12 27

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT
OF
TOKYO METROPOLITAN RESEARCH
LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

24
1972

序

衛生研究所には，端的にいって，三つの任務が義務づけられています。すなわち，調査研究，試験検査および東京都衛生局技術系職員に対する指導訓練であります。

これらの業務は衛生行政を推進するに当って，何れも重要な基盤となるものであります。

近年，特に食品，大気，水質等環境汚染の人体に及ぼす影響およびその対策は公衆衛生上最も深刻な課題となって参りました。これらの問題は極めて緊急を要するばかりでなく，また，取り組むには極めて困難なことばかりであります。それ故に，勢い，衛生研究所においては高度の試験検査が数多くもち込まれるようになり，職員の精神的肉体的負担は加わる一方であります。そのために研究業務はかなり圧迫される結果になったのは当然のことでありましょう。

ここに刊行する東京都立衛生研究所研究年報24号は1972年当所で行なった調査研究の概要を報告するものであります。従って，これは，いわば苦境の中で作りあげた職員の労作と申してもよいと思います。

なお，この研究年報の姉妹編として，事業概要を毎年発行しています。それは，当研究所の諸業務の一年間の事務的報告書であります。併せて御一覧下されば，当所の活動の実態がわかっていただけると思います。

1973年 8 月 31 日

東京都立衛生研究所長

辺 野 喜　正　夫

目　　次

一　般　論　文

1　市販洋菓子の黄色ブドウ球菌汚染の実態とそれらから検出され……寺山　武　五十嵐英夫… 1
　た黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能について　潮田　弘　斉藤　香彦
　稲葉美佐子　善養寺　浩

2　耐熱性ウェルシュ菌の健康人における分布および血清学的型別……伊藤　武…… 7
　とそれに起因する食中毒に関する研究

3　本邦食品の糸状菌汚染に関する研究……一言　広　諸角　聖…41
　東京における市販ひき肉についての調査成績　和宇慶朝昭　善養寺　浩

4　中性洗剤による細菌および回虫卵の除去効果について……門野　義雄　柏木　義勝…47
　柴田　実　徳江シゲ子
　大久保暢夫

5　腸内ウイルス感染症の実態は握に関する研究（第5報）……岩崎　謙二　柳沢　靖子…53
　1972年 1～12月における東京都内3下水処理場の未処理下水　矢野　一好　山崎　清
　からのウイルス分離について　坂井冨士子　藪内　清
　根津　尚光

6　1968～1972年における東京都民の日脳ウイルス抗体保有状況の……岩崎　謙二　藪内　清…61
　分布　柳沢　靖子　矢野　一好
　根津　尚光

7　1971～1972年における東京都民のレオウイルス抗体保有分析……岩崎　謙二　矢野　一好…69
　柳沢　靖子　山崎　清

8　1972年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　坂井冨士子…75
　および疫学的研究　伊藤　忠彦　岩崎　謙二
　根津　尚光　渡辺　賢哉
　木下　正彦　永野清一郎
　加藤　孝雄

9　1973年初頭東京都内に発生したA型インフルエンザとその後……坂井冨士子　伊藤　忠彦…81
　発生したB型インフルエンザの検索成績　藪内　清　岩崎　謙二
　根津　尚光

10　リノール酸メチル中のα—トコフェロールおよびアスコルビン……松本　茂　中山　京子…91
　酸の酸化分解について　松本あき子　鈴木　侑子
　片羽　久恵

11　In vitro による注射剤中のパイロジェン検出の検討……下平　彰男……97

12　生薬の試験法に関する研究（Ⅳ）……西川　洋一　勝田　隆子 103
　最近の中国産朮類生薬について　渡辺四男也

13　生薬の品質評価に関する研究（Ⅱ）……渡辺四男也　上原　真一 109
　オウバク（黄柏）中のベルベリン含量と灰分の通年変化　西川　洋一　伊吹　直登
　について　小林　正夫　田中　孝治

14　毒物または劇物を含有する家庭用品の試験方法に関する……吉原　武俊　奥本千代美 117
　研究（Ⅰ）　福士真知子
　市販婦人および乳幼児用肌着中のホルマリンについて（1）

15　市販医療用医薬品の品質について（Ⅰ）……田窪　栄一　重岡　捨身 125
　クロフィブレートカプセル　寺島　潔　宮武ノリエ

16　市販医療用医薬品の品質について（Ⅱ）……田窪　栄一　宮武ノリエ 131
　イノシトールヘキサニコチネート錠　寺島　潔　重岡　捨身

17　有機ハロゲン化合物のケイ光反応に関する研究（第1報）……観　照雄　鎌田　国広 137
　Diphenylamine を用いる Polychlorinated biphenyl のケイ　植田　忠彦　山添　律子
　光薄層デンシトメトリー　戸谷　哲也

18 化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究（Ⅸ）……風間　成孔　水石　和子　147
ベビーパウダー，クリーム中 Hexachlorophene 等のハロゲンフェノール系殺菌剤の分離定量法　中村　義昭　原田　裕文　戸谷　哲也

19 ヒト臓器中のポリ塩化ビフェニール含有量について……鈴木　助治　山野辺秀夫　159
大沢　映子　小泉清太郎　戸谷　哲也

20 ゴム製器具に関する衛生化学的研究（第1報）……西田　茂一　小林　史尚　167
乳首中の鉛および亜鉛について

21 玩具に関する衛生化学的調査（第一報）……小泉清太郎　鈴木　助治　173
折り紙の溶出試験について　山野辺秀夫　大沢　映子　戸谷　哲也

22 動物性食品中の細菌発育阻止物質の簡易推定法に関する研究……村上　一　神崎　政子　183
松本　昌雄　神保　勝彦　春田三佐夫

23 市販飲用乳の抗生物質汚染の実態と原料生乳から分離したブドウ球菌の抗生剤感受性について……松本　昌雄　神保　勝彦　191
春田三佐夫

24 昭和48年流行した新しいインフルエンザB型ウイルスの電子顕微鏡的研究……前木　吾市　坂井冨士子　199

25 食品中のマイコトキシンに関する研究（第4報）……直井家寿太　小川　仁志　207
醸造食品中のステリグマトシスチン試験法の検討　風間　栄治　斉藤　和夫　志村　公子　木村　康夫

26 L－グルタミン酸の多量摂取に対する衛生学的検討（第Ⅲ報）L－グルタミン酸ナトリウム投与における生体成分の変動……西垣　進　田村　行弘　219
山田　洋　鳥羽　啓子　嶋村　保洋　木村　康夫

27 DDTC–MIBK 抽出を利用する重金属の原子吸光同時分析法の検討（第Ⅰ報）……西垣　進　田村　行弘　231
真木　俊夫　山田　洋
多量のカルシウムおよびリンを含む食品中からのクロム分析について　鳥羽　啓子　嶋村　保洋　木村　康夫

28 マグロ類およびその他の水産食品の水銀含有量調査（第1報）……西垣　進　田村　行弘　239
真木　俊夫　山田　洋　鳥羽　啓子　嶋村　保洋　木村　康夫

29 天然由来による食品中の安息香酸に関する研究〔Ⅰ〕……西島　基弘　上田　工　249
あんずおよびうめについて　大西　操　高橋　尚子　上村　尚　中里　光男　木村　康夫

30 炭酸飲料水中のキニーネに関する研究……西島　基弘　大西　操　257
高橋　尚子　上村　尚　中里　光男

31 薄層クロマトグラフィーによるかんきつ果実中のジフェニルの定量（第3報）……鈴木　二郎　友松　俊夫　263
シリカゲルとエタノールの相互作用　冠　政光　中沢久美子　片倉　栄一　木村　康夫

32 生あん中のシアンの定性定量法について……上田　工　勝木　康隆　269
安田　和男　佐藤彌代子　木村　康夫

33 サッカリンの分解について……遠藤　英美　半田八十三　277
広門　雅子　石井　和恵　藤居　瑛

34 熱硬化性樹脂製食器の衛生性（メラミン樹脂について）……佐藤彌代子　佐藤　憲一　285
中島世津子　吉田　令子　柴　英子　藤居　瑛

35 焼ミョウバンの焼成温度による不溶化について（オートアナラ……大畠　敏子　安野　哲子 291
イザー法によるアルミニウムの定量）　小野　綾子　柴山　良一
藤居　瑛

36 ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅰ）……武士俣邦雄　霜田さと子 297
ポルフィリン体の定量法とその周辺について　小笠原　公

37 ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅱ）……武士俣邦雄　霜田さと子 303
一時尿のδ—アミノレブリン酸，コプロポルフィリン，ウロ　小笠原　公　野牛　弘
ビリノーゲン等の関係について

38 東京都民の尿成分検査成績……小笠原　公　武士俣邦雄 311
ウロビリノーゲン，糖，タンパクの出現状況　霜田さと子　可児　利朗
野牛　弘

39 清掃工場における PCB 収支試算……秋山　和幸　長嶋　親治 319
藤谷　和正　辰市　裕久
高橋利恵子　佐藤　泰仁
溝口　勲　野牛　弘

40 微小位置差によるオキシダント濃度差の比較研究……溝口　勲　佐藤　泰仁 325
牧野　国義　大沢　誠喜
野牛　弘

41 オゾンによるショウジョウバエの遺伝的影響について……千種　翠　中田　英吉 331

42 粘菌のオゾン反応……狩野　文雄　…… 337

43 ＰＣＢによるヒナ腎病変……大井　玄　関　比呂伸 343
前田ヒロ子　湯目　邦雄
野牛　弘　加納　堯子
北川　知行

44 水中有機物に関する調査研究　第Ⅰ報……森田　昌敏　中村　弘 351
水中のフタル酸エステル（ジオクチルフタレート，ジブチル　三村　秀一
フタレート）について

45 食品中のフタル酸エステル（ＯＢＰ，ＤＯＰ）について……森田　昌敏　中村　弘 357
三村　秀一

46 野菜，果物中の中性洗剤の残留および農薬の洗浄除去効果につ……渡辺　悠二　中村　弘 363
いて　樋口　育子　会田　朋子
高橋　保雄　三村　秀一

47 東京湾内底質中のＰＣＢ量について……土屋　悦輝　小輪瀬　勉 371
山崎　堅吉　松本　浩一
三村　秀一

48 し尿浄化槽，団地排水処理場放流水のＢＯＤとＴＯＣの相関に……岡本　寛　笹野　英雄 383
関する研究　山崎　堅吉　三村　秀一

49 東京湾底泥中の硫酸塩還元菌について……松本　淳彦…… 389

50 合成洗剤の毒性に関する研究（Ⅰ）……小林　博義　市川　久次 397
直鎖形および分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウ　藤井　孝　矢野　範男
ムの急性毒性について　紺野　敏秀　平賀　興吾
中村　弘　渡辺　悠二
三村　秀一

51 合成洗剤の毒性に関する研究（Ⅱ）……米山　允子　藤井　孝 409
直鎖形および分岐鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリ　伊川三枝子　柴　英子
ウムの亜急性毒性について　坂本　義光　矢野　範男
小林　博義　市川　久次
平賀　興吾

52 合成洗剤の毒性に関する研究（Ⅲ）……佐藤　薫　安藤　弘 441
マウスの皮膚塗布による催奇形性試験　湯澤　勝広　平賀　興吾

53　食品添加物の相乗毒性に関する研究（Ⅲ）……米山　允子　柴　英子　449
Dibuty hydroxy toluene と Alkyl benzene sulfonate との併用による亜急性毒性について　藤井　孝　伊川三枝子　市川　久次　坂本　義光　矢野　範男　小林　博義　平賀　興吾

他誌に発表した論文の要旨…… 467

著　書…… 481

1972年に行なった学会発表演題…… 483

CONTENTS

ORIGINALS & NOTES

1 SURVEY FOR CONTAMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN COMMERCIAL EUROPIAN TYPE CAKES AND DEMONSTRATION OF ENTEROTOXIN FROM ISOLATES ..... Takeshi TERAYAMA, Hideo IGARASHI, Hiroshi USHIODA, Kahiko SAITO, Misako INABA and Hiroshi ZEN-YOJI 1

2 INCIDENCE OF HEAT RESISTANT *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN FECES OF HEALTHY SUBJECTS, SEROTYPING OF ISOLATES, AND FOOD POISONING CAUSED BY NEW SEROTYPE ORGANISMS ..... Takeshi ITOH 7

3 STUDIES ON FUNGAL CONTAMINATION OF FOODSTUFFS IN JAPAN: FUNGAL FLORA AND INCIDENCE OF TOXIN-PRODUCING FUNGI IN MINCED MEATS MARKETED IN TOKYO ..... Hiroshi HITOKOTO, Satoshi MOROZUMI, Tomoaki WAUKE and Hiroshi ZEN-YOJI 41

4 WASHING EFFECT OF SYNTHETIC DETERGENTS FOR THE ELIMINATION OF BACTERIA AND ASCARIS EGGS ATTACHED TO VEGETABLES .....Yoshio KADONO, Yoshikatsu KASHIWAGI, Minoru SHIBATA, Shigeko TOKUE and Nobuo OHKUBO 47

5 EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON ENTEROVIRUS INFECTION(V) VIRUS ISOLATION MADE AT THREE SEWAGE TREATMENT PLANTS IN TOKYO IN 1972 ..... Kenji IWASAKI, Yasuko YANAGISAWA, Kazuyoshi YANO, Kiyoshi YAMAZAKI, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI and Naomitsu NEZU 53

6 SEROEPIDEMIOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE INCIDENCE OF ANTIBODIES AGAINST JAPANESE ENCEPHALITIS IN TOKYOITES ..... Kenji IWASAKI, Kiyoshi YABUUCHI, Yasuko YANAGISAWA, Kazuyoshi YANO and Naomitsu NEZU 61

7 INCIDENCE OF ANTIBODY AGAINST REOVIRUS TYPE 1 IN HEALTHY TOKYOITES IN 1971~1972 ..... Kenji IWASAKI, Kazuyoshi YANO, Yasuko YANAGISAWA and Kiyoshi YAMAZAKI 69

8 ECOLOGICAL SURVEY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AND SEROLOGICAL CONFIRMATION OF ITS INFECTION ON SUSPECTED PATIENTS IN TOKYO IN 1972 ..... Kiyoshi YABUUCHI, Fujiko SAKAI, Tadahiko ITO, Kenji IWASAKI, Naomitsu NEZU, Kenya WATANABE, Masahiko KINOSHITA, Seiichiro NAGANO and Takao KATO 75

9 STUDIES ON PREVALENCE OF INFLUENZA OCCURED IN TOKYO IN

EARLY 1973 ····· Fujiko SAKAI, Tadahiko ITO, Kiyoshi YABUUCHI, Kenji IWASAKI and Naomitsu NEZU ····· 81

10 OXIDATIVE DESTRACTION OF α-TOCOPHEROL AND ASCORBIC ACID IN METHYL LINOLEATE ····· Shigeru MATSUMOTO, Kyoko NAKAYAMA, Akiko MATSUMOTO, Junko SUZUKI and Hisae KATABA ····· 91

11 INVESTIGATION OF IN VITRO METHOD FOR THE DETECTION OF PYROGENS IN INJECTIONS ····· Akio SHIMOHIRA ····· 97

12 STUDIES ON EXAMINATION METHOD OF CRUDE-DRUGS (IV)
DISCUSSION OF THE CHINESE CRUDE-DRUG ZHU IN RECENT YEARS ····· Yoichi NISHIKAWA, Takako KATSUTA and Yohya WATANABE ····· 103

13 STUDIES ON THE EVALUATION OF CRUDE-DRUGS (II)
SEASONAL VARIATION OF BERBERINE CONTENT AND TOTAL ASH IN THE PHELLODENDRI CORTEX ····· Yohya WATANABE, Shinichi UEHARA, Yoichi NISHIKAWA, Naozumi IBUKI, Masao KOBAYASHI and Koji TANAKA ····· 109

14 STUDIES ON EXAMINATION METHODS OF HOUSEHOLD-NECESSITIES CONTAINING POISONOUS CHEMICAL SUBSTANCES (I)
DETERMINATION OF FORMALIN IN LADIES' AND CHILDREN'S UNDER-WEARS ON THE MARKET (1) ····· Taketoshi YOSHIHARA, Chiyomi OKUMOTO and Machiko FUKUSHI ····· 117

15 ON THE QUALITY OF MEDICAL MEDICINES (I)
CLOFIBRATE CAPSULES ····· Eiichi TAKUBO, Sutemi SHIGEOKA, Kiyoshi TERAJIMA and Norie MIYATAKE ····· 125

16 ON THE QUALITY OF MEDICAL MEDICINES (II)
INOSITOL HEXANICOTINATE TABLETS ····· Eiichi TAKUBO, Norie MIYAKAKE, Kiyoshi TERAJIMA and Sutemi SHIGEOKA ····· 131

17 STUDIES ON FLUORESCENCE REACTIONS FOR ORGANIC HALOGEN COMPOUNDS (I)
QUALITATIVE AND QUANTITATIVE *IN SITU* FLUOROMETRY OF POLYCHLORINATED BIPHENYL USING DIPHENYLAMINE ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY ····· Teruo KAN, Kunihiro KAMATA, Tadahiko UETA, Ritsuko YAMAZOE and Tetsuya TOTANI ····· 137

18 STUDIES ON EXAMINATION OF THE SPECIFIC MATERIALS IN COSMETICS (IX)
THE METHOD OF SEPARATION AND DETERMINATION OF HALOGENO-PHENOLIC GERMICIDES, SUCH AS HEXACHLOROPHENE, CONTAINED IN BABY POWDER AND CREAM ····· Masayoshi KAZAMA,

Kazuko MIZUISHI, Yoshiaki NAKAMURA, Hirofumi HARADA and Tetsuya TOTANI 147

19 STORAGE OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN HUMAN ORGANS AND TISSUES IN TOKYO ..... Sukeji SUZUKI, Hideo YAMANOBE, Eiko OHSAWA, Seitaro KOIZUMI and Tetsuya TOTANI 159

20 HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON RUBBER UTENSIL (I)
LEAD AND ZINC CONTENTS IN RUBBER NURSING-BOTTLE NIPPLES···
Shigekazu NISHIDA and Humitaka KOBAYASHI 167

21 HYGIENIC CHEMICAL INVESTIGATIONS ON TOYS (I)
DETECTION OF COLORING MATTERS AND HEAVY METALS EXTRACTED FROM "ORIGAMI" (COLORED PAPER) ..... Seitaro KOIZUMI, Sukeji SUZUKI, Hideo YAMANOBE, Eiko OHSAWA and Tetsuya TOTANI 173

22 STUDIES ON SIMPLE SCREENING PROCEDURE FOR ANTIMICROBIAL AGENTS IN FOOD ANIMAL TISSUES ..... Hajime MURAKAMI, Masako KANZAKI, Masao MATSUMOTO, Katsuhiko JIMBO and Misao HARUTA 183

23 INCIDENCE OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK AND SENSITIVITY OF COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FROM RAW MILK AGAINST SEVERAL ANTIBIOTICS ..... Masao MATSUMOTO, Katsuhiko JIMBO and Misao HARUTA 191

24 ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF NEW B TYPE INFLUENZA VIRUS ISOLATED IN 1973 ..... Goichi MAEKI and Fujiko SAKAI 199

25 STUDIES ON MYCOTOXINS IN FOODS (4)
DETERMINATION OF STERIGMATOCYSTIN IN MISO AND SOY SAUCE
Yasuta NAOI, Hitoshi OGAWA, Eiji KAZAMA, Kazuo SAITO, Kimiko SHIMURA and Yasuo KIMURA 207

26 HYGIENIC STUDIES ON A LARGE AMOUNT OF L-GLUTAMIC ACID INGESTION
(III) STUDIES ON VARIATION OF BIOCHEMICAL COMPONENTS IN SERUM AND URINE AFTER ORAL ADMINISTRATION OF MONO SODIUM L-GLUTAMATE IN MAN ..... Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA 219

27 DDTC-MIBK EXTRACTION SYSTEM FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HEAVY METALS IN FOODS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY (I)
ANALYSIS OF CHROMIUM IN FOODS CONTAINING A LARGE AMOUNT

OF CALCIUM AND PHOSPHATE ..... Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA 231

28 INVESTIGATION ON MERCURY LEVELS IN TUNA, MARLIN AND MARINE PRODUCTS (1) ..... Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA 239

29 STUDIES ON NATURALLY DERIVED BENZOIC ACID IN FOOD (I) DETECTION FROM APRICOT AND PLUM ..... Motohiro NISHIJIMA, Kou UEDA, Misao OHNISHI, Shyoko TAKAHASHI, Hisashi KAMIMURA, Mitsuo NAKAZATO and Yasuo KIMURA 249

30 DETECTION AND IDENTIFICATION OF QUININE IN MARKET AERATES WATERS ..... Motohiro NISHIJIMA, Misao OHNISHI, Shyoko TAKAHASHI, Hisashi KAMIMURA, Mitsuo NAKAZATO and Yasuo KIMURA 257

31 DETERMINATION OF BIPHENYL IN CITRUS FRUITS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (III) INTERACTION OF ETHANOL WITH SILICA GEL SURFACE ..... Jiro SUZUKI, Toshio TOMOMATSU, Masamitsu KANMURI, Kumiko NAKAZAWA, Eiichi KATAKURA and Yasuo KIMURA 263

32 DETERMINATION OF CYANIDE IN BEAN PASTE ..... Kou UEDA, Yasutaka KATSUKI, Kazuo YASUDA, Yayoko SATO and Yasuo KIMURA 269

33 STUDIES ON DECOMPOSITION OF SACCARIN (PART I) ..... Fusayoshi ENDO, Yasomi HANDA, Masako HIROKADO, Kazue ISHII and Teru FUJII 277

34 HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON THERMOSETTING PLASTICS (Melamine Ware) ..... Yayoko SATO, Kenichi SATO, Setsuko NAKAJIMA, Reiko YOSHIDA, Hideko SHIBA and Teru FUJII 285

35 RELATION BETWEEN THE TEMPERATURE AND THE AMOUNT OF INSOLUBILITY IN PREPARATION OF BURNT ALUM (Determination of Aluminum by Use of Auto Analyzer) ..... Toshiko OHATA, Tetsuko YASUNO, Ayako ONO, Ryoichi SHIBAYAMA and Teru FUJII 291

36 BIOCHEMICAL STUDIES ON THE PORPHYRINS (I) QUANTITATIVE METHOD AND REFERENTIAL FACTORS ON THE URINARY PORPHYRINS ..... Kunio BUSHIMATA, Satoko SHIMODA and Kimi OGASAWARA 297

37 BIOCHEMICAL STUDIES ON THE PORPHYRINS (II)
RELATIONS ON THE δ-AMINOLEVULINIC ACID, COPROPORPHYRIN AND UROBILINOGEN IN TEMPORARY URINE ····· Kunio BUSHIMATA, Satoko SHIMODA, Kimi OGASAWARA and Hiroshi YAGYU ····· 303

38 RESULT OF URINALYSIS OF THE INHABITANTS IN TOKYO
ON THE EXAMINATION OF URINE UROBILINOGEN, SUGAR AND PROTEIN ····· Kimi OGASAWARA, Kunio BUSHIMATA, Satoko SHIMODA, Toshiro KANI and Hiroshi YAGYU····· 311

39 AN ESTIMATION OF THE INTAKE AND THE OUTPUT OF PCBs IN THE INCINERATION PLANT ····· Kazuyuki AKIYAMA, Chikaharu NAGASHIMA, Kazumasa FUJITANI, Sukehisa TATSUICHI, Rieko TAKAHASHI, Yasuhito SATO, Isao MIZOGUCHI and Hiroshi YAGYU··· 319

40 COMPARATIVE STUDY ON THE DIFFERENCES OF OXIDANTS CONCENTRATIONS DEPEND ON TWO SITES IN A SCHOOL YARD AND BUILDINGS ····· Isao MIZOGUCHI, Yasuhito SATO, Kuniyoshi MAKINO, Masanobu OSAWA and Hiroshi YAGYU····· 325

41 GENETIC EFFECTS OF OZONE ON FECUNDITY (NUMBERS OF EGGS), HATCHABILITY, EMERGENCE RATE AND LONGEVITY IN *Drosophila melanogaster* ····· Midori CHIGUSA and Eikichi NAKADA ····· 331

42 OZONE REACTION ON SLIME MOLD ····· Fumio KANOH ····· 337

43 PATHOLOGICAL CHANGES IN THE KIDNEY CAUSED BY PCBs ····· Gen OHI, Hironobu SEKI, Hiroko MAEDA, Kunio YUNOME, Hiroshi YAGYU, Takako KANO and Tomoyuki KITAGAWA ····· 343

44 STUDIES ON ORGANIC SUBSTANCES IN WATER SYSTEM. PART I PHTHALIC ACID ESTERS (DOP AND DBP) IN WATER ····· Masatoshi MORITA, Hiroshi NAKAMURA and Shuichi MIMURA····· 351

45 PHTHALIC ACID ESTERS (DOP AND DBP) IN FOODS ····· Masatoshi MORITA, Hiroshi NAKAMURA and Shuichi MIMURA ····· 357

46 STUDIES ON RESIDUAL SYNTHETIC DETERGENT IN VEGETABLE AND FRUIT, AND ON REMOVAL EFFECT OF RESIDUAL INORGANIC PESTICIDE ····· Yuji WATANABE, Hiroshi NAKAMURA, Yasuko HIGUCHI, Tomoko AIDA, Yasuo TAKAHASHI and Shuichi MIMURA ····· 363

47 POLYCHLORINATED BIPHENYLS LEVELS IN THE SEDIMENTS OF TOKYO BAY ····· Yoshiteru TSUCHIYA, Tsutomu KOWASE, Kenkichi YAMAZAKI, Kouichi MATSUMOTO and Shuichi MIMURA····· 371

48 STUDIES ON THE CORRELATION BETWEEN BOD AND TOC OF EFFLUENT IN SEPTIC TANKS AND IN SEWAGE TREATMENT PLANTS OF

PUBLIC HOUSING AREAS ..... Yutaka OKAMOTO, Hideo SASANO, Kenkichi YAMAZAKI and Shuichi MIMURA 383

49 DISTRIBUTION OF MARINE SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE BOTTOM SEDIMENT OF TOKYO BAY ..... Atsuhiko MATSUMOTO 389

50 STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETERGENTS (I) ACUTE ORAL TOXICITY OF LINEAR AND BRANCHED ALKYL BENZENE SULFONATE ..... Hiroyoshi KOBAYASHI, Hisatsugu ICHIKAWA, Takashi FUJII, Norio YANO, Toshihide KONNO, Kogo HIRAGA, Hiroshi NAKAMURA, Yuji WATANABE and Shuichi MIMURA 397

51 STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETERGENTS (II) SUBACUTE TOXICITY OF LINEAR AND BRANCHED ALKYL BENZENE SULFONATES IN RATS ..... Masako YONEYAMA, Takashi FUJII, Mieko IKAWA, Hideko SHIBA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Norio YANO, Hiroyoshi KOBAYASHI, Hisatsugu ICHIKAWA and Kogo HIRAGA 409

52 STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETERGENTS (III) EXAMINATION OF TERATOGENIC EFFECTS OF ALKYL BENZENE SULFONATE SPREAD ON THE SKIN IN MICE ..... Kaoru SATO, Hiroshi ANDO, Katsuhiro YUSAWA and Kogo HIRAGA 441

53 TOXICOLOGICAL POTENTIATION STUDIES ON FOOD ADDITIVES (III) DIBUTYL HYDROXY TOLUENE AND ALKYL BENZENE SULFONATES ..... Masako YONEYAMA, Hideko SHIBA, Takashi FUJII, Mieko IKAWA, Hisatsugu ICHIKAWA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Norio YANO, Hiroyoshi KOBAYASHI and Kogo HIRAGA 449

SUMMARIES OF PAPERS PUBLISHED ELSEWHERE IN 1972 467

BOOKS PUBLISHED IN 1972 481

THEMES PRESENTED AT SCIENTIFIC MEETINGS IN 1972 483

一　般　論　文

市販洋菓子の黄色ブドウ球菌汚染の実態とそれらから検出された黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能について

寺山　武*　五十嵐英夫*　潮田　弘*
斎藤香彦*　稲葉美佐子*　善養寺　浩*

（検体集収担当：衛生局環境衛生部食品監視課，各保健所衛生課）

SURVEY FOR CONTAMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN COMMERCIAL EUROPIAN TYPE CAKES AND DEMONSTRATION OF ENTEROTOXIN FROM ISOLATES

Takeshi TERAYAMA, Hideo IGARASHI, Hiroshi USHIODA, Kahiko SAITO, Misako INABA and Hiroshi ZEN-YOJI

(Division of Bacteriology I, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

During January to March 1971, a survey was conducted for demonstrating the contamination with *Staphylococcus aureus* on 1,077 samples of europian type cakes which had sold at confectioneries in Tokyo. In the survey, *S. aureus* was isolated from 24 out of all the cakes examined; its detection rate was calculated 2.2%. These 24 isolates were tested for enterotoxin productivity, and 23 out of them were capable to produce the toxin.

About one-half number of 23 isolates produced enterotoxin A, B, C or D, respectively, in which enterotoxin B producing strain was only one, while the remaining strains produced two or three types of enterotoxins. Most predominant enterotoxin type demonstrated was D, followed by C and A.

緒　言

わが国で発生する細菌性食中毒は，腸炎ビブリオによるものが40～60%を占めて最も多く，ついでブドウ球菌によるものが20～40%，サルモネラによるものが10～20%，その他の細菌によるものはわずか数%となっている。腸炎ビブリオ食中毒はほとんど海産魚介類を原因として，7～9月に限定して発生している。しかし，適切な予防措置が取られるようになったために，しだいにその発生ひん度が低下している。

これに対して，ブドウ球菌やサルモネラによる食中毒はむしろ近年やや増加の傾向がみられ，公衆衛生上の問題の1つとなっている。米国やヨーロッパにおいても，ブドウ球菌食中毒の発生は多く，本菌食中毒はその発現症状が軽症であるため軽視されがちであるが，今や世界的にも食品衛生上の問題の1つであるといえる。

ブドウ球菌食中毒の原因となる食品は，食生活の相違から国により異なるが，わが国では米飯を主体としたものが多く，洋菓子類がこれについでいることが指摘されてきた[1]。本報では，ブドウ球菌食中毒予防の一環として，市販洋菓子における黄色ブドウ球菌汚染の実態を把握する目的で行なった検査成績とその際の検出菌のエンテロトキシン産生性を検討した成績を報告する。

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第1研究科

調査対象

1971年1月～3月の間に，東京都内の販売店より収去された洋菓子，1,077件である。それら洋菓子の種類およびその各件数を Table Ⅰ に示した。

細菌学的試験・検査法

一般生菌数および大腸菌群数の測定：食品衛生検査指針[2]に準じた。

黄色ブドウ球菌の分離および菌数測定：食品の10％乳剤0.1mlをＭＳＥＹ培地[1]に滴下，コンラージ棒で培地一面に塗抹し，37Ｃで48時間培養した後，卵黄反応陽性の集落について黄色ブドウ球菌の同定試験を行なった。黄色ブドウ球菌数は卵黄反応陽性の黄色ブドウ球菌集落を算定する方法より求められた。

エンテロトキシン産生能の検討と毒素の型別法：黄色ブドウ球菌が検出された洋菓子1件からおのおの1菌株の黄色ブドウ球菌を任意に選び，それらの寒天培養菌の1白金耳あてを4％ *NZ-Amine* 培地[3] 100m*l*（500m*l*の三角コルベンに入れ121Ｃ，15分間加熱・滅菌した）に接種し，35Ｃで24時間振盪培養（振巾15cm，毎分100回水平振盪）を行なった。この培養液を10,000 *rpm* 15分間の遠沈によって菌を除去し，その上清を透析用セロファンチューブに入れてポリエチレングリコール20,000の50％液中で，原量の1/50に濃縮した。この濃縮液を被検エンテロトキシン抗原として，寺山ら[3]の方法により，スライドゲル内沈降反応によってエンテロトキシンの型別を行なった。

コアグラーゼ型別法：善養寺ら[4,5]の方法によった。

成績および考察

洋菓子からの黄色ブドウ球菌の検出状況

市販洋菓子1,077件について黄色ブドウ球菌の汚染調査を行なった結果を，洋菓子の種類ごとにまとめて Table Ⅰ に示した。各種類ごとの検体数が数個のものから数百個のものまでまちまちであるので，一概にそれらの黄色ブドウ球菌の汚染率を言及することはでき

Table Ⅰ Detection of *Staphylococcus aureus* from europian type cakes

Specimen tested	No. of tested	No. of positive (Staphylococcal count per gram 10^2)	No. of positive (10^3)	No. of total positive (％)
Short cake	276	3		3 (1.1)
Cream cake	150	6	1	7 (4.7)
Mont blanc	86	3		3 (3.5)
Eclair	55			
Fruit cake	45	2	1	3 (6.7)
Custerd cream cake	43			
Omelet cake	41	1		1 (2.4)
Pudding	39			
Bavarois	34	4		4(11.8)
Chocolate cake	29	1		1 (3.4)
Savarin	23			
Roll cake	21			
Torten	19	1		1 (5.3)
Parfait	17			
Hawaian pine	12	1		1 (8.3)
Nits cake	9			
Pie	8			
Cheese cake	7			
Gateau	6			
Mix cream cake	5			
Others	52			
Total	1,077	22	2	24 (2.2)

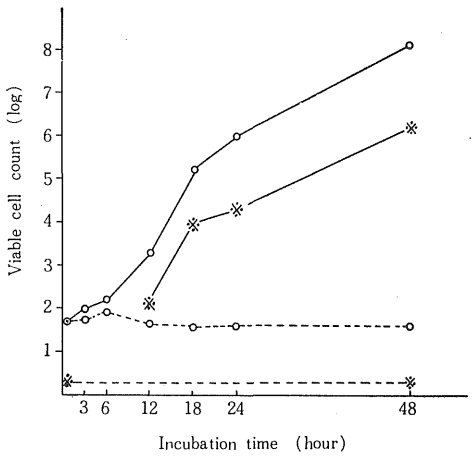
ないが，検体数30個以上のものについてみれば，ババロアが4/34(11.8%)，フルーツケーキ：3/45(6.7%)，生シュークリーム：7/150(4.8%)，モンブラン：3/86などが高い汚染を示していた。全体では1,077検体中24検体(2.2%)から黄色ブドウ球菌が検出された。

この調査とは別に，われわれが1972年の同時期に洋菓子743検体について黄色ブドウ球菌汚染調査を行なった際に，検体1gを7.5% NaCl加ブイヨンで増菌培養を行なった後に，MSEY培地で分離培養を行なったものと，直接検体の10%乳剤の0.1ml（検体量にして0.01g）をMSEY培地に塗抹・培養したものと比較してみると，前者で101/743（14.9%）後者で13/743（1.74%）から黄色ブドウ球菌が検出された。本調査においても増菌培養を併用していたならば，より高い陽性率が得られたであろう。増菌培養ではじめて黄色ブドウ球菌が検出されるような少数菌汚染でも，洋菓子の保存の条件しだいでは，黄色ブドウ球菌が増殖し，時間の経過とともに本菌菌数が増加することが示唆されるので，本菌検査にあたっては増菌培養を併用するのがのぞましい。

黄色ブドウ球菌が検出された24検体における汚染菌数をみると，洋菓子1g当り100～1,000個の黄色ブドウ球菌が認められたものが22検体，1,000～10,000のものが2検体であり，それ以上のものは1例も認められなかった。このように洋菓子における黄色ブドウ球菌の汚染菌数が概して少ないものが多いことは，この調査が季節的に低温のシーズンに行なわれたこと，さらに店舗より収去されてから検査までの時間が短かかったことなども関与していると推測される。

シュークリーム中における黄色ブドウ球菌数および一般生菌数の消長

Fig. 1 は実際に市販されていた洋菓子（シュークリーム）で，0.01gの培養では黄色ブドウ球菌が検出されないが，増菌培養ではじめて本菌が検出されたものを，25℃と5℃に保存して経時的に一般生菌数と黄色ブドウ球菌数の消長を検討した成績を示したものである。図から明らかなごとく，5℃に保存した場合には48時間経過しても黄色ブドウ球菌および一般生菌数の増加は認められない。これに対して，25℃に保存した場合には，一般生菌数において約6時間の lag phase の後，対数的に増殖しており，48時間後には10^8/gの菌数に達した。一方，同条件で黄色ブドウ球菌は，本菌菌数計算を検体の10%乳剤の0.1ml（もとの検体にして0.01g相当）について行なった関係から，6時間までは本菌が認められなかったが，12時間後にはじめて認められ，それ以後，対数的に増殖し，48時間後には黄色ブドウ球菌が10^6/gに達した。黄色ブドウ球菌の増殖曲線と，一般生菌数の増殖曲線とはほとんど平行しており，黄色ブドウ球菌の増殖が一般生菌数に影響されるような現象は認められなかった。



○——○ Total viable cell count at 25°C.
○------○ Total viable cell count at 5°C.
※——※ Staphylococcal count at 25°C,
※……※ Staphylococcal count at 5°C.

Fig. 1 Comparison of time course of growth of *Staphylococcus aureus* and other bacteria in a cream cake at 5°C and 25°C.

黄色ブドウ球菌汚染洋菓子における一般生菌数および大腸菌群数

黄色ブドウ球菌陽性の洋菓子24検体について一般生菌数および大腸菌群数の算定を行ない，両者との関係を各別に求めた。黄色ブドウ球菌が検出された洋菓子で一般生菌数が100/g以下のものは1例もなく，10^2/gのもの1例，10^3/gのもの4例，10^4/gが7例，10^5/gが6例，10^6/gが5例，10^7/gが1例であった。この成績は黄色ブドウ球菌の検出された検体は一般生菌の汚染もかなり高いことを示している。

これに対して，黄色ブドウ球菌が検出された24例のうちで大腸菌群が陰性のもの6例，大腸菌群が確認されたが100/g以下のもの7例，10^2/gが4例，10^3/gが3例，10^4/gが1例，10^5/gが3例，10^6/g以上のものはなかった。以上のごとく，黄色ブドウ球菌汚染と大腸菌群汚染との間には関連が見出されなかった。したがって，汚染指標菌としての大腸菌群の試験は黄色ブドウ球菌汚染指標とはなり得ず，本菌の食品汚染

調査は独自の検査を行なわなければならないことを示唆している。

洋菓子由来黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生能およびエンテロトキシン型とコアグラーゼ型

黄色ブドウ球菌が分離された洋菓子24検体の各々から各1株を任意に選んだ24株の黄色ブドウ球菌について，エンテロトキシン産生能とコアグラーゼ型を検討した成績を Table II に示した。24株中エンテロトキシンA～Dを産生したものは23株（95.8%）もの多きにわたった。これらのエンテロトキシン型はD型またはその複合型がもっとも多く16株，ついでC型とその複合型が12株，A型またはその複合型6株，B型を産生したものは，わずかに1株しか認められなかった。前報[3]でも指摘したごとく，検査材料の種類には関係なく，エンテロトキシンB産生菌の分布は少なく，D，C，A型毒素産生菌の分布が多いのが実状であろう。

Table II **Enterotoxin producing ability of isolates of *Staphylococcus aureus* from the cakes and enterotoxin types and coagulase types of the isolates.**

Coagulase type	No. of strain	Enterotoxin type								
		A	B	C	D	AC	AD	CD	ACD	Not found
I	2		1					1		
II	3							1	1	1
III	1				1					
IV	7	1			1	1		3	1	
V										
VI	3	1		1	1					
VII	8			1	4		1	2		
Total	24	2	1	2	7	1	1	7	2	1

分離菌のコアグラーゼ型は1検査材料から可能なかぎり3株を型別したが，1つの検体から異なったコアグラーゼ型の菌株が認められた例は1例もなかった。したがって，1つの検査材料は均一の菌型で汚染されていることを示すものである。24検体から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型は，Ⅶ型が8株，Ⅳが7株で，この両者が全体の2/3を占めた。コアグラーゼ型とエンテロトキシン型を TableⅡ に対比させて示したごとく，両者の間には関連性は認められなかった。

食中毒の原因となった黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型はⅡ，Ⅲ，ⅥおよびⅦ型に限られることを前報[1]で報告したが，分離菌のエンテロトキシン産生性を検討した成績では，いずれのコアグラーゼ型の菌株もこの毒素を産生しており，食中毒発生の予防を考える時，これら以外のコアグラーゼ型の菌株も無視することはできない。かりに前報で指摘したごとく，コアグラーゼⅡ，Ⅲ，Ⅵ，Ⅶ型菌だけが食中毒原性を有するにしても，本調査において分離された黄色ブドウ球菌で，コアグラーゼⅡ，Ⅲ，Ⅵ，Ⅶ型に型別されたものは24株中15株も含まれており，洋菓子の保存状態によっては，これらの菌の増殖が可能であり，当然，菌の増殖にともなってエンテロトキシンが産生されるから，食中毒予防の面からこれら食品における黄色ブドウ球菌汚染防止の適切な処置・指導が切望される。

結　　論

市販洋菓子の黄色ブドウ球菌汚染調査と，それらから分離された菌株のエンテロトキシン産生能について調査した結果以下の成績を得た。

市販洋菓子1,077件についてその0.01ｇの培養検査により24件（2.2%）から黄色ブドウ球菌が検出された。

黄色ブドウ球菌が検出された洋菓子における一般生菌数は多くの場合10^4/ｇ以上認められた。一方大腸菌群は陰性のものから，10^5/ｇのものまでまちまちであった。

洋菓子由来の黄色ブドウ球菌のうち23株（95.8%）はエンテロトキシンA～Dを産生した。

謝　　辞

本調査は衛生局業務の一環として行なわれたもので，食品監視課，各保健所衛生課の職員との共同調査であるが担当職員全員の氏名を上げることができないので，協力機関名のみを付した。協力を賜わった各職員に心から謝意を表します。

本稿の要旨は食品衛生学会第22回学術講演会において発表した。

文　　献

1）善養寺　浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐英夫，丸山　務，坂井千三：食衛誌，12，311，(1971)

2）厚生省編纂：“衛生検査指針　Ⅲ食品衛生検査指針—細菌学的検査法

3）寺山　武，五十嵐英夫，潮田　弘，善養寺　浩：食衛誌，13，549（1972）

4）善養寺　浩，寺山　武：モダンメディア，12，12（1966）

5）善養寺　浩，寺山　武，潮田　弘，工藤泰雄，坂井千三：都衛研年報，19，49（1967）

耐熱性ウェルシュ菌の健康人における分布および血清学的型別とそれに起因する食中毒に関する研究

伊藤　武*

INCIDENCE OF HEAT RESISTANT *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN FECES OF HEALTHY SUBJECTS, SEROTYPING OF ISOLATES, AND FOOD POISONING CAUSED BY NEW SEROTYPE ORGANISMS

Takeshi ITOH

(Division of Bacteriology I, Department of Microbiology,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Among the physiological characteristics of *Clostridium perfringens* in human feces, survival of the organism from heating at 100°C for 1–5 hours is said to be one of indispensable characteristics for the identification of its pathogenicity in regard to the ability of the organism to be an etiological agent of human enteritis. Because, there are numerous type of organisms beloging to the species of *Cl. perfringens* not only in nature including foods but also in human intestine as a normal intestinal flora.

On the other hand, since many investigators have reported the fact that the heat resistant *Cl. perfringens* exists in the feces of healthy subjects in certain extent, a series of investigations was conducted for clarifing the incidence and serotypes of isolates of heat resistant *Cl. perfringens* in the feces of healthy Tokyoites, in the period from 1966 through 1970.

In the early part of the investigation conducted in the period of 1966–1968, a total of 1,688 fecal specimens was collected from healthy subjects, consisting of 48 of 1–3 years old infants, 1,080 of 6–11 years old pupils, 350 of 15–17 years old senior high school pupils, 145 of 20–50 years old adults, 65 of 60–80 years old adults, and each 1 gram of them was inoculated into 13 ml of thioglycolate medium, followed by heating at 100°C for 60 minutes respectively in order to isolate the heat resistant strains. After cooling, they were incubated at 37°C for 48 hours. Then, 2 loops of the cultures were transfered onto the CW ager plate with 5% egg-yolk and incubated anaerobically at 37°C for 24 hours.

Through the investigation, it was found that 236 (14.0%) out of 1,688 had involved more or less heat resistant *Cl. perfringens* in the fecal specimens. However, the detection rate of the organism from specimens in each age group was varied from 6.3% to

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科

37.1% according to the groups tested. It was also observed that the detection rate of the organism in particular age group also varied according to the area of dwellings or difference of investigation periods. When serotyping was conducted on the 772 isolates obtained through this survey, only 304 (39.4%) isolates could be typed into the known Hobbs' serotypes 1–13 (as of December 1968, there were only 13 serotypes), and remaining 468 isolates were untypable by her serotyping. In addition, the detection frequency of the same serotype of organism from feces of healthy individuals was found to be quite low, when followup investigation was made on the 339 fecal specimens obtained from 113 representative individuals, for the consecutive 6 months with a interval of 1 or 2 months. And in each specimen, there were always variety of organisms consisting of several serotypes of the ones.

Since there were so many untypable isolates by the Hobbs' typing procedure, antigenic analysis of the untypable strains was attempted. Discrimination and serogrouping of individual isolates by their antigenic composition were made by using antisera immunized rabbits with representative cultures selected systematically from all these untypable strains. Through the cross absorption and agglutination tests on the prepares immune sera with antigens of these untypable strains, it was found that there were additional 56 serotypes (TW1–56) of the organisms, other than the ones known to have been classified into Hobbs' 1–17 serotypes.

The latter half of the same sort of investigation was conducted in the period of 1969–1970, on the fecal specimens collected from 1,091 normal healthy Tokyoites, consisting of 362 of 6–11 years old pupils, 350 of 15–17 years old senior high school pupils, and 379 of adults greater than 20 year of their ages. All the specimens collected were treated and inoculated as in the same way as it was done at the first investigation. In this time, efforts were concentrated for the isolation and discrimination of the new TW-type organisms. Consequently, 487 out of 805 isolates were found to be the organisms other than Hobbs' 1–17 serotypes. Of them, 446 (91.6%) isolates were typed into the new 51 TW-types, while the rest of 41 (8.4%) isolates were untypable by the new anti-TW typing sera. Among the isolates typed, TW-1, 6, 11, 20, 21, 44, and 52 were relatively dominant organisms detected.

As for the occurrence of food poisoning outbreaks due to these new TW-type organisms, there were 3 proved outbreaks in Tokyo in the period of 1968–1970. In these cases, a total of 518 patients were involved, and most of them developed typical food poisoning symptoms 12–16 hours after the injestion of the incriminated foods. In every case a responsible organism for the outbreak was isolated in the state of pure culture, both from the incriminated food and from the feces of patients simultaneously. They were proved to be caused by TW-4, 6 and mixture of TW-4 and 45 types of organisms respectively.

In addition to these surveys, an experimental study was made to establish a practical procedure for the determination of heat resistant characteristics of *Cl. perfringens* involved in food, because it has been well known that the evidence of the existence of the heat resistant organism in food is quite difficult to prove, if homogenates of suspi-

cious food stuffs are heated at 100°C for 60 minutes, as in the case of patients feces.

In the preliminary experiment, comparative studies were carried out on the Hobbs' type pilot strains for the ability of the formation of the heat resistant spores having capable of surviving from heating at 100°C for 60 minutes by using five kinds of spore forming media, such as Ellner's medium, Nishida's chopped meat broth, Angelotti's sporulation enrichment culture (SEC) broth, Kim's medium, and Dancan's medium. As a result, it was noticed that Kim's medium was the most suitable one for this purpose, followed by Dancan's medium and Angelotti's SEC broth respectively, when all the 48 hour cultures of 17 Hobbs' type pilot strains in the above mentioned 5 media were compared.

When it was applied on the laboratory isolates, majority of isolates (144/149) derived from both incriminated foods and patients' feces on 13 food poisoning outbreaks due to *Cl. perfringens* formed successfully heat resistant spores in Kim's and Dancan's media. While all the 96 isolates obtained from unheated feces of healthy subjects failed to produce any heat resistant spores in the same media. Thus, was concluded that when it was required to determine the heat resistant characteristics of *Cl. perfringens* involved in food stuffs, Kim's or Dancan's spore forming media were advisable to be used, after the enrichment of the organism in specimens in thioglycolate medium.

緒　　言

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトならびに動物の消化管内[1) 2) 3)]，土壌[4) 5)] および下水中[6)] など自然界に広く分布している。

Oakley ら[7)] は，本菌を，産生する毒素の特異性によって，A—Fの6型に分類した。これらの毒素型のうちで，B型，C型，およびD型菌は幼獣の腸炎[8) 9) 10)] あるいは腸毒血症 (enterotoxemia)[11)] の起因菌となることが知られている。本邦においては，白幡ら[12)] はウェルシュ菌に起因する牛の腸毒血症，今井ら[13)] は犬の出血性腸炎について，興味ある知見を報告している。

一方，ヒトにおけるウェルシュ菌の感染症は，A型菌によるガス壊疽が古くから重要視されていたが，1895年に Klein[14)] は英国の病院で発生した2例の集団下痢患者ふん便から本菌を証明し，腸炎起因菌となり得ることを示唆した。その後，Andrewes[15)]，Knox ら[16)] および McClung ら[17)] によっても同様な事例が追加報告されてきた。しかし，ウェルシュ菌は腸管内常在細菌叢を形成する一員であり，そうした正常ウェルシュ菌と腸炎起病性ウェルシュ菌の異同が明確にされていないままに，本菌の腸炎起病性は長い間疑問視されていた。

ところが，1957年 Hobbs ら[6)] はロンドンで発生した集団食中毒事例を疫学的および細菌学的に検討を加え，それらの事例の起因菌は，A型耐熱性ウェルシュ菌 (heat-resistant *Clostridium perfringens* type A 以後耐ウ菌と略す) によるものであることを明らかにした。これらの事例の起因菌は，ヒトの腸管内常在細菌叢としてのウェルシュ菌よりその芽胞の熱抵抗性が強く，患者ふん便を100°C 1～4 時間加熱してもなお生残することができる耐熱性菌であった。その後 Dische ら[18)] が Hobbs らの分離菌についてのヒト経口投与実験を行ない腸炎起病性を確認するに及んで，耐ウ菌の腸炎起病性が再認識されるようになった。

耐ウ菌食中毒を論じるに当って，先ず考慮しなければならないことは，耐ウ菌が食中毒患者ふん便からのみ検出されるということではなく，健康人ふん便中からもしばしば検出されるという事実である。しかも，その検出率は英国で5.2%[6)]，米国で4.9%[19)] と報告されているのに対し，本邦では，盛永ら[20)] は58.7%，吉村ら[21)] は62.0%，相川ら[22)] は24,1%，辺野喜ら[23)] 22.0%と欧米の報告例と比較して非常に高い値を示している。

このように地域あるいは研究者の違いによって，健康人からの耐ウ菌の検出率は非常に大きな差異が認め

られる。このことは，耐ウ菌食中毒の原因菌を決定するために，常にその地域に居住する健康人の耐ウ菌の分布をその血清型まで詳細に検討しておく必要があることを示唆しているものと考える。

つぎに，現在までに報告された多くの耐ウ菌食中毒事例の分離菌の血清型は1～17型の Hobbs 型のいずれかに該当している。この事実は，Hobbs 型耐ウ菌がヒト腸炎起病性と密接な関係にあり，食中毒の原因菌として重要な役割を演じていることは間違いのないことであろう。一方，Hobbs 型に該当しない耐ウ菌が，高率に健康者の腸管内に分布していることも，すでに著者ら[24]，Sutton[25] および Nagasaki[26] によって明らかにされている。しかし，この Hobbs 型以外の耐ウ菌の抗原的な差異およびその腸炎起病性については，現在まで全く検討されていない。この点の解明も極めて興味ある重要な問題であろう。

そこで本研究では，第1に，都内居住の健康人を対象に，耐ウ菌の分布，検出菌の血清型ならびに，排菌の推移について，

第2に，健康人由来の Hobbs 型に属さない耐ウ菌の血清学的型別とその応用について，

第3に，Hobbs 型に属さない耐ウ菌による食中毒3事例の疫学的ならびに細菌学的検討を加えた成績について，

第4に，食中毒由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能について，

の4点について検討を加え興味ある知見を得たので報告する。

第Ⅰ編　健康人における耐熱性ウェルシュ菌の分布と排菌の推移

1　材料および方法

1）健康人ふん便

1966～1968年の3年間に，以下に述べる都内居住の年令層の異なる5群の健康人ふん便約1gを，グリセリン保存液 4m*l* 宛入れたスクリューキャップ付試験管に採取し，検査材料とした。

検査対象とした健康人の内訳はつぎのとおりである。

①某乳児院に収容されている1～3才の乳幼児48名。

②A－Fの6小学校に在学中の6～11才の児童1,080名。

③某高等学校に在学中の15～17才の生徒350名。

④20～50才からなる某ホテルの従業員145名。

⑤某養老院で生活している60～80才の老人65名。

上記対象者のうち，小学校児童およびホテル従業員以外は，いずれもそれぞその同一施設で完全給食を受けているものであった。

2）使用培地

a　増菌培地

市販の粉末チオグリコレート培地（日水製薬）29.3gを1,000m*l* の精製水に溶解後，中試験管（1.5×17.5cm）に13m*l* 宛分注し，121°C15分間高圧滅菌後使用した。

b　分離用平板培地

赤真ら[27] の粉末CW寒天基礎培地（日水製薬）60gに精製水1,000m*l* を加え，加温溶解し，121°C，15分間高圧滅菌したものを，55°Cに30分以上放置後，無菌的に50％卵黄加食塩液を10％の割合に加え，その約20m*l* 宛を直径8.5cmのペトリ皿に分注し，放冷凝固させたものを使用した。

3）耐ウ菌の分離培養

前記グリセリン保存液中のふん便0.5～1.0m*l* を13m*l* 宛分注された増菌培地中に投入し，よく混和した後，100°C で1時間加熱し，直ちに流水で冷却後，37°Cで18～48時間培養した。培養後，培地の混濁とガスの産生を認めたものについては，その2白金耳量を分離用平板培地に塗抹した。

菌を塗抹した分離用平板培地は，Deoxo Catalyst (Engelhard Industries Inc.) を4～8個入れた真空ゲージ付嫌気ジャー（トミー精工）中に収納し，嫌気ジャー内の酸素を除去してから水素ガスで置換し，18～24時間嫌気培養した[28]。

4）分離菌株の同定

分離菌は，平板培地上に出現したウェルシュ菌を疑わせる集落について，善養寺・坂井[29] の方法により，次に示す諸性状を調べて同定した。

a　グラム染色

常法に順拠した。

b　好気培養試験

5％ウマ血液寒天に被検菌を画線培養し，37°C48時間好気培養を行ない，発育の有無を観察した。

c　炭水化物分解試験

ブドウ糖無添加の粉末チオグリコレート培地（Difco）を基礎培地とし，これにブドウ糖，乳糖，および白糖を別途にそれぞれ1％の割合に加え，加温溶解後小試験管（1.0×10.0cm）に3m*l* 宛分注し，115°C15分間高圧滅菌した。

被検菌を培地の深部に接種し，37°C 24時間培養後0.2％BTB指示薬を滴下して酸産生の有無を観察した。陰性の場合は7日間まで観察を続けた。

なお,糖無添加の粉末チオグリコレート培地(Difco)を基礎培地として作られた炭水化物分解試験用培地および以下に述べるインドール試験用培地，運動性試験用培地は，使用直前に再度100°C15分間加熱し，流水で冷却してから使用した。

d　インドール試験

前記cの基礎培地を加温溶解し，小試験管に3m*l*宛分注してから121°C15分間高圧滅菌した培地に，被検菌を接種し，37°C7日間培養後，常法により Ehrich-Bhöme の試薬を注加して判定した。

e　牛乳凝固試験

牛乳を小試験管に3.5m*l*宛分注し，これに還元鉄片として約1cmの釘1本を加え，100°C30分の間欠滅菌したものを使用した。被検菌を接種し，37°C7日間，牛乳の凝固とガスの産生を観察した。

f　運動性試験

前記cの基礎培地に寒天を0.15%の割合に加え，加温溶解後小試験管に3m*l*分注し，121°C15分滅菌し，半流動寒天培地を作り，これに被検菌を接種し，37°C7日間運動性の有無を観察した。

g　レシチナーゼ抑制試験

Willis ら[30]に従い,卵黄加CW寒天平板の半面に260単位に生理食塩液で希釈したウェルシュ菌α—抗毒素血清を塗布し，被検菌はα—抗毒素血清の非塗布面から，塗布面に向かって画線培養した。それを37°C24時間嫌気培養してから，卵黄反応とその中和反応および真珠層の有無を観察した。

α—抗毒素血清は予防衛生研究所赤真博士から分与を受けた。

なお一部の菌株は，赤真ら[27]によって開発されたα—抗毒素血清含有ろ紙（日水製薬）を用いる方法で試験を行なった。

5)　凝集反応による型別

a　Hobbs 型抗血清の作成

免疫用抗原：Hobbs 型別参考菌株をツァイスラーのブドウ糖血液寒天に分離培養し，S型集落を釣菌してチオグリコレート培地に接種し，37°C18～24時間培養を行なった。この培養菌液0.2m*l*をツァイスラーのブドウ糖血液寒天の全面にコンラジー棒で塗布し，37°C15～18時間嫌気培養後，発育した菌苔をかきとって，0.6%ホルマリン加生理食塩液に浮遊させ，37°Cで48時間放置した。つぎに，5,000rpm 20分間遠心沈殿を行ない，生理食塩液で3回洗滌し，最後に0.6%ホルマリン加生理食塩液で5mg/m*l*の濃度に再浮遊させたものを免疫用抗原とした。

Hobbs 型1～13の各型別参考菌株は,Central Public Health Laboratory（London）の Hobbs 博士より分与された。

家兎抗血清：体重1.5～2.5kgのウサギ耳静脈に，4日間隔で前記の抗原を初回0.5m*l*ついで1.0m*l*,2.0m*l*,3.0m*l*最終回4.0m*l* 接種した。最終接種後からおおむね7日後に一部採血し，その抗体価の測定を行ない，免疫に用いた抗原に対する凝集素価が640倍以上に上昇していた場合は，直ちに常法に従がって血液を採取した。もし凝集素価が640倍以下であった場合は，さらに追加免疫を行なってから採血した。採取した血液から血清を分離し，得られた血清は56°C30分間非働化後使用した。抗血清の保存は−20°Cで凍結保存した。

血清型別用吸収血清：Hobbs 型1～13の家兎抗血清は，交叉凝集反応を行ない，Hobbs 型間の類属関係を調べたところ，Hobbs 型1，6，8，9，10，11および12の各抗血清は homologous 以外の抗原には凝集が認められなかったので，未吸収のまま使用した。

homologous 以外の抗原にも若干の交叉凝集反応が認められた2，3，4，5，7および13の各型抗血清は，それぞれ類属反応を示した抗原による吸収試験をを行なってから使用した。

吸収試験は，サルモネラの O 凝集素吸収試験[31]に準拠して行なった。すなわち，10倍希釈した抗血清にツァイスラーのブドウ糖血液寒天培養菌を濃厚に加え，50°C 2時間反応させた後，一夜永室に静置した。ついで10,000rpm30分間遠心沈殿し，その上清について吸収菌との凝集反応を行ない，凝集が認められなくなるまで吸収を行なった。

b　分離菌株の型別

被検菌の血清型は，初め載せガラス上凝集反応を行なって，凝集が認められた場合は，次に当該抗血清との定量凝集反応を行なって決定した。

載せガラス上凝集反応：ツァイスラーのブドウ糖血液寒天で培養した被検菌を生理食塩液に浮遊させ，遠心沈殿によって3回洗滌し，最後に0.5%ツィーン80加生理食塩液に濃厚に再浮遊させた。ツィーン80は，自発凝集を最少限にとどめる目的で，生理食塩液に0.5%の割合に添加した[32]。

被検菌の凝集の有無は，50～80倍の凝集素価に希釈した抗血清と上記菌液とを載せガラス上で攪拌し，直ちに強く凝集したものを陽性とした。

定量凝集反応：0.5%ツィーン80加生理食塩液で倍数希釈した抗血清に，1mg/m*l*の濃度に浮遊させた被検菌を等量加え，50°C 16～18時間反応させた後肉眼

で判定した。

被検菌は，当該抗血清の凝集素価と同程度に凝集した場合，同一抗原型と判定した。

2 成　　績

1) 健康人ふん便中の耐ウ菌分布

年令層の異なる5群の健康人1,688名のふん便を対象に耐ウ菌の検出を行ない，また，検出菌株について血清型を検討した成績は Table I に示すとおりである。

耐ウ菌の検出率は1～3才の乳幼児では，25.0%，6～11才の学童では12.9%，15～17才の高校生では11.4%，20～50才の成人では17.2%，60才以上の老人の場合は30.8%であった。

しかし，上記の耐ウ菌検出率は，年令6～11才の成績で認められるように，A—Fの小学校別では最低A校の6.3%，最高F校の37.1%と同じ年令層でも大きな差異（x^2検討）があり，年令層と耐ウ菌の検出率との間に相関関係は認められなかった。

Table I. Distribution of Heat-resistant *Cl. perfringens* in the Feces of Healthy Tokyoites and of Their Hobbs' Serotypes

Years of age		No. of specimens examined	No. of positive (%)	No. of isolates obtained	Hobbs' serotypes													No. of untypable (%)
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total(%)	
1 - 3		48	12(25.0)	60				10			5							15(25.0)	45(75.0)
6 -11	A	175	11(6.3)	33	6		1	5		1							3	16(48.5)	17(51.5)
	B	209	39(18.7)	117	7		3	8	3		7			5		3	12	48(41.0)	69(59.0)
	C	334	35(10.5)	105	4	3	7	7		10	13			6	4	3	12	69(65.7)	36(34.3)
	D	100	15(15.0)	45	5			1	2		6						3	17(37.8)	28(62.2)
	E	200	16(8,0)	48	5		1	2	4	5		3			2		3	25(52.0)	23(47.9)
	F	62	23(37.1)	69		3	1	3		3	5				1		3	19(27.5)	50(72.5)
Sum		1,080	139(12.9)	417	27	6	13	26	9	19	31	3		11	7	6	36	194(46.5)	223(53.5)
15-17		350	40(11.4)	120	3			5	1	6	3			2	9		8	37(30.8)	83(69.2)
20-50		145	25(17.2)	75	2		5	7		6	4			3	3		5	35(46.7)	40(53.3)
60-80		65	20(30.8)	100	7			5	4								7	23(23.0)	77(77.0)
Total		1,688	236(14.0)	772	39	6	18	53	14	31	43	3		16	19	6	56	304(39.4)	468(60.6)

Note: A - F are indicating an individual primary school.

