚手の直径 10mm のデスクペーパーを用いた。

実験方法：IDF の Galesloot & Hassing のデスク法に準じた。

（2—1—2） 実験結果

その結果は表—1 に示した。

すなわち，供試寒天濃度のうち 1%，1.25%，1.5%の場合における各阻止円の直径の平均値は，それぞれ22.2，22.2，21.8mm であって，この三者間に有意差（1%の危険率）は認められなかった。

しかし寒天濃度が 1.75%，2.0% になると阻止円の直径の平均値は21.2及び21.7mm と若干小さくなる傾向を示し，この両濃度における阻止円の直径は前三者（寒天濃度が 1，1.25 及び 1.5%）の直径との間に有意差が認められた。

表-1 寒天濃度が阻止円の直径に及ぼす影響

1.00%	1.25%	1.50%	1.75%	2.00%
mm	mm	mm	mm	mm
23.1	23.0	22.4	21.7	22.1
23.0	22.9	22.2	21.7	22.1
22.9	22.9	22.2	21.6	22.1
22.3	22.8	22.1	21.5	21.9
22.0	22.6	21.8	21.4	21.9
22.0	22.0	21.7	21.1	21.7
22.0	21.6	21.7	21.1	21.7
21.8	21.6	21.6	20.8	21.6
21.7	21.6	21.5	20.8	21.4
21.6	21.5	21.3	20.4	21.0
範 囲 23.1～21.6	23.0～21.5	22.4～21.3	21.7～20.4	22.1～21.0
平 均 22.2	22.2	21.8	21.2	21.7

（2—2） 平板寒天培地の厚さの検討

（2—2—1） 実験条件

寒天培地の厚さ：底の内径 8.6cm のペトリー皿に液体培養と混合した寒天培地を，5，6，7，8，9，10，11及び 12ml をそれぞれ注入して厚さの異った平板寒天培地を作成した。（ただし，この場合の寒天培地の寒天濃度は 1.5% である）

その他の実験条件は実験（2—1）に同じである。

（2—2—2） 実験結果

表—2 に示したように，寒天培地の注入量が多くなるにつれて阻止円の直径が小さくなる傾向が認められた。

5～12ml の寒天注入量のうちで，5 ml の場合における阻止円が最も大きく平均 22.1mm であった。6，7，8 ml の各阻止円の直径の平均値は 21.4，21.5，21.1mm であったが，9，10，11，12ml となると阻止円は若干小さくなり19.8，19.8，19.5，19.5mm を示した。注入量が 6 ml の場合の阻止円の大きさ(21.4 mm）と 7 ml の場合のそれ（21.5mm）との間に有意

表-2　寒天培地の注入量が阻止円の直径に及ぼす影響

5 ml	6 ml	7 ml	8 ml	9 ml	10ml	11ml	12ml
mm							
22.8	21.9	22.5	21.7	20.3	20.0	19.9	19.8
22.7	21.9	22.4	21.6	20.1	20.0	19.8	19.8
22.4	21.8	22.0	21.2	20.1	20.0	19.8	19.8
22.1	21.6	22.0	21.2	20.0	19.8	19.7	19.7
22.1	21.4	21.6	21.2	19.9	19.8	19.5	19.7
22.1	21.2	21.3	21.0	19.9	19.8	19.5	19.5
22.0	21.2	21.2	20.9	19.7	19.8	19.3	19.4
21.7	21.2	21.0	20.9	19.5	19.7	19.2	19.4
21.7	21.2	20.9	20.8	19.5	19.6	19.2	19.4
21.5	21.0	20.6	20.6	19.5	19.5	19.2	19.2
範囲22.8～21.5	21.9～21.0	22.5～20.6	21.7～20.6	20.3～19.5	20.0～19.5	19.9～19.2	19.8～19.2
平均 22.1	21.4	21.5	21.1	19.8	19.8	19.5	19.5

差（危険率1％）は認められなかった。しかしそれ以外のものは相互に有意差が認められた。

（2—3）接種菌の培養時間の検討

（2—3—1）実験条件

1. 供試菌：*Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C953 の3代継代培養の菌液 1 ml（菌量 10^6/ml）を 100ml の増殖培地に接種した後，15, 16, 17, 18及び19時間ごとに培養菌を取り出して，それを各供試菌とした。

2. 菌量測定：測定培地にはＩＤＦのペーパーデスク法の寒天培地を用い，菌数測定は48時間後に行なった。

3. 平板寒天培地：15, 16, 17, 18及び19時間ごとの培養菌についてそれぞれの平板寒天培地を定法に準じて作成した。

4. 菌の活性度：ＴＴＣ色素の還元力は菌の活性に比例すると仮定して，ＴＴＣの発色度の強弱を菌の活性度の強弱とした。

15, 16, 17, 18及び19時間ごとに培養菌を取り出して，その菌液 1 ml を 9 ml のブイヨン（ＩＤＦのペーパーデスク法の寒天培地の組成に準ずる）に接種して 55±1°C の温度で 2.5 時間培養した。その直後 4％ ＴＴＣ溶液 0.3ml を添加混合し，更に 30分間培養を継続して直ちに 550mμ で吸光度を測定した。

なお，対照としてはＴＴＣを添加しない培養菌を用いた。

（5）ペニシリン液及びデスクペーパー：実験(2—1)に同じである。

（2—3—2）実験結果

供試菌を増菌培地に接種した後，15, 16, 17, 18, 19時間ごとに取り出して各培養時間ごとの菌量，ＴＴＣの発色度（吸光度）及び阻止円の大きさなどについて測定した結果は，表3～4及び図1に示す通りであ

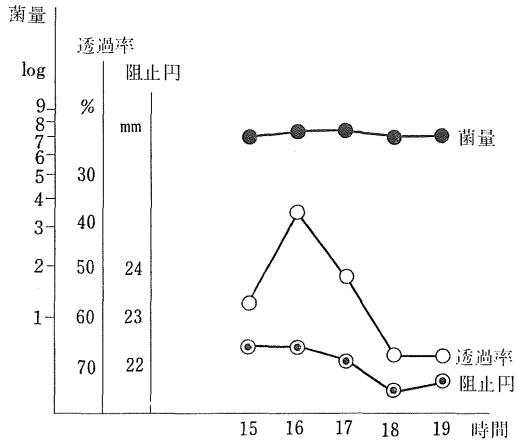
表-3　接種菌の培養時間が阻止円の直径に及ぼす影響

15 h	16 h	17 h	18 h	19 h
mm	mm	mm	mm	mm
22.8	22.4	22.0	21.4	21.5
22.6	22.7	23.0	21.4	21.7
22.0	22.0	21.5	21.4	21.5
22.4	22.0	22.3	22.0	21.3
22.1	22.6	22.4	20.8	21.7
21.7	21.8	22.0	21.3	21.8
22.4	23.1	21.8	21.0	22.0
22.4	23.1	22.4	22.0	21.8
22.5	22.3	21.9	21.8	22.2
22.7	22.3	21.7	22.0	21.5
平均 22.4	22.4	22.1	21.5	21.7

表-4　接種菌の培養時間並びに活性と阻止円の直径との関係

供試菌の培養時間（時間）	菌量（1 ml中）	吸光度（％）	阻止円の直径の平均値（mm）
15	1.8×10^7	57.50	22.4
16	3.6×10^7	38.25	22.4
17	3.6×10^7	51.75	22.1
18	1.4×10^7	68.00	21.5
19	2.2×10^7	68.00	21.7

図-1　接種菌の培養時間と菌量，活性阻止円との関係



る。

これによると菌量は各培養時間ともに大差ないが，吸光度即ち菌の活性が著しい変化を示した。すなわち，各培養時間のうち16時間において最も活性が強く，続いて15時間，17時間で，18時間と19時間は同程度の活性を示した。阻止円の大きさは，活性の低下する18時間及び19時間では，活性の強い16時間にくらべて小さくなる傾向を示した。

(2—4)　阻止円の測定時間の検討

(2—4—1)　実験条件

0.1 IU/ml のペニシリンを含む還元乳に浸漬したデスクペーパー（東洋沪紙㈱製，No. 27 厚手の直径 10 mm）を定法に準じて平板寒天培地上に置き，55±1°C の温度で培養し，所要時間（2.5, 3.5, 5.5, 24 時間）ごとに阻止円の大きさを測定した。

(2—4—2)　実験結果

表5に示したように実験Ⅰ～Ⅳのいずれも，阻止円は培養時間の経過とともに大きくなる傾向を認めた。

そのうち実験Ⅳについての詳細な資料は表6～7に示した。

すなわち，2.5，3.5および5.5時間培養の阻止円の大きさの平均値はそれぞれ20.7，22.0，22.9mmで，時間の経過とともに漸次大きくなった。そして24時間後には阻止円が巨大化して測定不能となった。

2.5時間培養のものにくらべて3.5時間培養のものは約90%が0.1～0.2mmの大きさで直径が増大し，5.5時間培養のものは約80%が1.1～3.0mmの大きさで直径が増大した。

(2—5)　ペーパーデスクの大きさの検討

(2—5—1)　実験条件

表-5　測定時間が阻止円の直径に及ぼす影響（1）

実験番号	測定例数及び阻止円	測定時間 2.5 h	3.5 h	5.5 h	24 h
Ⅰ	測定例数	10	10		10
	阻止円の直径の平均値	mm 21.3	mm 21.7		mm 22.3
Ⅱ	測定例数	10	10		10
	阻止円の直径の平均値	mm 20.7	mm 21.1		mm 22.0
Ⅲ	測定例数		10		10
	阻止円の直径の平均値		mm 20.7		mm 21.3
Ⅳ	測定例数	60	60	60	60
	阻止円の直径の平均値	mm 20.7	mm 22.0	mm 22.9	測定不能

表-6　測定時間が阻止円の直径に及ぼす影響（2）

	測定時間 2.5 h	3.5 h	5.5 h	24 h
測定例数	60	60	60	60
阻止円の直径の平均値	mm 20.7	mm 22.0	mm 22.9	測定不能
阻止円の直径の範囲	mm 20.0～21.6	mm 20.4～23.2	mm 21.0～24.4	〃
増大した直径の大きさの範囲		mm 0.1～ 2.6	mm 0.7～ 3.4	〃

表-7　測定時間が阻止円の直径に及ぼす影響（3）

増大した直径の大きさ ＼ 測定時間	3.5 h	5.5 h
3.1～4.0 mm	0	8例(13.3%)
2.1～3.0	6例(10.0%)	25例(41.7%)
1.1～2.0	34例(56.7%)	24例(40.0%)
0.1～1.0	20例(33.3%)	3例(5.0%)

ペーパーデスク：東洋沪紙㈱製の直径 12mm（No. 27，厚手），直径 10mm（No. 27，厚手）及び直径8 mm（抗生物質用として市販）の三種類のペーパーデスクを用いた。

(2—5—2)　実験結果

直径8，10，12mmの三種類のデスクペーパーを使

って，低濃度のペニシリンの検出を試みた。その結果は表8～9に示した。

すなわち，三種類のデスクペーパーのペニシリンの検出感度は同じであって，いずれのデスクペーパーを使っても 0.0025 IU/ml以下は検出できず，0.003 IU/ml 以上は検出可能であった。

表-8　ペーパーデスクの大きさと牛乳の吸収量

ペーパーデスクの直径(mm)	8	10	12
測定例数	10	10	10
吸収牛乳量(ml) (平均値)	0.0571～0.0513 (0.0526)	0.0923～0.0790 (0.0835)	0.1118～0.1054 (0.1098)

表-9　ペーパーデスクの大きさとペニシリンの検出感度

ペーパーデスクの直径(mm) / ペニシリンの濃度(IU/ml)	8	10	12
0.001	−	−	−
0.0025	−	−	−
0.003	+	+	+
0.004	+	+	+
0.005	+	+	+

（3）　総　　括

牛乳および乳製品中の抗生物質の検出法の一つにペーパーデスク法がある。

本検出法における阻止円の直径は，菌の発育抑制物質の含有量によって影響されるが，それ以外の諸要因とくに実験条件による影響を検討した。

その結果は，次のように要約される。

(1)　検出培地の寒天濃度と阻止円の大きさとの相関について検討した結果，寒天濃度が1.5% 以上になると阻止円が小さくなる傾向を認めた。

すなわち，寒天濃度が1，1.25および1.5%の場合の各阻止円の間では有意差は認められないが，しかし，寒天濃度が1.75および2%と高くなると阻止円が若干小さくなり有意差が認められる。

したがって，ＩＤＦの試験法による検出培地の寒天濃度は，既成濃度で良いと考えられる。

(2)　検出培地の厚さと阻止円の大きさとの相関について検討した結果，培地の厚さがうすいほど阻止円が大きくなる傾向を認めた。

内径8.6 cm のペトリー皿に5，6，7，8，9，10，11および12ml の量の培地をそれぞれ流し込んで厚さの異った平板を作成して，阻止円の大きさを比較した。

その結果，5 ml を流し込んで作成した平板における阻止円がもっとも大きく，続いて，6～8 ml の平板であった。なお 9 ml 以上の量を流し込んで作成した平板上の阻止円は 5～8 ml におけるそれにくらべて若干小さくなる傾向を認めた。

このことから，内径8.6cm のペトリー皿を使用する場合は，5～8 ml の培地を流し込んで平板を作成するのが適当と考えられる。

(3)　ＩＤＦの試験法によると接種菌に16～18時間培養菌を用いることになっている。

そこで，培養時間（15～19時間）と阻止円の大きさとの相関について検討した。

その結果，培養時間（15～19時間）による菌量の差異は認められず，いずれも 10^7/ml であった。しかし，菌の活性は培養時間によって著しく異り，16時間培養菌の活性が中でももっとも強かった。続いて15および17時間培養菌の活性であり，両者ともに同程度の活性を示した。18時間培養菌の活性は更に低下し，19時間も同程度の活性を持続した。

この菌の活性の強弱に相応じて阻止円の大きさが変る傾向が認められた。

すなわち，活性の強い15～17時間培養菌を用いた時の阻止円の大きさは，活性の比較的低い18～19時間培養菌を用いた時の阻止円の大きさにくらべて大きくなる傾向を示し且つ有意差が認められた。

上記のことから，増殖培地に継代培養菌液（菌量が 10^7/ml）を1%の割合に移植した場合は，15～17時間培養した菌液を検出培地の接種菌として供試するのが適当であると考える。

(4)　ＩＤＦによると阻止円は2.5時間後に測定することになっている。津郷等[5]は，菌の活性状態の相違によって菌の発育時間が変るので，阻止円の測定は2.5時間以上の適当な時間に行なって良いと述べており，そしてそれは2.5時間より長く培養しても阻止円の直径は変らないからであると言及している。

そこで阻止円の測定時間と阻止円の直径との相関について検討を試みた。

その結果，培養時間が長くなるにつれて阻止円の直径は漸次大きくなり相互間に有意差が認められた。

これらのことから，検出限界濃度あるいはそれに近い低濃度の抗生物質を含有する試料については2.5時間後に測定するよりはむしろ長時間培養してから阻止円を測定した方が良いと考えられる。他方，逆に高濃

度の場合は長時間培養によって阻止円が巨大化して測定不能となる危険があるので，2.5時間で測定した方がよいと考えられる。

以上のことから，津郷等が述べているように「長時間培養しても阻止円の直径が不変」とするのは危険と考えられる。

従って，阻止円の直径の測定は常に対照を置きながら一定時間後に行なえばよいと考えられる。

なお，試験目的が低濃度の抗生物質の検出にあるとすれば，阻止円の測定は2.5時間よりはむしろ24時間後にでも行なった方がよいのではないかと考えられる。

(5) ＩＤＦによるとデスクペーパーには，直径12～13mmのものを使用することになっている。しかし，わが国では上記の大きさのデスクペーパーは市販されておらず，ただ抗生物質用として直径8mmのものしか市販されていない。

他方，抗生物質検出試験の円筒法においては，試料中の有効物質の濃度が阻止円の直径を決定するが，ペーパーデスク法では試料中の有効物質の量が支配因子となる。

以上のことから，デスクペーパーの大きさによってペニシリンの検出感度が異るかどうかを，三種類のデスクペーパー（直径が8，10および12mm）を用いて検討した。

その結果，デスクペーパーの大きさの如何にかかわらず検出感度は同じで0.003IU/m*l*であった。ただ，デスクペーパーの直径の大きいものは，低濃度の阻止円が見易い傾向を示した。

以上のことから，ＩＤＦの記載する直径12～13mmのデスクペーパーを特別に注文して調製する必要はなく，市販されている直径8mmのデスクペーパーで充分であると考えられる。

（4） 参考文献

1) Neal, C. E., & Calbert, H. E.; J. Dairy Sci., 38, 629 (1955).
2) Galesloot, T. E., & Hassing, F.; Ned. Melk-en Zuiveltijdschr., 16, 89 (1962).
3) E. Green; International Dairy Federation, V-DOC86 (1968).
4) 日本国際酪農連盟；昭和44年度牛乳乳製品の成分規格設定事業最終報告書1970（資料第19号）。
5) 日本国際酪農連盟；第53回国際酪農連盟年次会議報告（1969）。

食品における Pseudomonas fluorescens の分布と酵素活性について

直井家寿太　小久保彌太郎
二島太一郎　松本　茂

（本研究の概要は第68回日本獣医学会（山口1969年）において報告した）

DISTRIBUTION OF PSEUDOMONAS FLUOLESCENS IN FOODS AND OF ITS ENZYMATIC ACTIVITIES

Yasuta NAOI, Yataro KOKUBO, Taichiro NISHIMA and Shigeru MATSUMOTO

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

A survey was made on the 175 food samples, consisting of 42 vegetables, 35 salads and 98 other miscelaneous cooked foods, for the isolation of *Pseudomonas fluorescens* which has been ascribed to be one of the most important psychrophilic spoilage agents of foods.

As a results, a total of 70 strains of *Ps. fluorescens* were isolated. Among them, 46 strains were found to be capable to produce proteolytic and lipolytic enzyme. Most of the isolates failed to produce cellulase, amylase, pectinase, chitinase and phosphatase. Enzymatic activities were observed both at 10°C for 10 days and 25°C for 5 days incubation, however, no qualitative differences were observed on the results obtained through these two incubation temperature.

All the isolates grew well at temperatures between 5°C and 30°C, but half of them failed to grow at 37°C.

All the isolates were capable to propagate in the broth containing 5% of NaCl, in the medium containing 7% of NaCl only 25 of the isolates showed toleranse, in the presence of 10% of NaCl all the strains failed to grow.

まえがき

Pseudomonas 菌属は広く自然界に分布するところから，本菌属によって食品が汚染されている事が当然予想されるが，その大部分は腐敗雑菌として軽視されてきた。

しかし，近年食品の低温貯蔵の普及にともない，低温でも増殖可能な Psychrotrophic bacteria，すなわち低温細菌の存在が重視されるようになった。本菌属は低温で良く発育し，またその生化学的活性が強いところから，今日では代表的な低温腐敗菌として注目されており，その産生酵素により，冷蔵食品の腐敗，あるいは変敗に関与していると思われる。本菌属と食品との関係に関する報告は，乳肉魚介関係の食品に関するもの[1)-6)]が多く，その他の一般食品に関するものはあまり見あたらない。しかし，今日冷蔵庫などの冷蔵設備の一般への普及のため，乳肉魚介食品以外の一般食品も，当然安易な考えから冷蔵されると考えられ本菌属との関係を検討する必要がある。

そこでわれわれは，Pseudomonas 菌属の中でも代表的な低温細菌といわれる *Ps. fluorescens* を取り上げ，農産食品を主体とした一般調理食品中の本菌の分布を調査し，さらに，この分離菌を用いて，食品に影響をおよぼすと考えられる種々の酵素の産生の有無を検討しあわせて保存性の問題に関連して，発育温度特

性及び耐塩性についても検討を加えた。

試験方法

1. 分離方法

供試食品は農産食品を主体とした一般調理食品175例を用いた。各試料30gを無菌的に計り取り，滅菌ホモヂナイザーで10%試料液を調製し，その0.1mlをCVT寒天培地平板に塗抹後，25°Cで48時間培養し，赤色を示す定型的集落で，Gram陰性，無芽胞性の桿菌を分離した。分離菌については，表1に示す生物学的性状[7),8)]を調べ，その性状に一致したものを *Ps. fluorescens* として同定した。

表1 *Ps. fluorescens* の生物化学的性状

キングB培地での蛍光	+
カタラーゼ試験	+
チトクローム・オキシダーゼ試験	+
ブドウ糖酸化醗酵試験	酸化
アルギニン脱炭酸酵素試験	+
運動性	+
インドール産生性	−
硫化水素産生性	−
42°Cでの発育	−

2. 各種酵素活性試験法

各供試食品から分離された70株を対象に，次の方法で7種の酵素の産生の有無を調べた。なお，活性試験温度ならびに培養時間は，一般の冷蔵庫内の標準温度と思われる10°Cで10日間及び *Ps. fluorescens* の発育至適温度といわれている25°Cで5日間観察した。試験結果で述べるが，これらの温度では，いずれの使用培地にも良く発育した。

① Lipase

Tween 80加寒天培地及び上田ら[9)]が低温細菌の脂肪分解活性検出用に推奨しているCrossley寒天培地を用い，いずれもスポット法により発育した集落及びその周囲の状態から判定した。

② Protease

脱脂乳加寒天培地平板上にスポットし，集落周囲に透明帯を形成するものを陽性とした。

③ Chitinase

ペプトン酵母エキスブイヨン培養液を酵素液として，川崎ら[10)]及びReissigら[11)]の方法に従いN-Acetyl glucosamin量を測定した。

④ Cellulase

ペプトン酵母エキスブイヨン培養液を酵素液として，若林ら[12)]の方法に従い，還元糖をSomogyi-Nelson法で測定した。

⑤ Phosphatase

フェノールフタレインフォスフェイト寒天培地平板上にスポットし，培養後アンモニアガスにさらし，集落が鮮明な桃色になったものを陽性とした。

⑥ Amylase

溶性デンプン加寒天培地平板上にスポットし，培養後デンプン反応をおこない，反応が集落周囲に現われないものを陽性とした。

⑦ Pectinase

Dowson[13)]により紹介されているWieringaの試験管法をおこない，液化の有無により判定した。

3. 発育温度特性

ペプトンに酵母エキスを0.1%に加えたブイヨンを使用し，5，7，25，30，37°C培養をおこない，その混濁により判定した。

4. 耐塩性

発育温度特性を試験するのに用いたと同じブイヨン培地に，食塩を0，3，5，7，10%の割に加えたものを使用し，25°Cで培養し，その混濁により判定した。

試験結果

1. *Ps. fluorescens* の分布

供試食品175例中50例（約30%）から本菌が分離された。そこで汚染食品の内訳を明かにするため，供試食品を表2に示すように分類した。

表2 一般食品中の *Ps. fluorescens* の分布

供試品名	供試例数	分離例数(%)
サラダ類（野菜サラダ，イモサラダ，卵サラダ，他）	35	15(42.8)
野菜単味の食品（キャベツ千切，レタス，他）	42	25(59.5)
その他の一般調理食品（煮物，フライ，スパゲティー，他）	98	10(10.2)
計	175	50(28.6)

その結果，サラダ類の43%，野菜単味の食品の60%から本菌が分離された。したがって，本菌汚染食品の80%は生鮮野菜及びサラダ類により占められ，これらの食品には，他の一般調理食品に比して，かなり高率に *Ps. fluorescens* の汚染が認められた。

2. 各種酵素活性

10°Cと25°C培養では，いずれの酵素産生能にも，有意の差は認められなかった。

各酵素活性陽性株数及び率は表3に示すとおりである。

表 3 各酵素活性陽性株数（率）

酵素名	陽性株数(%)
Lipase (Tween 80 培地)	33 (47.0)
Lipase (Crossley 培地)	54 (77.0)
Protease	50 (71.4)
Chitinase	0 (0)
Cellulase	4 (5.7)
Phosphatase	7 (10.0)
Amylase	0 (0)
Pectinase	0 (0)

lipase 活性は，Tween 80 加培地では47%，Crossley 培地では77%が陽性であり，Tween 80 加培地での陽性株は Crossley 培地でもすべて陽性であった。反応所見は，Crossley 法の方が明瞭に認められ，判定が容易であった。

protease 活性は，70 株中 50 株に認められ，そのうちの46株は，Crossley 法で観察した場合の lipase 活性をも有していた。

それら以外の酵素活性は，われわれの調べた株では，いずれも認められないか，cellulase, phosphatase 活性のように認められても非常に弱い活性であった。

3. 発育温度特性

発育株数は表4に示すとおりである。

表 4 発育温度特性

培養温度(°C)	5	7	25	30	37
発育株数	70	70	70	70	35

5°C及び7°Cでは5日以内に，25°C及び30°Cでは2日以内に全株とも良く発育した。しかし，37°Cでは半数の35株が発育したのみで，一般に発育速度も遅かった。

4. 耐塩性

発育株数は表5に示すとおりである。

食塩無添加及び3%添加では24時間で，5%添加では48時間で，全株とも良好な発育を認めた。しかし，

表 5 耐塩性

塩濃度(%)	0	3	5	7	10
発育株数	70	70	70	25	0

7%添加では70株中25株に発育を認めたが一般に弱い発育であり，10%添加では全株とも発育を認めなかった。

考察

低温腐敗菌として主要な *Ps. fluorescens* の一般食品中の分布を調査したところ，供試食品のほぼ30%から本菌を検出した。この結果は，Schultze ら[14]が行なった乳及び乳製品関係の食品からの分離率46%にはおよばないが，かなり高率であった。しかも，本菌汚染食品の80%が生鮮野菜を含む，いわゆる調理未加熱食品であったが，これは本菌が自然界に広く分布しているところから，当然と考えられる。しかし，植物の変質に関係があると思われる cellulase, amylase, pectinase などの活性を有する株は，ほとんど認められなかった。*Ps. fluorescens* について詳細な研究をおこなった Rhodes[7] も 169 株中 pectinase 活性を有する株は認められなかったと報告している。このことから，野菜単味の食品の場合には，本菌の汚染がかなり高くても，さほど影響はないものと考えられた。

それに反して，lipase, protease 活性は，今までのいくつかの低温細菌の総説[2),3),5),15~18)]に見るように，本菌による食品の低温腐敗上，重要な意義を持つものと考えられ，われわれの調査でも供試菌の70%以上の株に活性が認められた。この結果は，分布状態からみて，植物性の材料を使用するサラダ類や，蛋白性食品に，*Ps. fluorescens* の汚染があり，それが放置された場合は，本菌の産生する酵素の作用により変質する恐れがあると思われる。そのうちでも，lipase 活性は，乳及び乳製品中の脂肪の変質と密接な関係を有し，その検出法が検討されている。われわれも，従来の Tween 80 を使用する方法と，国際酪農連盟で標準化するように提案され，上田ら[9]が推奨している Crossley 法をおこない，その検出率を比較してみたところ，Crossley 法の方がはるかに良い結果であった。これは，本法では，バター脂肪を用いているため，Tween 80 よりも複雑な種々の脂肪酸を含むためと思われ，脂肪分解菌検出のためには，Crossley 法が，最もすぐれていると考えられる。

一般的な冷蔵庫内の温度と考えられる 10°C と本菌

の発育至適温度といわれている25°C での酵素の産生状況を比較したが，その産生株数による違いはなかった。Frank[19] も，*Ps. fluorescens* と分類学的に類似の *Ps. geniculata* 15 株を用いて，8°C と 27°C における種々の定性的生化学反応を比較した結果，有意の差はなかったと報告している。しかし，*Ps. fluorescens* の protease について検討した Peterson ら[20] は，この酵素の分泌は，0°C が最大で，温度の上昇と共に低下し，一度分泌された酵素の活性は，温度の上昇と共に強まると報告しており，定量的には，酵素の産生状況に差があると思われる。このようなことから，10°C 保存といえども，酵素による変質はかなり進行するものと考えられる。

食品の保存性の面から検討した発育温度特性及び耐塩性については，Rhodes[7] の報告よりわれわれの供試した菌株の方がやや発育率が良く，非常に幅広い発育温度域と，5～7%の塩濃度で発育した。この点からも，生化学的活性面に加えて，本菌の汚染は決して軽視出来ない問題である。

ま と め

代表的な低温腐敗菌といわれる *Ps. fluorescens* の分布を農産食品を主体とする一般調理食品を用いて調査したところ，約30%から本菌が検出され，そのうち野菜及びサラダ類が80%を占めた。

次に，分離菌70株を用いて，食品への影響を調べるため，10°C と25°C における種々の酵素の産生の有無について，また，保存性の問題に関連して発育温度特性と耐塩性について検討を試みた。その結果，培養温度による酵素産生の違いは認められず，約70%の供試菌が lipase 及び protease を産生した。しかし，野菜食品に影響を与えると考えられる cellulase, amylase, pectinase 活性は，ほとんど認められなかった。また，5～7%までの塩濃度で発育し，しかも幅広い発育温度域を示すところから，本菌で汚染された脂肪あるいは蛋白に富む食品を，上述のような条件下に放置した場合，それらの食品は，本菌により産生された酵素の作用により変質する恐れがあるものと推測された。

終りにのぞみ，御校閲を賜わった本研究所春田三佐夫乳肉衛生部長に謝意を表する。

参 考 文 献

1) Ayres, J. C. : J. Appl. Bact., 23, 471(1960)
2) Witter, L. D. : J. Dairy Sci., 44, 983 (1961)
3) 矢野信礼：食衛誌，5，103 (1964)
4) 島崎保家，沢井すが子，逆瀬川貞幹：日獣大紀要，14，26 (1965)
5) 春田三佐夫：食品衛生研究，18，246 (1968)
6) Shaw, B. G. and Shewan, J. M. : J. Appl. Bact., 31, 89 (1968)
7) Rhodes, M. E. : J. Gen. Microbiol., 21, 221 (1959)
8) Vanderzant, C. and Nickelson, R. : J. Milk and Food Tech., 32, 9 (1969)
9) 上田貞善，石塚厳，春田三佐夫，梅木富士郎：モダンメディア，15，363 (1969)
10) 川崎近太郎，伊藤誉志男：醗工誌，42，212 (1964)
11) Reissig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F. : J. Biol. Chem., 217, 959 (1955)
12) 若林和正，神田鷹久，西沢一俊：醗工誌，44，669，(1966)
13) Dowson, W. J. : "Plant Diseases due to Bacteria", p. 47 (Cambridge Univ. Press, 1957)
14) Schultze, W.D. and Olson, J.C., Jr. : J.Dairy Sci., 43, 346 (1960)
15) Ingraham, J. L. and Stokes, J.L. : Bacterial Rev., 23, 97 (1959)
16) Michener, H. D. and Elliott, R. P. : Adv. Food Res., 13, 349 (1964)
17) 小川益男：Japan Food Sci., 5(2), 8 (1966)
18) 清水潮：肉の科学，9，1 (1968)
19) Frank, H. A. : J. Bact., 84, 68 (1962)
20) Peterson, A. C. and Gunderson, M. F. : Appl. Microbiol., 8, 98 (1960)

サイクラミン酸のペーパークロマトゲラフ上の顕色法およびペーパークロマトグラフィーによる人工甘味料の一斉分析について

西垣　進*　西島基弘*
田村行弘*　松本　茂*

STUDIES ON A NEW DETECTION METHOD OF CYCLAMATE ON THE PAPER CHROMATOGRAM AND ITS APPLICATION ON THE ANALYSIS OF SYNTHETIC SWEETNINGS IN FOODS

Susumu NISHIGAKI, Motohiro NISHIZIMA,
Yukihiro TAMURA and Shigeru MATSUMOTO

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

はじめに

人工甘味料の試験法は数多く発表されているがペーパークロマトグラフィー（以下ＰＣ法）は簡易な方法であるにもかかわらず，サイクラミン酸に良い顕色法がないため[1]あまり用いられていなかった。そこで，我々は甘味料をＰＣ法で分離したのち[2][3]，サイクラミン酸についてはバリウム—ロジゾン酸を用いて顕色することにより良好な結果を得た。

また，本法を用いて市販果実，果汁缶詰および砂糖の人工甘味料について，検査を行ったので併せて報告する。

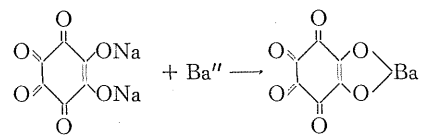
実験の部

1. ペーパ上のサイクラミン酸の顕色法

ＰＣ法で展開して風乾したのち，１％塩化バリウム，２％亜硝酸ナトリウム，２％塩酸を順次噴霧して少時放置し，ドライヤーで乾燥したのち，１％ロジゾン酸２ナトリウムを噴霧すると，サイクラミン酸の部分はロジゾン酸バリウムの赤色をバックに白色のスポットを発現する。

なお，本法におけるサイクラミン酸の検出限度は約５μgである。

本法の原理はロジゾン酸２ナトリウムがBa″と交換分解して弱塩酸々性で赤色を呈するので，サイクラミン酸を亜硝酸で分解して生成したSO_4''がBa''と結合して，サイクラミン酸の位置だけBa''が解離していないので赤地に白のスポットを発現する。



ロジゾン酸２ナトリウム　　ロジゾン酸バリウム(赤色)

（注）呈色機構にてらして，発色試薬のバランス，特に塩化バリウムの過剰をさけることが必要である。なお，本法を用いる場合サイクラミン酸５～10μgをＰＣ法で展開し，同時に顕色してみる事が望ましい。

2. 食品中からの分離法

a　液状検体

通常10～50gを分液ロートに取り，抽出法は薬学会協定法によると，サイクラミン酸の回収率が低下するため（表１）試験溶液を１％塩酸々性とし，食塩を飽

表１　抽出法による回収率（％）

試験法＼サイクラミン酸の濃度	2%	1%	0.2%
薬学会協定法	78	76	77
食塩飽和法	92	90	88

* 東京都立衛生研究所食品部

和したのち等量の酢酸エチルで振りまぜ，2回抽出する。

分離した酢酸エチル層を合せ食塩飽和の1％塩酸10 m*l* で洗滌したのち無水硫酸ナトリウムで脱水して沪過し，沪液を減圧で酢酸エチルを留去して，残渣をエチルアルコール 2 m*l* に溶かし検液とする。

b　固体検体（透析法）

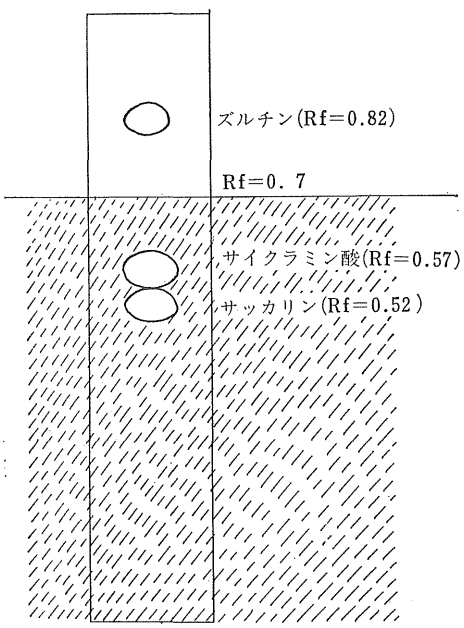
細切または，すりつぶした試料 10～50gを中和したのち Visking社のセロチューブ(30/32mm）に 1/50N-NaOH 約50m*l* を用いてつめ，1/50N-NaOH 150m*l* を入れた200m*l* のメスシリンダー中に浸漬して，ときどきゆりまぜながら常温で24時間透析を行う。

透析が終了したならば透析液をよくかきまぜ，一定量を取り液状検体と同様に処理する。

3.　ペークロによる確認法

検液 10～20μl をクロマト用ロ紙（東洋ロ紙No.51）にスポットして，*n*-ブタノール，エタノール，1％アンモニア＝(6：2：3）で約 15cm 展開して風乾したのち，薬学会協定法のとおり，はじめにサッカリン(Rf＝0.52）を紫外線照射により検出し，次いでズルチンは Rf＝0.7 以下をマスクしたのち（図1） 1％ *p-dimethylaminobenzaldehyde* 1N-塩酸溶液を噴霧して黄色のスポットにより検出する。

図1　甘味料のペーパークロマトグラフ



サイクラミン酸（Rf＝0.52）は Rf＝0.7 以上をマスクしたのち，先に書いたバリウム—ロジゾン酸法で検出する。

本試験法（検体50gを採取したとき）の検出限度はそれぞれ（表2）に示すとおりである。

表2　甘味料の確認限度

品　名	検出限度	検体中の甘味料の濃度	甘味を感ずる最低限度
サイクラミン酸	5μg	0.004％	0.1％
サッカリン	2.5μg	0.002％	0.01％
ズルチン	0.25μg	0.0002％	0.03％

グレプジュースの，あるものではズルチンと類似スポットを発現する場合があったので，薬学会協定法の薄層クロマトグラフィー（展開溶媒；酢酸エチル，シリカゲルプレート）を利用したところ，不明スポットを分離出来た。

市販品の検査結果および考察

本試験法をもちい，〔全糖〕と標示してある市販果実缶詰，果汁缶詰および砂糖について調べた結果は（表3）のとおりである。

表3　全糖標示缶詰中の人工甘味料の試験結果

品　名	種	サイクラミン酸	サッカリン	ズルチン
みかん	8	2	1	1
みかんジュース	11	1	—	—
桃	12	—	—	—
パインジュース	4	—	—	—
レモンジュース	2	—	—	—
コーラー	1	—	—	—
グレープジュース	2	—	—	—
フルーツみつまめ	2	1	—	—

みかん缶詰8缶中，人工甘味料の検出されたものは2缶であるが，その内の1缶はサイクラミン酸とサッカリンが検出された。他の1缶のサイクラミン酸の含量は，0.005％以下であった。このような微量の混入原因は人工甘味料添加製品と全糖製品と同じ機械で製造している場合，機械の洗滌不足の場合などが考えられる。

参　考　文　献

1）　孤田太郎，竹下隆三，衛生化学，204（1967）
2）　衛生試験法注解
3）　第2版食品添加物公定書注解

レッドチェリー缶詰の貯蔵中におけるキサンテン系色素の変化について

田村行弘* 西島基弘*
西垣進* 松本茂*

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE REDUCTION OF XANTHENE DYES DURING THE STORAGE OF CANNED RED CHERRIES

Yukihiro TAMURA, Motohiro NISHIZIMA,
Susumu NISHIGAKI and Shigeru MATSUMOTO

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

昭和43年度末の食品一斉検査において，キサンテン系色素で染色されたレッドチェリー缶詰中より，橙色系の不明色素が可成りの量検出された。

一般にレッドチェリーの染色には，食用赤色3号，食用赤色103号および食用赤色105号の三種混合色素が使用されているが，当初粗悪な不純物の多い色素が用いられたものと考えられ調査を行ったところ，そのような事実は認められなかった。

色素の分解については，太陽光線，加熱，ビタミン類等による分解産物の追究[3]，エオシンのアルカリ性水溶液の退色分解物についての追究[4]，トリフェニルメタン系色素のアルカリによる変化について[5]，キサンテン系色素のアルカリ分解について[6]等，種々の報告はあるが，実際の食品中における分解産物に対する報告は少なく，レッドチェリーについても報告はない。そこでわれわれは，缶詰中のキサンテン系色素が貯蔵中に缶内面のスズの溶出により還元をうけて，橙色の不明色素を産生したと推定し，現在使用許可となっているキサンテン系色素5種類で染色した桜桃および色素液を白缶および内面塗装缶につめたモデル缶詰を作成し，38°C でフ卵器中に保存し，その経時変化を調べて見た。その結果，色素の変化とスズの溶出量ならびにpHにおいて関連性が得られたので，ここに報告する。

実験の部

1. 実験材料

桜桃の収穫時に缶詰メーカーに依頼し，市販製品と同様の方法により作成した。表1に示したように，白

表1 モデル缶詰の内容

		白缶	内面塗装缶	ビン詰	シロップ
桜桃(有)	染色色素	チェリーレッド食用赤色3号	チェリーレッド食用赤色3号	チェリーレッド食用赤色3号	+
		103号	103号	103号	+
		104号	104号	104号	+
		105号	105号	105号	+
		106号	106号	106号	+
桜桃(無)	色素液	チェリーレッド	チェリーレッド		+
		チェリーレッド食用赤色3号	チェリーレッド食用赤色3号		−
		103号	103号		+
		104号	104号		+
		105号	105号		+
		106号	106号		+

1. 桜桃：品種・ナポレオン(10号)，梗付肉詰量100g＋液量100g(クエン酸0.35%)
2. 色素液：0.05%色素＋0.01%クエン酸，肉詰量200g
3. チェリーレッド：食用赤色3号＋食用赤色103号＋食用赤色105号(10：65：25)
4. シロップ：精製ブドウ糖＋人工甘味料（サイクラミン酸ナトリウム0.2%，サッカリン0.06%）
   ＋……添加したもの
   −……添加しないもの

* 東京都立衛生研究所

缶および内面塗装缶（200g 用のもの）の2種類に，食用赤色3号，食用赤色103号，食用赤色104号，食用赤色105号，食用赤色106号および桜桃の染色に用いられる混合色素のチェリーレッド（食用赤色3号10%，食用赤色103号65%，食用赤色105号25%）で，桜桃（品種10号ナポレオン）を果梗付のままで染色したもの，また別にpHを調整した色素液を詰めたものの計26種類を作成した。またコントロールには，缶詰と同様に染色した桜桃をビン詰にしたもの6種類を作成した。なお，チェリーレッドの色素液1種類を除き，市販品と同じくシロップ〔精製ブドウ糖＋人工甘味料（サッカリン0.06%＋サイクラミン酸ナトリウム0.2%）＋クエン酸，注入糖度13%〕を添加している。

2. 実験方法

① 貯蔵条件

一般に缶詰では，製造されてから最終消費年数がほぼ3年とされている。そこでわれわれもその程度の保存日数に相当する資料を得るために，38°C でフ卵器中に保存し，1日，5日，10日，20日，30日，50日および60日目に開缶して試験を行った。またコントロールとしてのビン詰は室温で，遮光し，90日間放置したものを試験に供した。

② pH の測定法

缶詰をフ卵器より取り出し，流水中で冷却し，開缶後，直ちに色素液はそのまま，また桜桃の入っているものは，果梗および種子を除き，全量をホモジナイズした後，ガラス電極 pH メーターを用いて pH を測定した。

③ スズ溶出量の測定

②と同様の処理後，硫硝酸で湿式灰化し 1N塩酸，1N 塩化アンモニウム溶液を支持電解質として，ポーラログラフィーにより定量した。

④ 色素の検査法

毛糸染色法により，抽出分離後，ペーパークロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーにより試験をおこなった。

㋑ ペーパークロマトグラフィーの条件

東洋沪紙 No. 50

展開溶媒 （i） アセトン＋イソアミルアルコール＋水（6：5：5）

（ii） 25%エタノール＋5%アンモニア（1：1）

㋺ 薄層クロマトグラフィーの条件

薄層板 ワコーゲルB—5，厚さ300mμ

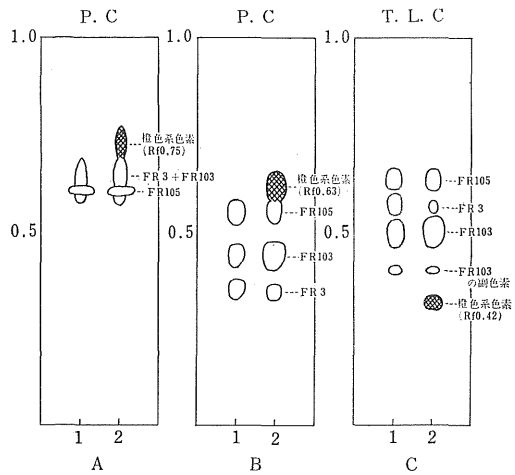
110°で1時間活性化

展開溶媒 *n*-ブタノール＋1%アンモニア＋エタノール（6：3：2）

結　　果

図1は，昭和43年度に問題となったレッドチェリー缶詰中より抽出分離した色素を，今回の実験の染色に使用した色素と比較したものである。図1—Aでは，食用赤色103号の上部（斜線の部分），図1—Bでは，食用赤色105号の上部（斜線の部分）にまた図1—Cでは食用赤色103号の副色素の下部（斜線の部分）の各々に橙色系色素が可成り検出しているのが標準色素との比較でわかる。

図1　レッドチェリー罐詰中の色素のペーパーおよび薄層クロマトグラム



1. 標準色素（食用赤色3号，103号および105号の混合色素）
2. レッドチェリー缶詰中の色素

A ペーパークロマトグラム（東洋沪紙No.50）
展開溶媒：イソテミルアルコール＋アセトン＋水（5：6：5）

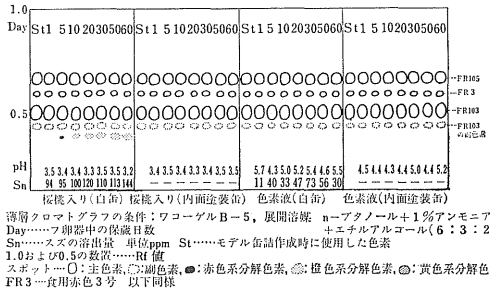
B ペーパークロマトグラム（東洋沪級No.50）
展開溶媒：25%エチルアルコール＋5%アンモニア水（1：1）

C 薄層クロマトグラム
吸着剤：ワコーゲルB-5
展開溶媒：*n*-ブタノール＋1%アンモニア水＋エチルアルコール（6：3：2）

この橙色系色素は，青色の強い蛍光を有し酸性でロイコ型となり色調を失い，エーテル層に移行し，またアルカリ性で復色し，水層に転溶する等その性質はキサンテン系色素と推定される。

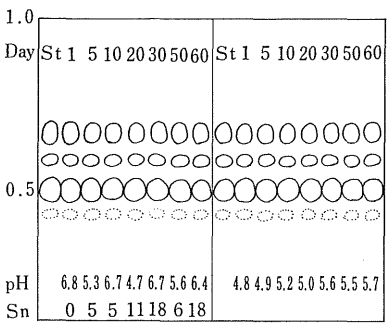
次にモデル缶詰について検討してみると，先ずチェリーレッドでは図2，3に示すように色素液の白缶および塗装缶，桜桃の入っている塗装缶からは60日経過

図2　モデル缶詰中のチェリーレッドの経時変化（薄層クロマトグラム，pHおよびスズ溶出量）



薄層クロマトグラフの条件：ワコーゲルB－5，展開溶媒　n－ブタノール＋1％アンモニア水＋エチルアルコール（6：3：2）
Day……フ卵器中の保蔵日数
Sn……スズの溶出量　単位ppm　St……モデル缶詰作成時に使用した色素
1.0および0.5の数字……Rf 値
スポット…○：赤色系，□：黄色系，●：赤色系分解色素，◎：橙色系分解色素，◎：黄色系分解色素
FR3…食用赤色3号　以下同様

図3　モデル缶詰中のチェリレッド（無糖）の経時変化（薄層クロマトグラム，pHおよびスズ溶出量）



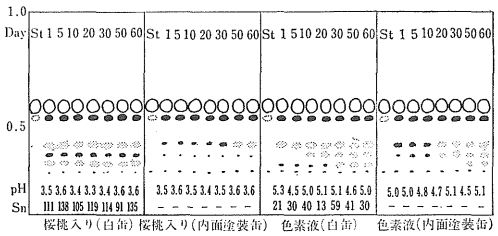
記号数値などは図2と同じ

した後でも問題の橙色系色素は検出されなかった。しかしながらスズの溶出量の多い桜桃入り白缶からは5日目より橙色系色素が表われ，保存日数が多くなるにしたがい増加してくる。この橙色系色素は図1に示したレッドチェリー缶中より検出された色素と同一であることがペーパークロマトグラムおよび薄層クロマトグラム等の Rf 値，色調および蛍光等により確認された。また色素液の白缶において，スズ溶出量の少ない理由はpH 5前後と高いためスズの溶出がおこらないものと考えられる。

図4は食用赤色3号についてで，色素液の白缶ならびに塗装缶および桜桃入り白缶のいずれからも，早いものでは5日目より蛍光の強い黄色および橙色系色素が産出し，桜桃入り塗装缶からは副生色素の産出はほとんど見られなかった。またスズの溶出量は桜桃入り白缶では，100ppm 前後と多いが色素液の白缶では，図2，3の色素液と同様 pH が高いため溶出量が少ない。

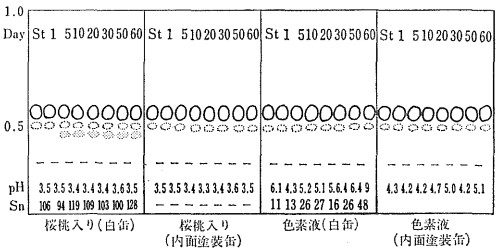
図5に示した食用赤色103号では，スズが 100ppm 前後溶出している桜桃入り白缶からのみ，橙色系色素

図4　モデル缶詰中の食用赤色3号の経時変化（薄層クロマトグラム，pH およびスズ溶出量）



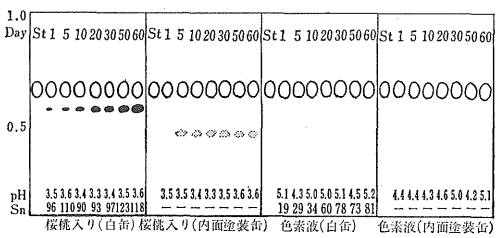
記号，数値などは図2と同じ

図5　モデル缶詰中の食用赤色103号の経時変化（薄層クロマトグラム，pH およびスズの溶出量）



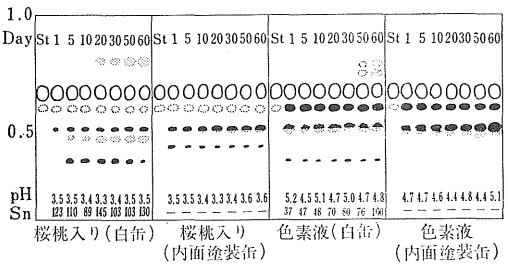
記号，数値などは図2と同じ

図6　モデル缶詰中の食用赤色104号の経時変化（薄層クロマトグラム，pH およびスズの溶出量）



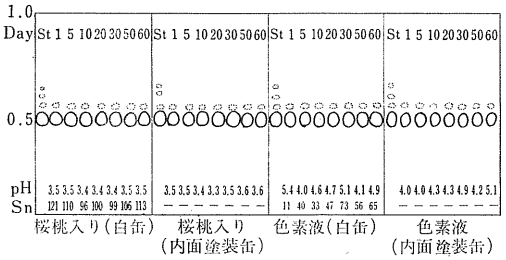
記号，数値などは図2に同じ

図7　モデル缶詰中の食用赤色105号の経時変化（薄層クロマトグラム，pH およびスズ溶出量）



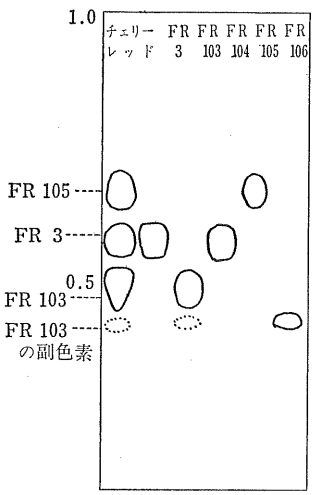
記号，数値などは図2に同じ

図8　モデル缶詰中の食用赤色106号の経時変化（薄層クロマトグラム，pHおよびSn溶出量）



記号，数値などは図2と同じ

図9　ビン詰中の色素の薄層クロマトグラフム



記号，数値などは図2と同じ

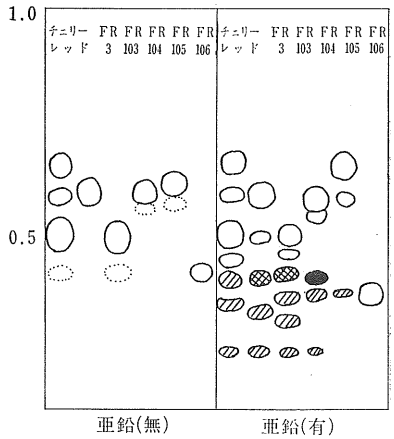
が産出され，日時が経過するにしたがい，その量も増加した。

図6に示す食用赤色104号では，桜桃入り白缶中よりわずかに赤色系色素が，また，桜桃入り塗装缶中より黄色系色素が産生した。

図7に示す食用赤色105号では，桜桃入り白缶中より，黄色，橙色および赤色系色素と多種類の分解産生色素を生じた。また，塗装缶では，赤色系色素を生じ，色素液では，赤色系色素である副色素が多くなり，その他に黄色系色素を産出した。

図8に示す食用赤色106号では，今回の実験の中で最も安定で，いずれの場合も変化が見られなかった。しかしながら，染色状態が他の色素と異なり，桜桃が他の色素では，表皮の近くにだけ染色しており，また，シロップは，ほとんど染色していない。食用赤色106号では，初めは，桜桃は表皮から肉部まで不均一

図10　pH3.5の緩衝液中で放置したもの



記号，数値などは図2に同じ

に染っており，シロップも濃く染色しているが，日時の経過するにしたがって，均一に染色し，更に種子にまでおよんだ。なおシロップは徐々にうすくなった。

図9に示すビン詰では90日常温に放置したあとも，いずれの色素も変化はなく，また，pHは桜桃入り缶詰と同様3.5前後であった。

図10は，pH 3.5の緩衝液（0.1％クエン酸に10％アンモニア水を加えpHを調整したもの）50mlを各試験管にとり，その各々に，各色素を0.1％になるように加えた後，各々を2等分し，一方はそのまま，他方には顆粒状の亜鉛1gを加え，コルク栓で軽くフタをして遮光し，1週間室温で放置後の結果を比較したものである。亜鉛を添加した色素液では桜桃入り缶詰と同様橙色系色素が表われ，更に，缶詰中では食用赤色3号にのみ表われていた蛍光の強い黄色系色素が食用赤色106号を除く他の色素中に産出した。食用赤色106号および亜鉛を添加しなかった色素液は，いずれも変化はなかった。

考　　察

この実験において，われわれが当初推定していた以上にキサンテン系色素（食用赤色106号を除く）が還元に対して弱いことが判明した。実験結果をまとめて見ると，表2のようであり，その結果は次のとおりである。

1.　還元状態における各色素の安定性の傾向

今回の実験結果では，食用赤色3号および食用赤色105号が最も還元に対して弱く，次いで，食用赤色103号および食用赤色104号となり，食用赤色106号は安定で今回の実験では，変化が認められなかった。

表2　モデル缶詰中の色素の分解およびスズの溶出量の傾向

		チェリーレッド	チェリーレッド	食用赤色3号	103号	104号	105号	106号
注1 桜桃入り	白缶	× 100		× 110	× 110	× 100	× 110	○ 110
	内面塗装缶	○ 0～10		× 0～10	○ 0～10	○ 0～10	× 0～10	○ 0～10
	ビン詰	○		○	○	○	○	○
色素液	注1 白缶	○ 30	注2 ○ 0→18	× 30	○ 30	○ 20→80	× 35→100	○ 10→60
	注1 内面塗装缶	○ 0～10	注2 ○ 0～10	× 0～10	○ 0～10	○ 0～10	× 0～10	○ 0～10
	注3 亜鉛を入れたもの		×	×	×	×	×	○
	注3 亜鉛を入れないもの		○	○	○	○	○	○

○…分解しないもの　×…比較的分解の少ないもの　×…分解の多いもの　数値…スズの溶出量(ppm)
注1…シロップ入り
2…シロップ無し
3…0.1%色素＋クエン酸緩衝液

この相違はpHによる安定性の違いおよび構造式上，特に，臭素とヨウ素の結合状態による差より生じるものと考えられる。コントロールとして用いたビン詰では，各色素共に経時変化は認められなかったが，これは桜桃中の還元糖，有機酸等の天然成分および味付けに用いた人工甘味料，クエン酸等の食品添加物の影響のないことを示している。また，強い還元状態，すなわち，亜鉛＋クエン酸中では，食用赤色106号を除いたキサンテン系色素に分解がおこり分解生成物が多量に生じた。すなわち，キサンテン系色素（食用赤色106号を除く）が強い還元状態の中におかれると，分解が早く，それによる生成物も更に分解が進む状態を示している。

2.　食用赤色3号および食用赤色105号

今回行った実験のうちで，この二者が最も分解しやすく，スズの溶出量のほとんどない塗装缶およびpHが5前後でスズ溶出量の少ない弱い還元状態にある色素液缶詰中においても分解が見られた。スズ溶出量の少ない塗装缶でも，鉄の量が20ppm前後検出され，鉄とクエン酸または有機酸との還元状態によるものと考えられる。また，色素液缶詰での分解には，pHもかなり影響を与えているものと考えられる。すなわち桜桃入り缶詰のようにpH3.5位になるとほとんどが色素酸（ラクトン型）となって沈殿し，比較的安定な状態となる。しかし，pH 5前後では，コロイド状（キノイド型）を呈し（特に食用赤色3号および食用赤色105号はこのpHが最適である）不安定な状態であるため，弱い還元状態においても分解がおこるものと考えられる[7]。

3.　食用赤色103号および食用赤色105号

この二者はスズの溶出量の少ない状態ではほとんど影響を受けないが，pH 3.5前後，スズ溶出量100ppm前後と条件が揃うと徐々に分解が起こり分解生成物を生じる。なおこの二者はpH 4.2がコロイド状態を呈する最適pHであるため，色素液缶詰では比較的安定であったものと考えられる。

4.　食用赤色106号

この色素は，他のキサンテン系色素とは構造上も異なるため，還元状態につよく，本実験中に他の色素の産生は見られなかった。

以上の結果より，43年度末に桜桃缶詰中より検出された橙色系キサンテン色素は，チェリーレッドの主成分すなわち食用赤色103号がスズ存在下の還元状態において分解し生じた色素と考えられる。

今回は実験結果についてのみの報告であるが，食品の加工，貯蔵等において生じる食品添加物の分解産物が，近年衛生上の問題として種々報告されているため，この観点から今後分解色素がどのようなものであるか確認するため実験を継続中である。

謝　　辞

試料缶詰の製造および提供に御協力をいただいた日東食品製造株式会社の各位に対し深謝する。

なお本報は，第18回食品衛生学会に発表したものである。

参 考 文 献

1) 衛生試験法
2) 食品添加物公文書
3) 石橋武二，公衛雑，12 (7)，613 (1965)
4) Heffter A. Ber. deut. Chem. Ges. 38, 3636 (1905)
5) 松井多一他：東京都立衛生研究所 年報XI
6) 神蔵美枝子：食衛誌 8, 427 (1967)
8, 434 (1967)
9, 348 (1968)
7) 後藤力雄：New Food Ind. 2, (6) 21 (1960)
8, (8) 20 (1966)

合成樹脂製容器包装材料中の化学物質の食品への移行性に関する研究

塩化ビニル樹脂製の器具および容器包装について行なった規格試験結果の考察

藤居　瑛*　佐藤彌代子*
上田　工*　松本　茂*

STUDIES ON THE ELUTION OF CHEMICAL SUBSTANCES CONTAINING IN THE POLYVINYL CHLORIDE-PACKING MATERIALS FOR FOOD

Teru FUJII, Yayoko SATŌ,
Kō UEDA and Shigeru MATSUMOTO

(Department of Food-Hygiene, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

はじめに

塩化ビニル樹脂は，食品の器具および容器包装として各種の用途に用いられているものであるが，その製品には，硬質と軟質のものがあり，保存容器には硬質塩ビが多く用いられている。塩化ビニル樹脂は，ポリエチレンやポリスチレンに比べて添加剤の種類も多く，添加量も数%から数十%にも及ぶものもあり，とかく衛生上の問題が起こり易い。

安定剤に使用される鉛，カドミウム，スズなど有害金属化合物が特に問題であるが，近年FDAにも認可された低毒性のオクチル錫化合物を使った硬質塩ビの製品は，溶出物も少なく安全性の高いものとして清酒の容器やアイスクリームのカップ類など食品の容器として伸びてきている。