性別による耐ウ菌の検出率に差異があるか否かについて，同じ老人ホームに生活している60～80才の健康人ふん便を対象に検討した結果では，男子の場合，30件中9件（30.0%）から耐ウ菌が検出されたのに対し，女子の場合は，35件中11件（31.4%）が陽性であり，性別による耐ウ菌検出率にも差異は認められていない。

Table I に示した健康人ふん便から検出された耐ウ菌の菌型は，耐ウ菌が陽性であったふん便1件につき3個の集落を対象に Hobbs の血清型別を行なった成績である。Hobbs の血清型は，現在では1～17型に分類されているが，14～17型は著者の研究以後に新たに追加されたものであるため，本研究では Hobbs 型1～13の抗血清を用いた。

供試された健康人由来耐ウ菌株は全体で772菌株で，そのうち Hobbs の血清型のいずれかに型別されたものが304菌株（39.4%），残りの468菌株(60.6%）は型別不能であった。

Hobbs型菌の検出頻度は，13型が最も高く，ついで4，7，1，6，11，3，10，5，12および2型で，8型は3株のみ，9型は全く検出されなかった。

2) 同一集団の乳児における耐ウ菌排菌の推移

都内の某乳児院に収容されている年令1～3才の健康な乳幼児48人を対象に，同一人について2カ月ごとに3回採便し，耐ウ菌のふん便中における排菌状態を検討した。その成績は Table II に示すとおりである。

すなわち耐ウ菌の検出率は初回が25.0%，2カ月後が12.5%，4カ月後が10.4%であり，同一集団の場合でも，耐ウ菌の検出率にはかなりの変動のあることが認められた。

耐ウ菌の排菌状況を個人別にみると，Table III に

Table II. Isolation of Heat-resistant *Cl. perfringens* from the Same Inhabitants of the Nursling at 2 Month Interval, and Their Hobbs' Serotypes

Date of sampling	No of specimens examined	No. of positive (%)	No. of isolates obtained	Hobbs' serotypes													Total	No. of untypable
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
3rd of March 1966	48	12(25.0)	60				10			5							15	45
6th of May 1966	48	6(12.5)	30		2		5										7	23
8th of July 1966	48	5(10.4)	25													5	5	20
Total	144	23(16.0)	115		2		15			5						5	27	88

Table III. Repeated Isolation of Heat-resistant *Cl. perfringens* Made on the 48 Individuals of the Inhabitants of the Nursling

Individuals	Initial isolation	2nd isolation 2 month later	3rd isolation 4 month later
1	—	—	—
2	7(5)	—	—
3	—	—	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—
11	—	—	—
12	ut(5)	—	—
13	ut(5)	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—
16	—	—	—
17	—	—	ut(5)
18	ut(5)	ut(5)	—
19	ut(5)	ut(5)	—
20	4(5)	—	—
21	—	—	13(5)
22	4(5)	—	ut(5)
23	—	2(2), ut(3)	ut(5)
24	—	—	—
25	—	—	—
26	—	—	—
27	—	—	—
28	ut(5)	4(5)	—
29	ut(5)	—	—
30	ut(5)	—	—
31	—	—	—
32	—	—	—
33	—	—	—
34	—	—	—
35	—	—	—
36	ut(5)	—	—
37	ut(5)	—	—
38	—	—	—
39	—	—	—
40	—	—	—
41	—	—	—
42	—	—	—
43	—	—	—
44	—	ut(5)	—
45	—	—	ut(5)
46	—	ut(5)	—
47	—	—	—
48	—	—	—

Note: Serolgoical typing was done on five colonies per each fecal specimen. Figures in the table indicate the Hobbs' serotype, parenthesis indicates numder of isolates, and ut indicates the strains untypable by Hobbs' typing sera.

示すごとく，初回，2カ月後および4カ月後の調査で3回とも連続して耐ウ菌が検出された例はなく，2回連続して耐ウ菌が検出された4例も，その検出菌型はいずれも異なり，健康人における耐ウ菌の保菌は長い期間持続するものではなく，2，3カ月を限度とする一過性保菌であることが判明した。

3) 同一集団の老人における耐ウ菌排菌の推移

年令60～80才の同じ養老院施設生活者65名を対象に，1カ月間隔で3回採便し，耐ウ菌の排菌状況を検討した。その成績は Table IV に示すとおりである。すなわち，耐ウ菌の検出率は，初回30.8％，1カ月後および2カ月後の調査ではいずれも16.9％であり，この場合も乳幼児の場合と同様に，調査時点の差によって検出率に大きな変動が認められた。

Tabl IV. Isolation of Heat-resistant *Cl. perfringens* from Same Inhabitants of the Almshouse at One Month Interval, and Their Hobbs' Serotypes

Date of sampling	No. of specimens examined	No. of positive (%)	No. of isolates obtained	Hobbs' serotypes 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total	No. of untypable
5th of November 1966	65	20(30.8)	100	7			5	4								7	23	77
7th of December 1966	65	11(16.9)	55	5							2					5	12	43
10th of January 1967	65	11(16.9)	55						14			5		4		5	28	27
Total	195	42(21.5)	210	12			5	4	14		2	5		4		17	63	147

Table V. Repeated Isolation of Heat-resistant *Cl. perfringens* Made on the 65 Individuals of the Inhabitants of the Almshouse

Individuals	Initial isolation	2nd isolation one month later	3rd isolation 2 month later	Individuals	Initial isolation	2nd isolation one month later	3rd isolation 2 month later
1	—	—	—	34	ut(5)	—	—
2	—	—	—	35	—	—	—
3	—	ut(5)	—	36	13(5)	—	—
4	—	—	—	37	—	—	—
5	—	—	—	38	—	—	—
6	5(4),ut(1)	—	—	39	—	—	—
7	—	—	—	40	—	—	—
8	ut(5)	—	—	41	ut(5)	—	ut(5)
9	ut(5)	—	6(5)	42	—	—	—
10	—	—	—	43	—	—	—
11	—	—	—	44	—	—	—
12	—	—	—	45	ut(5)	—	—
13	ut(5)	—	—	46	—	—	—
14	—	—	—	47	5(2),13(1),ut(2)	—	—
15	ut(5)	—	—	48	13(1),ut(4)	ut(5)	11(4),ut(1)
16	—	—	—	49	—	—	—
17	—	—	—	50	ut(5)	—	—
18	—	—	—	51	—	—	—
19	—	—	—	52	—	—	—
20	ut(5)	ut(5)	—	53	—	—	—
21	—	—	—	54	—	1(5)	6(5)
22	—	—	—	55	—	—	ut(5)
23	ut(5)	ut(5)	ut(5)	56	ut(5)	ut(5)	6(4),ut(1)
24	—	—	—	57	ut(5)	8(1),ut(4)	—
25	—	—	—	58	ut(5)	—	ut(5)
26	—	—	—	59	—	ut(5)	—
27	—	—	—	60	—	ut(5)	—
28	—	—	—	61	—	—	ut(5)
29	—	13(5)	9(5)	62	—	—	—
30	—	—	—	63	—	8(1),ut(4)	13(5)
31	—	—	—	64	ut(5)	—	—
32	—	—	—	65	4(5)	—	—
33	1(5)	—	—				

Note: Serological typing was done on five colonies per each fecal specimen.
Figures in the table indicate the Hobbs' serotype, parenthesis indicates number of isolates, and ut indicates the strains untypable by Hobbs' typing sera.

個人別にみた耐ウ菌の排菌状態は Table V に示すごとく，耐ウ菌が陽性であった28例のうち3例（23，48，56）は3回連続して，5例(20，29，54，57，63）は2回連続して，17例は1回のみ陽性であった。他の3例（9，41，58）は初回と3回目が陽性であった。

一方，前述の3回および2回連続して耐ウ菌が検出された事例についての菌型をみると，この場合も前述の乳幼児での成績と同様に同一血清型菌が続けて検出された例は認められなかった。

3 考　　察

耐ウ菌食中毒を決定する際の重要条件の1つとしてHobbs ら[6]は患者ふん便からの耐ウ菌の高い検出率をを指摘している。しかし，健康人における耐ウ菌の保菌率は研究者によって大きな差異が認められ，最低はHobbs ら[6]の5.2％から最高 Turner ら[33]の63％となっている。こうした，保菌率の差異の原因は未だ明らかでないが，西田[34]は使用する増菌培地の違いが，盛永[20]らは被検者の年令層によって，また，Sutton[25]は調査対象者の生活環境による違いを指摘してきた。

今回，著者が行なった都市環境に生活している乳幼児，小学校児童，高等学校生徒，20才以上の成人および60才以上の老人を対象とした成績では，11.4～30.8％（平均14.0％）の保菌率であり，盛永らが指摘した年令層による違いは認められない。

また，同じ年令層による保菌率の違いを検討した6校の小学校の児童の場合では，最低6.3％，最高37.1％と，その対象によって大きな差異のあることが明らかにされた。

つぎに，長期間，食事および居住が共通である集団生活者の耐ウ菌の保菌状況の経時的観察は，本菌の保菌と生活環境との関連を知るうえで極めて興味ある問題であろう。その目的で今回は，乳児院に収容されている乳児48名および養老院生活者65名を対象に研究が進められた。その結果，前者は隔月に調査され，10.4～25.0％，後者の場合遂月に調査されて，16.9～30.8％と大きく変動している。また，集団としてみた場合の血清型の偏りは認められず，個人別でも同じ血清型菌の持続的排菌は稀であるという興味ある結果が得られた。

つぎに，健康人ふん便から検出さた耐ウ菌の血清型は，検出株772株中304株（39.4％）は Hobbs 型1～13のいずれかに該当した。このことは，現在までの耐ウ菌食中毒の報告例が，Hobbs 型に起因する事実と感染源との関連において注目すべき点であろう。

なお，健康人ふん便検出菌の60.6％は Hobbs 型に一致しない菌株であった。この Hobbs 型に該当しない耐ウ菌の腸炎起病性についてはまったく検討されていないので，その点の解明の手懸とするため，それらの菌株の血清学的型別を行なった成績について次編で述べる。

4 小　　括

東京都内在住の健康な乳児院収容乳幼児，小学校児童，高等学校生徒，一般成人および養老院生活老人計1,688名を対象に耐ウ菌の保菌状況ならびに検出菌の血清型を検討し，つぎの成績を得た。

1） 被検者1,688名中236名から耐ウ菌が検出され，その保菌率は14.0％であった。

2） 保菌率は年令層による違いは認められず，同じ年令層でも対象者の違いにより，また，同一年令層で同じ集団生活者でも，調査時点によってかなり変動していた。

3） 健康人から検出した耐ウ菌の血清型は772株中304株（39.4％）が Hobbs 型に一致し，他は型別不能であった。高頻度に検出された菌型は Hobbs 型13，4，7および1である。

4） 同じ集団生活者でも耐ウ菌の血清型の偏りは認められない。

5） 遂月あるいは隔月に3回耐ウ菌の排菌と血清型を調べた結果，同一人が同一血清型菌を持続排菌することはきわめて稀であった。

第Ⅱ編　Hobbs 型に属さない耐熱性ウェルシュ菌の血清学的型別

1 実験材料および方法

1） 供試菌株

a　血清学的型別に供した Hobbs の血清型別不能株

1966～1969年の4年間に都内在住の健康人ふん便4,500件から検出した耐ウ菌で，Hobbs の血清型1～17に該当しない菌株である。これらの菌株を TW と仮称した。

b　Hobbs の血清型別参考菌株

Hobbs の血清型1～17の参考菌株のうち，1～13の血清型菌については1965年に，また，14～17の4血清型菌は，Hobbs らによりその後追加されたため1969年に Central Public Health Laboratory（London）の Hobbs 博士より分与を受けた。

2） 耐ウ菌抗血清の作成

TW 型と Hobbs 型別参考菌株の家兎抗血清の作成

は前編と同様に Hobbs ら[6] の方法に準拠した。

3) 凝集反応および吸収試験

凝集反応および吸収試験の術式は第Ⅰ編で述べた方法と同様に行なった。

2 実験成績

1) TW抗原型参考菌株の選択

健康人ふん便由来の耐ウ菌で，Hobbs 型に該当し

Table VI. Biochemical Characteristics of Pilot Strains Used for Preparation of New Typing Sera

Strains	TW serotypes	Date of isolation	Source	Fermentation of: Glucose	Lactose	Sucrose	Indole	Milk	Lecithinase inhibition test	Motility	Resistance to 100°C for 60 min*.	Aerobic growth	Gram stain
W 636	1	Apr., 1966	Healthy subject	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 637	2	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 665	3	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1249	4	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 602	5	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 650	6	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 763	7	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 669	8	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 854	9	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 953	10	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 858	11	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 863	12	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 731	13	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 680	14	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 874	15	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 875	16	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 877	17	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 618	18	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 437	19	Jul., 1966	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1175	20	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 633	21	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 876	22	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1110	23	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1116	24	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1137	25	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1139	26	May.,1967	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1138	27	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1160	28	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1158	29	Nov., 1967	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1179	30	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1242	31	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1241	32	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1359	33	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1389	34	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1400	35	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1409	36	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1392	37	Feb., 1968	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1172	38	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 7381	39	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 948	40	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 445	41	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 670	42	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1111	43	May.,1968	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 652	44	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1113	45	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1115	46	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 918	47	Aug.,1968	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1161	48	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1178	49	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1268	50	Sep., 1968	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1300	51	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1405	52	Jan., 1969	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1323	53	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1327	54	May.,1969	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1295	55	Apr., 1969	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+
W 1292	56	〃	〃	+	+	+	−	S	+	−	+	−	+

Note: +=Positive, −=negative, S=stormy fermentation.
*=media used were the ones recommended by Kim et al. and Dancan et al.

ない菌株のうち，任意に最初20菌株を選び，各々の家兎抗血清を作成した。抗血清作成に供試した菌株間の抗原の異同を交叉吸収試験で調べ，特異抗原を有することが明らかにされた場合は，その抗血清を用いて，他の Hobbs 型に該当しない菌株との凝集反応を行なった。著明な凝集を認めた菌株は除外し，凝集を認めない菌株については，さらに遂次数菌株づつ家兎抗血清を作成して，相互の吸収試験による抗原分析を行なった。

抗原分析の成績については後述するが， Table VI に示す56菌株はそれぞれ特異抗原を有することが明らかにされた。

そこで著者は，これらの56菌株を TW抗原型別参考菌株と設定し，また，56菌株のそれぞれ対応する血清型をTW 1～56と呼称した。

2) **TW型別参考菌株の生化学的性状**

TW 型別参考菌株と決定した56菌株の生化学的諸性状は，Table VI に示すごとくであり，全菌株とも典型的なウェルシュ菌の性状を有することが確認された。これらの型別参考菌株はいずれも100°C 60分の加熱ふん便からの検出菌株であるが，分離後の耐熱性について Kim ら[35] および Dancan ら[36] の各芽胞形成培地を用いて検討したところ，これらの培地でいずれも100°C 60分の加熱に抵抗性を示す耐熱性芽胞を形成することが証明された。

3) **TW 型と Hobbs 型との抗原関係**

a Hobbs 型抗血清に対する TW 型抗原の類属凝集性

著者が作成した TW 型抗原が新抗原型であることを確認するため，Hobbs 型抗原との関係について検討した。

まず，最初に，未吸収の Hobbs 型1～17の抗血清と TW 型1～56の抗原との定量凝集反応を行なった。その成績は Table VII に示すとおりである。Hobbs 型1，2，6，7，9～17の各抗血清に対しては TW 型抗原はいずれも凝集素価が20倍以下であった。しかし，Hobbs 型3の抗血清に対しては TW 型53，Hobbs 型4には TW 型12，Hobbs 型5には TW 型33と TW 型8および Hobbs 型8には TW 型22と TW 型6の抗原がそれぞれ凝集を示した。

なお Table VII には，著者が作成した Hobbs 型抗血清に対する Hobbs 型抗原間の類属関係も併せて記載した。

つぎに，Hobbs 型抗血清に対して凝集が認められた Hobbs 型および TW 型の各抗原については，それらの抗原で吸収試験を行ない各型抗原の特異性を検討し

Table VII. Cross Reactivity of Rabbit Immune Sera against Hobbs' Strains

Unabsorbed anti-Hobbs' type immune sera	Agglutinin titers of homologous antigen	Agglutinin titers of heterologous antigen	
		other Hobbs' type antigen	TW serotype antigen
1	2,560		
2	1,280	H16(40)	
3	2,560	H 4	TW53(40)
4	1,280	H 3(320)	TW12(40)
5	1,280	H 9(80)	TW33(80), TW8(640)
6	1,280		
7	1,280	H10(40), H13(40)	
8	1,280		TW22(60), TW6(60)
9	2,560		
10	1,280		
11	1,280	H16(160)	
12	5,120		
13	5,120		
14	2,560		
15	2,560		
16	1,280	H13(40)	
17	640	H 6(160)	

Note: Agglutinin titers in the table are expressed by reciprocal of highest dilution which showed positive result.
H = Hobbs' serotype, TW = TW serotype.

Table VIII. Specificity of Anti-Hobbs' Type Rabbit Immune Sera after the Absorption by Heterologous Antigens

Unabsorbed antisera		Antigens used for absorption	Final titirs exhibited by the absorbed antisera against	
Hobbs' serotypes	Agglutinin titers of homologous antigen		Homologous antigen	Antigens used for absorption
2	1,280	H 16	640	—
3	2,560	H 4	1,280	—
3	2,560	TW 53	2,560	—
4	1,280	H 3	640	—
4	1,280	TW 12	640	—
5	1,280	H 9	640	—
5	1,280	TW 33	640	—
5	1,280	TW 8	320	—
7	1,280	H 10	640	—
7	1,280	H 13	640	—
8	1,280	TW 6	320	—
8	1,280	TW 22	640	—
11	1,280	H 16	640	—
16	1,280	H 13	640	—
17	640	H 6	640	—

Note: H=Hobbs' serotype, TW=TW serotype.

Table IX Absorption of Heterologous Agglutinin

Antisera	Antigens			
	H 5	H 9	TW33	TW 8
H 5				
Unabsorbed	1,280	80	80	640
Absorbed with:				
H 9	640	—	—	40
TW33	640	—	—	40
TW 8	640	—	—	—

た。その成績は Table VIII に示すごとくである。

すなわち，吸収試験の結果，対応抗原の凝集素価は残存するのに対し，各抗血清に認められた他の型抗原の凝集素は完全に吸収され，類属凝集であることが確認された。

前述の吸収試験の成績の詳細について その 1 例を Table IX に示した。この場合 Hobbs 型5の抗血清に対して，Hobbs 型9が80倍，TW 型33が80倍，TW 型8に640倍の凝集素価であったが，それぞれの抗原での吸収後においては，対応抗原すなわち Hobbs 型5抗原の凝集素価が640倍と残存するのに対し，その他の抗原に対する凝集素価は20倍以下となり，Hobbs 型9，TW型33および TW型8の凝集は，Hobbs 型5の抗血清に対する類属凝集であることが判明した。

b TW 型抗血清に対する Hobbs 型抗原の類属凝集性

TW 型1～56の未吸収抗血清について Hobbs 型抗原との定量凝集反応を行なった成績は Table X に示すとおりである。

この場合は，56の TW型抗血清のうち，TW 型1，2，4，8，12，21，22，34，43，51，52および56の12種の各型抗血清には，Hobbs 型 1～17の 1 菌型から2菌型の抗原に対して40～640 倍の凝集素価を認めた。上記以外の TW 型抗血清に対しては，Hobbs 型抗原はいずれも凝集素価20倍以下であった。

Hobbs 型抗原に対して凝集を認めた TW 型抗血清については，凝集を示した各抗原を用いてさらに吸収試験を行ない，TW 型抗血清の特異性を検討した。その吸収試験の成績を Table XI に示した。この成績から明らかなように，凝集を認めた Hobbs 型抗原で吸収後の TW 型各抗血清は，いずれも吸収抗原に対する凝集素は完全に吸収されるが，抗血清に対応する homologous 抗原の凝集素価は残存した。すなわち，未吸収のTW型抗血清と Hobbs 型抗原との間に若干の凝集性が認められたが，それらはいずれも類属凝集であり，TW 型抗原と Hobbs 型抗原とは異なることが判明した。

Table X. Results of Agglutination Test with Anti-TW Type Rabbit Immune Sera and Hobbs' Type Antigen

Unabsorbed antisera	Agglutinin titers of homologous antigen	Reaction to Hobbs' type antigen
TW 1	1,280	H 1(320)
TW 2	1,280	H16(60)
TW 3	640	
TW 4	1,280	H10(160)
TW 5	640	
TW 6	1,280	
TW 7	2,560	
TW 8	1,280	H 5(40)
TW 9	1,280	
TW 10	640	
TW 11	1,280	
TW 12	1,280	H 4(80)
TW 13	640	
TW 14	1,280	
TW 15	2,560	
TW 16	1,280	
TW 17	640	
TW 18	640	
TW 19	2,560	
TW 20	1,280	
TW 21	2,560	H4(640), H16(320)
TW 22	640	H 8(160)
TW 23	1,280	
TW 24	1,280	
TW 25	10,260	
TW 26	640	
TW 27	640	
TW 28	640	
TW 29	5,120	
TW 30	2,560	
TW 31	640	
TW 32	640	
TW 33	2,560	
TW 34	5,120	H16(40)
TW 35	2,560	
TW 36	640	
TW 37	640	
TW 38	5,120	
TW 39	640	
TW 40	1,280	
TW 41	2,560	
TW 42	640	
TW 43	5,120	H16(80)
TW 44	1,280	
TW 45	2,560	
TW 46	640	
TW 47	1,280	
TW 48	640	
TW 49	640	
TW 50	1,280	
TW 51	2,560	H16(40)
TW 52	1,280	H 1(80)
TW 53	640	
TW 54	1,280	
TW 55	2,560	
TW 56	5,120	H16(40)

Note: ( )=Agglutinin titers, H=Hobbs' serotype.

Table XI. Type Specificity of TW Antisera after Absorption

Unabsorbed antisera		Antigens used for absorption	Final titers exhibited by the absorbed antisera against	
TW serotypes	Homologous titers		Homologous antigen	Antigens used for absorption
1	1,280	H 1	640	—
2	1,280	H 16	1,280	—
4	1,280	H 10	320	—
4	1,280	TW23	320	—
8	1,280	H 5	1,280	—
12	1,280	H 4	640	—
14	1,280	TW 8	320	—
20	1,280	TW35	640	—
21	2,560	H 4	1,280	—
21	2,560	H 16	640	—
22	640	H 8	320	—
23	1,280	TW 4	1,280	—
23	1,280	TW51	1,280	—
26	640	TW39	320	—
32	640	TW50	640	—
34	5,120	H 16	2,560	—
35	2,560	TW20	1,280	—
35	2,560	TW54	1,280	—
36	640	TW30	640	—
41	2,560	TW29	1,280	—
43	5,120	H 16	2,560	—
51	2,560	H 16	2,560	—
51	2,560	TW23	2,560	—
51	2,560	TW24	1,280	—
51	2,560	TW29	2,560	—
52	1,280	H 1	640	—
55	2,560	TW39	640	—
56	5,120	H 16	2 560	—

Note ; H＝Hobbs' serotype, TW＝TW serotype.

Table XII. Absorption of Heterologous Agglutinin

Antisera	Antigens		
	TW 21	H 4	H 16
TW 21			
Unabsorbed	2,560	640	320
Absorbed with:			
H 4	1,280	—	40
H 16	640	—	—

前述の吸収試験の詳細な成績の1例として，TW型21の抗血清の場合を Table XII に示した。この場合は TW 型21の抗血清に Hobbs 型4が640倍，Hobbs 型16が320倍の凝集素価を示した。しかし，Hobbs 型の両抗原で吸収後の TW 型21の抗血清は，homologous の抗原に対する凝集素のみが残存し，吸収抗原に対する凝集素価はいずれも20倍以下となり，TW 型21抗原の特異性が明らかにされた。

4) **TW 型各型間の抗原関係とその特異性**

a TW 型各型間の交叉凝集反応

TW 型1～56の各型抗原の特異性を明らかにするため，交叉定量凝集反応を行なった。その成績を Table XIII に示した。

TW 型1～56の相互の関係をみると，TW 型1，2，3，5などの45菌型は homologous の抗原にのみ凝集がみられ，他の TW 型抗原との間には凝集性が認められない。

TW 型抗血清に対して TW 型の heterogeneous の

Table XIII. Cross Reactivity of Anti-TW Type Rabbit Immune Sera

Unabsorbed antisera	Agglutinin titers of homologous antigen	Reaction to heterologous TW type antigen
TW 1	1,280	
TW 2	1,280	
TW 3	640	
TW 4	1,280	TW23(160)
TW 5	640	
TW 6	1,280	
TW 7	2,560	
TW 8	1,280	
TW 9	1,280	
TW 10	640	
TW 11	1,280	
TW 12	1,280	
TW 13	640	
TW 14	1,280	TW 8(320)
TW 15	2,560	
TW 16	1,280	
TW 17	640	
TW 18	640	
TW 19	2,560	
TW 20	1,280	TW35(40)
TW 21	2,560	
TW 22	640	
TW 23	1,280	TW 4(80), TW51(80)
TW 24	1,280	
TW 25	10,260	
TW 26	640	TW39(40)
TW 27	640	
TW 28	640	
TW 29	5,120	
TW 30	2,560	
TW 31	640	
TW 32	640	TW50(40)
TW 33	2,560	
TW 34	5,120	
TW 35	2,560	TW20(40), TW54(160)
TW 36	640	TW30(40)
TW 37	640	
TW 38	5,120	
TW 39	640	
TW 40	1,280	
TW 41	2,560	TW29(40)
TW 42	640	
TW 43	5,120	
TW 44	1,280	
TW 45	2,560	
TW 46	640	
TW 47	1,280	
TW 48	640	
TW 49	640	
TW 50	1,280	
TW 51	2,560	TW23(40), TW24(80), TW29(40)
TW 52	1,280	
TW 53	640	
TW 54	1,280	
TW 55	2,560	TW39(320)
TW 56	5,120	

Note: ( )=Agglutinin titers, TW=TW serotype.

抗原が凝集を示したものは，TW 4抗血清に TW 型23の抗原，TW 型14に TW 型8，TW 型20に TW 型35，TW 型23に TW 型4と51，TW 型26に TW 型39，TW 型32に TW 型50，TW 型35に TW 型20と54，TW 型36に TW 型30，TW 型41に TW 型29，TW 型51にTW 型23と24および29，ならびに TW 型55の抗血清に対して TW 型39の抗原である。

上述の heterogeneous 抗原に凝集が認められたうち，TW 型4と TW 型23，TW 型20と TW 型35，TW 型23と TW 型51の各型抗血清と抗原との間には交叉凝集が認められたが，その他の場合は一方向的な凝集性であった。

b　TW 型各型間の吸収試験

TW 型1～56の交叉凝集反応で各型抗血清に対して heterogeneous の抗原にも凝集が認められた前述のTW型抗血清，すなわち，TW 型4，14，20，23，26，32，35，36，41，51および55の各抗血清については，凝集を認めた抗原で吸収試験を行ない，各型の抗原の特異性を検討した。その成績を Tabl XI に示した。

この吸収試験の成績から明らかのように heterogeneous 抗原に凝集を認めた TW 型各抗血清は，その heterogeneous の抗原で吸収しても，抗血清の homologous 抗原の凝集素価は特異的に残存することを認めた。

前述の交叉定量凝集反応で，交叉凝集を認め，同一抗原型の疑いがあった TW 型4と TW 型23，TW 型20と TW 型35および TW 型23と TW 型51の抗原性について，交叉吸収試験を行なった成績を Table XIV，XV に示した。

この場合，TW 型4抗血清を TW 型23抗原での吸収，また，その逆に TW 型23抗血清を TW 型4抗原で吸収しても，homologous 抗原に対する凝集素価は残存し，TW 型4と23はそれぞれ異なる抗原型であることが判明した。

TW 23と51および TW 型20と35の場合も全く同様な結果が得られた。

以上の吸収試験の成績から，著者の TW 型1～56の抗原型は，それぞれ特異抗原であることが明らかにされた。

Table XIV.　Type Specificity of Immune Sera against TW 4,23 and 51 after Absorption

Antigens	Antisera						
	TW 4		TW 23			TW 51	
	Unabsorbed	Absorbed with TW 23	Unabsorbed	Absorbed with: TW 4	TW51	Unabsorbed	Absorbed with TW 23
TW 4	1,280	320	80	—	—	—	—
TW 23	160	—	1,280	640	640	40	—
TW 51	—	—	80	—	—	2,560	1,280

Table XV.　Type Specificity of Immune Sera against TW 20 and 35 after Absorption

Antigens	Antisera			
	TW 20		TW 35	
	Unabsorbed	Absorbed with TW 35	Unabsorbed	Absorbed with TW 20
TW 20	1,280	680	40	—
TW 35	40	—	2,560	1,280

5)　健康人ふん便由来耐ウ菌の TW 型血清型別

著者が耐ウ菌の抗原分析の結果明らかにした TW型血清学的型別が，実際面に応用可能か否かを検討する目的で，健康人ふん便から検出された耐ウ菌を対象に，TW 型1～56の抗血清による型別を行なった。

なお，TW 型血清学的型別は，すでに述べたごとく，Hobbs 型に該当しない耐ウ菌の抗原分析によるものであるので，本研究では Hobbs 型血清による型別も併用した。

血清型別に供試した耐ウ菌株は Table XVII に示したごとく，年令6～11才の小学生児童362名，15～17才の高等学校生徒350名ならびに20才以上の成人379名，合計1,091名のふん便を対象に菌検出を行ない，耐ウ

菌が陽性であったふん便161件について，陽性ふん便1件につき任意に選んだ5個の集落，すなわち合計805菌株である。

血清型別は，Hobbs 型については1～17型の各因子血清を，TW 型の場合は実験の簡易化のために Table XVI に示す6種の多価血清と，TW 型1～56の各因子血清を用いて載せガラス上凝集反応を行なった。載せガラス上凝集反応で凝集がみられた場合は，さらに，試験管内定量凝集反応を行なって血清型を決定した。

Table XVI. Sets of Polyvalent Sera for the Rapid Identification of TW Serotypes of Heat-resistant *Cl. perfringens*

Polyvalent sera	Following TW antisera were mixed
1	1, 2, 3, 6, 7, 30, 48, 53
2	10, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 42
3	17, 18, 19, 21, 35, 36, 38, 40, 43, 47, 54
4	24, 25, 27, 28, 34, 46, 49, 52, 55
5	5, 9, 26, 32, 39, 44, 45, 50, 51, 56
6	4, 8, 14, 22, 23, 29, 31, 33, 37, 41

健康人ふん便由来耐ウ菌の Hobbs 型および TW 型の血清型別成績は，Table XVII, XVIII に示すとおりである。まず，供試菌の Hobbs の血清型による型別状況をみると，Table XVII に示すごとく，6～11才の小学校児童からの検出菌270株のうち102菌株（37.4%），15～17才の高等学校生徒由来株では200菌株中53菌株（26.5%），また，20才以上の成人由来株の場合は335菌株中163菌（48.7%），供試菌株全体では805菌株中318菌株(39.5%)が Hobbs 型1～17のいずれかに該当したが，残りの約60%は型別不能株となっている。

Table XVII. Sero-typing Made by the Conventional Hobbs' type Immune Sera on Heat-resistant *Cl. perfringens* Isolated from Healthy Subject

Years of age	No. of specimens examined	No. of positive (%)	No. of isolates obtained	Hobbs' serotype																Total (%)	No. of untypable (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
6–11	362	54(14.9)	270	17		1	6	8	5	26	5		10		24						102(37.4)	168(62.6)
15–17	350	40(11.4)	200				9	2	9	5			15		11	2					53(26.5)	147(73.5)
Over 20	379	67(17.4)	335	47		12	15	1	13	13			9		52				1		163(48.7)	172(51.3)
Total	1,091	161(14.8)	805	64		13	30	11	27	44	5		34		87	2			1		318(39.5)	487(60.5)

Note: Serological typing was done on five colonies per each fecal specimen.

一方，以上の Hobbs 血清型別不能株を対象として行なった TW 血清型別成績は Table XVIII に示すごとくである。

型別状況を供試菌株の由来別にみると，6～11才の児童由来株で Hobbs の血清型別不能株であった168菌株中163菌株（97.0%），15～17才の高校生由来株の場合は147菌株中128菌株（87.1%），20才以上の成人由来株では172菌株中155菌株（90.1%）が TW 型1～56のいずれかの血清型に該当した。

TW 血清型別に供試した全株487菌株のうち446菌株（91.6%）が型別され，残りの僅か41菌株が型別不能株であったにすぎなかった。

従がって，前述の Hobbs 型と著者の TW 型の血清型別を併用することによって，今回，健康人ふん便から検出した耐ウ菌805菌株のうち，型別不能株は41菌株（5.1%）にすぎず，残りの764菌株（94.9%）は型別可能であった。

TW 型に型別された菌株の菌型をみると TW型8，10，18，26，29，36，38，41，42，46および50の11菌型を除く45菌型が検出され，このうち検出頻度の高いものは TW型1，5，6，11，20，21，31，44および52などであった。

Table XVIII· Serotyping Made by the TW Immune Sera on Heat-resistant *Cl. perfringens* Isolated from Healthy Subject

Years of age	No. of strains untyped by Hobbs' type sera	No. of strains typed as following TW serotypes																						
		1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24
6–11	168	8	1	4		5	34			13			3		5		5	20		5		
15–17	147	8	5		5	10	4			1		5	5					13				
Over 20	172	10	5		6		24	10	4	2	5			1		8		6	16	5	1	4
Total	487	26	11	4	11	15	62	10	4	16	5	5	8	1	5	8	5	31	16	10	1	4

25	27	28	30	31	32	33	34	35	37	39	40	43	44	45	47	48	49	51	52	53	54	55	56	Total (%)	No. of untypable (%)
	1	4	5		5	3	1	5	4	1			14				5	1	6		5			163(97.0)	5(3.0)
			5						5			10	10		5	5		10	10	5		2	5	128(87.1)	19(12.9)
6	5		1	15		1	3				2		3	9		1		2						155(90.1)	17(9.9)
6	6	4	11	15	5	4	4	5	9	1	2	10	27	9	5	6	1	13	16	5	5	2	5	446(91.6)	41(8.4)

Note: Serological typing was done on five colonies per each specimen.

3 考　　察

ウェルシュ菌の血清学的型別は，最初 Howard[37] によって試みられたが，供試菌株の殆んどすべてに交叉凝集を認め，本菌の血清型別の困難性を指摘した。ついで Henriksen[38] は凝集反応と補体結合反応を併用し，Orr ら[39] は補体結合反応と沈降反応による型別を試みたが，いずれも不成功に終っている。その後，Henderson[40] は，ウェルシュ菌の抗原性を熱に対する態度から耐熱性抗原と易熱性抗原とに分け，耐熱性抗原は Oakley ら[7] の毒素型分類の A型とC型菌に，易熱性抗原はB型とD型に存在し，しかも，A型菌の抗原性は菌株特異性が高いこと，B型とC型およびD型菌の抗原性は，それぞれ型特異性があることを報告し，ウェルシュ菌の血清学的型別の可能性を示唆した。

一方，耐ウ菌食中毒を明らかにした Hobbs らは，食中毒事例の分離株について抗原分析を行ない，最初8菌型，その後さらに追加し現在までに17菌型に分類している[6) 41]。この Hobbs らの血清型別は，本菌食中毒発生時，あるいは耐ウ菌の生態学的研究などの際に広く応用されている。

しかし，著者が第Ⅰ編で明らかにしたごとく，健康人ふん便中の耐ウ菌分布調査に，Hobbs の血清型別を応用した結果，検出菌株の約40%は Hobbs 型に該当したが，残りの60%は型別不能であった。そこで，本研究ではこの型別不能耐ウ菌について血清学的型別を行なった。その結果，ヒトのふん便から検出される Hobbs 型以外の耐ウ菌は抗原特異性によって，現在までに TW型1～56の血清型を明らかにすることができた。

つぎに，著者の血清学的型別が実際面に応用できるか否かを検討するため，健康人ふん便由来耐ウ菌で，Hobbs の血清型別不能株 487菌株を対象に型別を行なったところ，446菌株（91.6%）は型別され，型別不能株は僅かに41菌株（8.4%）という興味ある成績が得られた。従がって，著者の血清学的型別は，今後 Hobbs 型に該当しない耐ウ菌食中毒解明の重要な手懸りとなるであろうし，また，耐ウ菌の生態学的研究面にも広く応用できるものと考える。

事実，本研究の経過中に，次の第Ⅲ編で述べるごとく，はからずも Hobbs の血清型別不能耐ウ菌による食中毒を経験し，その血清型別を行なったところ，起因菌は著者の TW 型に該当するものであることが明らかにされている。

なお，前述の健康人由来株で Hobbs 型および TW 型に該当しなかった耐ウ菌については，さらに今後詳細な検討が必要であろう。

4 小　　括

健康人ふん便由来の Hobbs 型に属さない耐ウ菌の血清学的型別を行ない，次の成績を得た。

1) 健康人ふん便を100°C 60分加熱後に検出した Hobbs 型に属さない耐ウ菌を対象に，抗原分析を行ない56の血清型を明らかにした。この56の血清型を TW 型1～56と決定した。

2) 健康人ふん便から分離した805菌株の耐ウ菌について Hobbs 型と TW 型血清を用いた型別で，318菌株（39.5%）は Hobbs 型に，446菌株（55.4%）は TW 型に型別され，型別不能株は僅か41菌株（5.1%）であった。

3) 健康人由来株耐ウ菌で TW 型に型別された菌株の菌型は45菌型で，このうち比較的高頻度に検出された菌型は TW 型1，6，11，20，21，44および52の7菌型であった。

第Ⅲ編　東京都内に発生した Hobbs 型に該当しない耐熱性ウェルシュ菌に起因する食中毒の疫学ならびに細菌学的検討

1963～1970年の8カ年間に東京都内に発生した食中毒は，Table XIX に示すごとく，事件数1,267件患者数30,725名である。このうち，原因が判明した細菌性食中毒の事件数は709件，患者数19,795名で，原因菌としては腸炎ビブリオ，サルモネラ，黄色ブドウ球菌病原大腸菌および耐ウ菌となっている。

耐ウ菌食中毒は8カ年間で13事例，患者数3,632名を数えた。この13事例のうち，10事例は Hobbs 型によるものであったが，そのほかの3事例のうち2事例は，著者が第Ⅱ編で報告している Hobbs 型に該当しない耐ウ菌の抗原分析によって明らかにした TW型に起因するものであり，他の1例は Hobbs 型と TW 型との混合感染による興味ある事例であった。

著者が経験した耐ウ菌食中毒のうち，前述の Hobbs 型による事例については，すでに報告しているので[42]，ここでは，TW 型耐ウ菌による3事例の食中毒の疫学的および細菌学的検討を加えた成績について報告する。

Table XIX. Outbreaks of Food Poisoning Cases in Tokyo

(1963–70)

Etiology	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	Total
Bacteria									
Salmonella	4(109)	12(259)	6(24)	7(28)	19(230)	8(131)	10(179)	20(613)	86(1,573)
Staphylococcus	8(88)	6(50)	11(312)	15(251)	20(594)	19(447)	23(319)	27(537)	129(2,598)
V. parahaemolyticus	57(1,091)	59(1,138)	48(1,671)	41(1,043)	65(1,108)	66(991)	70(1,043)	49(1,180)	455(9,265)
Enteropathogenic *E. coli*			1(140)	3(220)	8(1,272)	4(316)	3(134)	7(645)	26(2,727)
Heat-resistant *Cl. perfringens*	1(1,491)	2(348)		1(657)	3(191)	1(156)	1(104)	4(685)	13(3,632)
Sum	70(2,779)	79(1,795)	66(2,147)	67(2,199)	115(3,395)	98(2,041)	107(1,779)	107(3,660)	709(19,795)
Chemicals	4(57)	8(54)	9(63)	6(432)	6(30)	8(41)	9(92)	7(70)	57(839)
Unknown	75(1,368)	74(1,435)	60(1,448)	53(837)	82(974)	57(980)	60(1,914)	40(1,135)	501(10,091)
Total	149(4,204)	161(3,284)	135(3,658)	126(3,468)	203(4,399)	163(3,062)	176(3,785)	154(4,865)	1,267(30,725)

Note: Figure in the table indicates the number of outbreaks, and parenthesis indicates the number of patients involved

1　検査材料および方法

1)　被検材料

耐ウ菌食中毒と推定される患者ふん便および推定原因食品について菌検索を行なった。

患者ふん便の採取は，坂井ら[43]が改良した腸管系病原菌検査用2％食塩加グリセリン保存液に入れ，直ちに送付されたものである。

推定原因食品は，3事例とも検食として保存されていたので，それについて菌検索を行なった。

2)　菌の分離・同定

ふん便からのウェルシュ菌検出法は第Ⅰ編で述べた善養寺・坂井[29]の記載の方法に準拠した。

食品からのウェルシュ菌の検索法は，食品を滅菌生理食塩液で10倍乳剤とし，それを2分して一方はそのまま，他方は60分間煮沸してから，前者の場合はカナマイシンを200γ/ml加えた卵黄加CW寒天に接種した。後者はチオグリコレート培地で増菌後，卵黄加CW寒天で分離培養を行なった。

食品中のウェルシュ菌生菌数測定法は，滅菌生理食塩液で10倍階段稀釈液を作り，その0.1mlづつをカナマイシンを200γ/ml加えた卵黄加CW寒天2枚に接種し，コンラジー棒で全面に拡げ，37°C 24時間嫌気培養した。出現した集落についてウェルシュ菌であることを確かめ，食品1g当りの生菌数を算出した。

ふん便および食品からの分離菌株は，いずれも第Ⅰ編で述べた各生化学的性状検査を行なってウェルシュ菌と同定した。

3)　血清型別

患者ふん便および原因食品から分離されたウェルシュ菌は，著者が第ⅠとⅡ編で作成したHobbs型およびTW型の各因子血清を用いて，定量凝集反応を行ない菌型を決定した。

2　集団発生例

1)　事例1

a，疫学調査成績

1968年6月19～20日，東京都内の某旅館に宿泊した中学校生徒276名中135名，会社従業員団体47名中20名および同旅館従業員5名中1名，計156名(発病率47.6％)が腹痛，下痢を主徴とする食中毒症状を呈した(Table XX)。本事例は，疫学調査および細菌学的検査結果から耐ウ菌TW型4に起因する食中毒であることが明らかにされた。

Table XX.　Review of Food Poisoning Cases Due to TW Serotyped Heat-resistant *Cl. perfringens* in Tokyo

Case	Date	Place	Responsible shop	Incriminated food	No. of patient/ No. of at risk (%)	Serotypes of causative strains
1	19, Jun, 1968	Hotel	Own meal service	Cooked chicken	156/328(47.6)	TW 4
2	18, Feb., 1970	Elementary school	Own meal service	Cooked whal meat	196/640(30.7)	H11, H15 TW4, TW45
3	16, May, 1970	Company	Own meal service	Lunch composed of miscellaneous food	166/213(77.9)	TW 6

原因食品は疫学調査の結果，発病者がいずれも19日の夕食を喫食した宿泊者に限られていることから，19日の夕食が疑われた。当日の食事内容は「米飯，鶏肉煮付および漬物」で，これらの残品についての細菌学的検査が進められ，「鶏肉煮付」が原因食品であることが判明した。

「鶏肉煮付」は，鶏ひき肉2kgに味噌と砂糖を加え，約30分間煮込まれたもので，調理後はそのまま室温に約5時間置かれ，盛付け後喫食された。

患者の潜伏時間は，本事例の発病者156名の全員について調査され，最短2時間，最長30時間，平均16.4

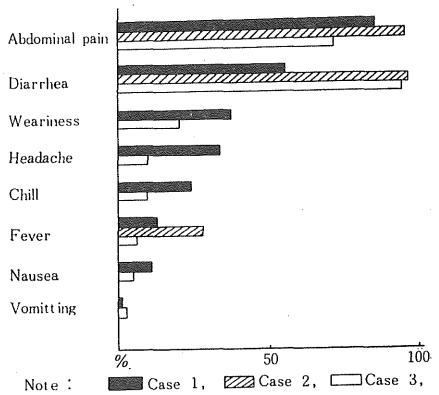


Fig1.　Clinical symptoms manifested by the patients

時間であった。

臨床症状は，Fig 1 に示すごとく，腹痛（85.3%），下痢（55.1%）を主徴とし，そのほかに倦怠感（37.8%），頭痛（33.3%），悪感（23.1%），発熱（12.2%）および嘔気（11.6%）などがみられた。また，嘔吐は2名にすぎなかった。下痢は大部分のものが1～4回の水様便で，一部粘液便を排するものもあった。発熱はいずれも37～38°C で，39°C 以上の高熱は認められていない。

予後は一般に良好で，1～3日後に全員回復した。

b，細菌学的検査成績

原因食品からの菌検出状況：疫学調査で最も疑われた19日の夕食の残品について菌検索を行なったところ，「鶏肉煮付」の非加熱直接分離培養で多数のウェルシュ菌が検出された。食品1g当りのウェルシュ菌生菌数は，3.7×10^3個であった

検出されたウェルシュ菌について，Hobbs 型とTW型の各因子血清を用いて型別を行ない，食品中に含まれていたウェルシュ菌の血清型と生菌数を検討した結果，Table XXI に示すごとく，食品1g当りTW型4が2.6×10^3個，型別不能菌株が1.1×10^3個と算出された。

Table XXI. Agreements on the Serotypes of the Isolates from the Fecal Specimens of Patients and Incriminated Foods

Case	Fecal specimens: Days after the onset of the illness	Fecal specimens: No. of positive/No. of specimens received (%)	Fecal specimens: No. of strains used for typing	Fecal specimens: Hobbs' seroype 1	2	8	11	13	15	Fecal specimens: TW serotype 1	4	6	11	37	39	45	Incriminated food: Untypable	Incriminated food: Serotype	Incriminated food: Viable count/g
1	2	7/7(100.0)	35	1		5				1	26	2						TW 4	2.6×10^8
																		ut	1.1×10^8
2	3-5	178/192(92.7)	890	25		130	17		459	108	1	2	8	4	136			H 11	8.5×10^4
																		H 15	5.1×10^4
																		TW 4	1.7×10^4
																		TW45	1.7×10^4
3	2-4	13/16(81.3)	65		1			1				58					5	TW 6	3.5×10^3

Note. In every case, 5 colonies were picked up from the plate and typed serologically by means of the Hobbs' method.
H＝Hobbs' serotype, TW＝TW serotype, ut＝untypable.

なお，食品からはウェルシュ菌以外の既知食中毒起因菌は検出されなかった。

患者ふん便からの菌検出状況：本事例の患者7名の第2病日ふん便が採取され，病原菌の検索が行なわれた。病原菌の検出状況は，赤痢菌，腸炎ビブリオ，サルモネラ，アリゾナ，病原大腸菌，黄色ブドウ球菌などの既知腸管系病原菌はすべて陰性であったが，全例から耐ウ菌が検出された。

そこで，耐ウ菌陽性ふん便1件当り5個の集落を任意に選び，それについて血清型別を行なった。その成績は Table XXI に示すごとく，供試菌株35株中26株（74.3%）は原因食品から高率に検出された菌株と同一血清型のTW型4であった。

以上の成績は，ふん便をチオグリコレート培地に入れ，100°C 60分加熱後の増菌培養で得られたものであるが，さらに，ふん便中の耐ウ菌排菌状態を詳細に検討する目的で，発病者7人のふん便について，非加熱および煮沸60分後の直接分離培養を行ない，1検体につき5個の集落について血清型を調べた。その成績は Table XXII に示すとおりである。

100°C 60分間加熱したふん便では，7例中6例からTW 型4が分離され，このうち2例は5個の全集落，4例は4集落がTW型4で占められていた。

非加熱ふん便では，7例中3例からTW型4が検出され，このうち1例は5集落ともTW型4であった。

以上の結果から，本事例は，原因食品からはTW型4と型別不能ウェルシュ菌が検出されたが，患者ふん便からの菌検出状況からTW型4によるものであると推定された。

2) 事例 2

a，疫学調査成績

1970年2月18～19日に東京都内の某小学校で，児童614名中190名および教職員26名中6名，計196名（発病率30.7%）が腹痛および下痢を主徴として発病した

Table XXII. Agreements on the Serotypes of Isolates from the Non Heat Treated Fecal Specimens and the Heat Treated Fecal Specimens (Case 1)

Individuals	Days after the onset of the illness	Non heat treated feces	Heat treated feces at 100°C, 60 min.
		Serotype	Serotype
1	2	TW 4 (5)	TW 4 (4) ut (1)
2	2	TW 4 (4) ut (1)	TW 4 (5)
3	2	TW 4 (2) H 1 (1) ut (2)	TW 4 (4) ut (1)
4	2	ut (5)	TW 4 (5)
5	2	ut (5)	TW 4 (4) ut (1)
6	2	H 6 (1) ut (4)	TW 4 (4) H 1 (1)
7	2	H 8 (3) ut (2)	H 8 (5)

Note. Serological typing was dont on 5 colonies per each fecal specimen.
( )=no. of strains, H=Hobbs' type, TW=TW type, ut=untypable.

(Table XX)。

本事例は，疫学調査および細菌学的検討を加えた結果，Hobbs 型とTW型耐ウ菌の混合感染によるものであることが明らかにされた。

患者の発生は，某校の児童と教職員に限られていることから，学校給食が疑われた。発病前日の17日の昼食（パン，牛乳，酢豚）と18日の昼食（パン，牛乳，フレンチサラダ，鯨肉煮付）の残存食品の細菌学的検査結果より，18日の「鯨肉煮付」が原因食品であることが判明した。

「鯨肉煮付」の調理過程は，鯨肉65kgを細切し，油で約15分間いためてから，これに調味料を加えて約30分間煮付けられた。本食品は調理後，そのまま室内に約20時間置かれ，翌日喫食された。

患者の潜伏時間は初発が4時間，最長30時間，平均15.3時間であった。

臨床症状は，水様性下痢（96.2%）と腹痛（75.6%）が主症状で，嘔気，嘔吐はなく，発熱が43名（27.2%）に認められたが，いずれも38°C以下であった(Fig 1)。

下痢は大部分のものが1～3回の水様便で，粘血便を排するものはなく，また裏急後重を訴えるものは認められない。

患者の予後は良好で，発病後1～3日に全員が回復した。

b，細菌学的検査成績

原因食品からの菌検出状況：2月17日，18日の給食の残品についての病原菌検索の結果，「鯨肉の煮付」から1g当り1.7×10^5個のウェルシュ菌が検出された。

「鯨肉煮付」から検出されたウェルシュ菌の血清型は，分離株のうち任意に選んだ20菌株について調べたところ，20菌株中10菌株が Hobbs 型 11，6 菌株が Hobbs 型15，TW 型4 および TW型45がそれぞれ2菌株であり，後述する患者ふん便からの検出菌株の菌型とよく一致している。

患者ふん便からの菌検出状況：本事例の患者196名のうち192名のふん便が採取され病原菌の検索が行なわれた。その結果，第3～5病日の患者ふん便192件中178件（92.7%）から耐ウ菌が検出された。検出菌の血清型は陽性ふん便1件につき5個の集落について Hobbs 型とTW型の各因子血清を用いて型別を行なったところ，Table XXI に示すごとく，供試菌株数890株中833株（93.6%）は原因食品由来株と同じ菌型，すなわち，Hobbs 型 11，15，TW 型4 および TW 型45であった。

つぎに，耐ウ菌陽性患者便178件について，菌型別の内訳をみると，Hobbs 型11が23件，Hobbs 型15が64件，TW 型4が28件，TW 型45が19件，Hobbs型11と15が共に検出されたものが12件，Hobbs型15とTW型4が15件，Hobbs 型15と TW 型45が5件，Hobbs 型11とTW型4および45が2件，また，Hobbs 型11と15および TW型4が1件であった。

一方，患者ふん便中の耐ウ菌排菌状態を検討する目的で，事例1の場合と同様に，耐ウ菌が陽性であった第2病日患者便15件について，非加熱と煮沸60分後の直接分離培養を行ない，ふん便1件につきそれぞれ任意に5個の集落を選び血清型を決定した。

まず，煮沸60分後の分離培養では，15例中 Hobbs 型15が4例，TW型4が3例，TW型45が2例，Hobbs 型1が1例，Hobbs 型15と TW型4の両菌型が3例，

他の2例のうち1例は，Hobbs 型11と15ならびにTW型4と37の4菌型が，1例は Hobbs 型15と TW 型36の2菌型が検出された。

一方，非加熱ふん便の検出菌型を，煮沸60分後のそれと個々のふん便について比較すると，前者の場合は15例中13例から型別不能株が1検体につき1～2菌株検出され，従がって，単独菌型のものは TW型45が検出された1例にすぎない。しかし，全体的にみた場合は，煮沸60分後の検出菌型と極めてよく一致し，Hobbs型11と15ならびに TW型4と45の4菌型が高頻度に検出されている。

以上の成績から本事例は「鯨肉の煮付」を原因食とした耐ウ菌 Hobbs 型11，15ならびに TW 型4および45の混合感染と推定された。

3） 事 例 3

a，疫学調査成績

1970年5月16～17日，東京都内の某事業所において発生した患者数166名におよぶ大規模な集団食中毒であった。本事例は，疫学調査および細菌学的検査結果から，耐ウ菌 TW型6による食中毒であることが判明した。

原因食品は，疫学調査で患者がいずれも社内給食を受けており，しかも，5月16日昼食の「Aランチ」喫食者に限られていることが判明し，その「Aランチ」についての細菌学的検査が進められた。その結果，本食品から患者と同一血清型耐ウ菌を多数認めた。

なお，「Aランチ」の献立内容は「ポークカツ，スパゲティー，いり卵，八宝菜および米飯」であるが，これらの食品は同一容器に保管されていたため，どの品目の食品がウェルシュ菌に汚染されていたのか明らかでない。

「Aランチ」喫食者は213名で，うち166名が発病し，発病率は77.9％と高い値を示した。

潜伏時間は，初発が5時間，最長24時間，平均12.3時間であった。

発病者166名の主症状は，下痢（94.6％），腹痛(71.7％）で，そのほかに，倦怠感，嘔吐，頭痛および発熱が少数例に認められた（Fig 1）。

下痢の回数は1～5回（87.5％）が最も多く，便性状は大部分が水様便で，少数例に粘液便がみられた。

本事例も予後は良効で，発病1～3日以内に全員が回復した。

b，細菌学的検査成績

原因食品からの菌検出状況：原因食品と推定された「Aランチ」（ポークカツ，スパゲティー，いり卵，八宝菜）が検食として保存されていたので，それについて病原菌の検索を行なった。なお，この食品は同じ容器に入れてあったので食品別の検査は行なわず，「Aランチ」をプールしたものについて実施した。

病原菌の検査結果は，事例1および2と同様に赤痢菌，サルモネラ，アリゾナ，腸炎ビブリオ，病原大腸菌および黄色ブドウ球菌などの既知腸管系病原菌は検出されなかった。しかし，ウェルシュ菌の検索で，非加熱材料から多数のウェルシュ菌が検出された。

検出菌の血清型を，Hobbs 型および TW 型の各因子血清を用いて検討したところ，TW 型6であることが判明した。食品1ｇ当りの TW 型6の生菌数は3.5×10^3個と算出された。

患者ふん便からの菌検出状況：本事例の患者数は166名であるが，このうち採便が可能であった16名の第2～4病日のふん便について病原菌の検索が行なわれ，13件（81.3％）から耐ウ菌が検出された。

検出菌の血清型は，耐ウ菌陽性ふん便1件当り5個の集落について型別を行なったところ，Table XXI に示すごとく，供試菌株65株中58株（89.2％）は前述の原因食品から検出されたと同じ TW型6であった。

TW 型6の検出頻度を患者別にみた場合は，16名中12名（75.0％）から該菌が検出されている。

つぎに，事例1および2の場合と同様に，患者ふん便中の耐ウ菌排菌状態を検討する目的で2病日の患者10名を対象に，非加熱と煮沸60分後のふん便について直接分離培養を行なった。この場合も，ウェルシュ菌陽性ふん便1件当りそれぞれ任意に5個の集落を選び血清型別を行なった。その成績は Table XXIII に示すごとく，煮沸60分の直接培養においては，全例から TW 型6が検出され，しかも型別に供試された5個の集落中4個以上が該菌で占められていた。

一方，非加熱ふん便の直接分離培養でも，10例中7例から TW型6が検出され，この陽性例の7例中5例は出現集落の半数以上が該菌であった。すなわち，患者ふん便中には原因食品検出菌と同一菌型の耐ウ菌が多数排菌されていることが判明した。

本事例は，患者および原因食品からの菌検出結果から，耐ウ菌 TW型6によるものであると推定された。

Table XXIII. Agreements on the Serotypes of Isolates from the Non Heat Treated Fecal Specimens and the Heat Treated Fecal specimens (Case3)

Individuals	Days after the onset of the illness	Non heat treated feces	Heat treated feces at 100°C, 60 min.
		Serotype	Serotype
1	2	TW6(5)	TW6(5)
2	2	TW6(3) ut (2)	TW6(5)
3	2	TW6(2) H 5 (3)	TW6(4) H 2 (1)
4	2	H 8 (4) ut (1)	TW6(4) H 13(1)
5	2	TW6(4) ut (1)	TW6(5)
6	2	TW6(3) ut (2)	TW6(5)
7	2	ut (5)	TW6(5)
8	2	TW6(2) H 7 (1) H 8 (3)	TW6(4) ut (1)
9	2	TW6(4) ut (1)	TW6(4) H 4 (1)
10	2	ut (5)	TW6(4) H 13(1)

Note. Serological typing was done on 5 colonies per each fecal specimen.
( )=no. of strains, H=Hobbs' type, TW=TW type, ut=untypable.

3 考　　察

著者らは，ここ数年来東京都内に発生する集団下痢症のなかで，既知の腸管系病原菌の因果性が認められない事例を対象に，その原因究明の研究を進めている。

その結果，原因不明下痢症のなかに病原大腸菌に含まれない大腸菌に起因するものがあることを明らかにしてきたが[44) 45) 46)]，なお，依然として原因が判明しない集団下痢症例も少なくない。

一方，著者は前述の大腸菌食中毒事例の経験から，現在までに諸外国に発生している耐ウ菌食中毒は，いずれも，Hobbs 型に該当するものであるが，Hobbs 型以外の耐ウ菌の腸炎起病性はどうか，その点の解明を意図して研究を進めた。

そこで，まずその手懸りを得るため，前編で述べたごとく Hobbs 型に該当しない耐ウ菌の血清学的型別を行なった。

その血清学的型別の研究過程において，東京都内に発生した集団下痢症の3事例は，その原因究明を行なった結果，Hobbs 型に該当しない耐ウ菌によると推定される興味ある事例であったのでここに報告した。

3事例のうち，2事例は著者が明らかにした耐ウ菌の血清型，すなわち，TW 型4ならびに TW型6に起因するものであり，他の1例は TW 型4と45および Hobbs 型11と15の混合感染によるものであった。

それらの事例は，いずれも患者ふん便検出菌と同一血清型ウェルシュ菌が原因食品からも多数認められ，また，患者便からの該菌の検出率も高く，Hobbs ら[6)]の耐ウ菌食中毒事例の知見とよく一致していた。

それに加えて，著者らは，すでに報告した Hobbs 型耐ウ菌食中毒事例[42)]において，その患者便中の該菌の排菌状態を，非加熱ふん便の直接塗沫分離培養で観察することの重要性について論じたが，今回の3事例の場合においても再確認された。

患者の潜伏時間および臨床症状は，Hobbs 型耐ウ菌食中毒[42)]の場合と極めて類似している。

つぎに，今回経験した3事例は，いずれも著者の血清学的型別を応用して明らかになったものである。こうした事実は，Hobbs 型に該当しない耐ウ菌のなかにも腸炎起病性を有するもののあることが強く示唆され，また，それらの解明に著者の TW型1～56の血清学的型別の応用は，多大の役割を演ずるものと考える。

4 小　　括

1968～1970年，東京都に発生した腹痛，下痢を主徴とする3事例の集団下痢症は，その病因として，赤痢菌，サルモネラ，病原大腸菌，腸炎ビブリオおよび黄色ブドウ球菌が否定され，3事例のうち2事例は著者の TW 型他の1事例は Hobbs 型と TW 型耐ウ菌の混合感染と推定された下痢症であった。

3事例の概要と細菌学的検討を加えた成績を要約するとつぎのとおりである。

1) 事例1は，1968年6月19日，旅館に発生した集団下痢症で，患者は旅館を利用した328名中156名（発

病率47.6%）であった。平均潜伏時間は16.4時間で，主症状は，腹痛（85.3%），下痢（55.1%），倦怠感（37.8%），頭痛（33.3%）および悪感（23.1%）である。

2病日の患者便7件中6件（85.1%）から耐ウ菌TW型4が検出され，しかも菌陽性者便の非加熱直接分離培養で該菌が純培養状に検出された。原因食品の「鶏肉煮付」からも患者と同じ血清型菌が2.6×10^3個検出された。

2) 事例2は，1970年2月18日，小学校に発生し，患者は学童190名，教職員6名計196名（発病率30.7%）であった。平均潜伏時間は15.3時間で，主症状は下痢（96.2%），腹痛（75.6%）および発熱（27.2%）である。原因食品は給食の「鯨肉の煮付」であった。本食品からは1g当り1.7×10^5個のウェルシュ菌が検出され，その血清型はTW型4，45，Hobbs型11，15，の4菌型であった。3～5病日の患者便192件中178件（92.7%）から検出された耐ウ菌890株中833株（93.6%）は原因食品検出菌と同一血清型のTW型4，45，Hobbs型11，15であった。

3) 事例3は，1970年5月16日，社内給食を原因食として，喫食者213名中166名（発病率77.9%）が発病した。平均潜伏時間は12.3時間で，主症状は下痢（94.6%），腹痛（71.7%）であった。2～4病日患者便16件中12件（75.0%）から耐ウ菌TW型6が検出され，菌陽性者便の非加熱直接分離平板上には該菌が純培養状に認められた。原因食品の給食残品（Aランチ）からも患者検出菌と同一血清型のTW型6が3.5×10^3個検出された。

第IV編　食中毒事例由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能について

著者ら[42]がすでに報告したHobbs型ウェルシュ菌食中毒および前記第III編で述べたTW型ウェルシュ菌食中毒の患者ふん便からの検出菌株は，Hobbsらの方法に準拠し，ふん便をチオグリコレート培地に入れ，煮沸60分後に増菌培養して検出された〝いわゆる耐ウ菌〟である。

一方，著者は前述のTW型ウェルシュ菌食中毒事例において，患者ふん便中の原因推定菌の排菌状態を検討するため行なった非加熱患者ふん便の直接培養で，煮沸60分後の検出菌と同じ血清型菌を認めた。また，原因食品からも，その非加熱条件での分離培養においてのみ，患者由来株と同一血清型菌を多数認めた。

そこで，本研究では著者が現在までに経験したウェルシュ菌食中毒事例の由来株を対象に，種々の芽胞形成培地を用いて，原因食品および患者ふん便の非加熱で検出されたウェルシュ菌が，煮沸60分後のふん便由来株と同様に耐熱性芽胞を形成するのか否かを検討した。

1　実験材料および方法

1) 供試菌株

本実験に供試したウェルシュ菌のうち，Hobbs型1～17の型別参考菌株はCentral Public Health LaboratoryのHobbs博士から分与された。食中毒由来株は，著者ら[42]がすでに報告した10事例ならびに第III編で述べた3事例，計13事例のウェルシュ菌食中毒患者から検出した96菌株，8事例の原因食品から検出した53菌株である。

対照の健康人由来株は，都内在住の健康人ふん便の非加熱材料から検出した96菌株および100°C 60分加熱処理後に検出した89菌株である。

2) 供試培地

芽胞形成には，Ellnerの培地[47]，西田らの肉カスブイヨン[48]，SECブイヨン[49]，Kimらの培地[35]およびDancanらの培地[36]の5種の培地を用いた。

各培地は中試験管（1.5×17.5cm）に15 m*l*宛分注，121°C 15分間滅菌後，流水で急冷してから使用した。なお，西田らの肉カスブイヨンは，ブイヨン10m*l*に対して肉カスを約30%の割合に加えて作成した。

3) 芽胞形成培地培養菌の総生菌数および芽胞数の測定

芽胞形成培地に供試菌を接種し，所定の時間培養した後の培養菌液中の総菌数，総芽胞数および耐熱性芽胞数の測定はつぎに述べる方法で行なった。

総生菌数の測定は，芽胞形成培地培養菌液を滅菌生理食塩液で10倍階段稀釈して，その稀釈液0.1m*l*づつを卵黄加CW寒天平板培地2枚に接種し，コンラジー棒で全面に塗布してから，37°C 24時間嫌気培養を行ない出現した集落を算定した。

総芽胞数の測定は，芽胞形成培地の培養菌液を，Groomら[50]の方法に従って75°Cの温浴槽で20分間加熱し，この加熱菌液中の生残菌数を，前述の総生菌数測定の場合と同様な方法によって算定し，それを総芽胞数とした。

耐熱性芽胞数は，Hobbsらの方法に準拠して，芽胞形成培地での培養菌液を60分間煮沸し，その培養菌液中に生残した生菌数を算定し，得られた生菌数を耐熱性芽胞数とした。

2 実験成績

1) 芽胞形成培地の比較

ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能は，使用する培地の種類および培養温度等の条件によって異なることは容易に想像されるところである。そこで，まず Hobbs 型別参考菌株を用いて現在までに報告されている主な芽胞形成培地を対象に，培養条件等について若干の検討を行なった。

Hobbs 型1～17の型別参考菌株のチオグリコレート培地6時間培養菌液0.1 m*l* を Ellner の培地，西田らの肉カスブイヨン，SEC ブイヨン，Kim らの培地および Dancan らの培地に接種し，37°C 48時間培養後に各培地で形成された耐熱性芽胞を定性的に調べた成績は Table XXIV に示すとおりである。

すなわち，耐熱性芽胞形成は，培地の種類によって

Table XXIV. Comparision of Heat Resistance of Spores Produced by *Cl. perfringens* in Five Different Media

Strains	Hobbs' serotype	Media				
		A	B	C	D	E
NCTC 8797	1	+	+	+	+	−
NCTC 8238	2	+	+	+	+	+
NCTC 8239	3	+	+	+	+	−
NCTC 8247	4	+	−	−	−	−
NCTC 8678	5	+	+	+	−	−
NCTC 8679	6	+	+	+	+	−
NCTC 8449	7	+	+	+	+	−
NCTC 8235	8	+	+	+	+	−
NCTC 8798	9	+	+	+	+	+
NCTC 8799	10	+	+	+	−	−
NCTC 9851	11	+	+	+	+	+
NCTC 10239	12	+	+	+	−	−
NCTC 10240	13	−	−	−	−	−
NCTC 10611	14	+	+	−	−	−
NCTC 10612	15	+	+	+	+	+
NCTC 10613	16	+	−	+	−	−
NCTC 10614	17	+	+	+	+	−

Note: A＝medium recommended by Kim et al, B＝medium recommended by Dancan et al, C＝SEC broth, D＝chopped meat medium, E＝Ellner medium.
＋＝cells surviving after heating at 100°C for 60 min.

著るしい差異が認められ，供試した5種の培地のうち，最も秀れているのは Kim らの培地であり，ついで Dancan らの培地およびSEC ブイヨンであった。Ellner の培地では，供試菌株17株中僅かに4株が耐熱性芽胞を形成したに過ぎない。

つぎに，Hobbs 型別参考菌株である NCTC 8238 と NCTC 9851株を用いて，耐熱性芽胞形成に好結果を示した Kim らの培地，Dancan らの培地および SEC ブイヨンについて，菌接種後における培養時間と耐熱性芽胞形成との関係を検討した。

その成績は Table XXV に示すごとくである。各培地における耐熱性芽胞形成は，SEC ブイヨンよりも Kim らの培地と Dancan らの培地が秀れており，また，菌接種後の培養時間は48時間培養が最も安定した成績が得られた。

なお，Kim らの培地および Dancan らの培地で形成された芽胞は，Wirtz の芽胞染色[51]を行ない観察したところ，両培地とも同様な偏在性の卵円形芽胞が認められた。

2) 食中毒由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成

前述の耐熱性芽胞形成培地の検討で，Kim らの培地および Dancan らの培地での37°C 48時間培養が最も安定した成績が得られたので，両培地を併用して食中毒事例の原因食品および患者ふん便由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成の有無を検討した。

a，原因食品由来株

Table XXV. Formation of Spores by Two Strains of *Cl. perfringens* in the Three Different Media

Media	Incubation period	NCTC 8238			NCTC 9851		
		Viable cells	Total spore* cells	Heat** resistant spore cells	Viable cells	Total spore* cells	Heat** resistant spore cells
SEC broth	24hr	$9.7\ 10^5$	0	0	1.3×10^5	0	0
	48hr	4.1×10^4	3.7×10^2	2.1×10	6.0×10^3	7.2×10^2	<10
	6 day	0.2×10	<10	0	1.0×10	2.0×10	0
Medium recommended by Kim et al	24hr	4.3×10^8	4.1×10^5	1.6×10^4	5.0×10^7	1.1×10^4	2.3×10^2
	48hr	1.0×10^6	3.1×10^5	3.0×10^4	2.9×10^6	1.8×10^4	3.3×10^3
	6 day	3.5×10^5	8.8×10^4	5.0×10^2	3.8×10^4	1.7×10^2	4.0×10
Medium recommended by Dancan et al	24hr	3.4×10^8	4.5×10^6	1.3×10^4	1.7×10^7	2.8×10^4	1.5×10^1
	48hr	1.1×10^7	4.6×10^5	4.8×10^4	1.0×10^6	6.5×10^3	9.7×10^2
	6 day	1.2×10^6	8.3×10^3	<10	2.8×10^4	5.1×10^2	<10

Note: *Cells surviving after heating at 75°C for 20 min.
**Cells surviving after heating at 100°C for 60 min.

著者が経験した耐ウ菌食中毒事例13例のうち，原因食品が保存されていて，その食品の非加熱条件での分離培養で，患者ふん便検出菌と同一血清型ウェルシュ菌が検出された事例は8例であった。この8例からの分離株53株について耐熱性芽胞形成能を検討した。

その成績は Table XXVI に示すごとく，53株中50株（94.3%）は，Kim らの培地と Dancan らの培地の両方もしくはいずれか一方で煮沸60分に耐える耐熱性芽胞を形成することが確認された。

なお，事例別の供試菌株数および菌型別の成績は，

Table XXVI. Heat Resistance of *Cl. perfringens* Isolates Obtained from Food Poisonig Cases

Sourse of isolation	Prior treatment of specimen	No. of strains examined	Media A	Media B	
Incriminated food	Non heat treated	53	+	+	39 (73.5%)
			+	−	10 (18.9%)
			−	+	1 (1.9%)
			−	−	3 (5.7%)
Patient feces	Heat treated	57	+	+	40 (70.2%)
			+	−	15 (26.3%)
			−	−	2 (3.5%)
	Non heat treated	39	+	+	36 (92.3%)
			+	−	3 (7.7%)

Note: +=cells surviving after heating at 100°C for 60 min.
A=medium recommended by Kim et al, B=medium recommended by Dancan et al.

Table XXVII に示すとおりである。この成績から明らかなごとく，前述の耐熱性芽胞形成を認めなかった2菌株は，TW 型と Hobbs 型との混合感染と推定された事例の原因食品由来株である Hobbs 型11であり，この場合同じ血清型5株中3株は耐熱性芽胞を形成している。

b 患者由来株

ウェルシュ菌食中毒13事例の患者ふん便を煮沸60分後に検出した57菌株と，13事例のうち，非加熱の患者ふん便の直接分離培養を実施した8事例からの検出菌

Table XXVII. Heat Resistance of *Cl. perfringens* Isolates Obtained from Food Poisoning Cases

Case	Serotype	Patient feces		Incriminated food
		Not heated	Heated at 100°C for 60 min.	
1	H 1	3/3	3/3	*
	H 4	3/3	2/3	1/1
2	H 5	*	3/3	*
3	H 13	*	3/3	*
4	H 2	3/3	3/3	2/3
	H 4	3/3	3/3	3/3
5	H 1	*	3/3	*
6	H 6	*	3/3	*
	H 13	*	3/3	*
7	H 8	3/3	3/3	10/10
8	H 5	3/3	3/3	*
9	H 4	*	3/3	3/3
10	H 6	3/3	3/3	5/5
1	TW 4	3/3	3/3	3/3
2	H 11	3/3	2/3	3/5
	H 15	3/3	3/3	5/5
	TW 4	3/3	3/3	5/5
	TW 45	3/3	3/3	5/5
3	TW 6	3/3	3/3	5/5
Total		39/39	55/57	50/53

Note: A denominator indicates number of strains used and a numerator indicates number of positive.
* =not available' H=Hobbs, serotype, TW=TW serotype.

39株について，それぞれ耐熱性芽胞形成能を検討した。

まず，煮沸60分後の検出株についてみると，Table XXVI および XXVII に示すごとく，供試菌株57株中55株（96.5%）は，用いた Kim らの培地あるいは Dancan らの培地で耐熱性芽胞を認めた。

一方，非加熱患者ふん便検出株の場合は，それぞれの事例の原因食品および煮沸60分後の患者ふん便から高頻度に検出された菌型，すなわち，各事例の原因と推定されたと同じ血清型菌について，耐熱性芽胞形成を調べた。

その結果は，Table XXVI および XXVII に示すごとく，供試した39菌株中36株は両培地で，他の3株も Dancan らの培地では陰性であったが，Kim らの培地で耐熱性芽胞を認めた。すなわち，この場合は供試した全菌株とも耐熱性芽胞を形成することが証明された。

3) 健康人ふん便由来ウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成

ウェルシュ菌食中毒患者の場合は，非加熱ふん便の直接分離培養で検出されたウェルシュ菌で，それぞれの食中毒の原因と推定された血清型菌は，芽胞形成培

Table XXVIII. Heat Resistance of *Cl. perfringens* Isolates Obtained from Healthy Subject

Treatment of specimen	No. of strains examined	Media		
		A	B	
Feces without heating	96	—	—	96 (100.0%)
Feces heated at 100°C for 60 min.	89	+	+	69 (77.5%)
		+	−	14 (15.7%)
		−	+	2 (2.2%)
		−	−	4 (4.6%)

Note: +=cells surviving after heating at 100°C for 60 min.
A=medium recommended by Kim et al, B=medium recommended by Dancan et al.

地で耐熱性芽胞を形成することを認めたので，つぎに，その対照として健康人ふん便由来株について同様に検討した。

供試菌株は，健康人の非加熱ふん便からの検出株96株とふん便を煮沸60分加熱してから検出した89菌株である。

使用した芽胞形成培地は，前述の食中毒由来株の場合と同じ Kim らおよび Dancan らの各培地である。

各菌株の耐熱性芽胞形成の成績は Table XXVIII に示すとおりである。健康人ふん便検出菌の場合は，供試した非加熱ふん便由来全株とも両芽胞形成培地で耐熱性芽胞が認められなかった。しかし，煮沸60分後のふん便由来株では，供試した89菌株中85菌株（95.4%）が，両芽胞形成培地もしくはいずれか一方の培地で耐熱性芽胞の形成が認められた。

3 考　　察

耐ウ菌食中毒の原因食品や患者由来株の芽胞形成能を検討する場合，使用する培地の性能を確認しておくことの重要性は論じるまでもないであろう[52]。

そこで，本実験に先立って，予備実験とし，いままでに開発されている主な培地，すなわち，Ellner, Kim ら，Dancan らの各培地，Angelotti らの SEC ブイヨンおよび西田らの肉カスブイヨンの5種の培地について耐熱性芽胞形成能が検討された。

この場合の供試菌株は Hobbs らの型別参考菌株であるが，前記の培地のうち，最も良好な成績が得られたのは Kim らの培地で，ついで Dancan らの培地，SEC ブイヨン，肉カスブイヨン，Ellner の培地の順であった。

従って，食中毒由来株の芽胞形成能は，Kim らの培地および Dancan らの培地を併用して行なわれた。

今回の実験で著者が経験した耐ウ菌食中毒のうち，原因食品から患者ふん便検出株と同一血清型ウェルシュ菌が検出された8事例の食品由来株は，一部の菌株を除いて，いずれも患者ふん便由来株と同様に耐熱性芽胞を形成することが明らかにされた。つまり，各原因食品の非加熱分離培養においてのみ検出された菌株であったが，その菌株も耐熱性芽胞を形成することが証明された。

このことは，本来耐熱性芽胞形成菌であっても，食品中ではその形成の困難性を示すことは勿論であろう。それに加えて，耐ウ菌食中毒発生時において，その原因食品検出菌について，従来行なわれている血清型の確認と併せて耐熱性芽胞形成能を検討することは，その因果性をより明確にすることができるものと考える。

つぎに，健康人ふん便の非加熱分離培養で検出されたウェルシュ菌は，すべて耐熱性芽胞を形成しなかったのに対し，耐ウ菌食中毒患者ふん便からの同条件検出ウェルシュ菌では，大部分に耐熱性芽胞形成を認めた。この知見は著者が第Ⅲ編で述べた耐ウ菌食中毒患者ふん便中の排菌状態検討が，その因果性を推定するうえに重要な参考になるという考え方を，一層強く支持するものといえよう。

なお，今回の実験で，Kim らと Dancan らの両培地が併用されたが，供試菌株のなかで耐熱性芽胞形成菌の大部分の菌株は両培地で同様な成績が得られた。しかし，一部の菌株は一方の培地で形成されるが，他方では形成されないことも認められている。

従って，現在開発されている芽胞形成培地ではまだ不十分な点があり，さらにこの方面の研究も今後に残された問題であろう。

4 小　　括

著者が経験した耐ウ菌食中毒13事例を対象に，原因食品および患者ふん便から検出されたウェルシュ菌の耐熱性芽胞形成能を検討し，次の成績を得た。

1) 耐熱性芽胞形成培地は Ellner の培地，西田らの肉カスブイヨン，SEC ブイヨン，Kim らの培地および Dancan らの培地のうち予備実験で Kim らの培地と Dancan らの培地で最も良好な成績が得られたので，分離菌の耐熱性芽胞形成能の検討には，両培地を併用した。

2) 8事例の耐ウ菌食中毒の原因食品から検出されたウェルシュ菌53株中50株（94.3%）は耐熱性芽胞の形成が認められた。

3) 13事例の患者ふん便の煮沸60分後の検出菌株57株中55株（96.5%），8事例の非加熱の検出株39株中全株が耐熱性芽胞を形成した。

4) 健康人ふん便由来株の場合は，非加熱での分離株96株はすべて耐熱性芽胞を形成せず，煮沸60分後の分離株では89株中85株（95.4%）が耐熱性芽胞を形成した。

総括および結論

ウェルシュ菌はヒトの腸管内に常在菌として存在することはよく知られていることである。そのウェルシュ菌のなかで，Hbobs ら[6]は100°C 60分の加熱に耐える〝いわゆる耐熱性ウェルシュ菌〟の腸炎起病性を明らかにし，また，起因菌の血清型別を行ない Hobbs

型1～17の血清型を示している。

その後，Hobbs 型に該当する耐ウ菌による食中毒の発生例が，諸外国[53]および我が国[42)54)]においても報告され，現在では本菌食中毒は，発生規模，事件数等において食中毒の重要な位置を占めている。

一方，健康人における耐ウ菌の保菌率は，報告者によって大きな差異が認められ，その原因については Sutton[25]は生活環境，西田[34]は検査方法の違い，また盛永ら[25]は年令層の影響を指摘しているが，Turner ら[33]が同じ方法で調査した成績で中国人では63%，英国人の場合は9%と両者の保菌率の間に大きな差異を認めている。この成績からすれば検査手法の違いを完全に否定できないにしても，むしろ調査対象による差異と考えるのが妥当と考える。事実，今回行なった著者の成績はそれを支持するものであり，また，年令層による違いも認められなかった。

健康人における耐ウ菌の保菌が，大腸菌にみられるように腸管内に永く定着するものなのかどうかの検討は，本菌の保菌率との関連において興味ある問題であろう。この点の解明に，著者が同じ食事を喫食している集団生活者を対象に逐月あるいは隔月に調べた範囲内では，同一血清型菌を持続排菌することは認められていない。つまり，耐ウ菌の保菌はかなり一過性であることが示唆された。

つぎに，現在までに報告されている大部分の耐ウ菌食中毒の起因菌は，いずれも Hobbs の血清型に該当するものである。しかし，その血清型に該当しない耐ウ菌の腸炎起病性が否定されているわけではなく，この方面の研究がほとんど進められていないのが実情であろう。

そこで，著者は本研究で，Hobbs 型に該当しない耐ウ菌食中毒解明の手懸とするために，Hobbs の血清型別不能株の血清学的型別を行ない TW型1～56の血清型を明らかにした。しかも，その研究途上において，3事例の TW型に該当する耐ウ菌食中毒を認めたことは，他の TW血清型菌のなかにも腸炎起病性を有するものの可能性が推察された。

一方，耐ウ菌食中毒であっても，原因食品を患者ふん便からの菌検出の場合と同じように，100°C 60分加熱後では，菌検出はほとんど成功しないことは，Hobbs らも指摘し，また著者らも経験している。しかし，その場合の非加熱の原因食品からは，患者ふん便検出菌株と同一血清型菌が容易に検出される。この非加熱の原因食品由来株が耐熱性芽胞形成能を有するのか否か，はなはだ興味ある問題である。

著者の耐ウ菌食中毒事例の原因食品由来株についての実験で，一部を除く大部分の菌株は，Kim らおよび Dancan らの各芽胞形成培地で患者ふん便由来株と同様に，100°C 60分間の加熱に耐える芽胞を形成することが証明された。

また，前述の事実は，最近 Dancan ら[55)56)57)]や Hauschild ら[58)59)60)]が，ウェルシュ菌の腸炎起病性因子として，芽胞細胞から特異的に抽出される enterotoxin を指摘しているが，それとの関連においても興味深い。

なお，Sutton ら[41]や Hall ら[61]は易熱性ウェルシュ菌の食中毒を，また Hauschild ら[62]は易熱性ウェルシュ菌の人体投与実験で食中毒症状を起こさせることを証明しているので，今後この点の検討も必要であろう。

著者が今回行なった実験成績を要約するとつぎのとおりである。

1) 東京都内居住の健康人の耐ウ菌保菌率は6.3～37.1%，平均14.0%で，保菌率と年令層との相関は認められない。

2) 同じ集団生活者でも耐ウ菌の血清型の偏りはなく，また，同一人が同一血清型菌を持続排菌することは稀であった。

3) 健康人ふん便を100°C 60分加熱処理後に検出された Hobbs 型に属さない耐ウ菌の血清学的型別を行ない，TW型1～56の血清型を明らかにした。

4) 健康人ふん便から分離した805株の耐ウ菌について Hobbs 型と TW 型血清を用いた型別で，318株（39.5%）は Hobbs 型に，446株（55.4%）は TW型に型別された。

5) 1968～1970年に，東京都に発生した腹痛，下痢を主徴とする事例の集団下痢症は，2事例が TW型4および6，他の1事例が Hobbs 型11，15と TW 型4，45の耐ウ菌の混合感染と推定された。

6) 8事例の耐ウ菌食中毒の原因食品から検出されたウェルシュ菌53株中50株（94.3%）は，Kim らおよび Dancan らの各培地で耐熱性芽胞の形成が認められた。また，13事例の患者ふん便の煮沸60分後の検出株57株中55株（96.5%），8事例の患者の非加熱ふん便検出株39株中全株が前記培地で耐熱性芽胞を形成した。

7) 健康人ふん便の煮沸60分後検出株89株中85株（95.4%）は耐熱性芽胞の形成を認めたが，非加熱ふん便検出株96株はすべて耐熱性芽胞の形成は認めなかった。

本研究の要旨は第23回日本細菌学会関東支部総会（昭和43年11月　山梨）および第22回日本細菌学会関東支部例会（昭和44年6月　東京）において発表した。

終りに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった麻布獣医科大学教授今井信実博士，当研究所微生物部長善養寺浩博士に深甚の謝意を表します。

なお本研究の機会を与えられ，終始御激励くださいました当研究所長辺野喜正夫博士に衷心より御礼申し上げます。

文　献

1）新城敏晴，尾形学：日獣誌，27，263(1965).
2）Taylar, A. W. and Gordon, W. S. : J. Path. Bacteriol., 50, 271(1940).
3）Smith, H. W. and Crabb, W. E.: J. Path. Bacteriol., 82, 53(1961).
4）新城敏晴，尾形学：日獣誌，27，305(1965).
5）Wijewanta, E. A. : J. Path. Bacteriol, 88, 339 (1964).
6）Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H. and Cruickshank, J. C.: J. Hyg., 51, 75(1953).
7）Oakley, C. L. : Bull. Hyg., 18, 781(1943).
8）Dalling, T.: Vet. Rec., 8, 841(1928).
9）McEwen, A. D.: J. Comp. Path., 43, 1(1930).
10）Field, M. I. and Gibson, E. A.: Vet. Rec., 67, 67 (1955).
11）Bennetts, H. W.: Bull. Coun. Scient. ind. Res., Meld, 57(1932).
12）白幡敏一，清水亀平次，後藤　仁，吉田　隆：帯広畜産大学学術研究報告，6,40(1970).
13）今井信実，長谷川茂，上村知雄，田淵　清，松本泰彦，西村　実：麻布獣医科大学研究報告，5, 11(1959).
14）Klein, E. : Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. 1, Orig, 18, 737(1895).
15）Andrewes, F. W. : Lancet, i, 8(1899).
16）Knox, R. and MacDonald, E. J.: Med. Offr. 69, 21(1943).
17）McClung, L. S.: J. Bacteriol., 50, 229(1945).
18）Dische, F. E. and Elek, S. D.: Lancet, 2, 71(1957)
19）Hall, H. and Hauser, G. H.: Appl. Microbiol., 14, 928(1966).
20）盛永五作，吉沢　潤：日細誌，17，899(1962).
21）吉村　陽，安川　章，飯田才一，岩尾守義，大森玄洞：日公誌，14，147(1967).
22）相川孝史，飯田広夫：北海道立衛生研究所報，17, 19(1967).
23）辺野喜正夫，西条頼広：東京都立衛生研究所年報，12，44(1960).
24）善養寺浩，坂井千三，伊藤　武，工藤泰雄，斎藤クラ，辺野喜正夫，長崎　護，三木　博，北　博正：日公誌，13，500(1966).
25）Sutton, R. G. A.: J. Hyg., 64, 65(1966).
26）Nagasaki, M.: The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University, 14, 173(1967).
27）赤真清人，大谷　昌，亀山昭一，伊藤明治，村田良介：日細誌，21，564(1966).
28）赤真清人，亀山昭一：メディヤサークル，56，15 (1964).
29）善養寺浩，坂井千三：腸管系病原菌の検査法，医学書院，東京（1967).
30）Wills, A. T. and Hobbs, G.: J. Path. Bacteriol., 77, 511(1959).
31）Edwards, P. R. and Ewing, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae, Burgess Publishing Company, Minneapolis 15, Minnesota, (1962).
32）Lynt, R. K., Solomon, H. M., Kautter, D. A. and Lilly, T.: J. Bacteriol., 93, 27(1967).
33）Turner, G. C. and Ming, M. W.: J. Path. Bacteriol., 82, 529(1961).
34）西田尚紀：メディヤサークル，29，11(1962).
35）Kim, C. H., Cheney, R. and Woodburn, M.: Appl. Microbiol., 15, 871(1967).
36）Duncan, C. L. and Strong, D. H.: Appl. Microbiol., 16, 82(1968).
37）Howard, A.: Ann. Inst. Pasteur, 42, 1403(1928)
38）Henriksen, S. D.: Acta. Path. Scand., 14, 570 (1937).
39）Orr, J. H. and Reed, G. B.: J. Bacteriol., 40, 441 (1940).
40）Henderson, D. W.: J. Hyg., 40, 501(1940).
41）Sutton, R. G. A. and Hobbs, B. C.: J. Hyg., 66, 135(1968).
42）善養寺浩，坂井千三，伊藤　武，丸山　務，工藤泰雄：食衛誌，11，282(1970).
43）坂井千三，工藤泰雄，斎藤クラ，塚原　秋，善養寺浩：東京都立衛生研究所年報，14，1(1964).
44）坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤クラ，善養

寺浩：東京都立衛生研究所年報，22，1(1970)．
45) 坂井千三，伊藤　武，丸山　務，斎藤クラ，善養寺浩：東京都立衛生研究所年報，22，7(1970)．
46) 坂井千三，丸山　務，伊藤　武，斎藤クラ，善養寺浩：東京都立衛生研究所年報，23，13(1971)．
47) Ellner, P. D.: J. Bacteriol., 71, 495(1956).
48) 西田尚紀，石田勝一，山岸高由：医学と生物学，62，89(1962)．
49) Angelotti, R., Hall, E. E., Foter, M. J. and Lewis, K. H.: Appl. Microbiol., 10, 193(1962).
50) Groom, R. A. and Strong, D. H.: J. appl. Bacteriol., 29, 308(1966).
51) Wirtz, K.: Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig., 46, 727(1908).
52) Perkins, W. E.: J. appl Microbiol., 28, 1(1965).
53) Vernon, E.: Mnn. Bull. Minis. Health., 26, 235 (1967).
54) 浅川　豊，中津川修二：食衛誌，7，266(1966)．
55) Duncan, C. L. and Strong, D. H.: J. Bacteriol., 100, 86(1969).
56) Duncan, C. L. and Strong, D. H.: Can. J. Microbiol., 15, 765(1969).
57) Strong, D. H., Duncan, C. L. and Perna, G.: Infec. Immunol., 3, 171(1971).
58) Hauschild, A. H. W., Niilo, L. and Dorward, W. J.: Appl. Microbiol., 16, 1235(1968).
59) Hauschild, A. H. W., Niilo, L. and Dorward, W. J.: Can. J. Microbiol., 16, 331(1970).
60) Hauschild, A. H. W., Niilo, L. and Dorward, W. J.: Can. J. Microbiol., 16, 339(1970).
61) Hall, H. E., Angelotti, R., Lewis, K. H. and Forter, M. J.: J. Bacteriol., 85, 1094(1963).
62) Hauschild, A. H. W.and Thatcher, F. S.: J. Food. Sci., 32, 467(1967).

本邦食品の糸状菌汚染に関する研究
東京における市販ひき肉についての調査成績

一言　広*　諸角　聖*
和宇慶　朝昭*　善養寺　浩*

STUDIES ON FUNGAL CONTAMINATION OF FOODSTUFFS IN JAPAN: FUNGAL FLORA AND INCIDENCE OF TOXIN-PRODUCING FUNGI IN MINCED MEATS MARKETED IN TOKYO

Hiroshi HITOKOTO, Satoshi MOROZUMI, Tomoaki WAUKE and Hiroshi ZEN-YOJI

(Division of Bacteriology I Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

A total of 165 minced meats collected from retailers in Tokyo was surveyed on the contamination with mycoflora, and 66,776 isolates were obtained, which were classified into about 25 genera. The number of fungi involved in the minced meats was calculated as 404. Among the 25 genera, the majors were *Aureobasidium, Phoma, Fusarium* and *Cladosporium*. Each one of them occupied about 10% of the total isolates.

Strains of *A. flavus* isolated from the total isolates of 165 meats were capable to produce aflatoxin B_1 and B_2 but not aflatoxin G, when the strains were cultured in SL medium. Strains of *A. versicolor* isolated from the 11 out of 26 specimens were confirmed to have sterigmatocystin-producing ability in YES medium. Incidence of these two toxin-producing fungi in the specimens was estimated as about 8%.

1　緒　言

著者らはこれまでに食品における有毒糸状菌汚染，ことに発がん性毒素産生性の糸状菌の各種食品における分布について調査し，報告してきた[1)2)]。

その結果，わが国の市販食品にも低率ながら aflatoxin および sterigmatocystin 産生菌による汚染が確認され，中にはピーナッツにおける例のように[3)]，みかけ上良質の食品といえども aflatoxin または aflatoxin 産生性 *Aspergillus flavus* の汚染が認められた例もあった。

ところで，生肉の糸状菌汚染についてみると，冷・凍蔵肉の汚染微生物のうち，糸状菌の肉に対する影響は細菌類に比してはるかに緩慢で軽度である。そのため生肉の糸状菌汚染とその品質低下に関与する糸状菌の研究も汚染細菌のそれに比してはるかに少なく[4)5)6)7)]，まして，近年しだいに解明されつつある mycotoxin ないしは mycotoxin 産生糸状菌の汚染分布を目的とした報告は皆無にひとしい。

そこで著者らは，市販の食肉として喫食頻度が高く，

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第1研究科

廉価の故にとかく種々の肉を混入するおそれのあるひき肉をとり上げ，都内で市販のひき肉における糸状菌汚染の分布をしらべ，検出した糸状菌の一部について，その mycotoxin 産生性を検討した結果，いくつかの知見を得たのでその成績について報告する。

2 実験方法

1）試料

供試ひき肉は1972年9月より11月までの間に都内の店舗で集めたブタ肉65検体，トリ肉36検体，ウシ肉44検体，ウシ・ブタ合挽18検体およびブタ・トリ合挽およびブタ・ウサギ合挽各1検体の合計165検体である。

2）糸状菌の分離

糸状菌の分離には，Chloramphenicol 100mcg/m*l* を加えたものおよびブドウ糖20％を添加した2種の Potato Dextrose Ager（PDA）および5％ Nacl 添加 Czapek-solution Agar の計3種の平板を使用した。

分離培養には，検体各5ｇを滅菌希釈液（0.05％寒天液）45m*l* と共にブレンダー（日本精機K.K.製・東京）にかけ，4,000 r.p.m，3分間破砕撹はんし，さらに適当に希釈したのち，その各 1m*l* を各平板に塗沫培養する方法を用いた。試料を接種した平板は25°C，7～10日間培養した。その間，連日観察しつつ，発育してきた集落を PDA 斜面培地に移植し，25°C，10日間培養したものを以後の同定操作に供した。

菌種の同定は前報の記載[1]にしたがった。

3）対照用標準 mycotoxin

純品の aflatoxin B_1，B_2，G_1 および G_2，ochratoxin A および sterigmatocystin は MAKOR Co., Israel の製品を用いた。用にのぞみ精製クロロホルムに溶解して使用した。

4）mycotoxin 産生用参考株

既知 mycotoxin 産生用参考株として用いた菌株は，aflatoxin 産生用には *Aspergillus flavus* Link NRRL 3,000を，Ochratoxin 産生用には *A. ochraceus* Wilhelm 67—MI—87 を，また sterigmatocystin 産生用には *A. versicolor* (Vuill) Tiraboshi NHL 5099である。これらの菌株はそれぞれ PDA 斜面に25°C，10日間培養したのち保存し，実験に際しては，新たに PDA 斜面に移植し25°C，10日間培養したのち使用した。

5）その他

mycotoxin の検出法，Clean up 法，TLC 法および aflatoxin B_1 の確認および定量試験法等については，いずれも前報[1]の記載にしたがった。

3 実験成績

1）肉類における汚染糸状菌数

各種のひき肉165検体における検出糸状菌数を Table Ⅰ に示した。すなわち1ｇあたりの検出糸状菌

Table Ⅰ. **Fungal Counts made on Minced Meats**

Sample	Number of samples tested	Number of fungi estimated	
		Range	Average
Pig	65	33–2,058/ｇ	406/ｇ
Chicken	36	33–2,675/ｇ	570/ｇ
Beef	44	16–2,683/ｇ	302/ｇ
Beef-Pig	18	8–5,223/ｇ	681/ｇ
Pig-Chicken	1	775/ｇ	
Pig-Rabbit	1	83/ｇ	
Total	165	8–5,223/ｇ	404/ｇ

数を肉の種類別に比較すると，ブタでは33～2,058(平均406/ｇ)，トリでは33～2,675（平均570/ｇ），ウシでは16～2,683（平均302/ｇ），さらにウシ・ブタ混合では8～5,223（平均681/ｇ）であった。このように肉種間に著差は認められない，しかしウシ・ブタ混合の18検体に，ウシおよびブタからの検出糸状菌数よりやや多い検出糸状菌数が認められた。これらの総検出菌の平均値は404/ｇであった。

2）肉種別にみた汚染糸状菌の分布

分離した汚染糸状菌の菌属ごとの分布状況を Table Ⅱ に示した。これらの全検出菌を *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属およびその他の3群に大きくわけてみると，ブタ由来のおよそ90％は *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属以外の菌属によって占められており，*Penicillium* 属は約9％，*Aspergillus* 属はわずか1.5％にすぎない。このような傾向はウシおよびウシ・ブタ混合由来株にも共通して認められ，*Aspergillus* 属，*Penicillium* 属以外の菌属はそれぞれ約80％および約94％，また *Penicillium* 属は14％および5.5％，さらに *Aspergillus* 属は7％および0.7％であった。これに対してトリ由来株では *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属以外の菌属は約80％と上記の検体と同様多数分離されているが，*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属はそれぞれ14％および9％で，*Aspergillus* 属の方が高い検出率であった。また *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属以外の菌属である，いわゆる field fungi[8]は合わせ

Table Ⅱ **Incidence of Fungi in Minced Meats**

Fungus	Fungal Counts						
	Pig	Chicken	Beef	Beef-Pig	Pig-Chicken	Pig-Rabbit	Average
Aspergillus	370 (1.5)	2,635 (14.3)	753 (7.3)	82 (0.7)			3,840 (5.8)
Penicillium	2,283 (9.0)	1,641 (8.9)	1,412 (13.7)	641 (5.5)	42 (5.4)	17 (20.5)	6,036 (9.0)
Other imperfecti fungi	22,829 (89.5)	14,119 (76.8)	8,128 (79.0)	11,025 (93.8)	733 (94.6)	66 (79.5)	56,900 (85.2)
Total	25,482	18,385	10,293	11,748	775	83	66,776

( ) : Percentage per all isolates

て20%前後検出されており，この点ウシ由来の菌属分布とよく以ている。これら *Asperillus* 属，*Penicillium* 属およびその他の菌属の全検体における平均検出率は *Aspergillus* 属 5.75%，*Penicillium* 属 9.04%およびその他の菌属 85.21%となり，field fungi が圧倒的多数検出されている。

これらの検出菌のうち多く検出された菌属は Table Ⅲに示したように菌数の多い順に見ると *Aureobasidi-*

Table III **Incidence of Fungi in Minced Meats**

Fungus	Fungal count							
	Pig	Chicken	Beef	Beef-Pig	Pig-Chicken	Pig-Rabbit	Total	%
Genus *Aspergillus*								
A. versicolor group	132	2,314	123				2,569	66.90
A. glaucus group	116	207	499	58			880	22.91
A. flavus group	16	58	74	8			156	4.06
A. niger group	16	16	33	8			73	1.90
A. terreus group	8		8				16	0.42
A. candidus group		16					16	0.42
A. spp.	82	24	16	8			130	3.39
Total	370	2,635	753	82			3,840	100
Genus *Penicillium*								
P. puberulum series	17						17	0.28
P. islandicum series			8				8	0.13
P. spp.	2,266	1,641	1,404	641	42	17	6,011	99.60
Total	2,283	1,641	1,412	641	42	17	6,036	100
Genus *Aureobasidium*	3,841	585	1,863	948	41	25	7,303	12.84
Genus *Phoma*	3,532	2,278	991	389	58	8	7,256	12.75
Genus *Fusarium*	708	890	292	5,200		8	7,098	12.47
Genus *Cladosporium*	2,948	1,942	909	616		17	6,457	11.34
Genus *Geotrichum*	1,375	917	66	299	567		3,224	5.67
Genus *Mucor*	139	524	191	99	17		970	1.70
Genus *Alternaria*	399	66	67	25		8	565	0.99
Genus *Paecilomyces*	207	34	67	74			382	0.57
Genus *Phialophola*	8	150	58				216	0.38
Genus *Rhizopus*	158						158	0.28
Genus *Cephalosporium*	25		83				108	0.19
Genus *Wallemia*	33	42	25				100	0.18
Genus *Trichoderma*	8	34	17	17			76	0.13
Gcnus *Scoplariopsis*	42			8			50	0,09
Genus *Oedocepharum*	25						25	0.04
Genus *Verticillium*		25					25	0.04
Genus *Stemphilium*	17						17	0.03
Genus *Arthrinium*	8						8	0.01
Genus *Chaetomium*	8						8	0.01
Genus *Nigrospora*	8						8	0.01
Genus *Glaphium*		8					8	0.01
Other fungi	9,340	6,624	3,499	3,350	25		22,838	40.14
Total	22,829	14,119	8,128	11,025	733	66	56,900	100
Sum total	25,482	18,395	10,293	11,748	775	83	66,776	

um, Phoma, Fusarium および *Cladosporium* の各属の順で，これらの菌属の合計は全検出菌数の41.9％を占めており，次いで *Penicillium* 属，*Aspergillus* 属および *Geotrichum* 属がそれぞれ9.0％，5.8％および5.7％の検出率で認められた。

Aspergills 属の中で検出菌数の多いものは *A. versicolor* group および *A. glaucus* group の菌で，*Aspergillus* 属の全検出菌数の約90％を占めており，さらに *A. flavus* group 4％，*A. niger* group 2％となっている。その他の菌属については上記の4属で *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属以外の菌属の全検出菌数の約50％を占めており，さらに *Mucor, Alternaria, Paecilomyces, Phialophora, Rhizopus* および *Cephalosporium* などの各菌属による汚染が認められた。

3）各種ひき肉における mycotoxin 産生能を有すると思われる菌群の分布

これまでに mycotoxin 産生株として報告された菌種と同種の菌株の検出率を Table Ⅳ に示した。すなわち全ブタ由来株数に対する毒素産生の可能性のある同由来糸状菌の割合は *A. flavus, A. versicolor, Fusarium* spp. および *Rhizopus* spp. の各菌種で約4％であった。同様にウシにおいては *A. flavus, A. versicolor, A. sydowi, P. islandicum* および *Fusarium* spp. の各菌種で約5％，トリでは *A. flavus, A. versicolor* および *Fusarium* spp. の3菌種で約18％，ウシ・ブタでは *A. flavus* および *Fusarium* spp. の2菌種で44％，またブタ・ウサギ混合では，*Fusarium* spp. が9.6％の検出率であった，またこれらの各菌群の合計はひき肉由来株総数の15.3％であった。

Table IV **Occurrence of Fungi to Toxin Producing Species (Percentage per All Isolates)**

Specis	Pig	Beef	Chicken	Beef-Pig	Pig-Rabbit
A. flavus	0.06 (16)	0.7 (74)	0.3 (58)	0.07 (8)	
A. versicolor	0.5 (132)	1.1 (115)	12.6 (2,314)		
A. sydowi		0.07 (8)			
P. islandicum		0.07 (8)			
Fusarium spp.	2.8 (708)	2.8 (292)	4.8 (890)	44.3 (5,200)	9.6 (8)
Rhizopus spp.	0.6 (158)				
Other fungi	96.0 (24,468)	95.2 (9,796)	82.3 (15,133)	55.7 (6,540)	90.4 (75)

( ) : Fungal counts

4）mycotoxin 産生能の検討

Table Ⅳ に示した mycotoxin 産生能を有すると思われる菌種について，既知 mycotoxin の産生能を検討した。この場合，*A. flavus* および *Rhizopus* spp. については Aflatoxin の，また *A. versicolor* および *A. sydowi* については Sterigmatocystin の産生能をそれぞれ検討した。その結果，Table Ⅴ に示したように

Table V. **Mycotoxin-Producing ability of Isolates**

Sample Number	Species of fungi	Number of isolates per gram	Toxin producing ability		Source
			Aflatoxin	sterigmatosystin	
N-322	*A. flavus*	58	+		Chicken
N-376		8	+		Beef
N-43	*A. versicolor*	8		+	pig
N-89		8		+	pig
N-138		58		+	pig
N-141		8		+	pig
N-189		8		+	Chicken
N-195		17		+	Chicken
N-299		33		+	Beef
N-312		8		+	Chicken
N-314		8		+	Chicken
N-317		8		+	Beef
N-372		2,225		+	Chicken

トリおよびウシ各1検体より分離した *A. flavus* に aflatoxin B_1 および B_2 産生性を認め，またブタ4件，トリ5件，およびウシ2件の計11検体より分離した *A. versicolor* に sterigmatocystin 産生能を認めた。ただ今回は *P. islandicum* および *Fusarium* spp. の mycotoxin 産生性は検討しなかった。

4 考　察

生肉における汚染糸状菌のうちで分離頻度の高いものとしては *Thamnidium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Sporotrichum* および *Penicillium* などがあげられる[7)9)]。これらの糸状菌はウシ枝肉などにおいて斑点状に付着して増殖する。そのうちの主な菌属にあげられているのは黒斑を生ずる *Cladosporium*，緑色斑を生ずる *Penicillium*，白斑を生ずる *Sporotrichum* および羽毛状を呈する *Thamnidim*, *Mucor* および *Rhizopus* などがある[10)11)]。

わが国では，稲垣ら[12)13)]および金井ら[14)15)]によって冷蔵肉の汚染糸状菌について報告されている。それによると冷蔵枝肉の表面にしばしば認められた菌として *Chaetostylum fresenii*. *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium*, *P. frequentans* などがあり，牛脂には *Chrysosporium pannorum*, *P. viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. cyclopium* var. *echinulatum* および *P. martensii* がよく認められたという。また田口[16)]は販売店のウシ生肉をしらべた結果，*Penicillium cyclopium*, *P. frequentans*, *Aspergillus sydowi*, *Geotrichum candidum*, *Alternaria tenuis*, *Trichoderma viride*, *Chaetostylum fresenii*, *Verticillium* sp. などを分離したと報告している。著者らが今回ひき肉より検出した糸状菌のうちで分離頻度の高い菌は *Aureobasidium*, *Phoma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus versicolor* group および *Mucor* であった。またこれらの他にも *A. glaucus* group および *Alternaria* などの菌を始めとしてきわめて多種の菌を検出した。この成績と他の報告例のそれとの相違点は，*Fusarium*, *A. versicolor* group および *A. glaucus* group の菌が比較的高頻度に分離された点である。さらに，他の報告例では優先菌種とされた菌種であっても，著者らの成績では，きわめて低い検出率にすぎなかった菌種も多い。これは多分に試料の形状と検出方法に左右された結果と思われる。著者らの今回の成績から，ひき肉といういわば汚染部位が均一化されていると見なされるような検体について，肉以外の穀粉などと同様の培養処理法によって定量的に分離した菌種の分布は，枝肉等から肉眼的に汚染部位を中心に分離した場合に比べて，より正確な分布を示したものと考えられる。このような点からも mycotoxin 産生の可能性のある菌種として *Fusarium* spp. および *Aspergillus versicolor* group の菌が多数分布していた点を重視すべきであろう。さらにこのことは *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *Fusarium*, *Rhizopus* および *Penicillium islandicum* などの菌種の全分離菌数に対する割合が15.3%という高率を示したことからもうなずけよう。

今回の分離菌のうち，最終的に mycotoxin 産生性の確認できたものは2検体より分離した *A. flavus* と11検体より分離した *A. versicolor* であった。最も分離菌数の多い *Fusarium* については，今回その toxin 産生性については検討しなかった。しかし，肉類の保存は低温で行なわれていることおよび *Fusarium* の産生する toxin は比較的低温でも産生される[17)]などの点から考えて，これらの毒素産生能は今後是非検討しなければならないと考える。

今回得られた市販挽肉の成績で，このような高い有毒糸状菌汚染が認められたことから，生肉の保存中における糸状菌の汚染経路およびそれらの糸状菌の防除対策についての検討を行なう必要があると考えられる。すでに稲垣ら[12)13)]および金井ら[14)15)]はと場の冷蔵室内と貯蔵中の牛肉における汚染糸状菌分布をしらべた結果，各冷蔵室の間にかたよりはあるが，冷蔵室と貯蔵肉との検出菌種はきわめて高い相関性が認められたと報告している。しかし，それらの汚染糸状菌の由来については不明な点が多い。一方，これら汚染糸状菌の防除対策については金井ら[18)19)]により紫外線灯と塩素性殺菌剤の併用がよいと報告されている。ただし，今回の著者らの成績から，これら市販店頭における食肉がきわめて高い糸状菌汚染度を示したことからみても，これらの問題について再検討する必要が認められよう。

5 結　論

都内の市販ひき肉165検体について，その糸状菌汚染を調べた結果，以下の結論を得た。

1）1g当りの検出糸状菌数は平均404で，肉種（ブタ，ウシ，トリおよびウシ・ブタ混合）間に著差は認められなかった。

2）汚染糸状菌の菌種分布をみると，*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属はきわめて少なく(15%以下)，その他の不完全菌群は85%以上の高い検出率を示し

た。また多く検出された菌は *Aureobasidium*, *Phoma*, *Fusarium* および *Cladosporium* などであった。

3）汚染有毒糸状菌としては，*Fusarium* が特に多く，次いで *A. versicolor* および *A. flavus* の汚染が目立ち，*Rhizopus* および *P. islandicum* がそれぞれ各1検体より検出された。

4）ブタ4件，トリ5件およびウシ2件の計11検体より分離した *A. versicolor* に Sterigmatocystin 産生能を，またトリおよびウシ各1検体より分離した *A. flavus* に aflatoxin B_1 および B_2 の産生能を認めた。しかし aflatoxin G は非産生であった。

6 謝　辞

本調査は食品監視課，各保健所衛生課の職員との共同調査であるが担当職員全員の氏名をあげることができないので，ここに御協力を賜わった職員各位に心から謝意を表します。

なお本研究の概要は第51回都衛生局学会で発表した。

〔附　記〕

本研究は昭和47年度当研究所研究課題「食品中の汚染カビに関する研究」として実施したものである。

文　献

1）一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩，倉田　浩，一戸正勝：食衛誌，14,364（1973）

2）一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩：食品衛生学会第25回学術講演会口演，14，326（1973）

3）倉田　浩，田辺弘也，粟飯原景昭，諸角　聖，一言　広，善養寺　浩：食品衛生学会第22回学術講演会口演，12，553（1971）

4）Tanner, F. W.: The Microbiology of Foods, 2 nd Ed., Garrard Press, Champaign (1964)

5）Ayres, J. C.: Microbiological Quality of Foods, Academic Press (1963)

6）American Meat Institute Foundation: The Science of Meat and Meat Products, W. H. Freeman and Company, SanFrancisco and London (1960)

7）金子精一：神奈川県衛生研究所年報，18，106（1968）

8）Christensen, C. M.: Bot. Rev., 23, 108 (1957)

9）世良　尚：モダンメディア，10，366（1964）

10）Jay, J. M.: Modern Food Mirobiology, Van Nostrand Reinhold Company (1970)

11）Jensen, L. B.: Microbiology of Meats, Garrard Press (1954)

12）稲垣尚起：衛生試験，79，293（1961）

13）稲垣尚起：衛生試報，79，297（1961）

14）金井恒夫，松本　昇，原田泰治，高橋義光，深沢　平：都衛生局学会誌，28，34（1962）

15）金井恒夫，原田泰治，深沢　平，高橋義光：同上誌，28，49（1962）

16）田口春義：食品衛生研究，17，177（1967）

17）Caldwell, R. W., Tuite J., Stob M. and Baldwin R.: Appl. Microbiol., 20, 31 (1970)

18）金井恒夫，原田泰治，深沢　平，高橋義光，菅谷重雄：都衛生局学会誌，29，49（1962）

19）金井恒夫，原田泰治，深沢　平，高橋義光：同上誌，29，52（1962）

中性洗剤による細菌および回虫卵の除去効果について

門野義雄* 柏木義勝* 柴田実*
徳江シゲ子* 大久保暢夫*

WASHING EFFECT OF SYNTHETIC DETERGENTS FOR THE ELIMINATION OF BACTERIA AND ASCARIS EGGS ATTACHED TO VEGETABLES

Yoshio KADONO, Yoshikatsu KASHIWAGI, Minoru SHIBATA, Shigeko TOKUE and Nobuo OHKUBO

(Division of Bacteriology II, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Since the safety of synthetic detergents to man and their washing effects for removing bacteria and eggs of parasites contaminating the fresh vegetables have been still remained obscure, an experiment was carried out on the washing effects, apart from the subject of safety, using leaves of a cabbage which was contaminated artificially with bacteria or ascaris eggs.

Two sorts of synthetic detergents on the market were used in the tests.

The results are summarized as follows.

As the indicated standard concentration for general use was about 0.2%, solutions of 0.02～0.4% were used for washings.

In the test for removing ascaris eggs, about 500 ascaris eggs taken from a pig were smeared to a leaf of cabbage (5×5cm), and after drying, the leaf was immersed and shaked 10 times in a washing solution for a given time; and then the washing effect was estimated from the results removing eggs.

In the 0.2% solution, the washing effect was 19.8%～35.4%, about twice as high as that of water-washing (the control), 8.4%～24.8%.

In the test for removing bacteria, a piece of leaf (5×5cm) that was contaminated with bacteria spontaneously was employed, and the washing effect of the detergent was estimated on the basis of ability to wash out these bacteria on the leaf.

With both detergents, the highest effect was obtained at the concentration of 0.1% (the eliminating ratio, about 36%). It was about thrice as high as that of water-washing, 12.7%.