昭和41年10月4日厚生省告示第434号として合成樹脂製器具容器包装の規格試験が改正公布されて以後取扱った規格試験の結果をまとめて報告を行なうとともに問題点を検討してみたい。

(1) 試　料

表1に示すフィルム28件，シート硬質14件，軟質9件，カップ類8件，中空成形ビン25件，ストロー7件，王冠用ジスクおよびコンパウンド25件，マナイタ4件，スティック（飴棒）7件の計10種127件についての試験結果を取上げた。

表1　試　料

形状	件数
フイルム	28
シート（硬質）	14
シート（軟質）	9
カップ	8
ビン	25
ストロー	7
王冠ジスク コンパウンド	25
マナイタ	4
スティック	7
計　10種	127件

(2) 試験法

食品添加物等の規格基準（厚生省告示第370号）第3のAの6，合成樹脂製の器具および容器包装の規格試験（昭和41年10月4日厚生省告示第434号改正）によって行なった。

(3) 試験結果

規格試験を行なった結果は，表2 a)～h)に示すとおりである。

* 東京都立衛生研究所食品部

表2 規格試験成績

a) フイルム

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
			ppm	ppm	ppm
1	—	—	—	1.5	0.80
2	—	—	—	3.5	0.16
3	—	—	—	3.0	0.48
4	—	—	—	3.0	0.64
5	—	—	—	3.5	0.47
6	—	—	—	4.0	0.79
7	—	—	—	2.0	0.79
8	—	—	—	1.0	0.95
9	—	—	—	2.5	1.43
10	—	—	—	1.0	0.63
11	—	—	—	1.0	0.95
12	—	—	—	2.5	0.95
13	—	—	—	2.0	0.47
14	—	—	—	3.5	0.47
15	—	—	—	1.0	0.95
16	—	—	—	1.0	1.71
17	—	—	—	3.5	1.55
18	—	—	—	5.2	2.45
19	—	—	—	5.5	2.13
20	—	—	—	9.5	3.08
21	—	—	—	8.5	2.45
22	—	—	—	1.0	1.47
23	—	—	1.5	2.5	1.47
24	—	—	—	0.5	1.94
25	—	—	—	0.5	1.39
26	—	—	—	0.5	1.63
27	—	—	—	0.5	1.55
28	—	—	—	2.5	1.70
計	28件 適27 否1(重金属限度以上1)				

b) シート（硬質，軟質）

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
29	—	—	—	5.0	1.95
30	—	—	—	5.5	2.89
31	—	—	—	5.0	0.68
32	—	—	—	0.5	1.16
33	—	—	—	3.5	0.89
34	—	—	—	7.5	0.87
35	—	—	—	1.5	1.32
36	—	—	—	3.0	1.47
37	—	—	—	1.0	1.24
38	—	—	—	1.5	1.32
39	—	—	—	1.5	0.96
40	—	—	—	0.5	0.72
41	—	—	—	0.5	0.72
42	—	—	—	1.0	0.96
43	—	—	—	13.0	16.6
44	—	—	—	17.0	2.77
45	—	—	—	0.25	1.20
46	—	—	—	2.5	2.95
47	—	—	—	6.5	6.26
48	—	—	—	2.5	6.97
49	—	—	—	164.5 (Ca)	6.97
50	—	—	—	10.5	4.57
51	—	—	—	21.5	17.42
計	23件 硬質塩ビ14 適14 否0 軟質塩ビ 9 適 6 否3			蒸発残留物限度以上 1 過マンガン酸カリウム消費量限度以上2	

c) カップ

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
52	—	—	—	1.8	3.02
53	—	—	—	1.5	1.08
54	—	—	—	2.5	3.33
55	—	—	—	3.0	1.22
56	—	—	—	3.5	0.97
57	—	—	—	2.0	1.30
58	—	—	—	2.5	0.89
59	—	—	—	5.5	1.34
計	8件 適8 否0				

d) 中空成形ビン

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
60	—	—	—	8.5	1.72
61	—	—	—	2.5	0.32
62	—	—	—	3.0	0.32

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
63	—	—	—	2.5	0.80
64	—	—	—	6.0	0.79
65	—	—	—	4.0	0.47
66	—	—	—	2.5	0.63
67	—	—	—	3.0	3.29
68	—	—	—	1.0	1.47
69	—	—	—	0.5	4.26
70	—	—	—	6.0	1.34
71	—	—	—	4.5	1.03
72	—	—	—	4.5	1.11
73	—	—	—	5.5	0.71
74	—	—	—	7.0	1.19
75	—	—	—	9.5	1.08
76	—	—	—	1.0	1.32
77	—	—	—	0.5	2.63
78	—	—	—	0.5	1.63
79	—	—	—	2.0	2.25
80	—	—	—	2.5	1.29
81	—	—	—	0.5	1.21
82	—	—	—	1.5	1.37
83	—	—	—	5.0	2.5
84	—	—	—	2.0	1.63
計	25件　適25　否0				

e）ストロー

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
			ppm	ppm	ppm
85	—	—	—	1.5	1.72
86	—	—	—	3.5	0.94
87	—	—	—	4.0	1.72
88	—	—	—	1.0	1.47
89	—	—	2.0	8.0	2.63
90	—	—	—	0.5	1.94
91	—	—	—	4.5	2.00
計	7件　適6　否1(重金属限度以上1)				

f）ジクス パッキング（発泡品）コンパウンド

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
92	—	—	—	185.0	24.33
93	—	—	—	29.5	6.48

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
94	—	—	—	300.5	2.91
95	—	—	—	239.5	19.89
96	—	—	—	9.0	3.21
97	—	—	—	4.5	10.00
98	—	—	—	1.0	1.24
99	—	—	—	2.5	1.53
100	—	—	—	16.5	3,33
101	—	—	—	0.5	2.53
102	—	—	—	7.0	3.40
103	—	—	—	232.5	11.85
104	—	—	—	25.5	50.56
105	—	—	—	43.5	61.62
106	—	—	—	4.5	75.84
107	—	—	—	9.0	41.08
108	—	—	—	19.0	7.51
109	—	—	—	6.5	3.64
110	—	—	—	5.0	2.63
111	—	—	—	2.0	2.25
112	—	—	—	1.0	2.00
113	—	—	—	1.0	2.00
114	—	—	—	1.0	1.94
115	—	—	—	210.0	22.34
116	—	—	—	4.5	2.0
計	25件　適17　否8			蒸発残留物限度以上 6 過マンガン酸カリウム消費量限度以上 8	

g）マナイタ

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
				ppm	ppm
117	—	—	—	7.5	27.53
118	—	—	—	13.5	23.14
119	—	—	—	0.75	1.44
120	—	—	—	21.5	16.46
計	4件　適1　否3			過マンガン酸カリウム消費量限度以上 3	

h）スティック

No.	フェノール	ホルムアルデヒド	重金属	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
			ppm	ppm	ppm
121 〜 127	—	—	3.5 〜 4.0	35.0 〜 48.5	2.63 〜 4.26
計	7件　否7			重金属限度以上 7 蒸発残留物限度以上 7	

(4) 判定および考察

規格試験を行なった結果の総合判定は表3に示すとおりである。

表3　規格試験総合判定結果

試料	件数	適(%)	否(%)
フィルム	28	27(93.1)	1(6.9)
シート(硬質)	14	14(100.0)	0(0)
シート(軟質)	9	6(66.6)	3(33.4)
カップ	8	8(100.0)	0(0)
ビン	25	25(100.0)	0(0)
ストロー	7	6(85.7)	1(14.3)
ジスク,コンパウンド	25	17(68.0)	8(32.0)
マナイタ	4	1(25.0)	3(75.0)
スティック	7	0(0)	7(100.0)
計	127	104(81.9%)	23(18.1%)

判定結果が不合格となった項目について表4に示す。

表4　不適項目

試料	不適項目数	重金属検出	蒸発残留物	過マンガン酸カリウム消費量
フィルム	1	1	0	0
シート(硬)	0	0	0	0
シート(軟)	3	0	1	2
カップ	0	0	0	0
ビン	0	0	0	0
ストロー	1	1	0	0
ジスク コンパウンド	14	0	6	8
マナイタ	3	0	0	3
スティック	14	7	7	0
計	36	9 (25.0%)	14 (38.9%)	13 (36.1%)

各試験項目ごとに考察をすすめてみると,

1.　フェノールおよびホルムアルデヒド

全く検出されない。

塩化ビニル樹脂の原料としては，フェノールおよびホルムアルデヒド（ホルマリン）を使用するものではないので，ここで検出されたものはない。しかし食品用ではないがヘキサミンを配合した合成ゴム製品からホルムアルデヒドを検出した例があるので注意が必要である。

2.　重金属

塩化ビニル樹脂には，安定剤として鉛，カドミウム，バリウムなどの金属石鹸類，また有機スズ化合物が配合されるので，この試験項目はしばしば不適となるところである。

重金属(鉛)を検出した不適品9件中，試料 No.23は厚さ0.1mmの白色フィルムであり，試料 No.89は白色の径4.5mm，長さ200mmのストローである。試料 No.121～No.127は7色の径4.8mm，長さ200mmの飴用の丸棒であり，7色いずれからも鉛が検出されたものである。

ストローからの鉛溶出について，加藤の報告[1]によると4%酢酸中に20°で10分間漬けたとき，ストロー1本から最低35μg，最高110μgの鉛が検出されている。

試料 No.89のストローについては，2ppmの鉛が検出されているのでこれを計算すると，1本のストローから規格試験によって溶出する鉛の総量は226μgとなる。

ストロー表面積＝0·45π×20×2≒56.5(cm²)

浸出液4%酢酸ml＝2ml×56.5＝113ml

鉛溶出量＝2μg×113＝226μg

重金属の溶出と鉛の含有量について，大出[2]の検査報告によると，鉛を約1%含有するものから規格試験によって限度（鉛として1ppm）以上の重金属が検出されている。筆者らの試験結果もこれとよく一致している。

表5　規格試験による重金属溶出と鉛含有量の比較

No.	試料 材質	試料 色	規格試験による重金属溶出量 (ppm)	乾式灰化後ポーラログラフにより定量 Pb %
A	硬質塩化ビニル樹脂	白	4.2	4.55
B		白	3.4	3.26
C		黄	検出しない	1.93
D		緑	検出しない	1.10
E		青	検出しない	0.97
F	軟質塩化ビニル樹脂	赤	1.4	1.07
G		橙	1.4	1.16
H		黄	検出しない	0.73
I		黄	1.4	1.26
J		緑	1.4	0.96

重金属の試験を行なうとき，硫化ナトリウム溶液による呈色が黄色となり，カドミウムを検出することがある。

食品用塩化ビニル樹脂の安定剤としては，鉛およびカドミウム化合物の配合は特に避けるべきものと考える。鉛は有害金属の中でも毒性[3]の強いものの一つであり，微量でも長期間にわたって摂取していると，体

内に蓄積し強い毒性を現わすものである。

アルキルスズ化合物も安定剤として汎用されているが，無機のスズに比べて毒性が強く，肝臓組織に障害を起こす[4]ことが知られている。その毒性は，化合物の形およびアルキルの大きさにより異なる。

米国においては，ジーオクチルスズ化合物が乳製品，酒類および炭酸飲料を除く食品容器包装材用塩ビの安定剤として，食品中に1ppm以上溶出しないことを条件として使用を許されている。

一般市販品について国立衛生試験所の調査[5]によると食用油中にジブチルスズ化合物(クロライドとして)0.06～0.84ppmが検出され，また硬質塩ビ製ビンに1年半貯蔵した日本酒から3～4ppmが検出されている。

また，水道用配管として金属パイプに代って硬質塩ビ管が著しく普及し上水道用にも広く使われているが，この安定剤から夜間の停滞中の水に0.5ppmの鉛が検出され，またカドミウムについても0.02ppm，給湯用の配管からは最高0.5ppmが検出された報告が[6]ある。

食品製造用，特に酸性の清涼飲料水の製造工程において使用するパイプには重金属について厳重な注意が必要である。(清涼飲料水の鉛の限度は約0.4ppmである。)

筆者らが，硬質塩ビ管について，BS 3505：1962 PVC pipe for cold water supply によって重金属の試験を行なった結果と，わが国の規格試験を行なった結果を比較すると表6，表7のとおりである。

すなわち試料パイプ(内径55mmの円筒)に高さ(水深)180mmまで抽出液として0.01M-酢酸(0.06%酢酸)と0.01M-酢酸ナトリウム(0.082%酢酸ナトリウム溶液)との混液(pH 4.6～4.8)428mlを満たし，室温で48時間放置したのち，その浸出液についてくり返し重金属(鉛，バリウム，カドミウム，スズ，亜鉛)の試験を行なった。その結果BSの規格には合格したが，規格試験においては鉛として2.5ppmが検出され，このパイプは食品衛生法には不適である。

3. 蒸発残留物

蒸発残留物の試験は，4%酢酸を用いて浸出した液を水浴上に蒸発したのち105°で乾燥するとき残留する物質の総量をみるもので，有毒成分だけが抽出されるわけではないが，この残査を測定することは，食品への移行性を推定する一つの目安となる。またこの残留物を重金属試験の定性定量に利用してポーラログラフィーを行なうこともできる。

規格の限度は30ppmと定められているが，表2のf)

表6　水道用パイプ重金属の溶出

(0.01M—AcOH•0.01M—NaAc混液)

試料	試験	浸出液中 Pb ppm ポーラロ	浸出液中 Pb ppm ヂチゾン	Pb mg/m²	BS3505限度
パイプA	第1回目	0.45	0.44	6.18	第1回目 15mg/m²
	第2回目	0.17	0.15	2.33	
	第3回目	0.13	0.11	1.78	第3回目 4.5mg/m²
パイプB	第1回目	0.36	0.35	4.94	
	第2回目	0.17	0.15	2.33	
	第3回目	0.13	0.11	1.98	

表7　水道用パイプの規格試験および重金属の溶出(4%AcOH)

試料	規格試験		重金属 Pb ppm 第2回目	重金属 Pb ppm 第3回目
パイプA	フェノール	検出しない		
	ホルムアルデヒド	検出しない		
	重金属	2.5ppm	1.6ppm	1.0ppm
	蒸発残留物	3.0ppm		
	過マンガン酸カリウム消費量	1.25ppm		

および表8に見られるように蒸発残留物が100ppmをはるかに超えるものがある。

可塑剤のほとんど入っていない硬質塩ビの製品は溶出物が少ないが，軟質の製品は溶出物が多い。

試料のNo. 92, 94, 95, 103, 115のように非常に多量の蒸発残留物を検出する場合は，充填剤，着色剤としてカルシウム化合物が配合されているものである。この王冠ジスクは，王冠のコルクジスクの代りに用いられるもので，清涼飲料水の王冠にも使用されているので特に注意しなければならない。

4. 過マンガン酸カリウム消費量

合成樹脂から溶出する有機物の量を知る目安とするもので，蒸発残留物試験の目的と類似している。

軟質のもの，ビン詰パッキング用の塩ビコンパウンド，調理台材料など，可塑剤，添加剤の多いものが，限度以上の過マンガン酸カリウム消費量を示している。その結果は表9のとおりである。

むすび

塩化ビニル樹脂製品について規格試験を行なった結果は，127試料中合格104件(81.9%)，不適23件(18.1%)，不合格項目は36項目で不適理由としては安定剤，

表8　蒸　発　残　留　物　ppm（mg/l）

試料＼蒸発残留物 ppm	0～1.0	1.01～2.0	2.01～3.0	3.01～5.0	5.01～10.0	10.01～30.0	30.01～50.0	100以上
フィルム	10	3	6	5	4	0	0	0
シート（硬質）	5	3	1	3	2	0	0	0
シート（軟質）	1	0	2	0	1	4	1	0
カップ	1	2	3	1	1	0	0	0
ビン	6	3	5	5	6	0	0	0
ストロー	2	1	0	3	1	0	0	0
ジスク	4	1	1	3	5	5	1	5
コンパウンド	1	0	0	0	1	2	0	0
マナイタ	0	0	0	0	0	0	7	0
スティック	30	13	18	20	21	11	9	5
計	127	113（89.0%）					質度を超えるもの 14（11.0%）	

表9　過マンガン酸カリウム消費量　ppm（mg/l）

試料＼$KMnO_4$ ppm	0～1.0	1.01～2.0	2.01～3.0	3.01～5.0	5.01～10.0	10.01～20.0	20.01～50.0	50.01以上
フィルム	14	10	3	1	0	0	0	0
シート（硬質）	7	6	1	0	0	0	0	0
シート（軟質）	0	1	2	1	3	2	0	0
カップ	2	4	0	2	0	0	0	0
ビン	7	13	3	2	0	0	0	0
ストロー	1	5	1	0	0	0	0	0
ジスク	0	6	12	4	2	3	3	3
コンパウンド	0	1	0	0	0	1	2	0
マナイタ	0	0	1	6	0	0	0	0
スティック	31	46	23	16	5	6	5	3
計	127	113（89.0%）				限度をこえるもの　14（11.0%）		

着色剤の鉛化合物に起因する重金属の溶出9件，蒸発残留物限度以上のもの14件，過マンガン酸カリウム消費量が限度以上のもの13件であった。

硬質塩ビの製品では，不適品は皆無であったが，軟質シート，コンパウンド，マナイタ材料に不適品がみられた。

新しい容器包装材料の開発に伴ない，食品の流通機構のなかで容器包装が占める役割りも次第に大きなものとなってきている。合成樹脂製品は運搬に軽く，見た目に美しく，軽量化，デザインの豊富さ，こわれにくい，ワンウェイ容器など利点も多いが，まだ衛生上の安全性を確めるための時間が十分ではないので今後とも調査研究が必要である。

参　考　文　献

1）加藤智雄，砂田毅：日衛誌，19，214（1964）

2（大出譲，塚野隆：プラスチックス，20（8），78（1969）

3）大森憲一：食品衛生研究，16（14），67（1967）

4）藤井清次，：細貝祐太郎，岡田太郎：ジャパンフードサイエンス，8（8），70（1969）

5）辰野隆：食衛誌，9（6），492（1968）

6）寒川寿助，第26回公衆衛生学会発表，691(1961)

追記

塩ビ食品衛生協議会から，昭和45年8月，ポリ塩化ビニルの自主規制ということで，塩ビの添加剤についてポジティブリストを発表された。この推奨規準に従って製造されたものには推奨マークを付ける等自主的に衛生規制が進んでいることを付記する。

添加物分析における食品成分の影響
亜硫酸試験法について（I）

二　島　太一郎*　松　本　　茂*

INFLUENCE OF SOME NATURAL FOOD STUFF CONSTITUENTS ON THE DETECTION OF FOOD ADDITIVES

Review made on the detection procedures for SO_2 (I)

Taichiro NISHIMA and Shigeru MATSUMOTO

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

SUMMARY

It is well-known fact that certain organic substances or its derivatives, naturally contained in some foods, have sometimes influence upon the analysis of food additives. In this study a review was made on the corresponding procedures in The Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists recommended by the Pharmaceutical Society of Japan, to find out appropriate procedure for the detection of SO_2 in foods.

Results obtained are summarized as follows:

1) The potassiumiodate-starch-paper method was found to be the most adequate and reliable procedure for the qualitative analysis of SO_2 in food. On the contrally the zinc-powder reduction method was not suitable for this purpose.

2) In the case of SO_2 contents in food, the Monier-Williams method was found to be the most suitable procedure which applicable to the analysis of food naturally containing organic sulfur, while the results obtained by other procedures such as the iodimetry method or the colorimetry method were much affected by the natural component in the food.

3) The iodate reducing substance in Japanese radish root was found out to be methylmercaptan, and the iodate reducing component in natural Wasabia-Japonica to be the secondary product of the hydrolysate of sinigrin.

The unfavorable reaction mentioned in the latter was successfully excluded by the addition of 75% methanol to the Samples.

ま　え　が　き

食品中から二酸化イオウ等の添加物の分析を行なう場合，しばしば食品中の天然成分及びその分解生成物質が分析を妨害することがある[1~5]。

このような現象を解明し，食品中の添加物のみを正確に分析することは殊に重要なことであり，過去においてこのことを無視したため，食品衛生行政上問題となった例もある。

したがって，現行の試験法を検討し，より正しい試験法の適用を見出す必要があると考え，食品中の亜硫

* 東京都立衛生研究所

Table 1 Results of Various Analytical Methods for SO_2 in Foods

Method / Sample	Qualitative Analysis		Quantitative Analysis		
	Potassium-Iodate-Starch-Paper	Zinc-Powder Reduction	Monnier-Williams	Iodimetry	Colorimetry
Welsh onion	−	+	0ppm	12ppm	35ppm
Allium tuberosum greens	−	+	8	15	0
Onion	−	+	0	8	3
Cabbage	−	+	0	5	0
Japanese radish root	−	+	0	50	4
Turnip	−	+	0	11	0
Bettara-zuke	−	+	0	54	0
Wasabia-Japonica	−	+	0	224	15
Soaked in sake-cake (W. J.)	−	+	0	14	0
Black mustard powder	−	+	0	128	22
Cochlearia armoracia L.	−	+	0	60	5
Eutrema wasabi Matsum.	−	+	0	140	4
Allyl isothiocyanate	−	+	−	−	−
Methyl mercaptan	−	+	−	+	+

酸定量を取上げ，主としてヨウ素滴定法に対する妨害現象について検討を行ない，若干の知見を得たので報告する。

I 実験結果及び考察

(1) 各種試料の盲検値

薬学会協定衛生試験法記載[6]の亜硫酸定量法のうち，第2法（ヨウ素滴定法）が簡便なため繁用されているが，ベッタラ漬，ワサビ漬等の植物性加工食品について第2法を適用して試験をした場合，ヨウ素酸カリウムデンプン紙法が陰性であるにもかかわらずヨウ素液を消費する矛盾を経験した。そこでこれらの植物性加工食品の共通の天然成分である有機イオウ化合物類が，ヨウ素還元性物質ではないかとの推定のもとに，天然成分として硫化アルキル，メルカプタン等の有機イオウ化合物を含有している試料について，薬学会協定衛生試験法記載の亜硫酸の定性定量試験法に準じて盲検値を調べた。その結果を Table 1 に示した。

いずれの試料も定性試験の結果は，ヨウ素酸カリウムデンプン紙法は陰性であり，亜鉛末還元法は陽性を示した。

定量試験第1法（Monnier-Williams 法）は，いずれの試料からも無視出来る程度の盲検値が得られた。

第2法(ヨウ素滴定法)は，各試料ともヨウ素液を消費し，二酸化イオウに換算して5～224ppm の値を示したが，カラシ類の成分である allylisothiocyanate（Aと略記）はヨウ素液を消費せず，ダイコン類の成分である methylmercaptan（Mと略記）はヨウ素液を消費した。

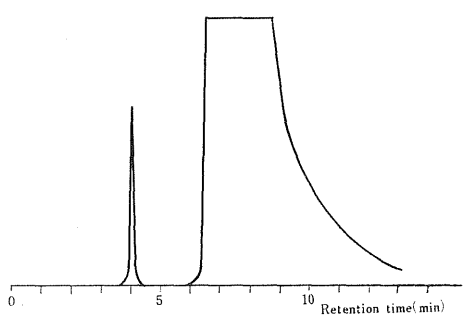
第3法（比色法）は，0～35ppm の盲検値を示し，Mは陽性を示した。

以上の結果から，日常よく試料として取扱うダイコンと，香辛料として繁用されているカラシ粉を選び，第2法に対する妨害物質の検討を行なった。

2. ダイコンについて

生ダイコンの臭気成分はMであるといわれ，辛味成分は配糖体としては分離されていないが，butylthiocrotonylisothiocyanate（Bと略記）の存在が確認されている。すでに Table 1 に示した通り，Mはヨウ素還元性物質であるから，試料についてその存在を確認するためにつぎのような抽出操作を行なった。

Fig. 1 Gas Chromatogram of Iodine reducing substances in Japanese Radish Root



生ダイコン500gを細切し，水500mlを加え直火で蒸留し，あらかじめエーテルを入れた氷冷受器に留液を捕収した。

この留液を分液ロートに移し，十分振とうしたのち，エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，室温送風濃縮し試料とした。

得られた試料についてMの存在を確認するためにガスクロマトグラフィー(GCと略記)を行なった結果，Fig. 1に示すごとく約4分附近に，標準品のMと一致したピークを確認した。

なお化学的確認法として，ニトロプルシットナトリウムによる定性試験の結果も陽性を示した。

以上の結果より，ダイコン及びその加工品の第2法に対する主な妨害物質はMであると考える。したがって，これらの食品に対して第2法を適用することは過大の値を与えることになるが，ヨウ素酸カリウムデンプン紙による定性試験が陽性の試料は，Table 1に示した通り第1法を適用することにより，Mの妨害を受けることなく正確な値を得ることが出来る。

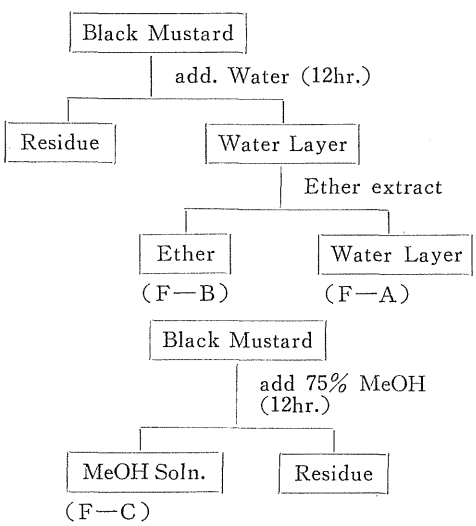
3. カラシ粉について

カラシは配糖体 sinigrin が水の存在で，myrosinase などの酵素により，A，glucose，$KHSO_4$に分解され辛味を呈する。

Aは Table 1の結果より，ヨウ素還元性物質ではないので，Fig. 2に示した抽出操作を行ない妨害物質を検討した。

すなわち，カラシ粉に十分な水を加えてよく混合し，12時間放置後遠心し水層を分離する。この水層についてエーテル抽出を行ないAをエーテル層に移行させる。

Fig. 2 Separetion method of Iodine reducing substances in Black Mustard



さきの水層を fraction A（F—Aと略記）とし，エーテル層を fraction B（F—Bと略記）とした。

一方 sinigrin の加水分解をおさえるために，試料を75%メタノール溶液でよく混合したのち遠心し，メタノール層を fraction C（F—Cと略記）とした。

各分画についてヨウ素滴定を行ない，ヨウ素還元性を確かめた結果，F—Aにその存在を確認した。

つぎにGCを行ないヨウ素還元性物質を追求した。Fig. 3，Fig. 4 にそれぞれのガスクロマトグラムを示した。

Fig. 3 Gas Chromatogram of each fraction of Black Mustard

Column : 10%Polyethylene glycol succinate/Silanized Chromosorb W, 0.4(i.d.)×150cm
Temperature : 120℃
Carrier gas : N_2, 60.0ml/min
Detector : HFID

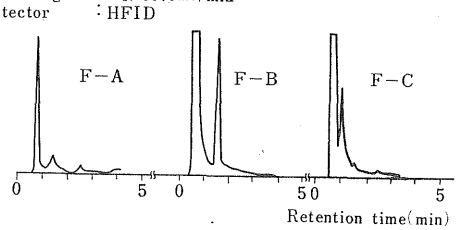


Fig. 4 Gas Chromatogram of each fraction of Black Mustard

Fig Ⅳ Gas Chromatogram of each fraction of Black Mustard
Sample size : 2μl
Column : 10% Reoplex 400/Chromosorb W, 0.4(i.d.)×225cm
Temperature : 120℃
Carrier gas : N_2, 60.0ml/min
Detector : HFID

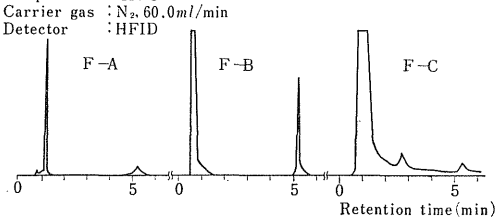


Fig. 3 に示したF—Aの50秒，Fig. 4 の同分画の80秒のピークを示す物質が，ヨウ素還元性物質であると考えられる。そこでこのピークを示す物質の生成を経時的に調べた結果，水と混合してから12時間で最高となり，以下徐々に減少する傾向が認められた。なおこの物質のピークの高さと，ヨウ素液消費量は比例関係にあることも認められた。

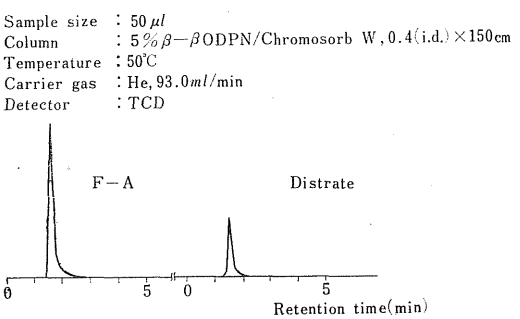
以上の結果より，F—A分画にピークを示す物質がヨウ素還元性物質であることを確認した。

次にF—A分画について，第2法の操作に準じて試験を実施すると，酢酸鉛吸収液で黒沈を生じることか

ら，この物質が加熱により分解されてH_2Sになり硫化鉛が生成されるものと考えられた。

そこで，F—A分画及びカラシ粉について，リン酸々性とし，直火で蒸留して得られた留液について，H_2Sの存在をGCで分析したところ，Fig.5に示した通り標準品のH_2Sに一致するピークを示すクロマトグラムが得られた。

Fig. 5 Gas Chromatogram of H_2S derived from Iodine reducing substance in Black Mustard



以上の結果より，カラシ粉は sinigrin の加水分解により，A以外にF—A分画に出現するピークを示す物質が副成され，この物質が加熱により分解しH_2Sとなり，最終的には硫化鉛となってヨウ素還元性を示すものと考えられる。

4. カラシ粉及びその加工食品に対する二酸化イオウ試験改良法

カラシ粉及びその加工食品中の第2法に対する妨害物質をおさえて，これらの中に含有される二酸化イオウを正確に定量する方法を検討した。

sinigrin は，75%メタノール溶液中で加水分解をほとんどうけないことと，すでに加水分解された試料においても，メタノール溶液を加えることにより沸点が下り，妨害物質が留出してこない点を応用して第2法を次のように改良した。

試料の一定量に，75%メタノール溶液100ml，リン酸 3mlを加え，受器には1%酢酸鉛液50mlを入れ以下操作法に準ずる。

なお本改良法の回収率は約90%であった。

ま と め

1. 薬学会協定衛生試験法第1法(Monier-Williams 法）は，有機イオウ化合物含有食品をもふくめて，もっとも広範囲の食品に適用して信頼性の高い方法であることを認めた。

2. 第2法は，H_2Sや揮発性イオウ化合物をヨウ素が酸化する。したがって有機イオウ化合物を含む食品には不適当である。

3. 第3法は，食品によっては呈色する物質を含むものもあるので注意を要する。

4. ヨウ素酸カリウムデンプン紙定性試験法は最も信頼性の高い定性試験法であることを認めた。

5. 生ダイコン中のヨウ素還元性物質は，メチルメルカプタンであることを確認した。

6. カラシ粉中のヨウ素還元性物質は，sinigrin の加水分解の際副成されると考えられる物質で，加熱により分解しH_2Sとなることを認めた。

この物質の妨害を抑えて，二酸化イオウを定量する方法として，メタノール添加法を検討し好結果を得た。

終わりに臨み本研究に種々ご指導を賜った東薬大助教授，細貝祐太郎博士に深く感謝いたします。

参 考 文 献

1) H. Zonneveld, A. Meyer : Z. Lebensmittel Untersuch u.-Forsch. 111, 198 (1960)
2) J. J. Thra sher : ibid. 49, 834 (1966)
3) L. F. Burrough, A. H. Sparks : Analyst 88, 304 (1963), ibid. 89, 55 (1964)
4) 梅原竜海，岡村一弘，中山信正：第12回食品衛生学会講演 (1966, 11, 18, 大阪)
5) 大村浩久，副枝紘一郎，山藤一雄：九州大農学芸誌，22, 131 (1966)
6) 日本薬学会編：衛生試験法註解，1965, p. 191 金原出版

添加物分析における食品成分の影響
亜硫酸試験法について (2)

松本　茂*　二島太一郎*
永瀬　誠**　藏内正行**

INFLUENCE OF SOME NATURAL FOOD STUFF CONSTITUENTS ON THE DETECTION OF FOOD ADDITIVES
Review made on the detection procedures for SO_2 (2)

Shigeru MATSUMOTO[1)]　Taichiro NISHIMA[1)]
Makoto NAGASE[2)] and Masayuki KURAUCHI[2)]

(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)*
(The Lion Dentifrice Co., LTD.)**

SUMMARY

In the present paper, fresh garlic and its products which have widely been used for seasoning were subjected to study the methods for the detection of SO_2 in foods.

Results obtained are summarized as follows:

1) The micro-diffusion analysis was found to be the most reliable quantitative method among the standard procedures in the case of fresh garlic and its products.

2) The iodimetry method did not indicate adequate values of SO_2 in this case, as it obstructed by H_2S.

3) The Monier-Williams method was neither suitable procedure in this case, as the blank values of fresh garlic estimated as 11-35ppm, and its products as 58-97 ppm, although all of them were negative by the potassiumiodate-starch-paper method.

4) The obstacle substance naturally contained in fresh garlic or its products were considered to be disulfides.

まえがき

前報[1)]において，有機イオウ化合物を含有する植物性食品に対して，薬学会協定衛生試験法記載の亜硫酸定性定量試験を実施したところ，亜硫酸塩類を使用していないのにもかかわらず高い盲検値を示す結果が得られた。

前報にひき続き，有機イオウ化合物を含有し香辛料として繁用されている生ガーリック及びその加工品について，検討した結果若干の知見が得られたので報告する。

*　東京都立衛生研究所
**　ライオン歯磨株式会社

1. 実験方法

1—1 試　料

(1) 生ガーリック

i) アメリカ産（MC社原料品）	3種
ii) 中共産	2種
iii) 日本産	7種

(2) 加工品

i) アメリカ製ガーリックパウダー（MC社製） 2種

ii) 台湾製ガーリックフレークス 1種

iii) 日本製ガーリックパウダー（R社製） 2種

1—2 試料の調製

生ガーリックは，表皮を除き，その鱗茎部のみを使用した。なお必要に応じてホモジナイザーで約3分間磨砕した。

加工品は，そのまま試料とした。

1—3 試験方法

薬学会協定衛生試験法記載の亜硫酸塩類の定性定量法に準じた。

2. 実験結果

1 盲検値

Table 1 に示したとおり，生ガーリック及び加工品は，定性試験法のヨード酸カリウム澱粉紙反応は陰性であり，亜鉛末還元法は陽性を呈した。

定量試験法第1法（Monnier-Williams 法）においては，生ガーリックは二酸化イオウに換算して，11～35ppm，加工品は 58～97ppm の盲検値を示した。

第2法（ヨウ素適定法）は，いずれの試料も多量の H_2S を発生し，終末点が不明瞭となり測定不可能であった。

第4法(拡散分析法)においては，生ガーリックはいずれも 16ppm 以下であり，加工品においては 30ppm 以下の盲検値を示した。

次に前報において報告した第2法改良法をこれらの試料に実施したところ，生ガーリックは第1法，第4法の盲検値に比較して相当量高い値を示したが，加工品は第1法よりは低いが，第4法のそれよりは高い結果を示した。

3. 拡散法の検討

生ガーリックおよび加工品は，Table 1 に示したとおり，第4法が最も低い盲検値をあたえた。したがって，これらの試料に亜硫酸塩類が使用された場合の定量法としては，本法が最も適当な定量法と考える。

そこで本法について若干の検討を行なった。

Table 2 に示したとおり，抽出時間の盲検値にあたえる影響は大きい。したがってこれらの試料に対して本法を適用する際には，抽出時間の厳守と，盲検値を確めることが必要である。

考 察

生ガーリックは，葉，茎，鱗茎中に配糖体 alliin が存在し，酵素 alliinase の作用を受けて容易に加水分解され，diallyl disulfid, diallyl sulfide 等の sulfide 類が生成する。

Table 1 Results of Various Analytical Methods for SO_2 in Fresh Garlic and Garlic Powder

Sample \ Method		Qualitative Analysis		Quantitative Analysis		
		Potassium Iodate-Starch-Paper	Zinc-Powder Reduction	Monnier-Williams	Diffusion Analysis	Modified Iodimetry
Fresh garlic	(U.S.A.)	−	+	27ppm	14ppm	107ppm
〃	〃	−	+	35	17	120
〃	〃	−	+	25	14	107
〃	(Chinese)	−	+	34	16	172
〃	〃	−	+	29	15	169
〃	(Japan)	−	+	27	16	154
〃	〃	−	+	29	16	154
〃	〃	−	+	19	10	142
〃	〃	−	+	17	5	142
〃	〃	−	+	11	5	142
〃	〃	−	+	11	5	142
〃	〃	−	+	14	8	142
Garlic powder	(Japan)	−	+	66	18	37
〃	〃	−	+	59	17	30
〃	(Chinese)	−	+	58	30	50
〃	(U.S.A.)	−	+	97	17	39
〃	〃	−	+	80	17	36

Table 2 Variation of Blanck Value with Extraction Time

Sample \ Time(min)		60	90	120
		ppm		
Fresh garlic	(Japan)	16	96	317
〃	(U.S.A.)	16	97	260
Garlic powder	(Japan)	18	—	62
〃	(U.S.A.)	30	—	90

したがって，これらの有機イオウ化合物が，亜硫酸塩類定性定量試験法に盲検値を与える物質と考えられる。

なおこの物質は加熱により分解しH_2Sとなる。このことから，加熱操作を行なわない第4法の盲検値が，第1法，第2法のそれよりも低い値を示したのではないかと考える。

次に前報記載の試料の場合は，定量試験法第1法が最も低い盲検値を与えたが，本実験に用いたガーリック類のように，disulfide 類を含有するような食品に第1法を適用する場合は，盲検値を確かめて定量することが必要である。

ま と め

ガーリック及びその加工品について，衛生試験法収載の亜硫酸塩類定性定量試験法を実施した結果は，次の通りである。

1. 定性試験法ヨード酸カリウム澱粉紙反応はすべて陰性，亜鉛末還元法はすべて陽性を示した。

2. 定量試験法第1法においては，二酸化イオウに換算して，生ガーリックは 11～35ppm，加工品は 58～97ppm の盲検値を与えた。

3. 第2法は，多量の H_2S 発生のため測定不可能であった。

4. 第2法は，全試料とも 30ppm 以下の盲検値を与え，検討した試験法のうちで最も低い値を示した。

5. 第2法改良法は，生ガーリックにおいては，107～172ppm と最も高い盲検値を示したが，加工品にあっては，第1法，第4法の中間の値 36～50ppm を示した。

6. 供試試料中の防害物質は，disulfide 類であると推定した。なお本物質は加熱蒸留により分解され，H_2S を生成すると考えられた。

7. disulfide 類を含有する植物性食品及びその加工品にあっては，ヨード酸カリウム澱粉紙反応が陽性のもののみ，第4法を適用して亜硫酸塩類を定量することが最適であると認めた。その際の抽出時間は1時間以内にとどめることが必要である。

文　献

1) 二島太一郎ほか：都立衛生研究所研究年報21，(1969)

ポーラログラフィー法による人工甘味料製剤中のサッカリンの定量法

遠藤英美* 井口光恵*
広門雅子* 青柳健太郎**

STUDIES ON QUANTITATIVE ANALYSIS OF SACCHARINE IN ARTIFICIAL SWEETNERS BY PHOLAROGRAPHY

Fusayosi ENDO, Mitue IGUTI
Masako HIROKADO and Kentaro AOYAGI

はしがき

当所における人工甘味料の製品検査件数は，年間約2000件であって，サイクラミン酸塩の使用禁止以後，化学的合成品の人工甘味料として代表的なものはサッカリンを残すのみとなった。サイクラミン酸使用禁止以後の人工甘味料製剤は，甘味度，味覚の点から多種類の添加物を配合した製剤が作られるようになり，従ってサッカリンの定量法についても当所で行なってきた溶媒抽出重量法を再検討する必要が生じてきた。今後の食品添加物製剤の定量法については，出来るだけオートメ化し，能率の向上ならびに精度を高める方針で，機器分析化を進める一環として，ポーラログラフィー法による人工甘味料製剤中のサッカリンの定量法を検討した結果，製品検査試験法として適用し得ることを確認したので，その方法について述べることとした。

実験の部

1. 測定機器　柳本矩形波ポーラログラフP—8型

2. 標準溶液および支持電解質溶液の調製

1) サッカリン標準溶液

日本薬局方「溶性サッカリン」水溶液に塩酸を加え析出する結晶を水洗後，80%アルコールより再結晶を2回行なったものをサッカリンの標準品として用いた。

標準溶液の調製（0.05%溶液）

標準品0.5gを秤取し，n/50 NaOHに溶かし，全量100m*l*とし，その10m*l*をとり支持電解質溶液を加えて100m*l*とする。

本品1m*l*中500γのサッカリンを含む溶液である。

2) 支持電解質溶液の調製

塩化アンモニウム（ＪＩＳ試薬特級和光純薬）

塩酸（和光純薬高々純度20%）

上記試薬を用いて0.1N溶液を作り，両液同容を混和して支持電解質溶液とした。

3. ポーラログラフィーの条件

Sens (SW) 20, RC Sens 20μA/mm, SW volt 20mV, Damping 3. Drop Time 0.96sec/Drop. の条件に柳本P—8型ポーラログラフを設置した。

4. 実験法

その1　サッカリン標準溶液のポーラログラフィー

サッカリン標準溶液1，2，4，6，8，10m*l*を内容10m*l*のメスフラフコに秤取し，支持電解質溶液を加えて全量を10m*l*とする。

この各溶液について上記条件下でポーラログラムを6cm/minの速さで記録した結果は図1の如くである。その矩形波の波高を測定したところ表1の如き値であった。

その2　支持電解質濃度と波高

次に支持電解質溶液の添加量と定量値との関係を検討することとした。サッカリン標準溶液3m*l*をとりこれに水および支持電解質溶液を加えて，支持電解質溶液30，40，50，60，70，80，90，100%の溶液として矩形波ポーラログラフィーを行なった。その結果は表2の如くである。

その3　実際例

* 東京都立衛生研究所　食品添加物部
** 東京都衛生局薬務部

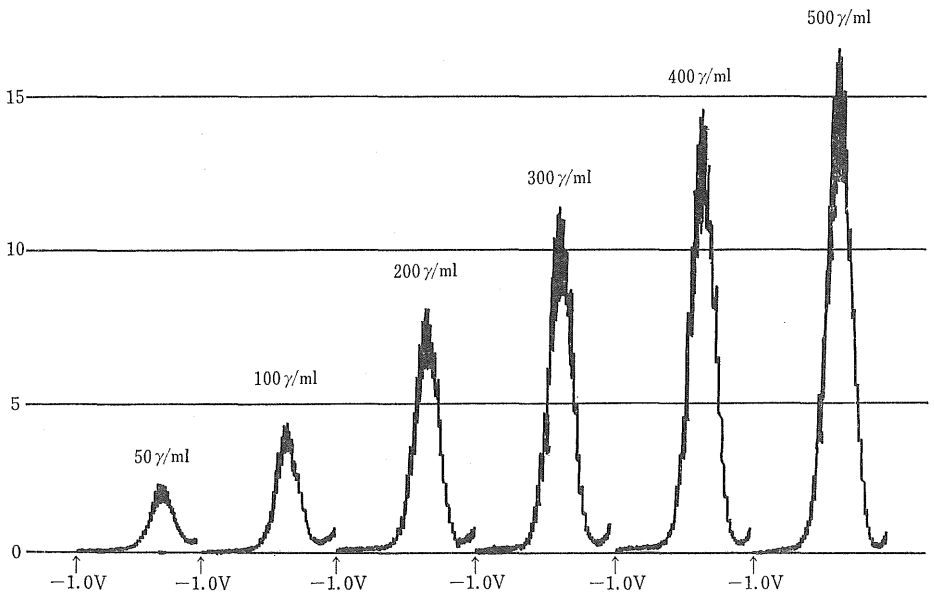


図 1　サッカリン標準溶液のポーラログラム

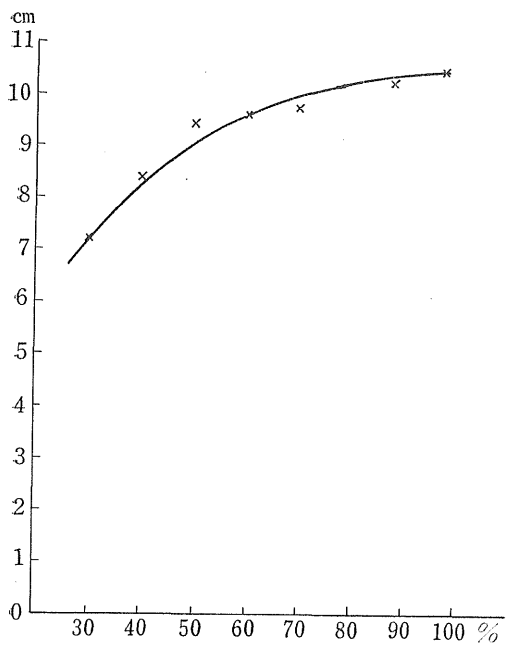


図 2　支持電解質濃度と波高の関係

製品検査検体として表3の如き処方例のものについて，試料 0.5g を秤取し，水に溶かして 100ml とし，その 1 ml をとり 支持電解質溶液を加えて全量を10ml にメスアップし，上記の条件下でポーラログラムを作

表　1

回数	50γ	100γ	200γ	300γ	400γ	500γ
	cm	cm	cm	cm	cm	cm
1	1.90	3.92	7.59	10.76	14.08	16.05
2	1.88	3.89	7.54	10.86	14.00	16.15
3	1.89	3.93	7.53	10.84	13.94	16.12
4	1.88	3.88	7.51	10.81	14.02	16.15
5	1.89	3.91	7.48	10.80	13.92	16.09
6	1.87	3.93	7.58	10.86	13.93	16.10
7	1.91	4.12	7.57	10.80	13.99	16.15

成した。その測定値は表4の如くである。

考　　察

実験その1　矩形波ポーラログラフの波高の最高，最低値を除いた平均値をグラフにとると表5の如くになり，ほぼ直線的な定量直線を得ることが出来る，従って 50γ/ml～500γ/ml の濃度範囲において定量可能である。

実験その2

実際検体には種々の添加物の混合が考えられ，支持電解質の変質も考えられるので，一応支持電解質濃度による波高の変化をみたのであるが，表2の結果から50%以上の支持電解質溶液中でポーラログラフィーが

表 2　製品検査申請検体の処方例

添加物名	%	添加物名	%	添加物名	%	添加物名	%
サッカリンナトリウム	6	サッカリンナトリウム	12	サッカリンナトリウム	19	サッカリンナトリウム	30
クエン酸ナトリウム	1.8	クエン酸ナトリウム	5	d—酒石酸ナトリウム	3	甘草末	3.5
L—グルタミン酸ナトリウム	1.1	ブドウ糖	32	乳糖	60	D—キシロース	5
重炭酸ナトリウム	0.1	D—ソルビット	5	コハク酸二ナトリウム	2	D—ソルビット	5
グラニュー糖	10.6	乳糖	40	ブドウ糖	10	ポリリン酸ナトリウム	3
ブドウ糖	80.3	酒石酸ナトリウム	3	クエン酸ナトリウム	5	果糖	5
食塩	0.1	コハク酸二ナトリウム	1	食塩	1	ブドウ糖	30
		L—アルギニンL—グルタミン酸塩	2			乳糖	18.5

表 3　製品検査検体の測定結果（7回測定平均値）

No.	処方(%)	定量値(%)	誤差(%)	No.	処方(%)	定量値(%)	誤差(%)
1	6	5.9	2.17	8	4	3.91	2.25
2	10	9.5	5.00	9	12	11.8	1.67
3	15	14.7	2.00	10	20	18.3	8.50
4	19	18.7	1.58	11	19	18.0	5.26
5	18	16.9	6.11	12	25	24.0	4.00
6	30	28.3	5.67	13	29	28.7	1.03
7	55	54.3	2.91				

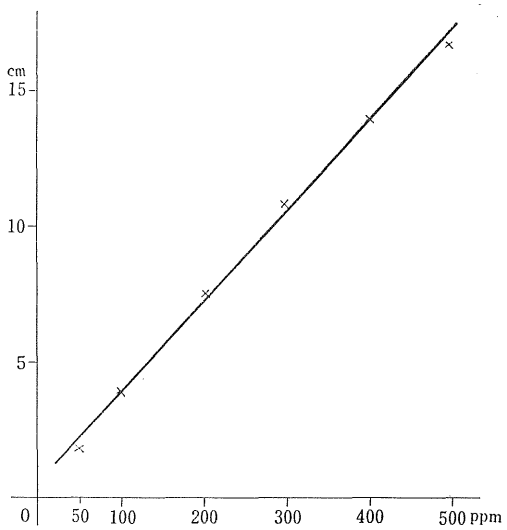


図　3

行なわれる限り支障がないことが判った。

実験その3

実際の製品検査申請検体について行なった結果は表4の如くであり，サッカリンの含有量5%～30%位の配合例については，他の有機酸その他による影響を受けずに10%の誤差範囲内で定量することが出来た。

結　論

ポーラログラフィーによる合成甘味料製剤中のサッカリンの定量法は可能であると考えられる。

サッカリンの定量法についてこの他550°において硫酸無添加灰化を行ない，硫酸根をクロラニル酸バリウムを用いて定量してみたが，ポーラログラフィー法に比較し，時間がかかり過ぎて多量処理に適さない。その他オートアナライザーによる定量法について検討中である。

参考文献

1) 武者宗一：ポーラログラフィー　東京化学同人 (1969)
2) 化学の領域　増刊　Vol 50, Vol 57, Vol 69
3) P．ズーマン：有機ポーラログラフ分析　共立出版
4) 川城巌，藤井清次：食品添加物試験法（機器分析を中心として）日本分析化学会

清涼飲料水用容器材としてのポリスチレンについて

遠藤英美* 大畠敏子*
藤居瑛* 青柳健太郎**

STUDIES ON POLYSTYRENE FOR SOFT DRINK'S RECEPTACLES

Fusayosi ENDO, Tosiko OHATA, Teru FUJI
and Kentaro AOYAGI

まえがき

ポリスチレンは冷菓，サワー飲料，乳酸飲料など，食品衛生法上いわゆる「ガラス瓶に紙栓をした容器」に充塡され市販する日配物飲料の容器として硝子瓶に代って最近急速に使用されるようになっている。

ポリスチレンは，オレフィン系樹脂（ポリエチレン，ポリプロピレン）に較べ，耐薬品性に劣り，特にオレンジテルペンの如き芳香族炭化水素，エッセンス成分であるエステル類に対し侵されやすい欠点がある。

その上製造工程中どうしても未反応のスチレンモノマーの残存をまぬがれないものであって，製品化の際に用いられる添加剤の飲料水中への移行の問題と共に考慮しなければならない点である。

我々は予防衛生研究所，俣野氏の発表された，清涼飲料水用オレンジコンクといわれる複合エッセンス中のポリスチレンシート浸漬試験に重点を置き，各種サワー飲料について保存試験を行ない，容器としての適性を検討すると共に，石油化学工業協会より紹介されたポリスチレンの代表的メーカー6社より試料提携を得て，材質の適性についての検討を行なうこととした。

検討項目

1. 各種サワー飲料の保存試験
2. 各種溶媒による抽出試験
3. 酸化防止剤およびスチレンモノマーの溶出
4. ポリスチレン中の金属の定性
5. 清涼飲料水用着色料の染着性
6. 揮発性物質の K MnO_4 消費量

試験試料

1. ポリスチレンシートおよびサワー容器

石油化学工業協会において6社原料シートをサワー飲料用容器として同一規格にシート成型したもので，添加剤およびスチレンモノマーの含量は表1の如きものである。

表 1

	添加物名	含有量
酸化防止剤	BHT	0.2%
可塑剤	流動パラフィン DOP	3 %
滑剤A	ステアリン酸アマイド エチレンステアロビスアマイド	0.1%
滑剤B	ステアリン酸カルシウム ステアリン酸亜鉛	0.2%
顔料	酸化チタン	
スチレンモノマー		0.2～0.55 %

2. サワー飲料

神奈川柑橘果工にて表2の如き処方で調製した果汁入り清涼飲料水を95°，瞬間殺菌した後，ただちに各社試作成型容器に充塡し，アルミ箔で開口部をヒートシールした。

実験法およびその結果

1. 保存試験

1/10天然果汁入サワー容器を20°±1°の恒温室内に1ヶ月間保存し，変形試験並びに感能試験を行なった。感能試験は同様にして製造した果汁をガラス容器に充塡したものを対照品として5°Cの冷蔵庫中に2週間保存したものを用いた。

* 東京都立衛生研究所
**東京都衛生局薬務部

表　2

メロン		オレンジ		トマト	
メロン	1,000g	オレンジストレート果汁	1,000g	トマトピューレー	1,000g
砂糖	950	砂糖	910	ブドウ糖	400
シュガロン	0.6	シュガロン	0.6	食塩	60
デヒドロ酢酸	0.25	デヒドロ酢酸	0.25	グルタミン酸ナトリウム	10
安息香酸	0.25	安息香酸	0.25	デヒドロ酢酸	0.25
クエン酸	24	クエン酸	24	安息香酸	0.25
メロン色々素(0.5%)	20ml	食用黄色5号(1%)	20ml	レモン香料	10ml
メロンエッセンス	10ml	オレンジエッセンス	10ml	水を加えて	全量10l
水を加えて	全量 10l	水を加えて	全量10l		
糖度	10°	糖度	10°		
酸度	0.25%	酸度	0.35%		

ピーチ		グレープ		アップル	
クレモフルーツピーチ	1,000g	グレープペースト($^1/_5$濃縮)	200g	アップルピューレー	1,000g
砂糖	920	砂糖	890	砂糖	880
シュガロン	0.6	シュガロン	0.6	シュガロン	0.6
デヒドロ酢酸	0.25	デヒドロ酢酸	0.25	デヒドロ酢酸	0.25
安息香酸	0.25	安息香酸	0.25	安息香酸	0.25
クエン酸	34	クエン酸	34	クエン酸	31
食用赤色2号(1%)	2ml	ブドウ色々素(1%)	10ml	アップルエッセンス	10ml
ピーチエッセンス	10ml	グレープエッセンス水	10ml	水を加えて	全量10l
水を加えて	全量10l	水を加えて	全量10l	糖度	10°
糖度	10°	糖度	10°	酸度	0.35%
酸度	0.35%	酸度	0.35%		

表3　保　存　試　験　成　績

社別	清涼飲料水の種類	変形試験 シール部	変形試験 カップ部	色	臭	味
A社	ピーチ	0/3	3/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	0/3	2/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	0/3	1/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	0/3	2/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	1/3	0/3	褪色する	カラメル臭	〃
MT社	ピーチ	0/3	1/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	1/3	2/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	0/3	0/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	1/3	0/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	1/3	0/3	褪色する	カラメル臭	〃

社別	清涼飲料水の種類	変形試験 シール部	変形試験 カップ部	色	臭	味
N P 社	ピーチ	0/3	0/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	1/3	0/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	0/3	2/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	1/3	0/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	1/3	0/3	褪色する	カラメル臭	〃
Y 社	ピーチ	0/3	0/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	1/3	0/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	1/3	0/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	1/3	0/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	2/3	0/3	褪色する	カラメル臭	〃
D 社	ピーチ	0/3	0/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	1/3	0/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	1/3	0/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	1/3	0/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	2/3	0/3	褪色する	カラメル臭	〃
M M 社	ピーチ	0/3	1/3	変化なし	変化なし	変化なし
	オレンジ	0/3	3/3	〃	幾分変化する	〃
	アップル	0/3	0/3	〃	発酵臭	幾分変化する
	グレープ	0/3	3/3	〃	幾分変化する	変化なし
	メロン	3/3	0/3	〃	幾分変化するも青くさみが無くなる	幾分変化する
	トマト	0/3	2/3	褪色する	カラメル臭	〃

備考　1）変形試験のシール部の1/3とは3検体中1検体が膨脹変形していることを意味する。
　　2）変形試験のカップ部の1/3とは3検体中1検体に凹型変形を認めることを意味する。

その結果は表3の如し。

2. 溶出試験

1）n—ヘキサン抽出量

各社試作シート（表4）を厚さの一定した箇所を選んで1.5cm×20cmの切片を作る。（1社は成型カップを用いたが，これはカップを4等分し，各部より 2.5 cm× 3 cm の切片1ケずつを作り計4ケを試料とした。）

表　4

各　社	1社	2社	3社	4社	5社
シートの厚さ mm	1.55	0.47	0.52	0.37	0.66

これら試料切片は，中性洗剤液で洗ったのち，水洗し，附着水分を拭きとったのち，風乾し，これを300m*l*三角フラスコ内にとり，n—ヘキサン120m*l*を加え，還流温度（80°）で水浴上で，15，30，60，120，240分間抽出し，抽出液は減圧濃縮して溶媒を留去し，80°，2時間減圧乾燥し，冷後秤量した。

その結果表5の如し。（次頁参照）

2）ISO—プロピルアルコール抽出量

n—ヘキサン抽出試料と同様に調製した切片につきISO—プロピルアルコール120m*l*で同様に操作して抽出した結果は表6の如し。（次頁参照）

3. 酸化防止剤およびモノマーの溶出

試　験　試　料

Y社製シート（厚さ0.66mm）3cm×5cm 切片
スチレンモノマー残存量0.55%
浸漬液
高砂香料製オレンジコンクP，500，1000
〃　ストロベリー100，1000

表 5　n—ヘキサン各時間抽出量 mg/100cm²　　（ ）内は計

社名	No.	時間 15分	30 分	60 分	120 分	240 分
A社	1	14.5	11.1(25.6)	19.8(45.4)	20.0(65.4)	6.0(71.4)
	2	15.8	11.0(26.8)	18.8(45.6)	22.8(68.4)	9.1(77.5)
	3	14.3	9.5(23.8)	18.5(42.3)	15.0(57.3)	9.0(66.3)
	平均	14.9	10.5(25.4)	19.0(44.4)	19.3(63.7)	8.0(71.7)
MT社	1	30.5	11.3(41.8)	20.5(62.3)	2.8(65.1)	3.3(68.4)
	2	32.2	19.2(51.4)	16.4(67.8)	2.4(70.2)	4.0(74.2)
	3	33.8	22.1(55.9)	10.8(66.7)	0.7(67.4)	1.3(68.7)
	平均	32.2	18.9(51.1)	15.9(67.0)	1.9(68.9)	2.9(71.8)
NP社	1	31.6	19.2(50.8)	14.1(64.9)	9.5(74.4)	8.2(82.6)
	2	36.0	23.1(59.1)	14.8(73.9)	9.3(83.2)	5.3(88.5)
	3	33.5	18.1(51.6)	16.0(67.6)	11.0(78.6)	11.3(89.9)
	平均	33.7	20.1(53.8)	14.9(68.7)	9.9(78.6)	8.3(86.9)
Y社	1	38.8	15.8(54.6)	12.8(67.4)	5.7(73.1)	6.7(79.8)
	2	34.5	12.1(46.6)	15.5(62.1)	9.8(71.9)	4.8(76.7)
	3	32.8	23.6(56.4)	13.8(70.2)	9.1(79.3)	7.3(86.6)
	平均	35.4	17.2(52.6)	14.3(66.9)	8.2(75.1)	6.3(81.4)
D社	1	29.7	12.5(42.2)	14.1(56.3)	7.0(63.3)	5.7(69.0)
	2	21.3	15.5(36.8)	13.5(50.3)	6.5(56.8)	6.0(62.8)
	3	17.0	14.8(31.8)	12.4(44.2)	6.3(50.5)	5.9(56.4)
	平均	22.6	14.3(36.9)	13.3(50.2)	6.6(56.8)	5.9(62.7)
MM社	1	48.0	6.7(54.7)	0.2(54.9)	1.8(56.7)	1.8(58.5)
	2	44.3	6.5(50.8)	1.3(52.1)	0 (52.1)	4.3(56.4)
	3	49.7	4.0(53.7)	0.5(54.2)	0.3(54.5)	2.0(56.5)
	平均	47.3	5.7(53.0)	0.7(53.7)	0.7(54.4)	2.7(57.1)