When the concentration exceeded 0.1%, the eliminating effect tended to decrease following to ascending of the concentration.

*東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科

緒　言

今日，一般家庭で，野菜，果実，食器類等の洗浄に使用されている台所用合成洗剤の普及は，めざましく，日常生活に不可欠な消費材として繁用されている。しかし，これら台所用洗剤が市井に登場して以来，人体や末端の下水処理施設等に与える影響が，しばしば論議された。

人体への影響は，昭和37年11月の食品衛生調査会からの厚生大臣宛答申，下水処理に関しては，ハード型からソフト型への転換等で，一応の結着がつけられたかのように考えられた。

しかし最近の環境汚染の急激な増悪に伴なって，合成洗剤の人体への影響を再検討する要望が高まり，昭和47年に東京都は独自の調査研究により，合成洗剤の野菜・果実・食器類への残留，皮膚刺激作用，毒性等の再検討を開始し，その安全性への確立をはかった。

我々は，これらの調査研究の一環として，野菜附着細菌および回虫卵の除去試験を行ない，その効果について検討を加えた。以下はその概要である。

Ⅰ　細菌除去試験

材料と方法

1）供試野菜

市販きゃべつの比較的表層部の葉を 5 × 5 cm 大に切り取り，該部に附着している一般生菌を除去試験の対象とした。

2）供試洗剤

市販の台所用合成洗剤A（陰イオン系・両性イオン系）およびB（陰イオン系）の2種を用いた。

これらの洗剤の指定標準濃度は，約0.2％であるので，その前後の濃度，即ち0.02，0.04，0.1，0.2，0.3，0.4および1.0％の各水溶液を各々 200ml ずつ無菌的に調製し，これを洗浄液として用いた。

これら2種の合成洗剤については，あらかじめ，厚生省編さん消毒薬検査指針および化学療法学会標準法[1] に従って，それぞれ殺菌効力および抗菌力を測定し，そのいずれの効力も無いことを確認した。

なお，細菌除去試験の対照には，滅菌精製水を用いた。

3）方法

検体である前述のきゃべつの葉を1枚ずつ無菌的に各洗浄液中に投入し，直ちに20回振り洗いを行なった後，充分に洗浄液をきり，ホモジナイズした。これらホモジナイズした葉汁と洗浄液中の生菌数をハート・インフュージョン寒天培地で，37 °C 72時間 培養し，発育した集落数から生菌数を測定した。これから洗浄前の葉に附着していた生菌数を逆算し，これと洗浄液中に落下した菌数との比を求め，これを洗浄効果として判定した，

成　績

台所用合成洗剤AおよびBのきゃべつ葉附着一般生菌に対する洗浄効果を Table 1 に示した。5 × 5 cm大のきゃべつ葉の各々に附着する一般生菌数は当然均等でない為に，各実験毎の最大・最小の菌数の巾を記載した。即ち，表中対照の精製水の実験の場合では，洗浄前の生菌数は 2380×10^4～2540×10^4個であり，洗浄により 2000×10^4～2300×10^4と減少し，洗浄液中に落下した菌数から，その除去効果は16.0％～9.4％であったことを示した。

洗剤AおよびBとも0.02％より濃度が高くなるにつれて，その洗浄効果は増加し，0.1％を最大として，以後漸減傾向を示した。

最大の菌落下率はA，B共に0.1％にあって，その率はAで30.1％～41.4％，Bで30.3～40.6％で，精製水に比較して，約2倍強の効果が認められた。

考　察

市販きゃべつ葉上に附着する一般生菌を実験対象として，台所用合成洗剤の洗浄効果を検討した。その際我々は浸漬時間をとらず，直ちに，振り洗いをおこなったが，これは，この方法が台所における現実に比較的即していると考えたからである。

その結果，陰イオン系・両性イオン系のA，陰イオン系のBともに指定標準濃度附近では，除去効果に特に優劣はなく，対照の精製水に比較して，2倍強の除去効果が認められた。

これら洗剤の指定標準濃度は，正確には，0.17％であるが，一般に洗剤は，ミセル限界濃度以上では，これに近い濃度で最大の洗浄力を発揮するといわれているが，我々の実験でも0.1～0.2％で最大の除去効果を示したところから，この指定標準濃度は，洗浄に最適の値であることが，うなづかれるところである。

我々が実験した最高の濃度である1.0％では，洗剤Bは，明らかにAより除菌効果が劣り，その菌落下率は，Aの½～⅓程度であったが，洗剤容器に表示されている成分上の差は，Aに両性イオンが添加されていることが明示されているのみで，両者の界面活性剤に本質的な差があるのかなどの詳細な処方内容が明らか

ではなく，推論の域を出ないが，実験段階で，洗剤AはBよりも，親水性に富んでいる様に思われたところから，これが比較的高濃度における除菌効果に影響を与えたものと考えられる。

Table 1. Effect of washing for the elimination of bacteria

Washings		Viable count on the surface of cabbage (5cm×5cm) Before washing (×10⁴)	Viable count on the surface of cabbage (5cm×5cm) After washing (×10⁴)	Bacterial counts obtained on the washings (×10⁴)	Elimination rate in percent	Mean
Distilled water (control)		2,540	2,300	240	9.4	12.7
		2,380	2,000	380	16.0	
Detergent A	0.02%	147	130	17	11.6	13.3
		141	120	21	14.9	
	0.04%	48.8	43	5.8	11.9	14.0
		42.9	36	6.9	16.1	
	0.1 %	10.3	7.2	3.1	30.1	35.8
		11.1	6.5	4.6	41.4	
	0.2 %	84	67	17	20.2	30.1
		60	36	24	40.0	
	0.3 %	60	48	12	20.0	29.5
		54	33	21	38.9	
	0.4 %	3.54	2.7	0.84	23.7	26.6
		3.4	2.4	1.0	29.4	
	1.0 %	30.8	26	4.8	15.6	18.5
		25.4	20	5.4	21.3	
Detergent B	0.02%	1,090	930	160	14.7	18.7
		1,190	920	270	22.7	
	0.04%	16.9	13	3.9	23.1	24.9
		15	11	4.0	26.7	
	0.1 %	33	23	10	30.3	35.5
		32	19	13	40.6	
	0.2 %	120	88	32	26.7	31.2
		112	72	40	35.7	
	0.3 %	480	360	120	25.0	30.0
		400	260	140	35.0	
	0.4 %	34.6	27	7.6	22.0	25.5
		32.4	23	9.4	29.0	
	1.0 %	26.9	25	1.9	7.1	7.9
		23.0	21	2.0	8.7	

これまでに，洗剤による細菌の除去試験に関しては，小野口[2] 今木ら[3] の生いちごを使っての報告があり，その除去率は97％台と高率の成績が示されている。勿論，検体等，実験条件に大きな差が認められるにしても，我々の成績とは格段の差があり，一概に比較し得ない。しかし前述の如く，浸漬時間をおかずに比較的現実に即した我々の方法では，洗剤による除菌効果は，期待し得る程のものではなかった。

Ⅱ　回虫卵除去試験

材料と方法

1）回虫卵浮遊液

今日，回虫卵附着野菜が殆んど見当たらないので，屠場より，新鮮な豚回虫の雌の分与を受け，これを解剖して，受精卵を採取し，2％ホルマリン水 1ml 中1,000個の虫卵浮遊液を調製した。

2）供試野菜

市販のきゃべつを用い，その平坦な部分を 5×5 cm 大に切り取り，この葉上に前述の虫卵浮遊液を0.5ml ずつ滴下した後，一昼夜，室温に放置して乾燥させたものを，一実験当り5枚ずつ用意した。

3）供試洗剤

台所用合成洗剤AおよびBを用い，それぞれ，0.02，0.04，0.1，0.2，0.3および0.4％の6段階の濃度の溶液を調製した。

4）方法

前述の洗剤溶液50ml中に，虫卵附着きゃべつを，液面に接するように投入し，浸漬時間を正確に2.5分，5分，10分の3段階に分けて浸した後，10回程度軽く振り洗いを行なってから取り出し，その洗剤溶液を静置した後，遠心沈澱し，沈渣を検鏡して，除去虫卵数を算定した。

除去率は，1洗剤，1濃度，1時間単位，5回の実験を繰り返し，その平均値を以て算定した。なお対照実験は，水道水で同様の方法で行なった。

成　績

Table 2 に示した如く，洗剤A，B共に指定標準濃度の約0.2％以上の濃度では，濃度が高くなるにしたがい，又浸漬時間が長くなる程，虫卵除去効果は増加傾向を示した。

又，Table 3 に示したように洗剤濃度を標準濃度以下にし，時間を5分に限定しても，この傾向は変らず，濃度が高い方が対照の水道水に比較して，良い除去効果を示した。

国で定めた洗剤の使用基準，即ち洗剤濃度0.2％で，

Table 2. Influence of the sort of detergent, concentration and immersed time for the elimination of ascaris eggs adhered on cabbage

Detergent A						Detergent B					
Immersed time (minutes)	Experiment	Concentration 0.2%	0.3%	0.4%	City water (control)	Immersed time (minutes)	Experiment	Concentration 0.2%	0.3%	0.4%	City water (control)
2.5	1	144	296	226	53	2.5	1	115	215	278	53
	2	120	210	202	31		2	117	238	375	31
	3	115	180	228	34		3	74	177	201	34
	4	142	202	247	37		4	93	208	180	37
	5	94	167	257	45		5	96	157	271	45
	Average	123	211	232	40		Average	99	199	261	40
	Percent	24.6%	42.2%	46.4%	8.0%		Percent	19.8%	39.8%	52.2%	8.0%
5	1	166	287	302	47	5	1	152	347	220	47
	2	113	275	332	78		2	136	331	277	78
	3	154	262	245	92		3	203	245	327	92
	4	142	270	279	96		4	145	378	184	96
	5	215	251	312	92		5	189	304	112	92
	Average	158	269	294	81		Average	165	321	224	81
	Percent	31.6%	53.8%	58.8%	16.2%		Percent	33%	64.2%	44.8%	16.2%
10	1	138	428	497	90	10	1	158	235	288	98
	2	156	322	506	143		2	194	356	496	160
	3	204	236	355	98		3	120	387	414	124
	4	169	346	389	116		4	136	241	421	128
	5	218	358	428	123		5	187	326	366	110
	Average	177	338	435	114		Average	159	309	397	124
	Percent	35.4%	67.6%	87.0%	22.8%		Percent	31.8%	61.8%	79.4%	24.8%

Table 3. Influence of the sort of detergent, concentration and immersed time for the elimination of ascaris eggs adhered on cabbage

Detergent A						Detergent B					
Immersed time (minutes)	Experiment	Concentration 0.02%	0.04%	0.1%	City water (control)	Immersed time (minutes)	Experiment	Concentration 0.02%	0.04%	0.1%	City water (control)
5	1	102	164	107	47	5	1	80	91	106	47
	2	88	107	150	78		2	81	89	120	78
	3	99	124	175	92		3	94	117	143	92
	4	105	110	158	96		4	100	143	137	96
	5	106	130	115	92		5	85	165	144	92
	Average	100	127	141	81		Average	88	121	130	81
	Percent	20 %	25.4%	28.2%	16.2%		Percent	17.6%	24.2%	26 %	16.2%

浸漬時間5分以内の点で比較してみると，洗剤Aでは，2.5分で24.6%，Bでは，19.8%，5分では，Aが31.6%，Bは33%と，対照の2.5分：8.0%，5分：16.2%に比較して，2～3倍の虫卵除去率を示した。

考　察

市販きゃべつの葉上に，実験的に豚回虫卵を附着させ，洗剤によるその除去効果を検討した。我々が得た成績によれば浸漬時間および濃度が増加するにしたがって，その除卵効果は増大し，細菌除去試験の項で述べた如く，ミセル限界濃度と考えられる指定標準濃度以上でも，細菌の場合と異なり，その除去効果は低下しなかった。これは対象物の物理的大きさによるものと考えられる。

合成洗剤の虫卵除去効果に関する報告は，熊田ら[4]の成績があるが，この報告によれば，水洗では46～71%，洗剤使用では86～96%の除去効果が得られたものとしている。

我々の実験成績では，水洗10分間でも，最高24.8%にしか至らず，明らかな差が認められるが，文献上の方法が詳らかでなく，詳細な検討がなし得なかった。

総　括

以上述べた如く，台所用合成洗剤による野菜附着細菌および回虫卵の除去効果は，対照の精製水，水道水に比較して，いずれも2～3倍の成績を示した。しかしTable 4に示す如く，寄生虫卵の，ここ数年の蔬菜汚染状況調査や，Table 5 のごとく，ふん便中からの回虫卵の検出率が極めて低下していること，端山[5]の主婦湿疹の患者の調査で，明らかに健康者に比較して，これらの患者は洗剤に対する反応が強いとの報告，さらに三村ら[6]が報告しているように，野菜を洗剤に浸漬すると，水洗後も一定量の残留が認められること，更に向後報告されるであろう慢性毒性等の調査結果等を勘案すれば，現時点で，その安全域を最大に見積って，あえて野菜，果実等の洗浄に合成洗剤を使用する

Table 4. Detection of ascaris eggs from market vegetables

Year	No. tested	No. positive	Kind of vegetable.
1969	52	3	celery 1, chrysanthemum coronarium 2
1970	52	4	lettuce 1, parsley 3
1971	53	0	
1972	101	0	
Total	258	7	

Table 5. Detection of ascaris eggs from fecal specimens of the inhabitants in Tokyo (1951～1972)

Year	No. tested	No. positive	Percent positive
1951	35,865	23,669 (66)	65.9 (0.18)
1952	10,897	6,542 (13)	60.03 (0.12)
1961	6,274	256	4.08
1962	7,260	460	6.34
1971	4,271	2	0.05
1972	3,323	0	0

Note: ( ) shows the Ancylostoma eggs.

ことなく，充分な水洗を行なうことが，都民の健康保持に，より良い結果をもたらすものと考えられる。

結　論

今回，東京都が独自に行なった“中性洗剤に関する調査研究”の一環として，我々は，細菌除去試験および回虫卵除去試験を行なった。

細菌除去試験においては，洗剤A，B共に0.1％の濃度において，最高の除去率（約30～40％）を示した。又，0.1％を境にして，濃度が高くなる程，除去効果は減少した。対照の精製水を用いての除去率は，平均値12.7％であった。

回虫卵除去試験においては，洗剤A，B共に，指定標準濃度（約0.2％）以上の濃度では，濃度が高くなる程，又，浸漬時間が長くなる程，虫卵除去効果は増加傾向を示した。対照の水洗10分間でも，最高24.8％の除去率しか示さなかった。

両試験共に，洗剤を用いての除去効果は，対照の効果の2～3倍程度であった。

文　献

1）石山俊次，他；Chemotherapy, 16(1)，98（1968）

2）小野口邦夫；ニューフッドインダストリー，8，25（1956）

3）今木喬，他；栄養と食糧，15(2)，77（1962）

4）熊田三由；寄生虫学雑誌，14(5)，495（1965）

5）端山伸子；合成洗剤（特に台所用合成洗剤）の皮膚障害の調査研究，中性洗剤に関する調査研究討議資料，昭和48年5月29日，東京都衛生局

6）三村秀一，他；東京都衛生局学会誌(51)，28（1973）

腸内ウイルス感染症の実態は握に関する研究（第5報）

—1972年1～12月における東京都内3下水処理場の未処理下水からのウイルス分離について—

岩崎謙二* 柳沢靖子* 矢野一好*
山崎清* 坂井冨士子* 藪内清*
根津尚光*

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY ON ENTEROVIRUS INFECTION (V) VIRUS ISOLATION MADE AT THREE SEWAGE TREATMENT PLANTS IN TOKYO IN 1972

Kenji IWASAKI, Yasuko YANAGISAWA, Kazuyoshi YANO, Kiyoshi YAMAZAKI, Fujiko SAKAI, Kiyoshi YABUUCHI and Naomitsu NEZU

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

Summary

Virus isolation attempts were made on raw, activated and treated sewages, collected at one month interval, at three sewage treatment plants in Tokyo in 1972, by the use of FL, HeLa, Hep2, Vero 518, Vero#462 and GMK cells.

Efforts were also made on 158 fecal specimens obtained from healthy Tokyoites and 369 from unknown fabrile disease patients, by the use of the same cells.

In addition to this, a total of 660 sera from healthy Tokyoites aged from 0 to 81 years, collected on June and October in 1971 and on June in 1972, were studied by hemagglutination inhibition and neutralization tests for the presence of antibodies against echovirus type 11.

Results obtained are as follows:

1) Recovery of viruses from the specimens collected at the different sampling points were varied according to the area where sewage are serving, i. e., viruses were recovered from all the 36 raw sewage samples (100%) and 11 of 12 activated sludge samples (91.7%) which derived from western area of Tokyo, while the ones derived from eastern area, viruses were recovered from 10 of 36 raw sewage samples (27.8%) and 15 of 48 activated sludge samples (31.3%) in Sunamachi treatment plant and 9 of 12 activated sludge samples (75%) in Mikawashima treatment plant respectively.

*東京都立衛生研究所微生物部ウィルス研究科

2) A total of 148 strains of viruses was recovered, which consisted of 30 strains of polioviruses (20.3%), 13 of coxsackieviruses B group (8.8%), 29 of adenogroupviruses (19.6%), 2 of echoviruses (1.4%), 63 of reovirus type 1 (42.6%) and 11 of unidentified viruses.

In addition, 3 viral agents were also recovered by inoculating the samples to suckling mice.

3) Highest recovery rate of the viral agents wat observed by Vero#462 cell, followed by GMK, Hela, Hep2, FL and Vero518 cells used, and Vero#462 and GMK cells were likely to be suitable for the detection of reovirus, HeLa and Hep2 cells for adenoviruses respectively.

4) Retrospective observation made on 660 sera collected in 1971 and 1972, had clarified that there were many newly infected individuals among the population aged 0–15 and 31–40, between the period of June 1971 and June 1972.

1 緒　言

1967年以来，毎月定期的に，都内の下水処理場に集められた未処理下水（生下水）から，腸内ウィルス・レオウィルスおよびアデノウィルスを対象にウィルス分離試験を行ない，下水中のウィルス出現消長経過から，都内におけるこれらウィルス浸淫状況の考察を続けてきた。

本報においては，1972年1～12月の下水検体からのウィルス検索ならびに原因不明疾患々者および健康者からのウィルス検索について報告する。更には1971年夏季，小児間に大流行がみられたエコー11型ウィルスについての血清学的検査成績をも併せ報告する。

2 実験材料および方法

検体採取場所・採取方法・処理方法は，前報[1) 2) 3) 4)]と同様である。

1）培養細胞

FL・HeLa・Hep 2・Vero518・Vero#462 各種継代培養細胞と，初代培養細胞としてサル腎細胞（green monkey kidney cell）の計6種類を使用した。

2）ウィルス分離および同定

前報[1) 2) 3) 4)]と同様である。一部のレオウィルスおよびアデノウィルス分離株はヒトO型またはサル赤血球を用い，HI 試験で同定した。更に一部検体について，生後24～48時間以内の乳のみマウスの皮下および腹腔内に検体を接種し，発症を指標にウィルス分離を行なった。

3）エコー11型ウィルスの HI 試験

被検血清をPBS(－)で1：4に希釈した後，血清中の非特異的HA因子をとりのぞくために，25%カオリンを等量混和し室温で20分放置した。後 3,000rpm 10分遠心沈澱させて上清をとった。マイクロトレイに前処理した血清の2倍階段希釈列をつくり，これに4 HAU/0.025m*l* の抗原を加えた。ウィルス対照と血清対照をおき，室温で1時間反応させたのち，1%ヒトO型赤血球を加え，4 °C内に静置した。1時間後，管底の赤血球像により判定した。HI 価は凝集を完全阻止する血清希釈倍数をもって表現した。

4）エコー11型ウィルスの中和試験

被検血清はPBS(－)で1：4に希釈し56°C 30分非働化した。被検血清に100$TCID_{50}$に希釈したエコー11型ウィルスを添加混和し，37°C の恒温槽内で3時間反応させ氷室に1晩放置した後，培養細胞内に接種し一週間観察して細胞変性効果（CPE）を指標に，各被検血清の抗体（≧4）の有無を調べた。

3 実験成績および考察

1）下水検体からのウィルス検出

1972年1～12月までの1ケ年間に行なった落合処理場下水検体60件，砂町処理場下水検体120件，三河島処理場下水検体12件のウィルス分離状況は，Table I に示した。

一般住宅地が多い落合処理場において，処理前の生下水36件中36件（100%），77株のウィルスを，沈澱汚泥12件中11件（91.7%），25株のウィルスを，処理下水12件中3件（25%），3株のウィルスを検出した。

一方，工場地帯の排水が流入している砂町処理場における処理前の生下水36件中10件（27.8%），12株のウィルスを，沈澱汚泥48件中15件（31.3%），15株の

Table I. Type of Viruses Recovered from Sewages

Place of sampling	Sample used for isolation	Specimens collected											
		Jan.	Feb.	March	April	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
Sunamachi sewage treatment plant	raw sewage	Reo1	—	—	—	A D	—	Reo1	—	—	P2	P1.2 Reo1	—
		—	—	—	—	—	Reo1	—	—	—	—	—	A D
		—	—	—	—	—	Reo1	—	—	—	—	P2. AD	—
	activated sludge	—	—	Reo1	—	—	—	—	—	—	P2. AD	A D	—
		—	Reo1	—	—	Reo1	—	Reo1	—	—	P2	—	—
		—	—	—	P2	—	—	—	CB2	—	Reo1	Reo1	—
		Reo1	—	—	—	P2	—	—	—	A D	AD3	—	—
	treated sewage	—	—	—	—	—	—	Reo1	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	Reo1	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ochiai sewage treatment plant	raw sewage	AD. Reo1	Reo1	Reo1	P2	P3. AD3 Reo1	CB2 Reo1	CB2	AD. Reo1	AD. Reo1	Reo1	Pl. CB3 Reo1	AD. Pl.2 CB2.Reo1
		—	Reo1	A D	P2	Reo1	Reo1	Reo1	CB3 Reo1	AD. Reo1	AD. CB3 Reo1	AD. Reo1	P2. CB4 Reo1
		Reo1	Reo1	AD. Reo1	AD. P2 Reo1	AD3 Reo1	AD. Reo1	AD. CB2 Reo1	Reo1	AD. Reo1	P1.2.AD Reo1	P1. 2. 3 Reo1	El6. AD Reo1
	activated sludge	AD. Reo1	—	—	P2	—	Reo1	CB5. AD Reo1	CB3. AD Reo1	Reo1	AD. Reo1	AD2	P2. CB3 A D
	treated sewage	—	Reo1	Reo1	—	—	Reo1	—	—	—	—	—	—
Mikawashima sewage treatment plant	activated sludge	Reo1	—	—	P2	—	Reo1	Reo1	CB2	E3. Reo1	A D	P2. Reol	P2. 3. Reo1

Keys for abbreviation: pl (2.3) = poliovirus type 1(2.3), CB2(3.4.5) = coxsackie virus B2(3.4.5), Reo 1 = Reovirus type 1, AD (2.3) = adenovirus type (2.3), E3 (16) = echovirus type 3(16).

ウィルスを，処理下水36件中２件（5.6%），２株のウィルスを検出した。さらに三河島処理場における沈澱汚泥12件中９件（75%），14株のウィルスを検出した。落合処理場においては，92～100％のウィルス検出率を示したのに対して，砂町処理場においては，28～31％という低率であったのは，砂町処理場に流入している工場排水の影響などが考えられる。

下水検体から検出したウイルスは148株で，ポリオウィルス30株（20.3%），コクサッキーB群ウイルス13株（8.8%），アデノウィルス29株（19.6%），エコーウィルス２株（1.4%），レオウィルス63株(42.6%)となり，その内訳の各ウィルスの分離数は，TableⅡに示した。

０～18才の健康人糞便は，２月および10月の２ケ月

Table II. The Number of Strains Isolated from Sewage and from Unknown Fabrile Disease Patients and from Healthy children

Sample used for isolation	No. of tested	No. of positive	p1	p2	p3	CB2	CB3	CB4	CB5	AD2	AD3	AD?	E3	E16	Reo1	?
Ochiai raw sewage	36	36	4	6	3	4	3	1	—	—	2	15	—	1	32	6
Ochiai activated sludge	12	11	—	4	—	—	2	—	1	1	—	5	—	—	8	4
Ochiai treatment sewage	12	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	—
Sunamachi raw sewage	36	10	1	3	—	—	—	—	—	—	—	3	—	—	5	—
Sunamachi activated sludge	48	15	—	5	—	1	—	—	—	—	1	1	—	—	7	—
Sunamachi tretment sewage	36	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—
Mikawashima activated sludge	12	9	—	3	1	1	—	—	—	—	—	1	1	—	6	1
Unknown fabrile disease patients	369	9	—	—	—	1	—	—	—	—	5	—	—	—	3	—
Healthy children	158	18	5	2	2	—	—	3	—	—	—	1	1	—	4	—

Keys for abbreviation : pl (2.3) = poliovirus type 1 (2.3),
CB2 (3.4.5) = coxsackie B2 (3.4.5) virus,
Reo 1 = Reovirus type 1, AD2 (3) = adenovirus type 2 (3)
AD? = adenovirus untyped,
E3 (16) = echovirus type 3 (16),
? = untyped.

のみしか検体採取が行なえなかったため，この年令層での腸管系ウィルスの感染実態はつかめなかった。しかし両月においてポリオウィルスが１才未満の乳児から分離され，下水検体からの分離成績と一致した。この時期は春秋の生ワクチン一斉投与時期であり，両者からの分離ウィルスは，生ワクチン由来のウィルスと考えられる。

次にアデノウィルスは，３型以外は年間を通じて分離されたが，３型は下水検体から５月に２株，10月に１株，患者検体から10月に５株分離された。1972年，下水検体から最も高率に分離されたのは，レオ１型ウィルスで，分離株数の42.6%であった。

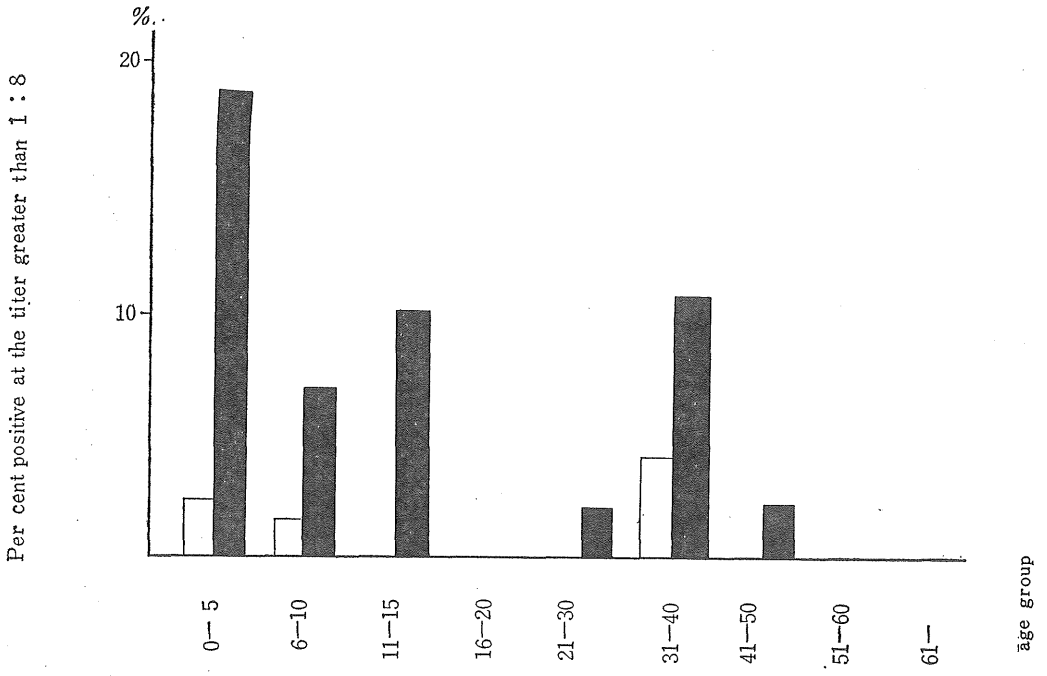
下水検体からのウィルス検索にあたって，FL・HeLa・Hep２・Vero518・Vero#462の５系継代培養細胞とサル腎（GMK）細胞の初代培養細胞を使用した。192件の下水検体検索結果を培養細胞種別に整理すると，TableⅢのようになる。FL細胞では22株(11.5%)，HeLa 細胞では27株（14.1%），Hep２細胞では31株（16.1%），Vero518細胞では21株（10.9%），Vero#462細胞では58株（30.2%），GMK細胞では39株（20.3%）のウィルスを検出した。Vero#462細胞でのウィルス分離が最も高率であった理由は，この細胞によりレオ１型ウィルスが多数分離されたことである。Vero#462細胞でのウィルス分離数58株中52株（89.7%）が，同ウィルスであった。したがって，Vero#462細胞はレオウィルスに対して非常に高い感受性をもつ細胞で，レオウィルス分離に適していることがわかった。

1971年のレオウィルス検出地区は，城西地区に限られていたが，1972年になると城西・城東両地区に拡がり，その検出率も著明に上昇した。この間の事情を究明するために，1971年６・10月および1972年６・10月に採血した都内の各年令層の健康人について，HI 抗

Table III. Virus Isolation from Sewage by the Use of Several Cell Lines

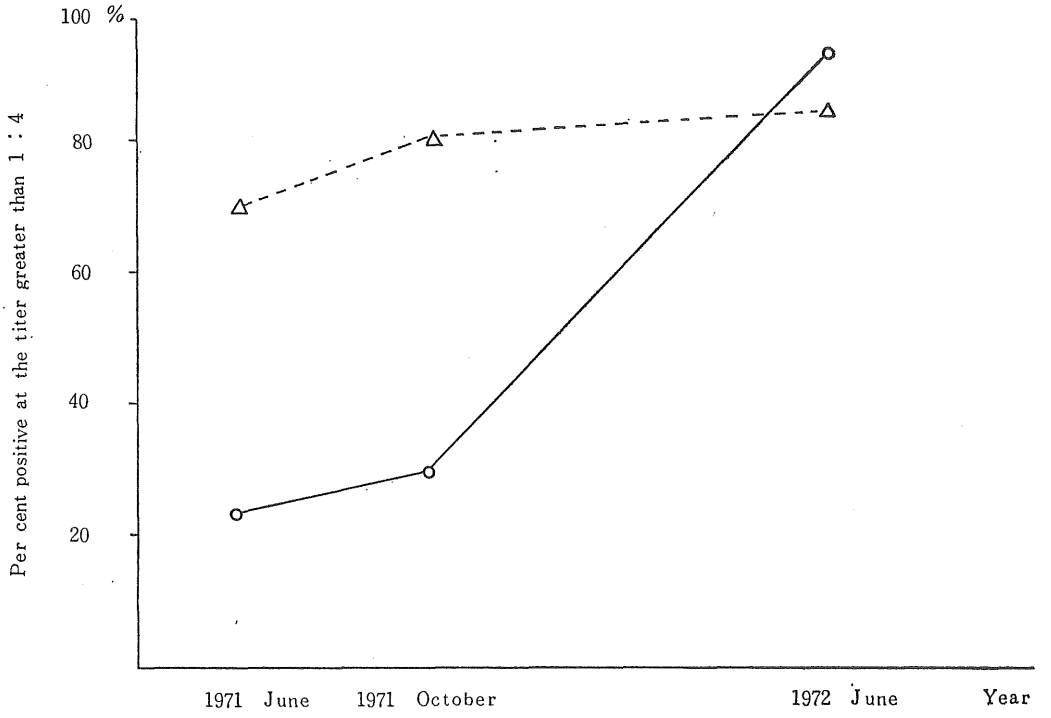
Virus detected			cell lines used					
			FL	HeLa	Hep2	Vero	#Vero	MK
poliovirus	type	1	1/192	4/192	0/192	0/192	0/192	0/192
	type	2	9/192	9/192	7/192	3/192	2/192	2/192
	type	3	2/192	2/192	1/192	1/192	0/192	0/192
coxsackie B	type	2	0/192	2/192	0/192	3/192	0/192	2/192
	type	3	1/192	3/192	1/192	0/192	0/192	0/192
	type	4	0/192	1/192	0/192	0/192	0/192	0/192
	type	5	0/192	1/192	0/192	0/192	0/192	0/192
echovirus	type	3	0/192	0/192	1/192	0/192	0/192	0/192
	type	16	1/192	0/192	0/192	0/192	0/192	0/192
adenovirus	type	2	1/192	0/192	0/192	0/192	0/192	0/192
	type	3	0/192	0/192	2/192	0/192	0/192	0/192
	type	?	4/192	14/192	12/192	1/192	0/192	0/192
reovirus	type	1	0/192	0/192	0/192	7/192	52/192	32/192
not identified			3/192	5/192	7/192	6/192	4/192	3/192
total			22/192	27/192	31/192	21/192	58/192	39/192

Note: Numerater indicates the number of virus strains isolated, and denominator indicates the number of samples inoculated.



Note : □ indicates the results of survey on June, and ■ indicates the one on June 1972.

Fig 1. Different incidence of E II HI antibody observed on healthy Tokyoites by their age groups.



Note : ○———○ incidence on the age group 0—5, △·····△ incidence on the age group 6—10

Fig 2. Different incidence of E 11 neutralizing antibody observed on healthy Tokyoites.

体保有状況を調査し，その浸淫度を究明した[5]。

生下水・沈澱汚泥68件を乳のみマウスに接種し，3件から乳のみマウスにけいれんおよびまひをおこす病原体を検出したが，同定は行なっていない。

2）1971～1972年におけるエコー11型ウィルスに対する健康都民の HI および中和抗体保有状況

1971年夏季，全国各地において小児の熱性疾患などからエコー11型ウィルスが多数分離されており，同ウィルスの大流行が推測された[6]。われわれも5～10月の下水検体から25株，5月には健康者から2株，7月には原因不明疾患々者から2株検出し，流行推移を把握した。その流行規模および感染主対象の年令層を推測するために，流行前1971年6月および流行後の1971年10月，1972年6月に採血した健康都民血清660例について HI 抗体価を測定した。試験結果は Fig 1 に示した。抗体保有率（≧1：8）が流行前に比べ，流行後に上昇したのは，0～5，6～10，11～15，31～40才の年令層であった。31～40才はウィルス感染児の親にあたる年代であり，家族内感染を受けたものと考えられる。更に4ヶ月から10才までの同一血清199例について，中和抗体保有率（≧1：4）を調べ，Fig 2 に示した。中和抗体保有率において，特に0～5才までの年令層において抗体価の上昇が著明にみられ，したがって1971年5～10月のエコー11型ウィルスの感染流行は，主に5才以下の小児が感染対象であったと考えられる。

4 結　論

都内三下水処理場流入下水検体からのウィルス検索逐月成績および健康者・原因不明疾患々者からのウィルス検索成績より，1972年1～12月における都内の腸内ウィルス浸淫状況を推測し，ウィルス検出率と培養細胞種類との関連についても検討した。また1971年浸淫腸内ウィルスの主体であったエコー11型ウィルスについて血清疫学的観察を行なった。

1）城西地区の排水が流入している落合処理場の下

水では，生下水36件中36件（100％）から，沈澱汚泥12件中11件（91.7％）からウィルスを検出した。城東地区の排水が流入している砂町処理場の下水では，生下水36件中10件（27.8％）から，沈澱汚泥48件中15件（31.3％）から，また三河島処理場沈澱汚泥12件中9件（75％）からウィルスを検出した。ウィルス検出率は処理場別により，下水検体の種類により差がみられた。

2）1972年の下水からのウィルス検索の結果，ポリオウィルス30株（1型5株，2型21株，3型4株），コクサッキーB群ウィルス13株（2型6株，3型5株，4型1株，5型1株），アデノウィルス29株（2型1株，3型3株，2.3型以外25株），レオ1型ウィルス63株，末同定11株の計148株を検出した。検出されたウィルスの種類は処理場別によって顕著な差はなかった。乳のみマウスによる検索から，発症させる3株の病原体を検出した。

3）培養細胞中最も高率にウィルスが検出し得たのは Vero#462 細胞で，次いで GMK・HeLa・Hep 2・FL・Vero518 細胞の順であった。ウィルス種類別にみると，レオウィルスの検出には Vero#462・GMK 細胞が，アデノウィルス検出には，HeLa・Hep 2 細胞が，ポリオウィルス検出には HeLa・FL・Hep 2 細胞が，コクサッキーB群ウィルス検出には，Vero518・HeLa・GMK 細胞が適していた。

4）1971年5～10月にかけて下水より高率に分離されたエコー11型ウィルスに対する血清疫学的調査では，まず流行前後における HI 抗体保有率（≧1：8）の変動から，感染対象が，0～5，6～10，11～15，31～40の年令層であったことがわかった。更に中和抗体保有率（≧1：4）の変動より，0～5才の年令層が主対象であることが判明した。。

謝　辞

本研究に御援助いただいた東京都下水道局落合・砂町両処理場の皆様方に深謝する。

文　献

1）岩崎謙二，他：都衛研年報，(20)，35（1968）
2）岩崎謙二，他：都衛研年報，(21)，9（1969）
3）岩崎謙二，他：都衛研年報，(22)，35（1970）
4）岩崎謙二，他：都衛研年報，(23)，49（1971）
5）岩崎謙二，他：都衛研年報，(24)，69（1972）
6）多ケ谷勇，他：1971年に発生したエコー11型感染症の流行について，国立予防衛生研究所，東京（1972）

1968～1972年における東京都民の日脳ウィルス抗体保有状況の分析

岩崎謙二* 藪内 清* 柳沢靖子*
矢野一好* 根津尚光*

SEROEPIDEMIOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE INCIDENCE OF ANTIBODIES AGAINST JAPANESE ENCEPHALITIS IN TOKYOITES

Kenji IWASAKI, Kiyoshi YABUUCHI, Yasuko YANAGISAWA, Kazuyoshi YANO and Naomitsu NEZU

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

Summary

During the period from 1968 to 1972, a total of 1,747 sera of Tokyoites aged from 0 to 81, was tested for the presence of hemagglutination-inhibltion (HI) antibodies and neutralizing (NT) antibodies to Japanese Encephalitis (JE) virus.

Results obtained were analysed statistically, by age group (0–5, 6–12, 17–16, 17–30, 31–59, and more than 60), by district (eastern, western and southern districts), and by year.

Incidence of JE HI antibody ($\geqq 1:10$) has varied according to age groups and higher incidence was observed in older age groups (more than 31 years of their age).

For the expression of the immune level of the population in the community, we used the linear function ($y = a - bx$; y : antibody positive rate, x : HI titer level in $\log 2$), calculated through HI titers obtained on the representing specimens.

Incidence of NT antibody on HI negative sera ($< 1:10$) was almost same in every age groups.

As for the areal incidence of HI antibody, it was almost equal between easrern and southern districts, however, it was little bit higher in western district, especially at age groups of 13–16 and 17–30.

Constant positive rate was obtained with JaGAr 01 antigen throughout the investigation period.

緒 言

日本脳炎（日脳）流行期直前における東京都民の日脳ウィルス抗体保有状況を調査する目的で，1968年以来毎年6月に健康都民約360名の血清検体を採取して日脳ウィルスに対する抗体価を測定してきたので，それらの試験結果を統計分析して報告する。

1968年以降の東京都内における日脳患者発生はほと

*東京都立衛生研究所微生物部ウィルス研究科

んど皆無に等しく，1968～1972年の5カ年間の届出患者総数はわずか2名であった。また屠場豚の日脳ウィルス抗体保有率の逐時調査結果[1~5]からも都内における日脳ウィルス汚染度は近年かなり低下していることがうかがわれる。このような日脳ウィルス汚染度の変化が都民の日脳ウィルス抗体保有に如何なる影響を与えているかなどについても考察した。

試験材料および方法

健康都民血清

浅草，足立（東部地区），糀谷，梅ヶ丘（南部地区），小平，八王子（西部地区）6保健所管内に居住する0～81才までの健康者から選んで採取した。毎年6月に1保健所当り約60名から，供血者の年令配分を考慮して採血した。採取した血清は −20°C のフリーザー内に凍結保存した。被検血清例数は1968年360例，1969年363例，1970年354例，1971年346例，1972年324例，計 1,747例であった。

HI（赤血球凝集抑制）試験

大谷[6]の方法に準じて行なった。使用した日脳HA（赤血球凝集）抗原は市販の JaGAr 01株，中山株抗原（武田薬品製）である。

HI価は使用抗原量のHAを完全阻止した被検血清の最高希釈倍数をもって表わした。

中和試験

ウィルス実験学各論（国立予防衛生研究所学友会編）記載の方法[7]に準じて，ニワトリ胎児初代培養細胞上のプラック減少法により行なった。

中和用のウィルスはマウス脳継代の日脳ウィルス JaGAr 01株および中山株の感染マウス脳を血清加PBSでそれぞれ10%乳剤とし，10,000rpm30分間遠心沈澱した上清を1.0m*l*ずつアンプルに分注し，凍結乾燥して保存した。アンプル内の中和用ウィルスは実験の都度溶解し原量に復して使用した。同ウィルスの PFU（プラック形成単位）は予め繰り返し実験を行なって測定しておいた。

中和抗体価はウイルス対照の産生プラック数（平均値）を50%減少させる血清希釈倍数で表現した。

試験成績および考察

1）東京都民の日脳ウィルスHI抗体保有状況

1968～1972年に採取した健康都民血清1,747例について行なった日脳HI試験の結果を，採血年次別，供血者の年令区分および抗体価別に整理して表1および表2に示した。表1には JaGAr 01株抗原を，表2には中山株抗原を用いて得た成績を示した。

Table 1

Incidence of JE JaGAr 01 Antibody in Healthy Human Sera.

Specimens collected	Age group	No. of Sera tested	HI antibody titer obtained								
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
1968	− 5	54	9	4	−	2	2	−	−	−	−
	6–12	110	14	7	5	1	1	−	−	−	−
	13–16	20	2	−	−	2	1	−	−	−	−
	17–30	53	3	5	2	7	4	2	2	−	−
	31–59	68	8	6	11	15	6	5	1	1	−
	60–	55	7	17	6	8	8	2	1	−	−
1969	− 5	48	11	2	1	2	1	−	−	−	−
	6–12	109	12	6	3	4	3	1	−	−	1
	13–16	22	6	6	2	−	1	1	−	−	−
	17–30	50	5	2	6	5	1	2	2	−	−
	31–59	76	11	10	10	9	8	5	3	1	2
	60–	58	4	14	12	7	5	8	2	−	−
1970	− 5	47	4	6	2	2	2	−	−	−	−
	6–12	116	16	4	9	2	2	1	−	−	−
	13–16	15	1	3	−	1	−	−	1	−	−
	17–30	63	7	3	3	4	3	2	−	−	−
	31–59	62	12	13	5	8	4	1	−	−	−
	60–	51	11	10	11	3	2	−	−	−	−
1971	− 5	41	4	10	4	4	1	−	1	−	−
	6–12	115	14	12	3	3	−	−	−	−	−
	13–16	12	−	2	1	−	2	−	−	−	−
	17–30	54	1	6	1	9	3	3	1	−	−
	31–59	65	7	9	11	8	7	5	1	−	−
	60–	59	9	12	10	11	5	−	−	−	1

Specimens collected	Age group	No. of Sera tested	HI antibody titer obtained								
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
1972	− 5	27	7	3	4	1	−	1	−	−	−
	6–12	93	9	6	8	5	−	1	1	−	−
	13–16	21	2	−	−	1	1	1	−	−	−
	17–30	62	8	3	9	2	4	−	−	1	−
	31–59	89	9	11	12	9	4	5	1	1	−
	60−	32	6	6	9	2	1	−	−	−	−

Note : Figures in the table indicate number of positive.

Table 2

Incidence of JE Nakayama Antibody in Healthy Human Sera.

Specimens collected	Age group	No. of sera tested	HI antibody titer obtained								
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
1968	− 5	54	5	3	4	−	1	−	−	−	−
	6–12	110	8	3	1	−	−	−	−	−	−
	13–16	20	2	2	−	−	1	−	−	−	−
	17–30	53	9	3	8	1	2	3	−	−	−
	31–59	68	9	13	14	9	3	2	1	−	−
	60−	55	11	9	8	5	−	−	−	−	−
1969	− 5	48	9	2	3	−	−	−	−	−	−
	6–12	109	5	5	4	1	−	−	1	−	−
	13–16	22	5	2	1	−	1	−	−	−	−
	17–30	50	7	4	4	3	1	−	−	−	−
	31–59	76	19	15	9	5	3	1	−	1	−
	60−	58	14	14	7	6	−	−	−	−	−
1970	− 5	47	6	2	3	−	−	−	−	−	−
	6–12	116	10	3	3	1	−	−	−	−	−
	13–16	15	1	−	1	−	1	−	−	−	−
	17–30	63	5	5	3	3	−	−	−	−	−
	31–59	62	14	8	3	−	−	−	−	−	−
	60−	51	7	6	3	−	−	−	−	−	−
1971	− 5	41	12	4	4	5	−	−	−	−	−
	6–12	115	19	7	2	−	−	−	−	−	−
	13–16	12	2	−	2	1	−	−	−	−	−
	17–30	54	6	4	5	7	1	−	−	−	−
	31–59	65	18	8	11	5	3	−	−	−	−
	60−	59	19	12	8	2	−	1	−	−	−
1972	− 5	27	5	4	−	1	−	−	−	−	−
	6–12	93	13	3	5	−	−	1	1	−	−
	13–16	21	1	1	−	2	−	−	−	−	−
	17–30	62	13	6	3	3	1	−	−	−	−
	31–59	89	16	12	5	4	5	−	−	−	−
	60−	32	10	5	2	−	−	−	−	−	−

Note : Figures in the the table indicate number of positive.

これら2表の成績から，都民の日脳ＨＩ抗体保有率は使用する抗原株，供血者の年令階層，採血年次によって差のあることが感じとれる。

各年次ごとに，JaGAr 01株および中山株抗原に対する0～5，6～12，13～16，17～30，31～59，60才以上6年令階層でのＨＩ抗体陽性率（抗体価≧1：10）の平均値を算出して年次変動を調べると，明らかな差がみられた。JaGAr 01株での陽性率は1971年が，中山株では1969年が最も高率で，JaGAr 01，中山両株とも1970年が最も低率であった。

JaGAr 01株での陽性率は全調査年次を通じて中山株での陽性率よりも高率であった。

このような使用抗原の株間にみられた HI 抗体陽性率の差は統計学的に1％以下の危険率で（高度に有意），また年次間にみられた差は5％以下の危険率で有意であった。

供血者を0～5，6～12，13～16，17～30，31～59，60才以上の年令区分にわけて，JaGAr 01株および中山

株抗原に対する1968～1972年の5カ年間の平均HI抗体陽性率（抗体価≧1：10）を算出して比較すると，明らかに年令階層間の差および使用抗原株間の差がみとめられた。これらの差は統計学的に1％以下の危険率で有意であった。

全年令階層を通じて中山株よりも JaGAr 01株での陽性率が高率であった。年令階層別の陽性率をみると，JaGar 01株では60才以上の階層が，中山株では31～59才の階層が最も高く，JaGAr 01，中山両株ともに6～12才の階層が最も低率であった。

陽性率算出基準の抗体価レベルを≧1：10，≧1：20，≧1：40，≧1：80，≧1：160と変えてそれぞれの陽性率を算出し，年令区分（要因A；0～5，6～12，13～16，17～30，31～59，60才以上の6水準）および採血年次（要因B；1968，1969，1970，1971，1972年の5水準）による変動を統計学的に分析した結果を表3にまとめて示した。

これら年令区分ならびに年次による変動の統計学的

Table 3. Statiatical Analysis on HI Antibody Incidence in Each Age Group and in Annual Fluction.

JE virus antigen used	factor	HI titer				
		≧1：10	≧1：20	≧1：40	≧1：80	≧1：160
JaGAr 01	Φ A	5	5	5	5	5
	Φ B	4	4	4	4	4
	Φ e	20	20	20	20	20
	V e	121.0605	107.5972	51.6406	49.5643	24.5848
	p A	73.2884％	71.7484％	74.7755％	51.5467％	44.5848％
	p B	0.3926％	3.2931％	4.5776％	11.2294％	8.1545％
	F_A	17.1508**	17.6733**	22.0055**	9.0317**	6.4083**
	F_B	1.1081	1.9566	2.6074	3.1871*	2.2439
Nakayama	Φ A	5	5	5	5	
	Φ B	4	4	4	4	
	Φ e	20	20	20	20	
	V e	557.6318	83.2838	58.8226	18.0462	
	p A	5.6641％	46.6107％	33.5190％	30.5750％	
	p B	5.6116％	28.5882％	30.5856％	11.1778％	
	F_A	1.3702	11.9004**	6.4160**	4.0445*	
	F_B	1.4585	9.3571**	7.1775**	2.3913	

Note： Φ =degree of freedom, A=factr A (age group less or equal to 5, 6 to 12, 13 to 16, 17 to 30, 31 to 59 and greater or equal to 60 years old), B=factor B (year tested; 1968,1969,1970,1971 and 1972), e=error, V=variance, p=probability, F=variance ratio of F-distribution, **=signifc ant at level of significance 1％, *=significant at level of significance 5％.

有意性は陽性率算出基準の抗体価レベルによって変化した。

年令階層間の差は JaGAr 01，中山両株抗原ともほとんどすべての組合せで高度に有意（1％以下の危険率）であったが，年次間の差は JaGAr 01株では抗体価≧1：80での陽性率を（5％以下の危険率），中山株では抗体価≧1：20および≧1：40の陽性率をとったとき（1％以下の危険率）だけ統計学的に有意であった。

この分析結果にもとづいて，JaGAr 01株ではHI抗体価≧1：80の陽性率を，中山株では≧1：40の陽性率をとって，各年令階層別に1968～1972年における都民の日脳抗体保有率の推移を示すと図1のようになる。

年次推移線を画くと，JaGAr 01株，中山株の陽性率は，16才以下の各年令階層でわずかながら上昇傾向を，17才以上の各年令階層では反対に下降傾向を示した。実測値から1年当りの変動値を算出してみると，16才以下での上昇値は JaGAr 01株で0.48～0.83％，中山株で0.41～2.49％，17才以上での下降値は JaGAr 01株で0.71～6.05％，中山株で2.21～4.96％であった。

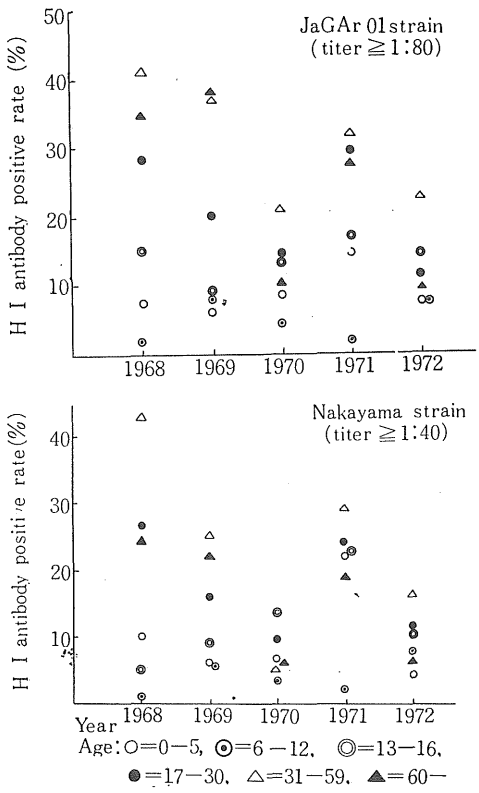


Fig. 1. Annual Fluction of JE Virus HI Antibody Positive Rates in Different Age Groups

17才以上の年令階層における陽性率の下降傾向は近年の都内における日脳ウィルス汚染度の低下が反映しているものと考える。

16才以下で陽性率の下降傾向がみられなかったのは，この年令階層での陽性率は高年令層に比べてかなり低率であることと日脳ワクチン接種の影響を考えなくてはならない。

ＨＩ抗体保有率の調査地区別による変動を調べるため，試験結果を東部，南部および西部地区別にわけて，抗体価≧1：10および≧1：40での５カ年間の平均抗体保有率をとって，統計学的にその変動を検討すると，≧1：10での陽性率では JaGAr 01，中山両株とに有意差はみとめられなかった。≧1：40での陽性率では JaGAr 01株（５％以下の危険率），中山株（１％以下の危険率）ともに有意差がみとめられた。

抗体価≧1：40での陽性率地域変動を，年令区分ごとに検討したところ，JaGAr 01株では13～16才（１％以下の危険率）および17～30才（５％以下の危険率）で，中山株では13～16才，17～30才（ともに５％以下の危険率）で統計学的な有意差がみとめられた。

また年次別の地域変動は，1970年（５％以下の危険率）およびに1971年（１％以下の危険率）に顕著にみられた。

西部地区のＨＩ抗体陽性率は，東部，南部に比して高率であるとの直感的結論は統計的にもたしかめられた。

集団における抗体保有様相を一元的に表現する方法は現在のところ確立されていない。

われわれは集団の抗体保有様相を各抗体価レベルでの陽性率値の変動パターンとして表現することを試み

Table 4 HI Antibody Incidene Expressed by the Linear Function.

Age group		JaGAr 01 antibody					Makayama antibody				
		1968	1969	1970	1971	1972	1968	1969	1970	1971	1972
≦ 5	a*	5.922	6.275	6.785	9.337	8.367	5.844	6.600	5.853	8.880	7.270
	b**	0.852	1.003	0.965	1.405	1.213	0.990	1.445	1.155	1.390	1.486
6–12	a	5.812	5.631	5.980	6.600	6.307	4.400	4.610	4.580	5.370	4.731
	b	1.042	0.696	0.877	1.359	0.820	1.175	0.760	0.925	1.380	0.602
13–16	a	5.426	1.067	6.538	7.353	5.136	5.263	7.425	4.836	7.520	4.710
	b	0.552	1.271	0.665	0.711	0.444	0.715	1.399	0.482	1.074	0.454
17–30	a	8.117	7.725	6.660	8.281	7.182	7.591	7.511	6.035	8.177	7.379
	b	0.855	0.828	0.783	0.924	0.840	0.884	1.157	0.965	1.231	1.245
31–59	a	10.570	9.804	9.795	10.344	8.799	10.206	9.030	8.410	9.749	7.766
	b	1.197	0.959	1.395	1.231	1.005	1.336	1.222	2.080	1.529	1.144
≧60	a	11.189	11.261	10.397	10.886	10.891	9.990	10.220	7.247	9.988	9.607
	b	1.406	1.263	1.709	1.498	1.823	1.725	1.770	1.585	1.826	2.390

Note : $y\ (\sqrt{\text{cumulative positive rate}} = a^* - b^{**} \times x$ (antibody titer = log 2)

てきた。

今回はＨＩ抗体陽性率値の平方根値をｙ，陽性率算出基準の抗体価の Log 2 値をｘとして，ｙ＝ａ－ｂｘなる一次式に実測値を代入して，それぞれのａ，ｂ値を算出した。年令区分別，採血年次別に算出したａ，ｂ値を表４に示した。

ａ，ｂ値の年令区分間にみられた差は，JaGAr 01，中山両株の場合に統計学的に１％以下の危険率で有意であった。このことは年令区分によって陽性率に差があるばかりでなく，年令区分によって抗体価分布のパターンに差のあることを示している。

ａ値の年次変動は中山株でだけ有意であった。ｂ値の年次変動はいずれの場合にも有意ではなかった。このことは陽性率の年次変動は中山株で著明にみとめられたが，抗体価分布上の年次差はみられなかったことを示している。

高年令層における低いｂ値，低年令層における高いｂ値は，高年令層における抗体価分布で若年令層に比較して高い抗体価を示す血清の比率が低くなっている実態を数量的に表わしている。

２）日脳ウィルスＨＩ抗体陰性者（抗体価＜１：10）の日脳ウィルス中和抗体保有状況

JaGAr 01株および中山株両抗原に対するＨＩ抗体価がともに＜１：10であった血清例についてプラック減少法により JaGAr 01株ウィルスに対する中和抗体価を測定した。結果は表５に示した。

Table 5. Detection of Virus Neutralizaing Antibody Made on on HI Negative Sera (<1 : 10)

NT antibody titer	age group																							
	～5				6～12				13～16				17～30				31～59				≧60			
	'69	'70	'71	'72	'69	'70	'71	'72	'69	'70	'71	'72	'69	'70	'71	'72	'69	'70	'71	'72	'69	'70	'71	'72
<10	2	6	2	3	11	8	10	16	1	1	1	3	2	5	4	11	－	6	4	14	1	3	1	5
10-19	9	7	5	3	12	10	20	15	－	－	－	1	2	5	2	5	2	2	2	6	1	－	3	1
20-29	4	5	3	3	9	20	22	11	3	2	1	1	4	9	13	7	2	4	5	8	－	2	1	－
30-39	3	4	1	1	7	13	9	8	－	2	1	5	5	7	8	7	1	3	5	2	1	2	1	－
40-49	1	5	1	－	6	11	6	4	－	－	1	2	3	5	1	2	1	－	－	2	1	1	3	1
50-59	1	1	1	－	4	7	6	2	1	1	－	－	1	4	2	1	－	－	－	2	－	－	－	－
60-69	3	3	1	1	4	4	5	2	－	1	－	1	1	1	－	2	－	2	－	－	1	1	1	1
>69	7	－	2	－	26	7	3	4	1	2	1	1	9	4	－	1	11	2	－	－	1	5	1	－

Note : Figures in the table indicate number of positive.

０～５，６～12，13～16，17～30，31～59および60才以上の中和抗体陽性率（抗体価≧１：10）はそれぞれ83.6％，84.2％，85.0％，84.6％，76.3％，72.6％であり，これら年令区分間の陽性率変動は統計学的には５％の危険率で有意ではなかった。

1969，1970，1971，1972年の年次別平均抗体保有率（≧１：10）を算出すると，それぞれは89.8％，82.4％，85.2％，66.8％となり，1972年のみが明らかに低率であった。この年次差は統計学的に１％以下の危険率で有意であった。

JaGAr 01株および中山株両ウィルスに対する中和抗体価を測定した75例の血清について，両者の抗体価を対比させて相関係数を算出したところ0.61となり，はっきりした相関々係はみられなかった。

３）日脳ウィルスに対するＨＩ抗体価と中和抗体価との関連性

ＨＩ抗体価と中和抗体価との関連性を調べるため，中山株ウィルスにするＨＩ抗体価（log 2 値）と中和抗体価（log10値）を測定した257例の血清の成績を対比させて相関係数を算出したところ，その値は0.73となり，中山株ウィルスに対するＨＩ抗体価と中和抗体価の間には弱い正の相関々係のあることがわかった。

結　論

1968～1972の５カ年間に採取した健康都民血清1,747例について，ＨＩ試験ならびに中和試験を行なって日脳ウィルスに対する抗体価を測定した。それらの試験結果を分析して，都民における日脳ウィルス抗体保有状況の年次的，年令階層的，地域的変動を考察した。

１）都民の日脳ＨＩ抗体保有率（≧１：10）は調査年

令階層によって著しい差がみられ，JaGAr 01株，中山株ともに31才以上の年令層で高率であった。

絶対数の上からみると高いＨＩ抗体価を示した血清数は高年令階層に多かったが，抗体陽性血清内での比率からみるとその比率は低かった。

2）都民の日脳ＨＩ抗体保有率は調査の年令階層，年次に関係なく，中山株よりも JaGAr 01株で高率であった。

3）HI 抗体保有率の年次推移は，JaGAr 01株，中山株ともに，16才以下ではわずかながら上昇傾向を，17才以上では下降傾向を示した。

4）ＨＩ抗体保有率の調査地区による差異は年令区分では13～16，17～30才の階層で，年次では1970年と1971年に顕著にみとめられた。

5）ＨＩ抗体陰性者（＜1：10）の中和抗体保有率は年令区分による差がみられなかったが，年次的には1972年が最も低率であった。

6）中山株ウィルスに対するＨＩ抗体価と中和抗体価の間には弱い正の相関々係がみられた。

謝辞　本試験実施に当り種々と御協力をいただいた衛生局公象衛生部ならびに各保健所の関係各位に深謝する。

文　献

1）藪内清，他：都衛研研究年報，(20)，39（1968）
2）藪内清，他：　〃　，(21)，19（1959）
3）藪内清，他：　〃　，(22)，57（1970）
4）藪内清，他：　〃　，(23)，35（1971）
5）藪内清，他：　〃　，(24)，75（1972）
6）日本公衆衛生協会：微生物検査必携，451，(1966)
7）国立予防衛生研究所学友会：ウイルス実験学各論，148（1967）

1971年～1972年における東京都民のレオウィルス抗体保有分析

岩崎謙二* 矢野一好*
柳沢靖子* 山崎清*

INCIDENCE OF ANTIBODY AGAINST REOVIRUS TYPE 1 IN HEALTHY TOKYOITES IN 1971–1972

Kenji IWASAKI, Kazuyoshi YANO, Yasuko YANAGISAWA and Kiyoshi YAMAZAKI

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

Summary

A total of 919 sera of healthy Tokyoites, which collected at June and October 1971 and 1972, was tested for the presence of HI antibody against Reovirus type 1, in order to clarify the degree of the virus dissemination in the community.

Because, previous virus isolation attempts made on sewages proved that there was a frequent detection of Reovirus type 1 in early 1972.

Results obtaind are as follows:

1) When incidence of the antibody (greater than 1 : 8) was calculated by the antigen of Lang strain, it was 27–45% in younger age groups (0–5, 6–10 and 11–15), and 60–80% in middle and older age groups (16–20, 21–30, 31–40, 41–60 and 61–).

However, when it was calculated by the antigen of 72–351 strain, it was 34–50% and 42–80% respectively.

Relatively few sera obtained from older age groups showed higher titer in comparison with those from younger age groups.

2) Both in 1971 and 1972, higher incidence of the antibody was observed on 6–10 and 11–15 age groups at October.

3) There was a weak correlation between the titer to Lang strain and an isolate (72–351) in 1972, when each specimen was tested by these 2 antigens (Correlation coefficient : 0.59).

1 緒 言

レオウィルスは，ヒトのほか家畜や野生動物に広く分布している[1-4]。

このウィルスは，ヒトに感染し，消化器や呼吸器に軽い急性症状をひきおこすことが知られているが，不顕性感染の場合も多く[5]，症状とウィルス感染との因果関係は，不明の点が多い。

われわれが1967年6月以来つづけてきた下水検体からのウィルス検索逐月調査[8,9,10]において，とくに

*東京都立衛生研究所微生物部ウィルス研究科

1971年末から1972年にかけてレオ1型ウィルスが高率に検出され，同時期における同ウイルスによる都内の高濃度汚染が推測された。

血清疫学的に，都内の同ウィルス汚染実態を知るため，1971年6月，10月および1972年6月，10月の4時期に採取した健康都民血清計919例についてHI試験を行なった。得られた試験結果は，統計分析して考察した。またレオ1型ウィルス Lang 株（標準株）および同分離株 72—351 を抗原として得られたHI抗体価の相関についても検討した。

2　実験材料および方法

1）被検血清

1971年6月に339例，同10月に129例，1972年6月に314例，同10月に137例計919例，0～81才までの健康都民から採取した。血清は試験を行なうまで−20°Cのフリーザーに凍結保存した。

2）HI試験

マイクロタイター法[6]によって行なった。被検血清は Rosen ら[7]の方法に準じて，カオリン処理を行ない，非特異抑制物質を除いて使用した。

使用したウィルスHA抗原は，ウィルスを Vero ＃462細胞に接種し36°Cにおいて4日間回転培養して作製した。レオ1型ウィルス Lang 株は，日本獣医大学病理学教室の安藤氏より分与を受けた。分離株72-351は，1972年4月下水検体から Vero＃462 細胞を用いて分離したものである。

赤血球は，ヒトのO型赤血球を使用した。

3　実験成績および考察

われわれが行なってきた都内の下水検体からのウィルス検索結果[8,9,10]から，1970～1972年におけるレオウイルス分離の逐月成績を示すと表Iのようになる。70年は118件の下水検体から4株，71年は144件から20株，72年は144件から63株のレオ1型ウィルスを検出した。70年，71年におけるレオウィルスの検出は，地域的にほとんど都の西部に偏っていたが，72年には東部からも同様に検出され，ウィルス感染が全都に拡大したことが推察された。

Table I.　Isolation of Reovirus Type 1 from Sewages

year		specimens collected											
		Jan.	Feb.	March	April	May	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
1970	No. of tested	4	4	4	11	11	12	12	12	12	12	12	12
	No. of positive	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1971	No. of tested	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of positive	6	6	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0
1972	No. of tested	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	No. of positive	6	5	4	1	5	9	8	4	5	5	7	4

この間の実態を血清疫学的に究明する目的で，1971年6月，同10月，および1972年6月，同10月に採取した健康都民血清計919件について行なったレオ1型ウィルス Lang 株抗原に対するHI試験の結果は，年令階層別および抗体価別に累積陽性率で表IIおよびIIIに示した。なお前出の被検血清中1971年6月および1972年6月に採取した計649件についてはレオ1型ウィルス分離株（72—351）抗原を用いてHI試験を行なった。試験結果は表IVに示した。

HI抗体価分布は，年令階層によって特色がみられた。抗体価≧1：8レベルでの保有率を比較すると20才以下の各年令層では，20才以上の年令層よりはるかに低率であったが，抗体価レベルを，≧1：16，≧1：32と順次上げると両者の差は，それに対応して縮小した。母集団の抗体保有状況を，$y = a - bx$〔$y = \sqrt{\text{抗体保有率}}$，$x =$抗体価（$\log 2$）〕なる一次式で表現すると，20才以下の各年令層ではb値が小さく，20

Table II. Incidence of HI Antibody against Reovirus Type 1 (Lang strain) in Healthy Tokyoites

Bleeding	Age group	No. of sera tested	Cumulative positive rate at the titer of greater than							
			1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
			%							
	0–5	40	35.0	35.0	15.0	15.0	5.0	2.5	0	0
	6–10	59	30.6	25.5	17.0	11.9	8.5	3.4	0	0
June	11–15	62	45.1	41.9	27.4	17.7	4.8	1.6	1.6	1.6
	16–20	8	62.5	37.5	25.0	0	0	0	0	0
1971	21–30	47	63.8	61.7	42.6	12.8	8.5	2.1	0	0
	31–40	26	88.4	80.7	42.2	11.4	3.8	0	0	0
	41–60	44	68.2	61.4	34.1	9.1	0	0	0	0
	61–79	53	77.6	64.4	39.9	15.4	3.8	1.9	0	0
	0–5	6	49.9	16.6	16.6	16.6	16.6	0	0	0
October	6–10	42	58.8	54.0	35.0	18.3	11.2	2.4	2.4	2.4
	11–15	30	59.8	56.5	23.2	9.9	3.3	0	0	0
1971	16–20	51	50.9	49.0	31.4	13.8	4.0	0	0	0

Table III. Incidence of HI Antibody against Reovirus Type 1 (Lang strain) in Healthy Tokyoites

Bleeding	Age group	No. of sera tested	Cumulative positive rate at the titer of greater than							
			1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
			%							
	0–5	27	40.7	33.3	22.2	11.1	7.4	7.4	0	0
	6–10	59	27.0	18.7	13.6	6.8	1.7	0	0	0
June	11–15	47	34.0	17.0	6.4	2.1	2.1	0	0	0
	16–20	5	80.0	60.0	20.0	20.0	0	0	0	0
1972	21–30	57	65.1	52.8	24.7	15.9	7.1	3.6	1.8	1.8
	31–40	37	43.2	37.8	21.6	2.7	2.7	0	0	0
	41–60	50	60.0	44.0	24.0	12.0	4.0	0	0	0
	61–81	32	59.4	53.1	25.0	12.5	3.1	3.1	0	0
	0–5	7	14.3	14.3	14.3	14.3	0	0	0	0
October	6–10	41	48.8	43.9	31.7	19.5	2.4	0	0	0
	11–15	34	49.8	38.1	26.4	20.5	5.8	2.9	2.9	0
1972	16–20	55	63.6	49.1	34.6	21.9	5.5	0	0	0

Table IV. Incidence of HI Antibody against Reovirus Type 1 (72–351) in Healthy Tokyoites

Bleeding	Age group	No. of sera tested	Cumulative positive rate at the titer of greater than							
			1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024
			%							
	0–5	31	51.6	45.2	32.3	19.4	3.2	0	0	0
	6–10	64	34.4	28.1	23.4	15.6	6.3	1.6	0	0
June	11–15	62	46.8	35.5	22.6	17.7	8.1	1.6	0	0
	16–20	8	50.0	50.0	37.5	12.5	0	0	0	0
1971	21–30	46	60.9	47.8	30.4	10.9	4.3	2.2	0	0
	31–40	27	70.4	40.7	22.2	3.7	0	0	0	0
	41–60	45	42.2	28.9	6.7	0	0	0	0	0
	61–79	53	64.2	30.2	22.6	7.5	1.9	0	0	0
	0–5	27	40.7	37.0	29.6	18.5	11.1	3.7	3.7	0
	6–10	61	42.6	32.8	21.3	13.1	3.3	1.6	1.6	1.6
	11–15	50	48.0	40.0	28.0	14.0	6.0	2.0	2.0	2.0
June	16–20	5	80.0	80.0	40.0	40.0	20.0	0	0	0
	21–30	56	82.1	67.9	48.2	25.0	10.7	1.8	0	0
1972	31–40	37	64.9	54.1	24.3	13.5	0	0	0	0
	41–60	50	72.0	36.0	16.0	6.0	2.0	0	0	0
	61–81	27	77.8	66.7	48.2	18.5	3.7	3.7	3.7	0

才以上の年令層では大きくなっており，前述の抗体価分布の差異を，数的に表現することができた。

1971年および1972年のＨＩ抗体保有率の年次変化を，年令階層群別にみると，Lang 株では全年令階層を通

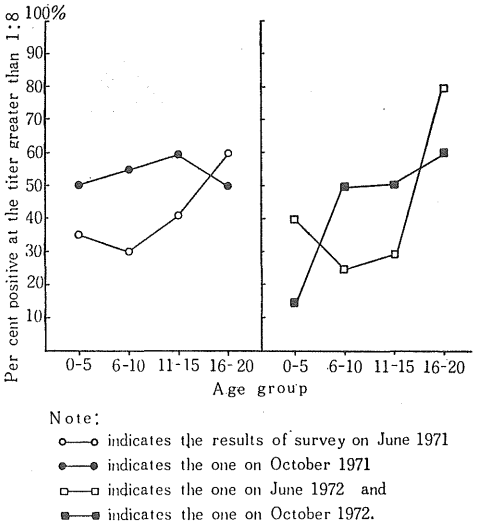


Fig. 1. Different incidence of Reovirus type 1 HI antibody observed on healthy Tokyoites, by their age.

じ目立った変化はなかったが，分離株では年令階層によって増減の変化がみられた。抗体保有率の上昇は年令の進んだ階層でみられた。

Lang 株の成績から，6月および10月の抗体保有を対比させて同一年次内の変動をみると図1のようになる。1971年には，0～5，6～10，11～15才で上昇がみられ，16～20才では低下した。1972年には，6～10，11～15才で上昇がみられ，0～5，16～20才では低下した。

Lang 株の成績からみると，レオウィルスに対するHI抗体保有率の消長は比較的短期間におこり，1年間隔の調査では，不適であると考えられる。また，レオウィルス感染の好発年令層が6～15才にあったと思われる。

血中抗体保有率の変動成績からは，レオウィルスの感染は主として夏季の候に発生するものと考えられる。

そしてこの推測は下水からのレオウィルス検出時期とは一致しない。

夏季の候には，下水の中に混在するエンテロウィルスの量が多くなり，増殖力のよいエンテロウィルスのみが検出され，混在するエンテロウィルスの量が少なくなる冬季にレオウィルスの検出が上昇して，前記の矛盾が出るものと思う。

都民血清650例について測定した Lang 株，および分離株抗原に対するHI価を対比させて表示すると，表Vのようになる。この成績から相関係数（γ）を算出すると0.59であって，両者に抗原的なずれのあることが，示唆された。

Table V. Correlation of HI Antibody Titers of Individual Serum, Culculated both by the Antigen of Lang Strain of Reovirus Type 1, and by an Isolate (72-351).

HI titer (Lang strain)	HI titer (an isolate 72-351)									sum
	<8	8	16	32	64	128	256	512	1024	
<8	227	45	20	10	7	3		1	1	314
8	15	14	14	8	1					52
16	20	26	29	27	17	4				123
32	11	16	21	24	12	4			1	89
64	7	1	8	11	7	8	1			43
128	1		3	4	8	2				18
256	1			1	3	1	2	1		9
512										
1024					1		1			2
sum	282	102	95	85	56	22	4	2	2	650

4 結　論

1971，1972両年に採取した健康都民血清計919件について，レオ1型ウイルスに対するHI抗体価を測定し，試験結果を統計的に分析して考察した。

1）抗体価≧1：8の抗体保有率は，Lang 株で若年令層（0～5，6～10，11～15才）27～45%，高年令層（16～20，21～30，31～40，41～60，61才以上）60～80%，分離株で若年令層34～50%，高年令層42～80%であった。

年令階層別にみた抗体価分布も差異があり高年令層では高い抗体価を示す血清の比率が若年令層に比べて低かった。

2）抗体保有率（≧1：8）は，1971年と1972年との間に，明らかな差を認めなかったが，同年次内の6月と10月を比較すると，両年とも6月より10月の方が，とくに6～10，11～15才において高率であった。

3）都民血清650件について測定した Lang 株，および分離株（72—351）抗原に対するHI価を対比させ相関係数を算出すると，0.59であった。

文　献

1）Sabin, A.B.: Science. 130, 1387, (1959)
2）Rosen, L.: Arch. Ges. Virusf. 13, 327, (1963)
3）macrae, A. D.: Ann, N. Y. Acad. Sci. 101, 455,

(1962)
4) Rosen, L.: Ann, N. Y. Acad. Sci, 101, 461, (1962)
5) Rosen, L.: Am. J. Hyg. 77, 29, (1963)
6) 富山哲雄：臨床検査, 16, 2, (1972)
7) Edwin, H. et al,: Diagostic Proc. for Viral and Rickettsial Diseases: American Public Health Association, INC, 259 (1964)
8) 岩崎謙二, 他：東京都立衛生研究所研究年報, 21, 9, (1969)
9) 岩崎謙二, 他：東京都立衛生研究所研究年報, 22, 35, (1970)
10) 岩崎謙二, 他；東京都立衛生研究所研究年報, 23, 49, (1971)

1972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研究

藪内　清*　坂井冨士子*　伊藤忠彦*
岩崎謙二*　根津尚光*　渡辺賢哉**
木下正彦**　永野清一郎**　加藤孝雄**

ECOLOGICAL SURVEY OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS AND SEROLOGICAL CONFIRMATION OF ITS INFECTION ON SUSPECTED PATIENTS IN TOKYO IN 1972

Kiyoshi YABUUCHI, Fujiko SAKAI, Tadahiko ITO,
Kenji IWASAKI, Naomitsu NEZU, Kenya WATANABE,
Masahiko KINOSHITA, Seiichiro NAGANO and Takao KATO

(Division of Virology, Department of Microbiology,
Tokyo Metropolitan Research Laboratry of Public Health)
(Metropolitan Tama Meat Inspection Station)

Summary

During the period from June through October 1972, 24 serum specimens, obtained from 10 suspicious patients of Japanese encephalitis (JE) infection, were studied serologically by means of CF and HI techniques. On the other hand, ecological survey of JE virus and of its mode of dissemination in Tokyo district were made by setting mosquito traps and sentinel rabbits at several stations. Simultaneously, observations were also made on the appearance of JE HI antibody in swine sera collected at the slaughter house at a week interval.

Results obtaind are summarized as follows:

1) None of the suspected patients were diagnosed as JE infection throughout the investigation period.
2) The year's first appearance of 2ME-sensitive JE antibody among swine population was observed on the specimens collected at 21st of August, after that maintained till 27th of November.
3) A total of 7 strains of JE virus was isolated from swine sera, throughout the investigation period. Among them, the latest isolatad was obtained from the serum collected at 30th of October.
4) All the sentinel rabbits placed at several stations had not show any response

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
**東京都多摩食肉衛生検査所

against JE virus, and no JE virus was isolated from the mosquito traped at the stations.

5) Lately, remarkable decrease was observed in the dissemination of the virus in Tokyo, however, continuous effort should be paied for the control of the disease, if there is some evidence on the dissemination of the virus in the district.

緒　　言

かつては本都においても多数の患者をだし，高い致命率と重度な後遺症のため，恐れられた日本脳炎（以下日脳と略す）も，長期にわたる強力な防疫対策推進の結果，1967年の43名を最後として急激に減少し，以後都内での感染を疑う真性患者の発生はみられないようになった。

しかし，われわれが1963年以来継続して実施している，本都における日脳の疫学的研究[1~10]の結果から推測すると，真性患者の発生こそないが，日脳ウイルスによる汚染そのものは毎年確実に存在していることが証明されている。また，全国的にみても，西日本には依然として真性患者の発生が認められ，その致命率も高く，特に老人層に多いことなど多くの問題を残している。

従って，本都においても，単に真性患者発生数のみにとらわれず，今後もその推移を厳重に監視してゆく必要があると考える。

本報は1972年度の調査研究成績である。

実験材料および方法

1) 患者血清

1972年6月29日から10月27日までの間に，都内各伝染病院で採血された疑似日脳患者血清10名分延24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

補体結合（CF）反応には，日脳中山株，ポリオ1型，2型，3型，コクサッキーB群1型，2型，3型，4型，5型，インフルエンザA型，B型，ムンプス，エコー6型，（以上自家製）アデノ（東芝化学製）およびヘルペス（予研製）の15抗原を使用し，赤血球凝集抑制（HI）反応には，日脳中山株，JaGAr 01株（以上武田薬品製）および麻疹（東芝化学製）の3抗原を使用した。

3) CF 反応

Kolmer の少量法[11]に準じたが，反応に関与する因子の量をさらに½に減量し，CF トレイを用いておこなった。

4) HI 反応

日脳については大谷[11]の方法に準じた。なお，ブタ血清については全期間にわたり，簡便法[12]による2メルカプトエタノール（2ME）処理をおこなって2ME感受性抗体を測定した。この簡便法によって2ME感受性抗体が証明されたブタ血清の中，10月以降に採血されたものについては，更にヨードアセトアミド透析処理法[12]をおこなった。この場合両者の成績が不一致の時は後者の成績を採用した。また，2ME感受性抗体とは，対照の抗体価にくらべ，2ME処理後の抗体価が8倍以上低下したものとした。

麻疹については豊島[13]の方法に準じ，マイクロタイター法によりおこなった。

5) ブタ血清

立川と場に出荷された，都内産で前年の夏を経験しない生後5～8カ月のと場ブタについて，7月から10月までは毎週，その他の月は月1回採血した。採血頭数は1回約50頭である。採取した血液は一夜と場内の4°C氷室に保存し，翌日アイスバックに入れて当所に送付され，血清分離後−20°Cに凍結保存した。

6) 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，6月下旬から10月上旬まで毎週1回（7月，8月は週2回）夕方17時から翌朝8時まで運転し，採集した力はクロロホルム麻酔したのち，分類し−70°Cに保存した。

7) おとり動物

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確めた個体を使用し，6月下旬から10月上旬にかけて毎週1回採血して，HI抗体価を測定した。

8) 日脳ウイルス分離同定試験

と場ブタ血清の一部およびコガタアカイエカの雌について，乳のみマウスを使用し，大谷ら[14]の方法に準じておこなった。

特に，ブタ血清の場合は，8月下旬から12月中旬までに採血したものの中で，HI抗体価<1:10のものについて，まずその4～5頭を1群とし，その血清を等量混合して乳のみマウスに脳内接種し10日間観察した。

この中発症をみとめた群については次代に継代した後同定し，さらにその群のブタ個々の血清について改めて初代から同様に分離試験をおこない，発症したものの2代脳を用いて同定し，ウイルス分離陽性ブタ個体を再確認した。なお，同定試験は JaGAr 01株，中山予研株免疫血清による HI および CF によった。

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

検索成績は Table 1 にしめす通りである。すなわち被検査者10名すべて血清学的に日脳感染は否定された。

また，当研究室保有のウイルス抗原の中，無菌性髄膜炎を起す可能性のあるものについても検査をおこなったが，いずれの抗原に対しても血中抗体の有意上昇はみとめられず，その病因を明らかにすることはできなかった。

Table 1. Results of Serological Test Made on JE Suspected Patients (1972)

No. [1972]	Name	Age	Sex	Date of bleeding [1972]	Days after onset	Antibody titers																		
						J E			C F															HI
						H I		C F	Polio			Coxsackie B					Influ-enza		Mumps	Adeno	ECHO·6	Herpes	Measles
						Naka-yama	JaGAr 01		1	2	3	1	2	3	4	5	A	B					
309	H.M	26	m	June 29	8	< 10	< 10	ND							N	D							
337	〃	〃	〃	July 3	12	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
339	〃	〃	〃	〃 10	19	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
411	〃	〃	〃	〃 12	21	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8
471	H.N	23	f	Sep. 28	7	N D		<4	N	D		<8	<8	<8	<8	<8	N	D	<8	ND	<8	<8	ND
474	〃	〃	〃	Oct. 7	16	< 10	< 10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	<8
490	〃	〃	〃	〃 27	36	< 10	< 10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	<8
431	I.S	16	m	Aug.10	14	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	ND
412	K.H	37	m	Oct. 9	111	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	ND
446	K.M	9	m	Aug.28	6	< 10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64	<8	<8	ND
419	K.N	25	f	Apr.24	15	< 10	10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	16
420	〃	〃	〃	May22	43	< 10	10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	16
421	M.M	25	m	July26	10	< 10	10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	16
422	〃	〃	〃	〃 29	14	< 10	< 10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	<8	<8	16
423	〃	〃	〃	Aug. 2	17	< 10	< 10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	ND
435	〃	〃	〃	〃 14	29	< 10	< 10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	16
434	K.K	18	f	Aug. 6	5	< 10	10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	ND
459	A.T	21	f	Aug.30	43	10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8	ND
460	〃	〃	〃	?	?	10	< 10	<4							N	D							
461	〃	〃	〃	?	?	10	< 10	AC							A	C							
462	〃	〃	〃	?	?	10	< 10	AC							A	C							
463	〃	〃	〃	?	?	10	< 10	<4	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	ND
507	S.R	44	m	Sep. 11	3	< 10	< 10	AC							A	C							
508	〃	〃	〃	〃 22	14	< 10	< 10	AC							A	C							

Keys for abbreviation : AC=Anti complementaly reactions,
ND=Not done, m=male, f=female.

2) と場ブタのHI抗体保有状況

1972年度立川と場において採血した都内産のブタの経時的日脳HI抗体保有状況は Table 2 にしめす通りである。

Table 2. Distribution of JE JaGAr 01 Antibody in Swine Sera, Collected at Tachikawa Slaughter House (1972)

Date of bleeding		HI antibody titer										Sum	Positive rate (≧1 : 10)	2ME-Sensitive rate		Virus* isolation
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	≧2560			Non-dialysed	Dialysed	
Jan.	24	42		1		1	1	2	1	1	1	50	16(%)	0(%)	(%)	
Feb.	21	45			1	1					4	51	12	0		
Mar.	13	50										50	0	0		
Apr.	24	48								1	1	50	4	0		
May	22	50										50	0	0		
June	26	50										50	0	0		
July	3	48										48	0	0		
	10	52										52	0	0		
	17	50										50	0	0		
	24	50										50	0	0		
	31	53										53	0	0		
Aug.	7	50										50	0	0		
	14	50										50	0	0		
	21	52			1							53	2	100		
	28	45			1					1	5	52	13	29		0/45
Sep.	4	47								1	2	50	6	66		0/47
	11	53										53	0	0		0/53
	18	47								1	2	50	6	33		2/47
	25	40			1		1				8	50	20	90		0/40
Oct.	2	36	2							1	12	51	29	20	13	1/36
	9	26	1	2			1				20	50	48	33	29	2/26
	17	35			1					1	13	50	30	27	13	0/35
	24	43	2	2						1	4	52	17	11	0	1/43
	30	37				1				1	13	52	29	27	27	1/37
Nov.	27	19						2	3	6	19	49	61	27	10	0/19
Dec.	18	26	1		2	1	2	1	1	2	16	52	50	38	0	0/26

* Virus isolations were limitedly made on the specimen which showed less than 1 : 10 in their HI titer.

すなわち，本年は8月21日採血分からはじめてHI抗体陽性で，かつ2ME感受性抗体保有の個体が現われ，以後漸時保有率は増加したが，その上昇程度は昨年と同様に非常に低率であった。また，10月以降に採血したものの中で，従来の簡便法により2ME感受性抗体陽性のものについては，更にヨードアセトアミド透析法を併用して確認したが，その結果，最も遅い時期では11月27日採血分まで2ME感受性抗体保有個体が見いだされた。

一方，ブタ血清からのウイルス分離試験では，9月18日採血分から2株，10月2日採血分から1株，10月9日採血分から2株，10月24日および10月30日採血分から各1株の計7株の日脳ウイルスを分離同定した。

これらのことから，少くとも10月末までブタ社会に日脳ウイルスが存在していたことが確認され，かつ2ME感受性抗体の保有状況から，更に11月上旬位までは新鮮感染が成立しているであろうことが推測される。この時期は，従来常識的に考えられていたものより相当に遅いものであり，注目に価すると考えるが，その本質については今回の調査からは究明できなかった。今後はこのような実験を冬期中も継続し，かつ多数のブタについて実施することで究明をはかりたい。

次に，本都における場ブタのHI抗体保有状況の年次別推移を比較するため，JaGAr 01株に対するHI価≧1:10の陽性率について図示すると Fig. 1 のようになる。

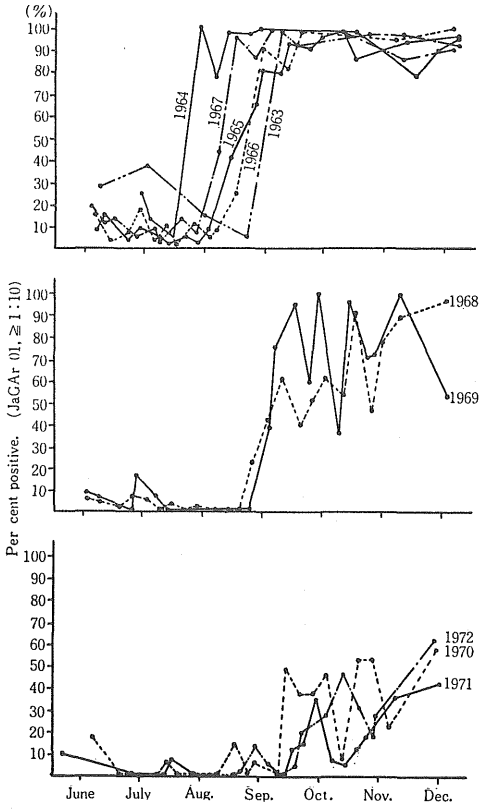


Fig. 1 Comparison of yearly incidence of JE HI antibody in swine sera collected at a slaughted house.

すなわち，1963年から1972年に至る各年の HI 抗体保有状況を大別すると，三つのパターンに分けることができる。

第1は，1963年から1967年にかけての型（Fig. 1 上）で，7月中旬から8月下旬にかけて急激な HI 抗体保有率の上昇がみられ，一度上昇すると1～2週間で90～100％にも達し，以後その高い保有率を12月頃まで維持する。この型をとった年はいずれも多数の真性患者（1963年16名，1964年64名，1965年31名，1966年35名，1967年43名）が発生している。また，抗体保有率の上昇時期の遅速は，真性患者数に良く反映し，早い時期に上昇した年程患者数が多くなっている。これらのことから，この5年間は本都における日脳ウイルス汚染が，短期間にしかも濃厚に存在したと推測される。

第2の型は，1968年および1969年にみられるもので（Fig, 2 中），両年共 HI 抗体保有率の上昇時期が非常に遅く9月に入ってからであり，その上昇程度も緩慢で，HI 抗体保有率の変動が激しくなっている。これは，ブタ社会での日脳ウイルス汚染度合が全般的には希薄になったが，なお時期，地区によって濃淡一様でないことを物語っているものと考える。

第3は1970年以降にみられるもの（Fig. 1 下）で，第2の型の傾向が更に進行したものと考えられ，HI 抗体保有率の上昇時期も更に遅く，その程度も50％前後にしかなっていない。

ちなみに1968年以降は，都内での感染を疑う真性患者の発生は皆無である。

Table 3. Number of *Culex tritaeniorhynchs Giles* Trapped and of its Results of JE Virus Isolation at the Stations

Date of collection (1972)		Station 1		Station 2							
		a		b		c		d		e	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
June	27	0	0			0	0	0	0	0	0
July	4	0	6(—)	0	9(—)	0	7(—)	0	1(—)	0	0
	11	30	10(—)	0	0	0	8(—)	0	12(—)	0	2 (—)
	18	1	2(—)			0	2(—)	1	1(—)		
	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7 (—)
	25	0	46(—)	0	4(—)	0	28(—)	0	37(—)		
	28	0	4(—)	2	18(—)					1	6 (—)
Aug.	1	0	7(—)	0	0	0	16(—)	0	13(—)	0	2 (—)
	4	33	19(—)	0	33(—)					0	1 (—)
	8	15	7(—)	0	45(—)	0	15(—)	0	4(—)	0	1 (—)
	11	0	4(—)	2	10(—)	1	9(—)	0	4(—)	0	2 (—)
	15	0	6(—)			0	6(—)	1	3(—)		
	18	0	1(—)	0	1(—)	0	1(—)	0	1(—)	0	1 (—)
	22	0	0	0	0	0	9(—)	0	7(—)	0	1 (—)
	25	0	3(—)			0	16(—)	0	7(—)	0	4 (—)
	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sep.	5	1	6(—)	0	10(—)	0	8(—)	0	0	0	1 (—)
	19	0	13(—)	0	4(—)	0	6(—)	0	4(—)	0	0
Oct.	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: Station 1, a =this laboratory's chicken pen; Station 2, b =Ueno zoo,s mule pen, c and d =horse pen, e =deer pen. Parenthesis indicate the result of virus isolation.

以上，と場ブタ血清の HI 抗体保有状況の年次別推移から推測すると，本都における日脳ウイルスの汚染度は年を追う毎に低くなってきていると言える。

3） コガタアカイエカの消長およびおとり動物の調査

都下多摩地区については，ブタ集団の HI 抗体保有状況を追跡することにより，当該地区の日脳ウイルス汚染状況をある程度は握できるが，ブタ集団から全く隔絶した都内23区においては不可能である。そこで，都区内の状況をみる手段として，当研究所鶏舎および上野動物園内の３カ所（ラバ舎，ウマ舎，シカ舎）にライトトップを設置してカを採集し，コガタアカイエカの消長とウイルス 分離試験をおこなうと共に（Table 3），おとりウサギをおいて，HI 抗体出現状況を調査した。

その結果，コガタアカイエカからは全期間にわたって日脳ウイルスは分離できず，おとりウサギについても全例抗体上昇を認めなかった。

結　　論

1972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調査をおこない，次の結論を得た。

1） 被検者10名中血清学的に真性日脳と診断されたものは皆無であった。

2） と場ブタ血清の日脳 HI 抗体保有状況調査では，８月21日採血分からはじめて２ME 感受性抗体保有個体が見いだされ，以後11月27日採血分のものまで続いた。

3） と場ブタ血清から，７株の日脳ウイルスを分離同定した。この中最も遅い時期のものは，10月30日採血分からの分離例であった。

4） おとり動物については，全例全期間にわたって日脳 HI 抗体価の上昇はみられず，またコガタアカイエカからもウイルスは分離されなかった。

5） 本都での感染を疑う真性日脳患者は，ここ数年発生がみられないが，以上の研究結果から推測すると，ウイルス汚染そのものは依然として存在しているので，今後もこの様な疫学的調査を続ける必要がある。

謝　辞：本研究をおこなうに当り，多大のご援助とご協力を賜った，東京都衛生局防疫課ならびに東京都上野動物園飼育課の関係各位に深甚の謝意を表する。

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） 藪内　清，他：都衛研研究年報，(20)，39(1968)
8） 藪内　清，他：都衛研研究年報，(21)，19(1969)
9） 藪内　清，他：都衛研研究年報，(22)，57(1970)
10） 藪内 清，他：都衛研研究年報，(23)，35(1971)
11） 日本公衆衛生協会：微生物検査必携，(1966)
12） 国立予研ウイルス第４室：日本脳炎流行予測事業における血清の２メルカプトエタノール処理方法について，(1971)
13） 臨床ウイルス談話会：ウイルス実験室診断法，(1964)
14） 国立予研学友会：ウイルス実験学各論，(1967)

1973年初頭東京都内に発生したA型インフルエンザとその後発生したB型インフルエンザの検索成績

坂井冨士子* 伊藤忠彦* 藪内 清*
岩崎謙二* 根津尚光*

STUDIES ON PREVALENCE OF INFLUENZA OCCURED IN TOKYO IN EARLY 1973

Fujiko SAKAI, Tadahiko ITO, Kiyoshi YABUUCHI,
Kenji IWASAKI and Naomitsu NEZU

(Division of Virology, Department of Microbiology,
Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health)

Summary

During the period from October 1972 through July 1973, a total of 420 specimens consiting of 224 throat washings and 196 paired sera of the patients was examined for the presence of influenza viruses and of antibody responses.

In addition to this, incidence of HI antibodies against several known influenza virus strains in healthy Tokyoites was also studied for the clarification of the influenza-like infection in the community.

Results obtaind are as follws:

1) During the period from January through March 1973, a total of 64 strains of A/Hong Kong type viruses was isolated from the patients involved in the 23 outbreaks in Tokyo.

2) Through the results of cross HI test made on the new isolates and former A type isolates. It was found that were considerable degree of antigenic variations on the newly isolated ones. It was also proved by the results of HI test which made on the paired sera of the patients.

3) Monthly incidence of A type antibody in healthy Tokyoites has revealed that the epidemic was lasted at the beginning of March and replaced by the new B type epidemics.

4) As for the B type virus isolation, a total of 24 strains has been isolated from April to as of 4th of July 1973, and all of them without only one were found to be a mutant of previously existed B type viruses.

5) Among the B type isolates, one strain was obtained from autopsy case who died of

*東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科

pnuemonia.

6) CF test made on 196 paired sera of patients has clarified that 78 individuals were found to be suffering from A type virus infection and 51 from B type virus infection respectively.

緒　言

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）ウイルスを主病因とする集団かぜが発生し，著者ら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。前報[1]においては1972年3月までの検索成績について報告した。今回はそれ以降の成績について報告するが，Aホンコン型「イ」の集団発生は1973年1月より認め，これは同型ウイルスによる5回目の流行にあたり，分離ウイルスのニワトリ免疫血清による交叉赤血球凝集抑制（以下 HI と略す）試験および患者血清の HI 試験から同ウイルスの抗原変異について若干興味ある知見を得た。また東京都においてはAホンコン型「イ」流行終熄後時ならぬB型「イ」の流行にみまわれ，集団発生の届出数および7月4日現在における当研究所のウイルス分離から夏期に入ってもなお流行が継続しているものと思われ，著者らは現在それらの検査およびその成績の解析につとめている。今回のB型分離株は後述する検査成績から抗原的にB型としてはこれまでにない極端な変異株で，真夏の間はともかくとして，秋以降再びかなりの流行が危惧されている。

検査材料および方法

1）被検血清：都内各地区の主として小，中学校児童，生徒を対象として合計47集団から採取した。所轄保健所が一集団につき平均5名の患者を選び出し，急性期および回復期に採血し実験に供した。血清は検査時まで −20°C に凍結保存した。都内居住成人血清は患者とは関係なくワッセルマン反応検査のため当研究所に送付された血清について地域的偏りのないようにサンプリングを行ない毎月約160件について検査を行なった。

2）血清検査：赤血球凝集抑制（HI）試験は微生物検査必携[2]に準じたが，反応はトレイで行ない一部「イ」，パラ「イ」検査のペア血清においてマイクロタイター法で行なった。被検血清はRDE処理し，2倍階段希釈してその0.1m*l*に 4 HAU/0.1m*l* のウイルス抗原を加えて混和室温1時間放置後1％ニワトリ赤血球浮遊液0.2m*l*を加え，更に室温1時間静置してその血球凝集像により判定した。またマイクロタイター法においては血清希釈はピペットを用い普通のトレイで母希釈をおこない各段階の希釈血清を0.025m*l*のドロッパーで1滴づつ反応させる抗原数に応じてマイクロトレイ（LINBRO IS—MRC—96）に移し，抗原 4 HAU/0.025m*l* 0.5％ニワトリ赤血球0.05m*l* の反応系でおこなった。これら HI 試験に使用した抗原は「イ」A型，「イ」B型，パラ「イ」1型（HA 2），パラ「イ」2型（CA），パラ（イ）3型（HA 1）で，「イ」A型は A/愛知2/68，A/福岡1/70，A/千葉5/71，A/東京494/72，および今回の分離株である A/東京452/73，A/東京458/73，B型はB/鹿児島1/68，B大阪2/70，およびB/東京53/73，B/東京63/73，B/東京69/73で，A/愛知2/68 のみは武田薬品製で，パラ「イ」の抗原はすべて東芝化学製であり，その他はすべて自家製のものである。補体結合（以下 CF と略す）反応は反応に関与する因子の量を Kolmer の小量法をさらに$\frac{1}{2}$に減量し，CF 用トレイを用いて行なった。使用した抗原は「イ」A—S，「イ」B—S，およびアデノ（3型）の3抗原である。血清学的診断基準は微生物検査必携[2]によった。すなわち HI 試験，CF 反応とも回復期血清の抗体価が急性期のそれに比して8倍以上であれば，その抗原と同型ウイルスの感染確実と判定し，4倍の場合は凝い，2倍または血清採取時期が適切であったにもかかわらず上昇しないものは陰性と判定した。

3）ウイルス分離検体：急性期患者のうがい水と死亡例の肺および気管支を実験に供した。うがい水は急性期患者に約 10m*l* の滅菌生理食塩水でよくうがいをさせ，これを等量のブイヨンを入れた試験管にうけ，直ちに氷漬けにして当研究所に急送した。また死亡例の肺および気管支もうがい水同様剖検後速やかに採取し氷漬けにして急送した。

4）ウイルス分離試験：うがい水はそのまま，3000 rpm 30分間遠心し，その上清をとり，肺および気管支は病変部の数カ所から採取した組織片を乳鉢内で細断し，滅菌砂を入れよく磨砕し，ブイヨンを入れ20％乳剤とした。このような剖検材料の場合は一般に細菌汚染が甚だしいので乳剤は 3,000rpm 5分間かるく遠心

Table 1. Results of Laboratory Test Made on Specimens, Collected during the period October 1972–March 1973 from Patient of Influenza-like in Tokyo

Group No.	Specimen recieved on	Place of occurence	No. of throat washings recieved	No. of individuals confirmed by virus isolation			No. of individuals confirmed by CF Test			Laboratory diagnosis
				*Ful-type A Hong Kong	*Ful-type B	adeno	*Ful-type A	*Ful-type B	adeno	
1	Oct. 20	Mitaka	3	0	0	0	0	0	0	unknown
2	〃 27	Nakano	5	0	0	5	0	0	4	adeno
3	Nov. 11	Mitaka	4	0	0	0	0	0	0	unknown
4	〃 21	Akabane	4	0	0	0	0	0	0	〃
5	Jan. 11	Hachiōji	5	4	0	0	4	0	0	*Ful. type A
6	〃 12	Suginamihigashi	5	4	0	0	5	0	0	〃
7	〃 20	Shinjuku	5	2	0	0	5	0	0	〃
8	〃 22	Jōtō	5	1	0	0	1	0	0	〃
9	〃 22	Itabashihigashi	5	1	0	0	3	0	0	〃
10	〃 23	Toshimanagasaki	5	5	0	0	5	0	0	〃
11	〃 23	Ushigome	5	4	0	0				〃
12	〃 23	shiba	5	2	0	0	4	0	0	〃
13	〃 24	Mukōjima	5	1	0	0	1	0	0	〃
14	〃 25	Katsushika	5	3	0	0	4	0	0	〃
15	〃 25	Umegaoka	5	3	0	0	3	0	0	〃
16	〃 25	Shibuya	4	2	0	0	4	0	0	〃
17	〃 30	Takaido	4	2	0	1	4	0	1	*Ful. type A and adeno
18	〃 31	Yukigaya	5	3	0	0	2	0	0	*Ful. type A
19	〃 31	Nakanokita	5	3	0	0				〃
20	〃 31	Machida	4	3	0	0	4	0	0	〃
21	〃 31	Nakano	11	5	0	0	10	0	0	〃
22	Feb. 1	Toshimaikebukuro	5	3	0	0	4	0	0	〃
23	〃 1	Nerima	6	3	0	0	4	0	0	〃
24	〃 6	Akabane	5	1	0	0	4	0	0	〃
25	〃 6	Kinuta	5	2	0	0	3	0	0	〃
26	〃 6	Shitaya	4	4	0	0	4	0	0	〃
27	Mar. 2	Tanashi	5	3	0	0				〃
Sum			134	64	0	6	78	0	5	

Note: *indicate influenza

したのち上清を 8,500rpm 20分間遠心し，さらに0.45 μのメンブランフィルターでろ過した。うがい水上清および肺・気管支のろ液はペニシリン，ストレプトマイシンをそれぞれ 500u/ml 250γ/ml になるように加え，ふ化鶏卵（9～10日卵）羊膜腔，漿尿腔，HeLa S 3，FL，Hep 2，Vero518，Vero#462の継代細胞およびMK初代培養細胞に接種した。分離培養試験は3代まで継代培養した。検体を接種したふ化鶏卵は4～5日間 35°C に培養後，漿尿液と羊水につきニワトリ赤血球凝集反応によりウイルスの存否を確めた。また組織培養においては連日 CPE の出現を観察した。またMK初代細胞においては7日後にモルモット赤血球の吸着の有無を確かめウイルスの存否を確かめた。

実験成績および考察

1972年10月より翌年3月までに27集団計134例について検索をした。検索の総括成績を Table 1 に示した。すなわち1972年は年末までに4集団について検索をおこなったが，10月の1集団は被検者5名の全例よりアデノ3型ウイルスを分離し，かつ血清学的にも抗体の有意上昇を認め，アデノウイルスによる集団かぜであることが判明したが，他の3集団についてはその原因を明らかにすることが出来ず，「イ」は証明されなかった。翌1973年に入ってからは1月に17集団，2月5集団，3月1集団，計23集団112例について検索した。1月11日に検体が送付された八王子保健所管内の由井中学校を幕開けにこれらすべての集団から「イ」Aホンコン型ウイルスを計64株分離し，かつ血清学的にも78例の「イ」A型の感染を認め，今冬期多発した集団かぜの主要因は「イ」Aホンコン型であることがわかった。No17 の集団では被検うがい水 4例中2例より「イ」Aホンコン型ウイルスが分離され，血清学的には4例ともA型に有意上昇を認め，集団としてはA型「イ」であったが，「イ」ウイルスの分離されなかった1例よりはアデノ3型ウイルスが分離され，血清学的にもアデノウイルスに対して抗体上昇を示し，アデノウイルス感染者が混在していたことを認めた。この他にもウイルスは分離されなかったが，数例アデノウイルスに対する CF 抗体価の高いものがあり，Aホンコン型「イ」の流行集団の中にアデノウイルス感染者が若干あったことがうかがわれた。また集団例とは別に患者死亡例の肺より2例Aホンコン型「イ」ウイルスを分離した。なおこの期間中それ以外のウイルスは分離されておらず，また HI 試験によるパラ「イ」の抗体の有意上昇例は1例もなかった。以上が今回の検索状況の概要である。これら「イ」ウイルス分離株はすべてニワトリ免疫血清による HI 試験でAホンコン型と同定されたものである。すなわち既知Aホンコン型免疫血清（A/愛知2/68，A/福岡1/70，A/千葉5/71）によく抑制され，それ以前のAアジア型株およびB型株の免疫血清では抑制されず容易に同定することが出来た。しかしながら同定試験に際して，今回の分離株はすべて上記既知Aホンコン型株の免疫血清に対してそれぞれ免疫株ホモの抑制価より4倍ないし16倍低い価を示した。そこでこのことが単に血清に対する分離株の Avidity が低いことを示しているのか，あるいは抗原変異によるものかを知るため分離株の一つであるA/東京452/73株とA/東京458/73株で免疫血清を作り，交叉 HI 試験をおこなった。その結果は Table 2 に示した通りで，従来の株は分離株の免疫血清に対して免疫株ホモの抑制価より16倍ないし128倍低い抑制価を示し，前述した Avidity では説明出来ず，抗原分析にあまり鋭敏でないとされているニワトリ免疫血清でも若干の抗原変異を認めることが出来た。Aホンコン型ウイルスは1968年わが国に侵入当初の株と昨年までの株には僅かな抗原変異が認められていることは前報[1]においても報告したが，今回はそれをやや上まわる変異が認められたわけである。次にこの様な抗原的差異が患者血清にどの様に反映するかを見るために患者約80例のペア血清について HI 試験を行なった。その成績の一部を Table 3 および Table 4 に示した。患者の大部分は Table 3 のごとく今回の分離株に対しても，また従来のAホンコン型株に対しても回復期血清の HI 価はよく上昇するが，分離株に対する HI 価は従来の株に対する HI 価と同じかもしくはむしろそれより低く，この様な患者血清の間では抗原変異は反映されるに至らなかった。しかしこれらはすべて急性期において多少ともAホンコン型に対する HI 抗体をもっている場合である。Table 4 に示した No 1～4 は某病院の結核病棟で発生した成人の例であるが，調査した結果近年「イ」様の熱型等を示したことがなく，また No 5 の学童1例を含めて「イ」のワクチンを一度も接種したことがなく，急性期において HI 抗体を全くもっていない。すなわちこのことからAホンコン型「イ」の初感染と推測された。これらの例では回復期における HI 価は従来の株に対するより今回の分離株に対する方が高く，この様な初感染と思われる例ではニワトリ免疫血清で認められた抗原変異がすなおに反映することが認められた。患者血清の抗体上昇におけるこの二つのパターンの違いは個人の「イ」Aホン

Table 2. Serological Characterization of A Type Influenza Viruses by Hemagglutination-Inhibition Test with Chicken Immune Sera

Antiserum (Chicken No.)	Antigen (Strain)	Reference antigen				Laboratory isolates				
		A/Aichi2/68	A/Fukuoka1/70	A/Chiba5/71	A/Tokyo494/72	A/Tokyo452/73	A/Tokyo458/73	A/Tokyo621/73	A/Tokyo644/73	A/Tokyo645/73
161	A/Aichi2/68	4096	4096	2048	4096	512	512	512	512	512
201	A/Fukuoka1/70	4096	4096	2048	2048	1024	1024	1024	1024	1024
211	A/Chiba5/71	2048	1024	8192	2048	512	1024	1024	1024	1024
213	A/Tokyo494/72	8192	4096	4096	8192	1024	1024	1024	1024	1024
217	A/Tokyo452/73	512	256	64	128	8192	8192	8192	8192	8192
219	A/Tokyo458/73	64	64	<64	64	1024	1024	1024	1024	1024

Table 3. Antibody Response of the Patients against Several A Type Influenza Viruses in 1973

Patieny No.	Specimen No.	Date of bleeding (1973)	Virus antigen used						
			A/Aichi 2/68	A/Fukuoka 1/70	A/Chiba 5/71	A/Tokyo 494/72	A/Tokyo 452/73	A/Tokyo 458/73	B/Ōsaka 2/70
1	72-595	Jan. 25	1024	512	256	256	256	256	512
	72-705	Feb. 8	4096	8192	2048	2048	2048	2048	1024
2	72-596	Jan. 25	512	512	256	256	128	128	256
	72-706	Feb. 8	1024	1024	1024	1024	1024	1024	256
3	72-597	Jan. 25	128	128	128	128	64	64	128
	72-707	Feb. 8	1024	1024	1024	512	512	512	256
4	72-598	Jan. 25	512	256	512	256	256	256	1024
	72-708	Feb. 8	1024	1024	2048	1024	1024	1024	512
5	72-599	Jan. 25	512	512	512	256	256	256	1024
	72-709	Feb. 8	1024	1024	1024	512	512	512	512

Table 4. Antibody Response of the Patients against Several A Type Influenza viruses in 1973

Patient No.	Specimen No.	Date of bleeding (1973)	Virus antigen used						
			A/Aichi 2/68	A/Fukuoka 1/70	A/Chiba 5/71	A/Tokyo 494/72	A/Tokyo 452/73	A/Tokyo 458/73	B/Ōsaka 2/70
1	72-615	Jan. 25	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	72-701	Feb. 8	128	64	16	64	512	512	<16
	72-772	Mar. 16	128	128	64	128	512	512	<32
2	72-616	Jan. 25	<16	<16	<16	<16	<16	<16	512
	72-702	Feb. 8	128	128	32	128	1024	1024	512
	72-773	Mar. 16	1024	512	512	512	≧8192	4096	512
3	72-617	Jan. 25	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	72-703	Feb. 8	128	128	<16	128	128	128	<16
	72-774	Mar. 16	128	64	32	32	128	128	<32
4	72-618	Jan. 25	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	72-704	Feb. 8	512	512	256	256	2048	2048	<16
	72-775	Mar. 16	512	512	256	256	2048	2048	<32
5	72-627	Jan. 31	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
	72-722	Feb. 13	1024	1024	256	512	4096	4096	<64

コン型ウイルスに対する既往歴あるいはワクチン歴の差によるものではないかと考える。以上はすべて当研究所に検査依頼を受けたものについての個人レベルでの成績であるので，これらの結果から直接都内の「イ」流行規模を考えることは出来ない。著者[3-6]らはこれまでも度々血清疫学的解析により「イ」流行の実態は握につとめてきた。今回も都民の型別血中 HI 抗体保

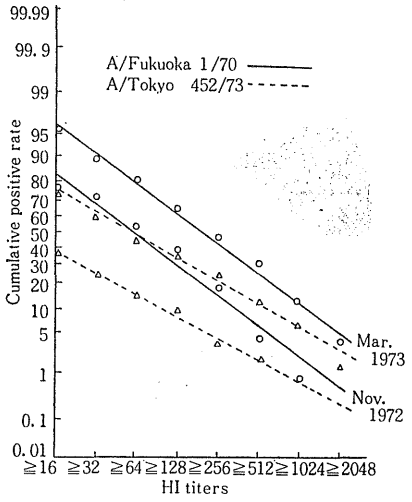


Fig. 1 Incidence of HI antibodies against A type influenza virus strains in healthy Tokyoites.

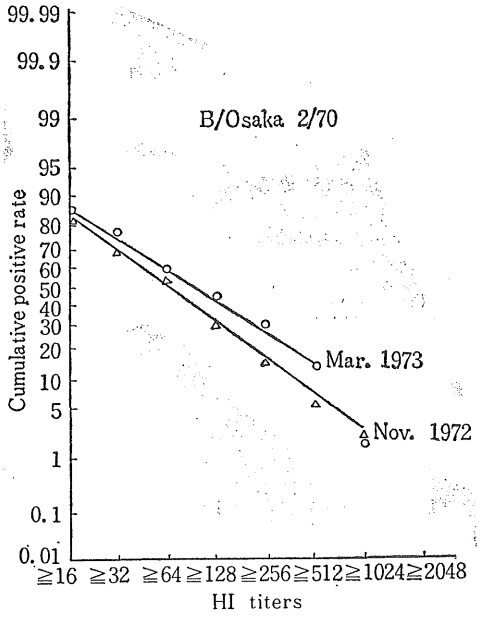


Fig. 2 Incidence of HI antibodies against B type influenza virus strain in healthy Tokyoites.

有状況の変動をみることにより「イ」流行の規模，期間等を推測するべく，実験をおこなった。Fig 1 および Fig 2 は正規確率紙を用い，縦軸に陽性率を，横軸に抗体価をとり，1972年11月と73年３月に採取した血清について行なった HI 試験の結果を示したものである。Fig 1 は1972年度の「イ」ワクチン株の一つであるA/福岡1/70株と73年の分離株であるA/東京452/73株で測定したものである。12月，１月，２月は図示していないが，11月から３月（学級閉鎖等の殆んどなくなった時点）までの間は両株とも徐々に平行的な上昇を示し，短い期間内に陽性率の急激な上昇が見られなかったことから特に爆発的な流行ではなかったと考える。またこの２つの株を比較すると福岡株の方が累積陽性率の絶対値は高いが，11月から３月にかけての上昇率は分離株である A/東京452/73 株の方が大きく，ここでも両者の抗原的差異が若干反映されていることがうかがわれた。さらにその後４月末の血清について測定したところ，その結果は３月末のそれと殆んど変動がなかった。また Fig 2 にはB型の同期間内の抗体保有の変動を示したが，この間殆んど変動が見られなかった。もちろんこのような方法では散発的な発生例を捕捉することはできないが，この間にいわゆる流行的規模の発生はなかったものと思う。以上のべてきたことから今冬期東京都に流行したインフルエンザはAホンコン型であり，３月上旬をもって一応終熄したことが血清疫学的な面からも考察された。

その後４月下旬より再び集団かぜが多発し始め，７月に入った現在いまだ終熄せず検索を続けている。検索概要は Table 5 に示した。４月21日に蒲田保健所管内の道塚小学校より送付された検体をはじめとし，７月４日現在まで20集団90例を検索した。その最初の道塚小学校の検体では６例中３例にアデノ３型ウイルスが分離され，血清学的にも２例を含め５例がアデノウイルス感染症と診断された。しかしその後４月24日に送付された No 2 の集団について検索をおこない，ウイルスは分離されなかったが，血清学的に「イ」B型における CF 抗体価の有意上昇が４例中３例に認められ，「イ」B型の感染を確認した。次いで５月９日に送付された No 3 の集団で「イ」B型ウイルスが３例中２例から分離され，それ以後７月４日送付の検体まで検索した結果「イ」B型ウイルスを24株分離した。分離されたウイルスは型のごとく既知ニワトリ免疫血清による HI 試験で同定した。もちいた免疫血清はA型としてA/愛知2/68株，A/東京452/73株，B型としてB/鹿児島1/68株およびB/大阪2/70株である。その

Table 5. Results of Laboratory Test Made on Specimens, Collected during the Period April 1973–July 1973 from Patients of Influenza-like in Tokyo

Group No.	Specimen recieved on (1973)	Place of occurence	No. of throat washings recieved	No. of individuals confirmed by virus isolation			No. of individuals confirmed by CF test			Laboratory diagnosis
				*Ful.type A Hong Kong	*Ful.type B	Adeno	*Ful.type A	*Ful.type B	Adeno	
1	Apr. 21	Kamata	6	0	0	3	0	0	5	adeno
2	〃 24	Setagaya	4	0	0	0	0	3	0	*Ful. type B
3	May 9	Nakanokita	3	0	2	0	0	3	0	〃
4	〃 11	Musashino	3	0	1	0				〃
5	〃 12	Tamagawa	5	0	0	0	0	1	0	〃
6	〃 12	Shitaya	5	0	1	0	0	4	0	〃
7	〃 15	Umegaoka	6	0	3	0	0	3	0	〃
8	〃 15	Tamagawa	4	0	1	0	0	1	0	〃
9	〃 16	Yukigaya	4	0	0	0	0	2	0	〃
10	〃 16	Shibuya	5	0	1	0	0	4	0	〃
11	〃 16	Mitaka	5	0	0	0	0	4	0	〃
12	〃 17	Kodaira	5	0	3	0	0	3	0	〃
13	〃 18	Nerima	5	0	3	0	0	4	0	〃
14	〃 18	Katsushika	5	0	0	0	0	4	0	〃
15	〃 22	Toshimaikebukuro	5	0	0	0	0	4	0	〃
16	〃 22	Kamata	4	0	0	0	0	0	1	adeno
17	〃 30	Senju	4	0	0	0	0	3	0	*Ful.type B
18	June 6	Arakawa	4	0	2	0	0	2	0	〃
19	〃 11	Shitaya	3	0	3	0	0	2	0	〃
20	Jnly 4	Kōjiya	5	0	4	0	0	4	0	〃
Sum			90	0	24	3	0	51	6	

Note : *indicate influenza

結果はすべて抗A型血清には抑制されなかったが，抗B型血清に対しては集団No 6 の 1 株（B/東京63/73）のみは鹿児島1/68株，大阪2/70株のいずれの血清に対してもホモの株より 4 倍程度低いが，よく抑制された。集団No 3，4，7，の 4 株は鹿児島 1/68 株の血清には全く抑制されず（<32倍）大阪2/70株の血清に対してのみホモの価より32倍ないし64倍低い抑制価しか示さず，辛ろうじてB型と同定出来る程度であった。

73年 4 月以降のB型「イ」流行において抗原的に従来のB型ウイルスに極めて近い株と，かなり変異した株の両方の存在が示唆され，分離株の免疫血清の作成を開始すると同時にB/東京63/73株および免疫血清に対して同じ態度を示した 4 株のうちB/東京53/73株とB/東京69/73株で抗原をつくり，過去の「イ」B型患者と今回すでに得られた患者のペア血清につき HI 試験をおこなって，その解析を試みた。Table 6 は1971年 3 月の患者であり，Table 7 は今流行期に得られた患者の血清である。結果は極めて明瞭に従来の株に近い株の存在と変異株の出現を示している。すなわち Table 6 に見られるように B/東京63/73株に対して1971年の患者血清の HI 抗体はB/鹿児島1/68株，B/大阪2/70株と同様によく上昇するが，B/東京69/73株に対しては有意上昇が見られない。逆に Table 7 の今回得られた血清ではB/東京53/73株およびB/東京69/73株に対してはよく上昇するが，他のいわゆるB旧型株に対してはほとんど上昇しない。しかも従来の株に対して急性期にかなり高い HI 抗体をもっている血清でも，B/東京53/73株あるいはB/東京69/73株に対してはほとんど抗体をもっておらず，以上のことからこの二つの株は従来の株とは抗原的にかなり異っている

Table 6. Antibody Response of the Patients against Several B Type Influenza Viruses Observed in 1971

Patient No.	Specimen No.	Date of bleeding (1971)	Virus antigen used				
			A/Tokyo 452/73	B/Kagoshima 1/68	B/Ōsaka 2/70	B/Tokyo 63/73	B/Tokyo 69/73
1	70-965	Mar. 2	16	512	256	128	<16
	70-978	Mar. 18	16	≧8192	≧8192	≧8192	32
2	70-966	Mar. 2	16	256	64	32	<16
	70-979	Mar. 18	32	≧8192	4096	512	<32
3	70-967	Mar. 2	64	256	128	64	<16
	70-980	Mar. 18	128	≧8192	≧8192	4096	64
4	70-968	Mar. 2	64	256	128	32	<16
	70-981	Mar. 18	64	≧8192	≧8192	4096	16
5	70-969	Mar. 2	16	512	256	64	<16
	70-982	Mar. 18	16	≧8192	4096	1024	<16

Table 7. Antibody Response of the patients against Several B Type Influenza Viruses Observed in 1973

Patient No.	Specimen No.	Date of bleeding (1973)	Virus antigen used					
			A/Tokyo 452/73	B/Kagoshima 1/68	B/Ōsaka 2/70	B/Tokyo 63/73	B/Tokyo 53/73	B/Tokyo 69/73
1	73- 39	Apr. 24	64	4096	1024	512	ND	16
	73- 55	May 8	64	≧8192	2048	1024	ND	128
2	73- 62	May 9	4096	4096	1024	512	ND	<16
	73-135	May 18	≧8192	≧8192	2048	512	ND	1024
3	73- 86	May 15	512	ND	1024	256	<16	16
	73-162	May 29	512	ND	1024	256	1024	8192
4	73- 89	May 15	1024	ND	512	128	<16	<16
	73-165	May 25	1024	ND	8192	1024	512	1024
5	73-117	May 17	512	ND	2048	256	<16	ND
	73-209	Jun. 1	512	ND	2048	512	2048	ND
6	73-114	May 16	1024	ND	1024	256	<16	16
	73-179	May 29	1024	ND	1024	256	64	64

ND indicates test was not done.