表 6　ISO—プロピルアルコール各時間抽出量　mg/100cm²　　（ ）内は計

社名	No.	時間 15分	30 分	60 分	120 分	240 分
A社	1	0	2.0(2.0)	0.8(2.8)	5.1(7.9)	6.5(14.4)
	2	0.7	1.5(2.2)	0.6(2.8)	5.2(8.0)	4.9(12.9)
	3	0	0	0	1.0(1.0)	1.1(2.1)
	平均	0.7	1.8(2.5)	0.7(2.2)	5.2(7.4)	5.7(13.1)
MT社	1	1.0	0 (1.0)	0 (1.0)	1.3(2.3)	6.5(8.8)
	2	1.0	1.0(2.0)	0.8(2.8)	1.7(4.5)	5.4(9.9)
	3	2.1	3.1(5.2)	0.8(6.0)	2.3(8.3)	5.8(14.1)
	平均	1.6	2.1(3.7)	0.8(4.5)	1.8(6.3)	5.9(12.2)
NP社	1	1.8	2.2(4.0)	3.8(4.8)	3.9(8.7)	3.6(12.3)
	2	2.7	4.5(7.2)	4.3(11.5)	1.3(12.8)	5.8(18.6)
	3	1.5	1.8(3.3)	3.7(7.0)	4.1(11.1)	5.0(16.1)
	平均	2.0	3.8(5.8)	3.9(9.7)	3.1(12.8)	4.8(17.6)
Y社	1	4.3	8.3(12.6)	4.5(17.1)	5.7(22.8)	3.5(26.3)
	2	1.1	3.5(4.6)	4.7(9.3)	11.8(21.1)	5.0(26.1)
	3	8.1	4.7(12.8)	4.7(17.5)	7.8(25.3)	9.3(34.6)
	平均	4.5	5.5(10.0)	4.6(14.6)	8.4(23.0)	5.9(28.9)
D社	1	0	4.7(4.7)	2.7(7.4)	4.3(11.7)	2.0(13.7)
	2	3.7	4.0(7.7)	0 (7.7)	11.7(19.4)	7.1(26.5)
	3	3.5	3.8(7.3)	2.1(9.4)	5.1(14.5)	5.7(20.2)
	平均	3.6	4.2(7.8)	2.4(10.2)	7.0(17.2)	4.9(22.1)
MM社	1	5.7	19.7(25.4)	9.0(34.4)	9.8(44.2)	6.8(51.0)
	2	7.0	25.0(32.0)	10.3(42.3)	5.7(48.0)	3.8(51.8)
	3	7.3	19.2(26.5)	9.6(36.1)	6.1(42.2)	3.8(46.0)
	平均	6.8	21.3(28.1)	9.6(37.7)	7.2(44.9)	4.8(49.7)

坂本香料製オレンジベース200
〃　フルーツエッセンス
長谷川香料製オレンジベース
〃　ストロベリー
各社製香料の300倍希釈液
実験方法

試料切片2ケを切片が重ならないよう広口共せんガラス瓶に入れ，cm²当り2mlの割りに各浸漬液120mlを加え，40±2°の恒温室内に2週間保存した。保存液は切片を除き，分液口斗に移し，切片およびガラス瓶は水15mlで2回洗い，洗液は保存液に合わせ，食塩30gを加え，冷後n—ヘキサン50ml，30ml，30mlずつで3回抽出し，n—ヘキサン抽出液は，水20mlで洗ったのち，無水硫酸ナトリウムを加えて放置し，クルデナ・ダーニッシ装置を用いて1mlになるまで濃縮し，冷風下でほとんど蒸発乾固し，アセトン1mlを加えて水浴中で還流冷却器を付けて30分間40°で温浸し，冷後，10μlを用いてガスクロマトグラフィー法でBHTおよびスチレンモノマーの定量を行なった。内部標準物質としてn—ノナンを用いた。

標準品　BHT（ナールデン社製）3回含水アセトンより再結晶したもの
スチレンモノマー（八幡化学製）
D—リモネン（和光純薬，特級）

測定条件
島津GC—IC型　水素炎イオン化検出器
カラム　PEG—20M alco 20% 1.5m ステンレスカラム
カラム温度　180°　Sens 10^{-3}
検出器温度　200°　Range 0.4
注入口温度　190°
キャリヤーガスおよび流速　N_2, 70ml/min, 2.2kg/cm²

BHT，スチレンモノマーおよびリモネンのクロマトグラムは図1の如くで，浸出液中のBHTおよびスチレンモノマーの同定はスタンダードのリテンションタイムより行なった。また定量はスタンダードのガスクロマトグラムより検量線を作成した。定量値は表7の如くであった。

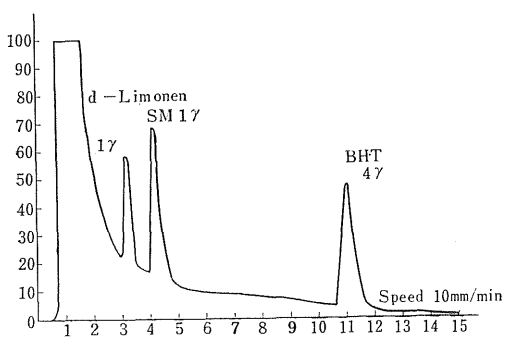


図　1

表　7

浸出液種類 ＼ γ/100cm²	BHT	残存モノマー
高砂オレンジコンクP	59.6	218
〃 500	13.1	48
〃 700	78.5	234
高砂ストロベリー 100	14.8	52
〃 1000	30.6	110
坂本オレンジベース 200	25.6γ	89
坂本フルーツエッセンス	61.5γ	223
長谷川オレンジベース	(—)	24

4.　ポリスチレン中の金属（定性）

A社製成型カップ切片5gを細切し，内容100mlのパイレックス製ビーカー中に取り，加熱して熔融したのち，硫酸1mlを加え，550°で灰化し，その灰分について発光スペクトル法（アーク法）を行なった結果は表8の如し。

表　8

アルミニウム	+
カルシウム	+
チタニウム	+
亜　鉛	+
鉄	+
シリカ	++
マグネシウム	+
鉛	—
銅	—
スズ	—
ヒ素	—
アンチモン	—

5.　食用色素の染着性

A社成型カップ細片（4mm×4mm）2gを別々に試験管にとり，0.01%食用タール色素溶液5mlおよび希酢酸1mlを加え，85°水浴中で6時間加温（途中蒸発した水分を補給）したのち，色素液を捨て，水5mlずつで2回洗浄後，沪紙上で風乾した。

その結果は表9の如し。

表　9

食用赤色　2号	ほとんど着色しない。
〃　102号	〃
〃　106号	着色する。
食用黄色　4号	着色しない。
食用黄色　5号	〃
食用青色　1号	わずかに着色する。
食用紫色　1号	着色する。

6.　揮発性物質の $KMnO_4$ 消費量

各社シート細片4mm×4mm 5gをクエン酸（結晶）1.5g，塩化ナトリウム15gおよび水50mlを加え水蒸気蒸留する。留液は0.1N $KMnO_4$ 溶液10ml，硫酸0.4mlを入れた受器中に液量100mlとなるまで蒸留した。

この留液を5分間煮沸したのち，常法に従って，$KMnO_4$ 消費量を求めた。

その結果は表10の如し。

表　10

A　社	0.0732%
MT社	0.1391%
NP社	0.0948%
Y　社	0.0569%
D　社	0.0569%
MM社	0.1075%

考　　察

1.　保存試験

サワー飲料を試料として行なった結果であったが，アルミ箔のヒートシール機が試作容器用のものでなかったので，完全なシールが出来ないものがあり，変形試験において，変形するものを認めたがシール機の完成により，異常はないものと推定される。感能試験の結果トマトは適性でないといえる。

2.　溶出試験

ポリスチレンはオレフィン系樹脂に較べて耐薬品性に劣るので，n—ヘキサンおよびイソプロピルアルコールについて行なったがシートの軟化がひどく抽出量にバラツキが目立った。

シートの厚さと抽出量の関係は認められず，抽出量の算定法は単位面積当りの方が適切と思われる。4時間抽出の平均値を表にすると表11の如し。

3.　BHTおよびスチレンモノマー

容器包装材として衛生上問題となるのは，材質および添加剤の食品への移行である。

表11　各溶媒4時間抽出量

溶媒 / 社別	d-ヘキサン mg/100cm²	イソプロピルアルコール mg/100cm²	シート厚さ（mm）
A	71.7	13.1	1.55
MT	71.8	12.2	0.47
NP	86.9	17.6	0.52
Y	81.4	28.9	0.37
D	62.1	22.1	0.66
MM	57.1	49.7	

表7の結果より，香料の種類によって，BHTの溶出量に13.1γ/100cm²～78.5γ/100cm²と大きな差が認められる。（なおこの結果は香料中のBHT量を差引いたものである）

この結果は香料希釈液中0.07～0.39ppmに相当し，B，I，B，R，A，でBHTの食品移行の限度を1ppm以下の規定しているのと比較するとはるかに低い値となっている。

しかし香料の種類によりその溶出量が異なることは清涼飲料水の種類によっては適性を欠くことが考えられる。

スチレンモノマーについても同じことがいえる。しかしスチレンモノマーについては，今後業界の技術進歩により減少することが考えられる。

4.　ポリスチレン中の金属

滑剤，着色料として，ステアリン酸カルシウムおよび亜鉛，チタンなどが使用されているのでこれらが検出されるのは判るが，Si，Mg，Fe，Alが検出される理由は融媒，滑剤，着色料などによると考えられる。

5.　タール色素の染着性

清涼飲料水には食用タール色素を使用するが，食用赤色106号，食用青色1号，食用紫色1号は表9の結果よりポリスチレンに染着し適性でない。

6.　揮発性物質の $KMnO_4$ 消費量

プラスチックスの食品中への異臭移行を推定する方

表12　ポリスチレンとポリプロピレンの揮発性物質の $KMnO_4$ 消費量(%)

	社名	$KMnO_4$ 消費量		社名	$KMnO_4$ 消費量
ポリスチレン	AD	0.0732	ポリプロピレン	MT	0.1075
	MT	0.1391		S	0.0822
	NP	0.0948		MY	0.0885
	Y	0.0569		T	0.1012
	D	0.0569		MS	0.0569
	MM	0.1075			

法として行なってみた。

ポリプロピレンと比較してみると表12の如くで両者とも大差はないが消費量は共に大きい結果である。

結　　論

清涼飲料水用容器としての安全性はなお検討の余地があるが，やはり飲料中の香気成分により溶出量が左右される点，飲料の種類を限定すべきであると思う。

終りに資料を提供された石油化学協会加盟各社および種々の御教示を戴いた国立予防衛生研究所，俣野技官に感謝の意を表します。

参 考 文 献

1) 村橋，小田，井本：プラスチックスハンドブック，(1966) 朝倉書店

2) 後藤：プラスチックス添加剤データ集，(1968) 化学工業社

3) ASTM STANDARDS on PLASTICS, (1957)

4) 塩ビ食品衛生協議会編　技術資料 No. 5, 7, 9, 13, 17, 18, 21

人工肉の栄養学的検討

道口正雄* 五島孜郎**

NUTRITIVE EVALUATION OF MEAT ANALOGUE

Masao DOGUCHI* Shiro GOTOH**

(Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Sesearch Laboratory of Public Health)
(Sagami Women's University**)

緒　　言

近年大豆または小麦蛋白を主原料とする新蛋白食品が開発され，多種多用途の製品が販売されている。これら新蛋白食品を形態によって別けると，粉状と繊維状のものとに大別され，この植物蛋白を繊維化し従来の植物蛋白製品にない畜肉特有のすじっぽい食感を備えた製品を人工肉と称しているようである。それらの製品のなかには畜肉ハムとあまり区別のつかぬものや，ひき肉，ベーコン類似品また畜肉に混合し肉製品，例えばひき肉，ソーセージなどに仕上げたものなどが市販されているようである。

これら外観や食感を畜肉に類似させた人工肉の消費量は，今後いよいよ増加するものと思われるが，それらの製品が蛋白源として畜肉に置きかえられた場合，栄養学的にいかなる問題が存在するかを検討することを目的として，国産人工肉5種，外国製品4種について，構成アミノ酸を測定し，さらにそれらの結果からFAO/WHO 共同専門委員会の勧告[1]に従って全卵並びに母乳の必須アミノ酸パターンを比較規準として人工肉のケルカルスコアを算定し，もって人工肉の栄養学的評価を試みた。

試料および実験方法

1) 供試試料

供試人工肉は9種，うち国産5種，外国製品4種であり，それらの形状並びに分析値を第1表に示す。

2) アミノ酸分析

i) シスチンの定量　シスチン0.2～0.3mgを含む試料をパイレックス試験管に秤取し，Blackburn[2]の記述に従い0°Cの過ギ酸2m*l*を加え，0°Cで一夜反応させた。ついで38%臭化水素酸0.3m*l*を加え，40°Cでロータリーエバポレーターを用い蒸発乾固せしめた。これに定沸点塩酸5m*l*を加え，減圧下に封管し105°±2°Cで24時間加水分解し，塩酸を除去した後，残渣を3m*l*のpH2.2クエン酸緩衝液（BRIJ-35含有）に溶解し，その0.5m*l*をとり日立KLA-3B型アミノ酸分析計を用い，システィン酸の定量を行なった。使用カラムは9×500mm，溶出用溶媒はクエン酸緩衝液pH3.25，溶出速度60m*l*/h，溶出温度55°Cであった。システィン酸の回収率を94%として分析値を補正した。

ii) トリプトファンの定量　Dréze の方法[3]に従い，試料と等量のデン粉を加え，$Ba(oH)_2 \cdot 8H_2O$

第1表　人工肉の水分および蛋白質含量

試料	形　　状	水　分 (%)	蛋　白 (%)	蛋白(%) 無水換算
No. 1	褐色フレーク（リジン添加）	11.0	57.5	64.5
2	ひき肉状	67.9	24.4	75.9
3	赤褐色フレーク	16.6	34.0	40.7
4	褐色粒状	71.6	24.4	85.9
5	黄色ランプ	10.1	49.8	55.4
6	褐色ランプビーフ様味付	11.0	47.8	53.7
7	赤褐色フレークベーコン様味付	8.4	37.4	40.8
8	褐色ランプビーフ様味付	6.8	47.7	51.2
9	黄褐色フレークポーク様味付	7.4	48.3	52.2

No. 1～5　国産品　No. 6～9　外国製品
No. 1～3　窒素係数　5.7
4～9　〃　6.25

* 東京都立衛生研究所　栄養部
** 相模女子大学

7.8g および水 4.4m*l* を加え封管し，120°C で15時間加水分解した。バリウムを硫酸バリウムとして除去した加水分解液の一部を蒸発乾固し，残渣を pH2.2 クエン酸緩衝液にとかし供試した。使用カラムは 9×200mm，溶出溶媒 pH5.28 クエン酸緩衝液，溶出速度 120m*l*/h，溶出温度 55°C であった。

iii) その他のアミノ酸の定量　蛋白質量20～30mg になるよう試料を秤取し，定沸点塩酸 10m*l* を加え，アセトンードライアイス中で凍結し，ロータリーポンプを用いて 10mm Hg 以下に減圧しつつ封管した。ついで105°±2°C で24時間加水分解後，蒸発乾固し残渣を 20m*l* の pH2.27クエン酸緩衝液にとかし，その 0.5m*l* を中酸性並びに塩基性アミノ酸分析に供した。塩基性アミノ酸分析は 6×100mm カラム，溶出溶媒は pH 5.28クエン酸緩衝液，また中酸性アミノ酸分析は 9×500mm カラム，溶出溶媒は初め pH3.25 クエン酸緩衝液，1時間15分後に pH4.25 クエン酸緩衝液に変えた。両分析とも溶出温度 55°C，溶出速度 60m*l*/h であった。

3) 試料中の蛋白質含量はケルダール法により，試料 No.1～3 に対する窒素係数は 5.7，No.4～9 には6.25を用いた。

結果および考察

供試人工肉のアミノ酸組成を示したものが第2表である。表より明らかなように，試料 No.1～3 のアミノ酸組成は小麦グルテンのそれとよく一致し，これらの試料は小麦グルテンを素材としたものであることを示す。

小麦グルテン蛋白の特徴は，グルタミン酸並びにプロリン含量が高く，特にグルタミン酸含量は30%以上にもなることであるが，No.1～3 の試料はどれもその条件に合致し，またその他のアミノ酸もグルテン中のそれらの含量と近似の値を示す。No.1 のリジン含量は他の試料並びにグルテンのそれらと著しく異なる値を示しているが，これはリジンを添加してあるためである。一方 No.4～9 のアミノ酸構成は大豆蛋白のそれとよく一致し，これらの試料は大豆蛋白から製造されたものと推定される。大豆蛋白はグルタミン酸およびアスパラギン酸含量が高く，また穀類蛋白に不足しているリジンの含量は高いが，含硫アミノ酸含量は低いという欠陥がある。特に人工肉に加工した場合，メチオニン含量が脱脂大豆蛋白の約半量ほどのものも認められるが，これは製造工程中にメチオニンの一部が破壊されることを示唆するものと考える。

食品蛋白質の栄養価は，通常生物価，蛋白正味利用率および蛋白効率などの生物学的評価が行なわれてい

第2表　人工肉のアミノ酸組成

アミノ酸 ＼ 試料 No.	アミノ酸 g/16g 総窒素										
	1	2	3	グルテン[5]	4	5	6	7	8	9	脱脂大豆[6]
トリプトファン	1.1	1.1	1.0	1.1	1.3	1.5	1.4	1.3	1.4	1.6	1.3
リジン	4.0	1.6	1.7	1.7	7.3	7.1	7.1	7.3	6.4	6.8	6.9
ヒスチジン	2.0	2.0	2.1	2.0	3.4	3.1	3.4	3.2	3.3	3.2	2.6
アルギニン	2.7	3.5	3.6	3.3	9.0	9.2	7.7	8.9	8.3	8.5	8.4
アスパラギン酸	4.5	2.4	2.8	3.3	13.4	11.9	11.9	12.6	12.6	12.2	12.0
スレオニン	2.6	2.2	2.3	2.4	3.9	4.2	3.8	4.0	3.9	3.8	4.3
セリン	5.0	5.5	5.5	5.0	6.0	7.4	5.7	5.7	5.6	6.3	5.6
グルタミン酸	33.8	35.3	38.0	35.6	19.5	18.1	22.1	18.8	22.0	21.4	21.0
プロリン	10.9	12.9	12.3	12.3	6.2	6.1	6.4	5.9	6.1	5.7	6.3
グリシン	3.2	3.1	3.1	3.2	4.0	5.0	4.2	4.2	4.2	4.4	4.5
アラニン	2.9	2.5	2.6	2.5	4.2	4.1	4.3	4.4	4.2	4.3	4.5
シスチン	2.1	2.2	2.2	1.9	1.4	1.5	1,2	1.4	1.4	1.4	1.6
バリン	3.7	3.2	3.2	4.1	4.3	4.3	4.5	4,6	4.5	4.1	5.4
メチオニン	1.6	1.5	1.3	1.6	0.7	0.8	1.1	1.3	1.1	0.8	1.6
イソロイシン	3.4	3.1	2.9	3.9	4.4	4.3	4.3	4.3	4.2	4.1	5.1
ロイシン	6.7	6.1	5.8	6.8	8.3	7.4	7.7	7.9	7.7	7.5	7.7
チロシン	3.2	3.2	2.8	3.3	4.0	3.1	3.3	3.5	3.4	3.3	3.9
フェニルアラニン	5.0	4.8	4.6	5.2	5.4	5.0	5.3	4.9	5.0	4.7	5.0

る。しかしこれらの方法は時間や経費がかかり実際の栄養指導には食品のアミノ酸組成より評価する化学価（ケミカルスコア）が実用的に用いられている。この化学的評価の方法は，食品の必須アミノ酸パターンと比較して栄養価を定める方法で，アミノ酸の分析値より容易に栄養価を求めることが出来る。1965年のFAO/WHO[1]共同専門委員会は蛋白質の化学価を求めるには，FAO暫定的パターンより人乳か全卵のいずれかの必須アミノ酸パターンを採用することをすすめており，実用上の比較規準には全卵のアミノ酸パターンを用いるのが最も妥当であると結論している。

第1図は人工肉および鶏全卵のA/E比（総必須アミノ酸g当りの各必須アミノ酸のmg数）を示す。芳香族アミノ酸はフェニルアラニン量を越えぬ量のチロシンを，含硫アミノ酸はメチオニン量をこえぬ量のシスチンを加えた価である。図に示されるように，リジン添加せぬ試料No.2および3は規準全卵パターンのリジンに比較して著しく低く，また試料No.4～9では含硫アミノ酸が低く，これらのアミノ酸がそれぞれの試料の制限アミノ酸となっていることが認められる。

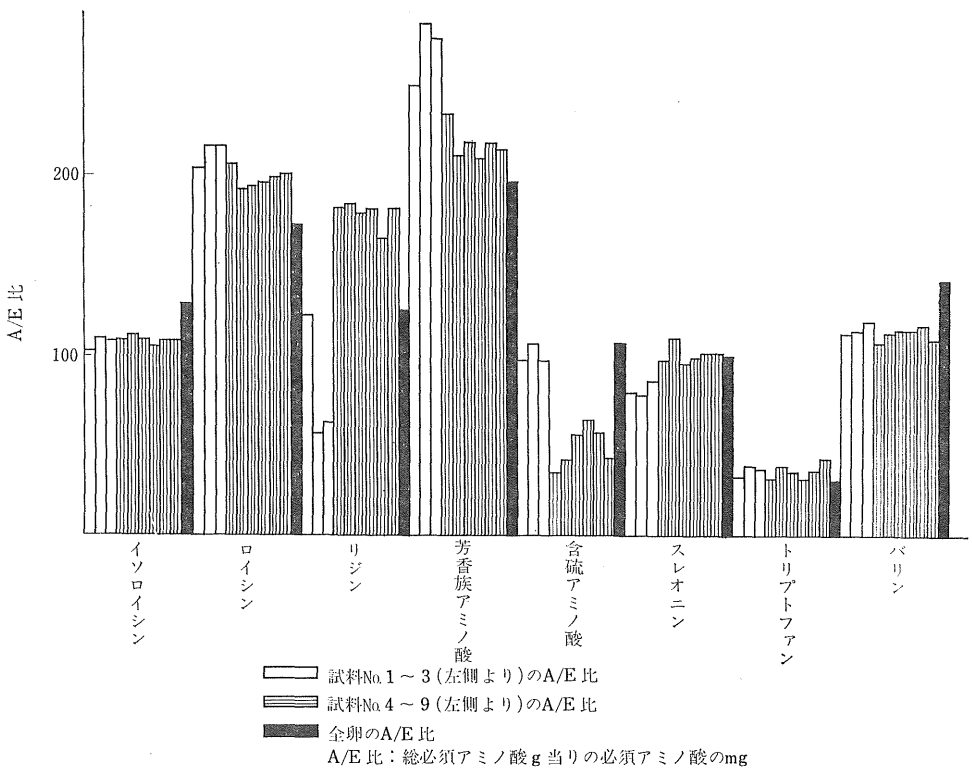
第3表は，FAO，人乳および全卵の必須アミノ酸パターンに基づいて計算した人工肉の化学価を示す。試料No.1～3では人乳および全卵パターンより算出

第3表　人工肉の化学価

試料	化学価			制限アミノ酸（卵組成）
	FAOパターンより	人乳パターンより	全卵パターンより	
No. 1	74	77	79	バリン
2	37	45	46	リジン
3	39	49	50	〃
4	32	40	33	含硫アミノ酸
5	37	48	39	〃
6	51	64	52	〃
7	60	74	60	〃
8	51	65	53	〃
9	37	49	40	〃
牛筋肉	80	80	80	含硫アミノ酸
豚ヒレ肉	85	90	80	〃
魚	70	70	75	トリプトファン

牛筋肉以下はFAD/WHO専門委員会報告[1]より

第1図　人工肉および全卵のA/E比



した化学価がよく一致するが，含硫アミノ酸が制限アミノ酸となっている No. 4～9 ではＦＡＯと全卵パターンからの化学価がよく一致する。

化学価がどの程度正しく蛋白質の栄養価を表現しうるものであるかについては，いまだ問題点が多く残されているが，全卵パターンよりの化学価に基づいて考察すれば，グルテンを素材としリジンを添加した試料 No. 1 の栄養価は著しく向上しており，一方大豆蛋白より製造されたと思われる No. 4～9，のうち化学価が30～40という低栄養価のものが半数あり，これは前記せるごとくメチオニン含量が低く，これが制限アミノ酸となってこれらの人工肉の蛋白質栄養価を著しく低いものとしているわけである。

人工肉の外観や味および食感をいかに畜肉に類似させても，小麦蛋白や大豆蛋白を素材としている以上，その素材のもつ以上の栄養価を期待しえないのは当然であり，人工肉を摂取するということは，麩（化学価 44[4]）やとうふ（化学価 [4]）を食するのとなんら変らぬことになる。またものによってはそれ以下の栄養価しか有しないものもあることが明らかにされた。

大豆蛋白からと考えられる試料のうちで最低の化学価を示す No. 4 とグルテンを素材とすると思われるもののうち最低の価を示す No. 2 を等量混合し，その化学価を計算すると，No. 4 のリジンが No. 2 のそれをおぎない，また No. 2 の含硫アミノ酸が No. 4 の不足をおぎない化学価を 63（制限アミノ酸，含硫アミノ酸）に向上させることは興味あることである。

要　　約

国産５種，外国製品４種の人工肉についてアミノ酸構成を検討し，それらの化学価を求めることによって人工肉の栄養価の判定をこころみた。アミノ酸構成より，この９種の試料のうち３種はグルテンを，他の６種は大豆蛋白を素材とするものであると判断された。また大豆蛋白より製造されたと思われる試料のうちにはメチニオン含量が低く，そのため化学価が著しく低いものが認められた。

参 考 文 献

1) 蛋白質必要量 FAO/WHO 共同専門委員会報告（1965）
2) S. Blackburn, "Amino Acid Determination" Marcel Dekker, lnc, New York. (1968) p. 128
3) A. Dréz, Biochem. J., 62, 3 (1956)
4) 日本食品アミノ酸組成表，科学技術庁資源調査会編，(1966)
5) M. Doguchi, Agricultural and Biological Chem. 33, 1769 (1969)
6) 渡辺篤二，化学と生物，3，(７)，9 (1965)

発熱性物質に関する研究 II

(化学的物質による体温変動)

下平彰男

STUDY ON FEVER-PRODUCING SUBSTANCES II

(Body Temperature with administration of chemical substances)

Akio Shimohira

(Submitted on July, 1970)

Pyrogen has been known as metabolic products of microorganisms since early this century, and it has been shown that Lipopolysaccharides extracted from gram-negative bacteria caused a high fever. Pyrogens in a wide sense, however, include chemical substances, i. e. sulfur, milk, gum, some hormones, 2,-4 dinitro-phenol (DNP), tetrahydro-β-naphthylamine, carmine etc. Previous studies have demonstrated that ethylephedrine (E) shows rise, methylephedrine(mE) does not any and xylitol (Xy) shows fall in body temperature of rabbits. Several investigators have lately reported that nervous hormone serotonine in brain origin may play an important role in the pathogenesis of fever in animals.

Our present investigations were undertaken to determine the change in body temperature of animals with administration of chemical substances after the treatment with reserpine to release serotonime. The change in body temperature was calculated from the area of temperature curves of reserpine-treated animals during a constant period of time after the administration of E, mE, DNP and Xy. Test animals used were healthy male rabbits and rats which have not decreased their weight for at least 1 week under the constant environmental condition. In order to hold test animals during body temperature recording by automatic thermister, the neck-fixed method on rabbits and the tube-fixed on rats were performed. The results suggest that there is a difference in the pathogenesis of the temperature response between rabbit and rat. Response of body temperature in reserpine-treated rats after administration of E, mE and DNP is seems te be higher and faster than in rabbits and the response curves on rats is different from on rabbits.

緒　　言

発熱性物質(Pyrogen)は古くから微生物の代謝産物として知られ，グラム陰性菌の内毒素から lipopolysaccharide (LPS) が抽出され，それが強力な発熱作用を起すことが明らかにされている。i) また candida utilis 酵母から得た ribonuculeic acid (RNA) が発熱作用のあることが報告され，ii) 更にウサギから得た白血球性発熱物質によって体温調節機構が研究され

ている。iii）しかし広義の発熱性物質として古くから硫黄，ミルク，ある種のゴム質，ある種のステロイドホルモン，2—4，dinitrophenol，tetrahydro-β-naphthylamine，carmine などの化学的物質が知られている。一方，生体の発熱機構については脳幹において神経ホルモン Serotonine（5—HT）が体温調節中枢に働いていることがウサギを用いて解明されている。iv）我々は数種の化学的物質をウサギに静脈投与し ethyl-ephedrine は体温上昇を示すが methyle-phedrine には見られず，糖アルコールの中，Xylitol のみに体温下降性があることを前回の年報に報告したが，v）今回はウサギおよびラットを用い体温上昇作用および下降作用のある化学的物質を reserpine 前処置により 5-HT を放出させた後投与し体温変動を記録した。すなわち，ウサギおよびラットに reserpine を皮下注射した後 ethylephedrine（E），methylephedrine（mE），2—4 dinitrophenol（DNP）および Xylitol（Xy）を投与し，それぞれの体温変動を比較した。

実験材料

実験動物：市販の実験用白ウサギ，雄（体重，購入時1,800～2,000g）およびラット，ウィスター系，雄（体重，購入時180～200g）を温度24±0.5°C，湿度55±5％の室内で7～10日間飼育し，体重増加を示すものの中から正常体温変動の少ないものを選び実験に用いた。

体温測定器：12点式自動記録サーミスター（飯尾電気 Ep-670 型）を用い，感熱部は径 4.5mm（ウサギ用）および 3.0mm（ラット用）を使用した。

薬品類

(1) ethylephedrine—日局塩酸エフェドリン 0.4g および 4g を注射用蒸留水に溶解してそれぞれ 100m*l* とした。

(2) methylephedrine—日局 dl-塩酸メチルエフェドリン 0.4g および 4g を注射用蒸留水に溶解してそれぞれ 100m*l* とした。

(3) dinitrophenol—2,-4-dinitrophenol 0.2g および 1g を 0.3％ 炭酸水素ナトリウム液に溶解してそれぞれ 100m*l* とした。

(4) xylitol—無色結晶純度 99％ 以上のもの 50g を蒸留水に溶解して 100m *l* とし 123°C で 15分間高圧蒸気滅菌した。

(5) adonitol—試薬特級 Adonitol 5g を注射用蒸留水に溶解して 10m*l* とした。

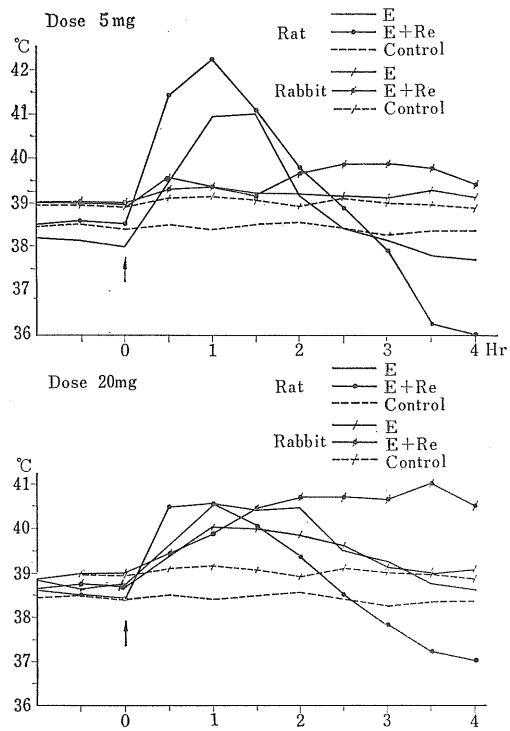
(6) reserpine—日局レセルピン10mg および100mg をそれぞれ乳鉢中にとり，プロピレングリコール 1g と共に研磨し，蒸留水少量およびリン酸 2 滴を加え温めながら溶解し，更に蒸留水を加えてそれぞれ 25m*l* とした。蒸留水はすべて pyrogen free の再蒸留水を用い，調製は清潔な室内で速やかに行なった。それぞれの溶液の濃度を 2 種類とした理由はウサギおよびラットに対し 1 匹あたり約 1～2 m*l* を投与するためである。

注射筒およびガラス器具類：耐熱硬質ガラス製で使用前 250°C 30分間熱灼して pyrogen free とした。

実験方法

実験動物はすべて購入後 7～10日間の予備飼育を経て実験を終るまで，温度24±0.5°C，湿度55±5％の室内でケージに入れあるいは固定し，特に騒音，臭気をさけ，採光等に注意して体温測定を行なった。体温測定に際しウサギは首加式固定を行ない，ラットは多孔式円筒（樹脂製）に固定し，自記サーミスター感熱部を直腸内 75mm（ウサギ）および 50mm（ラット）までそう入し，直ちに体温記録を始め，固定 1 1/2～2 hr 後に皮下注射を行ない，注射後 4 hr まで体温を連続記録した。

Fig. 1 Body Temperature of Animals administered ETHYLEPHEDRINE after treatment with Reserpine



実験1および結果

ラット2～3匹を1群とし3群を用意し，上記の方法で固定し，直ちに体温記録を開始し，1 1/2～2 hr後に第1群にはE 5 mg/kgを皮下注射し，第2群にはreserpine 2 mg/kgを皮下注射してから15分間以内にE 5 mg/kgを皮下注射し，第3群には生理食塩液5 ml/kgを皮下注射しcontrolとした。また別の2群についてE投与量を20mg/kgとし，同じ方法でRe処置後の投与および単独投与を行なった。更にまた5群のウサギを用い上記と同じ方法で実験を行なった。

Fig. 3 Body Temperature of Animals administered METHYLEPHEDRINE after treatment with reserpine

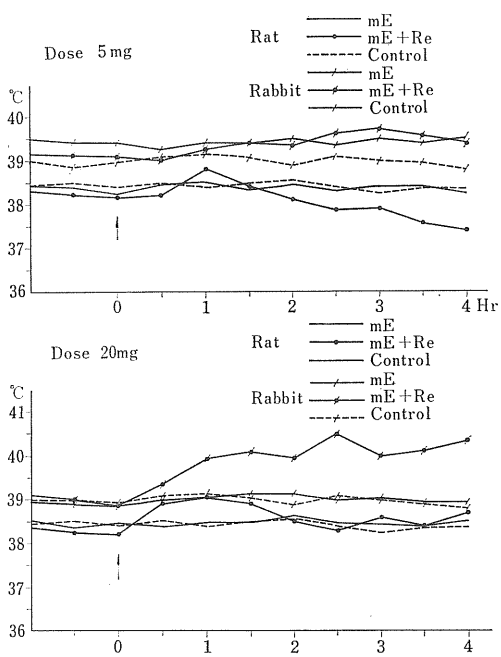


Table. 1 Rising Temperature on Ethylephedrine

Animals	Dose/kg	Max. Rising Temp. °C	Hours
Rats	5 mg	3.00	1 1/2
〃	Re + 5 mg	3.20	1
〃	20mg	1.80	1
〃	Re +20mg	2.15	1
Rabbits	5 mg	0.65	1/2
〃	Re + 5 mg	0.90	2 1/2
〃	20mg	1.05	1
〃	Re +20mg	2.00	2

その結果，注射前1 hrから注射後4 hrまでの体温を30分間毎にグラフに示し（Fig. 1）また注射時の体温を0とし，注射後4 hrまで30分間毎の体温変動（Fig. 2）をみると，5 mg/kg投与のラットは20mg/kg投与に比較し，Re前処置したものと共に体温上昇値が高く，Re処置により急激な体温上昇（1/2～1 hr）を示している。またウサギでは注射後1 1/2～2 hr後からRe処置の方が体温上昇値が高く20mg/kg投与の方が著明である。Table 1はE投与後の最高体温上昇値とその時の時間を示す。

実験2および結果

実験1と全く同じ方法でethylephedrineの代りにmethylephedrineを投与して実験を行なった。

その結果，注射前1 hから注射後4 hまでの体温を30分毎にグラフに示し（Fig. 3），また注射時の体温を0とし，注射後4 hrまで30分間毎の体温変動（Fig. 4）をみると，mE単独投与では投与量に関係なくラットおよびウサギとも体温上昇は見られず，Re処置

Fig. 2 Effect of ETHYLEPHEDRINE on the animals treated with reserpine

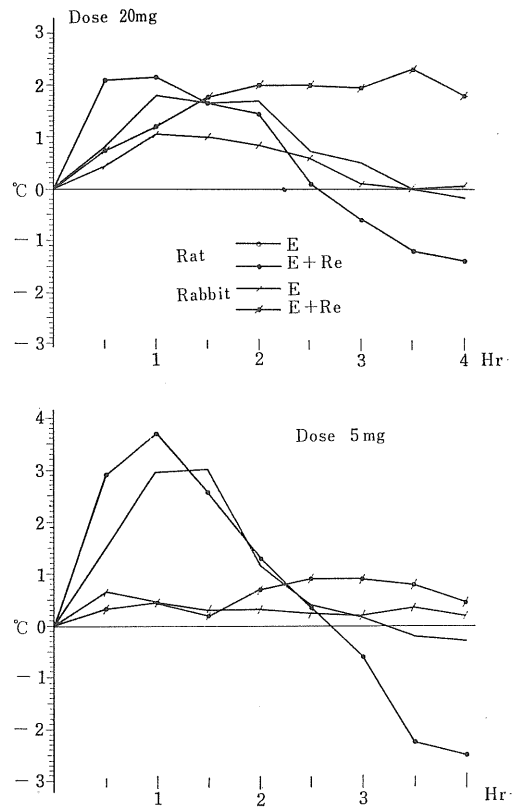
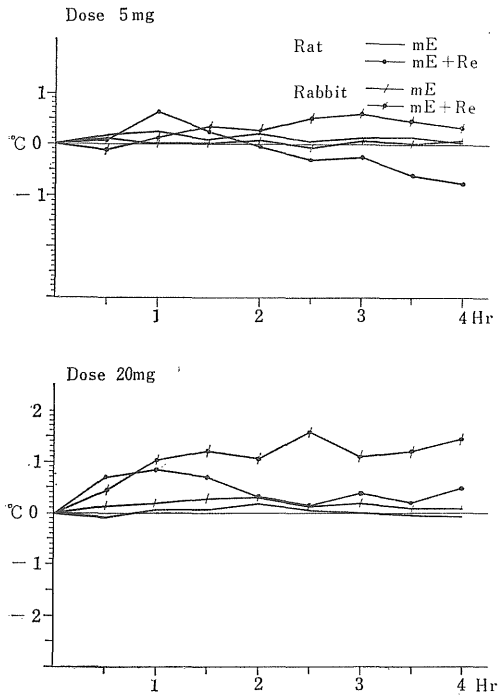


Fig. 4 Effect of METHYLEPHEDRINE on the animals treated with reserpine



によりラットでは注射後 1 hr 後に最高体温上昇を示し，ウサギでは 2 1/2hr 後に最高体温上昇を示し，ラットはウサギより回復が早く，体温上昇値も小さい。Table. 2 は mE 投与後の最高体温上昇値とその時の時間を示す。

Table. 2 Rising Temperature on Methylephedrine

Animals	Dose/kg	Max. Rising Temp. °C	Hours
Rats	5 mg	–	–
〃	Re + 5 mg	0.65	1
〃	20mg	–	–
〃	Re +20mg	0.85	1
Rabbits	5 mg	–	–
〃	Re + 5 mg	0.60	3
〃	20mg	–	–
〃	Re +20mg	1.60	2 1/2

実験 3 および結果

ラット 2～3 匹を 1 群とし 3 群を用意し，既述の方法で固定し，直ちに体温記録を開始し，1 1/2～2 hr 後に第 1 群には DNP 10mg/kg を皮下注射し，第 2 群には reserpine 2 mg/kg を皮下注射してから15分間以内に DNP 10mg/kg を皮下注射し，第 3 群には生理食塩液 5 ml/kg を投与して control とした。またウサギを用いて上記と同じ方法でＤＮＰ投与試験を行なった。

その結果，注射前 1 hr から注射後 4 hr までの体温を 30 分間毎にグラフに示し（Fig. 5）また注射時の体温を 0 とし，注射後 4 hr まで 30 分間毎の体温変動（Fig. 6）をみると，ＤＮＰ単独投与ではウサギおよびラットとも注射後 1 1/2～2 hr において最高体温を示し，Re 処置後投与の場合，ラットでは単独投与に比べて急激な体温上昇を示し（1/2～1 hr），以後速やかに回復し，ウサギでは単独投与との差はほとんど少なかった。

Fig. 5 Body Temperature of Animals administered DINITROPHENOL after tredtment with reserpine

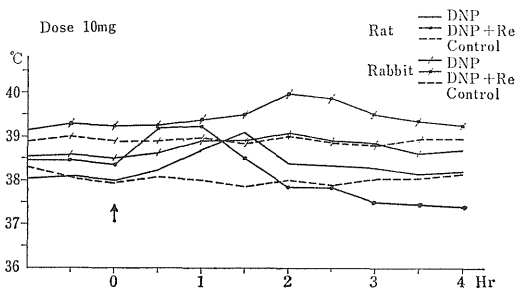
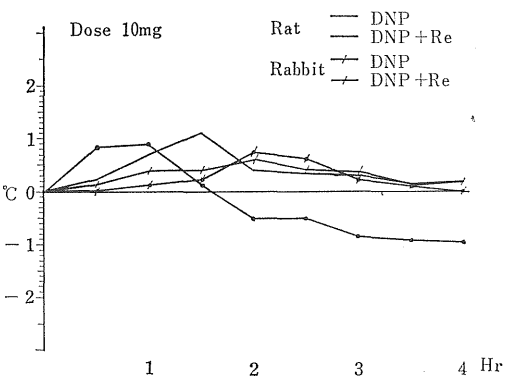


Fig. 6 Effect of DINITROPHENOL on the animals treated with reserpine



実験 4 および結果

実験 3 と同じ方法でＤＮＰの代りに50%の Xylirol 溶液 10ml/kg を投与し，実験を行なった。その結果，注射前 1 hr から注射後 4 hr までの体温を30分間

毎にグラフに示し（Fig. 7）また注射時の体温を0とし，注射後4hrまで30分毎の体温変動（Fig. 8）をみると，ラットではRe処置により体温下降性がやや弱くなるが，ウサギでは逆に体温上昇（＋0.75°C, 2hr後）を示した。

Fig. 7 Body Temperature of Animals administered XYLITOL after treatment with reserpine

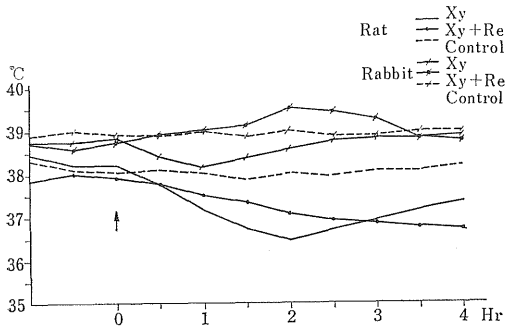
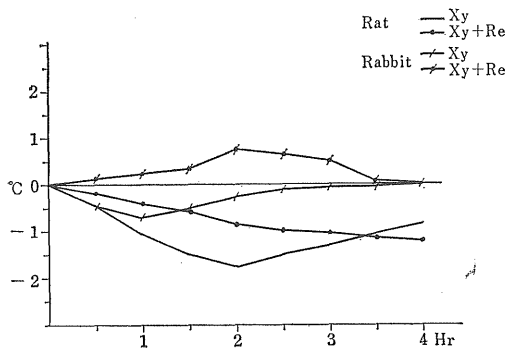


Fig. 8 Effect of XYLITOL on the animals treated with reserpine

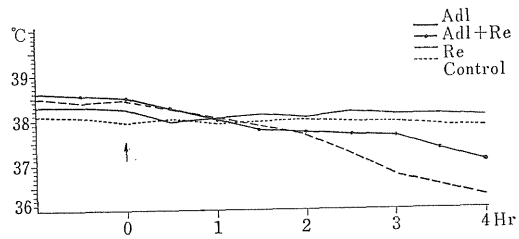


実験5および結果

Xylitol 投与によって体温が下降することは実験4および既報v）で明らかであるが，Xylitol の立体異性体である Adonitol をラットに投与して体温変動を測定した。すなわち，ラット2～3匹を1群とし4群を用意し，第1群には Adl 5 g/kg を皮下注射し，第2群には reserpine 2 mg/kg を皮下注射してから15分間以内に Adl 5 g/kg を皮下注射し，第3群には reserpine 2 mg/kg. 第4群には生理食塩液 5 ml/kg を投与した。

その結果，特に著明な有意差は認められなかった。（Fig. 9）

Fig. 9 Body Temperature of Rats administered ADONITOL after treatment with reserpine



考察および結論

まず体温測定法の問題であるが，滝野ら vi）はラットを腹位固定すると一過性の上昇を示した後，急速に下降し 4 hr で最低となると述べている。筆者らはラットの習性を利用し，ラット自身が通過し得るトンネル型円筒内を歩かせた後，直ちに前後を封じ，後部は尾のみを外部に露出させ，サーミスター感熱部を直腸内50mmまでそう入し，尾と共に接着テープを巻いて固定した。このトンネル型円筒は樹脂製を用い底部以外は直径9mmの孔を多数あけて通気性を保ち，体温を自動記録させながら皮下注射を行なうためにその円筒の背部中央に約30×40mmの戸を設けた。また試験室と試験前飼育室は同室で温度24±0.5°C，湿度55±5％に保ち，騒音，臭気などの刺戟をさけた。これらの方法でラットを固定し，直ちに直腸温度を自記サーミスターで連続記録（一匹あたり2分間間隔）すると約3割のラットは最初の体温は高く以後急激な体温下降を示し，あるいは短時間における体温変動がはげしいのでそれらのラットを除き実験に使用した。正常体温変動はラットはウサギに比べて大きいが $1\frac{1}{2}$～2 hr 後には最高最低の差が約0.3°C以内に安定した。ウサギについては首架式によって固定し，自記サーミスターで体温記録を行なったが，試験前体温が39.5°Cを超えるものおよび体温変動のはげしいもの（0.3°C以上）はごく稀であった。なお両者とも試験日の前日には試験日と同じように固定し体温記録を行なっておいた。

さて発熱現象については，発熱ウサギにおける脳内 serotonine の減少が報告されており vii）安田ら viii）は予め脳内 serotonine を放出させるため reserpine を投与しておいて微生物性発熱物質ＬＰＳを投与すると発熱を抑制することを報じている。我々はウサギおよびラットを用いて reserpine 処置後に化学的体温上昇性物質および下降性物質を投与し，体温を連続記

録しそれぞれ体温変動を比較した。実験1によるE投与ではラットはRe処置により更に急激な体温上昇と早い回復がみられ，これに比べてウサギではRe処置により体温上昇値は高くはなるがゆるやかでやや2峯性を示している。また実験2のmE投与ではRe処置によって両者とも発熱を起すがやはりラットの体温上昇のピークが注射後早くウサギではゆるやかでおそくやはり二峯性を示している。EはmEより中枢神経興奮作用が強いといわれており，何らかの形で網様体賦活系に作用していることがうかがわれる。実験3による化学的発熱性物質DNP投与ではRe処置により両者ともRe処置しない場合と体温上昇値に大差はないが，ラットではRe処置により急激な体温上昇(注射後$^1/_2$～1hr)を示しているのに対し，ウサギではDNP単独投与とあまり変らない。これはDNPの中枢神経系に対する作用が動物種差により異るものと思われる。更にXylitol投与においてもRe処置によりウサギだけが発熱を起していることも興味ある問題である。実験5における Xylitol 立体異性体である Adonitol 投与では試薬高価のためラットの実験のみに終った。なお体温下降を示す物質として他に morphine があるが，これについては別紙に発表する予定である。結論として体温調節機構は動物により差異があるものと思われ，ひきつづき研究して行く予定である。

参考文献

i) 加納ら：日薬理誌62，135—141 (1966)
ii) S. Kanoh et al : J. Bac. Vol. 96 No.3 (1968)
iii) D. M. Moore et al : J. Exptl. Med. Vol. 131 No. 1 (1970)
iv) 車勇ら：薬物の作用点　南江堂 (1968)
v) 下平：東京都立衛生研究所年報20 (1968)
vi) 滝野ら：日薬理誌61，192～198 (1965)
vii) 車勇：日薬理誌62，8～10 (1966)
viii) Yasuda : Japan J. Pharmacol. 11 114 (1962)

甘味料の呈色試験法について

松本　茂*

ON THE COLOR REACTIONS OF SWEETENERS

Sigeru MATUMOTO

(Department of medicine, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Details were discussed on the detection methods of sweeteners, about which some notices were presented.

The NO_2 oxidation methods followed by the detection of SO_4^{--} with some color reagents for the test of cyclamate, the fluorescence tests by auramine or α-naphtylamine under UV light for the identification of saccharin, dulcin and cyclamate were mainly examined.

食品および医薬品についてサイクラミン酸塩の使用規制が行なわれるようになって以来，人工甘味料の検出法については特に活発な検討が行なわれている。われわれは以前よりサイクラミン酸の検出法として比較的特異性のあるロジゾン酸バリウム法を用いて来たが，この方法による市販食品類の検査結果については別報[1]に記載されている。本ノートではこれらの呈色反応実施上の諸注意とその関連実験，および甘味料の蛍光試薬による検出法の実験結果について報告する。

1. サイクラミン酸の呈色反応

サイクラミン酸は塩酸酸性で亜硝酸塩を作用させるとき，室温で酸化分解をうけて SO_4^{--} を生成するので，これを $BaSO_4$ として固定し，過剰の Ba^{++} を各種の呈色試薬を用いて発色させて検出を行なった。この際沪紙上の反応（点滴反応またはペーパークロマトグラムの発色）として行なうときは各試薬量等のバランスにより鋭敏度に微妙な影響がみられる。われわれは Ba^{++} の発色剤として，1）テトラヒドロキシキノン2ナトリウム　2）ロジゾン酸2ナトリウム3）クレゾールフタレインコンプレクソン等について実験を行なった（Table. 1）。以下これらの方法の細部について実施上の注意をのべることとする。

Table. 1　Spot Test of Cyclamate (NO_2 Oxidation→Detected as $BaSO_4$)

concentration of sweetener \ reagent	tetrahydroxy-quinone. Na	Na rhodizonate	cresolphtalein complexone
cyclamate 1 % (5 μl)	white spot in pink back	white spot in red back	white spot in purple back
cyclamate 0.5 % (5 μl)	do. +	do. +	do. ±～+
cyclamate 0.25% (5 μl)	〃 +	〃 ±	〃 ±
cyclamate 0.1 % (5 μl)	〃 ±	〃 ±	−
saccharin 1 % (5 μl)	−	−	−
dulcin 1 % (5 μl)	−	−	−

* 東京都立衛生研究所　医薬品部

1—1　医薬品および食品よりの甘味料の抽出とペーパークロマトグラフィー

サイクラミン酸，サッカリンおよびズルチンの抽出には試料の水溶液（必要に応じて透析等の前処理を行なったもの）よりHCl性，NaCl飽和ののち酢酸エチルで抽出し，酢酸エチルを留去し（減圧下の方が試料の着色等がみとめられず好都合である），残留物をエタノールに溶かしてクロマトグラフィーの試験溶液とする。前記の反応をサイクラミン酸のスポットテストとして行なう場合はまずSO_4^{--}の不在を確かめなければならないが，その他試料中に亜硝酸酸化によりSO_4^{--}を生成する物質（例えば含Sアミノ酸等）も存在する場合があるので，スポットテストが陽性となったときはさらにペーパークロマトグラフィー等による確認を行なわなければならない。

ペーパークロマトグラフィーにおける展開溶媒[1]はブタノール・アンモニアまたはピリジン・イソプロパノール・水等を用いる。発色には後記諸法を適用する。（薄層クロマトグラムの発色試薬として1.の反応を行なうときはバインダー中にSO_4^{--}を含まない場合でなければならない）

1—2　亜硝酸酸化ののちテトラヒドロキシキノン2ナトリウムにより発色する法

（試薬）　①　1％$NaNO_2$溶液，②　1％HCl，③　0.5％$BaCl_2$溶液，④　テトラヒドロキシキノン（THQ）溶液：THQ・2Na・KCl試薬（食添公定書）を用時水に飽和して用いる。

（操作）　沪紙に①および②を噴霧し，ドライヤーでHClを完全にとばしたのち，③を少量噴霧し，ふたたび乾燥して$BaSO_4$を定着させ④THQ試薬を噴霧する。サイクラミン酸の存在により，桃赤色の地に白いスポットが観察される。

（検出限度）　0.25％サイクラミン酸溶液1滴（約5μl）で反応陽性を示す。

（注）　Ba^{++}が存在しても赤色を呈しないときはHClの残存が疑われるので，ふたたびよく乾燥してから④を噴霧する。

（阻害物質）　他の甘味料による類似反応は認められないが，前記のようにL-システィン等の含Sアミノ酸による類似反応が認められる。

1—3　ロジゾン酸2ナトリウムによる発色法

（試薬）　①，②，③は前記1—2の場合に準ずる。⑤0.5％ロジゾン酸2ナトリウム溶液（新製）

（操作）　①$NaNO_2$溶液，②HClを沪紙上に噴霧し完全にHClおよびNO_2の残存が認められなくなるまで乾燥し，③$BaCl_2$溶液を噴霧し，さらに乾燥して$BaSO_4$を定着させてから⑤ロジゾン酸溶液を噴霧し，しばらく放置して観察する。サイクラミン酸の存在で赤色の地に白いスポットがみとめられる。

（検出限度）　通例0.25％溶液1滴（5μl）で反応陽性を示す。

（注—1）　総体が赤色となり，標準スポット（0.5％サイクラミン酸溶液による）が白く抜けないときは，③$BaCl_2$溶液の過剰によることが多いので，この際は②HClをふたたび注意してスプレーする。またロジゾン酸が過剰なときも全体が褐色をおびてスポットが不明瞭となるが，このときも同様HClのスプレーを行なえばよい。

（注—2）　全体に呈色しないときはHClまたはNO_2^-の過剰によるものであるから，乾燥を行なうか，またはHCl噴霧ののちに乾燥し，つぎに⑤ロジゾン酸Na溶液を噴霧して観察する。

1—4　ロジゾン酸法における発色操作(試薬の順序)についての検討

上記1—3における試薬噴霧の順序を初め⑤ロジゾン酸Naをスプレーし，次に③$BaCl_2$により発色させ，乾燥後①$NaNO_2$溶液，ついで②HClを噴霧して10～20分間放置する。この場合は初めからSO_4^{--}が存在しているものとの区別がつきやすく，かつ試薬の過剰を避けるのに好都合である。

1—5　クレゾールフタレインコンプレクソン試薬（PC）による呈色法

（試薬）　⑥　0.5％クレゾールフタレインコンプレクソン・メタノール溶液，⑦　10％NH_4OH（または5％$Na_2B_4O_7$溶液）

（操作）　上記1—2，または1—3に準じて$BaSO_4$を沪紙上に生成，定着させてから，⑥PC溶液をスプレーし，ついで⑦アルカリ液を噴霧する。ただしこの際$BaCl_2$溶液は0.1または0.2％程度の稀薄なものを用いて，きわめて軽く噴霧することが必要である。SO_4^{--}の存在で赤紫色の地に白くスポットが抜ける。

（検出限度）　1～0.5％サイクラミン酸溶液1滴で反応陽性を示す。0.25％以下では顕著に認めがたい場合が多く，一般にTHQまたはロジゾン酸試薬（1—2，1—4）に比し発色（境界）が不鮮明である。

1—6　その他の呈色反応

サイクラミン酸の検出法としては他にpH指示薬による法（2—2），蛍光試薬を用いるUVランプによる検出法（2—1）等がペーパークロマトグラフならびにポリアミド薄層の発色法として用いられる。

2. サッカリンおよびズルチン（サイクラミン酸）の呈色反応

2—1 蛍光試薬(α ナフチラミンまたはオーラミン)によるサッカリン，ズルチン，サイクラミン酸の検出法

サッカリンは薬学会協定法に示されるように，UVランプ（2540 Å）の照射により蛍光がみとめられるが，α ナフチラミンまたはオーラミン等の蛍光剤を噴霧することにより，より明瞭となる。0.5～1％ α ナフチラミン酢酸溶液[2]をスプレーしてUV照射下に観察すれば Table. 2 のような吸収を示し，また0.5％ α ナフチラミンエタノール溶液を噴霧したのち0.1％酢酸酸性酢酸銅溶液を噴霧し，70～80° に加熱して乾燥すれば紫褐色の斑点が認められる（可視光下で)。またUV照射下では Table. 2 に示すようにズルチンおよびサイクラミン酸も検出可能であるが，サッカリン程顕著ではなかった。そこでわれわれは塩基性蛍光剤としてオーラミン溶液を用いて実験を行なった。

0.05％オーラミン溶液をスプレーした場合はズルチンはUV（短波）で強い吸収を示し，サッカリンは同（短波）で白く発光する。サイクラミン酸は長波の吸収の方がみとめやすかった（Table. 2)。いずれも α ナフチラミンよりスポットは著明であり，本法を用いればペーパー上のみならずポリアミド薄層(3)上の各甘味料を検出することができる。

Table. 2 Detection of Sweeteners by the Fluorescence Test

reagent / sweetener sol.	0.5％α naphtylamine ethanol sol. +$Cu(AC)_2$			1％α naphtylamine acetic acid sol.		0.05％ auramine	
light	UV short (2540Å)	UV long (3600 Å)	visible	UV (s)	UV (*l*)	UV (s)	UV (*l*)
saccharin 2～1％ (5 μl)	absorb (s) (brown) ○	absorb (brown)	(purple) (brown) ○	absorb (s) (purple) (brown) ○	absorb (w) (purbple) (brown)	fluor. ○ (white)	absorb (w) (dark)
saccharin 1～0.5％(5 μl)	do. ○ (blue brown)	do. (blue brown)	do. ○	do. ○ (dark brown)	do. (dark)	do. ○	do.
cyclamate 2～1％ (5 μl)	−	±	−	absorb (w) (gray)	absorb. ○ (gray)	absorb. (dark)	absorb ○ (dark)
dulcin 1～0.5％(5 μl)	±	±	−	absorb (w)	±	absorb (s) (dark) ○	absorb (w)

(s)…strong　　(w)…weak　　○…remarkable

2—2 pH 指示薬によるサッカリン，サイクラミン酸の検出法。P—ジメチルアミノベンズアルデヒドによるズルチンの検出法。その他の方法

ペーパークロマトグラフ上またはポリアミド薄層上のサッカリンおよびサイクラミン酸の発色はそれぞれ1％以上の濃度のスポットでは pH 指示薬[3]（MR，BCG混合指示薬）によっても検出できた。またズルチンの検出には薬学会協定法によるP—ジメチルアミノベンズアルデヒドによる呈色が鋭敏度高く[1]最も一般的であると思われる。サッカリンの検出には0.2～0.5％ $AgNO_3$ 溶液噴霧ののち10％ $K_2Cr_2O_7$ 溶液を噴霧することにより，赤褐色の地に白いスポットとして認められる（検出限度0.5％サッカリン溶液1滴)。

3. 甘味料の薄層クロマトグラフィー

TLC法としては竹下らのポリアミド薄層を用い，ベンゼン・酢酸エチル・ギ酸混合溶媒による展開[3]により満足な分離が行なわれた（発色はUV照射ならびにMR，BCG混合指示薬による)。市販ポリアミド薄層（蛍光剤含有のもの）も使用に便利であった（サッカリンおよびズルチンの検出)。上記混合指示薬による場合，放置するかアンモニアにさらして地色を淡緑色程度にすると識別しやすかった。なお前記のようにオーラミン溶液を噴霧したのちUV下で観察すれば三者の位置を確認することができた。

シリカゲル薄層では Korbelak[2] らの示す展開溶媒は長時間を要する等ポリアミド薄層に比し不利があった。

以上を要約すると甘味料の検出法としてはペーパークロマトグラフィーまたはポリアミド薄層によるのが便利であり，ペーパークロマトグラフィーによるときのサイクラミン酸の発色（またはスポットテストとして）は NO_2 酸化ののち $BaSO_4$ としてテトラヒドロキシキノンまたはロジゾン酸による方法が，この報告に記載した諸点に留意すればきわめて有効である事，

その他の甘味料の発色剤—ペーパーならびにポリアミド薄層上の三者の確認法—としては 2—1 にあげた蛍光剤による法，とくにオーラミン溶液の噴霧が有効であることを確かめた。

本実験は当所医薬品部　石田温子技師，宮武ノリエ技師，渋谷保健所　嶋田由美技師の協力によるものである。

参考文献

1) 西垣進，西島基弘，田村行弘，松本茂；都立衛生研究所研究年報21(1969　公衆衛生大会発表)
2) T. Korbelak, J. N. Bartlett ; J. Chromatog., 41, 124 (1969)
3) 竹下隆三（第9回日本薬学会　東北支部大会発表）（衛生化学投稿中）

有害性元素に関する衛生化学的研究(第1報)
紫外部吸収によるセレンの微量定量法

戸谷哲也* 原田裕文*
観照雄* 鈴木助治*

HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON HARMFUL ELEMENTS. 1.