Table 8. Serological Characterization of B Type Influenza Viruses by Hemagglutination-Inhibition Test with Chicken Immune Sera

Antiserum (Chicken No.)	(Strain)	Reference antigen		Laboratory isolates							
Antigen		B/Kagoshima1/68	B/Ōsaka2/70	B/Tokyo63/73	B/Tokyo53/73	B/Tokyo69/73	B/Tokyo142/73	B/Tokyo143/73	B/Tokyo144/73	B/Tokyo171/73	B/Tokyo172/73
179	B/Kagoshima1/68	4096	2048	1024	<32	<32	<32	<32	<32	32	<32
204	B/Ōsaka2/70	4096	8192	2048	256	128	128	256	128	256	256
223	B/Tokyo63/73	512	1024	512	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32
221	B/Tokyo53/73	<32	<32	<32	1024	512	1024	1024	512	1024	1024

ことが認められた。また Table 5 に示す通り今回の集団発生から24株の「イ」B型ウイルスを分離しているが B/東京63/73株 以外は免疫血清に対してすべてB/東京53/73株 あるいは，B/東京69/73株 と同じ態度を示し，変異株のグループに属するものと思われた。さらにB/東京63/73株とB/東京53/73株でニワトリ免疫血清を作り，従来の株と交叉 HI 試験をおこなった。その成績は Table 8 に示す通り，患者血清で得られた事実をさらに確認することが出来た。しかし Table 5 にあるようにウイルスが分離されず CF 抗体の上昇によってのみ診断した例も多く，これらがすべていわゆる変異株に属するB型ウイルスによるものであるかどうか，すなわち今流行期においていわゆる従来のB型株と抗原的に近似しているウイルスは集団 No 6 のみで他の集団に混在していなかったかどうかはさらに検討を進めないと断定出来ない。次に集団発生とは別に今流行期に入って，病理所見から「イ」様肺炎の疑いをもたれた剖検例の肺 6 例について監察医務院より依頼をうけ，ウイルス分離試験をおこなった。その結果1例のみであるが「イ」B型ウイルスを分離することが出来た。これまで「イ」A型ウイルスを患者死亡例の肺より分離した報告例は数多くあるが，著者らの知る範囲ではB型ウイルスの報告例はなく，特記すべきものと考える 。しかしただ分離し得たという事実を見たのみで，このことをただちに今回のB型ウイルスの毒性と結びつけて考えるには至っていない。

結　論

1972年10月から1973年7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おこない，また一方成人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おこなった結果次の結論を得た。

1）1972年末にはインフルエンザは証明されず，1973年1月から3月までに検索した23集団すべてから各1株以上，合計64株のインフルエンザAホンコン型のウイルスを分離した。

2）Aホンコン型ウイルスは流行を重ねるにつれて年々少しづつ抗原変異が認められているが，今回の分離株にはニワトリ免疫血清による交叉 HI 試験の結果からこれまでのを若干しのぐ抗原変異が認められた。また患者ペア血清について HI 試験をおこなうと，急性期に抗体のあるものの回復期血清の HI 価は今回の分離株と従来のAホンコン型株との間に差は認められなかったが，今回Aホンコン型ウイルスに対して初感染と思われる例では分離株に対してより高く HI 価が上昇し，患者血清においても抗原変異が認められた。

3）都民のインフルエンザAホンコン型ウイルスに対する HI 抗体保有状況の逐月変動成績からみて今冬期のAホンコン型インフルエンザの流行は3月上旬をもって終熄したと認められた。

4）Aホンコン型インフルエンザ流行の終熄後，4月下旬より再び集団かぜが多発し，その主病因はインフルエンザB型ウイルスであることがわかった。このB型ウイルスは1971年のB型患者と今回の患者ペア血清の HI 試験およびニワトリ免疫血清による交叉 HI 試験の結果これまでにないB型変異株であることを確認した。今回のB型インフルエンザの流行は夏期に入ってもなお続いており7月4日の患者からもウイルスを証明している。

5）今回のB型流行期間中に1例のみであるがインフルエンザ様肺炎患者死亡例の肺より本型ウイルスを分離した。

文　献

1　坂井冨士子，他：都衛研年報（23）41，(1971)
2　日本公衆衛生協会；微生物検査必携，1966
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：日伝染会誌，40，(5)，129，(1966)
5　坂井冨士子，他：都衛研年報，(20)，53，(1968)
6　坂井冨士子，他：都衛研年報，(21)，15，(1969)

リノール酸メチル中のα-トコフェロールおよびアスコルビン酸の酸化分解について

松本　茂*　中山京子*　松本あき子*
鈴木侑子*　片羽久恵*

OXIDATIVE DESTRACTION OF α-TOCOPHEROL AND ASCORBIC ACID IN METHYL LINOLEATE

Shigeru MATSUMOTO, Kyoko NAKAYAMA, Akiko MATSUMOTO, Junko SUZUKI and Hisae KATABA

(Division of Pharmaco- Chemistry, Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

The authors have studied antioxidation activity of α-tocopherol(VE) and the synergistic effects of ascorbic acid(VC) and other organic acids at the air oxidation of methyl linoleate(ML), in relation with the problems of stabilization of linolic ester products and prevention of edible oil oxidation. In these experiments, aeration oxidation was carried out by adding VE and VC to ML for researching their antioxidation activity, and VE and VC were separately extracted from samples collected periodically. VC was qualitatively determined by polyamide thin layer chromatography, and further VC and dehydroascorbic acid (DVC) were quantitatively determined by the 2,4-dinitrophenyl hydrazine method.

The residual VE of the sample used in the above test was also quantitatively determined by the EE method.

As the result, it was recognized that VC was oxidized to decompose through DVC, and vanished following to oxidation of VE : both VC and VE remained longer than did when existed separately,and it shows that they are protective to each other.

緒　言

われわれはリノール酸メチル（ML）の通気酸化とその際における酸化防止剤および synergist の作用について一連の報告[1) 2) 3)]を行なって来た。

前報[2)]ではMLの加熱下の通気酸化時のD,L-α-トコフェロール（VE）の酸化防止効果と，さらにVEに対するアスコルビン酸（VC）その他数種の有機酸の Synergism について報告し，その作用機構についての考察等を行った。今回はMLの酸化の際のVEとVC両者の添加量と効力の関係，ならびに酸化の過程での両者の分解状況等について実験を行ったのでその結果について報告する。

1　試料および酸化条件

リノール酸メチル：前報に準じ、サフラワー油より尿素付加体により精製する。

D,L-α-トコフェロール：市販特級品（純度98%以上）を用いる。

L-アスコルビン酸：市販特級品（純度99.0%）を用いる。

デヒドロアスコルビン酸：VCを臭素水により酸化して用いる。他にNBC社(USA)製品を使用した（純度

＊東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

96%)。

装置は前報に準じ，インピンジャー中にML 6 gを取り，85±1°のグリセリン浴中，酸素を300ml/minで導入して酸化を行った。

2　実験の経過および結果

2-1　MLの酸化時における，酸化防止剤VEに対するVCの添加量と Synergistic effect（相乗効果）について

VEに対する有機酸 Synergist としてのVCの添加量と，その効力の関係を知るため次のような実験を行った。酸化温度，ML量は上記の通りそれぞれ85°，6 gとし，これにVE 1 mmole/kg を加え，さらにVCを0.5，1，2，3 mmole/kgずつ添加して通気酸化を行った。この際におけるPOVの変化を Fig. 1（左側）に示す。VC無添加のものは約3.5時間でPOV1000に達するが，0.5mmole添加のものでは同10時間，1 mmole添加の場合は11.7時間と，酸化時間の延長を見せているが，VCを2 mmole/kg，3 mmole/kgと増加しても効果の増大は見られない。

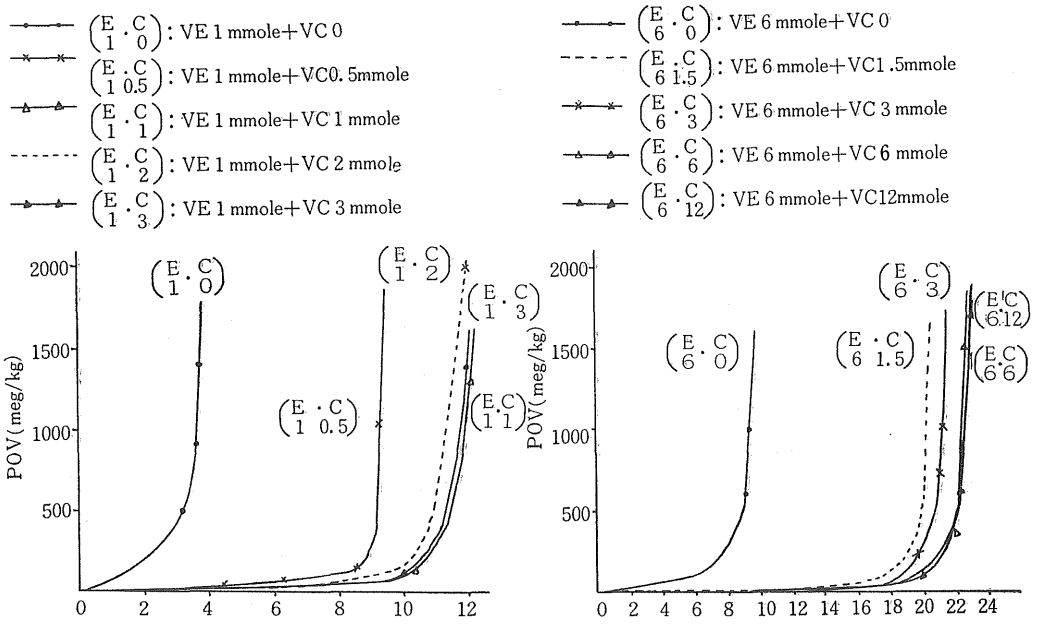


Fig. 1. Quantities of Ascorbic Acid and its Synergistic Effect on Tocopherol at the oxidation of Me-Linoleate (oxidation at 85°C)

次にVEの量を増してMLの0.25%（約6 mmole/kg）を添加した場合，Fig 1の右側に示すようにVC量0.025%（1.5mmole/kg）では同 POV1000に至る時間20.1時間，VC量0.05%（3 mmole/kg）で21.3時間，VC量0.1%（6 mmole/kg，VEと等モル）のとき同22.5時間と僅かながら増大するが、VC量を更に増して0.2%（12mmole/kg，VEの2モル）とした時も同じく22.5時間で全く効果の増大が見られない。なおVC量0のときは同酸化時間は9.3時間であった。

2-2　VEの酸化による減少と，VCの変性（DVCの生成）および分解について

ML 6 g中にVE 0.25%（6 mmole/kg）を加え，これに Synergist としてVC 0.1%（VEと等モル）を加えたものを試料①とし，ML，VEを①と同一量とし，VCのみを0.2%（VEの2モル）に増量したものを試料②として2-1の場合と同様85°で酸化実験を行ない，この際時間の経過にともなうVE量およびVC量の変化，ならびにVCがどのように変化し，分解して行くかを調べた。すなわちこれらの試料について経時的に各数種の酸化試料をとり，Table 1 に示した方法によりVEとVCを分離抽出し，有機溶媒層については，VEの定量（E-E法，Fe-dipyridil法）を行ない，水層については30° 以下の温度で速やかに真空濃縮し，濃縮液についてポリアミド薄層等を用いて薄層クロマト

Table 1. Analytical Procedure of Residual Tocopherol and Synergists in the Oxidized Sample

Sample
dilute with(hexan+ether)
extract with water

upper layer
(dry Na_2SO_4) evapolate
dil, with ethanol
estimation of Tocpherol
(E.E. method
Fe-dipyrildil)

lower layer
evapolate in vacuum
T.L.C.
of organic acids
(ascorbic acid
dehydro asc. a.
citric acid
malonic acid)
polyamide L.
si-gel L.

estimation of ascorbic acid and dehydro asc.
(Br_2 oxidation
2.4-D. N phenyl hydrazone
$\rightarrow H_2SO_4$(85%)
measure A.(515mμ))

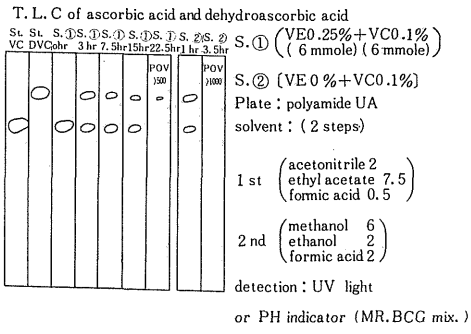


Fig 2.
Thin Layer Chromatography of Synergists

グラフィー（TLC）を行ない，VCの変化の状況を調査した[4]。

その結果は Fig. 2 に示す通りであるが，VCは酸化によってDVCを生成し，さらに分解して行くことが知られる。TLCの条件としては他にシリカゲルUA（螢光剤入り）を用いる方法も併用した（分析法については更に4-2に記す）。

次に上記の水層を濃縮せずに一定量とし，Roe[5]の方法に準じて，2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNP）による総ビタミンCの定量法により，還元型VCとDVCの分別定量を行った。結果は Fig. 3 および Fig. 4 に示す。

Fig. 3 は試料①（VC量0.1%添加）の場合で，Fig. 4 は試料②（VC量0.2%）の場合の変化を示すものである。いずれの場合もVEの減少状況はほとんど変らず，各7.5時間で約0.1%，15時間で0.05～0.04%，19時間では約0.01%と経時的に減少し，22.5時間でほとんど0となる。

これに比しVCの減少状況はやや複雑であり，試料①の場合，0時間で0.1%のものが7.5時間では0.05%に減少し，以下15時間までほとんど変らず，19時間で再びやや減少を見せ，22.5時間でほとんど0となる。この際DVCは7.5時間で約0.015%となり，以下19時間までほとんど変らず，22.5時間で痕跡程度となる。

試料②では初めVC 0.2%のものが，7.5時間で0.1%となり，以下約0.1%を保つが19時間でやや減少をみせ，ついでVEの消失とともに急速に減少して22.5時間でほとんど0となる。DVCの変化も①の場合に準じ，Fig. 4 に示すような経過をたどり22.5時間では痕跡となる。

上記のようにVEの変化に比しVCの減少状況が複雑なのはVCの酸化により生成するDVCとの間に平衡関係のあるためと推定されたが（考察の項を参照），さらにDVC自体のVEに対する Synergism を検する為，①と同条件でDVCを使用して酸化実験を行った。すなわちVEと同モル数のDVC（NBC社製，1.試料の項参照）(6 mmole/kg)を加えた場合，POV 1000に至る時間は15.1時間で，VCの場合①の約70%程度の延長時間となった。

なおVCのみを添加し，VEを添加しない試料では約3時間でPOVが1000を超えている。又同時にVCの残存も認められなくなる。

上記のようにVEおよびVCは共存する場合，互に保護的に作用していることが注目される。

3 実験結果についての考察

2-1の結果から酸化防止剤として加えられたVEの一定量について，Synergist としての VC の有効量には限度があり，それを超過して加えられても効果は上昇しないことがわかる。

又2-2の実験結果から，VCの添加量を増大してもVE

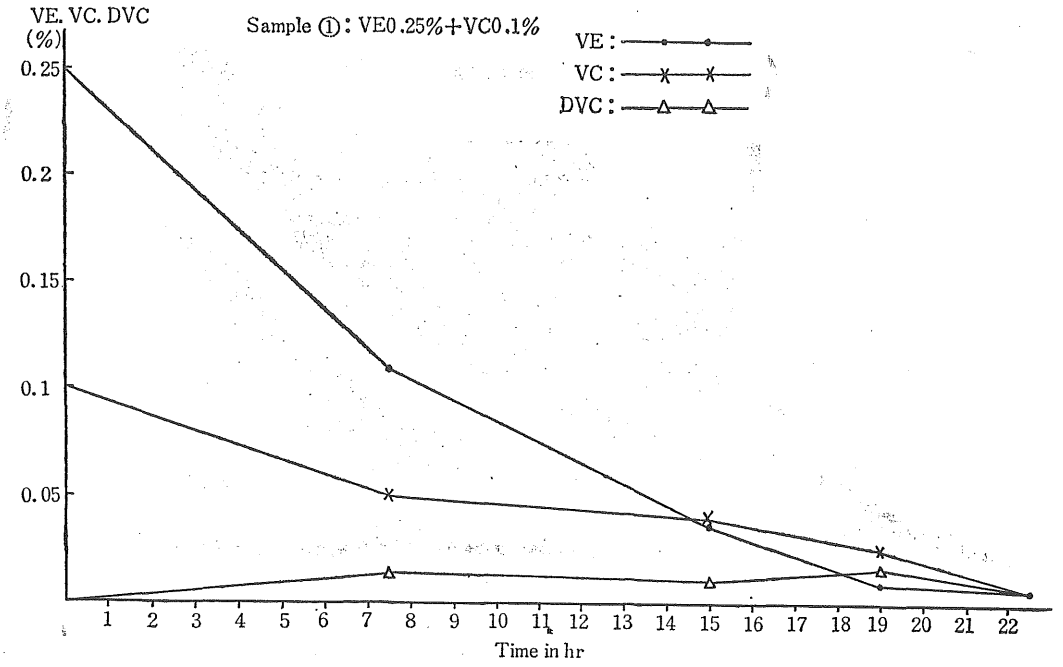


Fig. 3. Change of Residual Tocopherol (VE), Ascorbic Acid (VC) and Dehydroascorbic Acid (DVC) at the Oxidation of Me-Linoleate (I)

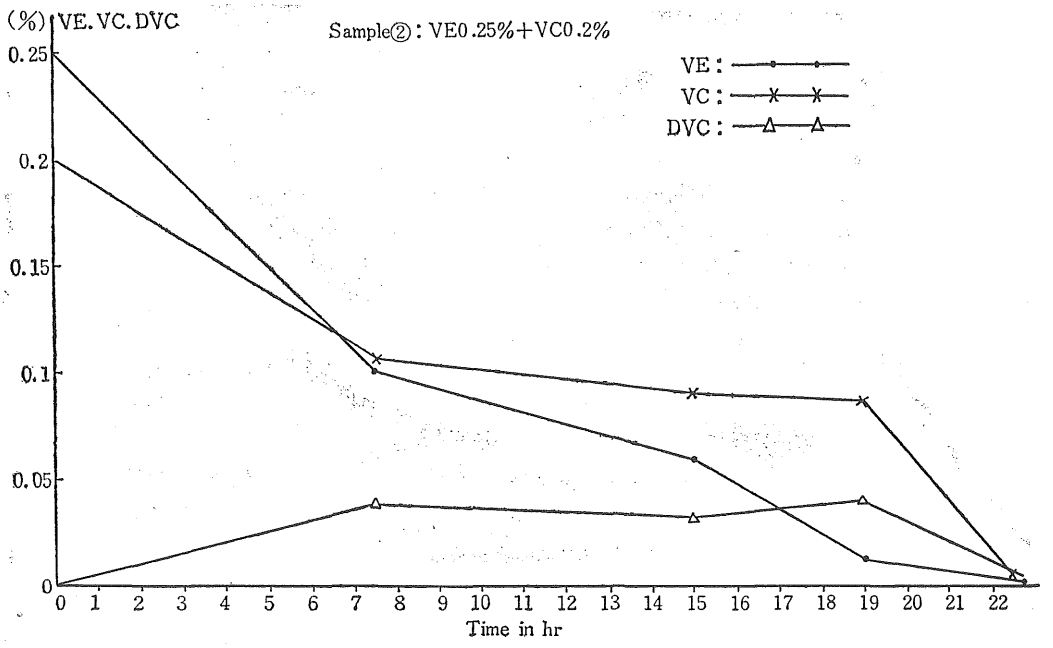
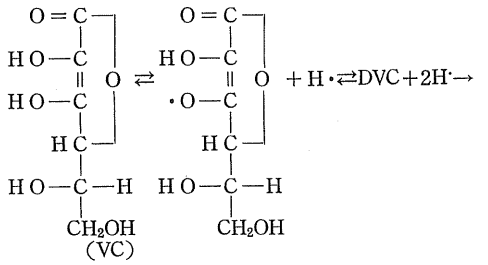


Fig. 4. Change of Residual Tocopherol (VE), Ascorbic Acid (VC) and Dehydroascorbic Acid (DVC) at the Oxidation of Me-Linoleate (II)

の酸化による減少速度は変らず，結局VCの利用率には限界があり，それを超えて加えられても無意味であることを示している。

前報[2]においてわれわれは，フェノール系酸化防止剤（VEを含む）がその効果を現わすのは，リノール酸の空気酸化によるChain reactionを，フェノール⇄フェノキサイド+H·の過程で生ずる水素の供与によって切断することに由来し，同時に有機酸 Synergist の効果は，これらからフェノキサイドへの水素供与によることを推論した。今，次式



の平衡により，生ずるH·が上記の効果を現わすとすれば上記の推論についての一つの裏付けとなろう（この際 Synergist より酸化防止剤への水素供与にも一種の平衡関係を考える必要があると思われる）。ただこの系は酸化の進行にともない右方へ進行して酸化分解が除々に進み，VEの消失に至っていわゆる induction period の終末を迎え，POVが急速に上昇する。

なお上記と類似の関係はブチルヒドロキシアニソールとVCおよびクエン酸，VEとクエン酸又はマロン酸等の場合についての実験結果（別報予定）についても成立する。ただし各酸化防止剤と有機酸 synergist の有効量（至適）の比率はそれぞれかなり異っている。

4　試料中のVEおよびVCの分析方法（酸化試料よりの分離抽出法．VCおよびDVCのTLC．VC，DVCの定量法．VEの定量法）

4-1　酸化試料よりVEおよびVC（DVC）の抽出

Table 1 の順序に従って，まず酸化試料6gにヘキサン・エーテル（2＋1）を加えて約40m*l*とし，水10m*l*ずつで2回よくふりまぜて，VC（DVC）を抽出する。溶媒層を分取し，溶媒を減圧で去り，残留物をエタノールで定容としVE定量用の試験溶液とする。水層については30°以下の浴温で，ロータリーエバポレーター等を使用し，速やかに水分を留去する（乾固をさける）（又この際受器には無水 $CaCl_2$ を入れておき，周囲を氷冷した）。残留物をエタノール少量に溶かしてTLC用の試験溶液とする。又VCおよびDVCの定量のための試験溶液は前記水抽出液（水抽出のかわりに5％メタリン酸を使用すると二層の分離がよく定量にも好都合であるが，この場合上層にメタリン酸が混入すると，VEの定量を障害するから，よく水洗してから脱水する）を5％メタリン酸溶液で定容（25m*l*）とし，試験溶液とする。

4-2　VCおよびDVCのTLC

Fig. 2 に大要を記載したがポリアミド（UA）薄層を使用するときは，上記4-1で得た試験溶液約5μlにつき，展開溶媒（1st）を用いてまず展開を行って脂溶性物質の混入による像の乱れを防ぎ，暗所で乾燥したのち，溶媒（2nd）で展開を行う。この時展開距離約9 cm，スポットの検出はUV照射によるが，pH指示薬（MR・BCG混液）によってもよい。

又シリカゲル薄層（螢光剤入り）を用いるときは展開溶媒，ベンゼン・メタノール・アセトン・酢酸（60：25：10：5）を用いて展開する。このとき展開距離約18cmでVCのRf約0.3，DVC約0.55を示す。

4-3　VCおよびDVCの定量（2,4-DNPによる比色法）

試験溶液（4-1）を一定量（通例2 m*l*）取り，Br_2水を滴加して酸化し，過剰のBr_2を0.5％チオ尿素溶液2 m*l*を加えて除き 2％2,4-ジニトロフェニルヒドラジン・9 NH_2SO_4 溶液1 m*l*を加え，50°の水浴中で1時間放置したのち，水冷しながら85％H_2SO_4 5 m*l*を加えて呈色させ，30分放置したのち515mμにおける吸光度を測定する。（Fig. 5）別にVC標準液（VC量30—120 μg）によって検量線を作製し（Fig. 6），これにより

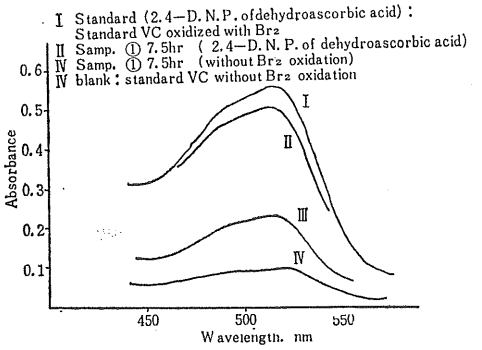


Fig. 5.
Absorption Spectra of Bis 2.4-D.N. Phenylhydrazone of Dehydroascorbic Acid

総VCを定量する。さらに臭素酸化を行わずに同様の操作を行ない，DVCを算定する。総VCよりDVCを差引いてVC量とする。

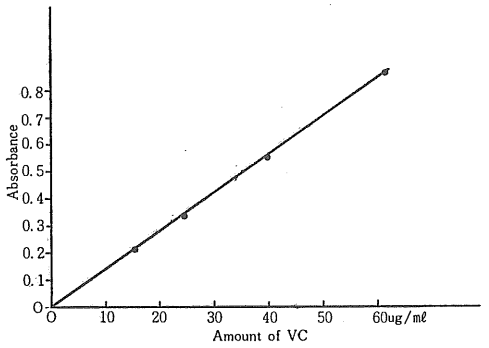


Fig. 6 Calibration Curve of Acorbsic Acid (515mμ)

4-4 VEの定量

4-1のVE定量用試験溶液を用い，E-E法（Fe-ジピリジル法）により（定量条件は薬学会協定法に準ずる），520mμにおける吸光度を測定して定量を行なった。

（結語）

今回の実験はリノール酸メチルの通気酸化に関する実験中，フェノール系酸化防止剤と有機酸 Synergistの関係を検討する目的で行った。その結果α-トコフェロールとアスコルビン酸については両者の効力と添加量の比率に関する知見をえ，さらにこの系における両者の酸化分解の様相を追跡して，その相互作用の機構について推論した。なお油脂類についての Synergistの添加量については在来経験的にのみ取扱われて来たようであるが，その使用量については有機酸 Synergistと酸化防止剤の組合せによる適正量を確かめた上で決められるべきものと考えられる。

（文献）

1） 松本茂，酒井昭子，伊藤紘一，勝木康隆：衛生化学，16，67(1970)，（第2報）

2） 松本茂，奥本千代美，加賀あき子，宮武ノリエ：衛生化学19，29(1973)，（第4報）

3） 日本薬学会第93年会，東京（1973年4月），（第5報として発表）

4） Knappe, E. and D. Peteri,, : Z. Anal. Chem., 211, 49(1965)

5） Freed, M. "Methods of Vitamin Assay" 3rd ed. (1967) Interscience Pub., New York p. 317

In vitro による注射剤中のパイロジェン検出の検討

下 平 彰 男*

INVESTIGATION OF IN VITRO METHOD FOR THE DETECTION OF PYROGENS IN INJECTIONS

Akio SHIMOHIRA

(Division of Pharmaco-Chemistry, Department of Chemistry,
Tokyo Metoropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Pyrogen test is one of the most difficult problems encountered in pharmaceutical development and production, because of build-up for equipment and cost with much labour. The current required in vitro method vs. rabbits for pyrogen in parenteral solutions has been reported by many laboratory workers.

Now, it is generally believed that pyrogens are endotoxins, specifically lipopolisaccharides usually resulting from the autolysis of cell walls of bacteria.

This paper describes an investigation of comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of pyrogen (endotoxin) with the aim of routine work as a replacement for the presnt pyrogen test.

The results demonstrated that in vitro method (The Limulus coagulation test) was 10～1,000 times as sensitive to endotoxin as the official pyrogen test. It shows greater availableness as useful routine work for the quantitative measurement of endotoxin, but the further study will require to be accomplished on a great deal of various injections.

1 緒 言

注射剤中のパイロジェン検定法は，各国薬局方など公定書の試験法に依存しており，注射剤としての適否の判定であることには異論はない。しかし，注射薬原料，注射剤製造行程中のパイロジェンチェックなど，判定規準以下の定量的な試験結果が要求されるとき，試験成績の再現性が問題と思われる。元来，Pyrogen Test はウサギの種別，性別，飼育環境条件，健康管理などの諸因子を一定にしなければならず，施設，人手などを省くことはできない。そこで in vitro における Pyrogen 検定法が求められるが，既に1956年，TBP 反応による Pyrogen 検出法について当時の綿密な研究報告[1]がなされかが，広く実用化されていない。近年の研究報告ではウサギの脾臓の組織培養によって Endotoxin（Pyrogen）の定量を試みており[2]，さらにマウスを用いた Endotoxin の生化学的定量法[3]が研究されている。これらはいずれもウサギの体温測定法よりも感度の高い結果が得られているが，routine work としてはいくらか繁雑性の難点が考えられる。また，Pyrogen（Endotoxin）の化学構造は加納ら[4]により詳しく解説されているが，注射剤中の Pyrogen を化学的に定量した報告はないようである。しかし Rojas-Corona ら[5]は Endotoxin 定量法について The *Limulus* Coagulation Test（カブトガニ血球凝固反応）と他の試験法と比較実験を行ない，簡便性と高感度の結果が

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

得られた。さらに Cooper ら[6] は，Klebsiella および E. coli から得た Endotoxin を用い，ウサギによる試験と上記の The *Limulus* Coagulation Test を比較し，後者は前者より簡便であり，感度も10倍高いと報告している。また小林，山元[7] は日本産カブトガニ血球（Pre-gel）による Endotoxin 定量法の綿密な研究を行ない，検出量はさらに高い感度を有することを報告している。

今回筆者は上記の Pre-gel 反応が各種注射剤の Pyrogen 検出に利用できるかに着目し，Pre-gel の各種注射剤に対する反応を検討し，ウサギによって Pyrogen 陽性結果を得た数種の注射剤に対する Pre-gel 反応を試みた。

2 実験材料および実験方法

(1) 実験材料

1) Pre-gel：日本産カブトガニ（Tachypleus tridentatus）の血球から抽出した血球 Pre-gel（Amebocyte lyate）を凍結乾燥しかもので，1アンプル（1 m*l* 用）中に Pre-gel 0.1m*l* を含む。

2) Pyrogen (LPS)：Fusarium oxysporum, Pseudomonas fluorescens および Shigella sub-group から得た endotoxin。

3) 注射剤：Pyrogen free の再蒸留水に薬剤を溶解し，高圧蒸気滅菌（1.0kg/cm², 15分間）を行なった。

4) ガラス器具類：マイクロピペットのみは110～120°Cで1 hr，その他は280°Cで30 min. 乾式加熱を行ない脱パイロジェンを行なった。

(2) 実験方法

1) Pyrogen Test：日本薬局方発熱性物質試験法による。体温測定は首架式で，12点式自記体温記録計を使用し，連続記録を行なった。

2) Pre-gel 反応：Pre-gel の入ったアンプルを必要量併列し，アンプルをカットし，Pyrogen-free の再蒸留水を 0.1m*l* づつ，マイクロピペット（100μ*l* 用）を用いて，それぞれのアンプルに入れ，凍結乾燥されている Pre-gel をしずかに溶解する。次に各コントロール液および検液それぞれ0.1m*l* づつを，それぞれ別のマイクロピペットを用いて加え，しづかに混ぜたのち，アンプル立てにたて，上部にキャップをかぶせる。併列されたアンプルは振動を与えないようにして 37°C のふらん器中に静置し，1 hr後にアンプル立てと共にしずかに常温にもどし判定を行なう。判定方法はアンプルを静かにとり，約45°の角度にゆるやかに傾けて，肉眼的にゲル形成，流動性，でんぷん様ゲルのアンプル壁付着，沈澱析出などを観察する。その結果，固い gel を形成し，傾けても動かないものを＋＋とし，gel は形成するが傾けると塊りとなって動くものを＋とし，軟かい半流動性の gel を形成し，傾けると流れるものを±とし，最初の液状のままで Negative control と同様に変化がないものを－とする。

3 実験と結果

まず3種類の Pyrogen (LPS) に対するウサギによる Pyrogen test と Pre-gel 反応の比較実験を行なった。すなわち Fusarium oxysporum, Pseudomonas fluorescens および Shigella sub-group から得た LPS をそれぞれ 10μg/m*l* の濃度から 0.0001μg/m*l* まで10倍稀釈液を調製し，それらを検液とし，Pyrogen Test および Pre-gel 反応を行なった。その結果，Tabl I に示したように Pre-gel 反応はウサギによる Pyrogen test によりはるかに感度は高く，Pseudomonas fluor-

Table I Comparative dilution effect of pyrogen test and reaction of Pre-gel on various lipopolisaccaride (LPS)

LPS	Fusarium oxysporum		Pscudomonas fluorescens		Shigella sub-group	
μg/ml	P.T.	P.G.	P T.	P.G.	P.T.	P.G.
10	＋	＋＋	＋	＋＋	＋	＋＋
1	＋	＋＋	＋	＋＋	＋	＋＋
10^{-1}	－	＋＋	－	＋＋	＋	＋＋
10^{-2}	－	＋	－	＋	＋	＋＋
10^{-3}	－	－	－	±	＋	＋
10^{-4}	－	－	－	－	－	±

P.G. : Reaction of Pre-gel (the *Limvlus* coagulation test)
P.T. : Official Pyrogen Test

P.G· ++ : Formation of immovable solid gel by tilting the tubes gently at 45° angle.
+ : Formation of movable gel in amass by the same manner.
± : Appearance of increased viscosity including starchy glanule formation.
− : No formation of gel.

escens の LPS に対しては1,000倍の感度がみられた。なお，これら3種の LPS のウサギの最少発熱量について実験を行なった結果（Table II），既述の LPS の順に，1.00, 0.20, 0.001μg/kg で，Table I の Pyrogen Test の結果と一致した。

Table II Minimum pyrogenicity of rabbits to various lipopolisaccharide (LPS)

LPS	Injection Dose (μg/kg)	Temperature Rise °C (Mean ± S.E.)
Fusarium oxysporum	1.00	0.73 ± 0.10
Pseudomonas fluorescens	0.20	0.73 ± 0.16
Shigella sub group	0.001	0.85 ± 0.12

次に実際上よく使用される注射剤に対する Pre-gel 反応の検討を行なった。まず注射剤の溶媒である蒸留水，滅菌蒸留水，滅菌再蒸留水，生理食塩液および電解質溶液について，Pre-gel 反応を行なった。その結果，滅菌しない蒸留水は Pyrogen Test 陽性で，Pre-gel 反応＋＋を示し，他は滅菌蒸留水を除いて，すべて陰性であった(Table III)。次に糖および糖アルコール8種をそれぞれ Pyrogen fere の再蒸留水に溶解し，

Table III Reaction of Pre-gel to vehicle for injection

Vehicle	Pyrogenicity	Pre-gel
Distilled Water	+	++
Sterized distilled water	−	±
Sterized re-distilled water	−	−
Physical saline solution	−	−
Electrolyte replacement	−	−

20%溶液を調製し，滅菌したのち，Pyrogen Test を行なって陰性の結果を確認して検液とし，上記と同様な Pre-gel 反応を行なった。この際，Pre-gel 反応の感度をよくするため，水酸化ナトリウム溶液を用いて検液の pH値 をなるべく6.25～7.25の範囲内[7] になるように補正して行なった。その結果，糖アルコールに若干の白濁が認められたが，すべて沈澱物は生ぜず gel 形成は全く認められなかった（Table IV)。同様にアミノ酸12種について1%の水溶液を調製し，滅菌を行ない，pH値の補正を行なったのち，Pre-gel 反応を

Table IV Results of Pre-gel reaction to non-pyrogenic sugar injection and sugar alcohol injection

Injection (20%)	P H	P H adjusted	Result
Dextrose	4.20	6.75	Negatiwe
Fructose	4.05	6.23	〃
Lactose	4.00	7.01	〃
Galactose	4.83	7.03	〃
Dextran	3.93	6.94	〃
Xylitol	6.15	6.80	〃
Mannitol	6.15	6.93	〃
Sorbitol	5.25	7.15	〃

行なった。その結果，やや白濁を生ずるものが見られたが，gel 成形は全くなく，すべて陰性と認められた(Table V)。

Table V Results of Pre-gel reaction to non-pyrogenic amino acid solution (1%)

Amino acid	P H	P H adjusted	Result
Glycine	6.16	6.95	Negative
Valine	6.21	——	〃
Leucine	6.10	6.78	〃
lsoleucine	6.15	——	〃
Threoninne	5.43	6.30	〃
Methionine	5.96	6.77	〃
Phenylanine	6.04	6.98	〃
Tryptophane	6.58	——	〃
Proline	6.13	——	〃
Lysine	5.08	6.93	〃
Arginine	5.67	7.01	〃
Histidine	3.98	7.02	〃

さて最後に，上記アミノ酸12種の中，Pyrogen Test の結果陽性を示したアミノ酸5種（Leucin 1種，Methionine ロット別3種，Arginine 1種）および最終製品であるアンプル入り注射剤5種（Xylitol 10%ロット別2種，Co-carboxylase 50mg/20ml ロット別2種，西洋トチノキエキス注射液1種）について Pre-gel 反応を行なった。その結果，Table VI にみられるように西洋トチノキエキス注射液を除いては Pre-gel 反応はすべて明らかな陽性を示した。なお，＋＋のサンプ

Table VI Comparative results of pyrogen test and reaction of Pre-gel on various pyrogenic injection

Sample	Pyrogen Test	P H	P H Adjusted	Result of P.G.
*Leucine 1%	positive	6.30	——	++
*Methionine 1%, (A)	〃	5.97	7.56	+
* 〃 , (B)	〃	5.30	6.90	++
* 〃 , (C)	〃	6.14	6.84	+
*Arginine 1%	〃	5.67	7.40	+
Xylitol 10%, (A)	〃	6.20	——	++
〃 , (B)	〃	6.17	——	+
Co-carboxylase 50mg/20ml, (A)	〃	3.96	6.22	+
〃 , (B)	〃	4.07	6.31	++
Semen hyppocastani inj.	〃	5.24	6.37	−

Note: All sample were submitted by manufactures for pyrogen test.
*Amino acid, crystal, were prepared with pyrogen- free distilled water for injection so as to contain one per cent of amino acid, and sterilized

ルを10～100倍稀釈を行なっても結果は＋あるいは±で明らかな陰性を示さなかった。また Co-carboxylase について pH値を補正しないで Pre-gel 反応を行なうと，結果は陰性であった。

4 考察と結語

LPS の種類が異なっても，endotoxin に対するウサギの反応と Pre-gel 反応は，やや平行しており（Table I），Cooper らの行なった実験結果[6] に似ている。もとより，ウサギの体温上昇を起す最少投与量すなわち最少発熱量は，LPS の種類によって異なり（Table II），Shigella sub-group から得た LPS がもっとも少量（0.001μg/kg）で，筆者らの実験では，投与量の少ない段階では投与量と体温上昇値は直線性がある。Castor ら[8] の高純度の LPS の特性に関する報告においても投与量 0.0005～0.005μg/kg の段階で投与量と発熱性は直線性を示しており，最少発熱量も 0.001 μg/kg あたりである。さて，Pre-gel 反応による endotoxin の最少検出量はウサギによる反応の最も強かったところの Shigella sub-group から得た LPS では10^{-4} μg/ml で人血漿中の endotoxin 定量を行なった実験報告[9] の $10^{-3}\mu$g/ml より10倍高い。同様に，Eibert らの実験報告[10] にも endotoxin 濃度10^{-3}～$10^{-4}\mu$g/ml では検出不可能であると述べている。今回の実験で Pyrogen（endotoxin）に対する Pre-gel 反応が非常に高感度であることは，日本産カブトガニ血球成分が外国産のものと差異があるか，あるいはその抽出法が異なっているのかもしれない。

次に Table III にみられる蒸留水の Pre-gel 反応陽性結果は，Pyrogen Test 陰性の滅菌された蒸留水においても Pre-gel 反応疑陽性の結果が得られていることは興味あると思われる。Pyrogen Test 陰性の糖，糖アルコールおよびアミノ酸に対する Pre-gel 反応の結果はすべて明らかな陰性を示しており，これらは血球 Pre-gel に対するこれらの薬剤の障害を調べたものであり，好結果が得られたものと思われる。

最後に，Pyrogen test 陽性の注射液について，Pre-gel 反応を行なった結果，著明な陽性がみられている。ただし西洋トチノキ注射薬のみ結果が陰性であることは，植物アルカロイドと Pre-gel 反応との関係について今後に残された問題と思われる。なお，筆者は西洋トチノキエキスの主成分である Aesin と血球 Pre-gel とは至適 pH において，白色の沈澱物を確認している。

以上のように今回の実験では Pyregen に対する Pre-gel 反応は，操作が簡便であり Pyrogen 検出量もすぐれていることが考えられる。しかし，endotoxin と血球 Pre-gel の反応機構が現在不明とされている現在の段階では，その他の各種注射剤中の薬物が血球 Pre-gel に障害を与えるか否かの実験をさらに重ねる必要があるものと思われる。

謝辞：技術的な御援助および多量の血球 Pre-gel を賜わりました帝国臓器製薬株式会社化学研究部山元正昭先生，小林正義先生に深く感謝致します。

文 献

1) 伊藤宏；日本薬理学雑誌，52，458（1956）

2) Heilman, D. H. et al. ; J. Bacteriol., 93, 15 (1967)
3) Baker, P. G. et al. ; J. Bacteriol., 90, 903 (1965)
4) 加納晴三郎；ファルマシア 4 No. 11, 800 (1968)
5) Roias-（Corona, R. R. et al. ; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 132 599 (1969)
6) Cooper, J. F. et al. ; J. Lab. Clin. Med., 78, 138 (1971)
7) 小林正義，他；薬学雑誌 (1973)（投稿中，私信）
8) Castor, G. B. et al.; J. Pharm. Sci., 60 1578 (1971)
9) Reinhold, R. B. et al. ; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 137, 334 (1971)
10) Eibert, J. ; Bull. Parenteral Drug Asoc. 26 No. 6 252 (1972)

生薬の試験方法に関する研究(Ⅳ)
最近の中国産朮類生薬について

西川洋一* 勝田隆子* 渡辺四男也*

STUDIES OF EXAMINATION METHOD OF CRUDE-DRUGS (Ⅳ)
DISCUSSION OF THE CHINESE CRUDE-DRUG ZHU IN RECENT YEARS

Yoichi NISHIKAWA, Takako KATSUTA and Yohya WATANABE

(Division of Pharmaco-Chemistry, Department of Chemistry, Tokyo Metro-politan Research Laboratory of Public Health)

Summary

The chinese Zhus of recent years were descussed by thin layer chromathography.

1) The three kind of Zhu which were named Seihoku-Sojutsu exported from Tientsin, Hine-Sojutsu exported from Honkong and To-Sojutsu of market, were originated in same species and contained essential oil less than rhizome of *Atractylodes lancea*. They seemed to be variation of *A. lancea*

2) Tientsin-Sojutsu exported from Tientsin, Tohoku-Sojutsu exported from Talien and To-Sojutsu of market were originated in the same speceis which was not identified.

緒言

朮は日常繁用される漢方処方に配合される重要な漢薬であるが，現在の市場品は名称など取扱上混乱があるので著者等は前報まで TLC を応用した朮類生薬の識別法について報告してきた。

昨年秋中国との国交回復に伴い日中貿易が盛んになり，多種目の漢薬が輸入されるようになった。しかしながら，漢薬の名称は産地，集荷地，修治法等の生産条件によって種々様々であり，また中国における名称が必ずしも日本市場に通用しないので同一異名が行なわれている。朮類も基原植物，産地，集荷地，形状および調製法または野生品と栽培品などの区分によって種々の商品名が中国でつけられているが，日本市場でも同一品種のものが流通過程で呼称が異なることがしばしばある。

中国産の朮類は白朮と蒼朮に大別され，白朮はオオバナオケラ *Atractylodes ovata* A. P. De Candolle を基原とし，揚子江に近い浙江，安徽，湖南の3省が栽培地として知られ，形状がきわめて特徴的で，他の朮類と外観上容易に識別することができる。日本市場では唐白朮として貴重なものであるが品薄で高価のためほとんど流通がなく，現在では中国東北地区，朝鮮半島および日本に分布するオケラ *A. japonica* Koidzumi の根茎から調製したものを日本薬局方では和白朮として唐白朮に代用している。しかし，日本産は市場性がなく，現在の市場品は朝鮮半島産が主である。

蒼朮は中薬志 I[1] によれば南蒼朮（茅朮，京蒼朮）と北蒼朮（山蒼朮，津蒼朮，関蒼朮）に区分され，南蒼朮はホソバオケラ *A. lancea* D.C. を基原とし，日本市場では古立蒼朮と呼ばれ，質堅く，油分に富み精油含量は 50 g 中2.0～3.0 ml で，切断面から白色綿状結晶を析出する特徴があり市場では上等品とされている。しかし，近年中国交易会で本種の出品がなくなり日本市場でもみられなくなった。これにかわるものとして1972年秋に西北蒼朮と称するものが出品され，今

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

年になって北支の天津港経由で輸入され日本市場で古立蒼朮または唐蒼朮などと名づけられて取扱われている。この朮は外観が *A. lancea* に基原する古立蒼朮に似ているが，質はやや軟く，切断面から白色綿状結晶を析出しない。そこで市場では粉（白色綿状結晶）をふかない古立蒼朮または本来の古立蒼朮と違うものとして中国の朮，すなわち唐蒼朮と名づけたものと思われる。

また西北蒼朮に似たものが香港経由の古立蒼朮として輸入されている。このほか天津港出荷の天津蒼朮，大連港出荷の東北蒼朮などがあり，この2者は大部分の外皮が除かれ，特別の調製法が行なわれたもののようである。日本では古くから外皮をつけたものを蒼朮，外皮を除いたものを白朮と称する習慣があるのでこの2者はそれぞれ取扱業者によっては各種各様の呼称がなされていることが想像できる。

このように日本市場の朮は対中国または北朝鮮～韓国貿易の事情によって各種のものが輸入されているにもかかわらず，従来の概念ないしは古く根強い習慣によって，つねに自己の認識のカテゴリーの中の名称にこじつけが行なわれ，同一異名が往行しているのが実態である。日本薬局方では朮を基原植物によって区分し蒼朮と白朮を別項目として収載しているが，市場の流通名からそのいずれに該当するかの判断はきわめて困難である。著者等は1968年以来市場品の混乱に着目し，行政取締と指導の見地から市場品を調査し，識別法として TLC を応用する方法を研究して市場品の基原的考察を行なってきたが，本報では識別法に若干の新しい方法を取り入れ，前述の最近輸入された数種の中国産朮類の識別について報告する。

実験の部

1 実験試料

実験に供した試料は最近中国の天津港，大連港または香港経由で輸入された出荷地の明らかなものおよび日本市場品で，品名は現産地名または市場の流通名である。またこれらと比較対照するために種の明らかな朮および *Atractylodes* 属の根茎を標品として用いた，

試料

(1)西北蒼朮（天津経由）
(2)古立蒼朮（香港経由）
(3)古立蒼朮（市 場 品）　（粉をふかない古立）
(4)唐 蒼 朮（市 場 品）
(5)天津蒼朮（天津経由）
(6)津 蒼 朮（香港市場品）
(7)東北蒼朮（大連経由）

標品

①古立蒼朮（*A. lancea*）
②北朝鮮蒼朮（*A. lancea* var. *simplicifolia*）
③唐白朮（*A. ovata*）
④日本産オケラ（*A. japonica*）の根茎

参考試料

津蒼朮（*A. lancea* var. *chinensis*）（大阪大学生薬学教室標本）

2 実験操作

精油の定量　日本薬局方一般試験法生薬試験法の精油定量に従って定量し50g中の ml で表現する。

TLC　試料溶液の調製およびプレートに対するスポッテングは次の通りである。

(1)試料粉末2gに無水エタノール 5ml を加え，水溶上でわずかに沸とうする程度に2～3分間温浸したのち放冷し，ろ過して試料溶液とし，この液20μlをスポットする。

(2)精油の定量を行ない定量器より分離したキシレン層を精油に対して10倍になるように無水エタノールを加えた液を試料溶液とし，この液20μlをスポットする。

(3) Fig 1 に示す TAS オーブンを使用し，試料の粉末0.5g をガラスカートリッジに入れ，オーブン温度を170°とし90秒間に留出するフラクションを直接シリカゲルプレート上にスポットする。本装置[2]は Thermomikro-Abtrenn-, Transfer- und Auftrage-Verfahren nach Stahl の略名を冠した装置で，微熱分割～分離用として Egon Stahl が開発したものである。

TLC の条件

プレート：Kieselgel G（Merck）0.25mm
展開溶媒：n-hexan : benzen : ethylacetate
（70 : 15 : 15）
展　　開：上昇法　12cm
スポットの確認：p-dimethylaminobenzaldehyde 5 g を10％硫酸100ml にとかした液をスプレーし注意して加熱する。

実験結果

1 試料の性状

(1)西北蒼朮　1972年秋中国広州交易会に出品され，その後天津港を経由して輸入されたもので，品名は現地名である。

不規則に屈曲し，まれに分岐するやや結節状～連珠状の円柱状を呈する横走根茎および不整塊状の根茎からなり，外皮は暗黄かっ色である。質はやや堅く横切面は類白色で淡黄かっ色の油室を認める。本品は切片を放置しても白色綿状結晶を析出しない。

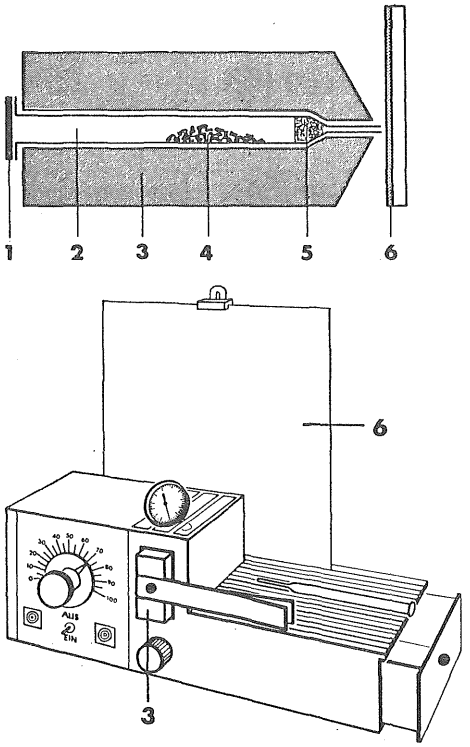


Fig 1 TAS-oven (Stahl)

1 = Packing　　4 = sample
2 = glascartridge　　5 = glaswool
3 = oven　　6 = plate

(2)古立蒼朮　1973年香港より輸入されたもので，品名は東京市場名である。

不規則に屈曲またはまれに分岐する連珠状～やや結節状の円柱状根茎，または不整塊状根茎からなり，外皮は暗かっ色で質やや堅く，横切面は類白色で橙黄色～黄かっ色の油室を認める。外観は(1)西北蒼朮に類似し，切片を放置するも白色綿状結晶を析出しない。

(3)古立蒼朮　近年市場でいわゆる粉をふかない古立蒼朮と名づけられて流通しているものである。

やや小型で不規則に屈曲し，まれに分岐する結節状の円柱状～不整塊状根茎からなり，外皮はかっ色～暗かっ色を呈し，質はやや堅く，横切面は淡かっ色で黄かっ色～暗かっ色の油室を認める。切片を放置するも白色綿状結晶を析出しない。

(4)唐蒼朮　東京市場品で，名称は流通名である。

本品は外形，色調，横切面の油室および切片から白色綿状結晶を析出しない点など(1)西北蒼朮とほとんど同じである。

(5)天津蒼朮　1973年天津経由で輸入されたもので，名称は入荷時のものである。

不規則に屈曲し，ときに分岐するやや結節状またはコブ状突起をつけたやや太目の円柱状～不整塊状の根茎からなり，大部分の外皮は除かれ外面は灰黄かつ色を呈する。質は軽虚で，やや軟く，横切面は油浸により一面黄かつ色を呈し，油室はやや不明確である。

(6)津蒼朮　1972年秋の香港市場品で，名称は現地名である。

大部分の外皮が除かれたもので，やや小型であるが外形およびその他の性状は(5)天津蒼朮とほとんど同じである。

(7)東北蒼朮　1973年初めに中国東北地区の大連港より出荷されたもので，名称は現地名である。

外皮がほとんど除かれたもので，外形およびその他の性状は(5)天津蒼朮にほとんど同じであるが，質は堅く，横切面は類白色～淡黄かっ色を呈し，黄かっ色の油室を認める。

参考試料　津蒼朮　本品は故高橋真太郎博士がご研究になりシナオケラ *Atractylodes lancea* De Candolle var. *chinensis* Kitamura の根茎と同定[3]されたもので，大阪大学薬学部生薬学教室に保管された標本の1部をご厚意により分与されたものである。表記に1963, 12, 20，香港永大行とある。

性状は不整結節状塊形～多くの突起のある円柱状根茎からなり，質は軽虚で，破析しやすく破析面は繊維性でない。外面は文献[3]記載によれば帯灰黄かっ色のコルク皮でおおわれているとあるが，何分にも年月がたっているので外観上からは判然としない。

2　精油含量

試料および標品の中から量的に多いもの数種について定量した。数値は50 g 中の ml 値である。

試　料		標　品	
(1)西北蒼朮	1.7ml	①古立蒼朮	3.0ml
(2)古立蒼朮	1.7ml	②北朝鮮蒼朮	0.5ml
(3)古立蒼朮	1.4ml	③唐白朮	0.4ml
(4)唐蒼朮	1.4ml	④日本産オケラ	1.4ml
(5)天津蒼朮	0.55ml		
(6)東北蒼朮	0.5ml*		

＊大阪三国商店研究室の測定値

3　TLC

(1)無水エタノール溶液のクロマトグラムは Fig 2，(2)精油および(3) TAS-オーブン法のクロマトグラムは

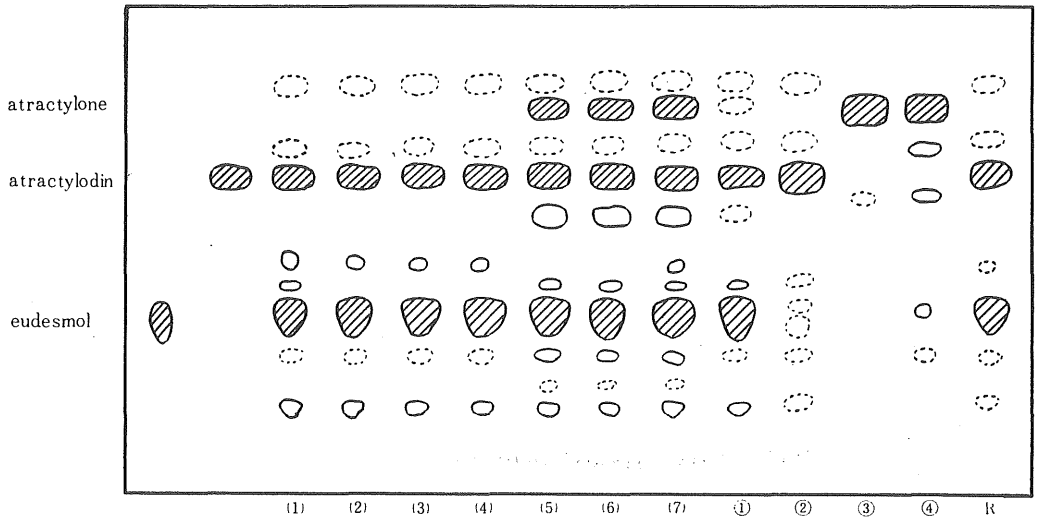


Fig. 2 Thin layer chomatogram of Zhu

plate : Kieselgel G (Merck) 0.25mm
solvent : n-hexan : benzen: ethylacetate (70 : 15 : 15)
detection : p-dimethylaminobenzaldehyde-sulphuric acid reagent (heating)
(1)—(7) : sample } ethanol solution
①—④ : standerd }
R : referenc (Shin-Sojutsu)