MICRODETERMINATION OF SELENIUM BY ULTRAVIOLET ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY.

Tetsuya TOTANI, Hirofumi HARADA
Teruo KAN and Sukeji SUZUKI

(Department of Cosmetic & Medical Goods, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

(Received July 20, 1970)

Summary

It has been known that toxicity of selenium is relatively higher than that of arsenic. On the other hand, it is not a easy task to determine selenium in sample materials because of the influence of interfering substances. For the purpose of achieving a method for the determination of a small amounts of selenium, a modified spectrophotometric method based on the use of O-phenylenediamine as reagent was examined. In this paper, the practical modified method and its applicability to the analysis of selenium contained in cosmetics, drugs and foods are described.

This method is summarized as follows :

1) The sample materials were digested with nitric and sulfuric acid, while the selenous acid loss by volantilization was prevented by absorbing into 15% aqueous ammonia. After the pH of digested solution had been adjusted to 2.5, the selenous acid obtained was reduced to the elementary selenium by using ascorbic acid as reducing agent. The elementary selenium was extracted with carbon disulfide, followed by the evaporation. The residues obtained was then dissolved by aqua regia as test solution. By this operation, various interfering materials on determing selenium could be removed.

2) As for the preparation of sulfur or flowers of sulfur, the samples were dissolved into carbon disulfide, and the selenium contained was directly extracted with aqua regia without using Marvin's apparatus.

3) For the quantitative measurment of selenium, o-phenylenediamine method has

* 東京都立衛生研究所 化粧療品部

been modified. The time required for the method was shorten to 10 minutes by heating at 60° in water bath, while original method required 2 hours at room temperature.

4) Practically, the method established had worked well, when it was applied on cosmetics, drugs or foods.

緒　　言

セレンはイオウと同族の35番目の非金属元素であり，半導体として整流素子，電子写真用感光材料，ガラスの着色剤，ゴムの加硫剤，殺菌剤および融媒等に多くの用途を有し，その需要も年々増加の傾向にある。しかし，その毒性はヒ素化合物よりも数倍強く，古く米国においてセレンを高濃度に含む牧草を飼料とした家畜の疾病として知られている。Beath[1),2)]らによってセレンを含有する土壌中からセレンを吸収する植物の分布が明らかにされ，Franke[3)]とRobinson[4)]はこれらの穀草を食餌として与える動物実験で毒性の発現を認めている。さらに，Smith, Franke および Westfall[5)]はヒトにおいても，セレンを含有する穀類を摂取することによって，セレン中毒症になる可能性を認めている。最近 West[6)]はタバコ巻紙中のセレンの有害性について述べているが，米国製の巻紙中には，セレンとして10ppm以上，タバコの葉そのものには2—4ppm，2種類のソ連製のタバコでは巻紙に6.8ppm，6.4ppmで，タバコの葉には0.8ppm，1.4ppm含有し，これがタバコの有害性の要因になっていると報告している。したがって，著者らはセレン含有量の衛生化学的意義が大きいものと考え，化粧品原料をはじめ医薬品，食品中のセレン量を測定することを目的として種々検討した。

セレンの定量法には，重量法，容量法，ポーラログラフ法，原子吸光法などがあるが感度が低く，微量セレンの定量には適用しがたく，著者らも交流ポーラログラフ法により検討したところ，定量に用いられるような矩形波を得ることができず，また，原子吸光法でも検出感度が低く，著者らの目的にそわなかった。セレンの比色定量法としては Cheng[7)]らが確立した3,3'—ジアミノベンチジンを用いるものが最も一般的である。セレン(Ⅳ)が本試薬と反応しピアセレノールを生成し，これをトルエンで抽出する方法で，わが国のＪＩＳ[8)]にも採用されている。鈴木[9)]らは本法によって尿や野菜などの天然食品中のセレンを測定している。また，村上[10),11)]らは1,8—ジアミノナフタレンによって3,3'—ジアミノベンチジンと同程度の精度で定量できることを明らかにし，硫酸中のセレンを定量している。著者らはセレン(Ⅳ)にヒドラジノベンゼンスルホン酸を用いてジアゾニウム塩を生成させ，α—ナフチルアミンとカップリングさせて発色させるKirk brightの方法[12)]を追試したところ，感度はよいが放置時間とともにブランクの呈色も強く，再現性にとぼしいことがわかり定量の目的にそわなかった。そこで3,3'—ジアミノベンチジン法を検討したところ，過塩素酸，シュウ酸，クエン酸アンモニウム塩などの陰イオンの共存によって発色が抑制され，また，多量の硫酸の存在でも著しい感度の低下をまねき食品などの実際試料に適用するにいたらなかった。次に比較的陰イオンの影響をうけにくい0—フェニレンジアミンによる定量法[13)]を検討した。その結果，単体に還元したセレンを二硫化炭素を用いて定量的に分離，抽出し，o-フェニレンジアミン法におけるピアセレノール生成反応を促進させ，比較的短時間にセレンを測定できることを見出した。実際試料として局方の精製イオウ中からかなり多量のセレンが検出され，若干の知見が得られたので報告する。

実　験　材　料

1. 試　薬

0—フェニレンジアミン溶液：0—フェニレンジアミン・塩酸塩，0.2%水溶液，冷所に2—3日間保存できる。

セレン標準溶液：SeO_2 1.4053 g を水にとかして1000m*l* とする。(1 m*l* 中 Se 1.00mg 含有) 1 m*l* 中 Se 1 μg は用時調整する。

ＥＤＴＡ溶液：0.1M水溶液

尿素溶液：0.4M水溶液

王水：塩酸3容量に硝酸1容量を加える。用時調製する。

2. 装　置

分光光度計：島津製作所製自記充電分光光度計，ＳＶ—50ＡＬ型（リニアタイプ）

pH メータ：Beckman Expandomatic pH メータ

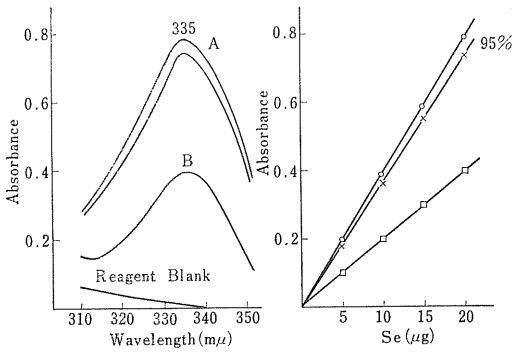
実　験　方　法

1. 0—フェニレンジアミン法の検討とその改良

1. 1 フェニレンジアミン法の検討

試料溶液を100m*l* ビーカーにとり，0.4M尿素溶液

Fig. 1 Absorption Spectra and Calibration Curves of Se by o—Phenylenediamine Method



A：20μg of Se in 5 ml of toluene
B：20μg of Se in 10ml of toluene
—○—：standing for 2 hrs. (toluene, 5 ml)
—×—：heating for 10min. at 60°（toluene, 5 ml)
—□—：standing for 2 hrs. (toluene, 10ml)

2 m*l* を加え80°以上で1分間加熱する。冷後，アンモニア水で中和し 0.1M ＥＤＴＡ溶液 2 m*l* を加えギ酸で pH を 1.5—2.5 に調整してから，全量を水で約 50m*l* とする。さらに0.2% 0—フェニレンジアミン溶液 2 m*l* を加え，室温で 2 時間放置する。分液漏斗に溶液をとり，トルエン 10m*l* を正確に加えて 30秒間振りまぜ，トルエン層を分取後 335mμ の吸光度を測定し，同様の操作による検量線から含有量を測定する。

上記操作方法によって Se 5，10，15，20μg の検量線を検討したところ，直線性のある検量線を得ることができたので 0—フェニレンジアミンによるセレンの定量法にかなり信頼度の高いことを知った。(Fig. 1)

1. 2 抽出溶媒

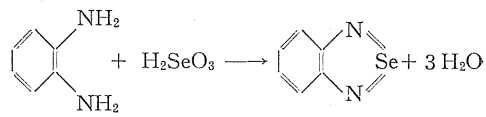
上記操作法では抽出時の溶媒にトルエンを用いているが溶媒による抽出率の差があると思われるので，四塩化炭素，クロロホルム，ベンゼン，クロロベンゼン，キシレンの各溶媒について 2 時間放置による Se 20μg の吸光度を比較したところでは特に大きな差を示す溶媒はなかったので上記のトルエン溶媒により抽出することにした。

また感度を高くする目的から トルエンの量 10m*l* を半分の 5 m*l* にかえ，Se 5，10，15，20μg について測定したところ，Fig. 1 に示す検量線を得ることができた。

1. 3 障害イオン

測定時に妨害となるイオンについて桐栄らもセレン 15μg の添加から吸光度によって比較している。Zn^{2+}, K^{+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Cd^{2+}, Ba^{2+}, As^{3+}, Sb^{3+}, NH_4^{+}, Al^{3+}, SO_4^{2-}, Cl^{-}, NO_3^{-}, PO_4^{3-} などの各イオンについては一般に測定値には影響をあたえないが，NO^{-}, I^{-}, Fe^{3+}, Sn^{4+} が障害する。そこで NO^{-} については尿素と加熱処理することで除くことができ，0—フェニレンジアミンの分解が起らなくなる。3 価の鉄イオンはＥＤＴＡの添加により，ピアセレノール生成への障害が減少される。

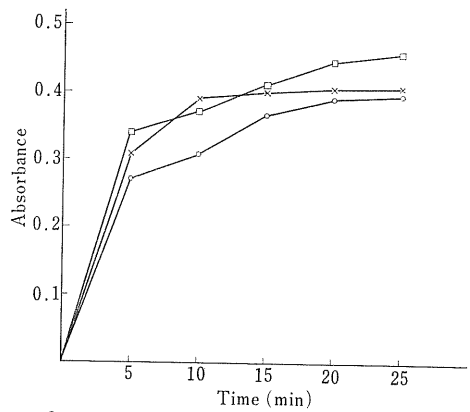
ピアセレノールの生成反応を次に示す。



1. 4 ピアセレノール生成条件の検討

一般にピアセレノール生成は 0—フェニレンジアミンとセレン(Ⅳ)との結合と解離が同時に起るため室温で 2 時間も長い時間放置しておく必要があるとされている。そこで生成反応を促進させる目的で加熱時間を 5，10，15，20，30分間での温度 50°，60°，80° について，吸光度を比較した。

Fig. 2 Effect of Time of Heating and Temperature on Maximum Formation of Piaselenol

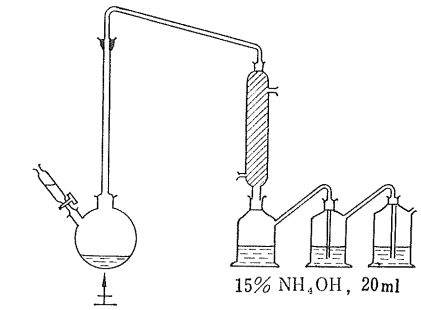


Se, 10μg; Wavelength, 335mμ -○-50°; -×-60°; -□-80°

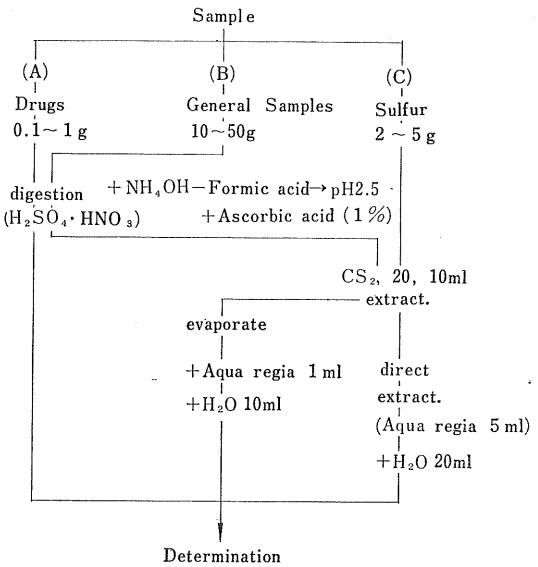
Fig. 2 に示すように加熱処理すると室温放置より吸光度が増し，0—フェニレンジアミンとセレンの反応が促進されている。80°では時間が長くなるに従って，吸光度も増加するが最大吸収値のシフトも平行して増大する。そこで 2 時間放置した吸光度と比較的近い値を示し，加熱時間による変化の少ない 60°，10 分間で操作することにした。

Se 5，10，15，20μg についてトルエン層 5 m*l* での 60° 10分間加熱と室温で 2 時間放置する方法について

Chart. 1 Preparation of Test Solution for Selenium



cf, Sulfur
Marvin's apparatus.



同時に比較したところ，両者の検量線（Fig. 1）の平均値において60°，10分間加熱処理した条件では2時間放置した場合に比して5％の減少として得られた。

そこで今回は2時間放置を60°，10分間加熱する処理で定量することにした。

2. 0—フェニレンジアミン改良法による試料中のセレン定量への適用

試料の乾式灰化はセレンの揮散性のため実施することができず，もっぱら，湿式灰化により処理した。鈴木[9]らはケールダールフラスコの上端を還流冷却させて，亜セレン酸の揮散を防いでいるが多量の試料を処理することができない。著者らは食品などの試料については10g以上の処理を意図したため，Chart. 1のような装置を作り，揮散してくる亜セレン酸を捕捉すると同時に液を濃縮することによって，試料の分解を促進させた。

2. 1 試料の灰化処理

1g以下の試料：フケトリシャンプーのように1—2.5％の二硫化セレンを含む製剤は試料採取量が0.1gでも定量可能なるため，Chart. 1の(A)のようにケールダールフラスコによって硫硝酸湿式灰化をおこない，直接，0—フェニレンジアミン改良法により定量した。

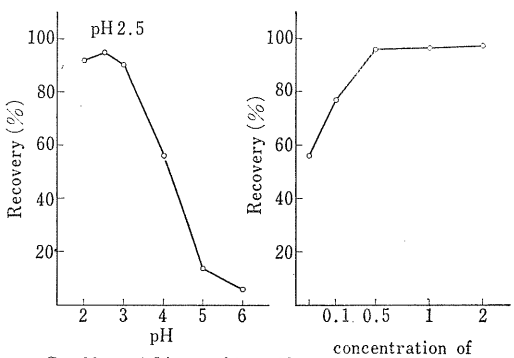
10g以上の試料：含有するセレンが微量である場合には多量の試料を処理する必要があり，また，硫硝酸灰化の際に亜セレン酸を防ぐ目的でChat. 1に示す装置のように，アンモニア水（20, 20, 20ml）に通気して捕集しアスピレーターに連結しながらおこなった。

2. 2 二硫化炭素によるセレンの抽出法

10g以上の試料の試験溶液の調整にあたっては液量が多くなり濃縮に時間がかかり，障害イオンとの分離操作が必要になる。そこで硫硝酸灰化したのち，アスコルビン酸で還元し単体セレンとし，これを二硫化炭素で抽出することを試みた。

アスコルビン酸還元におけるpHとその濃度の検討：Se 20μgをとり，液のpHを変化させて，1％アスコルビン酸含有量の条件で5分間放置してから，二硫化炭素で抽出したときの回収率を求めたところ，Fig. 3に示すようにpH3.0以下であればほとんど定

Fig. 3 Effect of Amount of Ascorbic acid and pH on Recovery of Se by CS_2-Extraction Method



Se, 20μg; 1% ascorbic acid; reduction time, 5min.

Se, 20μg; pH 2.5

Table. 1 Effect of Diverse Ions by CS_2-Extraction Method

Ions	Amounts added(mg)	Absorbance	Se found (μg)	Recovery (%)	Error (μg)
Fe	10	0.795	20.5	102.5	+ 2.5
	10	0.788	20.3	101.3	+ 1.3
Cu	10	0.750	19.4	97.0	− 3.0
	10	0.780	20.0	100.0	0
Mo	10	0.780	20.0	100.0	0
	10	0.725	18.3	91.3	− 8.7
W	10	0.261	6.7	33.3	−66.7
	10	0.157	4.0	20.0	−80.0
Te	1	0.598	15.5	77.5	−22.5
	1	0.555	14.3	71.7	−28.3
HNO_3	10	0.695	17.8	89.2	−10.8
	10	0.688	17.7	88.8	−11.2

Se added. 20μg

量的に反応することを認めた。また，pH2.5においてアスコルビン酸量を変化させてみたところ，0.5%以上の濃度ならば5分以内に同じく定量的に反応することがわかった。

アスコルビン酸還元—二硫化炭素抽出法における障害イオンの検討：Se 20μgに対し各イオンを加えて検討したところ，Table. 1 に示すように鉄，銅，モリブデンの500倍量の添加で誤差平均が5%以下であり，ほとんど影響しないと考えられる。しかし，タングステン，テルルは著しいマイナスの影響が認められた。

試験溶液の調整にあたって，Chart. 1 の(B)のように一般の試料は灰化したのち，分解液を亜セレン酸の捕捉に用いたアンモニア水およびギ酸で中和して，pH2.5に調整しアスコルビン酸を1%濃度になるように加えて5分間放置する。次に，還元して得た単体セレンを二硫化炭素 20ml，10mlで抽出し，二硫化炭素層を分取し，温風で蒸発乾固する。これに王水1mlを加えて溶し，加水して試験溶液とした。

特にイオウ，湯の華等の試料についてはChart. 1 の(C)のように，二硫化炭素 30mlを直接加えて溶かし，さらに，王水 5 mlを加えて強振し水 20mlで希釈する。水層を分取して四塩化炭素 20mlで洗浄したのち，水層を試験溶液とする。

2. 3 0—フェニレンジアミン改良法によるセレンの定量法

試験溶液（Seとして 1—20μg）を100mlビーカーにとり，これに発泡がなくなるまで尿素を加え，アンモニア水で中和してから，0.1M EDTA 溶液 5 mlを加える。ギ酸でpHを1.5—2.5に調整し，加水して全量を約 50mlとする。さらに，0.2% 0—フェニレンジアミン溶液 2 mlを加え，60° 水浴上で10分間加温する。冷後，100ml分液漏斗にとり，トルエン 5 mlを正確に加えて，30秒間強振する。トルエン層を分取し，層長10mmのセルを用い，トルエンを対照にして 335mμにおける吸光度を測定する。同様に操作して作成した検量線より含有量を求める。

結果および考察

以上の方法により，フケトリシャンプー，イオウ，湯の華および食品（試料採取量0.5—10g）等をChart. 1に示す(A)，(B)，(C)の方法に従って処理し，0—フェニレンジアミン改良法により，実際試料中のセレンの測定をおこなった結果を Table. 2 に示す。

フケトリシャンプーの類については二硫化セレン（1.0—2.5%）を含有する製剤についておこなったもので表示量に対して92—96%の測定値を得た。日局の精製イオウ中のセレン含有量は0.02—3.4ppm，昇華イオウが2.8—5.8ppm，沈降イオウ1.7—12.0ppm，また，湯の華が0.23—1.1ppmであった。少数例であるが食品についておこなったところ，0.05—0.5ppmのセレンを認めた。一般に主食に5 ppm以上，牛乳や飲料水中に0.5ppm以上のセレンが含まれると人畜に有害な影響があるといわれている[14]。今回は最高0.5 ppmであった。しかし，イオウ類には5 ppm以上のものが若干認められた。

イオウ中の金属の定量に際しての前処理はChart. 1に示すようなイオウを酸素気流中で燃焼させてから捕捉するMarvinの装置が一般に用いられている。著者らの二硫化炭素抽出法によれば簡易に処理することが

Table 2 Determination of Se in Various Samples

No.	Sample		Amount of Sample (g)	Test Solution	Absorbance	Se found (ppm)
1	Shampoo	a	0.1	A	0.415	5250.0
2	Shampoo	b	0.1	A	0.505	12700.0
3	J. P. Sulfur Purificatum	a	2.5	C	0.321	3.4
4	J. P. Sulfur Purificatum	b	5.0	C	0.010	0.02
5	J. P. Sulfur Purificatum	c	5.0	C	0.220	2.3
6	J. P. Sulfur Sublimatum	a	2.5	C	0.539	5.8
7	J. P. Sulfur Sublimatum	b	5.0	C	0.477	5.1
8	J. P. Sulfur Sublimatum	c	5.0	C	0.268	2.8
9	J. P. Sulfur Praecipitatum	a	5.0	C	0.215	2.3
10	J. P. Sulfur Praecipitatum	b	2.5	C	1.135	12.0
11	J. P. Sulfur Praecipitatum	c	5.0	C	0.300	3.2
12	J. P. Sulfur Praecipitatum	d	5.0	C	0.160	1.7
13	Flowers of Sulfur, Fukushima		5.0	C	0.140	0.7
14	Flowers of Sulfur, Kusatsu	a	5.0	C	0.178	0.9
15	Flowers of Sulfur, Kusatsu	b	5.0	B	0.220	1.1
16	Hair		10.0	B	0.090	0.23
17	Oyster		10.0	B	0.020	0.05
18	Shirasu		10.0	B	0.130	0.34
19	Shrimp (Koebi)		10.0	B	0.185	0.48
20	Dry Milk		10.0	B	0.097	0.25
21	Rice		10.0	B	0.110	0.29

できた。しかし，二硫化炭素を直接王水処理した場合，二硫化炭素を蒸留，あるいは過マンガン酸カリウム処理で精製しても空試験の吸光度が0.1前後に上昇する。これは王水によって，二硫化炭素が分解し，その分解産物が0—フェニレンジアミンと反応することによると考えられるが原因を明らかにするに至らなかった。

結　　論

セレンはヒ素よりも数倍強い毒性を有するので，衛生化学的意義が大きいものと考え，主として化粧品原料をはじめ，医薬品，食品中のセレン含有量を測定した。

実際試料の前処理は硫硝酸による湿式灰化ののち，液性を pH2.5 に調整し，アスコルビン酸還元により単体セレンとする。これを二硫化炭素を用いて抽出することによって，多量の分解液中の障害物質から分離，濃縮ができた。

特にイオウ，湯の華のような試料では直接二硫化炭素に溶かし，王水処理することによって特殊な装置を必要としないでセレンを抽出することが可能であった。

定量法としては0—フェニレンジアミンを用いる方法について検討し，加熱処理（60°，10分間）することによって，定量的にピアセレノールが生成することを見い出し，本法の欠点である測定時間を短縮することができた。

実際試料中のセレン含有量を測定したところ，イオウ中に0.02—12.0ppm，湯の華では0.23—1.1ppm であり，5ppm以上のセレンが認められたが食品中には新鮮重量当りにして 5ppm 以上のものはなく，すべて0.5ppm 以下であった。

本研究は日本薬学会第89年会（1964）名古屋において発表した。

参 考 文 献

1) O. A. Beath, J. H. Draize, H. F. Eppson, C. S. Gilbert, D. C. McCreary : J. Am. pharm. Assoc., 23, 94 (1934)
2) O. A. Beath, J. H. Draize, C. S. Gilbert : Wyoming Agric. Exper. sta. Bull., 200, 1 (1934)
3) K. W. Franke : J. Nutrition, 8, 597 (1934)
4) W. O. Robinson : J. Ass. Off. Agr. Chem., 16, 423 (1933)
5) Smith, Franke, Westfall : Pub. Health Rep.,

51, 1496 (1936)
6) W. West : Chem. & Eng. Newes, 29, 12, (1967)
7) K. L. Cheng : Anal. Chem., 28, 1738 (1956)
8) ＪＩＳ1306—1966 (昭41)
9) 鈴木幸夫，西山敬太郎，松家豊，桑井茂：Shikoku Acta Med., 11, 77 (1957)
10) 村上徹朗，石井栄善：工業化学雑誌，66, 110 (1963)
11) 村上徹朗：Ibid, 68, 1864 (1965)
12) G. F. Kirkbright, John H. YOE : Anal. Chem., 35, 808 (1963)
13) H. Arioshi, K. Toei, M. Kiniwa : Talanta, 5, 122 (1960)
14) S. F. Trelease, O. A. Beath : Selenium, Published by the authors, New York, 1949.

多量の Fe (III) 共存下における鉛の定量法

戸谷哲也* 原田裕文*
観照雄* 鈴木助治*
山添律子*

DETERMINATION OF LEAD IN THE PRESENCE OF LARGE AMOUNTS OF IRON (III)

Tetuya TOTANI, Hirofumi HARADA
Teruo KAN, Sukeji SUZUKI
and Ritsuko YAMAZOE

Department of Cosmetic & Medical Goods, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

(Received October 8, 1970)

Summary

A simple and practical method for determining lead in samples contained large amounts of iron such as iron oxide or blood has been developed.

The interference which Fe^{3+} ion offer in the determination of lead is prevented by reducing to Fe^{2+} ion. In the present official method(dithizone method), a considerable quantity of potassium cyanide and sodium sulfite are added, furthermore, it is required to warm in order to reduce Fe^{3+} ion. In this study, it was found that Fe^{3+} ion could be immediately reduced to Fe^{2+} ion by using ascorbic acid at room temperature.

There were no significant differences of lead recovery between the ascorbic acid method and the official method in iron oxide added lead from a comparison of both methods. By the application of the ascorbic acid method to determining lead in 42 kinds of iron oxides which are on the market, the lead content was from 5 to 445ppm.

This method can be applied availably to the determination of lead in routine work and can be adapted sufficiently to atomic-absorption spectrophotometric method with dithizone-MIBK extraction for determining lead.

緒　　言

鉛の微量定量法には吸光度法[1),2)]，原子吸光法[3)] ポーラログラフ法[4)] 等があげられるが，いずれも第2鉄イオンの共存はその酸化性のため，しばしば障害されることが認められる。特に食品添加物あるいは化粧品原料としてその使用が認められている酸化鉄中の鉛を定量する場合などは，その障害が著明で試験法も第2鉄イオンの除去が主眼とされている。また血液中の鉛測定においても第2鉄イオンの障害は無視できない。たとえば吸光度法はシアンイオンで鉄イオンをいんぺいし，ジチゾンによって鉛を抽出してその吸光度を測定することにより定量するのであるが，第2鉄イオンは酸化性の強いフェリシアンイオンとなり，ジチゾンを酸化して黄色のジフェニルチオカルボジアゾンを生

* 東京都立衛生研究所　化粧療品部

成し，鉛の抽出あるいは吸光度測定を妨害する。またポーラログラフ法においても第2鉄イオンの半波電位は支持電解質INHCl・INKCl(1+1)で+0.51V附近にあり鉛の測定に大きな障害となる[5]。この第2鉄イオンの障害を除くには原理的につぎの2つの方法が知られている。第1は鉄イオンと鉛イオンとを溶媒抽出法によって分離する方法，第2は還元剤を用いて第2鉄イオンを第1鉄イオンに還元し，共存した状態で定量する方法である。溶媒による鉄イオンの分離法としては試料溶液を6N塩酸酸性としたのち，メチルイソブチルケトン（MIBK）等の有機溶媒を用いて鉄イオンのみを抽出除去する方法があり，その残液についてポーラログラフ法[6]により鉛の定量を行なっている報告等がみられるが，多量の鉄イオンが含有されている場合，これを溶媒によって完全に除去することは定量を目的とする鉛が血液などのように比較的微量であるときには非常に困難である。また松本[7]らは多量の鉄が共存する場合の鉛の定量法としてトリエタノールアミンを鉄のいんぺい剤に用い，鉛をジチゾン—MIBKで抽出後原子吸光法によって定量を行なっているが，本溶媒系での比色定量は不可能なことが認められた。化粧品原料基準[8]による酸化鉄中の鉛定量法はジチゾンによる吸光度法を採用しているが，鉄イオンの障害を除くため，シアン化カリウム溶液を多量に加え，さらに亜硫酸ナトリウム溶液を加えて加熱することによりマスキングを行なっている。この方法は多量のシアンイオンを添加して加熱することから，日常業務として多数の検体を取り扱かう試験法としては適当でないと思われる。そこで今回は種々の還元剤について検討したところ，アスコルビン酸は室温において速やかに第2鉄イオンを還元し，鉄共存下における鉛の定量法として満足すべき結果が得られたので報告する。

実　験　の　部

〔Ⅰ〕 還元剤の検討

1. 検液の調製と試薬

1) 酸化第2鉄溶液；

酸化第2鉄1.0gを40m*l*の塩酸に加熱して溶かし，水を加えて100m*l*として検液とする。この液1m*l*は約5mgの鉄（Fe^{3+}として）を含有する。

2) クエン酸ナトリウム—水酸化ナトリウム支持電解質溶液；

クエン酸ナトリウム（特級）44gおよび水酸化ナトリウム（特級）2.5gを水に溶かし，全量を300m*l*とする。

3) 還元剤

イ．塩酸ヒドロキシルアミン（特級）

ロ．亜硫酸ナトリウム（特級）

ハ．塩酸ヒドラジン（特級）

ニ．シュウ酸（特級）

ホ．酒石酸（特級）

ヘ．ボロハイドライトナトリウム（$NaBH_4$）

ト．アスコルビン酸

2. 実験方法

検液15m*l*づつをビーカーにとり，イ～トまでの7種の還元剤をそれぞれ0.5g加えてよく振りまぜたのち，この液1m*l*にクエン酸ナトリウム—水酸化ナトリウム支持電解質液5m*l*を加え−0.05～−0.4V間のポーラログラムを柳本高感度ポーラログラフ装置P8-S型を用いて測定し，第2鉄イオンによる−0.26Vの波高を求めた。また還元剤を添加した液を水浴上で5分，15分，30分間それぞれ加熱し同様にポーラログラムを測定した結果をTable.1に示した。この表において第2鉄イオンの半波電位−0.26Vの波高をmmで表わし，検出しないものは(−)で示した。

3. 実験結果

Table.1にみられるようにボロハイドライトナトリウム，シュウ酸および酒石酸では30分間加熱してもほとんど第2鉄イオンの還元はおこらず，波高に変化がみられないが，亜硫酸ナトリウムでは15分間以上の加熱で，また塩酸ヒドロキシルアミン，塩酸ヒドラジンでは5分間以上の加熱で第2鉄イオンは検出されていない。しかしこれらはいずれも加熱処理を行なうことにより還元されているのに反してアスコルビン酸は室温で速やかに還元し第2鉄イオンは検出されていないことが認められ，本定量の目的に最も適していることが明らかになったので今回はアスコルビン酸を還元剤として使用した場合の第2鉄イオン共存下における鉛定量法について検討することとした。

〔Ⅱ〕 測定条件の検討

1. 吸光度法（ジチゾンベンゼン法）

現在，化粧品原料基準あるいは食品添加物公定書等の鉛定量法はジチゾンによる吸光度法を採用しており，もっとも一般的な方法であることから，今回は主にジチゾンベンゼン法について検討した。ジチゾンを用いる鉛の定量法は一般につぎのように行なわれる。すなわち検体にクエン酸アンモニウム溶液を加えることにより金属の水酸化物の沈殿生成を抑制し，チモールブルーを指示薬として強アンモニア水を加えてpHを9とする。この液にいんぺい剤としてシアン化カリウム溶液および還元剤として亜硫酸ナトリウム溶液を

Table. 1 Effect of Various Reducing Agents on Reduction of Ferric Ion by Polarography

Reducing Agents		Iron Oxide Fe^{3+} 5 mg/ml	Heat by Water Bath			
			0 min	5 min	15min	30min
Hydroxylamine HCl	0.5 g	20ml	228	(−)	(−)	(−)
Hydrazine 2HCl	0.5 g	20ml	227	(−)	(−)	(−)
Sodium Sulfide	0.5 g	20ml	239	119	(−)	(−)
Oxalic acid	0.5 g	20ml	223	215	221	219
Tartaric acid	0.5 g	20ml	225	220	228	230
Ascorbic acid	0.5 g	20ml	(−)	(−)	(−)	(−)
Sodium Borohydride	0.5 g	20ml	236	230	231	230

Fe^{3+}, Wave Heigt (mm)

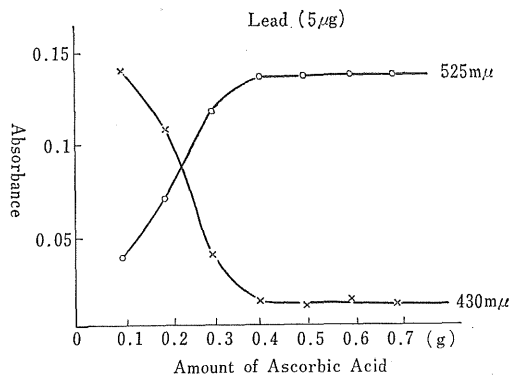
加えたのちジチゾンベンゼン液の一定量を加え強くふりまぜ，分離したのちベンゼン層をとり，ベンゼン層に残存している過剰の未反応のジチゾンをシアン化カリウム溶液とふりまぜて除去し，525mμ における吸光度を測定して鉛の含有量を求める。しかしさきに述べたように検液中に第2鉄イオンが共存する場合はジチゾンが酸化され 430mμ に最大吸収を有するジフェニルチオカルボジアジンが生成し，ベンゼン層から除去できず，ジチゾン鉛の吸光度に誤差を与える。さらに鉄イオンが多いときはジチゾン鉛の生成を障害し，検出不能となることが認められる。そこでさきに検討してよい結果の得られた条件としてアスコルビン酸 0.5 g を第2鉄イオンを含有する鉛準標液 15ml に加え常法どおりジチゾンベンゼン法によって抽出操作を行ない，ベンゼン層について 430mμ と 525mμの両者の吸光度を測定したところ，430mμ には吸収が全くみられず鉛の回収率も充分満足できることが認められアスコルビン酸の添加は鉛の定量を障害しないことを確認した。

2. アスコルビン酸添加量の検討

試験溶液中にもっとも鉄イオンの含有量が多い試料は酸化鉄であるが，この場合でも一般には 1 ml 中 5 mg 以下であることから，今回は 1 ml 中 5 mg の第2鉄イオンを含有する液を調製して検液とし，この液 15ml 中の鉄イオンを還元するのに要するアスコルビン酸の量について検討した。まず上記の検液 15ml に鉛 5 μg 添加し，これに 0.1～0.7 g のアスコルビン酸を段階的に加え，それぞれジチゾンベンゼン法によって鉛の抽出を行ない，430mμ と525mμ の吸光度を測定した結果を Fig. 1 に示した。

この図からみられるように 0.3 g のアスコルビン酸添加でほとんど第2鉄イオンは還元され，0.4 g 以上

Fig. 1 Effect of Amount of Ascorbic Acid



の添加によって完全に還元されており，430mμ の吸光度は一定となり 525mμ の吸光度は最高値を示している。このことから鉄 75mg を含有する試験溶液に対してアスコルビン酸の添加量は 0.4 g でよいことが認められた。

3. アスコルビン酸添加法による鉛の回収率

1 ml 中 5 mgの第2鉄イオン含有の液 15ml は0.4 g のアスコルビン酸の添加によってその障害は完全に除去できるが，さらに鉛の定量値に対する影響の有無を検討するため同条件の鉄イオン含有の液 15ml に鉛を 2～10μg 添加し，アスコルビン酸 0.4 g を用いるジチゾンベンゼン法によりその回収率を求めた結果を Table. 2 に示す。この表でもわかるように鉛の回収率は95～99.3%と高い値を示し，よい結果が得られた。

4. 現行試験法との比較

今回検討したアスコルビン酸を用いる定量法は満足できる方法であるが，この方法と現在公定法となっている化粧品原料基準に規定されている「ベンガラ」および「黄酸化鉄」の項の鉛試験法との比較について検

Table. 2 Recovery of Lead Added to Iron Oxide.

Iron Oxide Fe^{3+}, 5mg/ml	Lead		
	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
15ml	0	2.31	——
15ml	2.0	4.21	95.0
15ml	4.0	6.19	97.0
15ml	6.0	8.18	97.8
15ml	8.0	10.25	99.3
15ml	10.0	12.19	98.8

討した。化粧品原料基準の定量法は検液 25ml（試料 0.15g を含有）にクエン酸アンモニウム溶液を加え，さらにアンモニア水を加えて pH を 9 としたのち，10%シアン化カリウム溶液 20ml と 15%亜硫酸ナトリウム溶液 20ml を添加する。この液を水浴上で15分間加熱し，冷後ジチゾンベンゼン 10ml を加えてふりまぜベンゼン層を分取したのち，これを 1%シアン化カリウム溶液とふりまぜて過剰のジチゾンを除去し，525mμにおける吸光度を測定して別に作成した検量線から鉛の含有量を求める方法で第2鉄イオンの還元はシアンイオンと亜硫酸イオンを加えて加熱することによって行なっている。そこで酸化鉄 1 g を 30ml の塩酸に溶かし，水を加えて 100ml とした液 15ml づつをとり，それぞれ鉛を 2～8 μg 添加したものについて公定法およびアスコルビン酸添加法の二つの方法によって鉛を定量すると同時に鉛無添加の場合の430mμにおける吸光度を測定した結果を Table. 3 に示す。この表からアスコルビン酸添加法も公定法も鉛の定量値にはほとんど有意の差はみられないが，後者はまだわずかに第2鉄イオンの残存があると思われるジフェニルチオカルボジアゾンの 430mμにおける吸収が認められる。以上の実験結果から公定法が多量のシアンイオンを加えて15分間加熱することに反し，アスコルビン酸添加法は少量のシアンイオン添加でよく，かつ室温で迅速に鉛を定量できることから日常業務としての第2鉄イオン共存下における鉛定量法として優れていると考えられる。

〔Ⅲ〕 アスコルビン酸を用いる鉛定量法（改良法）

今回の実験においてアスコルビン酸を添加することにより第2鉄イオンが存在する場合でも精度よく迅速に微量の鉛を定量することができることを認めたので現行の公定法（ジチゾン法）を改良し，つぎの方法を確立し三二酸化鉄および血液中の微量鉛の定量を行なった。

1. 試 薬

40%クエン酸アンモニウム溶液；

試薬特級のクエン酸アンモニウム40g に水を加えて溶かし 100ml とする。

15%亜硫酸ナトリウム溶液；

試薬特級の亜硫酸ナトリウム15g に水を加えて溶かし 100ml とする。

10%シアン化カリウム溶液；

試薬特級のシアン化カリウム10g に水を加えて溶かし 100ml とする。

以上の試薬溶液はジチゾンクロロホルム溶液を用いて不純物として含有している鉛を除去する。

強アンモニア水；

試薬特級のものを用いる。

ジチゾンベンゼン溶液；

試薬特級ジチゾン20mg をベンゼンに溶かし 1 Liter とする。

アスコルビン酸；

日本薬局方のもの

Table. 3 Comparison of Ascorbic Acid Method and Standard Method for Determining Lead in Iron Oxide

Added (μg)	Ascorbic Acid Method		Standard Method	
	Fou nd(μg)	Recorery (%)	Found (μg)	Recovery (%)
0	1.06	——	1.02	——
2.0	3.00	97.0	2.94	95.8
4.0	4.97	97.8	4.86	96.1
6.0	6.91	97.5	6.71	94.9
8.0	8.76	96.3	8.70	96.0
430mμ E	0.031		0.231	

Standard Method : Japanese Standard of Cosmetic Ingredients, The First Edition

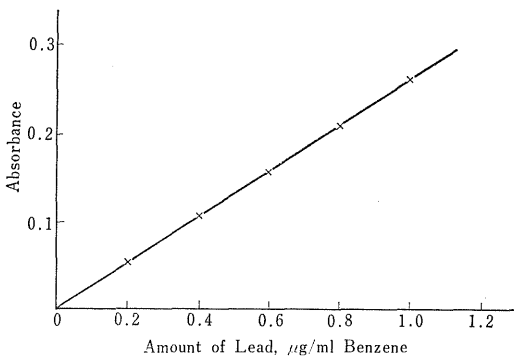
2. 検液の調製

試料が有機物を含有する場合は硫・硝酸および過塩素酸による湿式灰化法によって灰化したのち水を加えて一定量に希釈し，鉄含有量が 1 m*l* 中 5 mg 以下とする。また無機物（たとえば酸化鉄）の場合は 1 g をとり塩酸 20m*l* を加えて水浴上でほとんど蒸発乾固したのち，残留物に希塩酸 20m*l* を加え加熱して溶かし，水 40m*l* を加えて沪過する。残留物は希塩酸 5 m*l* づつで 3 回洗い洗液は沪液に合わせ水を加えて正確に 100m*l* とし試験溶液とする。

3. 定量操作

試験溶液 15m*l* を 100m*l* の分液ロートにとり，アスコルビン酸 0.4 g を加えて溶かし，40%クエン酸アンモニウム溶液 10m*l* およびチモールブルー指示薬 2 滴

Fig. 2 Calibration Curve for Lead by Ascorbic Acid Method

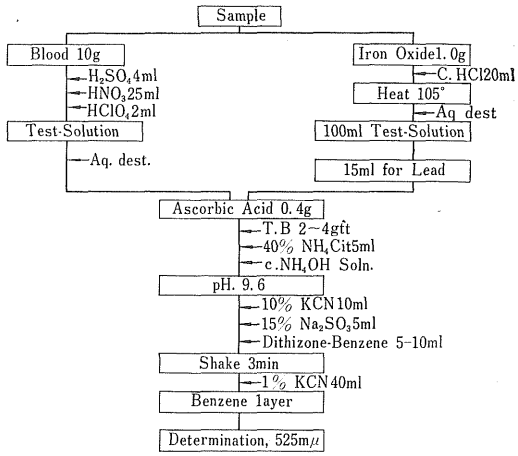


を加え，液が青色を呈するまで強アンモニア水を加える。さらに 15%亜硫酸ナトリウム溶液 5 m*l* および 10%シアン化カリウム溶液 10m*l* を加えて振りまぜたのち，ジチゾンベンゼン溶液 10m*l* を正確に加え，振盪器（250回/分）を用いて 3 分間振りまぜ分離したのち水層を除き，ベンゼン層に 1%シアン化カリウム溶液 20m*l* を加え 10 秒間強く振盪したのち静置する。分離後ベンゼン層を分取し 525mμ における吸光度を測定する。別に鉛標準液を用いて同様に操作して得た検量線（Fig. 2）から鉛の含有量を求める。

〔Ⅳ〕 改良法による市販酸化鉄中の鉛定量値

市販されている10種の黄酸化鉄および32種のベンガラ計42種について改良法によって鉛の含有量を測定した結果を Table. 4 （次頁参照）に示す。化粧品原料基準によって定められた酸化鉄中の鉛量は 40ppm 以下であるが，今回の試験でこの基準量をこえるものは 42品目中12品目あり，最高値は 445ppm であった。

Chart. 1 Quantitative Determination of Lead in Iron Oxide or Blood



〔Ⅴ〕 改良法による血液中の鉛の定量

血液 1 g 中には鉄イオンが Fe^{3+} として約 1 g 含有されており，そのため鉛を定量する場合には当然障害となって従来行なわれている定量法では正確な値を得ることは困難であったため，改良法による血液中の鉛の定量について検討した。まず回収率を求めるため保存血液を充分に振りまぜ，均一の状態としたもの10 g を硫硝酸および過塩素酸による湿式灰化法によって分解した。さらに同一血液10 g に鉛を 0.5，2，5 μg をそれぞれ添加し，同様の操作で分解し，各々の分解液に水 20m*l* を加えたのち改良法によって鉛の回収率を求めた結果を Table. 5 に示した。ただしこの場合はジチゾンベンゼン溶液は 5 m*l* を用いて行なった。また比較する意味で同一試料に希硫酸を添加し乾式灰化法により450° で約 7 時間灰化し，これに希塩酸 10m*l* を加え水浴上で乾固させたものに 0.4% のアスコルビン酸を含有する 1 N塩化カリウム−0.2N 塩酸溶液 5 m*l* を加えて溶かした液について常法に従いポーラログラフ法により鉛を定量し，その値を Table. 5 に示した。ここにみられるように改良法もポーラログラフ法も大きな差はみられず，いずれもほぼ 100% 近い回収率を示しており，本改良法は血液中の鉛定量法としても充分活用できることが認められた。

要　　結

鉛の定量法には吸光度法，原子吸光法，ポーラログラフ法などがあるが，いずれの場合も第 2 鉄イオンの共存は鉛の定量値に誤差を与えるのみでなく，ときには定量を不能とすることがある。そこで種々の還元剤について検討した結果，アスコルビン酸がもっとも優

Table. 4 Determination of Lead in Iron Oxide on the Market

No.	Samples or Maker Name	Color	Lead (ppm)	No.	Samples or Maker Name	Color	Lead (ppm)
1	MA—TK	O	445*	22	6—NB	BW	23
2	MA—Y—TK	Y・BW	10	23	0—TS	BW	22
3	NT—Y	Y	92*	24	5—TS	BW	23
4	MAL—TK	Y	12	25	2—TS	BW	15
5	YP—TS	Y	13	26	BS—BY	BW	82*
6	MA-YO-TK	Y	23	27	61—BY	Y・BW	40
7	IO—Y—BY	Y	155*	28	14—BY	R・BW	106*
8	TL—TP	Y	14	29	18—BY	V・BW	45*
9	TL—4—TP	Y	5	30	N—BY	BW	45*
10	TY—NT	Y	39	31	MA—1—TK	V・BW	20
11	OR—NT	Y・BW	27	32	MA—7—TK	V・BW	7
12	R—2—NT	R・BW	45*	33	11—TD	R・BW	21
13	IO—TS	R・BW	28	34	12—TD	R・BW	16
14	6—TS	R・BW	11	35	13—TD	R・BW	25
15	4—TS	R・BW	14	36	14—TD	R・BW	105*
16	2—TS	R・BW	93*	37	17—TD	V・BW	34
17	3—TS	R・BW	20	38	19—TD	BK・BW	25
18	1—NB	R・BW	186*	39	32—TD	R・BW	38
19	3—NB	R・BW	5	40	43—TD	R・BW	33
20	2—NB	V・BW	22	41	50—TD	R・BW	43*
21	4—NB	BW	21	42	11—FK	R・BW	14

O : Orange, Y : Yellow, BW : Brown, R : Red, V : Violet, BK : Black, * : Lead contents over standard limits(40ppm) of iron oxide.

Table. 5 Comparison of Dithizone Benzene Method and Polarographic Method Using Ascorbic Acid for Determing Lead in Blood

Blood (g)	Added Lead (μg)	Dithizone Benzene Method		Polarographic Method	
		Found (μg)	Recovery (%)	Found (μg)	Recovery (%)
10		1.10		1.06	
10	1.0	2.04	93.5	2.12	106.0
10	5.0	6.10	100.0	6.28	104.3
10	10.0	11.00	98.6	10.9	98.7

れていることを見い出し，75mg の第2鉄イオン含有の試料溶液に 0.4g のアスコルビン酸添加によって室温で迅速にその障害を除去できることが認められた。そこで従来のジチゾン法を改良し，アスコルビン酸を用いる方法を確立し，これによって現行の多量のシアンイオンを加えて加熱する時間および危険性は除かれ，日常業務として行なう鉄イオン共存下における鉛試験法として優れていると考えられる。

参 考 文 献

1) E. B. Sandall ; Colorimetric Determination of Traces of Metals 3rd Ed. (1959)
2) 日本薬学会協定衛生試験法 p. 297 (1965)
3) 松本勲，岡本正男，中村烈 ; 分析化学 17, 997 (1968)
4) 品川睦明 ; ポーラログラフ分析法 p. 275 共立全書 (1965)
5) 石橋雅義，藤永太一郎 ; ポーラログラフ分析法

p. 211，丸善株式会社（1956）
6） 田島信雄，黒部森可；分析化学 9 801（1960）
7） 松本勲，高橋稔雄，中村烈；分析化学 19 771（1970）
8） 化粧品原料基準（厚生省告示第322号） p. 401 薬事日報社（1968）

月経処理用タンポン基準註解

西　田　茂　一*

THE EXPLANATORY NOTE OF STANDARD OF MENSTRUAL TAMPON

Shigekazu NISHIDA

Department of Cosmetic & Medical Goods, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

(Received October 8, 1970)

This article is expounded the content of Standard of Menstrual tampon which was informed by the notice No. 303 of the Japanese Ministry of Health and Welfare in Aug. 10. 1970.

「月経処理用タンポン基準」は，薬事法第42条第2項の規定に基づいて，昭和45年8月10日付厚生省告示第303号で，告示された。

本基準の原案は，国立衛生試験所担当官ならびに筆者らが作製したものであるが，中でもタール色素ならびにけい光増白剤等は，粘膜との接触，経皮吸収などによって発ガン性，催奇形等の障害を誘発するおそれも多く，その衛生化学的意義は大きいと考えられる。そこで今回これらの事項を含めた基準各項設定の要旨ならびに，試験の内容を御承知頂くため本稿を起した。

以下，基準本文（傍線部分）を追いながら解説する。

Ⅰ　定　義

月経処理用タンポンとは，膣内に挿入して経血を吸収処理することを目的とするものをいう。(註1)

(註1)　月経処理用タンポン（以下タンポンと略称する）は，薬事法第2条第4項に規定する医療用具である。したがって医薬部外品であるパッド，ナプキン，テックスと呼ばれる生理処理用品[6]とは区別して取扱われている。

タンポンは，膣内の経血を積極的に吸収して，これを処理するものである。辞典によれば，tamponは止血栓であると記されているが，この場合は，吸収能をもった吸収体と解すべきであろう。

Ⅱ　構　成

本品は，吸収体とそれに結合するとり出し用コードからなる。(註2)

(註2)　タンポンを挿入したまま忘れてしまい，膣炎を起した例があった。挿入後一定時間経過したならば，必ず取出さなければならないことが原則であるから，とり出し用コードのような，とり出し部材の結合が義務づけられている。

Ⅲ　月経処理用タンポンの品質及び試験法

(1)　本品は，清浄で，刺激その他の有害作用がなく，鋭利な角や突起物等による傷害作用がない。(註3)

(註3)　繊維類を強圧縮すると，木材のような，硬度をもつものもできる。したがって，挿入具や吸収体に，粘膜を傷つけるような，鋭い角や突起物があってはならない。

(2)　本品は，白色で，においはほとんどない。ただし，とり出し用コードについてはこの限りでない。(註4)

(註4)　本品が清潔であることの目安として，白色であることが規定されている。ただし，とり出し用コードについていは，使用時の享柄をも考慮して，着色したものを用いてもよい。

(3)　本品は異物を含まない[4][5]。(註5)

(註5)　異物とは，主として製造管理，または，製造環境の不良のため，付着，混入したものをいい，例えば金属片，糞，長い糸くず，わらくず，砂，人毛，

* 東京都立衛生研究所化粧療品部

獣毛，昆虫，油の汚点，その他明らかに製造上の不注意や，環境の不良により付着したと思われるものの総称である。

タンポンは，その用法から見て，特に粘膜を傷つけるような異物の混入があってはならない。製造過程で，金属片やガラス片，あるいはその他の固い突起物が混入した場合は，ただちに事故につながるおそれがあろう。このような観点から，異物の検査は，特に厳重に行なうべきである。

試料を包装からとり出し，外観を目視により観察し，ついで試料をもみほごして拡げ，内部をしらべる。

(4) とり出し用コードの長さは80mm以上でなければならない。(註6)

(註6) 「Ⅱ構成」において，とり出し用コードの結合が義務づけられ，本項ではその長さを規制し，危険防止策とされた。

市販品の，コードの長さは，おおむね 85～130mm である。

(5) 本品には，故材を用いてはならない。(註7)

(註7) 故綿，故紙，その他の故材を使用することは，その製造所の環境不良を招いたり，異物混入のおそれがあるので禁じている。

(6) 本品について，次の試験を行なうとき，これに適合する。

ア 色 素[4)5)6)] (註8)

本品を10倍量（重量）の新たに煮沸し，冷却した水に浸し，かき混ぜたのち，ろ過し，ろ液 10ml を内径15mmの試験管に入れ，上方より観察するとき，ほとんど呈色しない。(註9)

(註8) 使用材料に，上りを白く見せるための青味付けを禁止することと，とり出し用コードに付けられた染料の溶出をチェックするため設けられた。

(註9) 浸出時間の規定がないが，5分間以上必要と思われる。

「ほとんど呈色しない。」とは，「イ 酸及びアルカリ」の試験における各指示薬の変色点の判定に，影響をおよぼさない程度を限度とする。

イ 酸及びアルカリ[4)5)6)] (註10)

アのろ液 10ml をとり，これにフェノールフタレイン試液2滴を加えるとき，紅色を呈しない。また，別に同液 10ml をとり，これにメチルオレンジ試液1滴を加えるとき，赤色を呈しない。(註11)

(註10) 材料の製造工程中に，使用した酸やアルカリの残存をしらべる目的で設けられた。これらの残存は，使用時に影響を与えるばかりではなく，繊維の劣化を早め，経時変化の原因となる。

(註11) フェノールフタレインの変色範囲は，pH（無色）8.3～10.0（紅色）である。

メチルオレンジの変色範囲は，pH（赤）3.1～4.4（だいだい黄）である。

ウ けい光[1)2)3)4)5)6)] (註12)

本品に暗所で紫外線を照射するとき，著しいけい光又は著しい汚染を疑わせるけい光を認めない。(註13)

(註12) この試験は「ア」と同様の目的から，けい光増白剤を使用して，純白を装うことを禁止したものである。また製造工程中に，機械油や，頭髪油等による汚染，または製造上の欠かんがもたらす著しい汚染を，紫外線照射によって認めるけい光によってしらべるものである。

(註13) 紫外線照射にあたり，はじめは，試料を原型のまましらべ，さらに試料をもみほごして内部をしらべる。とり出し用コードに防水加工を施こしたものは，わずかにけい光を発するものがあるが，本試験で追及するけい光増白剤でもなければ，汚染によるけい光でもない。

「著しいけい光」とは，次に記すけい光標準品より強いけい光を発するものをいう。

◎ けい光標準品：化成品工業協会けい光増白剤標品（Colour index No, FBA 24 のスチルベン系の遅染型に属するけい光増白剤）7mgを正確に量り，500 ml の褐色メスフラスコに入れ，水で正確に標線までうすめる。本溶液は，しゃ光して保存する。この溶液 5 ml をとり，塩化ナトリウム 0.1g を加え，水でうすめて 50ml とし，この溶液中に，ろ紙（東洋ろ紙 No, 51 8cm×15cm）を時々反転しながら1時間浸したのち，取り出し，ろ紙上で風乾する。

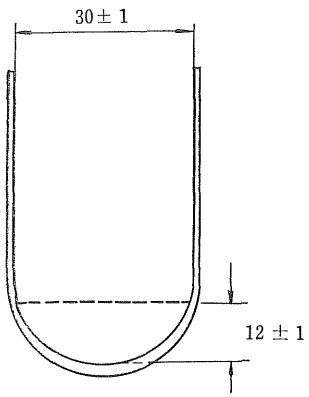
「著しい汚染を疑わせるけい光」とは，試料に，紫外線を照射したとき発するけい光が，部分的にある程度のひろがりをもつものをいう。

エ 吸収速度[11)] (註14)

図に示す肉厚均斉な試験管に，20～25°のローダミンB溶液（0.01→100） 5ml を入れ，液面上 5mm の高さから本品の先端部を下にして静かに落すとき，試験管内の液を吸収し終るに要する時間は，14秒以内である。ただし，測定は3回行い，その平均値を測定値とする。(註15)

(註14)[1)2)3)4)5)6)7)9)10)11)] 各種衛生材料のうち，吸収材料として用いられている脱脂綿，ガーゼの吸収能測定法は，各国の薬局方，薬典に記載されている。これらは，操作上のちがいはあっても，いずれも水中に

単位mm



投じてその沈降速度を測定し，吸収能の尺度としている。

また我国の生理処理用品基準別表（昭和41年5月24日，厚生省告示　第285号）には，日本薬局方「脱脂綿」に準じた沈降速度の測定規定がある。

タンポンは，膣内において，積極的に経血を吸収し，これを処理することが，その目的であるから，上記同様，吸収能を知ることが必要である。

タンポンは，多くの場合，綿状繊維を圧縮してあるため，薬局方やB.P.C（British phamaceutical codex）記載の吸収能測定法では，測定できない。またこれを用いることは不合理である。すなわち，素材的性格をもつ脱脂綿や，レーヨン・ステープル綿と，2次加工した月経処理専用型態のタンポンとでは，機能的に異なるからである。

また，タンポンは，2種以上の素材の組合せから成るものがあり，これらの素材を分別して，それぞれの素材の吸収能力を測定することは，非常にむずかしい。

タンポンは，1個づつを使用することによって，その目的を達するものであるから，各々のタンポン1個の特性性能を知るような試験法として採用された。

(註15)　試験管は，目の高さよりやや高めに固定し，吸収状態を下から観察すると，測定誤差が少い。

この測定法によったとき，次のような条件を満すタンポンの吸収速度は速い。

（i）　素材繊維が充分脱脂されているもの。

（ii）　素材繊維の捲縮度の高いもの。

（iii）　圧縮度の高いもの。

（iv）　重量，外径の大きいもの。

（v）　先端部が液に接触したとき，開花するように膨潤する機構をもつもの。

基準値が14秒と定められたが，これは吸収体として，最低の品質を確保するために設けられたものである。この数値の多少によってかならずしも品質の優劣を見極めることはできない。

吸収体の重量，圧縮状態，素材，構造，サイズ等の条件が同一であれば，試験上の誤差は少い。しかし，これらの条件が常に一定ではないことと，測定上の誤差を考慮して，測定は3回行ない，その平均値を測定値とするようきめられた。

タンポンの吸収能については，東京都立衛生研究所年報20(1968)に詳細な報告があるので参照されたい。

オ　吸収量[10]（註16）

本品のコードの端を持ち，吸収体の先端から20～25°の水中に浸せきし，3分間放置後静かに引き上げ，1分間つるしたまま放置したのち，本品に含まれた水を圧出して，その重量を量るとき，吸水量は吸収体重量の6倍以上である。ただし，測定は3回行ない，その平均値を測定値とする。

昭和45年10月6日付薬発第863号で，厚生省薬務局長より各都道府県知事に通知された新たな吸収量測定法に関するものは次のとおりである。

月経処理用タンポン基準のⅢの(6)のオに定める吸収量の重量を量る試験を行なうにあたっては，基準に定める試験のほか，次の試験によっても差し支えないものであること。

「本品のコードの端を持ち，吸収体の先端から20～25°の水中に浸せきし3分間放置後，静かに引き上げ1分間つるして滴下する水を除いたのち，そのまま重量を量るとき，吸水量は吸収体重量の6倍以上である。ただし，測定は3回行ない，その平均値を測定値とする。」（註17）

(註16)[1)2)3)4)5)6)7)]　日本薬局方「脱脂綿」U.S.P「脱脂綿」等には，一定容積，一定重量における吸水量の測定規定がある。これは，吸収材料としての，吸水保持能力をしらべるものと解される。タンポンも同様の機能を要求されるので，この項が設けられた。

(註17)　吸収量の測定法に，圧出して，その重量を量る方法と，吸水させた状態のまま量る方法があるが，両者の測定値の差は著るしく，かつ前者における測定値のバラツキは大きい。測定法は，昭和45年10月6日付通知による方法が当を得ている。

水中に，3分間放置する[9]のは，測定値のバラツキを少なくするためである。

水中より取り出す際に，吸水したタンポンが回転したり，静置中に回転すると，衝撃で吸水量が減じるの

で注意する必要がある。

吸水量測定値を絶対値で表わすとすれば，試料重量の大きいものが，小さいものより大きい値を示すので，生理処理用品基準（昭和41年5月24日厚生省告示第285号）に準じ，吸水倍率で表わすこととなった。

カ　脱落物質[7][8]（註18）

高さ23cm，内径5cmのガラス円筒に水を入れ，ゴムせんでふたをする。このとき，上部空間の高さが1cmになるように水量を調節し，標線を付けておく。次にゴムせんの小径面の中央部に直径1mmの銅線をU字型に埋め込み，これに本品のコードを結び，コードの長さが5cmになるようにする。

ガラス円筒の標線まで40～42°の水を入れ，直ちに試料とともにゴムせんでふたをする。常温で5分間放置後，ガラス円筒の中央部を持ち，上下方向に静かに2回転させ，10分間放置する。ゴムせんとともに本品を静かに引き上げ，本品に含まれた液を圧出し，円筒内の液に合わせる。

円筒中の液を蒸発濃縮し，はかりびんに入れ，105°で恒量になるまで乾燥するとき，残留物の量は25mg以下である。ただし，吸収体の先端に潤滑剤を塗布したものにあっては，35mg以下である。同様の方法で空試験を行ない補正する。（註19）

（註18）使用中，あるいは，取出し時に，繊維塊が脱落したり，遊離する繊維が多くあっては困る。また承認されない可溶性物質が多くあることも好ましくないので，併せてチェックすることになった。

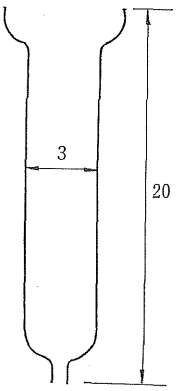
タンポンの先端に潤滑剤の塗布が認められているが，潤滑剤としては，Polyethylen Glycol のみ認められている。

Polyethylene Glycol の確認：薬局方Polyethylene Glycol 参照

（註19）「ガラス円筒の中央部を持ち，上下方向に静かに2回転させ，……」に要する時間は，おおむね10～12秒である。

「本品に含まれた液を圧出し……」には，次図のような，ガラス製圧出管を用いると便利である。

圧出管



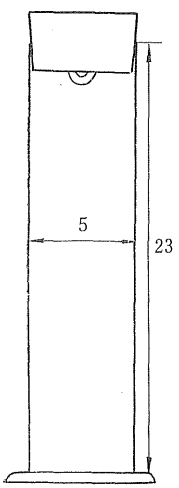
単位 cm

キ　強　さ[6]（註20）

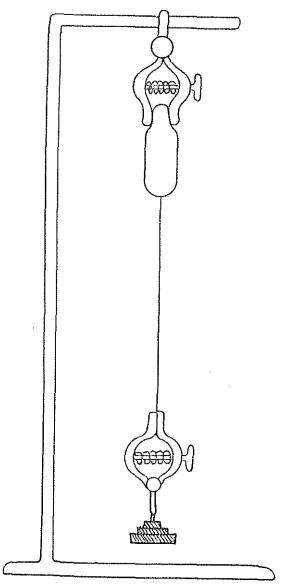
吸収体の先端から1/3の部分と，コードの端から15mmの部分を留め金ではさみ，長軸方向に3kgの荷重を加えるとき，1分間以内に切断しない。（註21）

（註20）膣内よりタンポンを取り出す際に，コードが切断したり，吸収体と分離するようでは困るので，

ガラス円筒



単位 cm



強さの規定が設けられた。

(註21) 前図のような装置を用いて試験を行なう。

——参　考——

1. 強　さ[12)13)]

膣内よりタンポンを取り出す際に，どのくらいの力を要するかは別問題として，市販タンポンの引張り強さをしらべた。

測定方法ならびに成績は，つぎのとおりである。

測定方法

吸収体の先端から1/3の部分を，引張り試験機の上部チャックでつかみ，とり出し用コードは，のばし，その端15mmを下部チャックでつかむ。ついで25cm/minの速さで引張り，切断時の荷重を測定した。

〔注〕 引張り試験機は，島津製作所製万能試験機SRⅡ型を用い，Range；100kg Perdivision；0.2kgで行なった。

試験成績

試料名	A	B	C	D	E
抗張力(kg)	15.0 ～18.5	15.2 ～18.5	12.2 ～18.4	6.7 ～9.5	5.8 ～9.4
試料名	F	G	H	I	J
抗張力(kg)	7.6 ～9.4	7.0 ～8.4	7.2 ～8.6	6.8 ～8.8	5.0 ～7.2

2. 挿入具

挿入具とは，吸収体と一体となって使用されるもので，吸収体を内蔵しているか，または，吸収体と接続して使用するものをいう。

挿入具には，押出し式挿入筒と，スティックと称する挿入棒がある。瞬間的に使用するものではあるが，いずれも膣内深く挿入されるものであるから，保健衛生上の危害を生ずるものであってはならない。特に，鋭利な角や，突起があってはならない。

手指の汚染を防ぐために，添付されている指サックのようなものは，挿入具の範ちゅうには属さない。

挿入具に関する具体的な試験項目，試験法の規定はないが，本基準の(1)(2)(3)(5)および「ア」「イ」「ウ」の各項に適合することが必要であろう。

また挿入時に折損，変曲するようでは，機能的にも，危険防止の面からも好ましくない。

3. 挿入具の強さ

入手し得た挿入具について，私案による方法で試験した結果を報告する。

試料；紙製の挿入筒ならびにスティック

試料の処理；試料を標準温湿度状態1類（温度19～21°，湿度63～67%）に24時間以上放置する。

測定方法；標準温湿度状態1類よりとり出した試料を，ただちに，つぎの方法によって試験する。

試料の両端部 1 cm を，水平な支持台で支え支点間中央に，外径 0.5cmの金属丸棒を直角に接触させ，これに荷重を加えてゆき，折損した時の荷重を抗折力とした。

押出し式挿入筒は，内筒と外筒を離し，それぞれについて行なった。

試験成績

試　料	抗折力(kg)
A 挿入棒	1.28 ～ 1.36
B 挿入筒(外筒)	0.90 ～ 1.02
B 〃 (内筒)	0.82 ～ 1.02
C 〃 (外筒)	1.15 ～ 1.21
C 〃 (内筒)	1.80 ～ 1.90
D 〃 (外筒)	2.70 ～ 2.85
D 〃 (内筒)	2.70 ～ 2.80
E 挿入棒	1.00 ～ 1.30

参考文献

1) Hager Handbuch der phamazeutishen Praxis (1958)
2) British phamaceutical codex (1963)；Part V Surgical dressing, p. 992
3) The phamacopeia of the United States of America XVI (1960)
4) 南江堂，第七改正日本薬局方註解，第一部 (1965)
5) 広川書店，第七改正日本薬局方註解，第一部 (1965)
6) 日本衛生材料工業会，生理処理用品基準註解 (1966)
7) 伊東，堀部，篠崎：衛生試験所報告82号，97 (1967)；83号，64 (1965)；84号 (1966) 紙綿類の基準について
8) 伊東，大場：衛生試験所報告84号 (1966) 衛生材料の全反射スペクトル
9) 田村，西田，柿沼：東京都立衛生研究所事業月報139号 (1960) 生理処理用品の品質について
10) 西田：東京都立衛生研究所事業月報197号，(1965) 生理処理用パッド　テックスの原材料および構成について
11) 西田：東京都立衛生研究所年報20号 (1968) 月経処理用タンポンの吸収能について

12) JIS Z 8703—1955 試験場所の標準状態
13) JIS P 8101—1961 溶解パルプ試験法

東京都における各種大気汚物質間の相関および因子分析

野牛　弘*　倉科周介**
鈴木重任***　佐藤泰仁*

CORRELATION AND FACTOR ANALYSIS OF AIR POLLUTANTS IN TOKYO

Hiroshi YAGYU,* Syusuke KURASHINA,**
Shigeto SUZUKI*** and Yasuhito SATO*

*(Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
**(Department of Hygiene and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo University)
***(Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo University)

Summary

Relationship between meteological factors and quantities of air pollutants in Tokyo in 1968, were studied by means of the correlation and factor analysis of the data obtained at Tokyo National Air Sampling Net Work Station.

Results obtained are summarized as follows:

1) Each air pollutant showed specific patterns of their seasonal vicissitude and each smog was consisted of different quantities of air pollutants.

2) An arrangement and a grouping of air pollutants could be made by the methods of "the coefficiency of belonging" and "the least squares", and the suitability and reliability of the consequences were proved by the method of canonical analysis.

3) According to the consequences obtained through the analysis of canonical method, it is likely to be a few factors existed are concerned in the formation of smogs.

4) It was concluded that the SO_2, dust, CO and O_3 values are necessarily applied for the indicators of the air pollution.

1. 緒　　言

昭和41年7月国設東京大気汚染測定所が東京都立衛生研究所構内に設置されて以来3年の月日が経過した。測定所内の諸計測器も次第に整備され，測定を担当する著者らにとってもほぼ満足しうるデーターが得られるようになった。著者らはこの測定データーを管理規定にもとづいて，遅滞なく厚生省に報告しているのであるが，この測定データーのうちより特に昭和43年度のみの気象要素，諸大気汚染物質相互間の関係について相関分析，因子分析により群化配列を試みたので，その方法と解析結果を報告する。

* 東京都立衛生研究所
** 東大衛生学教室
*** 東大中尾内科教室

2. 測定方法及びデーター処理機能

測定データーには，測定方法，測定器による特性が明らかに現われる。時には測定器の個人的操作の相違によっても差異が起こってくる。従って，当測定所では国より示された管理規定を厳格に守ると同時に，自

表1　測　定　機　器　概　要

測定項目	方　　式	原　　理	メーカー及び型式
W.V.	プロペラ型 風向風速発信器	プロペラで直結した発電機（交流式）で風速に比例した電圧を記録器の入力に整流し抵抗分割する。	小笠原計器　A-57
TEMP	白金抵抗体	温度による抵抗変化を電圧変換し，mV表示する。	〃　　〃
HUMI	毛　髪　式	毛髪の湿度による伸縮を，直流出力の差動トランスを動かしてその出力をmV表示する。	〃　　〃
SO_2	電気伝導度	吸収液（H_2O_2，H_2SO_4，蒸留水）にサンプルエアーを通じて生じる電気伝導度の大小を濃度変換する。	Beckman　K-78
NO_2	光電池比色計	吸収液（ザルツマン試薬）にサンプルエアーを通じて，吸収液の発色度合を光電池により濃度変換する。	〃　K-75
NO	〃	サンプルエアーを過マンガン酸カリ溶液に通してNO_2にしてNO_2と同じ方法で行なう。	〃　K-75
DUST	散乱光方式	サンプルエアーを暗室に通過させ，これを安定な光ビームを交叉して粉塵による散乱光を光電子増倍管で受け電流量を積算する。	柴田化学器械工業 A型
OXIDANT	光電池比色計	吸収液（KI，$Na_2HPO_4 12H_2O$，KH_2PO_4，蒸留水）にサンプルエアーを通して生じる発色度合を光電池により濃度変換する。	Beckman　K-78
CO	赤外線 吸収スペクトル	赤外線にサンプルエアーを通して生じる吸収エネルギーと比較セルのエネルギー差から電圧変化を濃度変換する。	日立-堀場EIA-1A
H.C.	水素炎イオン化 検出法	水素炎中にサンプルエアーを通しその燃焼によりイオン化を起し，コレクターと対極の間のイオン電流を電圧変換する。	柳本製作所 HCG-1000

※　その他，当測定所にはデーター処理装置として，積分装置(東芝)，データーロガー(早川)，電動タイプ（沖）がある。

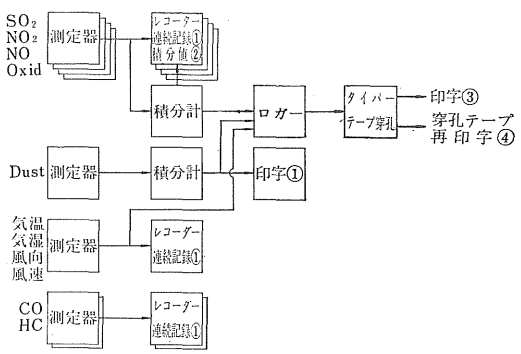
主的な管理規則に基づき，極めて客観的な維持管理に努め，もし得られた測定値に少しでも疑念がもたれる時はただちに破棄することにしている。

国設測定所の概要

1. 位置，構造
   東京都新宿区百人町４丁目539番地
   東京都立衛生研究所構内コンクリート１階建
   独立家屋
2. 測定項目　表１のとおり
3. 測定方式　同上
4. 原　　理　同上
5. 測定計器の型式　同上
6. 測定データーの処理

各大気汚染物質濃度測定器はそれぞれの大気中の濃度をそれぞれのレコーダーに①連続記録しており，この連続記録用の電流は同時に積分計に導入され，積分計は１時間毎に導入電流の積分値をレコーダーに送り，連続記録紙の上に②記録する。また同じ値はロガーを経由してタイパーに導入され③印字と，保存用穿孔テープに記録される。保存穿孔テープはタイパーにかけると再び④印字することができる。

図1　データー処理装置



通常保存穿孔テープより再印字した値を使用することにしているが，以上４つの測定値のうち，最も信頼性の高いのは①レコーダー連続記録値であり，ついで②レコーダー上の積分値，④穿孔テープ再印字，③印字である。常時われわれの目にみえる測定値は③印字であるから③印字と，①レコーダー上の連続記録値を対照チェックして，誤差が Fullscale の１％以下であれば④穿孔テープ再印字の測定値を使用することにしており，誤差１％以上の時には連続記録紙より平均値

を計測し，測定値としている。このようにして，測定値の誤印字による間違いを防止するように努めている。

3. 大気汚染物質の年間の変動

43年度の気象要素と大気汚染物質の月平均値，最高値，最低値，年平均値，最高値，最低値は表2の通りである。

1年間の月平均大気汚染物質の増減比をみると，図2の通りである。各汚染物質にそれぞれ特有の季節変動が認められる。例えば二酸化硫黄 SO_2は夏と冬に山があり，二酸化窒素 NO_2 と酸化物 Oxidant (O_3) は夏に高い山，一酸化窒素 NO，一酸化炭素 CO と浮遊粉じん Dust は冬に高い山がある。炭化水素 HCは年度後半に高い山があるが，この測定器は使用期間が短いため，機械の精度が不安定なのではないかと考えられる年間変動である。

図—2のみでは大気汚染物質の相互関係が判然としないので，それぞれの物質間の単相関係数を求めて，後に述べる最小自乗法による配列を行ない，群化すれば図—2下表のとおりとなり，SO_2, HC, Oxidant のそ

表2　国設大気汚染観測所昭和43年度測定報告データー

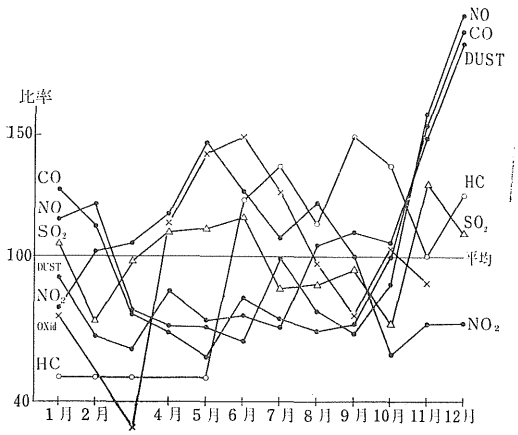
東京測定所（新宿区）

month	W.V.			TEMP			HUMI			SO_2			NO_2		
	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver
1	08.0	00.0	01.2	17.5	02.5	06.2	95.0	16.0	55.2	0.450	0.000	0.059	0.140	0.020	0.046
2	07.0	00.0	01.6	16.8	−03.2	04.6	97.0	12.0	51.1	0.270	0.000	0.041	0.190	0.020	0.059
3	10.0	00.0	02.7	22.0	01.3	11.3	100.0	14.0	65.6	0.270	0.000	0.055	0.150	0.000	0.061
4	10.0	00.0	02.2	26.3	07.0	16.1	100.0	22.0	73.4	0.270	0.000	0.063	0.240	0.000	0.065
5	08.0	00.0	02.6	29.6	10.9	20.1	100.0	22.0	75.8	0.260	0.000	0.062	0.190	0.000	0.085
6	09.0	00.0	01.8	34.0	17.1	24.8	94.0	33.0	76.2	0.230	0.000	0.065	0.220	0.020	0.073
7	23.0	00.0	01.8	36.3	20.3	26.6	96.0	53.0	82.6	0.190	0.000	0.048	0.320	0.000	0.062
8	12.0	00.0	02.0	35.0	22.0	28.4	99.0	35.0	85.7	0.200	0.010	0.049	0.240	0.010	0.071
9	06.0	00.0	01.5	31.0	16.0	23.4	96.0	38.0	80.8	0.240	0.010	0.053	0.180	0.010	0.058
10	05.6	00.4	01.8	30.4	09.4	18.0	99.0	29.0	74.2	0.226	0.000	0.040	0.097	0.002	0.034
11	08.9	00.3	01.7	25.6	04.3	16.2	95.2	16.9	74.7	0.292	0.001	0.073	0.177	0.001	0.042
12	05.6	00.0	01.6	20.9	01.8	10.5	94.3	15.0	63.1	0.434	0.000	0.061	0.170	0.000	0.042
全年	23.0	00.0	01.9	36.3	−03.2	17.2	100.0	12.0	71.5	0.450	0.000	0.056	0.320	0.000	0.058

month	NO			DUST			OXIDANT			CO			HC		
	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver	max	min	aver
1	0.330	0.000	0.039	1.31	0.02	0.19	0.150	0.000	0.027	22.0	0.0	5.9	2.3	0.0	0.4
2	0.520	0.000	0.041	0.69	0.02	0.14	※	※	※	29.0	1.0	5.2	6.0	0.0	0.4
3	0.500	0.000	0.026	0.85	0.01	0.13	0.100	0.000	0.010	19.0	0.0	3.5	3.3	0.0	0.4
4	0.360	0.000	0.024	0.69	0.03	0.18	0.160	0.000	0.040	13.0	0.0	3.2	※	※	※
5	0.280	0.000	0.024	0.87	0.03	0.15	0.180	0.000	0.050	12.0	0.0	2.7	3.2	0.0	0.4
6	0.170	0.000	0.022	0.81	0.00	0.16	0.210	0.000	0.052	11.0	1.0	3.8	2.0	0.6	1.0
7	0.320	0.000	0.034	0.68	0.03	0.15	0.220	0.000	0.044	15.0	1.0	3.4	2.6	0.6	1.1
8	0.160	0.000	0.026	1.08	0.03	0.22	0.220	0.000	0.034	15.0	0.0	3.2	2.0	0.2	0.9
9	0.150	0.000	0.023	1.02	0.05	0.23	0.200	0.000	0.026	21.0	0.0	3.3	2.3	0.2	1.2
10	0.380	0.000	0.030	1.01	0.01	0.21	0.214	0.000	0.037	42.0	0.0	4.7	4.0	0.3	1.1
11	0.306	0.001	0.054	1.28	0.01	0.32	0.146	0.001	0.031	41.0	1.0	7.2	3.6	0.1	0.8
12	0.453	0.006	0.068	2.24	0.02	0.41	※	※	※	55.0	0.0	8.9	5.7	0.1	1.0
全年	0.520	0.000	0.034	2.24	0.00	0.21	0.220	0.000	0.032	55.0	0.0	4.6	6.0	0.0	0.7

単位　W.V.……m/sec　TEMP……°C　HUMI……%　SO_2……ppm　NO_2……ppm
NO …… ppm　DUST……mg/m³　OXIDANT…ppm　CO ……ppm　HC ……ppm

図2　一年間の月平均大気汚染物質の増減比及び相関係数



	SO_2	HC	Dust	CO	NO	NO_2	OXid
SO_2	1.000	−0.108	0.361	0.263	0.220	0.123	0.129
HC		1.000	0.402	0.025	0.010	−0.248	0.294
DUST			1.000	0.807	0.793	−0.573	−0.143
CO				1.000	0.956	−0.730	−0.245
NO					1.000	−0.630	−0.197
NO_2						1.000	0.433
Oxid							1.000

れぞれの単独群化と Dust, CO, NO, NO_2 の一群の4群に分けられる。それぞれ群毎に特有な季節変動があることが示される。

4. 解析方法

昭和43年1年間に観測された一酸化炭素30ppm以上の濃度を示した時間は30時間であった。この時の各種大気汚染物質の測定値から各種汚染物質間の相関係数を算出すれば表—3の右上段の通りである。例えば，二酸化硫黄と二酸化窒素との30時間の測定値の相関係数は0.87と非常に高く，二酸化硫黄が増加すると二酸化窒素も増加すると考えて差支えなく，それが間違う確率は1％以下であることを示している。（正確には「二酸化硫黄と二酸化窒素との増減は相互に無関係とすれば，このような30回の測定値が観測されることは100回のうち1回しかない現象である。」）

表—3の左下段は一酸化炭素 30ppm 以下の時を1年間から30時間無作為に抽出し，その時間における各汚染物質濃度の測定値間の相関係数を算出したもので，最高の相関は負の相関の二硫化硫黄と湿度の間の−0.71である。すなわち湿度が増加してくると二酸化硫黄が減少することを示している。

B係数群化配列：著者らは表—3の群化配列を二因子解法のB係数[1](Coefficient of belonging) を算出して実施した。B係数とは同一群内の相関は，他の群内の変数との相関よりもより高いという考え方に基づくもので，同一群内の相互相関の平均の，それ以外の群の変数との相関に対する比の100倍として定義されている。

結果，表—3は表—4のごとく群化配列しなおされ，CO 30ppm 以上の時は表4の右上の配列となり，群化は温度，湿度のグループ，NO_2・SO_2・Dust・CO のグループ，NO と HC（炭化水素）のグループに分けられる。CO 30ppm以下の時には，NO_2，SO_2，湿度，

表3　大気汚染物質間相関係数

CO 30ppm以上　n=30								
☆	HC	CO	DUST	NO	NO_2	SO_2	湿	温
HC	☆	0.67**	0.76**	0.64**	0.41*	0.33	0.17	0.05
CO	0.18	☆	0.72**	0.69**	0.06	−0.01	−0.02	−0.14
DUST	0.25	0.53**	☆	0.10	0.49**	0.66**	−0.27	−0.48**
NO	0.32	0.01	0.65**	☆	0.32	0.13	0.05	−0.14
NO_2	−0.07	0.65**	0.51**	−0.08	☆	0.87**	−0.16	−0.08
SO_2	−0.12	0.60**	0.65**	0.47**	0.67**	☆	−0.31	−0.21
湿	−0.06	−0.57**	0.16	−0.55**	−0.26	−0.71**	☆	0.77**
温	0.22	−0.61**	0.13	−0.46**	−0.27	−0.38*	0.52**	☆
CO 30ppm以下　n=30								

$\gamma(30, 0.05) = 0.349 <$ *
$\gamma(30, 0.01) = 0.449 <$ **

表4　群　化　配　列　転　換（B係数による）

CO 30ppm以上　　n=30									
y ☆ x	温	湿	NO_2	SO_2	DUST	CO	NO	HC	
NO_2	☆	−0.77**	−0.08	−0.21	−0.48**	−0.14	−0.14	0.05	温
SO_2	0.67**	☆	−0.16	−0.31	−0.27	−0.02	0.05	0.17	湿
湿	−0.27	−0.71**	☆	0.87**	0.49**	0.06	0.32	0.41*	NO_2
NO	−0.08	0.47**	−0.55**	☆	0.66**	−0.01	0.13	0.33	SO_2
DUST	0.51**	0.65**	0.16	0.65**	☆	0.72**	0.10	0.76**	DUST
CO	0.65**	0.60**	−0.57**	0.01	0.53**	☆	0.69**	0.67**	CO
温	−0.27	−0.38*	0.52**	−0.46**	0.13	−0.61**	☆	0.64**	NO
HC	−0.07	−0.12	−0.06	0.32	0.25	0.18	0.22	☆	HC
	NO_2	SO_2	湿	NO	DUST	CO	温	HC	☆
CO 30ppm以下　　n=30									

表5　群　化　配　列　転　換（相関係数または最小自乗法）

CO 30ppm以上　　n=30									
☆	温	湿	NO_2	SO_2	DUST	HC	CO	NO	
温	☆	0.77**	−0.08	−0.21	−0.48**	0.05	−0.14	−0.14	温
湿	0.52**	☆	−0.16	−0.31	−0.27	0.17	−0.02	0.05	湿
CO	0.61**	−0.57**	☆	0.87**	0.49**	0.41*	0.06	0.32	NO_2
SO_2	0.38*	−0.71**	0.60**	☆	0.66**	0.33	−0.01	0.13	SO_2
NO_2	0.27	−0.27	0.65**	0.67**	☆	0.76**	0.72**	0.10	DUST
DUST	0.13	0.16	0.53**	0.65**	0.51**	☆	0.67**	0.64**	HC
NO	0.46**	−0.55**	0.01	0.47**	−0.08	0.65**	☆	0.69**	CO
HC	0.22	−0.06	0.18	−0.12	−0.07	0.25	0.32	☆	NO
	温	湿	CO	SO_2	NO_2	DUST	NO	HC	☆
CO 30ppm以下　　n=30									

NOのグループ，Dust，CO，温度のグループと炭化水素（HC）の単独グループに分けられる。

B係数による群化は，グループ内の配列をあまり問題としないので，著者らは変数の配列をかえてみた。この配列が適合しているか，どうかを検定する方法として次の二つの方法を考案した。

第一法（相関係数法）：相関行列の相関係数の絶対値をとり，これを100倍し整数とすれば相関行列は一種の相関表に変換される。そして変数の中で他の変数と関係の深いものほど近接して配置するとすれば，最も適した配列はこの相関表の相関係数が最も1に近いものである。

第二法（最小自乗法）：相関行列表で相関係数の大きい変数同志を近くに置き，小さい変数ほど配列をはなす。このことは前法と同じ考えであるが相接した変数間の相関係数には Factor として1をかけ，一つの間隔をおいた時には2^2を，二つの間隔をおいた時は3^2をかける。n個の間隔をおいた時は$(n+1)^2$を Factor

とする。相関行列のすべての相関係数にそれぞれの配列の Factor を乗じて，総和したものが，最小になれば，その配列は一番適合した配列である。

この二法を使用して，二，三の例の配列を試みたのであるが，ほぼ同じ傾向が出るので，第二法の最小自乗法を用いて，表－4の再配列を試みた。

さらに配列後の群化は相関係数の平均が 0.700 以上になるものを同一群とした。

表－3，表－4は表－5のごとく配列かつ群化される。CO 30ppm 以上の大気汚染時には温度と湿度が同一群となり，NO_2, SO_2 が同一群，Dust，炭化水素(HC), CO が同一群となり，NO が単独群となる。先のB係数配列と異なる点は，配列においてCO，NO，HC の位置が転換したことである。

一方 CO 30ppm以下では配列が大幅に変り，かつ相関行列内の相関係数が小さいので群化はできない。配列は CO 30ppm以上の大気汚染のときと異った配列になっている。

Canonical 因子分析：B係数群化配列は更に因子分析に導入されるのであるが，著者らは電子計算機 HITAC 5020 を利用して Canonical 因子分析を行なった。

図3　CO 30ppm以上の時の群化
（Canonによる因子分析）

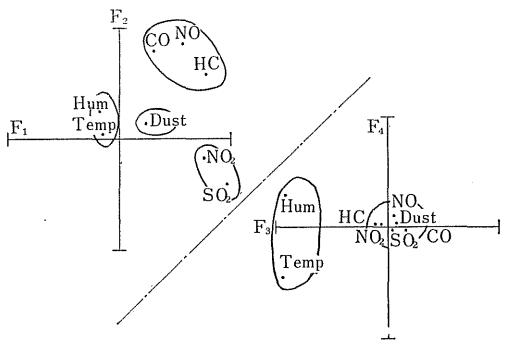
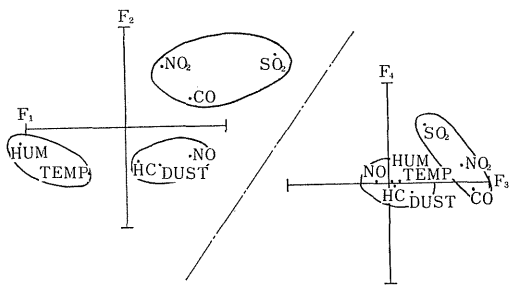


図4　CO 30ppm以下の時の群化
（Canonによる因子分析）



Canonical 因子分析[2),3)] の原理はデーター行列からつくられた合成変量が最大の相関をもつように重みベクトルを定めようとするものである。

計算の流れ：Program　東大ライブラリープログラム 162［Estimation of Factor Loading by Canonical Factor Analysis］

Factor Analysis(Title)
Correlation matrix A
Initial U
Initial G

1. Cycle No.
Eigen value of X(=G'AG)
Theta (Mean of N-M smaller eigen values)
TRA(Trace of X) TRGA (Trace of Gamma =Sum of M larger eigen values)
$G=1/\sqrt{U}$
Factor loading matrix

2. Residual variance U
1-2 Repeated
(If No. of iteration cycle becomes greater than IT STOPP)
"Stopped" is printed
Eigen vector and eigen values are printed
T (Sum of the N-M smaller eigen values)
TS (X^2)
The degree of freedom of TS is $\{(n-m)^2-n-m\}/2$

5. 解析結果

1. CO 濃度 30ppmを基準として，大気汚染状況を区分して，配列群化を先に示した最小自乗法と Canonical 因子分析により行なった結果は

① 大気汚染物質中常に同様な傾向（正逆共に）を示すものは二酸化硫黄と二酸化窒素，一酸化窒素と炭化水素，温度と湿度の三組である。

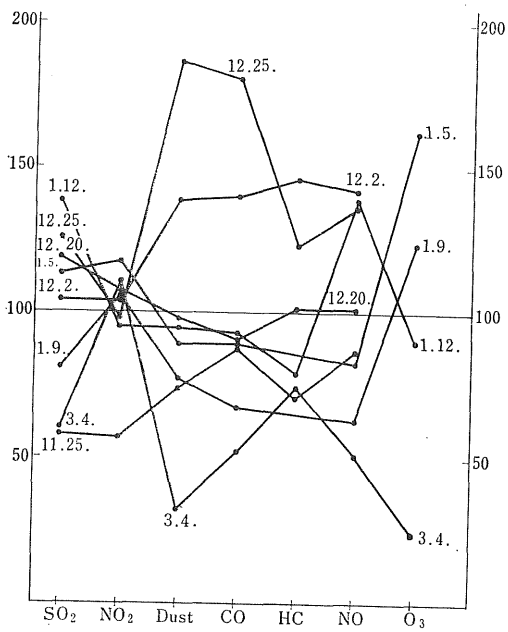
② CO 濃度の増減によって群化が異なってくるのは CO である。濃度が高くなると CO は酸化窒素，炭化水素と行動を共にするが，濃度が低い時には二酸化硫黄，二酸化窒素と同傾向の増減を示す。

③ Dust は CO 増加時は CO 濃度に関係なく別個の増減を示すが，CO 濃度が低いときには一酸化窒素，炭化水素と同じ増減を示す。

2. Smog 警報発令時

昭和43年中に東京都において Smog 警報の発令されたのは合計8回であった。Smog 警報発令中の時間は数時間にすぎず，従って測定値も数個にすぎないこ

図5　Smog＋前24時間大気汚染物質濃度比



と，および一年間の計測値を総合すると季節変動によってかくれてしまうので，警報発令時に警報前24時間の測定値を加えて解析を行なった。この8回の Smog 時の大気汚染物質平均濃度の比較を画けば図—5のようになる。各 Smog 時の大気汚染物質の Pattern は非常にまちまちである。すなわち① SO_2 のみが増加した場合は12月20日，②SO_2 と NO が増加した場合は1月12日であり，③SO_2 と O_3 が増加したのが1月5日と1月9日である。1月9日の場合 SO_2 の増加は他の Smog に比して少ないのであるが，Smog 警報は SO_2 の増加した時に発令されることから，いづれの Smog 警報時も SO_2 の増加があると考えてよい。④SO_2•CO と Dust の三者が増加した場合は12月2日と12月25日である。⑤SO_2•CO と NO が増加した場合は11月25日である。⑥ SO_2•NO_2 と HC が増加した場合は3月4日である。以上のように Smog は常に一様な Pattern を示すものでなく，Smog 毎に特有な Pattern を画くものである。そこで Smog ごとの大気汚染物質の配列群化を行なった。

表—6—1右上半部は1月5日の Smog 警報発令時7時間およびそれ以前合計31時間の大気汚染物質 SO_2, NO_2, NO, CO, O_3, Dust の6種類の相互間の相関係数表であり，配列をB係数および最小自乗法によって行ない，単相関係数の平均が0.7以上を一群とした。

また Canonical 因子分析を行なえば，各大気汚染物質の因子1，因子2，因子3の係数行列式は表7—1となる。因子1，因子2の係数は大きいが，因子3の係数はいづれも小である。これは因子1，因子2が主たる共通因子であることを示し，因子3以下は主たる共通因子とは考えにくいことを示すものである。従ってこれを因子1，因子2について，平面に展開すれば，各大気汚染物質は図6の如く配置される。これを先の単相関係数の平均が0.7以上のものを一群とした群化を行なった。SO_2 と NO_2 が同一群となり，同一増減をすることが推測される。Dust•CO と NO が同一群で増減する。O_3 は単独群である。

以下表6—2より表6—4まで，表7—2より表7—8までおよび図—6，7，8，9はそれぞれの Smog 警報時＋前24時間の大気汚染物質相互間の相関係数表。

表6—1　Smog 警報＋前24時間大気汚染物質相関係数・配列・群化

43.1.5.12：～43.1.6.19：　n＝31

☆	NO_2	SO_2	DUST	CO	NO	O_3	
NO_2	☆	0.788	0.657	0.383	0.250	−0.168	NO_2
SO_2	0.618	☆	0.613	0.484	0.431	−0.233	SO_2
DUST	0.767	0.786	☆	0.787	0.505	0.253	DUST
CO	0.586	0.619	0.915	☆	0.850	0.558	CO
NO	0.393	0.270	0.714	0.833	☆	0.613	NO
O_3	−0.087	−0.213	0.243	0.430	0.703	☆	O_3
	NO_2	SO_2	DUST	CO	NO	O_3	☆

43.1.9.11：～43.1.10.21：　n＝30

表 7－1　43.1.5～1.6 カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0.661	0.636	−0.273
NO_2	0.560	0.647	0.026
NO	0.848	−0.347	−0.302
O_3	0.447	−0.746	0.143
CO	0.947	−0.192	0.088
DUST	0.836	0.251	0.396

表 7－2　43.1.9～43.1.10カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0.758	0.525	−0.250
NO_2	0.742	0.331	0.468
NO	0.760	−0.576	0.033
O_3	0.291	−0.835	−0.032
CO	0.942	−0.210	−0.088
DUST	0.985	0.063	0.011

図 6　Smog ＋前24時間大気汚染物質関係図（Canonical 因子分析による）

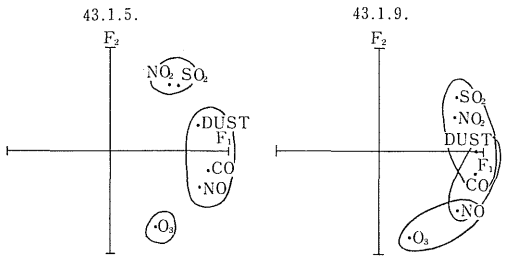


表 6－2　Smog 警報＋前24時間大気汚染物質相関係数・配列・群化

43.1.12.11：～43.1.13.14：　n＝28

☆	DUST	SO_2	CO	HC	NO	NO_2	O_3
SO_2	☆	0.855	0.865	0.787	0.636	0.620	0.037
NO_2	0.793	☆	0.912	0.795	0.760	0.654	0.010
DUST	0.463	0.763	☆	0.917	0.892	0.767	0.276
CO	0.601	0.900	0.938	☆	0.743	0.689	0.439
HC	0.522	0.903	0.887	0.962	☆	0.785	0.433
NO	0.380	0.875	0.874	0.924	0.925	☆	0.247
O_3	−0.187	−0.282	−0.319	−0.342	−0.300	−0.263	☆

43.3.4.12：～43.3.5.12：　n＝20

表 7－3　43.1.12～1.13 カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0.897	−0.245	−0.219
NO_2	0.780	0.142	−0.088
NO	0.904	0.364	−0.145
O_3	0.333	0.594	0.643
CO	0.990	−0.053	−0.037
HC	0.921	−0.134	0.321
DUST	0.845	−0.364	−0.085

表 7－4　43.3.4～3.5 カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0.661	−0.703	−0.149
NO_2	0.946	−0.226	0.157
NO	0.916	0.270	0.207
O_3	−0.320	−0.046	0.132
CO	0.977	0.105	−0.096
HC	0.965	0.149	0.056
DUST	0.903	0.263	−0.249

図7　Smog＋前24時間大気汚染物質相関図（Canonical 因子分析による）

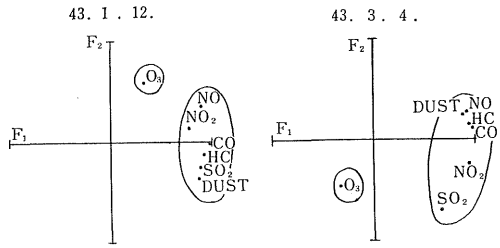


表 6－3　Smog 警報＋前24時間大気汚染物質相関係数・配列・群化

43. 11. 25. 12：～43. 11. 26. 15：　n＝28

☆	NO_2	SO_2	NO	HC	CO	DUST	
SO_2	☆	0. 257	−0. 068	0. 091	0. 194	−0. 031	NO_2
NO_2	0. 773	☆	0. 397	−0. 231	−0. 203	−0. 051	SO_2
CO	0. 498	0. 564	☆	0. 854	0. 851	0. 398	NO
HC	0. 475	0. 554	0. 931	☆	0. 921	0. 600	HC
NO	0. 358	0. 526	0. 994	0. 969	☆	0. 297	CO
DUST	0. 367	0. 370	0. 852	0. 887	0. 861	☆	DUST
	SO_2	NO_2	CO	HC	NO	DUST	☆

43. 12. 2. 11：～43. 12. 3. 14：　n＝27

表 7－5　43. 11. 25～11. 26カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0. 169	−1. 047	0. 080
NO_2	−0. 108	−0. 074	−0. 170
NO	−0. 933	−0. 517	−0. 004
CO	−1. 033	0. 027	−0. 259
HC	−1. 053	0. 075	0. 141
DUST	−0. 548	0. 056	0. 912

表 7－6　43. 12. 2～12. 3 カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0. 422	−0. 686	0. 354
NO_2	0. 554	−0. 781	0. 085
NO	0. 991	0. 028	−0. 065
CO	0. 986	−0. 043	−0. 050
HC	0. 975	−0. 012	0. 093
DUST	0. 882	0. 196	0. 379

図8　Smog＋前24時間大気汚染物質関係図（Canonical 因子分析による）

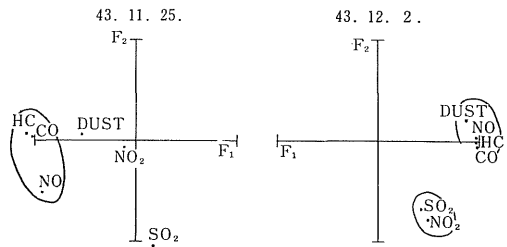


表 6—4　Smog 警報＋前24時間大気汚染物質相関係数・配列・群化

43. 12. 20. 11：～43. 12. 21. 16：　n＝29

☆	NO_2	SO_2	CO	NO	DUST	HC	
NO_2	☆	0. 522	0. 292	−0. 215	0. 321	−0. 286	NO_2
SO_2	0. 860	☆	0. 573	0. 168	0. 263	0. 066	SO_2
DUST	0. 625	0. 835	☆	0. 667	0. 330	0. 198	CO
HC	0. 489	0. 654	0. 877	☆	−0. 098	0. 320	NO
NO	0. 358	0. 412	0. 572	0. 733	☆	−0. 291	DUST
CO	0. 239	0. 401	0. 710	0. 851	0. 857	☆	HC
	NO_2	SO_2	DUST	HC	NO	CO	☆

43. 12. 25. 11：～43. 12. 26. 24：　n＝38

表 7—7　43. 12. 20～12. 21カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0. 359	−0. 625	−0. 262
NO_2	0. 892	−0. 201	−0. 248
NO	−0. 138	−0. 569	0. 741
CO	0. 117	−0. 931	0. 116
HC	−0. 114	−0. 035	0. 529
DUST	−0. 588	−0. 464	−0. 578

表 7—8　43. 12. 25～12. 26カノニカル因子係数表

	因子 1	因子 2	因子 3
SO_2	0. 823	0. 512	0. 063
NO_2	0. 664	0. 570	0. 328
NO	0. 746	−0. 452	0. 372
CO	0. 815	−0. 530	0. 005
HC	0. 929	−0. 185	−0. 105
DUST	0. 945	0. 122	−0. 213

図 9　Smog ＋前24時間大気汚染物質関係図（Canonical 因子分析による）

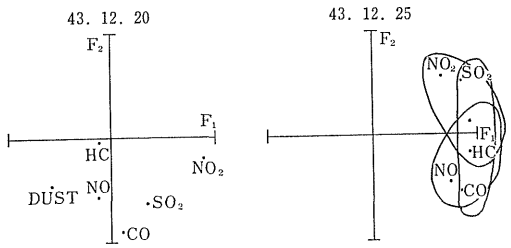


表 8　Smog 警報＋前24時間大気汚染物質配列

43. 1. 5. 12：～ 6. 19：　SO_2—NO_2 | DUST—CO—NO | O_3

43. 1. 9. 11：～10. 21：　NO_2—SO_2 | DUST—CO | NO | O_3

43. 1. 12. 11：～13. 14：　DUST—SO_2—CO—HC—NO—NO_2 | O_3

43. 3. 4. 12：～ 5. 12：　SO_2—NO_2—DUST—CO—HC—NO | O_3

43. 11. 25. 12：～26. 15：　NO_2—SO_2 | NO—HC—CO | DUST

43. 12. 2. 11：～ 3. 14：　SO_2—NO_2 | CO—NO—HC—DUST

43. 12. 20. 11：～21. 16：　NO_2—SO_2—CO—NO—DUST—HC

43. 12. 25. 11：～26. 24：　NO_2 | SO_2 | DUST—HC | CO | NO

表9—1　Smogなし日曜日大気汚染物質間相関係数と配列群化

43.1.14（日）

☆	SO_2	NO_2	CO	NO	DUST	HC	O_3
SO_2	☆	0.174	0.164	0.114	0.149	0.161	0.144
O_3	0.307	☆	0.791	0.658	0.652	0.626	0.413
NO_2	0.470	0.564	☆	0.941	0.923	0.916	0.787
CO	0.059	0.173	0.568	☆	0.981	0.970	0.028
NO	0.019	0.289	0.430	0.940	☆	0.979	0.930
DUST	0.163	0.092	0.321	0.767	0.781	☆	0.919
	SO_2	O_3	NO_2	CO	NO	DUST	☆

43.4.14（日）

表9—2　Smogなし日曜日大気汚染物質間相関係数・配列・群化

43.7.14（日）

☆	SO_2	NO_2	HC	CO	NO	O_3	
SO_2	☆	0.687	0.351	0.301	0.213	0.256	SO_2
NO_2	0.528	☆	0.692	0.724	0.631	0.273	NO_2
O_3	0.518	0.322	☆	0.905	0.808	−0.257	HC
NO	0.469	0.549	0.812	☆	0.833	−0.328	CO
HC	0.132	0.293	0.650	0.827	☆	−0.341	NO
DUST	0.074	0.036	0.258	0.611	0.862	☆	O_3
	SO_2	NO_2	O_3	NO	HC	DUST	☆

43.10.13（日）

表10—1　43.1.14(日) カノニカル因子係数表

	因子1	因子2	因子3
SO_2	0.144	0.046	−0.230
NO_2	0.658	0.628	−0.055
NO	0.992	0.013	0.060
DUST	0.990	−0.014	−0.061
O_3	0.933	−0.314	0.033
CO	0.939	0.291	0.041
HC	0.982	−0.018	−0.093

表10—2　43.4.14(日) カノニカル因子係数表

	因子1	因子2	因子3
SO_2	0.194	−0.006	−0.912
NO_2	−0.856	−0.322	0.326
NO	−0.796	0.472	−0.234
DUST	−0.621	0.512	−0.236
O_3	−0.564	−0.643	−0.443
CO	−0.831	0.484	−0.070

表10—3　43.7.14(日) カノニカル因子係数表

	因子1	因子2	因子3
SO_2	0.549	−0.516	−0.522
NO_2	0.906	−0.360	0.016
NO	0.807	0.331	0.074
O_3	−0.060	−0.878	0.310
CO	0.915	0.323	0.062
HC	0.884	0.266	0.031

表10—4　43.10.13(日)カノニカル因子係数表

	因子1	因子2	因子3
SO_2	0.297	−0.466	−0.284
NO_2	0.312	−0.373	−0.764
NO	−0.901	0.296	0.194
DUST	−0.836	−0.518	−0.013
O_3	−0.713	0.650	−0.172
HC	−0.977	−0.089	−0.022

図10　Smog のない日曜日大気汚染物質関係図
（Canonical 因子分析による）

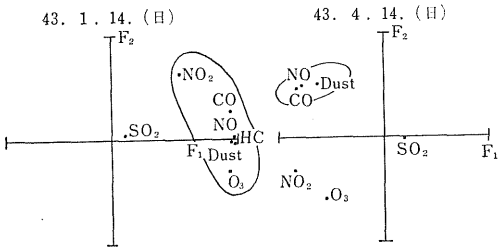


図11　Smog のない日曜日大気汚染物質関係図
（Canonical 因子分析による）

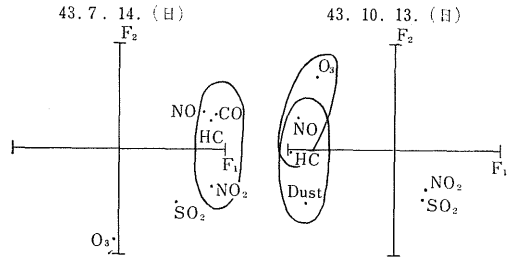


表11　Smog なし日曜日大気汚染物質配列

43. 1. 14　SO_2—[NO_2—CO—NO—DUST—HC—O_3]

43. 4. 14　SO_2—O_3—NO_2—[CO—NO—DUST]

43. 7. 14　SO_2—[NO_2—HC—CO—NO]—O_3

43. 10. 13　SO_2—NO_2—[O_3—NO—HC]—DUST

Canonical 因子係数表と Canonical因子１・２展開図である。

また表８は配列群化のみを並列した。

3.　Smog のない日の大気汚染物質相互間の相関関係について

Smog 警報の発せられるのは SO_2の増加がある時であるが，その逆に SO_2の発生の少ない日曜日を１月，４月，７月，10月よりえらびそれぞれ，冬，春，夏，秋の代表として，配列，群化を行なえば表—９—１，９—２，表10—１～４および図—10，11となる。また表—11は群化配列のみを一表とした。

SO_2 はいづれも単独群となっているのが認められ，CO と HC と NOと Dust は同一群であり，NO_2はSO_2群と CO 群との中間的単独群であり，O_3は単独群であることがわかる。

6.　考　　察

近年電気的測器具の普及はめざましく，国設東京大気汚染測定所にもこれが利用され，迅速に大量の測定データを得て，大気汚染の発生防止対策に資するべく努力されている。著者ら測定に直接たずさわるものは，この測定所の意義をよく理解し，これ等の器具の完全維持管理には知識と経験と細心の注意と労力を傾中することをおしまぬものである。

さて大気汚染物質は多種多様である。これらをすべて測定するということは，研究としては必要であろうが，行政上の要求には合致しないであろう。行政上必要とするものは，大気汚染を代表とするもの，指標として普遍性のあるものを数少なく，正確につかむことであろう。このような意図により，昭和43年１年間の測定データを解析し，大気汚染の構成物質の比率が，季節により非常に変動すること，従って四季の Smog はそれぞれ四季の特性が現われることと，これら大気汚染物質はいくつかのグループにわけられることが認められた。すなわち，SO_2 と NO_2 の群，CO，HC，NO の群，Dust の単独群，O_3 の単独群である。

著者らは解析方法として，B係数と最小自乗法を使用しての大気汚染物質の配列群化を試みたものであるが，この方法によっても，相当程度各物質間の関係を意味づけることができたと思う。この方法で求められた配列群化をCanonical因子分析の展開図中に適応させると，よく結果が一致することがわかり，B係数，最小自乗法の解析力に自信を得たのである。一方 Canonical 因子分析によれば，共通因子を数多く想定しても，著者らの測定している大気汚染物質の場合にはほんの２，３の共通因子によって説明されてしまうことから，これらの物質が平面に展開されうるし，さらに直線的に展開することも可能なのであろうと推定する。そして同じ理由でB係数，最小自乗法のごとき簡単な方法でも群化配列することができるのであろう。

共通因子が２～３にすぎないということは，それが気象要素か，風速か，風向か，逆転層の高さか，それともその他の何ものかであるかは不明である。今後の測定と解析とに待たなければならない。

現在Smog警報の発令はSO_2を主たる指標にして行なわれている。Smog は視程のさまたげとなることを意味しているが，Smog の言葉には目にみえない大気汚染も含んで解釈されるのであるから指標としてSO_2のみを使用するのは適当ではないと考える。すべからくSO_2の他に Dust，CO，O_3の３物質を指標に加えることを提案したい。またSmog警報もいずれは大気汚染警報と改称するのが適当ではないだろうか。

7.　結　　論

昭和43年国設東京大気汚染測定所データを解析した結果，次のことが結論される。

1. 各種大気汚染物質にはそれぞれの物質の季節変動がある。

2. 各種大気汚染物質の相関係数からB係数および最小自乗法により配列，群化することができる。

3. Canonical 因子分析により，以上の配列群化がほぼ適合していることが裏付けられる。

4. Canonical 因子分析でこれらの大気汚染物質の一般因子は二，三にすぎないことが推測される。

5. 大気汚染指標として，SO_2，Dust，CO，O_3 を使用すべきであろう。

参考文献

1) 清水利信，斉藤耕三：因子分析法，pp. 75—81，日本文化科学社

2) 芝祐順：行動科学における相関分析法，pp. 205—221，東京大学出版社，1967

3) C. R. Rao : Estimation and tests of significance in factor analysis, Psychometrica, Vol. 20, No. 2, pp. 93—111, (1955)

有料道路料金所環境の料金収受員に及ぼす影響について

野牛　弘*　両角　清*
小林正武*　山崎爽治*
佐藤泰仁*　池田眞悟*

ENVIRONMENTAL CONDITIONS AT A TOLL-GATE BOOTH AND THEIR INFLUENCE ON THE LABORS' HEALTH

Hiroshi YAGYU, Kiyoshi MOROZUMI, Masatake KOBAYASHI, Soji YAMAZAKI, Yasuhito SATO and Shingo IKEDA

Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

Summary

During the three days in December 1969, a survey was made on the environmental conditions of toll-gate business at the booth of a toll-gate near Tokyo, as the exhaust gas of the vehicle is now significant problem in the public nuisance in Tokyo.

Results obtained are summarized as follows:

1) The average of the noise degree was 75 phons and the concentration of CO gas was 10 ppm, but sometimes the latter indicated over 30—50 ppm.

2) The maximum concentrations of NO and NO_2 gas were 1.20—1.37 ppm and 0.22 ppm respectively.

3) The weight of dust in air was 0.74mg/m^3 in average, 1.02mg/m^3 in maximum and 0.45mg/m^3 in minimum; and that of lead was 12.7μg/m^3 in average, 17.2μg/m^3 in maximum and 9.0μg/m^3 in minimum; and then, that of silica dehydrate was 0.12 mg/m^3 in average, 0.23mg/m^3 in maximum and 0.03mg/m^3 in minimum.

4) As for the influence of above mentioned conditions to the labors' health, there were no one who is suffering from lead poisoning, silicosis nor carbon-monoxide toxication.

5) No significant effect was observed on the two minutes inhalation of oxygen at intervals to the labors.

6) More worse influence of the cigaret smoking was observed on the COHb per cent in blood than that of the polluted air conditions of the toll-gate booth.