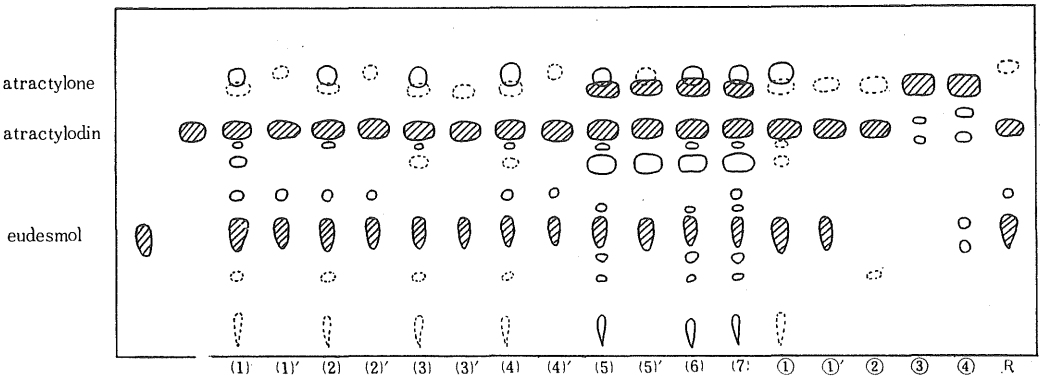


Fig. 3 Thin layer chromatogram of Zhu

plate : Kieselgel G (Merck) 0.25mm
solvent : n-hexan : benzen : ethylacetate (70 : 15 : 15)
detection : p-dimethylaminobenzaldehyde-sulphuric acid reagent (heating)
(1)—(7) : sample TAS oven
(1′)—(5′)①′ : essential oil
①—④ : standerd-TAS oven
R : refereuce (Shin-Sojutsu)-TAS oven

Fig 3 に示す通りである。

標準物質として同時に展開した eudesmol は大阪大学薬学部吉岡一郎博士から恵与されたもの，atractylodin は著者等が TLC によって分離し，紫外部吸収およびエールリッヒ試液の呈色によって同定[4] したものである。

クロマトグラム上に表れるスポットの数および呈色の濃度については各試料溶液およびスポッテング法の間に若干の差があり，(1)無水エタノール溶液ではスポットの数が比較的多く，(2)精油ではスポットの数が最

も単純であるが呈色は強い，また(3) TAS-オーブン法はきわめて少量の試料から短時間に直接スポッテングすることができスポット数は(2)精油より多く，微量に含まれる成分も確認できるようである。

eudesmol は各試料および標品の①古立蒼朮からそれぞれ対応するスポットとして Rf0.33 付近に認められた。(5)天津蒼朮，(6)津蒼朮，(7)東北蒼朮は無水エタノール溶液の場合にやや呈色が弱い。

atractylodin は全試料から明らかに Rf0.58付近に対応する汚緑色のスポットとして確認され，特に標品の②北朝鮮蒼朮の呈色が強い。

atractylone は呈色試液をスプレーするとき，直ちに Rf0.71付近に赤色を呈するスポットとて認められ，(1)無水エタノール溶液の場合試料の(5)天津蒼朮，(6)津蒼朮，(7)東北蒼朮および標品の③唐白朮，④日本産オケラで著明に，また①古立蒼朮でわずかに認められた。しかし，(3) TAS-オーブン法によれば(1)西北蒼朮，(2)古立蒼朮，(3)古立蒼朮，(4)唐蒼朮で淡赤色のスポットとして認められ，特に本法により従来高橋等の研究[3]で atractylone を全く含まないとされていた②北朝鮮蒼朮にもわずかに同呈色のスポットが認められたことは興味深いことである。

前報で報告したように atractylone と同時に同呈色を示すスポットが Rf0.47 付近に認められ，このスポットを示すものは試料の(5)天津蒼朮，(6)津蒼朮，(7)東北蒼朮で，これらの朮は Rf0.21 付近にもわずかに淡赤色を呈するスポットを認める。これら2種の物質のうち前者は試料の個体によっては atractylone よりも呈色の濃い大きなスポットとして認められ，試験管内でエタノール浸液にワニリン・塩酸試液を加えるとき atractylone の呈する赤色に加算されて濃度を強くするもので，この反応を応用して白朮の確認試験および蒼朮の純度試験としている現日本薬局方の規格に若干の問題点があることは著者がすでに指摘[4]した通りである。

これらのほかに(3) TAS-オーブン法では全試料および標品①古立蒼朮で atractylone の上部に隣接してかつ色のスポットを，(1)無水エタノール溶液で試料の(1)西北蒼朮，(5)天津蒼朮，(6)津蒼朮，(7)東北蒼朮および標品①古立蒼朮が eudesmol の上部に淡汚緑色の小スポットを，また全試料および標品①古立蒼朮で Rf0.17付近に淡紫色の小スポットを認める。

以上のスポットのほかはいずれも小スポットで呈色もきわめて弱く，生薬の個体差によって一定ではなく，識別の基準となり難いものである。

参考試料として同時に展開した大阪大学標本の津蒼朮は1963年12月以来約10年を経過しているがeudesmolおよび atractylodin のスポットが(1)無水エタノールおよび(3) TAS-オーブン法で確認することができたが，そのほかのスポットはいずれも呈色か微弱で，個体差による確認なども試料が少ないため実施不可能であった。

考　察

(1)西北蒼朮，(3)古立蒼朮，(4)唐蒼朮は性状および TLC 像が類似している。(2)古立蒼朮は形態および TLC 像でわずかに前3者と差があるように認められ，香港経由という点に若干の問題点はあるが，これらはいずれも同種～近縁のものと考えられる。

以上の4者は流通名を異にしているものの，同一異名が行なわれ，取扱業者によっては本来の古立蒼朮にかわるいわゆる粉をふかない古立蒼朮としている可能性がある。

これら4者と標品①古立蒼朮との相違点は標品の表面に特徴的にあらい縦しわがあり，質は堅く，精油含量も高くまた白色綿状結晶を析出することおよびTLC像に若干の差が認められることである。

中国における *A. lancea* の自然分布は江蘇，安徽，湖北，江西，浙江の各省および河南省の南部であり，生薬としての主産地は中央部の江蘇，湖北省で，武漢地区が出荷地として知られている。分布地理学上から中国西北部の内蒙古，河北，山西，陝西，甘粛，山東および河南省北部に自然分布するものはシナオケラ *A. lancea* var. *chinensis* で，その根茎から調製された朮を北蒼朮（山蒼朮，津蒼朮）と称し，天津が集荷および出荷地として知られている。西地を冠する実験試料の西北蒼朮は天津経由のものであることからもシナオケラを基原とすることも考えられるが，参考試料の津蒼朮（*A. lancea* var. *chinensis*）が古いため精油成分の経年変化も当然考えられ，種の識別基準とすることができなかったことはなはだ残念なことである。

(5)天津蒼朮，(6)津蒼朮および(7)東北蒼朮は大部分の外皮が除かれていて外観上類似のものであるが，前2者は質軟く，横切面が油浸によって全面黄かっ色を呈し，油室が不明確であり，東北蒼朮は質堅く，横切面は類白色で油室も明らかに認められる。しかし TLC 像では有意の差が認められないことから同一基原のもので，調製法が異なるものである可能性がある。しかし東北蒼朮の性状は，さきに高橋博士が報告[3]された中国の東北地区に産する東北大個朮の性状記載に類似点があり，東北を冠し大連港から出荷されていること

から同種とも考えられる。東北大個朮は中国東北部でシナオケラとオケラの分布地域の接する地域で両種が自然交配をおこして生じた雑種植物の根茎と推定されたが正確な考定は保留されているものである。近年この東北大個朮は日本市場に流通なく，前報で大阪大学標本のうち1個を分与されたものについて報告したが，1953年以来の保存品で，成分の経年変化を考慮するとき基準試料とし難いが，eudesmol および atractylodin が著明に，また atractylone がきわめて弱い量色であるが認められる点など類以点が多い。

本研究の考察は主として精油成分を TLC 像から比較検討したが，朮類は成分含量に個体差があり，古立蒼朮および試料の(1)西北蒼朮，(2)古立蒼朮，(3)古立蒼朮，(4)唐蒼朮の中には炮製によると考えられる一部炭化した部分があることから精油成分は一部変化～揮散していることも考えられる。また(5)天津蒼朮および(6)津蒼朮は横切面の油浸現象から水中での剝皮調製作業が推定され，試料間の個体差を考慮すれば製品としての生薬から成分的に基原植物を判断することにはある程度の限界がある。

いずれにしても，中国に分布する *Atractylodes* 属には数種あり，またキク科植物であるから自然交配なども考えられ，正確な同定は産地および集荷～出荷地の現地調査が必要である。

朮類のように複雑なものは流通過程で，つねに現産地名および出荷地をチェックして取扱うことが必要で，これが種の判定および品質評価にかなり重要な役割りをはたすものである。

最後に実験試料を日本薬局方の規格から考えるならば，全試料から atractylodin が確認されることから，これらは日本薬局方蒼朮のカテゴリーに入るものと考定する。ただし，精油含量で基準より若干低いものがあった。薬局方の規格は流通生薬の品質を確保する一定基準であるから，いたずらに低い基準を設けて祖悪品を救うべきものではないことは当然であり，数多くの生薬について詳細な調査を行なう必要がある。

謝　辞

本研究に当り終始ご鞭撻をいただいた当所松本茂理化学部長，eudesmol の標品をいただいた大阪大学吉岡一郎博士および貴重な標本を分与され有益なご助言をいただいた同大学の米田該典氏，研究全般にわたり有益なご助言をいただいた国立衛生試験所西本和光博士，輸入朮類の標本を提供された三国商店永井吉澄氏，紀伊国屋漢薬局，山本薬品工業K.K，内田商店，志平商店，第一薬品K.K，TAS-オーブンの使用についてご便宜をただいた株式会社シュミットの方々に深甚な謝意を表します。

参考文献

1）中葯志（I），312（1955）
2）Stahl, E: Chromatographische und Mikroskopische Analyse von Drogen, 22（1970）
3）高橋真太郎，難波健輔：生薬学雑誌15 246（1961）
4）西川洋一，勝田隆子，上原真一：東京都立衛生研究所年報 23 73（1972）

生薬の品質評価に関する研究（Ⅱ）

オウバク（黄柏）中のベルベリン含量と灰分の通年変化について

渡辺四男也* 上原真一* 西川洋一*
伊吹直登** 小林正夫** 田中孝治**

STUDIES ON THE EVALUATION OF CRUDE-DRUGS (Ⅱ)

SEASONAL VARIATION OF BERBERINE CONTENT AND TOTAL ASH IN THE PHELLODENDRI CORTEX

Yohya WATANABE, Shinichi UEHARA, Yoichi NISHIKAWA, Naozumi IBUKI, Masao KOBAYASHI and Koji TANAKA

(Division of Pharmaco-Chemistry, Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan Research Laboratry of Public Health)
(Medicinal Plants Garden, Tokyo Metropolitan Government)

Summary

The investigation for seasonal variation of the bark of *Phellodendron amurense* cultivated in Tokyo were made by the measurement of berberine content, total ash, loss on drying and moisture.

The results indicate that berberine content is not maximum at the most proper season, July, for rind of the bark, and total ash of the old tree is more than that of the youngers.

Additionally, the moisture of bark increases during the spring to early summer and decreases in autumn.

1. 緒　言

オウバク（黄柏）は berberine, palmatine, jateorrhizine 等のアルカロイドを含み，神農本草経以来重要な漢薬で，そのエキスとともに日本薬局方（以下 J. P. VIII と略す）に収載され，苦味健胃薬，整腸薬およびベルベリン原料生薬として広く使われている。

オウバクの基原である *Phellodendron* 属は中国，北朝鮮，台湾および日本各地に自然分布し，北海道，長野，岐阜，鳥取，福島その他数県で生産され，古くから奈良県では陀羅尼助，山陰地方では煉熊，飛騨，信州では百草などとよばれて民間薬として内用されたほか，打撲症などにも外用されてきた。

J. P. VIII ではオウバクの基原を *Phellodendron amurense* Ruprecht (*Rutaceae*) またはその他同属植物の周皮を除いた樹皮と規定し，さらに本品を乾燥したものは，ベルベリン（$C_{20}H_{19}NO_5$：353.38）として1.0

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
**東京都薬用植物園

%以上の含有量を，乾燥減量は9.0%以下，灰分は6.0%以下と品質の基準を設定している。

このキハダは我が国におけるベルベリン資源として重要な価値ある植物であるが，その樹皮中のベルベリン含量の変化を樹種別，産地別，採取部位別，性別，樹令別等について詳細に調査した報告は少ない，わずかに木村等[1]が岐阜県および石川県に野生するオオバノキハダ *Phellodendron japonicum* Maxim. の樹令87～130年生について幹皮，枝皮，小枝皮のベルベリン含量を測定し，この順序に含量が低下していくことを報告している。

同時に木村等[1]は9，10，11，12月および翌年の4，6，7，8月にわたり，毎月中旬に採取調製した試料について乾燥減量，灰分，エーテルエキス，ベルベリン含量を測定し，7月にベルベリン含量が最も高くなり，8月，6月の順に低下していくことを合せ報告している。

また最近，堀越等[2]は樹種別，性別，採取部位別に樹皮中のベルベリン含量の精査を試み国立衛生試験所春日部植物栽培試験場で栽培した *Phellodendron amurense*（45年生）と交雑種 *P. amurense* × *P. japonicum*（43年生）の2樹種の性別，計4種について7月下旬～8月上旬に採取した試料につき，根部，根頭部，幹部，枝部等のベルベリン含量を測定している。

そして木村等[1]と同様，ベルベリン含量はいずれも根部，根頭部において最も高く，主幹部は下部より上部，枝部にしたがい低くなる傾向を認めている。

この様に，1樹について採取部位によるベルベリン含量の分布を調査した報告はあるが，1年間を通じてその含量変化を詳細に検討した報告はない。

またオウバクの灰分は J. P. VIII で6.0%以下と規定されているが，近年の市場品に関する著者等の実測調査によれば33例の平均値は7.6%（6.2～9.0%）を示し，いずれも不適品となる。

しかし，灰化温度範囲の規定が450～550°と J. P. VIII で始めて規定されたにもかかわらず，その規格値が J. P. VII と全く同数値であることに若干の問題点があり検討の必要がある。

合成医薬品の効果および薬害が社会問題となり，特にキノホルム製剤の薬害事件以来，ベルベリンの殺菌効果が再認識されてオウバクの評価が高まり，製剤原料またはベルベリン原料生薬としての消費が急増し，中国，北朝鮮，台湾等から輸入されているが，輸入品の中にはベルベリン含量の少ない粗悪品も多く，良質品種の国内栽培増産がさけばれている。

そこで著者等はオウバクの生産条件設定および指導と原料生薬の品質評価を目的として東京都薬用植物園で栽培した *Phellodendron amurense* の20年生10種については毎月，8年生10種については隔月にベルベリン含量および灰分を測定し，合せて含水率，乾燥減量の通年変化を検討した，また2樹については採取部位別による分布も比較検討したので報告する。

2. 実験の部

2-1 実験材料

東京都薬用植物園において栽培した樹令8年生と20年生の *P. amurense* 21種（♂17種，♀4種）および都立衛生研究所に植栽した樹令25年生の *P. amurense* 1種である。

8年生の *P. amurense* はコナラ，クヌギ，クリ等の雑木材に囲まれ，樹間1.5mほどに密植されているため日照はあまりよくない。一方20年生の *P. amurense* は南側にトの字型に樹間3m近い間隔で植えられ，日照は良好である。

2-2 試料の採取と調製

ベルベリン含量，灰分，含水率および乾燥減量の通年変化の試料としては20年生の *P. amurense* 10種をもちいて毎月下旬，8年生の *P. amurense* 10種については隔月の下旬に地上より高さ1mのところを20cm×10cm の範囲で採皮した。また主幹のベルベリン含量，灰分および乾燥減量の垂直分布を調べるための試料は8年生，25年生の *P. amurense* 各1樹をもちい，7月下旬に地上より50cm間隔毎に高さ20cmの範囲で，実際に生薬として生産される太さの程度まで採皮した。

各試料はコルク層を除き風乾後細切し，さらに粉砕器を使用し中末～微末とした。

2-3 実験方法

(1) 含水率および乾燥減量

コルク層を除去した樹皮は除湿機の前にならべ室温で約1カ月風乾したのち，前後の重量差からその百分率を含水率とした。

また粉砕器で粉末とした試料約3gを精密に量り，J. P. VIII 生薬試験法にしたがって乾燥減量を測定した。

(2) 灰　分

試料約2gを精密に量り J. P. VIII 生薬試験法にしたがって灰分を測定した。

(3) ベルベリンの定量[3]

試料約4gを精密に量り，ソックスレー抽出器に入

れ，エーテル 70ml で1時間抽出脱脂し，エーテルを蒸散させたのち，再びメタノール 70ml を用いて筒管中の抽出液が無色となるまで抽出する，メタノール抽出液をほとんど蒸発乾固したのち，水 30ml を加え水浴中でときどき振りながら10分間加温し，タルク 1g を加えてよく振り混ぜ放冷する，冷後ろ過し，残留物を水 10ml，ついで 5 ml で洗い，ろ液および洗液は合わせ，これに塩化ナトリウム 1.3g および希塩酸 5 ml を加え2分間よく攪拌したのちときどき振り混ぜ 1～5° の冷水につけて約2時間放置する，充分に析出した沈殿を遠心分離して集め，上澄液は傾斜してできるだけよく除き，温湯をもちいて沈殿を溶かし，冷後水を加えて正確に 500ml とし，試料原液とする。ついで試料原液 10ml を正確にとり水を加えて正確に 100ml とし，この液を試料溶液とする。

一方，同じ試料約 3 g を精密に量り，乾燥減量を求め，さきに秤取した定量用試料の量を乾燥物の量に換算する。

別に重クロム酸カリウム（標準試薬）を110°で4時間乾燥しデシケーター（シリカゲル）で放冷したのち，その約 100mg を精密に量り水約 300ml を加えて溶かし，1 N 硫酸 5 ml を加え，さらに水を加えて正確に

Table I The Moisture Content in the bark of *Phellodendron amurense*

Tree number	Sex	Age	Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	an annual average
1	♂	20		% 44.8	% 32.9	% 49.4	% 48.2	% 54.0	% 50.1	% 49.8	% 43.2	% 42.6	% 39.6	% 44.9	% 42.0	% 45.1
2				45.1	36.3	43.1	49.4	52.9	48.9	46.8	42.5	41.9	38.8	41.0	42.0	44.1
3	♀			46.2	35.8	41.1	47.8	51.2	49.5	49.1	44.8	45.5	42.3	45.5	46.1	45.4
4	♂			38.3	31.8	41.8	49.2	53.1	48.0	51.4	42.6	42.5	44.0	44.1	45.8	44.4
5				48.8	44.3	42.7	52.2	55.4	54.1	52.5	47.5	43.6	36.2	43.4	47.8	47.4
6				47.3	43.4	45.8	49.1	55.8	55.2	53.7	48.4	45.1	37.7	41.1	42.4	47.1
7	♀			45.2	47.2	48.3	29.2	57.1	51.4	53.6	44.3	37.0	33.5	45.2	45.3	44.8
8	♂			49.6	46.0	52.2	50.5	58.7	53.6	53.8	48.0	41.5	30.5	49.3	50.5	48.7
9				50.9	43.0	49.8	51.2	55.6	53.2	52.0	44.8	42.1	48.3	46.1	48.5	48.8
10				43.9	40.8	45.9	47.0	51.5	53.0	51.0	48.4	45.0	42.8	42.2	43.3	46.2
mean				46.0	40.2	46.0	47.4	54.5	51.7	51.4	45.5	42.7	39.4	44.3	45.4	—
11	♂	8		48.1		46.0		54.6		56.2		45.1		45.0		49.2
12					47.7		54.1		54.9		46.4		45.5		48.4	49.5
13				46.4		45.3		55.5		60.7		44.4		49.5		50.3
14	♀				38.2		51.7		55.2		50.3		43.6		48.4	47.9
15				45.2		46.4		51.8		57.8		45.9		46.8		49.0
16	♂				27.0		52.7		56.4		46.3		45.0		47.6	45.8
17				46.8		45.6		53.0		59.3		47.1		50.2		50.3
18					35.0		43.8		53.4		45.9		45.4		45.5	44.8
19				47.8		44.2		52.5		59.5		45.8		45.7		49.3
20					33.1		52.1		54.0		35.5		45.3		47.4	44.6
mean				46.9	36.2	45.5	50.9	53.5	54.8	58.7	44.9	45.7	45.0	47.4	47.5	—

500ml とし，この液を標準溶液とする。

試料溶液および標準溶液の 421mμ における吸光度 A_T, A_S を水を対照として測定する。

この時試料溶液の吸光度が 0.2 以下および 0.6 以上の場合は試料原液の量を適宜増減し試料溶液を調製する。

$$\text{ベルベリンの量(mg)} = \frac{A_T}{A_S} \times \text{重クロム酸カリウムの量(mg)} \times 0.9447$$

3. 結　果

3-1 含水率および乾燥減量

Table I, II, に示す如く，2，3の例外はあるが，一般に含水率は春から初夏にかけて高まり，秋に低下する，この傾向は20年生も8年生も同じである。

月別で見ると，20年生ではほとんどが5月に最高値を示し平均でも54.5%と高く，その前後の4月（47.4%），6月（51.7%），7月（51.4%）も比較的高い。一方低いのは2月と10月で，それぞれ平均 40.2 % と 39.4%となっている。

また8年生は隔月のため，前後の数値が明らかでないが，7月付近が高く，2月が低い値を示している。

いずれにしろ20年生も8年生も含水率は年平均44～

Table II The Loss on drying in the bark of *Phellodendron amurense*

Tree number	Sex	Age	Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	an annual average
1	♂	20		% 7.2	% 6.9	% 7.0	% 5.9	% 6.0	% 6.4	% 4.9	% 4.6	% 4.8	% 6.1	% 5.6	% 5.3	% 5.9
2				6.4	6.3	7.1	6.9	6.1	6.8	4.4	4.2	4.2	6.2	6.5	5.7	5.9
3	♀			7.4	6.7	6.2	6.8	6.1	7.0	6.5	6.4	6.7	6.4	6.8	7.4	6.7
4	♂			7.0	7.1	7.6	6.3	4.9	5.6	7.0	6.5	6.8	6.2	5.9	5.4	6.4
5				6.0	6.6	5.7	5.4	5.9	5.9	5.9	6.1	5.9	5.6	6.1	7.0	6.0
6				5.6	7.4	4.7	5.0	5.4	5.3	4.8	5.6	5.6	5.4	5.3	7.2	5.6
7	♀			6.9	6.6	6.4	6.6	6.7	6.5	5.7	5.8	5.9	5.3	5.5	6.1	6.2
8	♂			7.4	7.0	6.1	6.5	6.9	6.5	6.3	6.4	6.4	5.6	5.8	6.5	6.5
9				7.2	6.1	5.3	5.0	5.3	5.1	6.1	5.9	5.9	5.0	5.8	8.1	5.9
10				7.9	7.1	4.8	4.9	5.2	5.4	5.4	6.3	5.4	5.3	6.0	6.0	5.8
mean				6.9	6.8	6.1	5.9	5.9	6.1	5.7	5.8	5.8	5.7	5.9	6.5	—
11	♂	8		8.1		7.7		7.4		5.5		5.8		6.2		6.8
12					6.8		6.8		7.2		5.8		5.4		7.3	6.6
13				6.8		6.8		6.5		5.3		4.9		6.4		6.1
14	♀				7.2		6.3		6.3		5.5		4.6		7.8	6.3
15				7.3		6.4		6.4		5.7		5.0		6.4		6.2
16	♂				6.9		6.3		7.0		5.0		4.8		7.4	6.2
17				7.0		6.9		6.9		7.0		7.0		7.0		7.0
18					6.5		6.8		6.5		6.7		5.3		7.4	6.5
19				6.6		6.4		6.7		6.3		6.4		6.7		6.5
20					6.9		6.4		6.7		6.8		5.2		7.3	6.6
mean				7.2	6.9	6.8	6.5	6.8	6.7	6.0	6.0	5.8	5.1	6.5	7.4	—

50%程度である。

乾燥減量は年平均5.6～7.0％でいずれも J. P. VIII の規定以内である。

3-2 灰　分

Table III に示す如く，灰分は月別変化に規則性はなくまた大きな変動もない，むしろ個体間に差があり，20年生の平均は6.4％であるが5.3～7.4％とその差が2％ほどもある。

さらに8年生（平均5.0％）にくらべて20年生の方が高い傾向にある。

3-3 ベルベリン含量

Table IV に示す如く，20年生では個体間に差があるが，各試料とも，3，5，6月に最高値を示すものが多く，平均値でもこの3カ月には差がない，また7月はこれらの月にくらべ幾分ではあるが含量が低下している。

一方1，2月，11，12月の4カ月は含量が低く，さらに8月にも含量の低下が認められることは特異である。

3-4 主幹の垂直分布

Table V に示す如く，25年生の *P. amurense* についてはベルベリン含量が主幹下部より上部にいくにし

Table III The Total ash in the bark of *Phellodendron amurense*

Tree number	Sex	Age	Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	an annual average
1	♂	20		% 7.2	% 7.4	% 7.8	% 7.6	% 7.9	% 7.3	% 7.7	% 6.9	% 7.1	% 7.1	% 7.4	% 7.2	% 7.4
2				6.8	5.9	6.5	6.6	6.6	6.2	6.4	6.3	5.8	5.7	6.1	6.2	6.3
3	♀			7.0	7.3	6.0	7.1	7.6	7.1	7.0	6.9	7.0	6.3	7.4	7.9	7.1
4	♂			7.4	7.3	6.3	6.8	8.3	6.8	6.8	7.1	6.9	6.6	7.5	7.7	7.1
5				6.0	5.2	5.3	5.7	5.3	5.1	5.2	4.9	4.4	5.1	5.9	5.5	5.3
6				6.0	5.3	5.6	6.3	5.7	5.7	6.0	5.6	5.2	4.9	5.8	5.2	5.6
7	♀			7.6	7.7	6.4	7.4	8.0	6.3	6.9	5.9	5.8	5.6	6.7	6.7	6.8
8	♂			6.3	7.2	6.0	6.0	7.3	5.3	5.8	5.7	5.7	5.2	5.9	6.1	6.0
9				6.7	6.7	6.1	7.0	6.7	5.9	6.4	5.9	6.1	6.5	6.4	6.6	6.4
10				5.8	6.3	5.1	5.8	6.2	5.3	5.9	6.2	5.1	5.1	6.0	6.5	5.8
mean				6.7	6.6	6.1	6.6	7.0	6.1	6.4	6.1	5.9	5.8	6.5	6.6	6.4
11	♂	8		5.7		5.1		5.6		4.7		5.0		4.9		5.2
12					4.3		4.1		4.2		4.4		3.7		4.6	4.2
13				5.4		4.8		4.3		4.9		4.3		5.5		4.9
14	♀				4.6		4.3		4.9		4.4		4.6		4.5	4.6
15				5.3		4.3		5.5		4.7		5.4		5.0		5.0
16	♂				4.0		4.8		4.5		4.2		3.2		4.3	4.2
17				5.4		5.5		6.4		4.8		5.6		5.5		5.5
18					4.4		4.9		5.5		5.3		4.3		5.7	5.0
19				6.3		5.4		6.3		5.7		5.6		5.7		5.8
20					5.4		5.7		5.1		5.0		4.8		5.9	5.3
mean				5.6	4.5	5.0	4.8	5.6	4.8	5.0	4.7	5.2	4.1	5.3	5.0	5.0

Table IV The Berberine Content in the bark of *Phellodendron amurense*

Tree number	Sex	Age	Month	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May.	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	an annual average
1	♂	20		% 3.8	% 3.6	% 4.1	% 4.2	% 4.1	% 4.2	% 4.1	% 3.6	% 4.0	% 4.2	% 3.7	% 3.6	% 3.9
2				4.6	4.5	4.9	4.6	5.2	4.8	4.9	4.9	5.0	4.4	4.2	4.5	4.7
3	♀			3.5	4.0	4.3	4.1	4.3	4.7	4.2	3.9	4.2	4.5	3.8	3.9	4.1
4	♂			3.7	4.3	4.6	4.2	4.5	4.4	4.4	3.4	4.2	4.6	3.5	3.9	4.1
5				2.5	2.8	2.9	2.8	3.3	3.6	3.0	2.4	3.0	2.9	2.2	2.8	2.9
6				4.4	4.3	4.6	4.3	4.6	3.8	4.3	4.1	4.2	4.5	3.8	3.9	4.2
7	♀			1.9	2.1	3.1	3.0	2.6	3.1	3.1	2.5	2.8	2.7	2.3	2.1	2.6
8	♂			2.8	2.8	3.8	3.1	3.8	3.6	2.9	2.7	3.2	3.1	2.5	3.1	3.1
9				4.1	4.2	4.8	4.0	4.5	4.4	3.8	3.7	4.5	4.3	3.2	4.2	4.1
10				3.1	3.5	3.8	3.5	3.8	4.2	3.8	3.9	3.6	3.8	3.2	3.1	3.6
mean				3.4	3.6	4.1	3.8	4.1	4.1	3.9	3.5	3.9	3.9	3.2	3.5	—
11	♂	8		3.7		4.1		4.1		4.4		4.0		4.0		4.0
12					4.5		4.7		4.0		4.0		4.4		4.6	4.4
13				3.4		3.7		3.4		3.3		3.9		3.6		3.6
14	♀				3.4		3.5		3.8		3.2		3.6		3.5	3.5
15				3.9		4.3		5.0		4.4		4.8		4.8		4.5
16	♂				3.8		4.1		3.9		3.7		4.3		4.2	4.0
17				2.1		2.4		3.1		2.6		2.4		2.3		2.5
18					3.6		4.0		3.5		3.5		4.0		3.6	3.7
19				3.0		3.7		3.9		3.6		3.5		3.7		3.6
20					3.6		3.3		3.1		3.4		3.5		3.5	3.4
mean				3.2	3.8	3.6	3.9	3.9	3.7	3.7	3.6	3.7	4.0	3.7	3.9	—

たがい減少してくるという傾向はなく，むしろ灰分に規則正しい低下が認められる。一方8年生では2，3の例外はあるが，ベルベリン含量は幹の上部にいくにしたがって低くなっている。しかし灰分にはあまり差が認められない。

4. 考　察

4-1 試料の採取について

野生キハダの採取は7月下旬，即ち土用頃が最適でその他の時期は樹皮の剥離が困難であり，またこの頃は年間を通じてベルベリン含量が最も高いとされている[1)]。

今回著者等の1人，伊吹によれば実験材料のキハダも6月，7月を除いてはコルク層の剥がれが悪いことを確認している。

このことより野生，栽培キハダに拘らず，樹皮の剥離は7月が優れていることとなる。

4-2 含水率および乾燥減量について

含水率が春から夏にかけて高まり，秋に低下することは，キハダが落葉喬木であることからも推測でき，植物の活動状況とも一致する。また乾燥減量は生薬が一般に風乾品をもちいるものであり，保存中に空気中

Table V The Berberine Content, Total ash and Loss on drying in the bark of *Phellodendron amurense*

Age / Test / Part	25 years old			8 years old		
	Berberine Content	Total ash	Loss on drying	Berberine Content	Total ash	Loss on drying
A	4.8 %	7.5 %	5.0 %	4.6 %	4.7 %	7.6 %
B	5.0	7.0	5.2	4.5	4.9	6.9
C	4.6	7.1	5.3	4.0	5.0	7.2
D	4.3	6.8	5.2	3.6	4.9	6.7
E	4.9	6.7	5.0	3.9	4.9	7.0
F	5.1	6.4	5.0	3.7	5.0	6.8
G	4.8	6.3	5.2	3.8	4.8	7.0
H	4.8	5.7	5.2	3.6	4.7	6.9
I	4.2	5.9	4.8	3.5	4.8	6.0
J	—	—	—	3.9	4.7	6.0
K	—	—	—	3.2	4.6	6.0

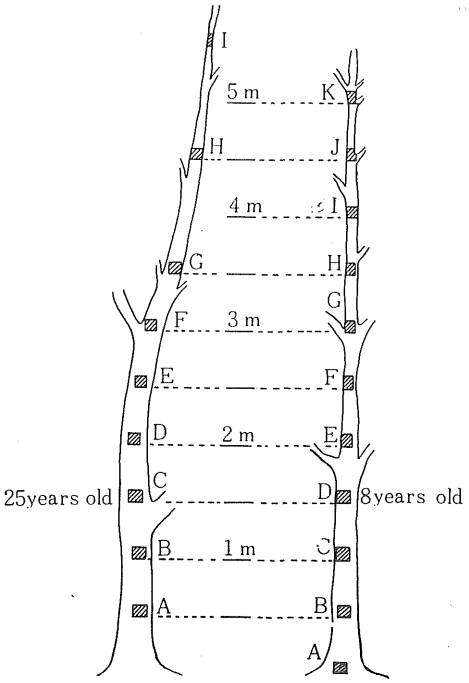


Fig 1. Sampling of Materials : A～K were stripped off 50cm each on the ground.

の湿度により変動することがあるため品質管理の見地から規定されている。それ故保存管理の著るしく悪い条件でない限り J. P. VIII の規準を超えることはないと思われる。

さらに含水率と乾燥減量の間にはなにか関係があるのではないかと推測されたが，相関関係は見い出し得なかった。

4-3 灰分について

一般的に生薬の灰分は同種生薬でも生育時の環境，産地，野生品と栽培品，採取時期等により一定しないことが多いとされているが，今回の栽培キハダに関する限りでは採取時期による変動は少なく，同じ年生でも個体間に差があること，樹令の高いものが低いものにくらべて多くなっていることである。

このことは J. P. VIII で6.0％以下と規定している点から考えると，高樹令のキハダは局方不適品となる危険性がある。

しかし，現在では電気炉で灰化することが一般に普及したことから J. P. VIII では灰化温度を 450～550° と規定したが，規格値は前局方値と変りなく，従来のガスバーナ直火灰化方式の値をそのまま使用しているので規格値改正の必要がある。

4-4 ベルベリンの定量法(塩化ベルベリン沈殿—比色法）と含量について

J. P. VIII では試料10gをもちいメタノール抽出後，ヨウ化カリウムでベルベリンをヨウ化物沈殿として分離し，これをろ過しやすいアセトン付加体（アセトンベルベリン）の結晶に変え，その重量より含量を求めている。したがってこの方法(アセトンベルベリン法)ではヨウ化物沈殿を完全にアセトン付加体のりん片状結晶に変えることが必要である。この付加体の結晶を析出させる操作にはかなりの熟練を必要とし，かつ試料中のベルベリン含有量によっては結晶の析出が見ら

れなかったり，また付加体が粉末状に析出してろ過が困難となり，油状物を析出する等，正確な定量の妨害となるので改めて試料秤取量を増減し定量をおこなうこととなる。

この様に，J. P. VIII の方法は試料使用量が多く，実験時間も長く，かつ技術的熟練を要するため，試料量に制限のある今実験ではメタノール抽出後，塩化ベルベリンとして沈殿分離し特別の熟練を必要としない本法が優れている。また試料溶液の吸光度が0.2～0.6になるよう試料原液を増減していることは，検量線の直線性を考慮しているからではなく，本法が対照標準法であるために，標準品の吸光度とかけはなれることが誤差の原因となるからである。

なお，本法はアセトンベルベリン法にくらべわずかではあるが低い値となる。

また，ベルベリン含量は，野生品では7月に最高となっているが，今回の栽培品ではそれより早くなっていることは山地と平地における気候の相違からかどうか，その原因等は今後の検討に待ちたい。

4-5 主幹の垂直分布について

木村等[1]および堀越等[2]によれば，ベルベリン含量は主幹では根部に近い下部より上部，枝部にしたがい減少することを確認しているが，著者等の実験では8年生が同じ傾向を示す，しかし25年生はバラツキがあり，下部と上部でもあまり差がない。

また灰分は8年生では変化がないが，25年生では下部より上部へと低下していくことは樹令差とも合せ考えて興味深い。

5. 要　約

(1) キハダの採取は野生品と同様栽培品でも7月が最もコルク層の剝離が容易である。

(2) 含水率は春から夏に高まり，秋へと低下する。

(3) 灰分は個体間に差があるが，老樹は若樹にくらべ一般的に含有率が高い。

(4) ベルベリンの含量は栽培品で3月，5月，6月に最高値を示すものが多く，この3カ月は平均値もほとんど等しく，高い。

謝　辞

本研究にあたり，御指導，御鞭撻を賜わった当所松本茂理化学部長，ベルベリンの定量法について御指導を賜わった国立衛生試験所西本和光博士に深謝致します。

参　考　文　献

1) 木村雄四郎，小泉清太郎，明翫澄江：薬学雑誌，73，194（1952）

2) 堀越司，田辺猛，武良哲雄，富永敏夫：生薬学雑誌，27，44（1973）

3) 西本和光：医薬品研究投稿予定

毒物または劇物を含有する家庭用品の試験方法に関する研究（I）
市販婦人および乳幼児用肌着中のホルマリンについて（1）

吉原武俊* 奥本千代美*
福士真知子* 松本茂*

STUDIES ON EXAMINATION METHODS OF HOUSEHOLD-NECESSITIES CONTAINING POISONOUS CHEMICAL SUBSTANCES (I)
DETERMINATION OF FORMALIN IN LADIES' AND CHILDREN'S UNDERWEARS ON THE MARKET. (1)

Taketoshi YOSHIHARA Chiyomi OKUMOTO
Machiko FUKUSHI and Shigeru MATSUMOTO

(Division of pharmaco-Chemistry, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Recently, skin troubles with clothes offer a problem, and formalin is presumed to be one of the causes; thus, its determination from clothes was discussed and its content in commercially available clothes was examined.

Some methods are shown in Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists and JIS for determination of formalin, and acetylacetone method was selected seeing from reproductivity and stability.

Formalin from ladies' and children's underwears on the market was determined, and from Bemberg products it was detected with a high level. As the result of discussing the extraction method, it was found out the observed value varied depending on pH and temperature.

It will be due to that as the sample was extracted in an acidic area or under heat, the formalin combinig to regin is eluted partially as free formalin.

1 はじめに

最近，毒物および，劇物による事故が多発しているが，これは化学工業が発展した今日繊維製品，洗剤，家具および化粧品など我々の日常生活に密着した日用品の多くに種々の化学物質が使用されているためと思われる。昭和46年に毒物および劇物取締法の改正が行なわれ，劇物を含む家庭用品等が新たに指定され一部についてその使用基準や試験方法等が公布されたが，なお不充分な点が多く特に試験法に関しては今後の検討，改良および新試験法の設定が必要とされる。著者らは家庭用品に含まれる有害物質の試験方法について

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

調査研究することとし，衣服による皮膚障害[1)2)3)]が問題となっているおりから，まずはじめに衣服中のホルマリン[4)5)6)]について研究し，検討を行なった。

ホルマリンの測定法はアセチルアセトン法[7)]，クロモトロプ酸法[8)9)]，および螢光法[10)]などが報告されているが，衣服中のホルマリン試験法として衛生試験法[11)]ではアセチルアセトン法とクロモトロプ酸法，JIS[12)]ではフロログルシン法とヨウ素法が採用されている。また，衣服からの抽出条件も衛生試験法は水，JISは非イオン系浸透剤溶液によりホルマリンを抽出する点などの相違がみられる。

そこで著者等はアセチルアセトン法その他の定量方法および衣服からの抽出条件等について検討を加え，ついで都内で市販されている婦人および乳幼児用肌着85品目についてホルマリンを定量したので報告する。

2 実験方法

2-1 試　薬

a．ホルマリン標準原液：市販のホルマリン（約37％ホルムアルデヒド溶液）7 mlを水に溶かして100mlとする。この溶液中のホルムアルデヒド含量は局方のホルマリン定量法に従い標定する。

b．ホルマリン標準溶液：ホルマリン標準原液20 mlを正確に量り，水を加えて正確に100mlとし，さらにこの液2 mlを正確に量り，水を加えて正確に100 mlとする。（HCHO：約100μg/ml）この液の適量をとり，水で希釈して必要なホルムアルデヒド濃度の溶液を調製し，ホルマリン標準溶液として使用する。この溶液は用時調製する。

c．アセチルアセトン試液：酢酸アンモニウム150 gを水に溶かし，氷酢酸3 mlおよびアセチルアセトン2 mlを加えたのち，水で全量1000mlとする。

d．フロログルシン試液：フロログルシン0.1 g，1 gおよび5 gをそれぞれ2.5規定水酸化ナトリウム溶液に溶かして全量100mlとする。

e．0.01％非イオン系浸透剤溶液：市販のポリオキシエチレンアルキル型浸透剤「サンモリン11（三洋化成）」の1 gを水に溶かして全量100mlとし，さらにその1 mlをとり水で全量100mlとする。

2-2 装　置

日立自記分光々度計　EPS-3 T形

日立螢光分光々度計　203形

2-3 ホルマリンの試験法

a．アセチルアセトン法：ホルマリン標準溶液5 mlをとりこれにアセチルアセトン試液5 mlを加えて混和し60°の水浴中で10分間加熱し，冷却したのち，波長420mμにおける吸光度を測定する。対照液は水5 mlについて同様の操作を行なったものを用いる。

b．フロログルシン法：標準溶液を40mlとり，フロログルシン試液を適量加えてよく振りまぜ，発色が最高となったとき，波長470mμにおける吸光度を測定する。対照液は，水40mlについて上記と同様に操作したものを用いる。

c．螢光法：上記aに準じて操作したのち，励起波長410mμ，選択波長510mμにおける螢光強度を測定する。

2-4 試　料

婦人および乳幼児用肌着は都内のデパートおよびスーパーマーケットにて昭和47年11月から48年5月の間に購入した。価格，材質，メーカーにかたよりのないように注意を払った。

2-5 衣服中のホルマリン定量

a．ホルマリンの抽出液の調製

細切した試料をホルマリンの含量により，1～10 gを精密に秤り，共栓試験管にとり，水100mlを加えて密栓し，60°の水浴中で30分間振とう抽出し，温時濾過する。この液5 mlにアセチルアセトン試液5 mlを加え60°の水浴中で10分間加温したとき黄色を呈しなくなるまで抽出を操り返す。

b．検液AおよびBの調製

aで得た抽出液を必要に応じて遠心分離し，澄明な溶液を検液Aとする。

抽出液の10～50mlを500mlの蒸留フラスコにとり，20％リン酸1 mlを加えたのち200mlのメスフラスコに水5～10ml入れたものを受器として用い，冷却器のアダプターが水につかるようにして水蒸気蒸留を行なう。留液が約190mlになったとき，蒸留をやめ，アダプターを水でよく洗って正確に200mlとしこれを検液Bとする。

c．ホルマリンの定性試験

検液Aを5 mlとりアセチルアセトン試液5 mlを加え60°の水浴中で10分間加温したとき呈する黄色が，水5 mlについて同様操作したときの呈色より強い場合ホルマリン⊕と判定する。

d．ホルマリンの定量試験

前項cで⊕と判定された試料については，検液AおよびBの5.0mlを正確に量り，アセチルアセトン試液5.0mlを加え60°の水浴中で10分間加温し，水で冷却したのち，水5 mlについて同様の操作を行なったものを対照に420mμにおける吸光度を測定し，別に測定

したホルマリン標準溶液の吸光度よりホルマリン濃度を求める。

3 実験結果

3-1 ホルマリン定量方法の検討

a．フロログルシン法

JIS 収載のフロログルシン法は発色時の経時変化の大きいことがすでに指摘[13]されている。

ホルマリン標準溶液5，10，20および30μg/mlを各40mlづつとり，25°で1％フロログルシン試液を0.25ml添加して検量線を作製し，また別にフロログルシン試液を0.5mlにして同様に検量線を作製した。Fig. 1に示すように，吸光度とホルマリン濃度の間に直線関係がみられるのは5～20μg/mlのせまい濃度範囲であり，また試液量によって吸光度の変化する傾向が認められる。

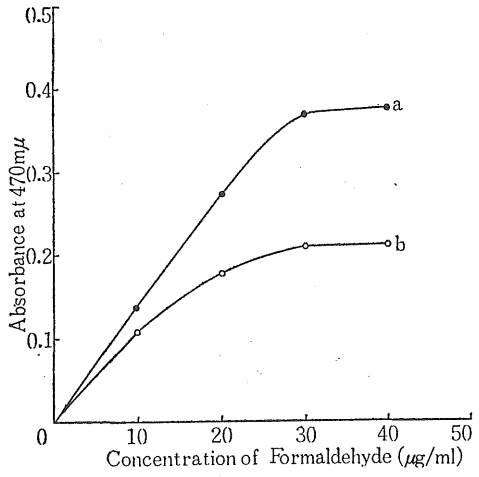


Fig. 1 Calibration Curves for Formaldehyde at Different Amount of Phloroglucinol (by the Phloroglucinol Method)
a：1% Phloroglucinol T. S. 0.5ml
b：1% Phloroglucinol T.S. 0.25ml

試液量を2.0，1.0および0.5mlの3段階とし，発色の経時変化を調べると試液量の増加に従がい，最高発色時の吸光度は高くなり，かつ退色が促進された。（Fig 2）

また，この反応を20，25および30°で行なったところ，30°ではきわめて早い退色が認められる。さらにフロログルシン試液の量が一定の場合，試液のアルカリ濃度によって吸光度および安定時間が変化し，また一定の条件下でも再現性にとぼしいことが認められる。

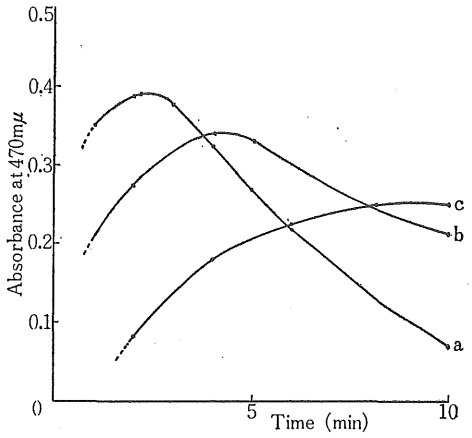


Fig. 2 Effect of Standing Time and Amount of Phloroglucinol on the Absorbance (by the Phloroglucinol Method)
20μg/ml HCHO:40ml
a：1%phloroglucinol T. S, 2.0ml
b：1%phloroglucinol T. S, 1.0ml
c：1%phloroglucinol T. S, 0.5ml

b．アセチルアセトン法および螢光法

アセチルアセトン試液による比色法は，ホルマリン1μg/mlの濃度で十分定量でき，再現性も得られ，また試液の安定性も高く，2週間は使用可能であった。同操作による螢光法は0.1μg/ml以下のホルマリンを検出することができるが，試液による盲螢光のため，アセチルアセトン試液を用時調製する必要がある。

また実際の衣服試料には螢光物質が含まれているため，衣服中のホルマリン測定には安易に応用することができないと認める。

3-2 抽出条件の検討

a．抽出温度と抽出時間

試料を1gとり，(a)20°，(b)40°および(c)60°の水浴中で15～60分間振とう抽出し，定量操作に従ってホルマリンを測定した結果，抽出温度の上昇に伴ない測定値が高くなり，また試料によっては，抽出時間の延長とともにホルマリン測定値が高くなる。

b．抽出回数

試料1gを60°の水浴中で30分間づつ，各水100mlを用いて抽出を繰り返し，それぞれの抽出時に溶出されるホルマリンを測定した結果した結果，高濃度にホ

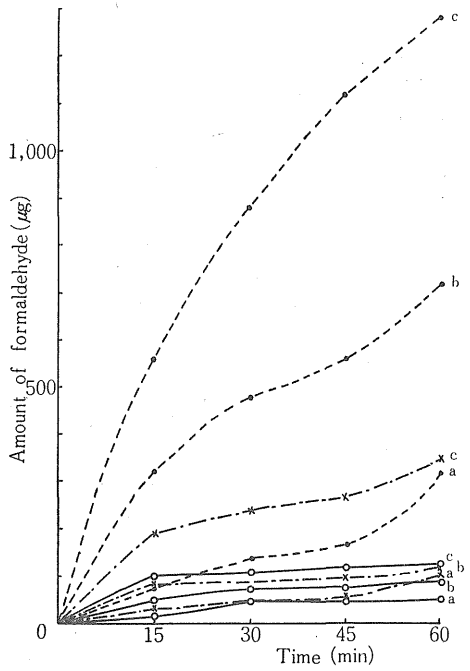


Fig. 3 Effect of Extracting Time and Temperature on the Extraction of Formaldehyde.

a : at 20°C
b : at 40°C
c : at 60°C
●----● : bemlerg
×-·-·-× : nylon, polyurethan
○——○ : cotton

Table I Extraction of Formaldehyde from Samples

Sample No	Material	Fraction				
		1	2	3	4	5
1	P.E. etc	200*	(—)			
2	N.,P.U. etc	900	(—)			
3	N.,C. etc	1,100	500	(—)		
4	N.,B.	4,000	1,300	tr.		
5	B.	6,600	5,800	2,000	1,300	tr.
6	B.	23,400	3,300	1,700	300	tr.
7	N.,B.	25,400	2,900	1,900	600	tr.

* HCHO μg/g
B. : bemberg, C. : cotton, N. : nylon, P.E. : polyester
P.U. : polyurethan, tr. : trace, (—) : non detected

ルマリンを含有するものは2回目以降の抽出液中にもホルマリンが検出された。

c．抽出溶液の種類

水，0.01%非イオン系浸透剤溶液および，0.1%リン酸溶液を用いて，試料1gの抽出を行ない定量操作に従ってホルマリンを測定し，その抽出度を比較した。

Table II Extraction of Formaldehyde with Different Solvents

No	Material	H_2O	0.01% Penetrant soln	0.1%H_3PO_4
1	B.	1,380*	1,620	3,080
2	B.,N.	840	840	5,010
3	C.	90	90	90
4	C.	110	110	150
5	C.	80	—	110
6	N.	60	—	60
7	C.	0	—	0
8	N.	0	—	0

* HCHO μg/g
B. : bemberg, C. : cotton, N. : nylon
— non tested

水と浸透剤溶液の間には，測定値に有意の差が認められないが，この2抽出液に比べ，リン酸溶液により抽出した場合は，はるかに大きな値を示した。

d．PHの影響

リン酸を用いて抽出液のPHを変化させ，PHによるホルマリン測定値の変化を検討した。TableⅢに示すようにPH値が低くなるに従ってホルマリンの値は大きくなる。

Table III Effect of pH on the Extraction

No	Material	PH		
		6	4	2
1	B.	980*	1,100	7,200
2	N.,P.U.	130	200	680
3	C.	90	90	250

* HCHO μg/g
B. : bemberg, C. : cotton, N. : nylon,
P.U. : polyurethan

3-3 直接測定値と水蒸気蒸留後の測定値の比較

抽出液を直接アセチルアセトン法で測定した値（検液Aの測定値）と水蒸気蒸留後の測定値（検液Bの測定値）との間に有意の差が認められる。（TableⅣ）

検液Aは，濾過，遠心分離によっても濁りがとれず吸光度の測定できないものが約半数あった。

Table IV Influence of Steam-Distillation on the Determination of Formaldehyde

No		Material	HCHO addition (μg)	HCHO fouud (μg) without S.D	HCHO fouud (μg) with S.D
Sample*	1	B.	0	2,060	8,970
	2	B.	0	1,930	6,600
	3	B.	0	1,500	5,830
	4	B.	0	940	3,260
	5	B.,N.	0	1,020	2,030
	6	A.	0	850	1,410
	7	N.,P.U.	0	340	620
	8	N.,P.U.	0	220	290
	9	C.	0	320	790
	10	N.,C.	0	150	250
** Standard	11	C.	11,200	11,420	11,220
	12	C.	5,600	5,650	5,310
	13	C.	1,120	1,240	1,040
	14	C.	110	100	90
	15	C.	50	tr.	tr.

* Sample : 1g, ** Stndard=the sample containing no HCHO : 1g
A. : acryl, B. : bemberg, C. : cotton, N. : nylon, P.U. : polyurethan, tr. : trace, S.D. : Steam distillation

Table V Formaldehyde from Ladies' Underwears

Sample name		Material	Cost (yen)	HCHO(μg/g)
Slips	1	C.	395	(—)
	2	C.	580	230
	3	N.	580	(—)
	4	N.	980	(—)
	5	N.	1,500	40
	6	C.,N.	380	140
	7	B.,N.	680	3,740
	8	B.	480	16,340
	9	B.	580	20,400
	10	B.	1,300	25,160
Brassieres	1	C.,P.U.,P.E.	?	490
	2	C.,P.U.,P.E.	900	50
	3	C.,P.U.,P.E.	380	690
	4	C. etc	1,300	790
	5	C.,P.U.,N.	380	1,970
	6	C.,P.U.,N.	480	1,490
	7	P.U.,N.	450	80
	8	P.U.,N.	480	270
	9	P.U.,N.	1,200	620
	10	P.U.,N.	1,400	150
Corsets	1	P.U,N., etc	?	200
	2	P.U,N., etc	290	290
	3	P.U,N., etc	780	(—)
	4	P.U,N., etc	1,300	40
	5	P.U,N., ect	2,100	310
	6	P.U,N., etc	2,600	(—)
	7	C.,N. etc	2,300	70
	8	C.,N.,P.U.	380	70
	9	C.,N.,P.U.	1,800	250
	10	C.,N.,P.U.	2,300	400
Panties	1	C.	130	(—)
	2	C.	180	(—)
	3	C.	180	80
	4	C.	180	80
	5	C.	300	(—)
	6	C.	400	(—)
	7	N.	180	60
	8	N.,B.	100	7,560
	9	N.,B.	200	5,020
	10	N.,B.	280	28,030
Under-shirts	1	C.	330	(—)
	2	C.	400	(—)
	3	C.	450	(—)
	4	C.	600	(—)
	5	C.	700	(—)
	6	C.	1,000	60
	7	C.,N.	380	(—)
	8	N.	280	(—)
	9	C.,A.	250	(—)
	10	C.,A.	600	(—)
Paper-panties	1	R.	50	(—)
	2	R.	50	(—)

A. : acryl, B. : bemberg, C. : cotton, N, : nylon, P.E. : polyester, P.U. : polyurethan, R. : rayon, (—) : non detected, ? : non marked

Table VI Formaldehyde from Children's Underwears

Sample name		Material	Cost yen	HCHO(μg/g)
Singlets	1	C.	130	(—)
	2	C.	180	(—)
	3	C.	280	(—)
	4	C.	300	(—)
	5	C.	340	(—)
	6	C.	400	(—)
	7	C.	450	(—)
	8	C.	530	(—)
	9	C.	600	(—)
	10	C.	680	(—)
Diapers	1	C.	400	(—)
	2	C.	800	40
	3	C.	850	(—)
	4	C.	960	40
	5	C.	1,400	(—)
	6	C.	1,500	(—)
	7	C.	1,600	70
	8	C.	1,700	(—)
	9	P.P.	160	(—)
	10	R.	100	(—)
Diaper-covers	1	W.	630	(—)
	2	W.	800	50
	3	W.	1,400	190
	4	W.	1,500	(—)
	5	W.,N.,P.U.	1,600	(—)
	6	A.	480	(—)
	7	Ac.,P.E.	550	(—)
	8	N.	750	(—)
	9	N.	1,200	(—)
	10	N.	1,300	(—)
Headgear	1	C.	550	(—)
	2	A.	600	1,010
PinaforeC.	1	C.	150	(—)

A. : acryl, Ac. : acetate, C. : cotton, N. : mylon, P.E. : polyester, P.P. : polypropylene, P.U. : polyurethan, R. : rayon, W.: wool, (—) : non detected

Table VII Relation between Formaldehyde and Materials of Ladies' Underwears

Material	Sum	HCHO	
		+	−
B.	3*	3	0
B. etc	4	4	0
C.	14	4	10
Ar.	17	10	7
Ar.,C.	14	11	3

* Numbers of Samples
Ar.: artifical fiber excepting bemberg
B.: bemberg
C.: Cotton

3-4 市販婦人および乳幼児用肌着中のホルマリン

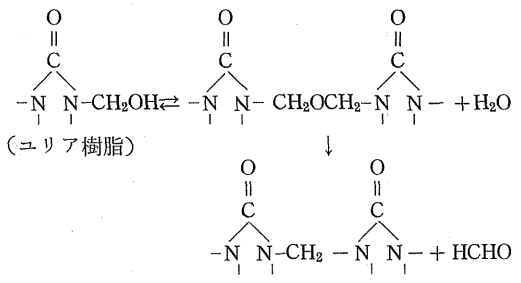
婦人用肌着52検体，乳幼児用肌着30検体を60° の水浴中で30分間，水100m*l* を用いて振とう抽出し，水蒸気蒸留したのち，アセチルアセトン法によりホルマリンを定量した結果，婦人用肌着32検体からホルマリンが検出され，そのほとんどはファンデーション類であった。またベンベルグ製品からはすべて高濃度のホルマリンが検出され，最高値は28030μg/g を示した。

乳幼児用肌着からはホルマリンはほとんど検出されず，プリント模様のオムツ3検体，ウールのオムツカバー2検体から少量のホルマリンが検出された。肌着以外の，ベビー用帽子2検体，よだれかけ1検体について定量した結果，帽子の1つから1010μg/g という高い値のホルマリンが検出された。

4 考　　察

衣服中のホルマリンとして問題となるのは主として，安定化（例えば防皺等）の目的で樹脂加工を行なったセルロース系（綿，レーヨン，ベンベルグ等）繊維であり，ウール，絹などの天然繊維や合成繊維はほとんど関係がないと考えられる。

使用される樹脂にはユリア樹脂，メラミン樹脂，プロピレン樹脂などがあるが，遊離ホルマリンの発生には，次のような機作が考えられている[6]。



すでに述べたように抽出温度の上昇に伴なうホルマリン定量値の増加，抽出時の PH の低下による定量値の増加，水蒸気蒸留操作による定量値の増加等の実験結果は，使用されている樹脂からホルマリンへの分解過程が，酸，加熱等により促進されるためと考えられる。

したがって遊離ホルムアルデヒドのみの測定を目的とする場合，抽出条件を設定するには上記の考慮が必要となる。

5 結　　論

アセチルアセトン法その他の定量法について検討した結果，安定性，再現性などの点からアセチルアセトン法を選び市販婦人用肌着および乳幼児用肌着中のホルマリンを測定した結果，婦人用肌着52検体中まったくホルマリンを検出しなかったものは20検体でベンベルグ製品からは高濃度のホルマリンが検出された。乳幼児用肌着からは，プリント模様のオムツ3検体，ウールのオムツカバー2検体に少量のホルマリンが検出された。

水と浸透剤溶液のあいだに抽出度の有意の差は認められず，リン酸酸性下での抽出条件で測定されるホルマリン値は，水抽出測定値に比べ，非常に高い値を示した。また水蒸気蒸留操作を経たのちの分析値は，蒸留前の値に比較して高い値を示した。

謝　　辞

本研究にあたり，分析法の調査等に多大の便宜を与えられた衛生局薬事衛生課長青柳健太郎氏，多くの有益な御教示をいただいた都立繊維工業試験場の杉山満雄氏，小田急百貨店商品試験係の宮入浩子氏に深く感謝いたします。

（付記）

本研究は昭和47年度当研究所調査研究課題「毒物または劇物を含有する家庭用品の試験法に関する研究(1) 衣服処理剤」の一部として実施したものである。

参 考 文 献

1）浦畑俊博：繊維製品消費化学, 11, 532 (1970).
2）水野良像：　Ibid., 11, 516 (1970).
3）池田佐喜界：　Ibid., 11, 519 (1970).
4）青山光子：　Ibid., 11, 512 (1970).
5）川合英一：　Ibid., 11, 528 (1970).
6）伊藤信也：日本家政学会被服繊維研究委員会講演資料, 33 (1969).
7）Nash, T.: Biochem. J., 55, 416 (1953).
8）West, P. W. and Sen, B.: Z. Anal. Chem., 153,

477 (1956).
9) Sawicki, E., Hauser, T. R. and McPherson, S.: Anal. Chem., 34, 1460 (1962).
10) Belman, S.: Anal. Chim. Acta., 29, 120 (1963).
11) 衛生試験法：衣服処理剤試験法.
12) 日本工業規格：樹脂加工繊物試験方法.
13) 日本染色協会，日本繊物樹脂加工同業会：樹脂加工布のホルマリン臭測定法 (1969).