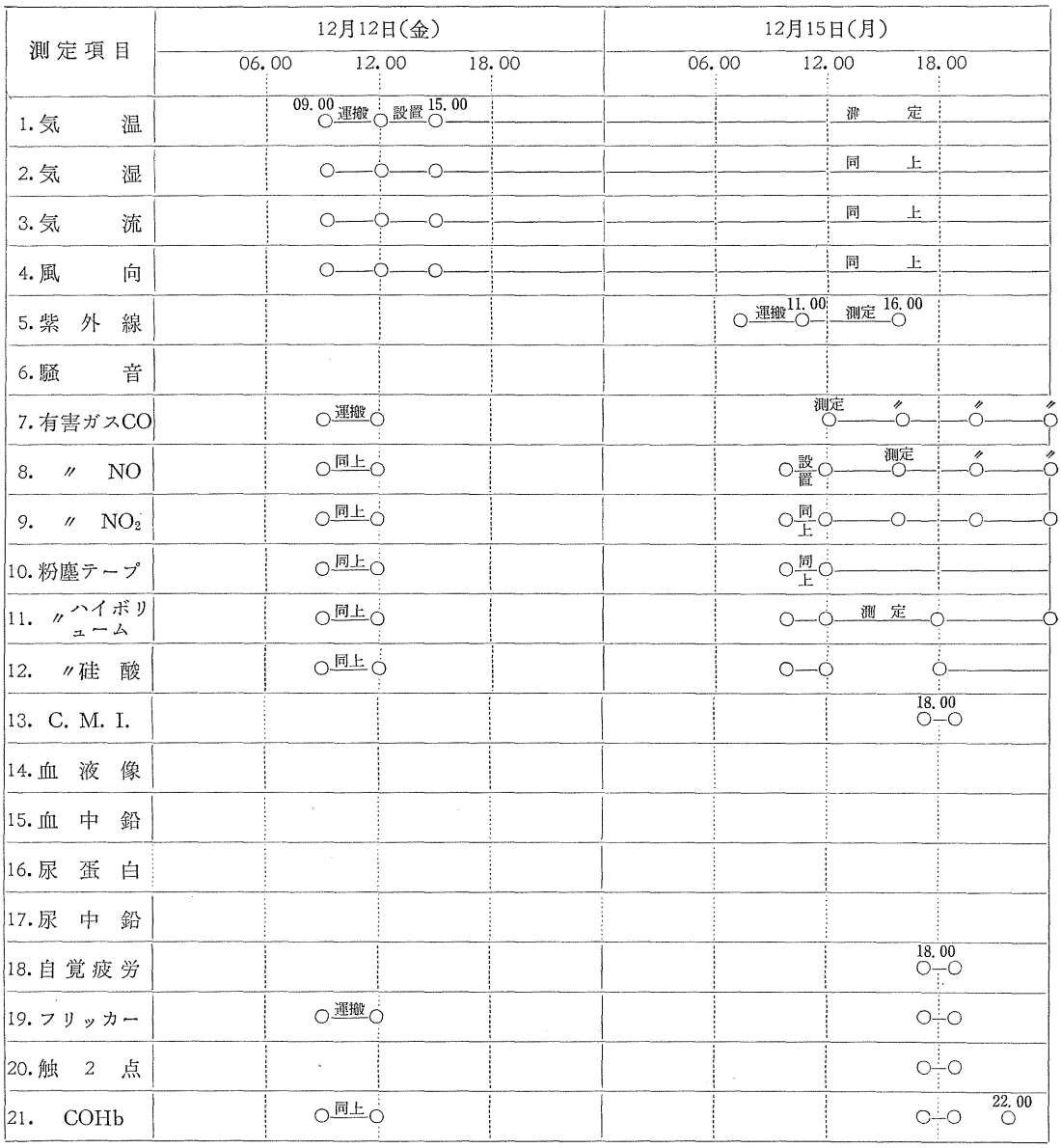
I 緒　　言

近年交通公害防止が叫けばれているが，交通機関特に自動車による排気ガス，騒音は，その元凶であろう。これ等の交通公害を最もまともに被っているのは交通関係業務従事者である。

われわれは昭和44年12月15，16，17日の三日間にわたる連続48時間の東京近郊有料道路料金所の環境調査と料金収受員の健康調査を実施する機会にめぐまれた

* 東京都立衛生研究所環境衛生部

表1 横　　浜　　新　　道，



ので，その調査結果を報告する。この調査事項の中には，2，3新しい試みを実施し，興味ある知見を得たので，併せて報告する。

Ⅱ 調査の概要

1. 調査目的：料金所における自動車の排気ガスの実態及び排気ガスが収受員に与える影響を調査し，排気ガス対策を確立するための資料を得ることを目的とした。

2. 調査事項：

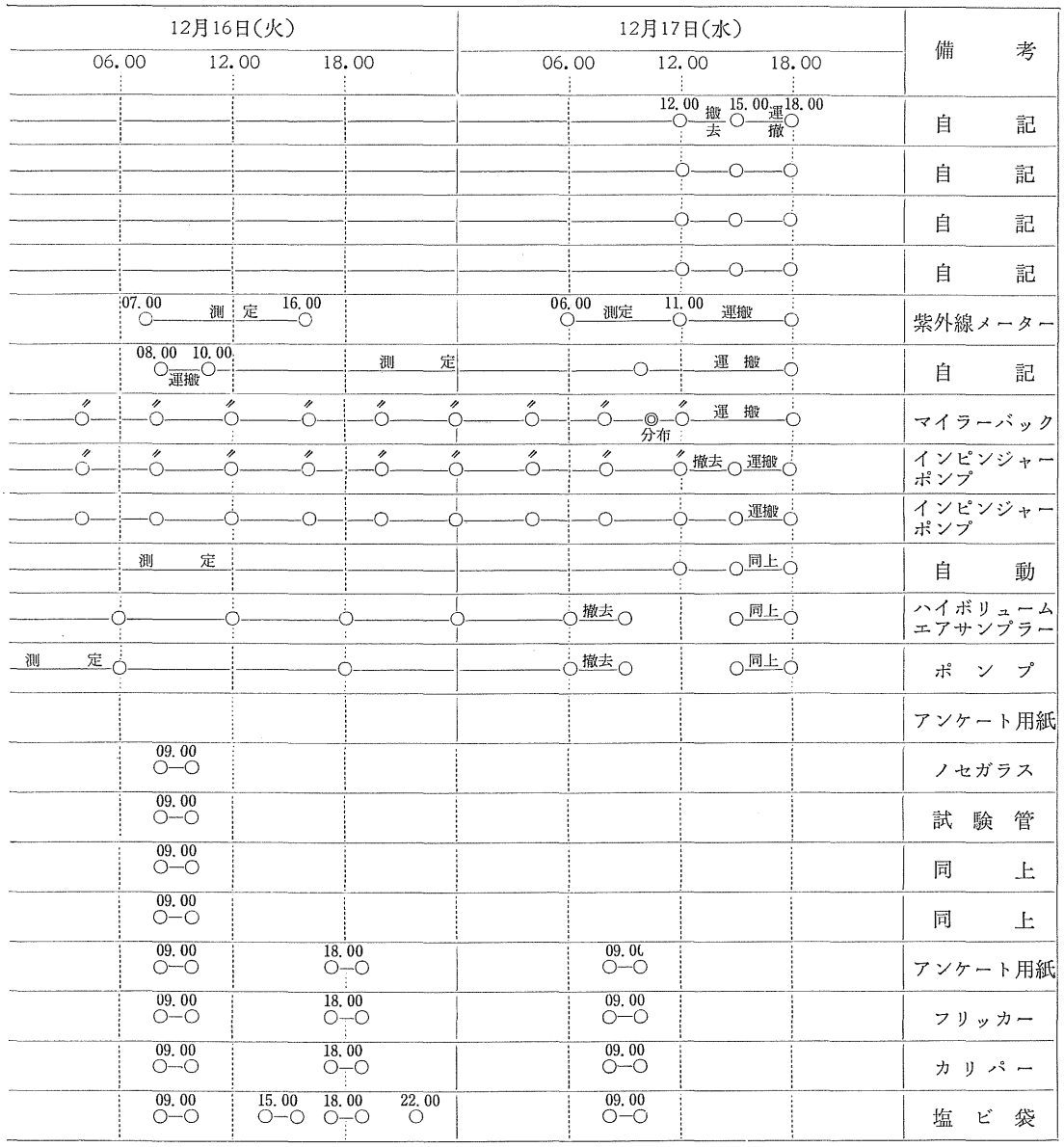
(1) 料金徴収所のブース No.1 および No.3（下り線）の2地点（図1）の排気ガスの発生濃度を経時的に測定記録した。

(2) 排気ガス（有毒ガス：一酸化炭素・一酸化窒素，二酸化窒素，鉛，珪酸等）の経時変化を分析した。

(3) 排気ガスの人体への慢性及び急性影響を血液，尿検査及び疲労検査により調査した。

(4) 酸素吸入の排気ガス対策としての効果を調査した。

調　査　日　程　表



3. 調査日程，測定方法

(1) 調査日程　昭和44年12月12日より準備を開始し，12月15日12時より，12月17日12時まで調査測定業務を終了した。日程手順は表1の通りである。

(2) 測定方法

ア　気温，気湿：図1の百葉箱内にて自記温湿度計により実施。

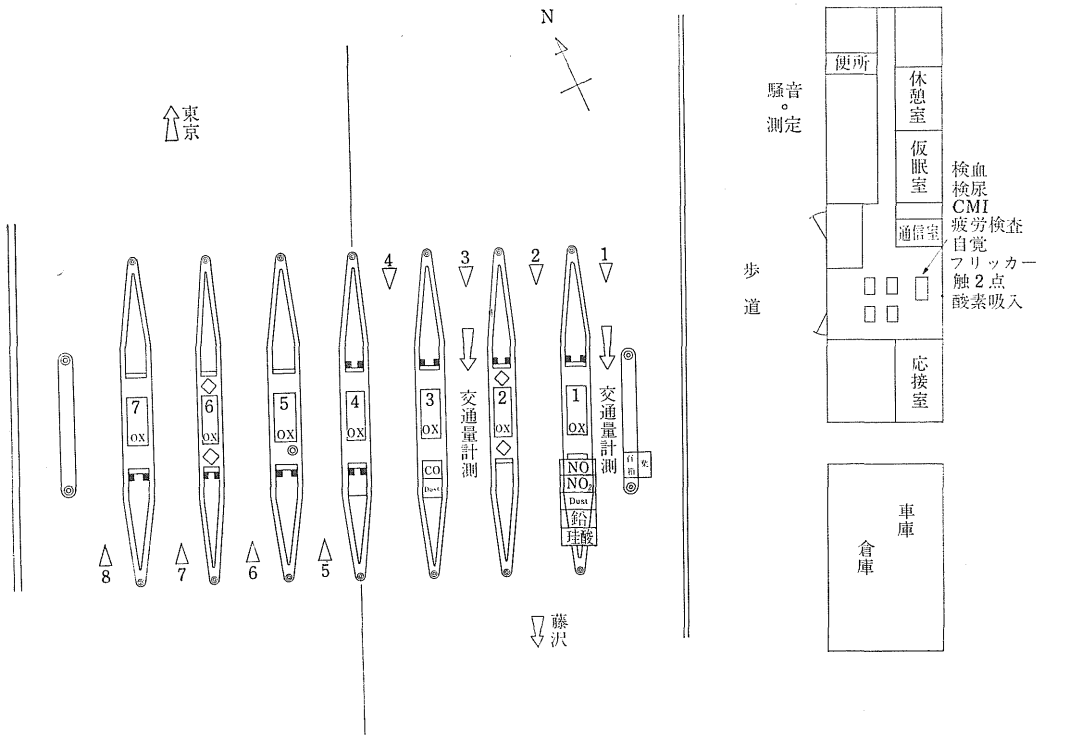
イ　気流，風向：図1百葉箱上方において測定。自記風向風速計による。

ウ　紫外線：ブース3，南側において計測。
自然昼光測定用積算照度計（東洋理化工業）

エ　騒音：下り線事務所前歩道上で測定。
指示騒音計（リオン）
高速度レベルレコーダー（リオン）

オ　有害ガス：一酸化炭素濃度，テフロンバッグ及び塩化ビニールバッグにて採気。
非分散型赤外ＣＯ計（日立掘場）および検知管（北川式）にて測定。

図1 横浜新道料金所



カ 有害ガス：一酸化窒素濃度測定，Saltzman法[8]

キ 有害ガス：二酸化窒素濃度測定，Saltzman法[8]

ク 粉塵：テープ反射率及び吸収率，自動式ろ紙集ん器による法[1]

ケ 粉塵重量：Staplex High Volume Air Sampler[8]にて採塵，重量測定

コ 気中鉛量：Staplex High Volume Air Sampler[8]にて採塵後，塵中の鉛を硝酸にて溶出し原子吸光分析し定量した。

サ 粉塵中珪酸量：モリブデン酸アンモニウム法[2]

シ Cornell Medical Index (C.M.I.) 調査

CORNELL MEDICAL INDEX

健康調査表　　昭和　年　月　日

姓名　　現住所

満年齢　　歳　性別　男　女　職業

※の該当する個所を○印でかこんで下さい。

※最終学歴　小学　中学　高校　大学　※結婚状況　未婚　既婚　死別　別居　離婚

○次の質問すべてに，はい，いいえのどちらかを○印でかこんで下さい（特にひどい項目には◎をつけて下さい）

A

1 新聞を読むのに眼鏡がいりますか　はい　いいえ

2 遠くを見るのに眼鏡がいりますか　はい　いいえ

3 目先が真暗になる事がありますか　はい　いいえ

4 いつもまばたきしたり涙が出たりしますか　はい　いいえ

5 よく目が痛みますか　はい　いいえ

5′ よく目がかすみますか　はい　いいえ

6 よく目が赤くなりますか　はい　いいえ

7 耳は遠いですか　はい　いいえ

8 耳だれのあった事がありますか　はい　いいえ

9 いつも耳鳴りがしますか　はい　いいえ

B

10 よくせきばらいをしますか　はい　いいえ

11 よくのどがつまるような感じがしますか はい いいえ
12 よくくしゃみが出ますか はい いいえ
13 いつも鼻がつまっていますか はい いいえ
14 いつも鼻汁が出ますか はい いいえ
15 時々ひどく鼻血が出ますか はい いいえ
16 ひどいかぜにかかりやすいですか はい いいえ
16′ よくのどが痛んだり，扁桃腺がはれたりしますか はい いいえ
17 かぜをひくと，せきが続いてなおりにくいですか はい いいえ
18 かぜをひくといつもねてみますか はい いいえ
18′ たんがよく出ますか はい いいえ
19 冬になるとかぜばかりひいていやですか はい いいえ
20 かぜをひくとすぐ鼻水が出ますか はい いいえ
21 ぜんそくがありますか はい いいえ
22 いつもせきが出てこまりますか はい いいえ
23 喀血したことがありますか はい いいえ
24 ひどく寝汗をかくことがありますか はい いいえ
25 結核以外の慢性の胸の病気にかかったことがありますか はい いいえ
25′ 微熱がありますか はい いいえ
26 結核にかかったことがありますか はい いいえ
27 結核の人といっしょに住んでいたことがありますか はい いいえ

C

28 医者から血圧が高いといわれたことがありますか はい いいえ
29 医者から血圧が低すぎるといわれたことがありますか はい いいえ
30 胸や心ぞうの所に痛みがありますか はい いいえ
31 動悸がうって気になることがよくありますか はい いいえ
32 心ぞうが狂ったように早くうつことがありますか はい いいえ
32′ ときどき脈が狂うことがありますか はい いいえ
33 よく息苦しくなることがありますか はい いいえ
34 人より息切れしやすいですか はい いいえ
35 時々坐っていても息切れすることがありますか はい いいえ
36 足がひどくむくむことがありますか はい いいえ
37 夏でも手足が冷えますか はい いいえ
38 よく足がひきつることがありますか はい いいえ
39 医者から心ぞうが悪いといわれたことがありますか はい いいえ
40 家族に心ぞうの悪い人がいますか はい いいえ

D

41 歯は半分以上ぬけていますか はい いいえ
42 歯ぐきから血がでますか はい いいえ
43 ひどい歯のいたみがよくありますか はい いいえ
44 舌がいつも真白でざらざらしていますか はい いいえ
45 いつも食欲がないですか はい いいえ
46 よく間食をしますか はい いいえ
47 いつも御飯をあらがみしますか はい いいえ
48 よく胃をこわしますか はい いいえ
48′ はきけがあったりはいたりしますか はい いいえ
49 食後いつもおなかがもたれますか はい いいえ
50 食後よくゲップが出ますか はい いいえ
50′ むねやけがあったり，すっぱいものが上ったりしますか はい いいえ
51 胃の具合が悪くて，ひどく気になることがありますか はい いいえ
51′ 偏食がひどいですか はい いいえ
52 消化が悪くて困りますか はい いいえ
53 さしこむようにおなかが痛むことがありますか はい いいえ
54 いつも胃の具合がわるいですか はい いいえ
55 家族に胃の悪い人がいますか はい いいえ
56 医者に胃潰瘍か十二指腸潰瘍があるといわれたことがありますか はい いいえ
56′ 食事のあとか空腹のときに胃がいたみますか はい いいえ
57 よく下痢をしますか はい いいえ
58 血の混ったひどい下痢をしたことがありますか はい いいえ
58′ ときどき便に粘液が出ますか はい いいえ
59 寄生虫のいたことがありますか はい いいえ
60 よく便秘しますか はい いいえ
61 痔をわずらったことがありますか はい いいえ
62 黄疸（ひふや目が黄色くなる）に

なったことがありますか　はい　いいえ
63 肝ぞうや胆のうの病気になったことがありますか　はい　いいえ
E
64 よく関節がいたんではれますか　はい　いいえ
65 筋肉や関節がいつもこわばっていますか　はい　いいえ
66 腕や脚にひどいいたみがありますか　はい　いいえ
67 ひどいリウマチでかたわになっていますか　はい　いいえ
67′ 肩やくびすじがこりますか　はい　いいえ
68 家族の人にリウマチの人がいますか　はい　いいえ
69 情けないほど脚が悪かったり痛んだりしますか　はい　いいえ
69′ 足がだるいですか　はい　いいえ
70 仕事が続けられない程，背中や腰がいたみますか　はい　いいえ
71 からだのどこかきかなくなったところがありますか　はい　いいえ
F
72 ひふが非常に敏感でまけやすいですか　はい　いいえ
72′ ときどき小さな皮下出血が起こりますか　はい　いいえ
73 切り傷をするとなおりにくいですか　はい　いいえ
74 顔がひどく赤くなることがありますか　はい　いいえ
75 冬でもひどく汗をかきますか　はい　いいえ
76 ひふにひどいかゆみがありますか　はい　いいえ
77 よくひふにじんましんが出ますか　はい　いいえ
77′ ときどき顔がむくみますか　はい　いいえ
78 よくできものができますか　はい　いいえ
G
79 よくひどい頭痛がしますか　はい　いいえ
80 いつも頭が重かったり痛んだりするため気がふさぎますか　はい　いいえ
81 家族に頭痛もちが多いですか　はい　いいえ
82 急に体があつくなったり冷たくなったりしますか　はい　いいえ
83 度々ひどい目まいがしますか　はい　いいえ
84 気が遠くなって倒れそうな感じになることがありますか　はい　いいえ
85 今迄，2回以上気を失ったことがありますか　はい　いいえ
86 からだのどこかにしびれや痛みがありますか　はい　いいえ
87 からだのどこかがまひしたことがありますか　はい　いいえ
88 頭をうって気を失ったことがありますか　はい　いいえ
89 顔，頭，或は肩がびくびく動くことがありますか　はい　いいえ
90 ひきつけの発作（てんかん）をおこしたことがありますか　はい　いいえ
91 家族にひきつけの発作を起こした人がありますか　はい　いいえ
92 爪をかむくせがありますか　はい　いいえ
93 どもりますか　はい　いいえ
93′ 舌がもつれて話しはしにくいですか　はい　いいえ
94 夜中にねぼけて歩きまわることがありますか　はい　いいえ
95 寝小便をしますか　はい　いいえ
96 小学生の頃寝小便をしていましたか　はい　いいえ
H
〔男子のみ〕
97 性器に何かひどい故障のあったことがありますか　はい　いいえ
98 性器のいたむことがありますか　はい　いいえ
99 性器の治療を受けたことがありますか　はい　いいえ
100 脱腸があると医者にいわれたことがありますか　はい　いいえ
101 尿に血のまじったことがありますか　はい　いいえ
102 尿の出にくいことがありますか　はい　いいえ
〔女子のみ〕
97 いつも月経痛がありますか　はい　いいえ
97′ 月経は不順ですか　はい　いいえ
98 月経のときは体の具合が悪いですか　はい　いいえ
99 月経のときはねこみますか　はい　いいえ
99′ 月経期以外に性器の出血がありますか　はい　いいえ
100 からだが，かーツとなって汗が出ることがありますか　はい　いいえ

101 月経のときは気分がいらいらしますか はい いいえ
102 おりものがありますか はい いいえ
〔男女とも〕
103 毎晩小用に起きますか はい いいえ
104 昼間，尿の回数が多いですか はい いいえ
105 小便をするときにやけるようないたみがありますか はい いいえ
106 ときどき尿をもらすことがありますか はい いいえ
107 腎ぞうか膀胱が悪いと医者にいわれたことがありますか はい いいえ

I

108 疲れてぐったりすることがよくありますか はい いいえ
109 仕事をすると疲れ切ってしまいますか はい いいえ
110 朝起きるといつも疲れきっていますか はい いいえ
111 ちょっと仕事をしただけで疲れますか はい いいえ
112 御飯がいけない程つかれますか はい いいえ
113 ひどい神経衰弱にかかっていますか はい いいえ
114 家族に神経衰弱にかかった人がいますか はい いいえ

J

115 よく病気をしますか はい いいえ
116 よく病気で寝こみますか はい いいえ
117 いつも体の具合が悪いですか はい いいえ
118 病弱なほうですか はい いいえ
119 あなたの一族は病気にかかりやすいですか はい いいえ
120 ひどい痛みで仕事ができないですか はい いいえ
121 自分の健康のことが気になって仕方がないですか はい いいえ
122 いつも病気がちで不幸ですか はい いいえ
123 からだが弱いので情けないですか はい いいえ

K

124 猩紅熱にかかったことがありますか はい いいえ
125 子供の時リウマチにかかったこと或は手足の痛みを起こしたことがありますか はい いいえ
126 マラリアにかかったことがありますか はい いいえ
127 ひどい貧血で治療を受けたことがありますか はい いいえ
128 性病の治療を受けたことがありますか はい いいえ
129 糖尿病がありますか はい いいえ
130 医者に甲状腺がはれていると，いわれたことがありますか はい いいえ
131 医者から，しこり又は癌の治療をうけたことがありますか はい いいえ
132 何か慢性の病気がありますか はい いいえ
132′ 原爆の影きようを受けたことがありますか はい いいえ
133 やせすぎていますか はい いいえ
134 ふとりすぎていますか はい いいえ
135 医者から脚に静脈瘤があるといわれたことがありますか はい いいえ
136 入院を要するような手術を受けたことがありますか はい いいえ
137 大けがをしたことがありますか はい いいえ
138 ちょっとした事故を起こしたりけがをしやすいですか はい いいえ

L

139 寝つきが悪かったり，眠ってもすぐ目を覚まし易すいですか はい いいえ
139′ よく夢をみますか はい いいえ
140 毎日くつろぐ余裕はないですか はい いいえ
141 毎日運動する余裕はないですか はい いいえ
142 1日20本以上たばこをのみますか はい いいえ
143 人より余計にお茶やコーヒーをのみますか はい いいえ
144 毎日かなり酒をのみますか はい いいえ

M

145 試験のときや質問されるときに汗をかいたりふるえたりしますか はい いいえ
146 目上の人が近づくととても緊張してふるえそうになりますか はい いいえ
147 目上の人が見ている仕事がさっぱりできなくなりますか はい いいえ
148 物事をいそいでせねばならぬときには頭が混乱しますか はい いいえ
149 少しでも急ぐと誤まりをしやすいですか はい いいえ
150 いつも指図や命令をとり違えます

か　はい　いいえ
151 見知らぬ人や場所が気にかかりますか　はい　いいえ
152 そばに知った人がいないとおどおどしますか　はい　いいえ
153 いつも決心がつきかねますか　はい　いいえ
154 いつも相談相手がそばにいてほしいですか　はい　いいえ
155 人から気がきかないと思われていますか　はい　いいえ
156 よそで食事をするのが苦になりますか　はい　いいえ

N

157 会合に出ても一人ぼっちな感じがして悲しいですか　はい　いいえ
158 いつも不幸で憂うつですか　はい　いいえ
159 よく泣きますか　はい　いいえ
160 いつもみじめで気が浮かないですか　はい　いいえ
161 人生は全く希望がないように思われますか　はい　いいえ
162 いっそ死んでしまいたいと思うことがありますか　はい　いいえ

O

163 いっもくよくよしますか　はい　いいえ
164 家族にくよくよする人がいますか　はい　いいえ
165 ちょっとしたことでも気になって仕方がないですか　はい　いいえ
166 人から神経質だと思われていますか　はい　いいえ
167 家族に神経質な人がいますか　はい　いいえ
168 ひどい神経症（ノイローゼ）になったことがありますか　はい　いいえ
169 家族にひどい神経症になった人がいますか　はい　いいえ
170 精神病院に入院したことがありますか　はい　いいえ
171 家族の誰かが精神病院に入院したことがありますか　はい　いいえ

P

172 ひどいはにかみや或は神経過敏なたちですか　はい　いいえ
173 家族にはひどいはにかみや神経過敏な人がいますか　はい　いいえ
174 感情を害し易いですか　はい　いいえ
175 人から批判されるとすぐ心が乱されますか　はい　いいえ
176 人から気むずかしやだと思われていますか　はい　いいえ
177 人からいつも誤解されますか　はい　いいえ

Q

178 友達にも気を許さないですか　はい　いいえ
179 仕事をしようと思ったらいてもたってもおれなくなりますか　はい　いいえ
180 すぐかーっとなったりいらいらしたりしますか　はい　いいえ
181 いつも緊張していないとすぐ取り乱しますか　はい　いいえ
182 一寸したことが癇にさわって腹が立ちますか　はい　いいえ
183 人から指図されると腹が立ちますか　はい　いいえ
184 人から邪魔されていらいらしますか　はい　いいえ
185 自分の思うようにならないとすぐかーっとなりますか　はい　いいえ
186 ひどく腹を立てることがよくありますか　はい　いいえ

R

187 よくからだがふるえますか　はい　いいえ
188 いつも緊張していらいらしていますか　はい　いいえ
189 急な物音で飛上るように驚いたりふるえたりしますか　はい　いいえ
190 どなりつけられるとすくんでしまいますか　はい　いいえ
191 夜中急に物音がしたりするとおびえますか　はい　いいえ
192 恐い夢で目のさめることがよくありますか　はい　いいえ
193 何か恐しい考えがいつも頭に浮んできますか　はい　いいえ
194 よく何の理由もなく急におびえたりしますか　はい　いいえ
195 突然冷汗のでることがよくありますか　はい　いいえ

ス　血液像：ギームザ染色[4]

セ　血中鉛量：鉛中毒量をみるため血中 δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase 量測定[3]

ソ　尿蛋白定性ズルフオサルチル酸法[4]

タ　尿中鉛量：鉛中毒量をみるため尿中 δ-Aminolevulinic Acid 量を測定した[5]

チ　自覚疲労検査：自覚的症状調査表[6] 変法下記自覚的症状に疲労評価点をつけ，それ等を合計して症状の数により除したものを疲労度とした。

自覚的症状	評価点
a．目がくらくらする	5
b．目をとじるとチラチラ（ホシ）がとぶ	4
c．足をはこぶのもだるい	5
d．何となく全身に倦怠を感ずる	4
e．ふだんの歩調よりにぶっている	3
f．頭がボーッとする	4
g．目がくぼんだように思う	4
h．ものを云うのもいやになった	5
i．考えごとはもういやだ	4
j．横になっていたい	5
k．飯を食うのも気が進まない	5
l．もうへとへとに疲れてしまって何をする元気もない	6
m．これからまだ軽い散歩もしたい	2
n．ラジオなら聞いてみたい	2
o．新聞なら読んでみたい	3
p．新聞を読むのもラジオを聞くのもいやだ	4
q．まだ何でも出来る	2
r．ふだんと同じで別に疲労した感じは持たない	2
s．まだ歩調も軽快だ	2
t．今から映画でも散歩にでも出かけても別に重荷と感じない	2
u．労働のあとの心地よい程度の疲れだ	2

ツ　フリッカー値測定[6]：労研式フリッカー値測定器（柴田化学）

テ　触二点弁別いき値法[6]：左前側前腕部皮膚について，カリパーにて測定

ト　COHb%：Ringold et al の20秒呼気停止後呼気法[7]による。呼気を塩化ビニール袋にとり Soda lime の CO_2 吸収管を通して，非分散型赤外線CO分析計により測定した。また一部北川式CO検知管を併用した。呼気中の CO 濃度を5で除し，0.5を加えたものを血中のCOHb%とした。

表2　横浜新道管理事務所（料金所）の温湿度並に風向・風速

時間	12月15日 気温(°C)	湿度(%)	風向	風速(m/s)	12月16日 気温(°C)	湿度(%)	風向	風速(m/s)	17月17日 気温(°C)	湿度(%)	風向	風速(m/s)	摘要
1					4.2	57	↑記録器故障↓	↑記録器故障↓	−1.6	85	N	無風	
2					0.8	71			−2.7	89	N	〃	
3					−0.3	79			−3.0	88	N	〃	
4					−1.7	86			−3.2	87	N	〃	
5					−2.3	87			−3.8	89	WNW	〃	
6					−2.8	88	WNW	無風	−3.6	88	NW	〃	
7					−2.4	88	NW	〃	−3.6	88	W	〃	
8					0.0	84	SW	〃	−0.7	83	S	〃	
9					6.0	58	NNW	〃	4.0	53	S	〃	
10					9.2	42	SW	2.10	6.6	43	S	〃	
11					10.0	34	WSW	2.25	9.5	34	S	〃	
12	11.1	34	SW	3.60	10.8	29	SW	2.60	10.7	35	S	〃	
13	11.5	35	SW	2.75	11.5	29	WSW	4.00					
14	11.6	32	WSW	4.60	11.7	30	SW	2.50					
15	10.5	35	WSW	4.25	12.0	32	SW	3.05					
16	9.3	38	WSW	5.50	11.2	33	WSW	2.00					
17	8.2	40	WSW	5.95	↑時計停止↓	↑時計停止↓	WSW	無風					
18	7.7	42	WSW	4.40			E	〃					
19	7.3	44	WSW	2.95			NNE	〃					
20	7.0	46	WSW	2.60			N	〃					
21	6.7	46	WSW	2.75			WSW	〃					
22	6.1	47	WSW	1.00			N	〃					
23	4.9	50	SW				WSW	〃					
24	5.2	51	W	1.25	−1.8	85	N	〃					

図2　道路公団横浜料金所第1ブース附近における紫外線量

受光部設置は⊘ブース地上1m

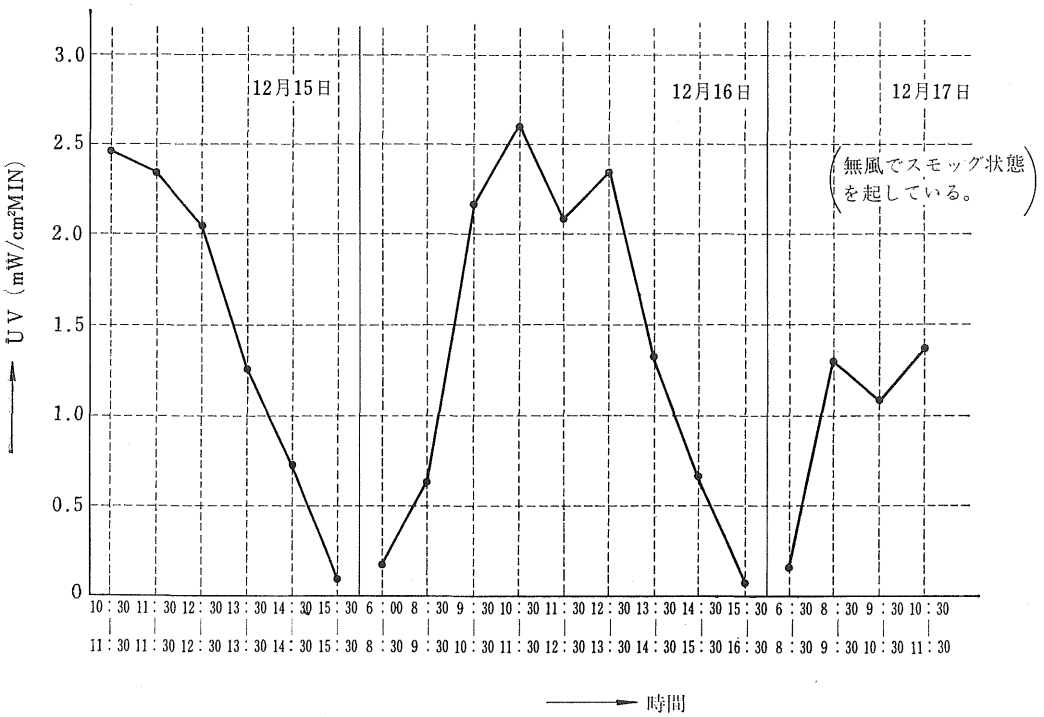
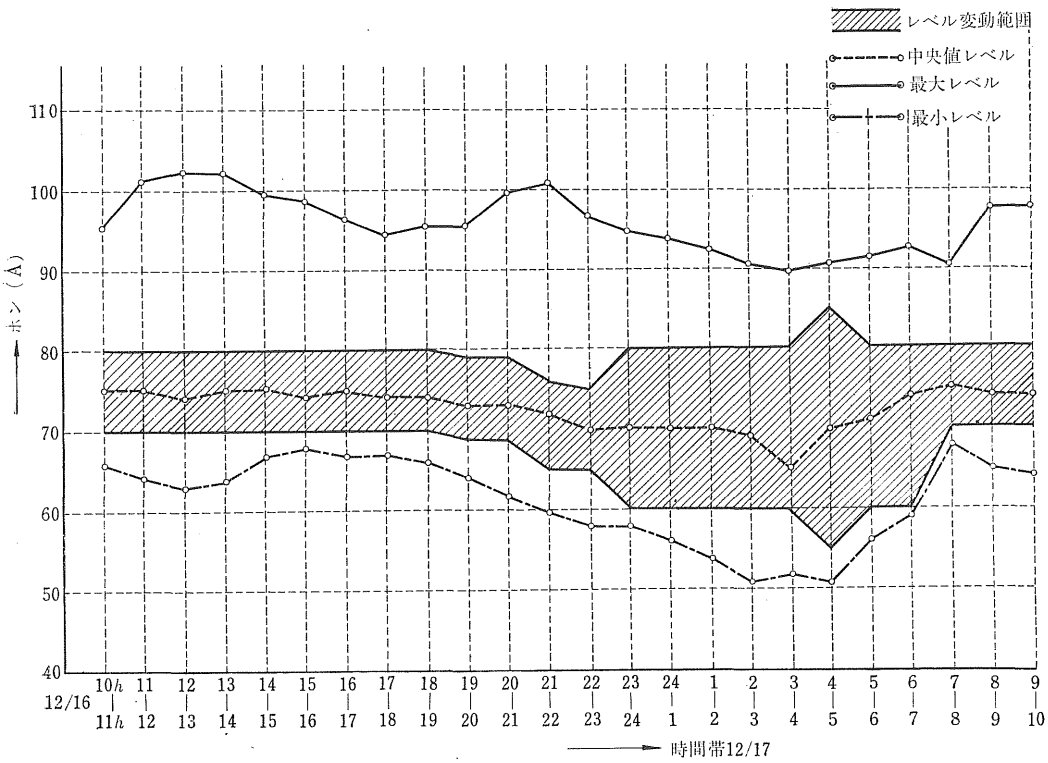


図3　道路公団横浜料金所における騒音レベル



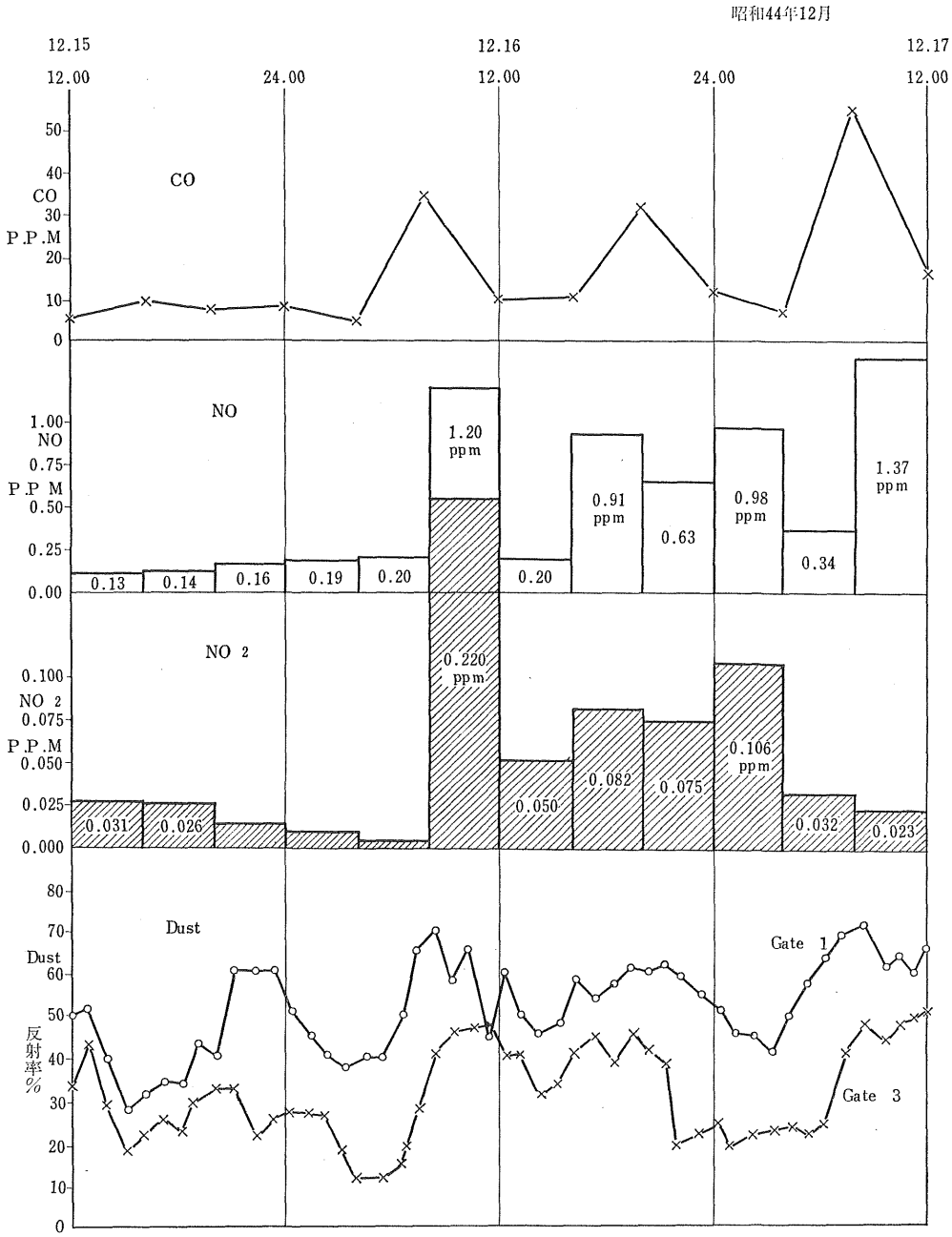
Ⅲ　調査の結果及び考察

1.　環境調査

調査の期間が冬季であったため，気温は夜間零下38°Cを記録したが（表2），夜間は風速がおとろえ，気温のわりには，比較的勤務しやすかった模様である。各ブースには石油ストーブによる暖房が行われているが，30分交替の勤務でもあり，この程度の暖房で一応満足すべきであろう。日中は第1，2日は3～5mの風が主として南西方向より吹き，かつ料金所の周辺が開豁地でもあるので，排気ガスの長時間の停滞も起らなかった。

紫外線の照射も冬期であることもあって，比較的弱

図4　横浜新道大気汚染物質増減曲線



く，問題とすべき強度ではない(図２)。

騒音変動範囲は平均75ホン最高80最低65でありやや騒音の強い勤務場所である。夜間交通量の減少時に最高85ホンの騒音が認められるが，交通量の減少により料金所通過後の急速発進が多いことが原因していると思われる。これらの強度騒音は休憩室，仮眠室まで影響する程度ではなかった(図３)。

有害ガス，一酸化炭素濃度は３～５ｍの風がある時には10ppm程度で問題はないと思われるが，無風状態の時には30～50ppm以上にもなる（図４)。(日本産業労働環境基準 100ppm)

一酸化窒素濃度は午前８時より正午にかけて高濃度を示し，1.20～1.37ppmとなった（図４)。

二酸化窒素濃度は最高0.22ppmであり，一酸化窒素を合計しても，労働環境基準５ppmに達しないので，労働環境条件は満している（図４)。

粉塵はハイボリューム，エアサンプラーによれば，平均0.74mg/m³，最高1.02mg/m³，最低0.45mg/m³，鉛量平均12.7μg/m³，最高17.2μg/m³，最低9.0μg/m³であり，無水珪酸量は平均0.12mg/m³，最高0.23mg/m³，最低0.03mg/m³である（図５)。

労働環境基準では粉塵総量 5mg/m³，鉛量0.15mg/m³，無水硅酸 1.0～1.5mg/m³ であり，いづれも基準を満足している。（一般に生活環境基準は労働環境基準の10分の１から 100 分の１とされている。)

参考のため，昭和43年度東京都庁前の最高の大気汚染値と比較すると，一酸化炭素，一酸化窒素二酸化窒素濃度及び粉塵総量は都庁前最高濃度より低いか又は同程度である。ただし粉塵テープエアサンプラーのみは高くなっている（図４)。

料金所の塵埃は炭素粒が多いため，色が黒くみえること，及び塵埃の時間的濃淡の差が大きいことなどから発塵の多い場所と考えられているが，これは見掛け上であって，塵埃総量ではそれほど問題とする程度ではない。

昭和43年度東京都庁前最高濃度（１時間値)

CO：40ppm，NO：1.82ppm，NO_2：0.25ppm

粉塵総量(デジタル)：3.06mg/m³

テープエアサンラプー反射率　37%

2.　勤務員の健康調査

(1)　コーネル健康指数（C.M.I.)（表３）

性格分類によれば，半数以上が正常であり，殆んどが正常に近い性格を持っている。やや病的傾向を持っているものが勤続３年以下と，３.１年以上に１名づつ認められた。

全般的に呼吸器系，消化器系の異常の訴えがやや多い傾向が認められるが，この訴えの数には勤続年数による差は認められない。

また，循環器系の訴えの数，精神的の訴えの数にも勤続年数による差は認められない。

図5　料金所大気汚染物質濃度曲線

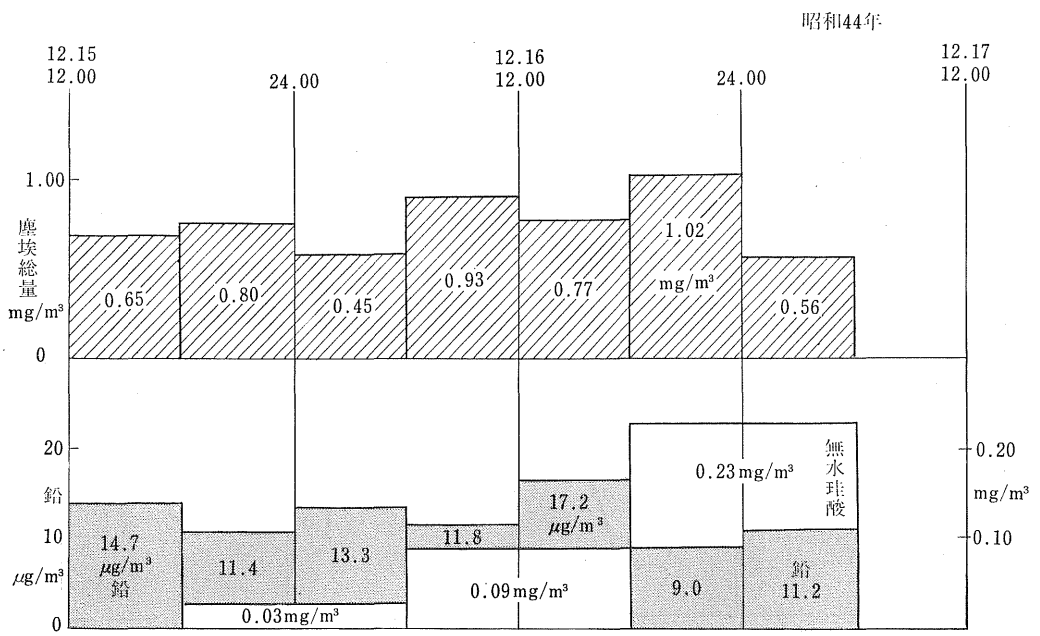


表3　コーネル健康指数調査解析

1.　勤続年数と性格分類

勤続年数＼性格分類	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	計
3年以下	6	4	1	0	11
3.1年以上	7	5	1	0	13

勤続年数による性格分類に差はない。
Ⅰ型：正常，Ⅱ型：正常に近い，Ⅲ型：やや病的傾向，Ⅳ型：病的

2.　C＋I＋J＝循環器系の訴えの数

勤続年数＼C＋I＋J	4以下	5以上	計
3年以下	9	2	11
3.1年以上	10	3	13

勤続年数による循環器系の訴えの数に差はない。

3.　M～R＝精神的な訴えの数

勤続年数＼M～R	5以下	6以上	計
3年以下	8	3	11
3.1年以上	11	2	13

勤続年数による精神的な訴えの数に差はない。

4.　B＝呼吸器系の訴えの数

勤続年数＼B	5以下	6以上	計
3年以下	5	6	11
3.1年以上	8	5	13

勤続年数による呼吸器系の訴えの数に差はない。

従って，C.M.I.調査によれば，勤続年数により，健康指数が低下することも増加することもない，つまり慢性的健康障害の心配はないと思われる。

(2)　血液尿検査

個人については1～2名軽度の異常所見を認めるが，集団として考えた場合，下記所見が認められる（表4）。

ア　40才以上の人に尿蛋白が疑陽性に出るものが多い。

イ　勤続年数3年以下の人に尿蛋白が疑陽性に出るものが多い。

ウ　血液像：血液中の鉛量(δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase)，尿中の鉛量（δ-Aminolevulinic Acid 量）は年令，勤続年数による差は認められない。

表4　血液像，尿所見解析

血液像

1.　年令により Stab％に差があるか？
　30才台以下　14.9±5.6（n＝15）
　40才台以上　15.9±4.5（n＝8）差なし

2.　勤続年数により Stab％に差があるか？
　3年以下　15.1±6.4（n＝8）
　3.1年以上　15.3±4.7（n＝15）差なし

3.　年令により淋巴球％に差があるか？
　30才台以下　34.4±4.2（n＝15）
　40才台以上　32.3±7.9（n＝8）差なし

4.　勤続年数により淋巴球％に差があるか？
　3年以下　33.6±8.2（n＝8）
　3.1年以上　33.7±4.1（n＝15）差なし

5.　血球中 δ-ALA-D 量（μmol Porphobilinogen/RBC100ml/1h）と年令
　30才台以下　43.7±12.7（n＝15）
　40才台以上　39.5±5.8（n＝8）差なし

6.　勤続年数により血球中 δ-ALA-D量（μmol PBG/RBC100ml/1h）に差があるか？
　3年以下　45.1±6.6（n＝8）
　3.1年以上　43.1±7.4（n＝15）差なし

尿所見

1.　年令により尿中 ALA 量に差があるか？
　30才台以下　3.97±1.54（n＝15）
　40才台以上　4.23±1.08（n＝8）差なし

2.　勤続年数により尿中 ALA 量に差があるか？
　3年以下　3.89±0.77（n＝8）
　3.1年以上　4.15±1.64（n＝15）差なし

3.　年令により尿蛋白疑陽性に差があるか？
　30才台以下　疑陽性以上　4/15
　40才台以上　〃　7/8　差あり
　40才台以上に蛋白疑陽性に出るものが多い。
　誤差率1％以下

4.　勤続年数により尿蛋白疑陽性に差があるか？
　3年以下　（±以上）　6/8
　3.1年以上　〃　5/15　差あり
　3年以下の人に蛋白疑陽性に出るものが多い。
　誤差率1％以下

以上から職場環境の慢性中毒が起こる恐れはないと考えられると同時に，収受員の年令と勤続年令の間に特殊な関係のあることを知った。即ち40才台以上に勤続3年以下のものが多く，この人達に尿蛋白疑陽性のものが多いことを示している。但し尿蛋白疑陽性は病的とは限らない。

表5　疲労調査結果解析（その2）

自覚疲労	全	日勤	夜勤
作業前	2.77±0.85 n=41	2.78±0.82 n=24	2.77±0.86 n=17
作業後	3.54±0.66 n=46	3.41±0.76 n=25	3.70±0.44 n=21

単位：度

自覚疲労		酸素吸入	酸素吸入なし
作業後		3.50±0.66 n=23	3.58±0.66 n=23
喫煙	有	3.64±0.52 n=17	3.55±0.74 n=13
	無	3.10±0.85 n=6	3.62±0.52 n=10

単位：度

触2点	全	日勤	夜勤
作業前	31.1±6.9 n=45	31.0±6.8 n=24	31.3±6.7 n=27
作業後	33.1±7.9 n=45	30.3±6.3 n=25	36.6±8.2 n=20

単位：mm

触2点		酸素吸入	酸素吸入なし
作業後		34.0± 7.8 n=23	32.1± 8.0 n=22
喫煙	有	35.6± 6.2 n=17	32.3± 5.3 n=12
	無	29.3±10.5 n=6	32.0±10.2 n=10

単位：mm

フリッカー	全	日勤	夜勤
作業前	46.9±9.9 n=45	51.3±6.1 n=24	44.3±8.9 n=21
作業後	45.1±8.7 n=45	42.0±8.7 n=25	48.9±7.4 n=20

単位：明滅回数/秒

フリッカー		酸素吸入	酸素吸入なし
作業後		41.0±13.7 n=23	45.1± 9.1 n=22
喫煙	有	45.7± 8.4 n=17	43.5± 9.1 n=12
	無	43.2± 8.3 n=6	41.6±14.2 n=10

単位：明滅回数/秒

3.　疲労検査（表5）

(1)　自覚疲労調査では作業によって疲労感が増加することが認められ，特に夜勤は日勤に比して自覚疲労度が高い。酸素吸入は喫煙をしない人には疲労感の増大を軽減する傾向を有するが，喫煙者にとっては何等の効果を示さない。

(2)　触2点弁別検査では，夜勤後の疲労度の増加は認められるが，日勤後の疲労度の増加は認められない。また，酸素吸入は喫煙をしないものに疲労度の増加を軽減する傾向を有するが，酸素吸入と喫煙の疲労度に及ぼす影響を比較すると喫煙の疲労度を増加する作用に比して酸素吸入の疲労度軽減作用は極めて小さいと考えられる。

(3)　フリッカー検査では，夜勤後の疲労度の増加が証明されず，かえって疲労度の減少を認めたが，これは夜明け現象，暗順応の生理的影響および数時間の仮眠などの影響が現われたものと考えられる。また作業後のフリッカー値は勤続年数の多いものに疲労度の少い傾向を認めた（表6）。

(4)　以上3種の疲労検査の結果は，日勤に比しし，夜勤の方が疲労度の増加が大きい傾向が認められる

表6　疲労調査結果解析

作業後について

1.

自覚疲労	平均値±標準偏差	n
3年以下	3.60±0.47	20
3.1年以上	3.50±0.75	26

単位：度

t=0.5　差なし

2.

触2点	平均値±標準偏差	n
3年以下	31.3± 8.5	19
3.1年以上	30.9±12.1	26

単位：mm

t=0.12　差なし

3.

フリッカー	平均値±標準偏差	n
3年以下	42.7± 9.0	19
3.1年以上	46.8± 8.3	26

単位：明滅回数/秒

t=1.54　差なし　(7%差あり)

疲労検査及び血中COHb量相互間の相関係数

	自覚疲労	COHb%	触2点	フリッカー
自覚疲労	1.000	0.273	0.209	0.041
COHb%	0.273	1.000	0.479**	0.066
触2点	0.209	0.479**	1.000	0.172
フリッカー	0.041	0.066	0.172	1.000

が，いづれも疲労の度合いが高いものとは考えられない。

4. 酸素吸入の効果の判定

(1) 血中のCOHb%量（表7）ブース附近の一酸化炭素濃度が常に10ppm以上（図6）もあることが原因しているのであろうか，あきらかに作業前に比して作業後の血中COHb%は増加している。但しいづれも4.5%を下まわる量であり，中毒発生域が10%以上であるから，ブース内環境のCO濃度がCO中毒を起させている事実はない。一方喫煙者は喫煙しない者に比

図6 CO 濃 度 分 布

17日 11時～11時30分

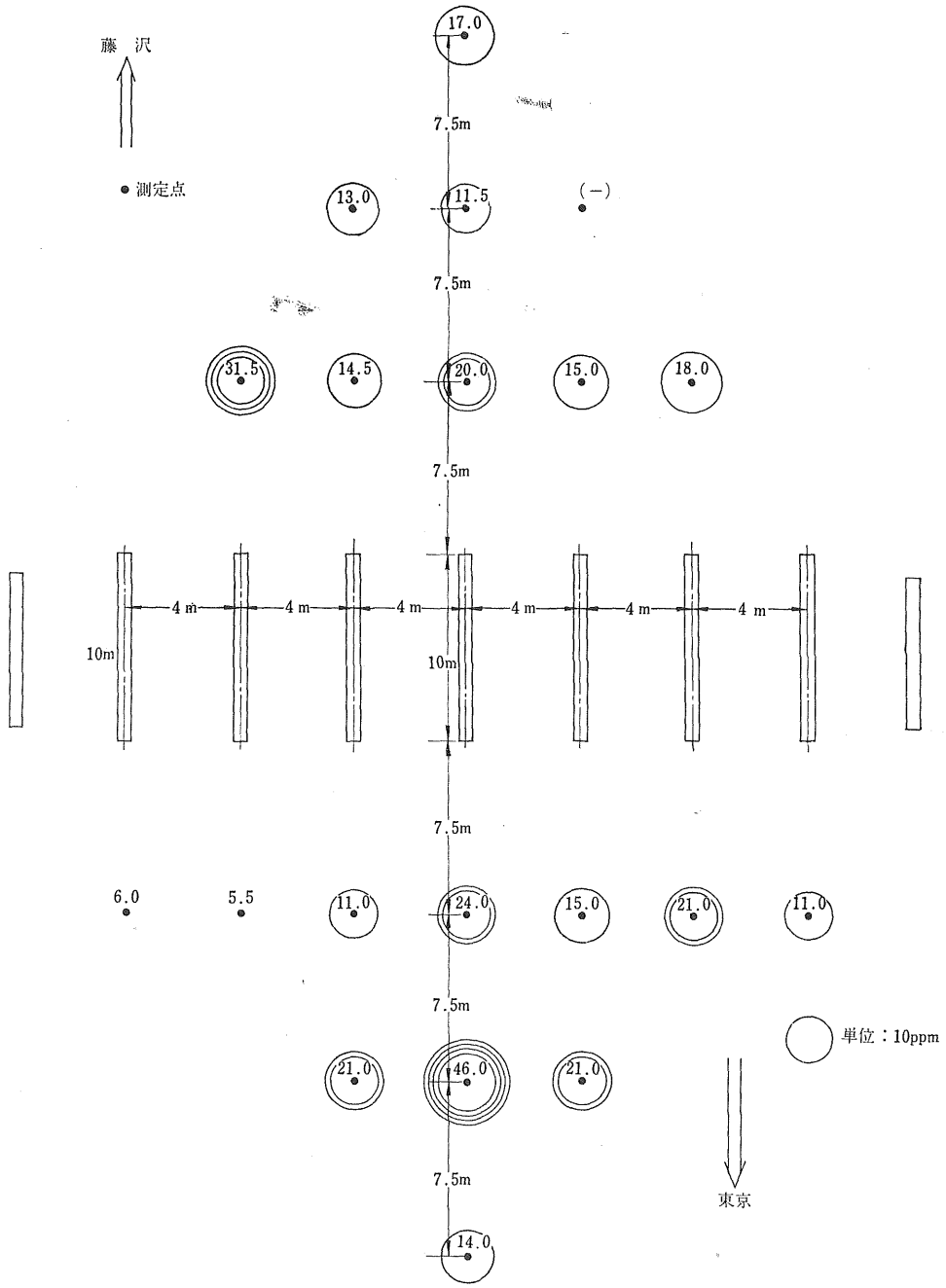


表7　収受員血中COHb%喫煙者との関係

血中COHb%	全	日勤	夜勤
作業前	2.3±0.8 n=45	2.3±0.6 n=24	2.4±1.1 n=21
作業中	2.7±1.0 n=33	2.5±0.9 n=12	2.9±1.0 n=21
作業後	3.0±0.9 n=46	2.8±0.9 n=25	3.1±0.8 n=21

血中COHb%		酸素吸入	酸素吸入なし
作業中		2.7±1.0 n=16	2.8±1.0 n=17
喫煙	有	3.2±0.8 n=11	3.3±1.0 n=10
	無	1.7±0.3 n=5	2.0±0.4 n=7

血中COHb%		酸素吸入	酸素吸入なし
作業後		3.2±0.8 n=23	2.8±0.9 n=23
喫煙	有	3.5±0.7 n=17	3.3±0.8 n=13
	無	2.2±0.3 n=6	2.1±0.3 n=10

喫煙者	全	日勤	夜勤
作業前	2.8±0.6 n=29	2.6±0.5 n=15	3.0±0.7 n=14
作業中	3.2±0.9 n=21	3.1±0.8 n=7	3.3±0.9 n=14
作業後	3.4±0.7 n=30	3.3±0.7 n=16	3.5±0.7 n=14

喫煙者しない	全	日勤	夜勤
作業前	1.6±0.3 n=16	1.7±0.2 n=9	1.4±0.2 n=7
作業中	1.9±0.4 n=12	1.7±0.2 n=5	2.0±0.4 n=7
作業後	2.1±0.4 n=16	1.9±0.2 n=9	2.4±0.2 n=7

して血中のCOHb%が高く，喫煙は作業環境のCOより，人体に影響を強くあらわしている。喫煙の有無にかかわらずいづれも作業につくことによって，COHb増加が認められることは作業環境のCO濃度及び作業中の喫煙と作業場の暖房器により発生するCOガスによる増加と考えられる。特に夜勤のものの作業後の増

表8　そ　の　他

1. 平均年令35.1才（124名）

2.

	10—20代	30才台	40才台	計
日勤	20	17	23	60
夜勤	12	33	19	64

30才台の夜勤者が多い

3.

	10—20代	30才台	40才台	計
喫煙有	18	24	38	80
無	14	26	4	44

40才台になると喫煙者が多い

4.

勤続＼年令	30才台以下	40才台
3年以下	26	24
3.1年以上	57	18

40才台に勤続年数の短いものが多い

5. 勤続年数

1年以下	25名	5年以下	10名
2年以下	11名	6年以下	21名
3年以下	13名	7年以下	8名
4年以下	33名	7.1年以上	3名

平均勤続年数　3.5年

自覚疲労	平均値±標準偏差	n
3年以下	3.27±0.71	34
3.1年以上	3.09±0.97	53

差を認めない

触2点	平均値±標準偏差	n
3年以下	32.3±6.3mm	33
3.1年以上	31.1±9.1mm	53

差を認めない

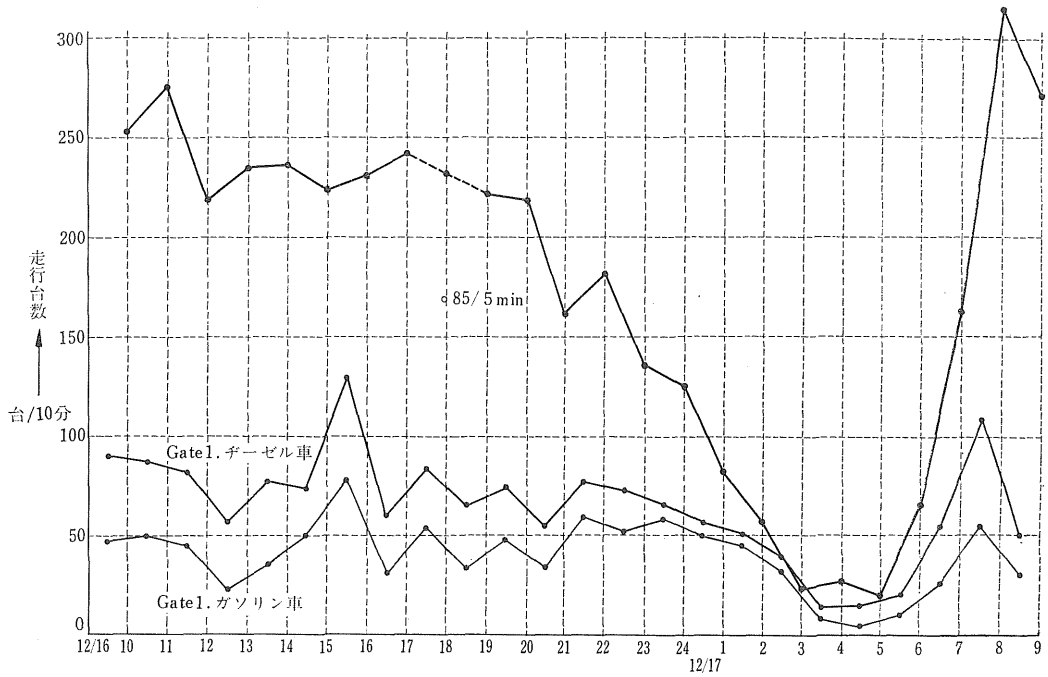
フッリカー	平均値±標準偏差	n
3年以下	45.0±8.7	33
3.1年以上	48.5±7.6	53

差は認めない

加が日勤に比して多いことからゲート通過車両の増加による排気ガス増加によるCOHb%の増加ではなくして，暖房器具から発生するCOガスによるCOHb増加であろう。

(2) 酸素吸入はブースにおける料金収受作業をはなれ詰所に帰った直後2分間実施したが，血中 COHb

図7　道路公団横浜料金所における下り方向交通量分布



量には有意義な効果を認めることは出来ない。喫煙有無にかかわらず効果はないものと考えられる。

従って，酸素吸入が自覚疲労，触2点弁別に効果を認めたとしても，これ等は心理的な影響が大であろう。従って心理的効果をねらって酸素吸入を実施しても，いづれは効果を失うことは明らかである。よって酸素吸入を実施することは無効であろう。

それよりも，喫煙を止めることが，健康のためには最もよいことであるし，しかもゲートの作業環境は粉塵有毒ガスの発生する環境であるから，禁煙を先づ行うことが必要であろう。次いでCOを発生する恐れのある暖房器具を努めて使用しないこと。即ち電熱器，赤外線灯或は煙突付きの暖房器を使用すべきであろう。

5.　その他

収受員の平均年令は35.1才（延124名）であり，30才台の夜勤者が多いことが認められ，40才台になると喫煙者が非常に多いことが認められる。また40才以上では勤続年数の短いものが認められる（表8）。

Ⅳ　結　　語

自動車排気ガス公害が大きな社会問題となっている現在においては，有料道路の料金所の作業環境が健康に有害であるかどうかは，そこに働く料金収受員にとって，また有料道路経営者にとって重大な関心事である。われわれは今回の調査結果から，収受員の作業環境は，労働環境基準からすれば，不良環境の範囲には入らないことを知った。しかも年中無休の営業状態にあって，よく合理的な勤労管理が実施されており，またよりよい作業環境を作るように労使ともに努力しているのを認めることが出来た。特に酸素吸入によって少しでも大気汚染の障害を改善するこころみを計画されたようであるが，今回の調査によっては酸素吸入の有効さを認めることは出来なかった。

本調査にあたり，日本大学医学部公衆衛生学教室西川滇八教授，東京大学医学部衛生学教室和田攻講師，倉科周介助手はじめ二教室の研究員諸氏の御支援を得たことを厚く感謝する次第である。

参　考　文　献

1）日本薬学会編：衛生試験法注解，改訂第2版，1965
2）多田治：有害物管理のための測定法，第Ⅰ部，無機編，労働科学叢書，24
3）K. Nakao, O. Wada, Y. Yano ; Clin. Chem. Acta, 19, 319～325, 1968
4）金井泉：臨床検査法提要，改訂第24版，1966
5）O. Wada, K. Toyokawa, et al : Brit. J. industr. Med. 26, 240～243, 1969
6）労働科学研究所：労働衛生ハンドブック改訂第

4版，1966
7) Ringold et al: Arch. Environ. Health, 5 (4), 308～318. 1962
8) 大気汚染研究全国協議会第3小委員会：大気汚染ハンドブック，1965，コロナ社

水道水中のアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の同時検出について(第II報)

木村康夫* 山崎堅吉*
中村弘*

SIMULTANEOUS DETECTION OF AMMONIA AND NITRITE NITROGEN IN TAP WATER (II)

Yasuo KIMURA, Kenkichi YAMAZAKI
Hiroshi NAKAMURA

Department of Water Analysis, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

Summary

Following the previous report, experimental studies on the possibilities of simultaneous detection of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen, were made with tap water originated from a deep well water. The addition of chlorine and iron powder to the deep well water, containing 0.6ppm of ammonia nitrogen, caused formation of 0.004~0.014ppm of nitrite nitrogen, while the same treatment made on the standard ammonium carbonate solution, containing 0.6ppm as ammonia nitrogen, does not produce any nitrite nitrogen.

1. はじめに

アンモニア性窒素を含む深井戸水を原水とする専用水道などにおいて，法[1]定通り塩素消毒が行われていてもアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素が同時に検出され，水道法水質基準に不適となる場合がしばしば見られる。このことについて，第I報[2]でアンモニア性窒素を含む深井戸水を塩素消毒した場合，不連続点前の塩素注入で0.001～0.003ppm程度の亜硝酸性窒素が生成されることを報告した。また，更に残留塩素の他に鉄の影響が加わると，亜硝酸性窒素の生成量が増加するものと推定されたので，今回はこの残留塩素と鉄の影響について以下のような実験を試みた。

2. 実験

2—1 試薬及び装置

2—1—1 pH調整液：重炭酸ナトリウム $NaHCO_3$ 2.10g及び炭酸ナトリウム Na_2CO_3 2.65gを蒸留水にとかして100mlとした。

2—1—2 アンモニア性窒素標準液：炭酸アンモニウム $(NH_4)_2CO_3 \cdot H_2O$ 0.8143gを蒸留水にとかして1lとした。本液1mlはアンモニア性窒素0.1mgを含む。

2—1—3 塩素溶液：次亜塩素酸ナトリウム液（有効塩素4.0%）を蒸留水で100倍に希釈した。本液1mlは0.4mgの有効塩素を含む。

2—1—4 分光光度計：島津QV—50型，10mmおよび20mmセル使用。

2—1—5 pHメーター：東亜電波 model HM-A ガラス電極

2—2 試験法

2—2—1 水素イオン濃度：ガラス電極法。

2—2—2 アンモニア性窒素：ネスラー法およびインドフェノール法。

2—2—3 亜硝酸性窒素：GR法

2—2—4 残留塩素：オルトトリジン法

* 東京都立衛生研究所

2—3　実験方法

2—3—1　アンモニア性窒素 0.6ppm を含む深井戸水（井深 160m，pH7.8，アンモニア性窒素 0.60ppm，亜硝酸性窒素 0 ppm，硝酸性窒素 0 ppm，塩素イオン 7.1ppm，過マンガン酸カリウム消費量 1.07ppm，大腸菌群(−)（50m*l* 中），一般細菌数 0（1 m*l* 中）]に Table. 1 に示す量の塩素（次亜塩素酸ナトリウム溶液）および鉄粉（試薬）を加えよく混和したのち，直ちに亜硝酸性窒素および残留塩素を測定し，そのまま室温に静置し 6 時間後，24時間後にも同様な測定を行なった。

2—3—2　アンモニア性窒素 0.6ppm を含むアンモニア標準溶液を pH 調整液を用いて pH7.8 とし，上記と同様に塩素および鉄粉を加え，よく混和したのち，直ちに亜硝酸性窒素および残留塩素を測定し，6 時間後，24時間後にも同様な測定を行った。

3.　**結果および考察**

3—1　アンモニア性窒素を含む深井戸水を用いて行なった実験においては，Table. 2 および Fig. 1～Fig. 4 に示すように，塩素注入量が不連続点以下の場合において，亜硝酸性窒素の生成は，塩素のみを添加した場合（Fig. 1）に比較して，塩素および鉄粉を

Table. 1　Preparation of Samples

Sample Number	Deep Well Water (Contain 0.6ppm Ammonia Nitrogen)	Added Chlorine	Added Iron Powder
1—1	200m*l*	0.06mg　(0.3ppm)	0mg
1—2	200	0.06	5
1—3	200	0.06	10
1—4	200	0.06	50
2—1	200	0.12　(0.6ppm)	0
2—2	200	0.12	5
2—3	200	0.12	10
2—4	200	0.12	50
3—1	200	0.20　(1.0ppm)	0
3—2	200	0.20	5
3—3	200	0.20	10
3—4	200	0.20	50

Table. 2　Detection of Nitrite Nitrogen and Residual Chlorine

Sumple Number	Immediately After		6 hrs After		24 hrs After	
	Nitrite Nitrogen	Residual Chlorine	Nitrite Nitrogen	Residual Chlorine	Nitrite Nitrogen	Residual Chlorine
1—1	0　ppm	0.14ppm	0　ppm	0.14ppm	0　ppm	0.13ppm
1—2	0	0.09	0	0.08	0.007	0.05
1—3	0.002	0.04	0.002	0.02	0.007	0.01
1—4	0	0.02	0.001	0.00	0.006	0.00
2—1	0	0.36	0	0.35	0.001	0.33
2—2	0	0.22	0	0.18	0.005	0.15
2—3	0.001	0.13	0.003	0.08	0.006	0.02
2—4	0	0.05	0.004	0.00	0.010	0.00
3—1	0	0.72	0	0.71	0.002	0.70
3—2	0	0.48	0.002	0.42	0.004	0.31
3—3	0.002	0.34	0.002	0.30	0.009	0.20
3—4	0	0.20	0.004	0.11	0.014	0.02

Fig. 1 Detections of Nitrite Nitrogen and Residual Chlorine (iron powder 0mg)

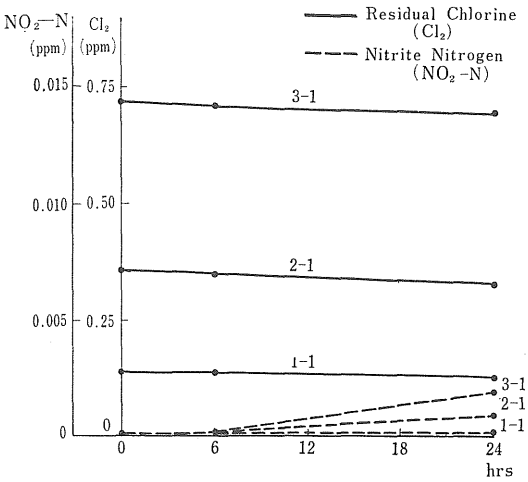
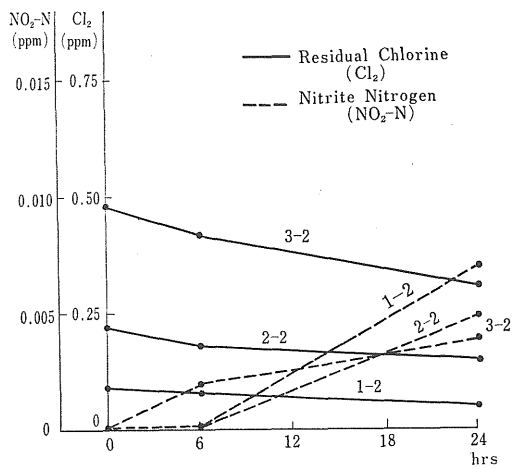


Fig. 2 Detections of Nitrite Nitrogen and Residual Chlorine (iron powder 5 mg)



添加した場合（Fig. 2～Fig. 4）の方がはるかに多く，また鉄粉の添加量の多い程，およびその接触時間の長い程，亜硝酸性窒素の生成量が多かった。しかし，鉄粉は残留塩素を消費するため，逆に鉄粉の添加量の多い程，接触時間の長い程，残留塩素は少なくなる。即ち，アンモニア性窒素を含む深井戸水を塩素消毒する場合，塩素注入量が不連続点以下の場合，鉄管などの鉄が露出していると残留塩素が鉄により消費され，亜硝酸性窒素が生成され易くなり，法定通り残留塩素が存在しても，アンモニア性窒素と亜硝酸性窒素

Fig. 3 Detections of Nitrite Nitrogen and Residual Chlorine (iron powder 10mg)

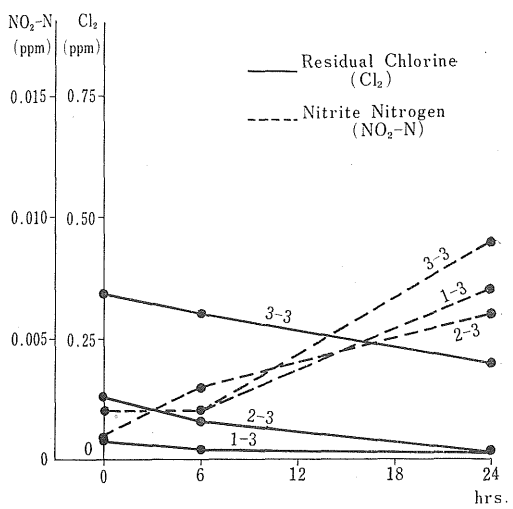
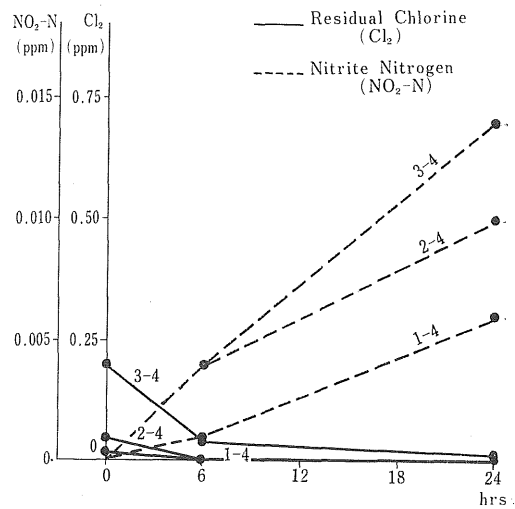


Fig. 4 Detections of Nitrite Nitrogen and Residual Chlorine (iron powder 50mg)



の同時検出が起りうることがわかった。

3—2 炭酸アンモニウムより調整したアンモニア性窒素標準液で行なった実験では，亜硝酸性窒素の生成はみられなかった。

4. むすび

深井戸水中のアンモニア性窒素は一般のアンモニウムイオンと性質を異にする特異な性質をもち，(1)非常に空気酸化をうけやすく，容易に亜硝酸性窒素に酸化

されること，(2)不連続点以下の塩素消毒では0.001～0.003ppm 程度の亜硝酸性窒素を生成すること。を第1報で報告したが，更に，塩素消毒のほかに鉄の影響が加わると，亜硝酸性窒素の生成が促進され，法定通り塩素消毒が行なわれても，容易にアンモニア性窒素と亜硝酸性窒素の同時検出が起りうることがわかった。

参考文献

1) 水道法（昭和32年，法律177号）
2) 東京都立衛生研究所年報20（昭和44年）p. 123

BOD試験を妨害する物質について

三村秀一* 山崎堅吉*
笹野英雄*

STUDIES ON GROWTH INHIBITORS OBSTRUCTING BOD TEST

Shuichi MIMURA, Kenkichi YAMAZAKI
and Hideo SASANO

Department of Water Analysis, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

Summary

Reliable results of the BOD test can only be expected on the samples in which micro-organisms are propagating naturally. Thus, water samples contaminated by the growth inhibitory substances are not suitable for the BOD test. Further more, most of the inhibitory substances are difficult to remove from the specimens, as the chemical means of removing of the obstructing substances would change the water quality itself. Minimum concentrations of the obstructing substances in the diluted samples were calculated (in ppm) as follows: Ag, less than 0.0005; org. Hg, 0.05; inorg. Hg, 0.05; Cu, 0.15; Cr, 0.15~0.25; Ni, 0.25; Al, 1.0~1.5; Pb, 2.5; Cd, 2.5; CN, 2.5~3.5; Fe^{2+}, 2.5~3.5; Zn, 2.5~5.0; LAS, 25~35 and ABS, 25~50. The order of the BOD obstracting gradient was Ag, org. Hg, inorg. Hg, Cu, Cr, Ni, Al, Pb, Cd, CN, Fe^{2+}, Zn, LAS and ABS.

緒　　言

BOD（生物化学的酸素要求量）とは，水中の汚染源となり得る物質が生物化学的に酸化されるために消費する酸素量をあらわしたものであり，排水中の有機物質が自然状態で酸化される場合に最も近い条件のもとで生物化学的反応に基づいて試験を行なうものであるから，河川汚濁の原因である有機物質の指標としては最も適当な資料となるものである。河川や工場排水の水質基準にはBOD（Biochemical Oxygen Demand）が規制されているが，BOD試験を行なうに際しては好気性菌の生存または活動を妨害する物質を除去しなければならないとされている。そこでBOD試験を妨害する物質を除去する方法が問題となってくる。

酸，アルカリは中和することにより，また残留塩素は亜硫酸ソーダやチオ硫酸ソーダにより処理することが出来るが，妨害物質と思われる大部分のものは検水そのものに変化を与えないで妨害物質のみを除去する事は非常に困難である。そこで著者等はBOD測定における妨害物質の除去法を見出すべく，その第一段階として各種無機金属，有機水銀，シアンおよび合成洗剤（ソフト型，ハード型）のBOD試験におよぼす影響を検討したので報告する。

実　験　の　部

1. 実験試料

実験に供した原水は，*l*-グルタミン酸をBOD試験稀釈水に溶解し，これに植種源として，残留塩素の存在しないし尿浄化槽放流水を加え，BOD値を約100 ppmとしたものを用いた。妨害物質の対照として用いた薬品および溶解度は次の通りである。

* 都立衛生研究所　水質試験部

	薬　品	溶解度
a） Al	…$K_2Al_2(SO_4)\cdot 24H_2O$	11.4^{20}
b） Cr	…K_2CrO_4	62.9^{20}
c） Fe	…$FeSO_4(NH_4)_2SO_4\cdot 6H_2O$	18.0°
d） Ni	…$NiSO_4(NH_4)_2SO_4\cdot 6H_2O$	10.4^{20}
e） Cu	…$CuSO_4\cdot 5H_2O$	31.6°
f） Zn	…$ZnSO_4\cdot 7H_2O$	96.5^{20}
g） Pb	…$Pb(NO_3)_2$	56.5^{20}
h） CN	…KCN	易
i） Cd	…MetalCd(+HNO_3)	215.0°
j） Org・Hg	…CH_3HgCl	
k） inOrg・Hg	…$HgCl_2$	6.9^{20}
l） Ag	…$AgNO_3$	122.0°
m） ABS	…$CH_3(CH_2)_{11}C_6H_4SO_3Na$	
n） LAS	…KAOMX-1542	

2. 実験方法

原水のＢＯＤ値を100％とした時と，原水に（ａ）～（ｎ）の物質を加えた時のＢＯＤ値を比較し，ＢＯＤ試験への妨害率を算出した。なお上記のＢＯＤ値は標準稀釈法の20°Ｃ，５日間による値であり，稀釈倍数は20倍稀釈のものが５日間酸素消費率が，40～70％の範囲に入ったものである。ＤＯ（溶存酸素）測定は，柴田ミラー変法を用いた。妨害物質の対照として用いた薬品と原水との接触時間は５～20分である。

3. 実験結果および考察

Fig. 1 Effect of Aluminium on BOD test

Concentration : in diluted samples

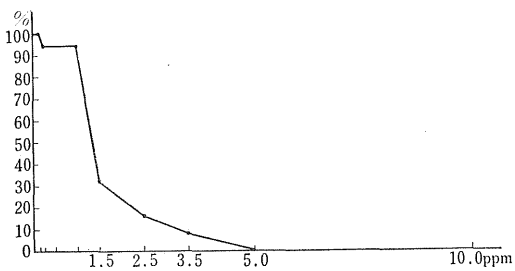


Fig. 2 Effect of Chromium on BOD test

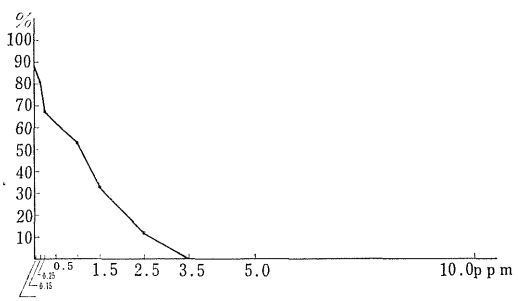


Fig. 3 Effect of chromium on BOD test

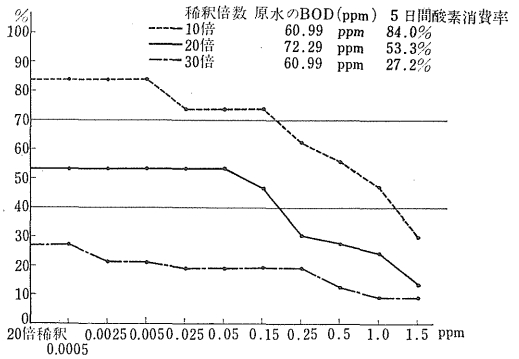


Fig. 4 Effect of Iron on BOD test

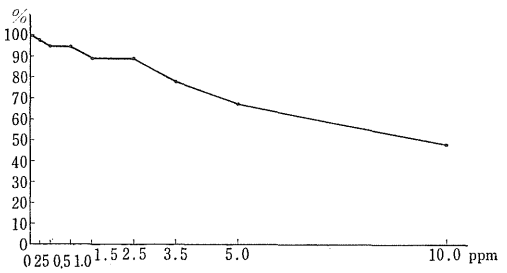


Fig. 5 Effect of Nickel on BOD test

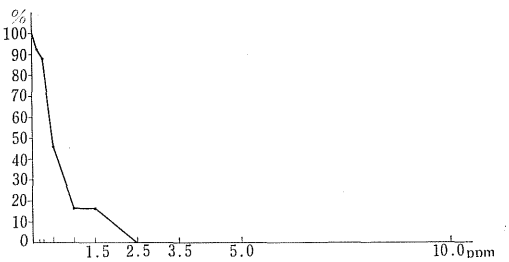


Fig. 6 Effect of Copper on BOD test

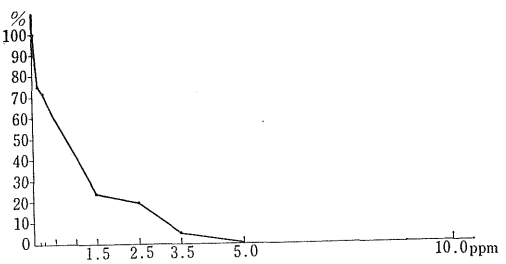


Fig. 7 Effect of Zinc on BOD test

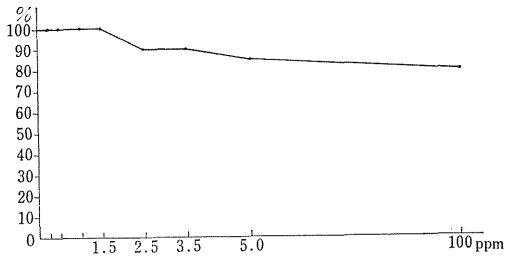


Fig. 8 Effect of Lead on BOD test

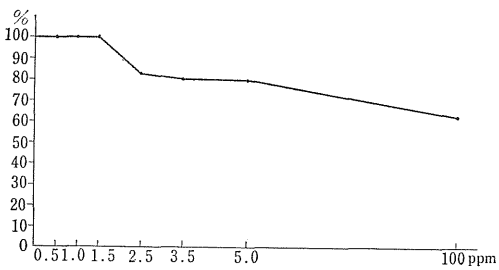


Fig. 9 Effect of Cyanide on BOD test

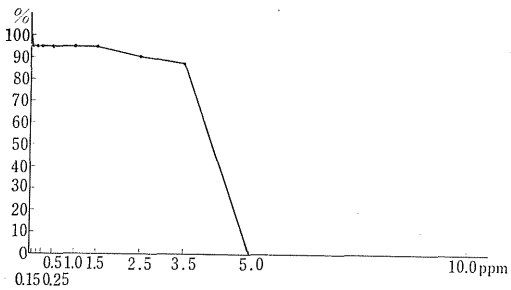


Fig. 10 Effect of Cyanide on bacterias

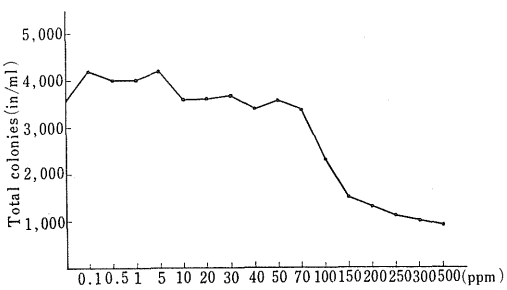


Fig. 11 Effect of Cadmium on BOD test

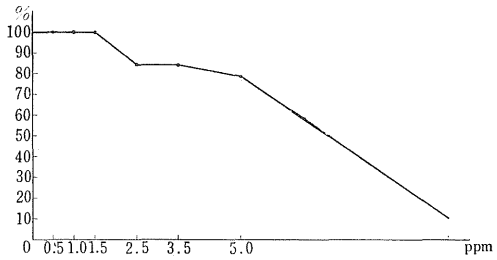


Fig. 12 Daily change of oxygen demand of Cadmium on BOD test

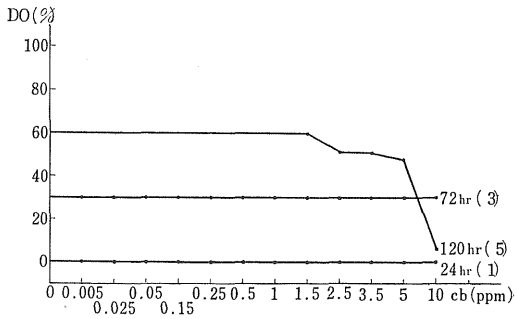


Fig. 13 Effect of Mercury on BOD test

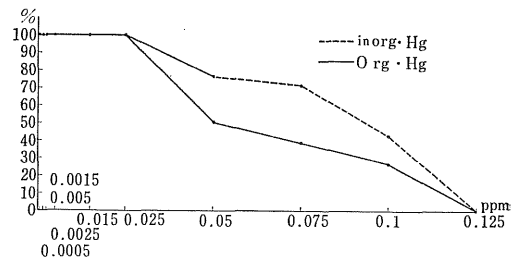


Fig. 14 Effect of ABS (Hard type) on BOD test

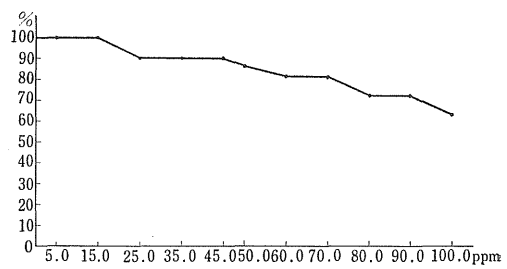
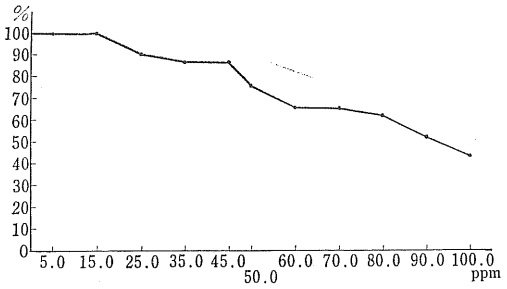


Fig. 15 Effect of LAS(Soft type) on BOD test



a）アルミニウム（Al）

Al^{3+} は水中で通常水分子を配位し，$Al(H_2O)_6^{3+}$ などの形で存在する。現在および今後とも軽金属の主成分として広く用いられるものと思われる。今回のBOD試験における原水中の Al の濃度は，溶解度からみて完全に溶解していると推定される。

そこで Table. 1 および Fig. 1 により Al のBOD試験におよぼす影響をみると，ふらん瓶中濃度で1.5ppm になるとBOD 試験は大きく妨害され，原水BOD値の32%に相当する値になる。したがって1.5ppmでは5日間酸素消費量も40～70%の範囲から大きくはずれる。妨害物質による酸素消費量の問題については，今回行なった全妨害物質に共通のことであるので，b）クロミウム（Cr）のところで述べる。

b）クロミウム（Cr）

クロミウムの大きな用途はメッキであり，また合金（ステンレス，ニクロム等）として重要なもので需要が極めて多い。Table. 1 および Fig. 2 により Cr のBOD 試験におよぼす影響をみると，ふらん瓶中濃度で0.15ppmになるとBOD 値は80.95% となり，3.5ppm では0%を示す。Fig. 3 はBOD試験における5日間の酸素消費率への影響を示したものである。BOD値は5日間酸素消費率が40～70%の範囲内のものを適用するという定義からみると，稀釈倍数を10，20，30倍にとった場合，5日間の酸素消費率が40～70%の範囲に入るものは20倍稀釈のものであり，この値を真のBOD値と考えてよい。次の表はクロムのふらん瓶中濃度と各稀釈倍数による5日間酸素消費率を示したものである。

BOD値の計算には5日間酸素消費率が40～70%のものを採用する。これから原水(0)のBOD値は20倍のもの（酸素消費率53.3%）を採用することになるが，20倍稀釈のものでもCr 濃度が0.25ppm を越えると酸素消費率40%以下となり，BOD値の計算に適しなくなる。

Cr(ppm)	10 倍	20 倍	30 倍
0	84.0 %	53.3 %	27.2 %
0.0005	〃	〃	〃
0.0025	〃	〃	21.0
0.005	〃	〃	〃
0.025	72.8	〃	19.0
0.05	〃	〃	〃
0.15	〃	46.8	〃
0.25	62.0	30.4	〃
0.5	54.4	27.8	12.3
1.0	47.0	26.0	9.0
1.5	30.0	23.4	〃

一方原水の酸素消費率が84.0%であった10倍稀釈のものが，Cr 濃度で 0.25～1.0ppm まで酸素消費率40～70%の範囲に入り，理論上はBOD値計算に適する倍数となる。この結果真のBOD値は20倍稀釈のもので計算されるものが，Cr を 0.25ppm 入れてやると10倍稀釈で計算されることになり，BOD値は約½の値で示されることになる。したがって妨害物質の存在する検水のBOD値を得るためには，酸素消費率40～70%の稀釈倍数のものを選び，その中から結論で述べているBOD試験を妨害する最小濃度以下のものを用いる必要がある。

c）鉄（Fe^{2+}）

地球上に広くかつ多量に存在する元素で，合金(鋼，マンガン鋼，ステンレス，ニッケル鋼，フエリシリコン，その他）としてあらゆる分野に用いられる。したがって排水中には広く存在する。Table. 1 および Fig. 4 よりふらん瓶中濃度で3.0ppm 附近がBOD値80%位と推定され，3.0ppm 以上になると徐々に妨害され，グラフはなだらかな線を描いている。

d）ニッケル（Ni）

メッキに使用されるほか器具の製造，合金成分など用途が多い。Table. 1， Fig. 5 よりふらん瓶中濃度で0.25ppm を境として急激に妨害され，2.5ppm ではBOD値が0となる。

e）銅（Cu）

銅の用途は非常に多く，電線その他電気関係資材，日用諸器具の製造にまた種々の合金の成分などに広く使用されている。銅イオンは，わずかに存在しても生物の正常な発育を阻害すると言われているが，Table.

1，Fig. 6 からみても妨害率は大きく，ふらん瓶中濃度 0.15ppm でＢＯＤ値が75％と低くなっている。ＢＯＤ試験に用いる蒸留水はその製造装置に銅が使用されているものについては注意を要する。

ｆ）亜鉛（Zn）

亜鉛を含む合金には，真鍮，洋銀など重要なものが多く，また電池，トタン板の製造等にも用いられている。そのた鉛と並んで水道等にも使用されている。亜鉛は今回実験を行なった金属中では最も妨害率が小さく Fig. 7 のような妨害傾向であった。

ｇ）鉛（Pb）

鉛は板，管などとし，また蓄電池の電極，硫酸製造の鉛室などに用いられる。その他ハンダー活字金などの成分として用途は大きい。ＢＯＤ試験妨害率は想定していたよりも小さく，亜鉛と大差なかった。(Fig. 8)

ｈ）シアン（CN）

工場排水中のシアン化合物は酸性側で容易に猛毒性のシアン化水素に変り，人体に関してはシアン化水素 0.025ppm を含む空気中では数時間後にわずかながら毒性の症状があらわれるが，0.12ppm では１時間以内で危険であり，2.5ppm では致命的であるとされている。そこでＢＯＤ試験においても低濃度で妨害があらわれるものと考えて試験してみた。その結果 Table. 1，Fig. 9 のような値および傾向を得たが，当初予想していたよりシアンによる影響が小さかったので，そこで一般細菌数と大腸菌群に対するシアンの影響を調べてみた。

Fig. 10 はシアンによる一般細菌数への影響を示したものである。一般細菌に対しては 70ppm 附近でその影響があらわれている。大腸菌群に対してはシアンの影響はほとんど認められなかった。なおシアンを分解する水生真菌類の報告等があり，これらが河川，湖沼，内湾等の水中，ベントスなどからしばしば分離されると言われている。このようなことも考慮に入れてシアン分解菌が存在していないと思われるし尿浄化槽放流水を植種源に用い実験を行なったわけであるが，ふらん瓶中濃度で 3.5ppm を境にしてシアンによる影響が大きくあらわれている。

ｉ）カドミウム（Cd）

天然には常に亜鉛に伴って産出し，易融合金（ウッドの合金，リポウイッツの合金など）や標準電池に用いられている。近時イタイイタイ病の原因物質はカドミウムであるとして問題となった金属である。カドミウムのＢＯＤ試験におよぼす影響は Fig. 11 に示した通り，ふらん瓶中濃度 1.5ppm で妨害を受けている。Fig. 12 はカドミウムのＢＯＤ試験におよぼす影響を経日的にみた表である。これによると１日目は原水および各濃度の試料とも酸素の消費が全然行なわれず，３日目で原水および 0.005，0.025，0.05ppm までの濃度のものが酸素消費が行なわれ，0.15ppm 以上の濃度ではまだ酸素の消費が行なわれなかった。５日目に入ると 0.15ppm 以上の濃度のものも酸素の消費が行なわれ，2.5ppm で原水ＢＯＤ値の 84.21％，10ppm で 10.52％を示した。この結果からカドミウム 0.15 ppm 以上のものは３日目から酸素消費が確認され，1.5ppm までは５日間の総計では原水のＢＯＤ値と同じ値を示した。カドミウムによる妨害は 2.5ppm からあらわれている。

ｊ）塩化メチル水銀（CH_3HgCl）

有機水銀の公害として水俣病が大きく取上げられ，これに関して検討された結果が多数報告されている。この中で水俣湾貝中の有機水銀は CH_3HgCl と言われているが，この CH_3HgCl は 5 N-NaOH 液中で 110°C，６時間，６N-HCl 液中で 105°C，４時間処理しても有機性を保持しているとの報告が，熊本大医学部衛生学教室よりされている。また無機水銀が有機水銀へ転化するとの報告等もある。水銀のＢＯＤ試験へおよぼす影響についての検討は，ｋ）の無機水銀の項で比較検討することにする。

ｋ）塩化第二水銀（$HgCl_2$）

水銀は銀白色流動性の金属で，常温で液体である唯一の金属である。融点は −39°C で金属中最低，沸点は 356.9°C でかなり底く，したがって蒸発性で水銀蒸気となり，これは猛毒である。用途は温度計，気圧計，医薬，水銀燈，水銀塩類，アマルガムおよび朱の製造，治金における混汞法，理化学実験用などとして広く用いられている。$HgCl_2$ は蛋白質と結合を起すので猛毒であり，これを利用して希薄液を消毒剤，殺菌剤として用いられている。

（有機水銀 CH_3HgCl と無機水銀 $HgCl_2$ の比較）

Table. 2 および Fig. 13，14 に示したのが両者のＢＯＤ試験へおよぼす影響をあらわしたものである。水銀（Hg）濃度は有機水銀は CH_3HgCl，無機水銀は Hg として表わした。したがって CH_3HgCl 量の約 $\frac{4}{5}$ が CH_3HgCl 中の Hg 量に相当する。Table. 2 および Fig. 12 は無機水銀より有機水銀の方がＢＯＤ妨害率の大きいことを示し，いずれもふらん瓶中濃度で 0.025〜0.05ppm 間で妨害の影響があらわれはじめている。そして 0.125ppm で酸素消費が全く行なわれなくなる。

l）銀（Ag）

銀は装飾品，各種銀器具として使用されているが，その外薬用のコロイド銀は強殺菌防腐力があり，水剤，軟膏剤として用いられる。性質としては熱，電気の最良導体で延性，展性もきわめて大きい。空気中で熱しても酸化されないが，硫化水素，オゾンなどがあれば鋭敏に反応して硫化銀 Ag_2S，過酸化銀 Ag_2O_2 を生じ，黒変する。Ag には強殺菌防腐力があることからＢＯＤ試験を相当妨害するであろうことは推定されたが実際にも Table. 2 のごとく，ふらん瓶中濃度で 0.0005ppm の低濃度でもＢＯＤ試験を 100％妨害している。銀は今回実験を行なった金属中では最も妨害率が大きかった。

m）ＡＢＳ（Alkyl Benzene Sulfonates）

近年石油化学の発達により，洗剤として界面活性剤が用いられるようになった。最初から用いられている界面活性剤はＡＢＳ（Softtype）である。この物質に関する問題点は２つあり，１つはこの化合物が 1 ppm 程度の濃度で目に見える泡を作ること，他の１つは下水処理場で分解されないことである。また人体におよぼす影響については 500ppm 程度までは人間に生理的な反応を起させないという報告もある。しかし公害問題としては上記の２問題が大きくクローズアップされ，ＡＢＳの誘導体であるＬＡＳ（Linear Alkylate Sulfonate）をＡＢＳの代りに生産するようになった。ＡＢＳのＢＯＤ試験におよぼす影響は次項のｎ）ＬＡＳのところで比較検討する。

ｎ）ＬＡＳ（Linear Alkyl Benzene Sulfonate）

最近，合成洗剤が分解され難いＡＢＳから生物分解を受け易いＬＡＳに切替えられているが，現実には腐敗そう，貯留そう，一次処理のみの下水処理場などで嫌気的または半好気的な条件で処理された放流水中には，かなりの洗剤が残留しており，I.ＡＳでもこのような条件下では完全な生物分解を受けないのである。そこで工場排水，その他の排水中に合成洗剤が含有される率が非常に高いことが推定されるので，ＢＯＤ試験におよぼす影響をＡＢＳ，ＬＡＳを比較しながら実験を行なった。

（ＡＢＳ と ＬＡＳ の比較）

試料作成に先だち，合成洗剤の定量をＪＩＳ-ＫＯ 120（工場排水試験方法）22.1により行ない。溶存酸素測定は柴田ミラー変法を用いた。なお溶存酸素測定に際し柴田ミラー変法，ウインクラー法の両法について洗剤による滴定誤差を合成洗剤を稀釈水に Table. 4 の通り添加したものについて検討した。その結果，合成洗剤添加量として 1～2000ppm の範囲内では 100 ppm までは柴田・ミラー変法の方がすぐれていたので当法を使用することに決定した。なお両法とも洗剤が一定濃度以上になると対照蒸留水のＤＯと差を認めたが，これは両法ともＤＯ測定時における撹拌により洗剤が起泡するため白濁を生じ，そのために指示薬の滴定終末点が不明確になるためと思われる。ＡＢＳ（Hard type）ＬＡＳ（Soft type）のＢＯＤ試験におよぼす影響についてふらん瓶中濃度で 0.025，0.05，0.15，0.25，0.5，1.0，1.5，2.0，2.5，3.5，5.0 の 11段階にとり，５クールの実験を行なった。その結果はＡＢＳ，ＬＡＳともいずれの濃度においても妨害を示さなかった。そこでふらん瓶中の濃度を最高 100 ppm まで上げて実験を行なってみた。その結果は，Table. 3，Fig. 14，15 の通りである。ＡＢＳ，ＬＡＳともにふらん瓶中濃度で 25ppm までは差がなく，35 ppm から差があらわれはじめ，100ppm の濃度ではＡＢＳ 63.64％，ＬＡＳ 43.48％という値を示した。いずれも 25ppm から妨害があらわれ，総体的には生物分解を受け易い Softtype のＬＡＳの方がＢＯＤ試験に与える妨害が大であった。

結　　論

金属イオンによって微生物の働きが阻害される現象をあらわしたものを Oligodynamie という。これは Nägeli が微生物の発育がごく低濃度の重金属水溶液で害される現象を発見してこの現象を Oligodynamie と呼んだことにはじまるが現在では広く生物が微量の金属イオンによって害される現象をいう。生物により多少異なるが，主なイオンをこの作用の大きさの順にならべると次のようになる。

$Ag > Hg > Cu > Cd > Ni > Pb > Al > Zn > Cr > Fe^{2+}$

この現象は殺菌などに応用される。ＢＯＤ試験の妨害の要因として細菌や微生物の活動が阻止されることが上げられる。そこでＢＯＤ試験を妨害する傾向も Oligodinamie の殺菌力順序と関連があるのではないかと推定し，今回行なったＢＯＤ試験を妨害する物質の妨害率を大きい順にならべ比較してみた。それは次の通りである。

$Ag > Org \cdot Hg > inorg \cdot Hg > Cu > Cr > Ni > Al > Pb > CN > Fe^{2+} > Cd > Zn >$ ＬＡＳ ＞ ＡＢＳ

これをみると Oligodinamie Onder の Cd と BOD Inhibitor order の Cr が入れ替っているが，他については大体同じような傾向を示している。今回の実験に使用した各物質のＢＯＤ試験に妨害を与える最小濃度（稀釈検水中濃度）は大体次の通りである。

1）Ag　…極微量（0.0005ppm 以下）
2）Org・Hg　…0.05ppm
3）inOrg・Hg…0.05ppm
4）Cu　…0.15ppm
5）Cr　…0.15～0.25ppm
6）Ni　…0.25ppm
7）Al　…1.0～1.5ppm
8）Pb　…2.5ppm
9）CN　…2.5～3.5ppm
10）Fe^{2+}　…2.5～3.5ppm
11）Cd　…2.5ppm
12）Zn　…2.5～5.0ppm
13）ＬＡＳ　…25～35ppm
14）ABS　…25～50ppm

ＢＯＤはあらゆる生物の酸素要求量の総合であるので，植種試料中の生物相の状態により，一定条件のもとにＢＯＤ試験を行なっても，いつでも一定のＢＯＤ値が得られるとは限らないが，今回実験した混入物質が上記の濃度以下であるか，あるいははそれ以上でも検体を稀釈することによってその濃度以下にすることができればＢＯＤ試験に与える妨害は除去できるものと推定される。

参考文献

萩原　耕一著　ＢＯＤ試験法解説（績文堂）（1957）
無機化学研究会　最新無機化学（広川書店）（1961）
田中　穣編集　実験化学便覧（共立出版）（1966）
児玉　桂三編集　生物化学ハンドブック（技報堂）（1957）
井上　敏編集　岩波理化学辞典（岩波書店）（1953）
公害問題研究会　水質汚濁問題とその対策（公害問題研究会）（1967）
高嶺　明達編集　工場排水試験方法（日本規格協会）（1964）
戸田忠雄著　戸田新細菌学（南山堂）（1957）

Table. 1　Inhibiting rate of materials on BOD test

Concentration of materials (inhibitors) in Raw water	0.1～0.5 ppm	1 ppm	3 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	50 ppm	70 ppm	100 ppm	200 ppm
Concentration of materials (inhibitors) in diluted samples	0.005～0.025	0.05	0.15	0.25	0.5	1	1.5	2.5	3.5	5	10
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Al (Aluminum)	100	100	100	94.74	94.74	94.74	32.00	16.00	8.00	0	0
Cr (Chromium)	100	87.05	80.95	67.83	62.07	53.17	32.60	11.11	0	0	0
Fe (Iron)	100	100	100	100	94.44	94.44	88.89	88.89	77.78	66.67	47.62
Ni (Nickel)	100	100	91.67	87.50	45.83	16.67	16.67	0	0	0	0
Cu (Copper)	100	100	75.00	71.43	60.71	42.87	23.81	19.05	4.76	0	0
Zn (Zinc)	100	100	100	100	100	100	100	90.00	90.00	85.00	80.00
Pb (Lead)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93.00
CN (Cyanide)	100	95.24	95.24	95.24	95.24	95.24	95.24	90.48	87.50	0	0
Cd (Cadmium)	100	100	100	100	100	100	100	84.21	84.21	78.94	10.52

Table. 2　Inhibiting rate of mercury and Silver on BOD test

Concentration of mercury in law water	0.01 ppm	0.03 ppm	0.05 ppm	0.1 ppm	0.3 ppm	0.5 ppm	1 ppm	1.5 ppm	2 ppm	2.5 ppm	3 ppm
Concentration of mercury in diluted samples	0.0005	0.0015	0.0025	0.005	0.015	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.15
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Org. Hg (Organic mercury)	100	100	100	100	100	100	50.00	38.46	26.92	0	0
Inorg. Hg (inorganicmercuy)	100	100	100	100	100	100	76.19	71.43	42.86	0	0
Ag (Silver)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table. 3 Inhibiting rate of ABS and LAS

Concentration of materials in diluted water	100 ppm	300 ppm	500 ppm	700 ppm	900 ppm	1000 ppm	1200 ppm	1400 ppm	1600 ppm	1800 ppm	2000 ppm
Concentration of materials in diluted water	5	15	25	35	45	50	60	70	80	90	100
A B S	% 100	% 100	% 90.01	% 90.01	% 90.01	% 86.36	% 81.82	% 81.82	% 72.73	% 72.73	% 63.64
L A S	100	100	90.01	86.95	86.21	75.86	65.52	65.52	62.07	52.17	43.48

Table. 4 Influence of ABS on the determination of Dissolve oxygen

Concentration of ABS in law water (DO=8.33)	Shibata-Miller method	winkler-method
0 ppm	100 %	100 %
50 ppm	100 %	100 %
100 ppm	100 %	103.77%
500 ppm	106.25%	103.77%
1,000 ppm	106.25%	107.55%
2,000 ppm	106.25%	107.55%

Table. 5 Influence of ABS LAS on total colonies and coliform group

Concentration of ABS LAS in standard samples	Total colonies (in 1 ml)		Coliform group (in 1 ml) (Desoxy cholate)	
	ABS	LAS	ABS	LAS
0	180,000	180,000	51	51
5	130,000	130,000	51	52
25	130,000	1,500	53	53
50	34,000	1,500	72	50
80	2,800	1,100	61	60
100	2,500	900	50	55

産業廃水の質的分類

	該当する産業
BODの高い廃水浮遊物質の多いもの	と場，魚介調製工場，缶詰，乳製品，パルプ，製紙，製革，油脂，羊毛紡績，洗濯，醸造，製糖
BOD高く，毒物を含む	石灰ガス，タール，肥料，製鉄，石油精製，ベンベルグ，KPパルプ
BODの値が比較的低く（80ppm以下）毒物を含む	金属工業，人絹，染料，石油化学，殺虫剤および消毒剤製造，合成繊維製造
BODの値が比較的小さく(60ppm以下)浮遊物質とコロイドを含む	有機性廃水，紙をすいた廃水（白水）
主として無機物質を含む	鉱山の坑水，規錬廃水，金属加工，製鋼

土壌中における大腸菌の推移

松本淳彦*

HYGIENIC STUDIES ON *Escherichia coli* IN SOILS.

(Preliminary Report)

Atsuhiko MATSUMOTO

Résumè

1) Vertical distribution of bacteria in some garden soils was studied. Both the total bacteria and Coli-aerogenes group decreased markedly with the increase of depth. The bacterial population at the depth of 1 meter was about 1/100 of that of the surface and Coli-aerogenes group bacteria were seldom detected from the soils of more than 30 cm deep.

2) Suspensions of *Escherichia coli* (1.0×10^4 cells/ml) were inoculated to each of the sterilized and raw garden soils which were sieved by 20 mesh sieve and stored at 25°C keeping the moisture at about 40%. In the sterilized soils, *E. coli* population increased markedly in one or tow days and later on decreased gradually. While that in the raw garden soils decreased gradually without the initial multiplication to 1/10 and 1/100 of the initial population after 20 days and 40 days respectively. The total bacterial population in the raw soil was almost stable during all the period of experiment (1.2to 7.3×10^6/g).

3) Suspension of *E. coli* was dripped on the soil columns (dia. 6.4cm, length 30cm, 60cm and 90cm) and the effluents from the bottom were cultured. The initial suspension contained 300 to 500 cells of *E. coli* per 1ml. and the flow rate was regulated at 4ml. per minute. On the whole, the longer the column was the more the removal effect for *E. coli* was large. The removal effect for *E.coli* of the sterilized soil column decreased markedly with the progress of flow time and completely dissappeared after 1.0 to 1.4 liter of effluent were collected. Nevertheless, that of the raw soil column was undoubtedly much greater and was more than 90% even 1.4 liter of effluent was flew out excepting the column of 30cm in which the removal effect was markedly smaller.

4) After stopping the dripping, the suspension in the soil column was sucked out from the bottom by a vacume pump and the distribution of *E. coli* in the soil column was examined. The number of *E. coli* in the surface part of the sterilized soil column was two to six times larger than that in the bottom part. While the former was twenty to fifty times larger than the latter in the raw soil column.

* 東京都立衛生研究所水質試験部水中微生物研究室

5) To make clear the effects of pedolomicroorganism for *E. coli*, the raw soil extracts of different dilution and the *E. coli* suspension were inoculated to the sterilized well water which contains 50ppm of pepton and stored at room temperature. *E. coli* almost died out after 10 days in the thick soil extract culture, and decreased to 1/10 of the initial count after 16 days in the thin extract culture. While, in the control culture which does not contain the soil extract *E.coli* multiplied from 3×10^2/ml to 1.4×10^7/ml after 3 days and later on there was no variation even after 16 days. The total bacterial count increased from 1.8×10^6 to 1.4×10^7/ml in each culture of different degrees of dilution of the extract after 3 days.

The biological action of indigenous microorganisms in soils may be considered to be one of the essential factors which control the infiltration of *E. coli* into subterranean water.

Therefore, it may not be disregarded in the discussion of well water contamination.

緒　　言

昭和41年3月，都下東村山市で専用水道に基因する水系集団赤痢が発生した。当時使用していた水源井への汚染径路としていくつかの可能性が挙げられたが，地表からの滲透流入ということが一因に考えられた[1]。また，家庭排水等を地下吸込式によって処理している地域がいまだ多い現状に対して，実際に汚水が地表あるいは地中に放流された際の地下水汚染径路の機構を究明するため，野外における土壌中の細菌分布を調査し，また大腸菌の土壌中における生存時間，土壌中へ滲透していく間の除去率等について室内実験を行なった。

土壌中の大腸菌群分布について

概して土壌中には多くの微生物群が生息しているが，これらは土壌表面附近に最大密度を示しており，深さの増すごとに減少していくのが通例である[2)3)]。また，大腸菌群についても同様であるがその由来は動物などの排泄，あるいは下水，便槽，浄化槽の漏水，溢水等が考えられる[4)]。

実験1

都内数個所の庭地に穴を堀り，一定間隔で無菌的に土壌を採取し，その垂直分布を調査したところ Table 1に示すような結果を得た。一般細菌数は1m下層では表層部のおよそ1/100の数に減少しているものの，かなり生息しているが大腸菌群については30cm下層に至ると検出困難になる傾向にあった。これは，降雨の後ではかなり差がみられると思われるが，高橋ら[5)]も滲透式浄化槽附近の土壌中の大腸菌分布状況を調査しているが，その排出末端から半径50cm，地表面下30～50cmの範囲を越えると検出し難たくなることを報告している。

土壌中の大腸菌の生存時間について

大腸菌など細菌類が新たに土壌中へ放流されても一般に長生きできず，また増殖することもできないが，良い環境が与えられるとかなり長期間生存していることができる[6)]といわれる。

Table 1　Bacterial Population and Coli-aerogenes group in Some Garden Soils

Bacterial count (no/g)		
Samples	Surface	Depth 1 m
1	4.2×10^5	1.0×10^3
2	5.8×10^5	2.8×10^3
3	2.2×10^5	8.5×10^3
4	1.1×10^6	6.8×10^4
5	1.5×10^6	5.7×10^4
6	4.0×10^6	6.5×10^4

Coli-aerogenes group (no/g)				
Samples	Surface	Depth		
		10cm	20cm	30cm
1	60	0	0	0
2	320	90	40	30
3	600	200	0	0
4	2,300	500	0	0
5	3,700	510	50	0
6	6,100	930	150	0

Each numeral shows the number of colonies per 1g (wet weight) of soils after incubation of 24hrs. at 37°C.

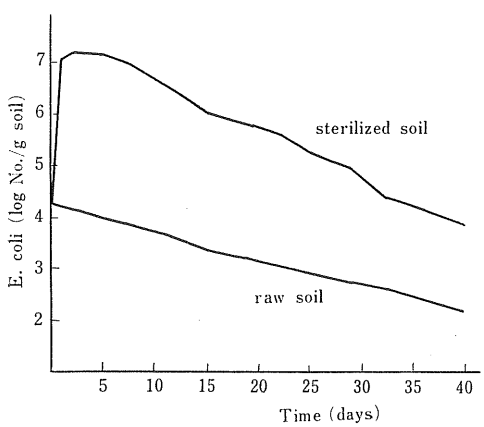
実験2

20メッシュ篩で篩別した土壌表面の黒土を約300gずつ，直径10cm，高さ12cmのガラス容器に入れ，対照として生土壌のもの，生土壌に大腸菌を接種したもの，滅菌処理した土壌に大腸菌を接種したものの三試料を用意した。土壌の滅菌は高圧滅菌（120°C 30分間）を3日間行なった。使用した大腸菌は下水から分離した *Escherichia coli* type Ⅰ で，24時間ブイヨン中で純粋培養したものを滅菌生理食塩水で稀釈してから土壌中に接種し，滅菌サジでよく混合して均一になるようにした。接種された大腸菌数は平均2.0×10^4/gであった。

各土壌水分は約40%に保持されるように適時滅菌蒸留水を加え，通気状態で25°C のフ卵器に放置しておいた。

大腸菌数測定は各土壌試料10gを滅菌蒸留水（pH 7.0±0.5）に懸濁して全量を100m*l*とし，30回強振盪し，1時間静置した後，その上澄水1m*l*についてデソキシコレート寒天培地にて37°C，24時間培養を行なった。Fig.1に示したように滅菌土壌に接種した大腸菌は急速に増殖し，48時間後には最大値1.8×10^7/gに達したが，これを過ぎるとゆるやかに減少をはじめる。一方，生土壌に接種した場合は増殖することなく，接種後3日を経過する頃から徐々に減少を呈した。この減少曲線は対照に用いた生土壌中の既存大腸菌群のそれと同じ傾向を示した。この傾向は D. A. Klein[7] 等が大腸菌を種々な稀釈段階で土壌に加えて行なった実験と同様な減少曲線をとっているが，彼等は大腸菌の死滅率は土壌中の栄養分に左右されることが大きいと述べている。尚，生土壌中の一般細菌数（$1.2\sim7.3\times10^6$/g）については実験期間中殆んど増減はみられなかった。

Fig. 1 Survival Period of *E. coli* in Soils



土壌の大腸菌除去について

大腸菌浮遊液を土壌カラムに通過させてそれぞれの除去率を比較してみた。

実験3

20メッシュ篩で篩別した土壌を，直径6.4cm，高さ100cmの透明合成樹脂製円筒に充塡して土壌カラムと

Fig. 2 Experimental Apparatus for Estimating the Removal rate of *E. coli*

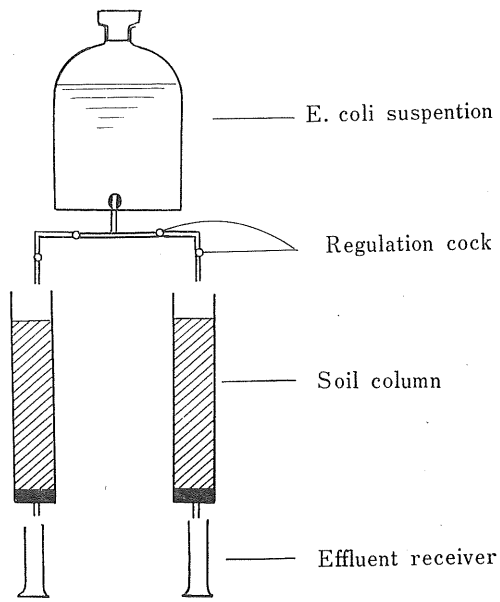
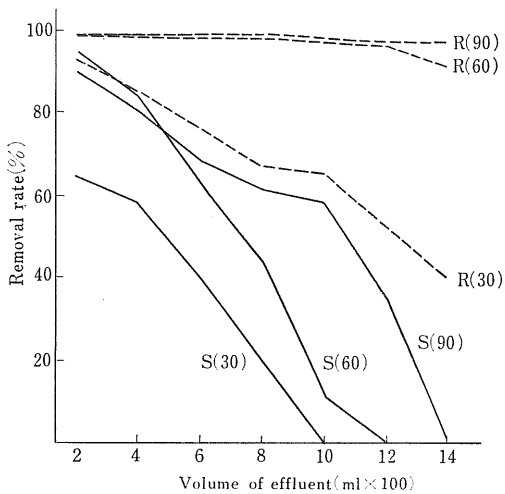


Fig. 3 Removal rate of *E. coli*.



The numerals in parenthese show the length (cm) of each soil column.

R : Raw soil　　S : Sterilized soil

し，二本を対にして一方を生土壌，他方を滅菌土壌としてFig.2に示すような装置を組立てた。カラムの高さはそれぞれ30，60及び90cmとし，上から大腸菌浮遊液を流速4 ml/minにて滴下した。そして両カラムを通過した流出水をシリンダーで一定量毎に採取し，1 ml 中の大腸菌数を測定して各カラムの除去率を算出しFig.3に示した。

各土壌カラムの抱水量は大腸菌浮遊液を滴下し，下端から流出しはじめた時点での滴下水量として概算した。

Fig.3に示すように，カラムの長い程，吸着による除去率が大きいのは当然であるが，滴下水量が多くなるにつれて両カラムの除去率に開きが現われてくる。即ち，滅菌土壌では滴下水量が少ない間はかなり除去されているが，カラム抱水量の2倍以上になると急激に除去率の低下がみられるようになる。一方，生土壌カラムにおける除去率は非常に大きくまた長時間持続していることが認められた。このことは単に吸着作用による除去だけではなく，土壌中に生息している微生物群との間の生物学的な関係（拮抗，補食など）[8)7)]が大きく関与しているように考えられた。

次に大腸菌浮遊液の滴下を止め，下端からの自然流出がなくなるまで静置した後，真空ポンプで流出口から弱く吸引しながら残っている水分を可及的に排除した。そして各カラムの表層部と下層部との土壌中の大腸菌数を測定したところ，いずれも表層部の方に多くの数が検出された。これを両カラムについて比較してみると，滅菌土壌では表層部に1,600～2,200/g，下層部には600～1,200/g（表層部の37.5～54.5%），生土壌の場合は表層部に1,300～1,800/g，下層部40～110/g（表層部の3.1～6.1%）の大腸菌が検出されたが，下層に至る間にかなり減少していることが明らかであった。この機構が特に生土壌の場合に著しいのは単なる吸着だけでなく，生物学的作用がかなり影響を及ぼしているものであり，これがまた大腸菌の土壌深層への移動をも大きく抑制していることが考えられた。このことについてR. B. Kronei等[8)]は土壌の表層部分が汚水中の粒子の移動限界であり，土壌中に細菌類の浸入を抑制するものであることを明らかにしている。

これらの結果は砂地，赤土，黒土など土壌の質，粒子の大きさ，水分或いは流速等の条件によってかなり相違が現われると思われるので今後の問題として検討しているところである。

G. G. Robeck[9)10)]等は，ＡＢＳも単に吸着作用だけではなく土壌中の微生物群に吸着された後に好気的分解を受けるものであることを放射性物質を使用して証明し，更に大腸菌は，土壌中ではＡＢＳやその他の塩類よりも浸透速度がおそいことを報告している。

又，窒素化合物など汚水中の塩類が地下移動中にどのような変化を受けるか等の報告[11)12)13)]も数多くあり，いずれも通気性のよい土壌中で生物学的作用によってコントロールされることを述べている。

最後に生物学的影響を受けていることを推察するために次のような基礎実験を試みてみた。即ちペプトン50ppmを添加した滅菌井水（pH 7.0調整）に大腸菌を一定量ずつ接種（2.4～3.2×10^2/ml）し，各々に土壌浸出液を10倍稀釈段階で加えてそれぞれ大腸菌の生存時間を測定した。

浸出液を加えない対照水中の大腸菌は4日経過後には増殖をはじめて最高4.9×10^6/mlに達し，16日間経過後も殆んど増減がみられなかった。土壌浸出液を濃厚に加えた水中の大腸菌は減少の一途をたどり10日後には検出されなくなり，稀薄に加えられたものは多少増減が見られたが16日間後には約1/10の数に減少した。一方，一般細菌数については3日経過後には各水中とも1.8×10^6～1.4×10^7/mlと平均して増加しているのが認められ，実験終了まで増減は殆んどみられなかったが，稀薄に加えたものの方が多少長期間にわたって多く生存している傾向を示した。

要約と考察

(1) 土壌中における大腸菌の生存時間および除去率を検討するため，基礎実験として生土壌と滅菌土壌とを使用して比較を行なった。

(2) 自然界では土壌中の大腸菌群分布状況は表層部に最大密度を示すが，30cm以上下層に至ると検出し難たくなる傾向を示した。

(3) 土壌中では大腸菌は増殖することはないが2.0×10^4/gを接種した場合，約50日間生存していた。

(4) 滅菌処理した土壌に接種した大腸菌は短時間で増殖し，極大期を過ぎると生土壌中と同じような減少曲線を呈した。

(5) 大腸菌を土壌カラムに通過させたときの除去率は，滅菌土壌では小さい反面，生土壌の場合は非常に大きく，かつ長時間持続しているのが認められた。これは前者は吸着作用のみであるのに対して，後者では生物学的作用が大きく関与していると考えられた。

家庭用排水等を地下浸透式によって処理しようとする場合には，地層の地質調査を行なうと同時に微生物学的な調査をも考慮することが望ましいわけである。

これは土壌の吸着作用だけに期待をかけるのではなく，新見[14]も指適しているように，汚水を土壌中のより多くの微生物群と接触させることによって浄化をより促進させるためであり，これが地下水汚染防止対策にもなるものである。

参考文献

1) 目黒勝郎，辺野喜正夫他：東京都東村山市文化村における赤痢集団発生について，日本公衆衛生雑誌，Vol. 13, No. 8, 653, (1966)
2) 岡田要之助：土壌微生物学概論，養賢堂，昭16
3) Alexander, M.：Introduction to soil Microbiology, John Wiley and Sons. Inc. New York, (1961)
4) Edwin E. Geldreich.：Detection and significance of fecal coliform bacteria in stream pollution studies. Jour. Water Poll. control Fed., Vol. 37, No. 12, 1722, (1965)
5) 高橋一三，大野茂他：屎尿浄化槽一次処理装置流出水の地下放流に関する研究，そのⅡ，水処理技術，Vol. 9, No. 9, 29, (1968)
6) Dale J. Donsel：Seasonal variation in servival of indicator bacteria in soil and their contribution to storm water pollution, Appl. Microbiol, Vol. 15, No. 6, 1362, (1967)
7) D. A. Klein and L. E. Casida. Jr.：Escherichia coli die out from normal soil as related to nutrient availability and the indigenous microflora,. Canadian Jour. Microbiol, Vol. 13, No. 11, 1461, (1967)
8) R. B. Kronei, G. T. Orlob and C. Hodgkinson：Movement of coliform bacteria through porous media., Sewage & Industrial wastes, Vol. 30, No. 1, 1, (1958)
9) G. G. Robeck, J. M. Cohen：Degradation of ABS and other organics in unsaturated soils., Jour. Water poll. control Fed, Vol.35, No. 10. 1225, (1963)
10) G. G. Robeck, A. R. Bryant and R. L. Woodward：Influence of ABS on coliform movement through water-saturated sandy soils., Jour. A.W.W.A., Vol. 54, No. 1, 75, (1962)
11) Herbert C. Preul.：Contaminants in ground waters near waste stabilization ponds., Jour. W.P.C.F., Vol. 40, No. 4, 659, (1968)
12) Herbert C. Preul and George J. Schroepfer.：Travel of nitrogen in soils., Jour. W.P.C.F. Vol. 40, No. 1, 30, (1968)
13) 小島貞男：外国における新しい研究（52），（地中に入った窒素化合物の変化）水，No. 5, 63, (1967)
14) 新見正：屎尿浄化槽に対する毛管沪過浄化法の応用について，毛管浄化研究会，(1966)

依頼試験を中心としてみた三多摩地区浅層地下水の動向 (1)

藤澤正吉　斉藤節子
鈴木　靜

THE CHEMICAL RESEARCH AND MOVING DEGREE OF POIIUTION FOR SHALLOW GROUND WATER OF SANTAMA DISTRICT IN THE METROPOLIS OF TOKYO

Masayoshi FUJISAWA, Setsuko SAITO, Sizuka SUZUKI

The ground water pollution in Santama District, the suburbs of Tokyo, correlatively caused with the rapid expanding municipalization of said district, has already entered into such a progressing status as it can no longer be disregarded even from the pubric helth.

Considering the essentiality of grasping the actual status of the pollution for water administration in the future to see in what shape and how rapidly it goes, a pursuit investigation has been decided to be undertaken.

1. まえがき

近年公害問題として，水質汚染という言葉がよく使われている。主として河川水をさしている場合が多いが，同時に地下汚染も平行して進みつつあることは，当然予想されることである。

三多摩地区は，住宅地として，急速に都市化が進んでいるものの，水道普及率，下水道設備共に不完全で汚染に対する危険要因は相乗されており，公衆衛生の上からも無視する事の出来ない事点まできている。

さきに，土木研究所と協同で，北多摩幹線排水路周辺の井戸水，約500本についての所見を報告したが，さらに，

(1) 人口の動態がはげしく，かつ膨張をつづけている過程。

(2) 人口密度（都市化度）に充分の拡がりを持つ。

(3) 地形，地質的に多様である。

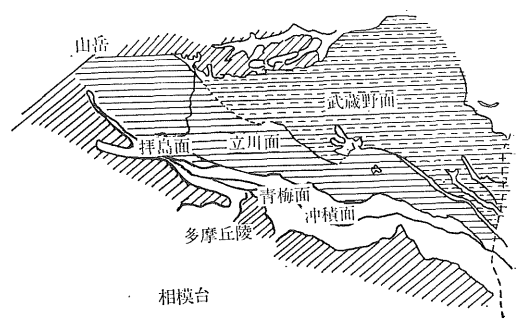
等の点よりして，興味ある地区の一つとして，さらには，浅層地下水の基質と動向を調べ，これを追跡することにより，汚染がどのような形で，どの位の速さで進行しつつあるかの実態を把握することは，今後の水行政上，必須のことと考え，調査を行った。

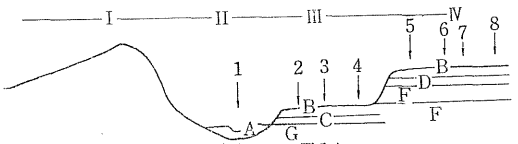
2. 資料について

昭和43年度一般依頼件体，約2,400件について，その検査成績より，適，不適に分け調査を行った。これは，比較的本来の水の姿を持ったものを適，他の要因の加わったものが不適であるという考え方から分類したもので，両者の平均的特性を見んとしたものである。

3. 地形，地質，帯水層について

前報において説明した故，概説すると，三多摩地区は，山岳，丘陵地区，相模台，武蔵野面，青柳拝島面，沖積層に大別され，平面的に次図の如き配置位を取





I 多摩丘陵　1 多摩川　5 国分寺
II 沖積面　2 国立　6 三鷹
III 立川面　3 府中　7 小金井
IV 武蔵野面　4 調布　8 武蔵野
A 沖積層　E 武蔵野礫層
B 立川ローム　F 東京層群
C 立川礫層　G 三浦層群
D 武蔵野ローム

っている。

これらの各面は夫々，比高10～15mの段丘崖によって分たれ，全般的に，南東へ $1/200$～$1/250$ の傾斜を示しているが，傾斜角は一定していない，ほぼ中心部で断面図を作れば，次の如き概念図を得る。

したがって，これら各段丘面に賦存する地下水は，互いに，不連続状態にあると見做して良く，当然，浅層地下水の存在様式は，これらの点を考慮しなければならないと思われる。

因みに，これらの面における水位を示すと図（次頁参照）の如くである。

4. 調査項目および集計

調査目的と依頼試験という枠の中から，有為，可能な項目として，塩素イオン，硬度，過マンガン酸カリ消費量を追跡の指標として選んだ。

又，山岳地区において，若干，一緒に集計した所もあるが，おおむね，各自治体の区域をもって単位とし，飲料水判定基準により，適，不適に分け，夫々のヒストグラムを作ったのが次表である。

（なお，総括的な推計については検例の増加にまちたい。）

上表より，更に，各平均値，最頻帯を抽出し，あわせて，水質起与因子との関連を見んとしたのが次表である。

5. 集計に対する考察

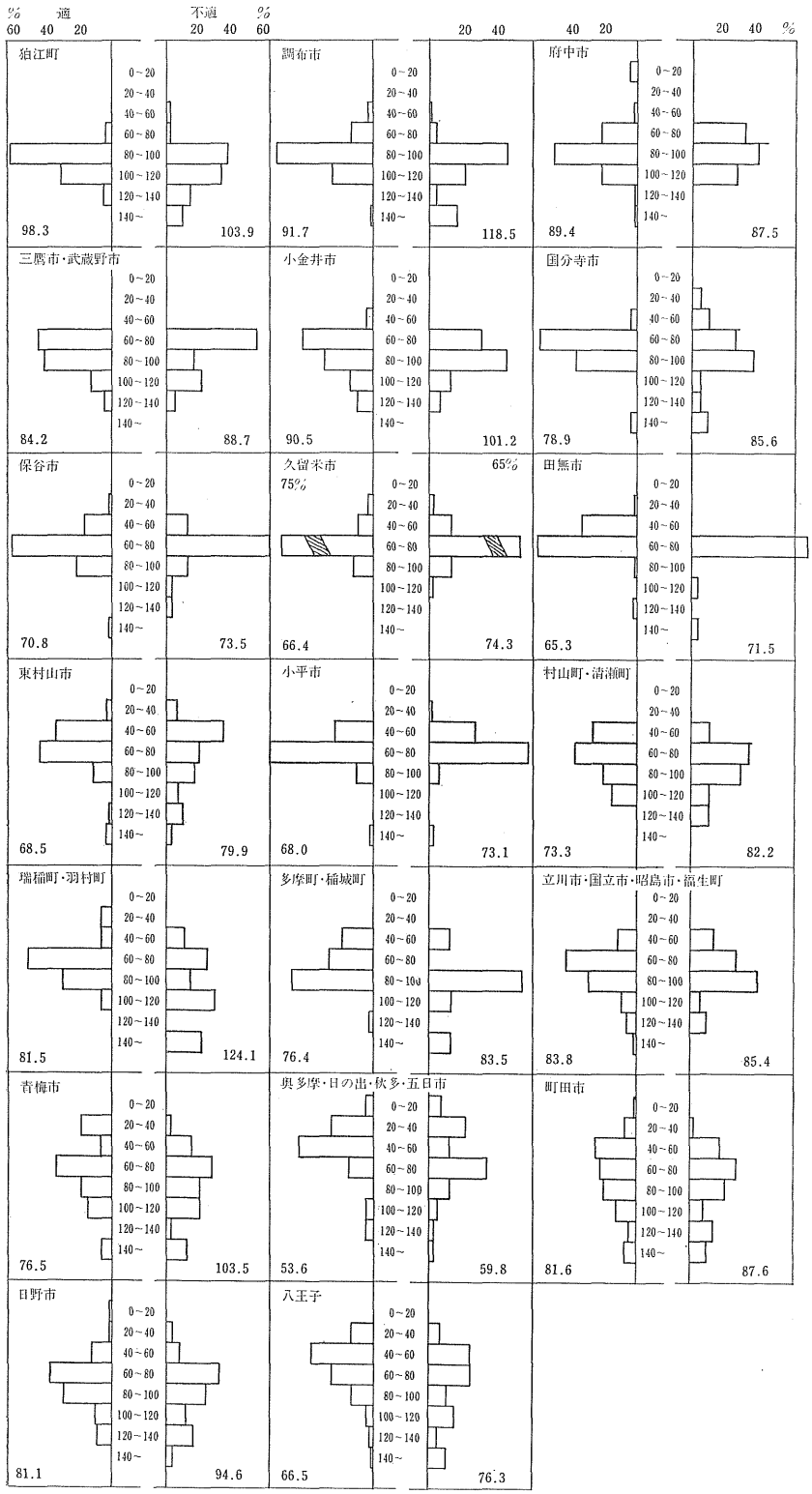
今回の調査において，自治体を便宜上の単位としたことは，自治体としての水を論ずる上において有利であるが，地下水の存在様式，供給源の異り等の制約を受けねばならず，相当する自治体間に若干の凹凸が見られる。

次に，依頼試験中心のため全井戸の場合と同様の解析が出来ない点があげられる。搬入先，必ずしも，上下水道，人口，衛生思想の同一でないことで，結局，区域の一層の細分化，検例の増加等の課題をかかえている。

6. ま と め

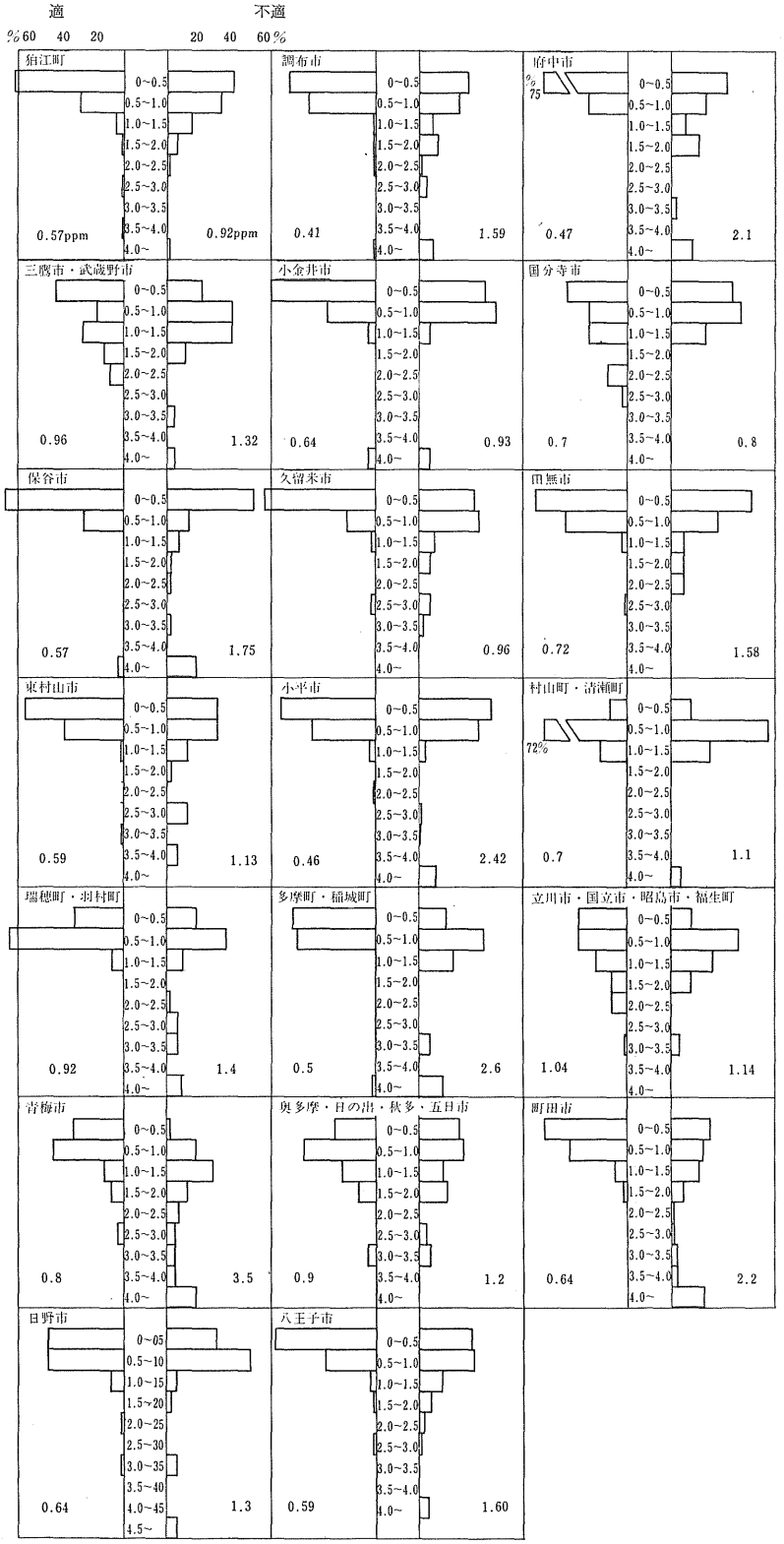
	Cl（適）		Cl(不適)		硬度(適)		硬度(不適)		$KMnO_4$ 消費量(適)		$KMnO_4$ 消費量(不適)		人口
	平均値	最頻帯	平均値	最頻帯	平均値	最頻帯	平均値	最頻帯	平均値	最頻帯	平均値	最頻帯	密度
八王子市	12.9	5～10	16.6	5～10	66.5	40～ 60	76.3	40～ 80	0.6	～0.5	1.6	0.5～1.0	1,270
日野市	16.3	10～15	29.5	10～15	81.1	60～ 80	94.6	60～ 80	0.6	0～1.0	1.3	0.5～1.0	3,202
町田市	18.7	15～20	19.6	15～20	81.6	40～ 60	87.6	60～ 80	0.6	～0.5	2.2	～0.5	2,318
奥多摩 五日市	9.1	～0.5	6.4	～0.5	53.6	40～ 60	59.8	60～ 80	0.9	0.5～1.0	1.2	0.5～1.0	576
青梅市	17.2	10～15	30.3	20～25	76.5	60～ 80	103.5	60～ 80	0.8	0.5～1.0	3.5	1.0～1.5	636
立川市	20.5	15～20	22.0	10～20	83.8	60～ 80	85.4	80～100	1.0	0～1.0	1.1	0.5～1.0	5,373
多摩，稲城	14.1	15～20	18.7	15～20	76.4	80～100	83.5	80～100	0.5	～0.5	2.6	0.5～1.0	1,410
瑞穂，羽村	18.5	10～15	39.5	10～15	81.5	60～ 80	124.1	100～120	0.9	0.5～1.0	1.4	0.5～1.0	1,588
村山，清瀬	20.8	15～20	25.4	15～20	73.3	60～ 80	82.2	60～ 80	0.7	0.5～1.0	1.1	0.5～1.0	3,665
小平市	18.1	15～20	21.4	15～20	68.0	60～ 80	73.1	60～ 80	0.5	～0.5	2.4	～0.5	6,334
東村山市	19.3	10～15	27.6	15～20	68.5	60～ 80	79.9	40～ 60	0.6	～0.5	1.1	0～1.0	5,435
田無市	19.0	15～20	19.4	15～20	65.3	60～ 80	71.5	60～ 80	0.7	～0.5	1.6	～0.5	8,276
久留米町	17.8	20～25	23.9	20～25	66.4	60～ 80	74.3	60～ 80	0.5	～0.5	1.0	0.5～1.0	5,321
保谷市	22.3	20～25	25.3	15～20	70.8	60～ 80	73.5	60～ 80	0.6	～0.5	1.8	～0.5	9,587
国分寺市	18.9	15～20	24.6	15～20	78.9	60～ 80	85.6	80～100	0.7	～0.5	0.8	0.5～1.0	6,808
小金井市	25.2	15～20	34.7	20～25	90.5	60～ 80	101.2	80～100	0.6	～0.5	0.9	0.5～1.0	7,970
三鷹武蔵野	27.5	15～25	28.9	20～25	84.2	60～ 80	88.7	60～ 80	1.0	～0.5	1.3	0.5～1.5	10,753
府中市	19.1	20～25	19.4	15～20	89.4	80～100	87.5	60～100	0.5	～0.5	2.1	～0.5	5,216
調布市	23.1	20～25	28.4	20～25	91.7	80～100	118.5	80～100	0.4	～0.5	1.6	～0.5	6,823
狛江町	25.8	20～25	26.1	25～30	98.3	80～100	103.9	80～100	0.6	～0.5	0.9	～0.5	9,186

硬　　度



※八王子を八王子市とする。

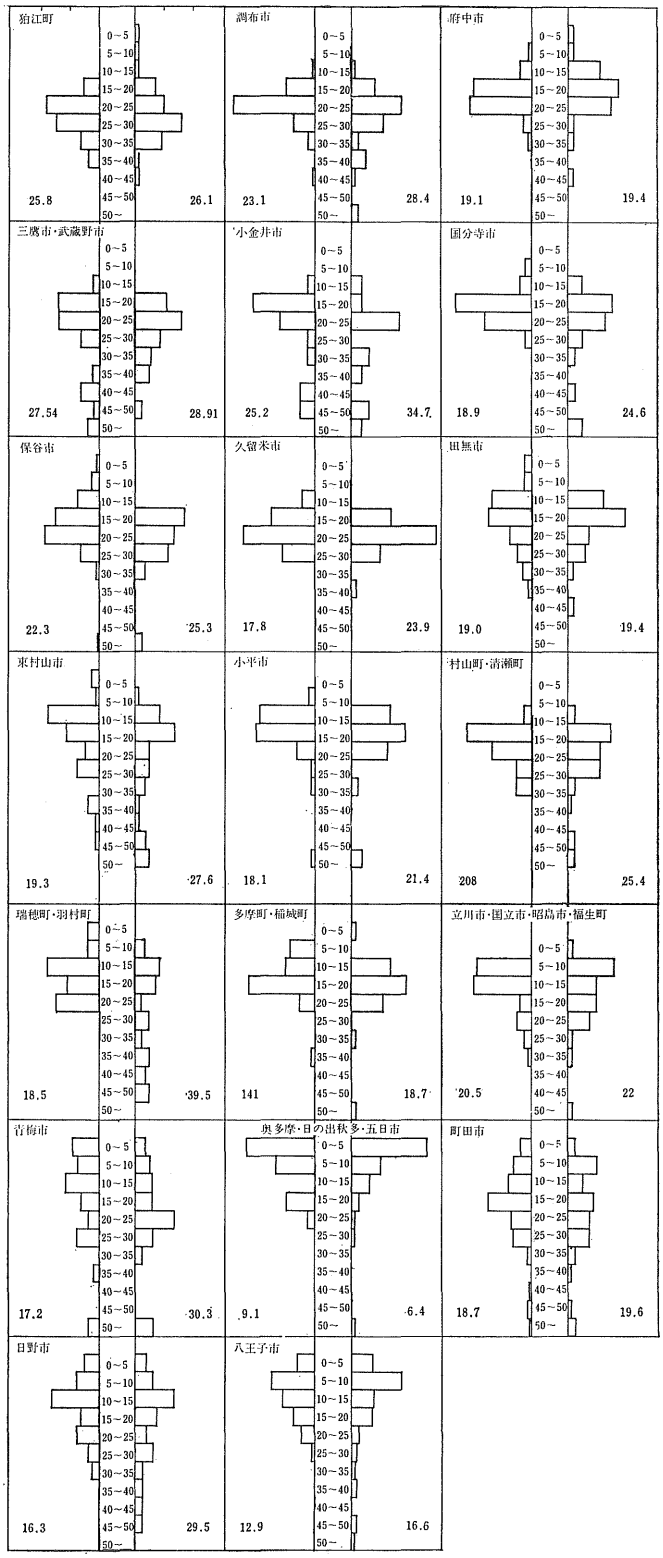
過マンガン酸が消費量



※日野市の不適の数字は全部少数点が入る。
※久留米市の適の数字 0.5

塩素イオン

適　　不適


狛江町
0～5
5～10
10～15
15～20
20～25
25～30
30～35
35～40
40～45
45～50
50～
25.8
26.1
調布市
23.1
28.4
府中市
19.1
19.4
三鷹市・武蔵野市
27.54
28.91
小金井市
25.2
34.7
国分寺市
18.9
24.6
保谷市
22.3
25.3
久留米市
17.8
23.9
田無市
19.0
19.4
東村山市
19.3
27.6
小平市
18.1
21.4
村山町・清瀬町
208
25.4
瑞穂町・羽村町
18.5
39.5
多摩町・稲城町
141
18.7
立川市・国立市・昭島市・福生町
20.5
22
吉祥市
17.2
30.3
奥多摩・日の出秋多・五日市
9.1
6.4
町田市
18.7
19.6
日野市
16.3
29.5
八王子市
12.9
16.6

以上，初期調査の結果は，要約すると，

イ）当地区浅層地下水について言えば，その供給源は，地形，地質に優先する。すなわち，供給源が一定と思われる地域，武蔵野面，あるいは立川面が，夫々崖線により切断され，不連続な賦存地下水であると思われても有為な差は見られない。瑞穂地区，狭山丘陵南縁に，塩素イオン，硬度共に，若干高い地区が見られるが，前者はジャリ穴の乱堀，後者は，地下水位の高い所，更に停滞区域と言った，汚染されやすい地区の為の二次的なものと解すべきであり，むしろ，井戸の深さに相函する。同様に，冲積部の水は，他区の水と異質なものに思えるが，これも，地形，地質によるよりも，供給源が，多摩川であり，水田用水である影響を多とする考え方の方が妥当と思われる。

ロ）汚染されたと思われる水，すなわち，不適検体の検査項目すべての定量値は，適検体のそれの上位にあり，且つ正比例することを確認した。

ハ）当然考えられるが，帯水層まで，かって人工的に清浄であった場合，その水は明らかに清澄であり，イ）を含め，水質の変遷は，人口密度とその歴史に影響され，その程度は特徴的な場合が多い。

以上，当地区内水質の一応の基質を見た訳であるが，初年度分の報告であり，これが，補足と変遷については，相当年月の調査を継続したい。

なお，本調査起稿にあたり，土木研究所の協力をいただいたことを深謝する。

他誌に発表した論文の抄録

飲料水から赤痢菌を検出した集団発生例と菌検出のためのメンブランフィルターの応用について

善養寺　浩，坂井　千三，工藤　泰雄
伊藤　　武，斉藤　クラ，丸山　　務

日本伝染病学会雑誌，43，175—183，1969

Application of Membrane Filter Method for Isolation of Causative Shigella from Drinking Water in Waterborne Dysentery Outbreaks

Hiroshi ZEN-YOJI, Senzo SAKAI
Yasuo KUDOH, Takeshi ITOH,
Kura SAITOH and Tsutomu MARUYAMA

抄　　録

感染源が水系と推定された集団赤痢の発生例は数多く報告されているが，それらの原因水から赤痢菌が検出され，その因果関係が明確にされた事例は，著者らが昭和41年3月都下東村山市に発生した集団赤痢において共用井戸水から赤痢菌を検出し，その感染源を明らかにした事例が最初である。

著者らは，飲料水およびその他の水中赤痢菌の検出方法として，メンブランフィルター集菌法（MF法）の応用を試み，MF法と従来のブイヨン増菌培養法，遠心沈澱法との検査精度の比較検討を行なった。

実験的に赤痢菌1：大腸菌9を生理食塩液500m*l*中に浮遊させた場合における赤痢菌の検出に，MF法では3～5個の赤痢菌浮遊でも検出されるのに対し，ブイヨン増菌培養法では30～50個，遠心沈澱法では300～500個存在しないと検出することができなかった。

前述のごとく従来法に比較しMF法が水中赤痢菌の検出方法として秀れていることが確認されたので本法を実際面に応用しつぎの成果を得た。

すなわち，1966～1969年5月までに東京都に発生した8例の集団赤痢の感染源推定井戸水からMF法によって赤痢菌を検出した。この8例のうち6例はS. sonnei，他の2例はS. flexneri 2a およびS. fleneri 3aであった。

8事例とも患者および井戸水から検出された赤痢菌の菌型，薬剤感受性およびコリシン型が一致していることから，使用井戸水が感染源であったことが証明された。

腸炎起病性腸内細菌鑑別用Lysine-Indole-Motility（LIM）培地について

五十嵐英夫，太田　建爾，善養寺　浩

日本細菌学雑誌，24，338—343，1969

A New Differential Medium for Enteric Pathogens : Lysine, Indoe, Motility (LIM) Medium.

Hideo IGARASHI, Kenji OHTA,
and Hiroshi ZEN-YOJI

1. 腸管病原性の腸内細菌の検査の簡易化と能率化を目的として，同一培地でリジン脱炭酸能，インドール産生能および運動性を同時に鑑別できるLysine-Indole-Motility（LIM）培地を考案した。

2. その組成は，ポリペプトン（第五栄養）10.0g，酵母エキス（Difco）3.0g，ブドウ糖1.0g，L-リジン塩酸塩10.0g，L-トリプトファン0.5g，B.C.P 0.02g，カンテン末3.0g，精製水1,000m*l*, pH6.7±0.1である。使用に際しては，加熱溶解後，3～4m*l*あて小試験管に分注し，121°Cで15分間滅菌後，急冷し，半流動高層培地とする。菌は中心部に穿刺後，37°C一夜培養し判定する。

3. 成績の判定はつぎのごとくである。リジン脱炭酸試験は培地全体が紫色を呈するものを陽性，上層部のみ紫色で深部の黄色のものを陰性とする。インドール産生試験はインドール試薬を重層し，境界面が赤色に変わったものを陽性，変化のないものを陰性とする。運動性は培地全体が混濁して発育したものを陽性，穿刺線に沿ってのみ発育したものを陰性とする。

4. 本培地の性能を確認するために，赤痢菌166株サルモネラ120株およびその他の腸内細菌を用いて，本培地のリジン脱炭酸能，インドール産生能および運動性を検討した結果，それぞれの常用鑑別培地での試験成績と一致することが確認され，また本培地を実際面に応用しても，その優秀性が確認された。

5. LIM培地とTSIカンテンとの併用により，リジン脱炭酸，インドール産生，運動性，硫化水素の産生，乳糖，白糖およびブドウ糖の分解ならびにガス産生の8種の性状が確認できるため，腸管病原性のすべての腸内細菌を同定することができる。

健康保菌者検索によるサルモネラ保菌の実態について

—主として小中学生を対象とした場合—

小野川　尊（東京都予防医学協会細菌部）
寺山　　武（東京都立衛生研究所細菌第1部）
坂井　千三（　　〃　　）

日本伝染病学会雑誌，43
225—231，1969

Detection of healthy carriers of Salmonellae and Shigellae

Takashi ONOGAWA, Takeshi TERAYAMA and Senzo SAKAI

東京都内の小・中学生を対象として1966年，1967年の2年間に赤痢菌およびサルモネラの保菌者検索を行ない，また同期間に食品取り扱い者についても同様な検索を行ない，両者の成績を比較検討した。

赤痢菌の検出率は，1966年では学童・生徒および食品取り扱い者の両者とも0.04%であった。1967年においてもそれぞれ0.02%で，両者の間の赤痢菌の保菌率に差は認められなかった。

1966，1967年の2年間のサルモネラの保菌率は学童生徒で0.14%，食品取り扱い者で0.05%であり，若年者においてサルモネラ保菌率が著るしく高いことが認められた。

保菌者由来のサルモネラの菌型は学童および成人のいずれからのものでも大きな違いは認められなかった。

サルモネラ分離菌株の中には1966年に分離されたもので7.8%，1967年のものから8.0%に抗生剤耐性株が認められた。

サルモネラ保菌者のうち学童について調査した成績では，軽症下痢患者とみなされるものが約40%に認められた。

市販食肉のサルモネラ汚染と本菌食中毒の関連について

坂井　千三

メディヤサークル，14，315—320，1969

Incidence of Salmonella Contamination on House-Hold Meat and It's Product in Tokyo

Senzo SAKAI

サルモネラ食中毒の予防の基礎的研究の一環として，都内市販食肉のサルモネラ汚染実態調査を行ない，その成績と都内発生のサルモネラ食中毒，散発下痢患者および保菌者から検出されるサルモネラ菌型との関連について検討した。

市販食肉のうち，国内産食肉の場合，サルモネラ陽性は1,085件中107件（9.3%）で，とくに鶏肉が高度（19.5%）に汚染され，ついで豚肉（9.0%），合挽肉（7.0%），牛肉（6.2%）であった。この市販食肉から検出された菌型は27菌型で，うち，S. derby, S. typhi-murium, S. infantis, S. blockley, S. enteritidis, S. anatum などが高頻度に検出された。

輸入肉の場合は167件中24件（14.4%）がサルモネラ陽性，菌型は16菌型であった。

ハムは275件中1件からS. derbyが検出されたが，ソーセージ99件はすべて陰性であった。また，肉店舗の市販サラダの場合は592件中3件が陽性であった。

前述の都内で市販されている食肉などから検出されたサルモネラと食中毒患者，一応健康と考えられた飲食物取扱者および学童からの検出菌株，並びに六大都市病院で赤痢診定患者，あるいは外来下痢患者から検出されたもので菌型の同定依頼を受けた菌株を対象に由来と検出菌型の相互の関係を検討した。その結果，保菌者あるいは散発下痢患者などの検出菌株の菌型は食肉検出株以上に多彩であるが，全体的にみると，食肉から検出頻度の高い菌型はやはり，食中毒患者，散発下痢患者および保菌者などからも高率に検出され，両者の間に密接な関連が認められた。

腸炎ビブリオのK抗原に関する研究

1. O2：K3およびO2：K28K抗原の免疫学的特異性とその糖構成

工藤　泰雄

日本細菌学雑誌，24，174～182，1969

Studies on K Antigen of Vibrio parahaemolyticus

1. Immunochemical Specificity of K3 and K28 Antigens and Their Sugar Constituents

Yasuo KUDOH

現在血清学的に分類されている腸炎ビブリオK抗原の本体，さらに，その免疫学的特異性と化学構造を明らかにする目的で，最初にK3およびK28の2種のK抗原について検討した。

まず，中津川株（O2：K3）およびT-1698株（O2：K28）の2株からWestphalらのフェノール—，水による抽出法，凍結融解法および超遠心沈澱分画法によ

ってK抗原の抽出，精製を行なった。最終的に得られたK抗原の均一性を検討した結果，K３抗原は電気泳動，超遠心分析で均一の像を示した。しかし，K28抗原では，なお僅かの核酸の混在が認められた。ゲル内沈降反応による分析では，両抽出K抗原とも，きわめて高い沈降抗原性と特異性を示した。しかし，なお，対応抗KO血清に対して２本の沈降線を形成した。この２本の沈降線はO抗原等の他の抗原物質の混在によるものではなく，いずれもK抗原によるものであることを認めた。

両K抗原の化学組成を検討すると，いずれも多糖体を主体とする酸性物質であり，その構成糖として両者からガラクトースおよびラムノースの２種の糖が検出された。

抽出K抗原の抗原性を知るため，K３抗原をウサギのでん筋に総量 80mg を接種したが，対応K抗体の産生は認められなかった。したがって，本菌抗原は単に全菌免疫血清によって作られるK抗体との反応性だけを有するハプテンであると考えられる。また，マウスに対する致死毒性を検討した結果，K抗原 5 mg の腹腔内接種においても，毒性は認められなかった。

腸炎ビブリオのK抗原に関する研究

2. K１～46各K抗原の免疫学的特異性とその糖構成

工藤　泰雄

日本細菌学雑誌：24，331～337，1769

Studies on K Antigens of Vibrio parahaemolyticus

2. Immunochemical Specificity of K Antigens and Their Sugar Constituents

Yasuo KUDOH

第１報で述べたごとく腸炎ビブリオK抗原（K３およびK28抗原）は多糖体を主体とする物質であり，明らかな抗原特異性を示すことから，他のK抗原も同様に多糖体よりなり単純な糖構成で特異性を示すのか否か，全K抗原について検討した。

Westphal のフェノール・水法で抽出したK１～46の各K抗原は多糖体と主体とする酸性物質であり，K16およびK27を除いていずれもゲル内沈降反応においてK沈降抗原性を有し，対応KO血清に対して２本の沈降線を形成した。これら沈降抗原性の認められた各抽出抗原が凝集反応で示されると同様の免疫学的特異性を有するか否かを検討すると，各K抗原相互の組み合わせのうち，交差反応の認められたO3：K30とO5：K14およびO5：K15とO11：K35のK抗原を除いてはいずれも特異性が認められた。交差反応の認められたO3：K30とO5：K14およびO5：K15とO11：K35のK抗原について，さらにK抗原とあわせてO抗原の異同を検討した。その結果，O3：K30とO5：K14はO抗原が異なるがK抗原はまったく同一であることが確認された。また，O5：K15とO11：K35ではK抗原，O抗原ともまったく同一であった。

つぎに，沈降抗原性の認められた抽出各K抗原多糖体の糖構成を検討した結果，構成糖として未同定糖を含む10数種の中性糖およびアミノ糖が検出された。各K抗原は１～６種の糖よりなり，それぞれ特徴ある糖構成を示すが，サルモネラなど腸内細菌のO抗原多糖体にみられる基本軸糖のような共通の構成糖の存在は認められなかった。K抗原の糖構成とO抗原との関係ではO２群に属するK３およびK28抗原が同一の糖構成を示したが，他のO群内，O群間では異なるK抗原の間に同一の糖構成を示すものは認められなかった。

各種細菌に対する Cathomycin の抗菌性

Chemotherapy, Vol 17, No. 3, 1969

善養寺　浩，大久保暢夫，堀　　幹郎
柴田　　実

Antibacterial Activity of Cathomycin

H. ZEN-YOJI, N. OHKUBO,
M. HORI, M. SHIBATA

グラム陽性・陰性各種菌群に対する Cathomycin の抗菌力を，マクロライド系抗生物質である Erythromycin のそれを比較検討した。

この抗生物質はサルモネラ，大腸菌群に対しては抗菌力を示さなかったが，変形菌，赤痢菌に対して Erythromycin より高い活性を持つ事が明らかにされた，しかしある種のグラム陽性球菌には低い感受性しか示さなかった。

Acetyl-Spiramycin による家兎実験梅毒の治療成績

善養寺　浩，大久保暢夫，堀　　幹郎
柴田　　実

Chemotherapy. Vol 17, No. 8 Sept. 1969

Therapeutic Effect of Acetyl-Spiramycin on The Experimental Rabbit Syphilis

H. ZEN-YOJI, N. OHKUBO
M. HORI, M. SHIBATA

Acetyl-Spiramycin の駆梅効果を Spiramycin,

Penicillin-V, Erythromycin のそれと比較した。その結果，梅毒の家兎背皮内，睾丸内感染群に対して明らかに効果が認められた。

製造ならびに流通過程における食肉製品の食品衛生学的考察

春田三佐夫，大石　純一，加藤　千里
渡辺　　学，梅木富士郎，林田　志信

東京都衛生局学会誌，No. 43，174～175（昭44. 10. 13）

Surveillance made on Meat-products from the view point of Food-Hygiene

Misao HARUTA, Junichi OISHI
Chisato KATO, Satoru WATANABE
Fujio UMEKI and Shinobu HAYASHIDA

Reports of working Conference of Health Bureau of Tokyo, No. 43, 174～175 (1969)

抄　　録

食肉製品が原料から製品になるまでの過程ならびに消費者の手に渡るまでの流通過程の各段階についてサーベイランスを試み，次のような結果を得た。

ウインナソーセージについては包装の段階での細菌汚染が顕著であり，10°C 以上の保存では保存性の低下，食中毒発生の危険性が憂慮される。ハム，ソーセージについてはスライスして販売されているものに細菌汚染が顕著にみられた。その主たる原因は不潔なスライサー，陳列用バット類などからの2次汚染にあることが判明した。

以上の事実はウインナソーセージ，スライスハム，ソーセージ類が食中毒発生の要因としての役割を演ずる可能性の大きいことを示唆するものであり，強力な衛生指導の必要性を通感させる。

脂肪分解菌の検出および計数用 CROSSLEY 寒天培地について

春田三佐夫，梅木富士郎（都衛研）
上田　貞善，石塚　　巌（栄研化学研究所）

モダンメディア，15巻6号，363～368，昭44年6月

Studies on the Crossley Agar for Detection and Enumeration of Lipolitic Organisms.

Misao HARUTA and Fujio UMEKI
(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
Sadayoshi UEDA and Iwao ISHIZUKA
(Laboratory of Eiken Chemical Co. Ltd,)

Modern Media, 15, 6, 363～368 (1969)

抄　　録

1966年の国際酪農連盟年次会議で，脂肪分解菌の検出および計数用培地として提案された Crossley（クロスリー）寒天培地について種々検討を試みた。すなわち，国際酪農連盟提案のクロスリー培地の性能，国産素材による基礎培地の性能，色素脂肪調整に用いるビクトリアブルーの品質，本培地の pH と集落青変の関係などについて基礎的検討を試み，さらに研究室において調整した培地と試作粉末化培地を用いて低温保存乳における脂肪分解菌の検出を試み，同時に保存各種微生物の本培地における発育態度についても検討した。その結果，1）国産の素材を用いて調製した基礎培地にBOH社製ビクトリアブルーと国産バターで調製した色素脂肪を加えた培地で十分脂肪分解菌の検出測定が可能なこと，本培地が粉末化可能なこと，分離菌株について脂肪分解能の有無をみる場合，スポット法を応用すれば，両者の鑑別は容易であることを知った。

包装容器などに付着する2，3の微生物に対するプロピレンオキサイドの殺菌効果と残留について

林田志信，大石純一，春田三佐夫（都衛研）
小熊　崇（昭和炭酸KK）
細貝祐太郎，藤井清次（東京薬大）

食品衛生学雑誌，10巻，5号，355～358頁，昭44年10月

The Antimicrobial Effect of Propylen Oxide and Its Residue on Food Wrappings and Containers

Shinobu HAYASHIDA, Junichi OOISHI
Misao HARUTA(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
Takashi OGUMA (Showa Tansan Co., Ltd.)
Yutaro HOSOGAI and Seiji FUJII (Tokyo College of Pharmacy)

J. Food Hyg. Soc. 10, 5, 355～358 (1969)

抄　　録

プロピレンオキサイド，二酸化炭素混合ガスによる殺菌効果および残留量測定試験において以下の結果を得た。

i）口紙片に付着させた E. coli, S. aureus および A. niger の胞子は 50°C，180分の処理条件で殺菌した結果，生菌を検出しなかった。

ii）ポリエチレン製袋，割バシ，王冠などに上記の

菌を付着させた場合，50°C，180分，常圧の処理条件では割バシを除き生菌は検出されなかった。

iii）ポリエチレン製袋，ポリセロセァン製袋，硬質塩化ビニール樹脂容器，ポリスチロール樹脂製ペトリザラ等へのＰＯの残留は24時間から48時間の放置でまったく認められなかった。

微量電気泳動法および微量ゲル内沈降反応による食肉の肉種鑑別

村上　一，梅木富士郎，中村　義
春田三佐夫

食品衛生学雑誌10巻，6号，434～439（1969）

Application of a Micro-Electrophoresis and Micro-gel-diffusion Technique in the Differentiation of Household Meat

Hajime MURAKAMI, Fujio UMEKI
Tadashi NAKAMURA and Misao HARUTA

J. Food Hyg. Soc. 10, 6, 434～439 (1969)

抄　録

Culliford の提唱した微量電気泳動法および Argaman らが提唱した微量ゲル内沈降反応を，日常の肉種鑑別業務に応用することを考え，これら２つの微量法の鋭敏度および精度について従来の試験管法および Ouchterlony の変法を対照として実験的に比較検討を行ない，その結果，微量電気泳動法は，抗体量の少ない場合にややその鋭敏度を欠くうらみはあるが，十分な量の抗体があれば最も高い抗原希釈列まで反応を示し，４種の方法のうちで最も鋭敏度の高いことを認めた。なお，本法は日常検査で常に要求される簡易性，迅速性の点でも，20分間で結果を判定でき，しかも必要な血清量も１検体につき５μl と従来の試験管法に要する量の約⅕でよいなどの利点があった。一方，微量ゲル内沈降反応は微量電気泳動法と同一量の血清で一度に３検体を処理でき，沈降バンドの形成も１～２時間で始まり，４～６時間で判定できるところから，生肉の肉種鑑別法として利用価値の高い方法であることを認めた。

リノール酸メチルの通気酸化と酸化防止剤の影響…（Ⅲ）

（ブチルヒドロキシアニソールに対するクエン酸の相乗作用について）

松本　茂，酒井昭子，勝木康隆，伊藤紘一

日本公衆衛生雑誌，16，1969

Oxidation of Methyl Linoleate and Influence of Anti oxidants.…（Ⅲ）

Sigeru MASUMOTO, Akiko SAKAI
Koichi ITO and Yasutaka KATSUKI

リノール酸メチル（M. L）の90°および70°での通気酸化により経時的に得られた試料について，過酸化物価（ＰＯＶ），カルボニル価（Car. V），屈折率（ＲＩ）等の諸恒数およびＩＲスペクトルの測定を行なった。これらを前報110°における酸素導過時の恒数と比較し，ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）の酸化防止効果とクエン酸の相乗作用についての検討を行なった。

その結果 Car. V. POV の変化速度はそれぞれ顕著に減少を見せたが，再現性は明らかに増大し，ＰＯＶの最高値は前回に比べて高い値を示した。ＢＨＡの酸化防止効力は前回と同様にこれらの条件でも明瞭であり，クエン酸の相乗効果も認められた。またＩＲスペクトルの変化よりみて110°の場合と同様ＭＬの二重結合は，ＰＯＶの増大とともに conj cis-cis 結合より conj trans-trans へ移行することが観察された。

微量セレンの定量法

戸谷哲也，原田裕文，観　照雄
鈴木助治，田村健夫

昭和44年４月
日本薬学会第89年会，講演要旨集534（1969）

Determination of Small Amounts of Selenium

Tetsuya TOTANI, Hirofumi HARADA
Teruo KAN, Sukeji SUZUKI and
Takeo TAMURA

セレンの毒性はたとえばウサギの経口投与ではＭＬＤが1.5mg/kg（Na_2SeO_3）であり，ヒ素の LD_{50} 20mg/kg（As_2O_3）より数倍高い。近年 P. W. West はタバコの巻紙中から10ppm 以上のセレンを検出し，喫煙の有害性について報告している。最近，輸入品などの増加にともないセレンによる汚染の危険性も増えることが予測されるので，微量セレンの定量法を確立することを目的として行なった。セレンの吸光度定量法として報告されている 3, 3'-Diaminobenzidine法，1, 8-Naphthalenediamine 法，O-Phenylenediamine 法等について検討したが，O-Phenylenediamine 法に有用性が高いことが認められた。試薬を添加後常温で２時間放置して測定することが本法の至適条件とされているが，これを改良し，60°，10分間の放置で再現性よく定量し得ることを見出した。実際試料は湿式

灰化したのち，含有している亜セレン酸をアスコルビン酸で還元して単体セレンとしてから二硫化炭素を用いて抽出し，その蒸発残査を王水にとかして試験溶液とし，O-Phenylenediamine 改良法でセレンを定量した。このような前処理操作によって，実際試料を分析する場合にセレンの定量におよぼす障害物質を除くことが可能となり，化粧品，医薬品および食品に対しても適用できた。

カルボニル類の薄層クロマトグラフィーによる定性試験

戸谷哲也，原田裕文，観　照雄，田村健夫

昭和44年6月

衛生化学15巻，3号

Identification of Carbonyl Compounds by Thin-Layer Chromatography.

Tetsuya TOTANI, Hirofumi HARADA
Teruo KAN and Takeo TAMURA

日本薬学会協定衛生試験法，飲食物香料試験法中カルボニル化合物の同定法について上提し，採択された。本試験法ではベラルゴンアルデヒドをはじめとする約20種のカルボニル化合物をとりあげ，同定法としては試料をそのまま薄層で展開する直接法と誘導体としたのち展開する間接法の2つの方法を用いた。直接法で用いた薄層は①セッコウ5％を含有するシリカゲルで，間接法ではシリカゲルのほか②フェニルセロソルブをしませたケイソウ土あるいは③ミネラルオイル（オンジナ27）をしませたシリカゲルを用いた。そして薄層①の場合は主にベンゼンで，②の場合はシクロヘキサン—酢酸(19＋1)，③の場合はジオキサン—水（13＋7）を展開溶媒として使用した。直接法の発色剤としては2.4—ジニトロフェニルヒドラジン溶液をはじめベンチジン，m-フェニレンジアミン，インドールなど11種の試薬溶液を用い，Rf値および各発色剤による自然光あるいは紫外線照射下における発色の状態により判別した。また間接法は試料溶液に2.4—ジニトロフェニルヒドラジン溶液を加えて冷却して一昼夜放置し，ヒドラゾンを捕捉し，ジメチルホルムアミドに溶かしたのち前記3種の薄層を用いて展開し水酸化ナトリウム—エタノール溶液を噴霧することによって発色させ対照と比較して同定を行なった。本誌では実施にあたって特に留意すべき必要のある詳細な注解を付した。

ジフェンヒドラミンの定性ならびに定量法

田村健夫，戸谷哲也，原田裕文
鈴木助治，郷　一栄

昭和44年6月

衛生化学，15巻3号

Identification and Determination of Diphenhydramine.

Takeo TAMURA, Tetsuya TOTANI
Hirofumi HARADA, Sukeji SUZUKI
and Kazue GÖ

日本薬学会協定衛生試験法，香粧品試験法中ヘアーローションに含有される特殊成分ジフェンヒドラミンの定性ならびに定量試験法を上提し，公定試験法として採択された。定性試験は沈澱反応，薄層クロマトグラフィーならびにガスクロマトグラフィーにより行ない，定量試験はガスクロマトグラフィーによって行なった。試験溶液の調製は定性および定量試験のいずれの場合にも，ジフェンヒドラミンを強酸性イオン交換樹脂（Dowex AG50-1）に吸着させ油分，活性剤を除き，水酸化ナトリウム，60％エタノールで溶出し，試験溶液とした。これについて沈澱反応における方法はライネッケ試薬を用い，淡赤色の結晶性沈澱の有無を判定し，薄層クロマトグラフィーでの方法は5％セッコウ含有シリカゲルを用い，エタノール—酢酸(9＋1)，クロロホルム—エタノール—酢酸(8＋2＋1)で展開し，塩化白金•ヨウ化カリウム混液で発色させ確認した。ガスクロマトグラフィーによる方法は1.5％SE—30含浸クロモソルブWを用い，水素炎イオン化型検出器により，一般試験法ガスクロマトグラフィーの項に従って試験を行ない，内部標準物質（マレイン酸クロルフェニラミン）との相対保持時間および面積比より，試料の定性ならびに定量試験を行なった。本誌では実施にあたって特に留意すべき必要のある詳細な注解を付した。

コンクリート用水としての水質調査

Water quality for concreate mixing water

三村秀一

セメント，コンクリート，No. 268，12～17

Shuich MIMURA

コンクリート用水は，コンクリートのクラック，凝結反応などに影響することから，一部外国では，懸濁物質，溶解性物質，塩素イオン，硫酸イオン量などの水質基準が定められている。我が国では，飲料に適する水という条件となっているが，現在までの事故例の原因不明の中には，水質に起因するものが多く含まれ

ているように考えられる。

筆者は，日本建築学会の中の「コンクリート用水委員会」の専門委員として，我が国のコンクリート用水の水質基準制定のあたっての資料に全国の地下水，水道水，河川水，等の水質調査を行ない，その結果について報告してある。

（Vol. 3, No. 9, 3月）

プール沪過機に関する一考察

An Account on Filters for Swimming Pools

山崎堅吉

スクールサイエンス

Kenkichi YAMAZAKI

概　要

現在法規上では水質基準を維持出来るなら，水泳プールに沪過機はなくてもよいが，正しく運転すれば衛生管理には大いに役立ち，将来はプール施設として欠く事が出来なくなるものである。従って沪過機の選定に当り基本的な知識を必要とする。

選　定

1. 機械的能力　遊泳最大人員でも沪過効率のあがる能力を有すること。

2. 管理（時間）的能力　特に専門の管理者のいない学校プールでは運転稼動者の勤務時間，水質の回復する時間等を考慮して機種炉過方式の選定をする必要がある。

炉過方式　主として現在使用されている方式の長短所の比較検討を行なう。

標準　プール炉過機の基準はないが，これに相当するものとして標準を示し，新たに施設を設ける際の参考事項をのべる。

結論として炉過器の衛生管理上の限界，また運転稼動の際の諸注意を列記し普及の一助とした。

公衆浴場と温泉の衛生検査

Hygienic Examination of Pablic Bath and Hot-Spring Waters

山崎堅吉

臨床検査　Vol. 13, No. 10

Kenkichi YAMAZAKI

概要

公衆浴場については水質基準の各試験項目の意義とその検査法を解説し，特に注意すべき点を述べる。また浴場の現場より法規外の問題で一般にとり上げられる事例とその解説をのべる。

温泉については温泉法が余り知られていないのでその定義，分類を述べ，分析法は主旨に止どめ，また温泉に関する問題点を提起した。本総説は衛生検査技師諸兄のために記したものである。

鉄細菌に関する研究（Ⅵ），Gallionella の生物学的性状(3)，試験管培養における G. ferruginea の発育のパターン

松本昌雄

水道協会雑誌，No. 414, p. 36～41（1969, 3）

Studies on the Iron Bacteria, (6) Studies on the Biochemistry of the Gallionella

Masao MATSUMOTO

Journal of Japan Water Works Association No. 414, p. 36～41 (1969, 3)

飲料水に白，黄，緑，褐，黒色とさまざまな色相を呈した喀痰，寒天塊，海綿，綿屑，木屑および泥状の浮遊沈澱物（スライム）が多量に発生して水質を著しく汚染することがある。その結果，飲料水あるいは工業用水として化学的・細菌学的に不適となる例が，しばしば起きている。これらスライムの原因が微生物である場合が非常に多いのである。そのスライムの原因菌の一つに鉄細菌があり，この分離培養法もまだ確立されていない現状である。そこで鉄細菌の培養について基礎的実験を行なって1報から継続して発表してきた。その結果，既知の鉄細菌の培地よりも発育のよい培地をつくることができたので，その培地並びに培養方法について報告すると共に，鉄細菌のスライム形成に5種類の定型的なパターンのあることを認めた。

鉄細菌に関する研究（Ⅶ），Gallionella の生物学的性状(4)，Gallionella の発育におよぼす溶存酸素，硫酸銅，次亜塩素酸ナトリウムならびに温度の影響

松本昌雄

水道協会雑誌，No. 419, p. 31～43（1969, 8）

Studies on the Iron Bacteria, (7) Studies on the Biochemistry of the Gallionella

Masao MATSUMOTO

Journal of Japan Water Works Association No. 419, p. 31～43 (1969, 8)

鉄細菌の生化学的性状については，ほとんど不明の現状である。そこで鉄細菌（Gallionella）の生化学的性状を明らかにするために基礎的実験を行なって，その結果を逐次報告してきた。続いて今回は Gallionella

の発育に及ぼす溶存酸素，硫酸銅，次亜塩素酸ナトリウムおよび温度などの影響について検討を行なった。その結果は，Gallionellaは溶存酸素濃度が34～63%の場合に発育が良く，84%以上および17%以下では発育しなかった。硫酸銅濃度が 3～5 ppm で30分間作用すると菌の発育が抑制されて24時間後には死滅した。塩素消毒の場合，0.5ppmの注入量で10分後，0.7ppmで8分後，1 ppm で1分後にそれぞれ死滅した。一方，温度の影響を検討した結果，37°C—2日間で大部分が死滅する。30°～25°Cでは8日後も変化を認めないが，13日後に発育悪くなり30日後にはほとんどが死滅していた。20°C においては30日後発育の変化を認めないが，55日後に発育がきわめて悪くなり，67日後には死滅した。

衛生試験法及注解〔10〕底質試験法

B．生物学的試験，6．試験結果の表示

松本浩一

衛生化学，Vol.15，No.3，pp.149～167，1969

Commentary for the Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists.〔10〕Examination of Bottom Sediments.

B. Biological Examination. 6. Expression of the Results of Examination.

前報（衛生化学，Vol.14，No.3，pp.150～160，1968）に記した試験法による試験結果の判定資料として，生物学専攻者以外でも比較的容易に使用出来ると考えられる汚水生物学的指標生物表を提案した。また，各汚濁水域の代表的な底生生物であると考えられる水生昆虫18種，扁形動物1種，環形動物5種，軟体動物2種，輪形動物2種，原生動物5種，分裂菌類3種，藻菌類1種，珪藻類8種，緑藻類5種の図を付し，種の説明および近縁の属種との見分け方を記した。

地下水の生物〔1〕

1．まえがき；2．地下水生物の生息場所

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.3，pp.237～245，1969

An Introduction to Phreatobiology〔1〕

1. Foreward；2. Habitats of Subterranean Aquatic Organisms.

地下水中に生息する特殊な生物を研究する学問—Phreatobiology—の起源および本邦におけるその発展過程をのべた。地下水生物は井戸（地下水），洞穴水，湧泉，間隙水，深湖底などに生息して発見される。地下水生物学の起源は1768年に白色で盲目のホライモリがユーゴスラビアの洞穴から記載されたのが最初で，20世紀のはじめ頃から学問としての体系化が進み現在に至った。本邦では1916年に東京市ケ谷の井戸からカントウイドウズムシが記載されたのが最初で，1950年以降地下水動物の研究は急速に進み現在約250種以上が知られ，きわめて興味ある種を多く含んでいる。

地下水の生物〔2〕

3．地下水生物の生息環境と特性

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.4，pp.344～348，1969

An Introduction to Phreatobiology〔2〕

3. Subterranean Aquatic Environments and Characteristics of Subterranean Aquatic Organisms.

地下水生物の生息環境は特異であり，次のような特長がある。1）永久に暗黒である。2）水温が低く，年変化が少ない。3）食物が少ない。4）溶存酸素が少ない。5）一般に運動水域が狭い。6）生息環境条件が単調で変化が少ない。7）生息水域が地域的に隔絶し閉鎖されている。また，地下水動物にはつぎのような特長がある。1）眼および体色素が退化している。2）代謝が低く生殖時季が不定である。3）体は小さく個体数も著しく少ない。4）饑餓に対し非常に耐性があり長命である。5）非常に起源の古い動物が多く，また分布が地域的である。6）産卵数がきわめて少ない。

地下水の生物〔3〕

4．地下水生物相の構成

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.6，pp.492～502，1969

An Introduction to Phreatobiology〔3〕

4. Constituents of Subterranean Aquatic Fauna.

全く暗黒な地下水中には，特殊な細菌類を除くと，本来植物は存在しない。したがって地下水中の生物相は動物によって代表される。地下水産の動物はいろいろなカテゴリーに分けられるが，外来地下水性種，好地下水性種，真地下水性種の3つのカテゴリーに大別することが出来る。これらの3つのカテゴリーにつき実例をあげて説明し，本邦ならびに世界の真地下水性種の分類学的構成を表示した。真地下水性動物として

は原生動物・腔腸動物・紐形動物・扁形動物・袋形動物・環形動物・軟体動物・節足動物・脊椎動物などが知られているが，節足動物の甲殻類がもっとも多く知られている。

地下水の生物〔4〕

5. 地下水動物の起源；6. 地下水動物の世界的分布；7. 地下水動物と古地理学

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.7，pp.592～599，1969

An Introduction to Phreatobiology〔4〕

5. Origin of Subterranean Aquatic Species；6. World Distribution of Subterranean Aquatic Species；7. Subterranean Aquatic Species and Palaeogeography.

地下水動物の起源は地表水の動物に由来し，現在でも地下水生活に移行しつつある動物もあるが，起源がきわめて古く古生代にまでさかのぼるものもある。またその起源を淡水生物に発するものと海水生物に発するものがある。これらの動物が地下水中に移動した理由を紹介し，地下水中のきわめて起源の古い動物の5つのカテゴリーについてのべた。また地下水動物は世界のほとんどすべての地域にみられるが，ヨーロッパ・アジア・アメリカの北部には分布せず，古地理学との関係も深い。

地下水の生物〔5〕

8. 地下水生物各論

1) 原生動物門；2) 海綿動物門；3) 腔腸動物門

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.8，pp.666～676，1969

An Introduction to Phreatobiology〔5〕

8. A List of Subterranean Aquatic Species.

1) Phylum Protozoa ; 2) Phylum Porifera ; 3) Phylum Coelenterata

原生動物，海綿動物，腔腸動物につき簡単な説明をなし，地下水中から報告されたこれらの動物を紹介した。原生動物は鞭毛虫綱，肉質綱，極嚢胞子虫綱，胞子虫綱，繊毛虫綱，吸管虫綱の6綱のいずれも地下水中から知られ150種以上が報告されているが，真地下水種は少ない。原生動物は井水汚染の指標として重要であると考えられる。海綿動物・腔腸動物も少ないながら地下水中からの報告があるが，多くは地表水種である。

地下水の生物〔6〕

4) 扁形動物門

(1) 総論；(2) 渦虫綱；(3) 渦虫綱の目の検索

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.10，pp.862～866，1969

An Introduction to Phreatobiology〔6〕

4) Phylum Platyhelminthes

(1) General Remarks ; (2) Class Turbellaria ; (3) A Key to Orders of Class Turbellaria

扁形動物門の概要をのべた。扁形動物門は渦虫綱・吸虫綱・条虫綱の3綱からなるが，地下水中から報告されているのは渦虫綱がおもであり，吸虫綱・条虫綱はきわめて少ない。渦虫綱の概要をのべ，11目の検索を付した。渦虫綱の11目のうち地下水から報告されているのは，カテヌラ目・マクロストマ目・新棒腸目・三岐腸目・順列目・卵黄皮目・および蔵頭目の7目で，三岐腸目は地下水産種も真地下水種ももっとも多い。

地下水の生物〔7〕

(4) 地下水産の渦虫類；(5) 地下水性プラナリアの分類；(6) 地下水産淡水三岐腸類の地理的分布

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.11，pp.950～956，1969

An Introduction to Phreatobiology〔7〕

(4) Subterranean Turbellarians ; (5) Classification of Subterranean Planarians ; (6) Geographical Distribution of Subterranean Paludicola.

地下水から報告された渦虫類7目11科28属に属する約50種の種名・産地をリストアップした。地下水産のプラナリアは淡水三岐腸亜目のプラナリア科・ケンキィーア科・デンドロシーラ科のいずれもみられる。これら3科の検索を付し簡単に説明した。地下水性プラナリアの地理的分布は比較的狭く，英国やスカンジナビアなど北方地域を除く全ヨーロッパにもっとも多く，北米からは約14種，マレー半島，本邦などから少数が知られている。

地下水の生物〔8〕

(7) 日本の地下水産のプラナリア

松本浩一

用水と廃水，Vol.11，No.12，pp.1027～1037，1969

An Introduction to Phreatobiology〔8〕

(7) Subterranean Planarians of Japan.

本邦の地下水からは，淡水三岐腸亜目のプラナリア科・ケンキィーア科・デンドロシーラ科のいずれも報告されている。しかしながら，真地下水性種は，プラナリア科の *Phagocata* 属3種，ケンキィーア科の *Speophila* 属1種のみである。これらの本邦の地下水性のプラナリアはいずれも井水から報告されており，欧米の真地下水種がほとんど洞穴から報告されている事実とくらべ興味がある。本編では本邦の地下水種を主とするプラナリア類3科6属19種につき図・検索を付して説明した。なお，地下水産の同定未済種の既知産地，地下水産渦虫類の採集・運搬・観察・固定などの方法を紹介した。

昭和46年1月25日　発行
January, 1971

昭和45年度
規格表第2類
印刷番号(45)1938
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報21

編集
発行：東京都立衛生研究所

所在地　東京都新宿区百人町4の539
電話　363—3231(代)

印刷所　株式会社　研文社
東京都港区西新橋1—10—10