市販医療用医薬品の品質について(I)

クロフィブレートカプセル

田窪栄一* 重岡捨身*
寺島潔* 宮武ノリエ*

ON THE QUALITY OF MEDICAL MEDICINES (I)

CLOFIBRATE CAPSULES

Eiichi TAKUBO Sutemi SHIGEOKA
Kiyoshi TERAJIMA and Norie MIYATAKE

(Division of Pharmaco-chemistry, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Medicines are usually classified into two major groups, medicines for popular use and those for practitioners' use. As the latter are distributed directly to practitioners without sending to the market, it is difficult to supervise them. Among medicines for practitioners' use the authors researched medicines for circulation system, which have been abruptly demanded recently, and are administered by practitioners for a long term.

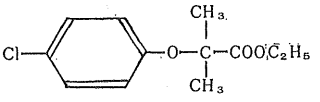
Now, Clofibrate Capsules were tested which are used as anti-hypertensive agent and anti-atherogenesis agent. There were no particular problems as to the content of the main ingredient, disintegration test and free acid impurities, but someproblems were pointed out as to the variation of the capsule content and p-chlorophenol derived from the raw material.

1 はじめに

一般に医薬品は，一般大衆用医薬品と医療用医薬品に大別される。後者は前者のように一般の流通機構を通らずにメーカーから直接医療機関に販売されることが多く，監視の盲点になっていた。著者らは医療用医薬品のうち最近急激な需要をしめ，生産量，使用量が多く，多数のメーカーが競合し，メーカー間の薬価の格差も大きく，しかも医師から長期間にわたって投与される循環器系用医薬品についてその品質を検討することとした。

第一に降圧剤，動脈硬化用剤として用いられるクロフィブレートカプセルについて試験した。

クロフィブレート[1]（以下 CPIB とする）は1962年英国の Imperial Chemical Industries の Thorp & Waring によって開発され Fig 1 の構造式をもつ化合物で，アルコール，石油エーテル，クロロホルムに溶け，水に溶けにくい無色ないし帯黄色の油状物質で特



$C_{12}H_{15}ClO_3$: 242.71
Ethyl-α-(p-chlorophenoxy)—isobutyrate

Fig. 1 Clofibrate

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

有の臭気がある。

CPIB は血中のコレステロール，トリグリセリドおよびリン脂質を低下させ，また血小板の粘着力の低下および血液凝固の亢進した場合にもコレステロールを低下させる生理作用があり，これらの作用から異常に上昇した高脂血症を改善する目的で使用され，急性毒性はマウス経口投与で LD_{50} 1950mg/kg，腹腔注で1625mg/kg といわれている。

2　検体　使用機器　試薬・試液

検体：我々が試験を行った CPIB カプセルは都内から収去された10メーカー，18種である。検体の包装単位は最小120，最大1,200カプセルであり，そのうち任意に60～70カプセルをとり試験を行った。また検体はいずれも軟カプセルで PTP 包装されている。

使用機器：日立自記分光々度計　EPS-3 T型
日立分光々度計　124型
錠剤崩壊試験器（恒温槽付）T-2型
（富山産業ＫＫ）

試薬・試液

メタノール，クロロホルム，4―アミノアンチピリン，フェリシアン化カリウム，炭酸水素ナトリウム，（以上 JIS 特級）

中和エタノール，フェノールフタレイン試液，N水酸化ナトリウム液，0.1N 水酸化ナトリウム液，0.05N水酸化ナトリウム液，N塩酸（以上日本薬局第方試薬・試液による）

n- ヘキサン：JIS 特級 n- ヘキサン50m*l* に対し，0.1N 水酸化ナトリウム液 25m*l* の割合で洗浄し，さらに洗液が中性になるまで水で洗ったもの。

ベンゼン：JIS 特級ベンゼンを n- ヘキサンと，同様に処理したもの。

ホウ酸・水酸化ナトリウム緩衝液（pH8.4）：JIS 特級ホウ酸24.736ｇをとり0.1N 水酸化ナトリウム液に溶かし1 *l* とする。

強塩基性イオン交換樹脂：ダウエックス１－Ｘ８（50～100メッシュ）約３ｇに対し，N水酸化ナトリウム液75m*l* を加え15分放置後洗液が中性になるまで水洗し，さらにメタノール50m*l* で３～４回洗ったもの。

イオン交換カラム：上記で調製した強塩基性イオン交換樹脂を内径約１cm，高さ約20cm のガラスカラムに充てんしたもの。

P- クロルフェノール標準品：東京化成特級 P- クロルフェノールを日本薬局方フェノールの定量法に準じて定量し，純度を求め98％以上のものを用いた。

クロフィブレート標準品：CPIB 原体約100mg を精密に量りメタノールで正確に50m*l* とする。この液2.5m*l* を正確にとり以下 CPIB の定量の試料液の調製と同様の操作を行い得た液をＡとする。別に2.5m*l* を正確にとりイオン交換カラムを通さずに同様の希釈をして得た液をＢとする。ＡおよびＢについて層長 10mm でメタノールを対照として 225mμ 付近の最大吸収波長で吸光度を測定し，各々の吸光度の比より原体の純度を求め99％以上のものを用いた。

3　試験項目および方法

品質を検査するため行った試験項目および方法は次のとおりである。

CPIB はわが国の公定書にはいまだ収載されていないが，NFXIII[2] には CPIB および CPIB カプセルが収載されているので，試験法および判定の参考とした。

1)　性状

各試料につきそれぞれの医薬品製造承認書の性状の項による。

2)　崩壊試験

各試料の６カプセルずつをとり，日本薬局方一般試験法，31崩壊試験法，操作法(4)カプセル剤の項に従い試験を行う。

3)　平均内容量および内容量偏差

全試料は軟カプセルに主剤（CPIB）を充てんしてあるが，CPIB は液体のためカプセルに充てんする際内容量のバラツキが生じやすく，試験を行う必要がある。

操作法

各試料中20カプセルずつをとり，１カプセルずつの重量を量ったのち注射器で内容物をできるだけ抜きとり，ハサミでカプセルを切り開き，エーテルで洗浄したのち約10分間風乾し重量を量る。前後の重量差を各々のカプセルの内容量とし，20カプセルの平均内容量と各々のカプセルの内容量の偏差を，日本薬局方製剤総則，４カプセル剤，硬カプセル剤の重量偏差試験法に準じて試験する。

4)　遊離酸

CPIB は不純物としてP-クロルフェノキシイソ酪酸を混在する。

操作法

カプセルの内容物約10ｇを精密に量り，中和エタノール100m*l* を加え，0.05N水酸化ナトリウム液で滴定する。（指示薬フェノールフタレイン試液２～３滴）。

0.05N 水酸化ナトリウム液 1 ml = 10.733mg$C_{10}H_{11}O_3Cl$

5) P-クロルフェノールの定量

CPIB 製造の際に精製が不十分であると原料として用いた P-クロルフェノール（以下 P-CP とする）が多量に混在するおそれがある。P-CP の毒性は Merk Index（1968年版）によればマウス経口投与で LD_{50} 670mg/kg であり，急激に人体に影響があるとは思われないが，長期間連続して服用する医薬品であるから，NFXIIIでも30ppmという限度を設けている。またCPIBの品質をチェックするためにも是非試験を行う必要がある。

操作法

試料液の調製

カプセルの内容物約2.5 g を精密に量り，n-ヘキサン50ml を加えて溶かし，0.1N水酸化ナトリウム液15 ml ずつで2回抽出する。抽出液を合わせ還流冷却器をつけ沸とう水浴上で1時間加熱し，冷後 0.1N 水酸化ナトリウム液で正確に50ml とする。この液20ml を正確にとりN塩酸を加え中性ないし微酸性とし，さらに新たに製した5％炭酸水素ナトリウム溶液 4 ml を加え，ベンゼン25ml ずつで5回抽出する。抽出液を合わせ水10ml で洗い洗液は捨てる。このベンゼン溶液を0.1N水酸化ナトリウム液15ml ずつで3回抽出し，抽出液を合わせ 0.1N 水酸化ナトリウム液を加えて正確に 50ml とし試料液とする。

標準液の調製

P-CP 標準品約25mg を精密に量り，0.1N水酸化ナトリウム液に溶かし，1 ml 中 P-CP0.5～0.6mcgを含む溶液を調製し標準液とする。

定量

試料液，標準液の 20ml ずつを正確に量り，それぞれ別の100ml の分液ロートに入れる。それぞれにホウ酸・水酸化ナトリウム緩衝液（pH 8.4）20ml を加えよく混和したのち，3％4—アミノアンチピリン溶液 0.2ml，10％フェリシアン化カリウム溶液 0.5ml を順次加え混和し15分放置したのち，クロロホルム10ml を正確に量って加え2分間振り混ぜクロロホルム層をとり，無水硫酸ナトリウム約1 g を加えて脱水する。この液につき，0.1N 水酸化ナトリウム液 20ml を正確に量り同様に操作して得た液を対照として層長10 mmで 455mμ 付近の最大吸収波長で吸光度を測定し定量する。

6) CPIB の定量

操作法

試料液の調整

カプセルの内容物約 100mg を精密に量りメタノールを加えて溶かし正確に 50ml とする。この液 2.5ml を正確にとりイオン交換カラムに通し，さらにカラムはメタノール 15，15，10ml で洗い，流出液を合わせメタノールを加えて正確に 50ml とする。この 2.5ml を正確にとりメタノールを加えて正確に 25ml とし試料液とする。

標準液の調製

CPIB 標準品約100mg を精密に量りメタノールを加えて溶かし正確に 50ml とし，以下試料液の調製と同様に操作した液を標準液とする。

定量

試料液，標準液のそれぞれにつき層長10mm でメタノールを対照として 225mμ 付近の最大吸収波長で吸光度を測定し定量する。

4 試験法の検討

1) P-CP の定量

P-CP を定量するには (1)ガラスクロマトグラフィーによる方法[3]，(2)インドフェノール法による比色定量法[4] があるが，ガスクロマトグラフィーによる方法では主剤の CPIB に含まれる P-CP の絶対量が少ないため，試料をそのままガスクロマトグラフィーに注入することは不適当と考え，インドフェノール比色法により定量を行った。

P-CP のインドフェノール比色法による吸吸スペクトルは Fig 2 に示す通りであり，検量線は Fig 3 に示すように原点を通る直線が得られ，再現性も良好であった。

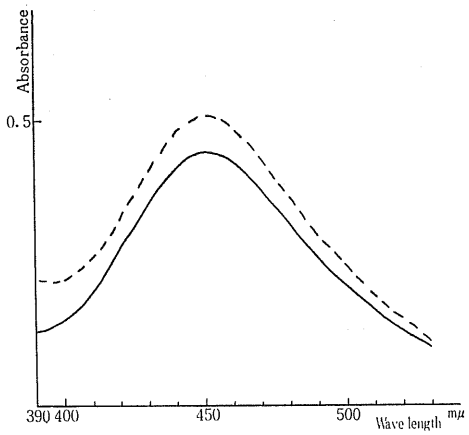


Fig 2 Absorption Spectrum of Colored Solution

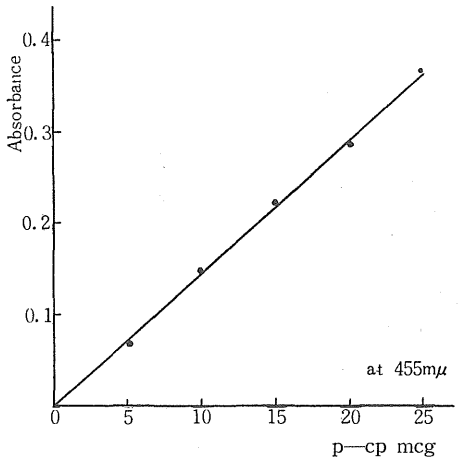


Fig 3 Calibration Curve of p—Chlorophenol

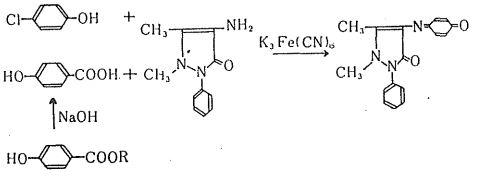


Fig 4 Reaction of p—Chlorophenol and p-Hydroxybenzoic acid

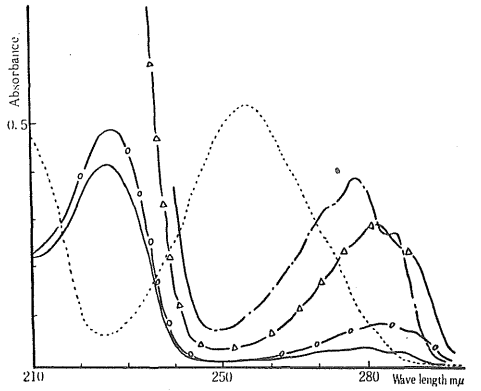
CPIB カプセルの軟カプセルは原料としてゼラチン，ソルビット，グリセリン等を用いるため，しばしばP- ヒドロキシ安息香酸エステル（以下 PHBA エステルとする）を防ばいの目的で添加することがある。このような場合は PHBA エステルがカプセル基剤から主剤の CPIB 中に溶出して，P-CP を CPIB から抽出する際 P-CP とともにアルカリ液に移行してくる。PHBA エステルはアルカリと20～30分接触するとその数%が加水分解され，接触時間が長くなるに従い階段的に PHBA に変化する。この PHBA は Fig 4 に示すように P-CP と同じ反応をし，Fig 2 に示すように P-CP と同じ吸収スペクトルを示し，P-cp を定量する際プラスの妨害となる。PHBA エステルの加水分解はホウ酸・水酸化ナトリウム緩衝液を加えることにより防止できるが数件の検体を同時に処理する場合，短時間で操作することは困難なため，アルカリ抽出液をあらかじめ加熱して PHBA エステルを完全にPHBA に加水分解したのち，炭酸水素ナトリウムアルカリ性でベンゼン抽出し，P-CP と分離する。

本定量法における回収率を見るため(A) P-CP，(B) PHBA と P-CP の混合物について，P-CP を前述の定量法と同様の操作を行い定量した結果(A)では98%，(B)では102%回収できた。

2) CPIB の定量

CPIB の定量には(1)一定過剰のアルカリを加え加熱し加水分解したのち，未反応のアルカリを酸で逆滴定する方法[5]，(2)紫外部吸収法で定量する方法[2] があるが多数の検体を同時に処理するためには紫外部吸収法が適当であると考えこの方法によった。

CPIB の紫外部吸収スペクトルは Fig 5 に示すとおり 2 つの最大吸収があり，今回はNFXIIIに従い10mcg/ml の溶液について225mμ 付近の最大吸収波長で定量したが，278mμ付近の最大吸収波長においても P-CP および PHBA エステルの妨害が少なく，定量性もあると考えられ，今後検討する予定である。



——Clofibrate 10mcg/ml —○—○p—cp 7mcg/ml
—•—•Clofibrate 100mcg/ml —△—△p—cp 20mcg/ml
……PHBA—Me 5mcg/ml Solvent：Methanol

Fig 5 Ultra-violet Absorption Spectrum

先にも述べたように CPIB 製造の際に原料として P-CP を用い，カプセルには PHBA エステルを含むものがある。Fig 5 で示すとおり CPIB を紫外部吸収法で定量するとき，P-CP，PHBA エステルの共存はあきらかに妨害となるが，強塩基性イオン交換樹脂を通すことによりこれらを除去することができるので定量法としては十分と考えられる。定量の際用いる強塩基性イオン交換樹脂の 5 ml について，絶対量として P-CP 約 2 mg，PHBA メチルエステル約2.5mg を通過させ，流出液の紫外部吸収を測定した結果，完全に除去できることを確認した。

5 結果および考察

1) 性状

検体はいずれも特有の臭いをもつ油状の CPIB を赤～橙赤色軟カプセルに充てんしたもので，それぞれの医薬品製造承認書の性状の項に適合するものであった。

2) 崩壊試験

検体はいずれも日本薬局方一般試験法，31崩壊試験法，操作法(4)カプセル剤の項に適合し20分以内に崩壊した。

3) 平均内容量および内容量偏差

18種の検体のうち個々のカプセルの内容量が平均内容量の±10%を越えるものが1カプセル以上（20カプセル中）あるものは11種で Table I にあきらかなようにその中の1種は±10%を越えるものが6カプセルあった。また±20%を越えるものはなかった。すべての検体は表示された内容量が1カプセル中 250mg で，これに対して実測した平均内容量はいずれも241mg～262mg の範囲内で表示量と大差なかった。しかし20カプセルの個々のカプセルの内容量では最も少ないもので210mg，最も多いもので310mg のものがあり，1日3～6カプセル服用する本剤の場合内容量のバラツキは服用量に大きな差が生じ問題と思われる。

4) 遊離酸

検体中の P-クロルフェノキシイソ酪酸はいずれも0.04～0.16%の範囲内にあり，NFXIII の遊離酸の限度0.193%を越えない。

5) P-CP 含量

検体18種のうち NFXIIIに規定されている P-CP の限度30ppmを越えるものが3種あるが，P-CP を全く検出しないものから最大でも1,100ppm までで，今回の結果からは大川ら[3]，丹野ら[4] の報告に見られるような4,000ppm や 6,000ppm を越えるものは見られなかった。また Table I に示すA社，C社のように同一メーカーの製品でも大きな差の見られるものがあり，このようなことは CPIB 原体の原料検査を厳重にすることで防ぐことが出来ると考える。

6) CPIB 含量

主剤である CPIB の含量はいずれも表示量の96～104%で承認された規格の範囲内であった。

以上の結果のまとめを Table I に示す。B社，H社，I社のものは全項目良好であったがA社，C社のように P-CP が30ppm を越えるもの，A，C，D，E，

Table I Results of Clofibrate Capsules

Sample No.	Maker	Disintegration Test	Variation of the Capsule Content ± 10%	Min. (mg)	Max. (mg)	P-CP (ppm)	Free Acid (%)	CPIB (%)
1	A	Good	2	239.2	299.4	30>	0.04	100.0
2		Good	2	233.5	294.4	30>	0.06	102.4
3		Good	2	234.5	297.0	30>	0.04	103.6
4		Good	1	232.6	283.1	110	0.09	102.0
5		Good	4	216.7	286.9	46	0.07	97.6
6	B	Good	0	238.6	259.3	0	0.09	98.4
7		Good	0	242.8	255.0	0	0.06	99.6
8		Good	0	242.5	258.2	0	0.06	100.0
9		Good	0	236.3	252.3	0	0.07	98.4
10	C	Good	4	227.2	293.3	1,100	0.1	100.4
11		Good	0	248.3	252.0	0	0.08	96.0
12	D	Good	2	212.5	282.5	0	0.06	100.4
13	E	Good	6	209.6	310.0	30>	0.08	102.8
14	F	Good	4	220.8	300.1	0	0.07	99.2
15	G	Good	3	200.0	266.9	30>	0.1	98.0
16	H	Good	0	245.4	248.6	30>	0.13	95.6
17	I	Good	0	237.4	283.5	30>	0.09	97.2
18	J	Good	1	227.8	280.0	30>	0.16	99.2

F，G，J７社のように内容量偏差に問題のあるものや，最小内容量と最大内容量に大きな差があるものなど，今後ともCPIBカプセルの品質を試験する必要があると思われる。

謝　辞

この試験に際して貴重な原体を提供して下さった住友化学工業株式会社，有益な御助言を頂いた国立衛生試験所薬品部，ならびに検体の収集にあたられた薬事監視員の皆様に深謝致します。

参考文献

1）最近の新薬，17集，195（1966）
2）National Formulary XIII，173，174（1968）
3）大川重俊，野口実，塩山秀寿，深川緑：月刊薬事，12，1699（1970）
4）丹野慶紀，渡辺勝宏，森川恵美子：衛生化学，16，307（1970）
5）大川重俊，野口実，塩山秀寿，深川緑：月刊薬事，12，1479（1970）

市販医療用医薬品の品質について（Ⅱ）
イノシトールヘキサニコチネート錠

田窪栄一* 宮武ノリエ*
寺島潔* 重岡捨身*

ON THE QUALITY OF MEDICAL MEDICINES (Ⅱ)
INOSITOL HEXANICOTINATE TABLETS

Eiichi TAKUBO, Norie MIYATAKE, Kiyoshi TERAJIMA, and Sutemi SHIGEOKA

(Division of Pharmaco-chemistry, Department of Chemistry, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

In this report Inositol Hexanicotinate Tablets, a mild vasodilator, are discussed as to its quality and quantitative determination, following to the previous report.

For quantitative determination of Inositol Hexanicotinate, usually non-water system titration and a hydrolysing method are employed, but they are not so suitable in the application to formulated products. The authors subjected Inositol Hexanicotinate to alkali decomposition, and determined the formed nicotinic acid quantitatively by means of UV absorption spectrum ; the result was so satisfactory that this method was employed.

The specimen in this experiment showed a satisfactory content of main ingredient in the range of 90–110%, but contents of some other ingredients were not compatible with the specification.

1 はじめに

前報にひき続き，イノシトールヘキサニコチネート錠の品質試験の結果およびイノシトールヘキサニコチネートの定量法について検討したので報告する。

イノシトールヘキサニコチネート（以下 IHN とする）はイタリアの Instituto Biochemico Sperimentale とスウェーデンのボフォースノーベルクルート社との共同研究によって創製された血管拡張剤で，Lindquist ら（1958）および Berge ら（1958）の臨床実験により効力が確認されたものである。IHN は Fig 1 に示す構造式を有し，主として胃において吸収され血液中のエステラーゼによって徐々に分解され，ニコチン酸とイノシトールになる（Fig 1）。したがってニコチン酸の血管拡張作用は緩和で持続的に発現し，脱コレステロール作用やセンイ素溶解作用も発揮する。一方イ

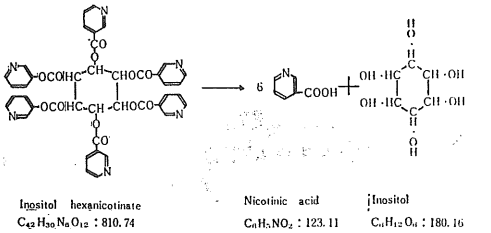


Fig 1

*東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科

ノシトールは脂好性因子として肝臓にコレステロールが沈着するのを防止し，また毛細血管の脆弱性を低下し血栓の形成を阻止する作用がある[1)]

IHN の定量法には①非水滴定用氷酢酸にとかし，0.1N 過塩素酸で滴定する非水滴定法　②一定過剰量のアルカリ液と加熱して IHN をイノシトールとニコチン酸ナトリウムに分解し，残ったアルカリを酸で逆滴定して求める方法がとられているが，①の方法は終末点が識別しにくく，IHN をとかす際非水滴定用氷酢酸のみでは溶けず多量の無水酢酸を必要とするなどの難点があり，②は製剤中の IHN を定量するとき賦形剤が妨害となり，定量値がバラつき，製剤に用いるのは不適当である。そこで，IHN をアルカリ分解し，生ずるニコチン酸を紫外部吸収スペクトルで測定し定量する方法を検討した結果，製剤にも適用性がみられたので，IHN の定量法として用いた。

2　検体，器具および試薬・試液

検体：都内で収去した IHN 錠製剤 6 社10種の製品を検体とした。検体の包装単位は最小 100 錠，最大 1,000 錠であり，ガラスびんまたはヒートシールしたものを缶に納めてあるものである。

器　具：

錠剤崩壊試験器（恒温槽付）T−2 型（富山産業K．K）、ソックスレー抽出装置

円筒ろ紙：ソックスレー抽出に市販の円筒ろ紙（東洋ろ紙 No.84）だけを使用すると，微粉末の賦形剤などが外に出て，濁りの原因となり妨害となるので，その内側に東洋ろ紙 5 C で作った円筒を入れ二重にして使用した。

pH メーター　（東亜電波工業K．K）モデル HM−5 型に非水用電極をつけたもの，

日立自記分光光度計　EPS−3 T型

試薬・試液

クロロホルム，無水酢酸，ジクロルメタン(以上JIS 特級)

非水滴定用氷酢酸

0.1N過塩素酸

塩化メチルロザニリン試液：塩化メチルロザニリン 0.1g に非水滴定用氷酢酸 10m*l* を加えてとかす。

2 N硫酸試液，2 N塩酸試液

2 N水酸化ナトリウム試液

IHN 標準品：IHN 原体をエタノールから 3 回再結晶し，105°で 3 時間乾燥したものを標準品とした。融点250～254°，非水滴定法により求めた純度が 98 %以上のものを使用する。

ニコチン酸標準品：試薬特級のニコチン酸を105°で 1 時間乾燥し，「日局 8 」ニコチン酸の定量法により求めた純度99.5%以上，融点 234～238° のものを使用する。

イノシトール標準品：JIS 特級のイノシトールを 105°で 4 時間乾燥し「日局 8 」イノシトールの定量法により求めた純度97%以上，融点 223～227° のものを使用する。

3　試験項目および方法

品質評価のために行なう試験項目およびその方法は次の通りである。

1）外観，性状

検体の形，大きさ，色，剤型，におい，味などをしらべる。

2）内容量

実際に容器に入っている量は，表示量と一致するかどうかをみる。

3）崩壊試験

第八改正日本薬局方　一般試験法31　崩壊試験法操作法(1)錠剤の項に従って試験する。検体 6 錠を任意に抜きとり試料とし，試験液は水を用い(温度37±2°)，補助盤を入れ，30分間上下運動を行ったのち観察する。

4）平均重量および重量偏差試験

第八改正日本薬局方　製剤総則13　錠剤　「錠剤の重量偏差試験法」に従って試験する。検体20錠を任意に抜きとり，その重量を精密に量り平均重量を計算し，この値と個々の錠剤の重量との偏差（%）が規定値以内かどうかをしらべる。

5）ＩＨＮの定量

定量法としては1)非水滴定法，2)紫外部吸収法を用いた。

1)非水滴定法

検体20錠以上をとり，その重量を精密に量り 1 錠の平均重量を算出し，乳鉢中で研和し均一な粉末とする。IHN として約 1.2g 対応量を円筒ろ紙中に精密に量り，ソックスレー抽出を行う。(抽出溶媒クロロホルム 60 m*l*，温度約 70°C，抽出時間 4 時間)，冷後クロロホルムで正確に 100m*l* にしたのち，その液 15m*l* を共通すり合せなし型コルベンに正確にとり，減圧でクロロホルムを留去し，4 時間減圧乾燥したのち，無水酢酸90 m*l*，非水滴定用氷酢酸 20m*l* を加えて残留物をとかし，塩化メチルロザリニン試液 0.05m*l* を加え，青色を呈するまで 0.1N 過塩素酸で滴定する。終末点はあらか

じめ電位差滴定を行って確認しておく。同時に空試験を行う。

0.1N過塩素酸 1 ml＝13.512mg$C_{42}H_{30}N_6O_{12}$

2)紫外部吸収法

試料液の調製：検体20錠以上をとり，その重量を精密に量り 1 錠の平均重量を算出し，乳鉢中で研和し均一な粉末とする。IHN として約 500mg 対応量を円筒ろ紙中に精密に量り，ソックスレー抽出を行う。(溶媒ジクロルメタン60ml，温度60～65°，抽出時間 4 時間)，冷後ジクロルメタンを加えて全量を正確に100mlとし試料液とする。

標準液の調製：IHN 標準品約 250mg を精密に量り，ジクロルメタンを加えて完全にとかし，正確に 100mlとする。

アルカリ法：100ml の共通すり合せメスフラスコに試料液 5 ml を正確に量り，減圧でジクロルメタンを留去したのち，1時間減圧乾燥する。残留物に 2 N水酸化ナトリウム液 50ml を加え，ふりまぜて残留物を出来るだけとかしたのち，還流冷却器をつけ沸とう水浴中で30分間加水分解する。冷後水で正確に100mlとし，その液 5 ml を正確に量り，水で正確に 50ml とし，層長 10mm で波長 262mμ の吸光度を測定する。対照液は 2 N水酸化ナトリウム 50ml をとり試料液と同様に操作したものを用いる。同時に標準液 10ml について試料液と同様に操作し比較標準とする。

酸法：①100mlの共通すり合せメスフラスコに試料液 5 ml を正確に量り，減圧でジクロルメタンを留去したのち，1時間減圧乾燥する。残留物に 2 N硫酸を加えて完全にとかしたのち 100ml とし，この 5 ml を正確に量り水を加えて正確に100mlとする。この液について層長 10mm で波長 261mμ の吸光度を測定する。対照液は 2 N硫酸 50ml について試料液と同様に操作したものを用いる。同時に標準液 10ml について試料液と同様に操作し比較標準とする。

②2 N硫酸のかわりに 2 N塩酸を用いて①と同様に操作する。

4　紫外部吸収法の検討

1）ソックスレー抽出の抽出溶媒の検討

IHN はエーテル，n－ヘキサンにとけにくく，エタノール，クロル置換炭化水素に比較的とけやすいので，エタノール，クロロホルム，ジクロルメタンおよび四塩化炭素などを抽出溶媒として検討した。ジクロルメタンと比べてそれ以外の溶媒は沸点が高いので，ソックスレー抽出するとき，抽出筒の底を必要以上に加温して他の物質まで抽出する危険性があり，測定の妨害となることが考えられる。これらのうちジクロルメタンは最も沸点が低く38.5°～40.5°で，溶媒留去の過程で短時間に操作ができ，しかも IHN の溶解度が最も高いなどの点から，溶媒をジクロルメタンとした。

2）抽出温度および抽出時間の検討

抽出温度が高いと賦形剤など IHN 以外の物質も抽出されることがあるので，できるだけ低温かつ一定の温度で抽出するようにし，水浴の温度は 60～65° とした。

抽出時間は，IHN 錠の任意の 3 種の製剤を用いて30分，1時間，2時間，3時間および 4 時間に区分して検討した結果，3時間で十分であることが判明したが，使用するソックスレー抽出器によって還流速度に差があり製剤の賦形剤も各社によって異なるので，抽出時間を 4 時間とした。

3）アルカリ法における分解条件の設定

沸とう水浴中で還流冷却器をつけて行い，アルカリ濃度と分解時間を設定するために，アルカリ濃度を 1 N，2 N，分解時間を 5 分，15分，30分，45分，60分と変化させて行った。すなわち IHN 標準品約 250mg をジクロルメタン100mlに溶解した前記の標準液について，設定したアルカリ濃度，分解時間以外はすべて前記のアルカリ法によって行った。(Fig 2)

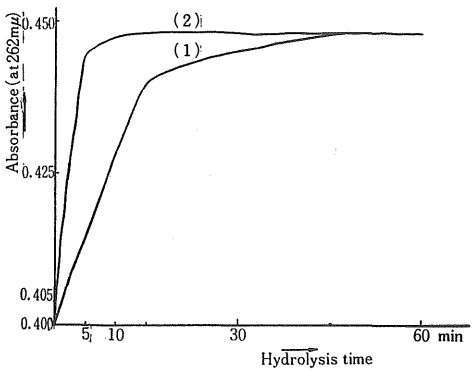


Fig 2. Relation between concentration of sodium hydroxide and hydrolysis time.

The concentrations of sodium hydroxide are 50ml of 1N-NaoH (1) or 50ml of 2N-NaOH (2)

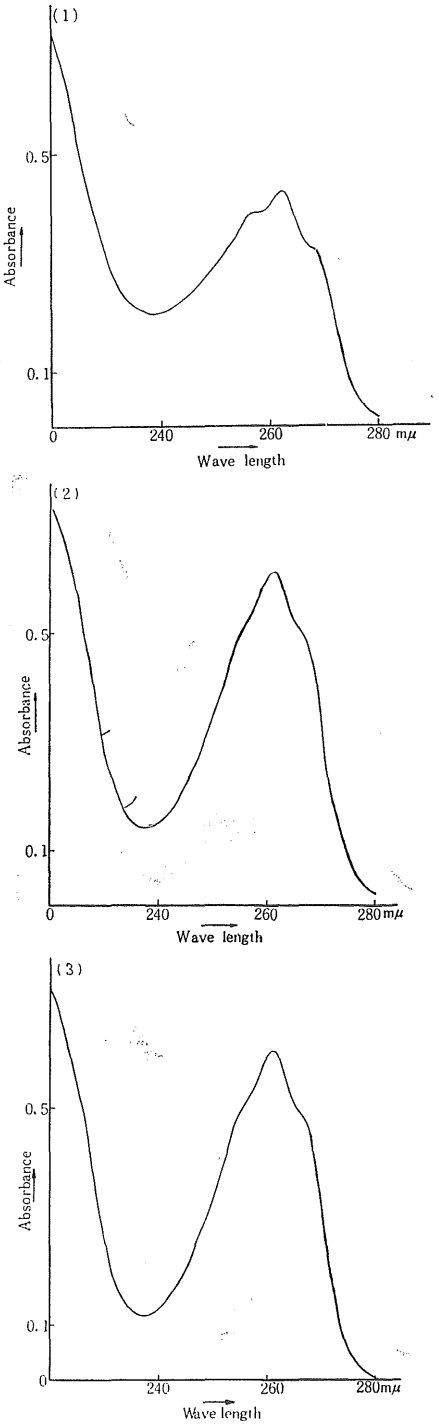


Fig 3. Absorption spectrum of IHN by Alkali method or Acid method

(1) sodium hydroxide solution (20mcg/ml)
(2) hydrochloric acid solution (15mcg/ml)
(3) sulfuric acid solution (15mcg/ml)

その結果，アルカリによる加水分解は2N水酸化ナトリウム液を用いるとき，かなり短時間で完了すると推定されるが，安全を見込んで30分とした。

4）吸収スペクトル

紫外部吸収スペクトルはFig 3の通りである。アルカリ法では最大吸収波長は 262mμ であり，酸法では261mμである。また酸法では塩酸溶液でも硫酸溶液でも同じ吸収曲線を示す。

ニコチン酸を0.1N塩酸，0.1N硫酸，0.1N水酸化ナトリウム液にそれぞれとかし 10～20mcg/ml 含有するよう希釈した液の紫外部吸収スペクトルと，イノシトールの0.1N塩酸溶液，0.1N硫酸溶液または0.1N水酸化ナトリウム溶液の紫外部吸収 スペクトルは Fig 4に示す通りである。これから明らかなようにこの定量法は IHN のニコチン酸を定量するもので，その際イノシトールは妨害にならない。

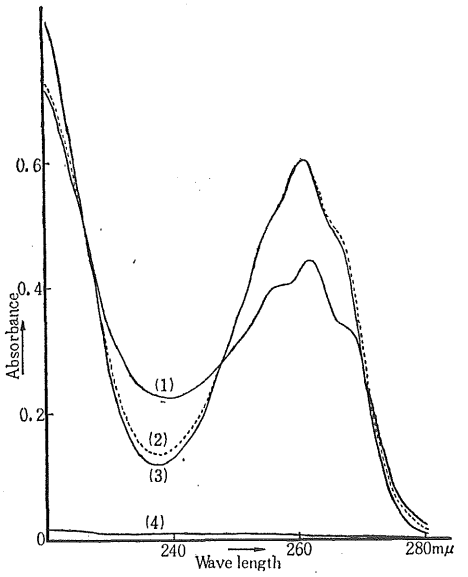


Fig 4. Absorption spectrum of Nicotinic Acid and Inositol

(1) nicotinic acid in sodium hydroxide solution (18.5mcg/ml)
(2) nicotinic acid in hydrochloric acid solution (15mcg/ml)
(3) nicotinic acid in sulfuric acid solution (15mcg/ml)
(4) inositol in solution of sodium hydroxide or hydrochloric acid or sulfuric acid (18mcg/ml)

5）検量線の作製

IHN 約 250mg を精密に量り，ジクロルメタンにとかし正確に 100m*l* とし，その液の 2，4，5，8，10，12m*l* を共通すり合せメスフラスコにそれぞれ正確に量り，ジクロルメタンを減圧で留去したのち，減圧乾燥したものに 2 N水酸化ナトリウム液 50m*l* を加え，還流冷却器をつけ30分間沸とう水浴中で加熱し，冷後水で正確に 100m*l* とし，その液 5 m*l* をそれぞれ正確に量り，水で正確に 50m*l* とした液について検量線を作製した。別にニコチン酸約 230mg を精密に量り 1 N水酸化ナトリウム液にとかし正確に 100m*l* とし，その液 10m*l* をメスフラスコに正確に量り水で正確に 100m*l* とする。この液の 2，4，5，8，10，12m*l* をそれぞれ正確に量り 0.1 N水酸化ナトリウム液で正確に 100m*l* とした液についてニコチン酸の検量線を作製する。(Fig 5)

IHN 約 200mg を精密にはかり，ジクロルメタンにとかし正確に 100m*l* とする。希釈倍率は上述と同様にし，2 N水酸化ナトリウム液の代りに 2 N硫酸を用いて酸溶液の検量線を作製する。次にニコチン酸約 185 mg を正確に量り IHN と同様に操作し，ニコチン酸の酸溶液の検量線を作製する。(Fig 6)

IHN とニコチン酸の検量線は Fig 5，Fig 6 に示すごとくアルカリ液，酸液のいずれの場合も同一となり，原点を通る直線が得られ，Beer の法則に従った。

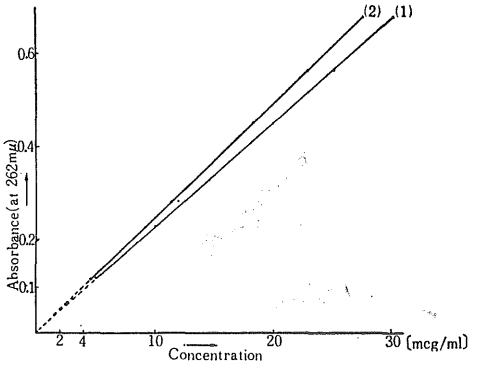


Fig 5. Calibration Curves of Inositol Hexanicotinate and Nicotinic acid.
The test solutions are sodium hydroxide solutions of Inositol hexanicotinate (1) or Nicotinic acid (2)

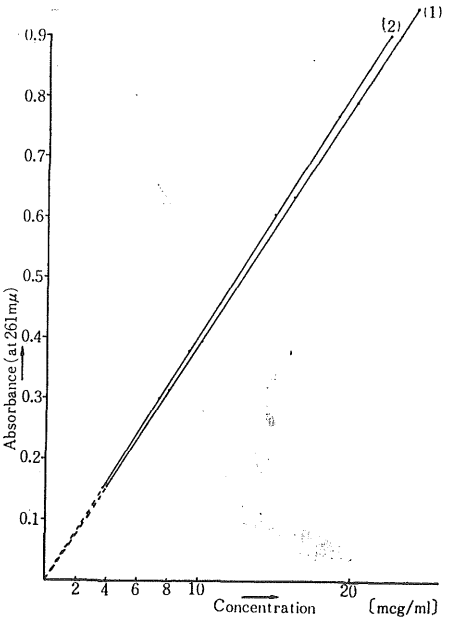


Fig 6. Calibration Curves of Inositol Hexanicotinate and Nicotinic acid
The test solutions are sulfuric acid solutions of Inositol hexanicotinate (1) or Nicotinic acid (2)

5　3種の定量法による定量値の比較

非水滴定法および紫外部吸収スペクトル法（酸法，アルカリ法）により検体を定量した結果は Table I に

Table I. Estimation value in comparison with three kind of methods

Sample Number	Non-aqueous titration method	Spectral analytical method	
		Alkali method	Acid method
	%	%	%
1	97.8	99.7	97.0
2	97.6	99.8	98.7
3	97.3	98.1	97.8
4	97.0	98.6	98.0
5	93.6	94.6	94.2
6	94.3	93.4	94.0
7	97.4	97.6	97.6
8	103.2	104.0	103.9
9	99.0	99.6	101.4
10	98.1	99.0	98.8

示す通りであり，いずれの方法によってもほぼ同じ定量値が得られた。

IHN 錠製剤の定量法としては非水滴定法が多く用いられているが，この方法は終末点が識別しにくく，また IHN が非水滴定用氷酢酸のみではとけにくいため多量の無水酢酸を使うので，検体数の多い場合には問題になる。これに対して紫外部吸収法は操作が簡単で，一度に多数の検体を処理することができるので，製剤の定量法としては非水滴定法より有利である。

6　結果および考察

今回の試験の結果，内容量，崩壊試験および重量偏差試験では10検体いずれも各社の製造承認書の規格あるいは「日局8」に適合した。Table I に示すように，IHN の定量はソックスレー抽出し非水滴定法および紫外部吸収により定量する方法で定量し，10検体いずれもその含量は表示量の 90～110 %でほぼ良好な結果が得られた。しかし検体番号5，6のように規格の範囲内にあるとはいいながら下限に近く，これが同じメーカーの製品であることから，このメーカーには更に表示量に近づけるよう希望したい。また他の2検体については主薬以外の成分分量に関して若干の問題点がみうけられた。この2検体は IHN 以外に賦形剤として「でんぷん，乳糖又はこれらの混合物」が承認されているが灰分について定性試験の結果，マグネシウム塩，カルシウム塩の反応を著明に検出し，承認された成分以外のものを多量に含有していることが判明した。また他の1検体については成分として黄色色素の使用が承認され，検体そのものも黄色の錠剤であるにもかかわらず承認された「規格および試験法」の性状の項には白色の錠剤であると記されている。

この様に今回の試験では承認された内容と製品との間に矛盾した点がみられ，これからの試験検査に問題点として残された。

謝　辞

この試験に際して貴重な原体を提供して下さった東京田辺製薬株式会社，金剛化学株式会社，また検体の収集にあたられた薬事監視員の皆様に，深謝いたします。

参考文献

1)　最近の新薬　13集（薬事日報社）
第八改正日本薬局方，
NF XIII 475 (1970)

有機ハロゲン化合物のケイ光反応に関する研究（第1報）
Diphenylamine を用いる Polychlorinated biphenyl のケイ光薄層デンシトメトリー

観　照雄*　鎌田国広*　植田忠彦*
山添律子*　戸谷哲也*

STUDIES ON FLUORESCENCE REACTIONS FOR ORGANIC HALOGEN COMPOUNDS (I)
QUALITATIVE AND QUANTITATIVE *IN SITU* FLUOROMETRY OF POLYCHLORINATED BIPHENYL USING DIPHENYLAMINE ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Teruo KAN, Kunihiro KAMATA, Tadahiko UETA, Ritsuko YAMAZOE and Tetsuya TOTANI

(Division of Microanalysis, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Diphenylamine (DPA) was found as a useful detection reagent for the determination *in situ* of polychlorinated biphenyl (PCB) on thin layer chromatography. PCB was detected as a spot with stable light blue fluorescence on the thin layer plate by using DPA and irradiating 254 nm of UV ray under the suitable conditions. The quantitative determination of PCB was carried out by the measurement of its fluorescence intensity using fluorodensitometer. When 5–200 ng of PCB (KC–200 – KC–600) was developed on the alumina-thin layer plate containing DPA, and the plate was irradiated by 254 nm of UV ray 10 min., a linear relationship was obtained between the amount of PCB and fluorescence intensity of PCB spot, and the limit of detection was 5 ng. On the reversed-phase partition thin layer chromatography (Liquid paraffin-Kieselguhr), PCB appeared as the spots with fluorescence by irradiation of UV ray for 60 min. after spraying DPA, and it was possibble to confirm the kind of PCB (KC–200 – KC–600) from its chromatographic pattern. Close agreement between the values of PCB in carbonless copying paper, fish and others determined by the methods mentioned above and those determined by gas liquid chromatography was obtained.

緒　言

1964年に有機塩素系農薬の薄層クロマトに際し，川城，細貝[1]は呈色試薬として芳香族アミンを噴霧後，紫外線を照射することによって発色させ，検出する方法を報告している。

著者らは Polychlorinated Biphenyl (PCB) が Diphenylamine のような芳香族アミン試薬の共存下で紫

＊東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科

外線の適当な照射条件を選択することによって，青色ケイ光を発することを認めた。そこで本条件下においてケイ光薄層デンシトメトリーによる PCB への適用を目的とし，基礎的諸条件を検討したので報告する。

すなわち主たる実験としては芳香族アミンの内 Diphenylamine (DPA) を選び，予め DPA を含有させたアルミナ薄層を用いる，一方流動パラフィン—ケイソウ土による逆相クロマトグラフィーを行い DPA を噴霧したのち，適当な紫外線照射下においてケイ光性物質を生成させ，デンシトメトリーによる定量法について検討した。

なお本法に用いた薄層での吸着剤，展開溶媒などは科学技術庁「PCB 分析法研究会[2]」のそれに従った。

実験の部

試薬ならびに実験材料

PCB 標準溶液；カネクロール（以下 KC と略す）−200，300，400，500，600（鐘淵化学工業）のそれぞれ 100mg を n− ヘキサン 100m*l* に溶かし，PCB 標準溶液とする。この標準溶液 1 m*l* は各標準品 1000 μg を含有する。

4.4′− ジクロルビフェニル（ケイ光内標準）；4.4′−Dichlorobiphenyl (Analabs社)

4.4′−ジクロルビフェニルケイ光内標準溶液；4.4′−ジクロルビフェニル10mgを正確にはかり，n− ヘキサンを加えて 500m*l* とする。

有機塩素系農薬；p.p′−DDE（残留農薬分析用，和光純薬）

ジフェニルアミン；ジフェニルアミン（以下 DPA と略す，特級，和光純薬）含水エタノールで2回再結，m.p. 53—54°

1％ DPA 溶液（薄層用噴霧剤）；DPA 1 g をエタノールに溶かし 100m*l* とする。

吸着剤；アルミナ，Aluminum oxide G, type E (Merck社) およびケイソウ土，Kieselguhr G (Merck 社)

シリカゲル溶着プレート；ヤマトリプレート 5 cm ×20cm（ヤマト科学）

展開溶媒；① n− ヘキサン—ベンゼン（19：1），②アセトニトリル—アセトン—メタノール—水（35：20：35：10）に流動パラフィン 20m*l* を加え振りまぜたのち静置し，上層を分取する。③ベンゼン—メタノール（9：1）

装　置

展開槽；縦5.5cm×横21.5cm×高さ21.0cm角形展開槽（萱垣製作所）

紫外線照射器；ミツミ紫外線検出器（254＋366nm）SJ−1031型，6w 2 本（ミツミ科学産業）

薄層アプリケーター；（藤原製作所）

ケイ光薄層デンシトメーター；クロマトスキャナ装置付島津自記分光ケイ光光度計（RF−502）

実験方法

DPA 添加アルミナ薄層クロマトグラフィー

DPA添加アルミナ薄層(以下薄層 a と称する)の調製はつぎのように行なう。すなわち DPA 0.5g をメタノール 55m*l* に溶かし，アルミナ 50g を加えて十分に混和したのち，アプリケーターで厚さ約0.25mm の均一な薄層を作製し，風乾して用いる。加熱活性化を行なうことなく，乾燥貯蔵箱中に保存する。なお本プレートは調製後少なくとも一週間以内に使用した方がよい。

展開ならびにケイ光測定法としては薄層 a の下端から 2.5cm の位置にハミルトン製マイクロシリンジ(10 μl) を用いて PCB 標準溶液ならびに試験溶液 2 μl をそれぞれ塗布し，風乾する。展開槽内にガラスろ紙を巻き，展開溶媒①を用いて上昇法によって展開する。展開距離は10cmとし，展開終了後，風乾し，紫外線照射器より10cm の距離から254nm の紫外線を10分間照射する。この薄層をクロマトスキャナ装置付自記分光ケイ光光度計を用い，原点から展開先端方向に走査を行ないデンシトグラムを測定する。得られたスキャンニングのプロフィルから Rf 値を求め，波高と半値幅の積をケイ光強度とする。

逆相クロマトグラフィー

流動パラフィン—ケイソウ土薄層（以下薄層 b と称する）の調製法は，流動パラフィン 1.8g をクロロホルム 78m*l* に溶かし，ケイソウ土 18g を加えて十分に混和したのち，約 0.25mm の薄層を作製し，風乾したのち，乾燥貯蔵箱中に保存する。

展開ならびにケイ光測定法は薄層 a の展開ならびにケイ光測定法に従って行なう。ただし展開溶媒は②を用い，風乾後1％ DPA 溶液を噴霧してから紫外線の照射を行なう。

ケイ光薄層デンシトメーターの測定条件

負高圧 − 800V，レスポンス 4，カットフィルター UV − 39を用い，薄層の走査スリット 1 mm× 5 mm，走査速度 2 cm/min，記録計チャート速度 2 cm/min，レンジは薄層 a で50mV，薄層 b で200mV とする。さらにヤマトリプレートに基準物質の硫酸キニーネ 300 ng を直径 2 ～ 3 mm の大きさに塗布し，展開溶媒③で展開したスポットに速査スリットを固定して，記録計のフルスケールの50％とする。

結果および考察

顕色剤の検討

PCB の顕色剤としてもっとも安定性がよく，また十分なケイ光強度の得られるものを選択することを目的とし，13種の芳香族アミンを用い，つぎの方法によって検討した。すなわちアルミナ薄層に KC－200～600をそれぞれ200ng ずつを塗布したのち展開を行ない風乾後，0.5～2％の芳香族アミンのエタノール溶液を噴霧する。噴霧後直ちに254nmの紫外線を10～30分間照射し，365 nm の紫外線のもとでそれらのケイ光強度を観察した結果を Table I に示す。

Table 1 Fluorescence Intensity of PCB with Aromatic Amines on Chromatogram

	Aromatic Amines	KC-200	KC-300	KC-400	KC-500	KC-600	Back-ground
1	Aniline	+	+	+	+	+	(—)
2	o-Toluidine	−	−	−	−	−	(—)
3	*α*-Naphthylamine	−	−	−	−	−	(卅)
4	p-Phenylendiamine	−	−	−	−	−	(卄)
5	Benzidine	+	−	+	+	+	(卄)
6	o-Tolidine	+	±	±	−	−	(—)
7	Diphenylamine	卅	卅	卅	卅	卅	(—)
8	N-Methylaniline	+	+	+	+	+	(—)
9	p-Aminodiphenylamine	−	−	−	−	−	(—)
10	Naphthylethylenediamine	+	±	±	−	−	(+)
11	Triphenylamine	卅	卅	卅	卅	卅	(+)
12	N,N-Dimethylaniline	±	−	−	−	−	(−)
13	Tribenzylamine	−	−	−	−	−	(−)

Amount of Kanechlor：200ng
Adsorbent：Aluminium oxide G (Merck)
Developing Solvent：n-Hexane-Benzene (19：1)
Spray Reagent：0.2～2% EtOH soln.
Irradiation：UV light (254nm) 10～30min.
Viewing：UV light (365nm)

ここにみられるとおり，ケイ光が認められるものとして 1) Aniline, 5) Benzidine, 7) Diphenylamine, 8) N-Methylaniline, 9) p-Aminodiphenylamine, 10) Napthylethylenediamine および 11) Triphenylamine の７種があげられるが，これらのうちで特に強いケイ光の得られるものは第２級アミンである 7) Diphenylamine と 9) p-Aminodiphenylamine ならびに第３級アミンである 11) Triphenylamine であった。しかしこのうち p-Aminodiphenylamine と Triphenylamine の両者は安定性や溶解性に難点があるため，今回は安定性，溶解性にすぐれ，プレートの作製が容易な Diphenylamine を用いることとした。

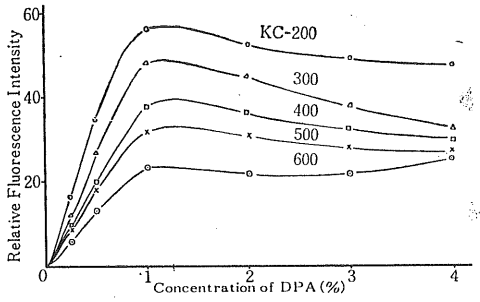


Fig.1 Effect of Concentration of Diphenylamine in Aluminum oxide

Amount of Kanechlor：100ng
Adsorbent：Aluminum oxide G (Merck)
Developing Solvent：n-Hexane-Benzene (19：1)

DPA の添加量

アルミナに添加する DPA の量について検討した。

アルミナに５％以上の DPA を添加してプレートを作製した場合には薄層の表面に結晶が析出し，使用することができないので，DPA の濃度 (wt/wt) を0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0％の６段階に分け，それぞれに KC－200～600を100ng ずつ塗布したのち，展開溶媒①で展開し，紫外線照射後，スポットのケイ光強度を測定した。この表ではバックグランドそのものの

ケイ光強度，色調などは示さなかったが，バックグランドの強度は DPA の濃度が高くなるほど強くなり，ケイ光光度計を用いる測定が困難であった。0.25と0.5%では PCB のケイ光強度が低下するため1%前後が最も適当であることを認めたので，添加量は1%の濃度とした。

また DPA を薄層 b の噴霧剤として用いた場合，ケイ光強度は DPA の濃度に関係なく，0.5%～5%の間のいずれの濃度を用いてもその強度はほとんど変らないことが認められたので噴霧剤は1%溶液を用いることとした。

照射時間の検討

薄層プレート上の PCB は DPA の共存下で254nm

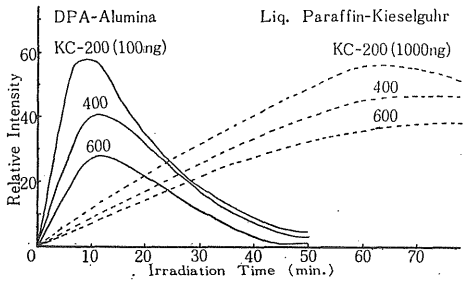


Fig.2 Effect of UV Light Irradiation Time on Fluorescence Intensity of PCB with DPA

UV Light (254nm) 6W (MITSUMI, SJ-1031), 10cm

の紫外線照射によりケイ光物質を生ずることは前にも述べたが，そのケイ光強度は照射時間によって異なりまたプレートと紫外線照射器との距離にも影響される。そこで照射距離は10cm と定め，この条件での最適な照射時間について検討することとした。すなわち 254 nm の紫外線照射器をプレート上 10cm に保ち，5分の間隔で最高70分間まで照射を行ない，各時間ごとのケイ光強度を測定した結果を Fig. 2 に示す。この図からわかるように薄層 a の場合は10分後，また薄層 b の場合は60分後にもっと強いケイ光の得られることを認めたので，照射時間はそれぞれ DPA- アルミナは10分間，逆相クロマトは60分間行なうこととした。

励起，ケイ光スペクトル

薄層 a と b の各薄層を用いて KC－200～600を展開したのち，紫外線を照射して得たスポットによって励起波長およびケイ光波長の選定を行なった。この際走査スリットは固定した状態とし，また UV-39 カットフィルターは使用しなかった。

Fig. 3 は薄層 a を用いた場合の測定結果で，ケイ光波長432nm に設定したときの励起極大は KC－200 で347nm，KC－400で 351nm，KC－600で 355nm と塩素化の高いほど red shift することが認められたが，今回はそれらの中間値である 351 nm を励起波長として測定することとした。またバックグランドとして325と354nm に励起極大を示す弱い2個のピークを検出し，また基準物質の硫酸キニーネは励起波長338nm が得られた。

つぎに励起波長を351nm としてケイ光スペクトルを測定したところ，ケイ光極大は430から432nm であったので，432nm を測定波長とした。またバックグランドは410nm に弱い極大を，また硫酸キニーネは415nm を示した。

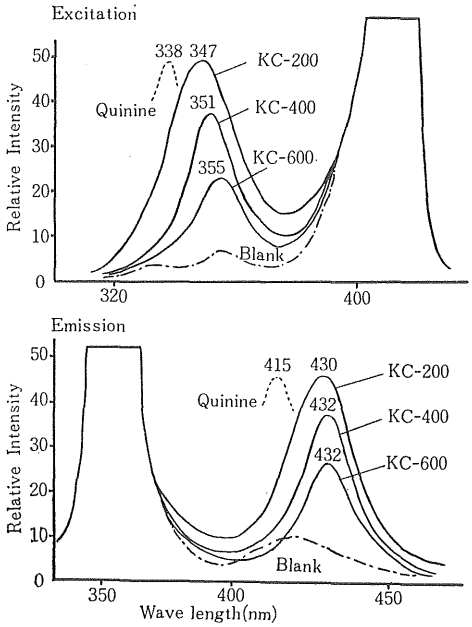
Fig. 4 は薄層 b でのスペクトルを同様に測定した結果を示したもので，励起波長348nm，ケイ光波長395nm と選定した。

ケイ光強度の再現性

すなわち同一の薄層 a 上に KC－500を100ngずつ6コをスポットし，常法に従って操作したのちこれらのケイ光強度をそれぞれ測定したところ，変動係数 2.6%とバラツキが小さく，再現性の良い結果が得られたが，同じ PCB を同量ずつスポットした場合でも，異なる薄層間ではケイ光強度に差のあることが認められた。

基準物質として用いた硫酸キニーネはケイ光強度を補正する一手段ではあるが，今回の PCB のための展開溶媒によっては，その極性のために当然展開されない。このため，数十種にのぼる3,4-ベンツピレンをはじめとする多核芳香族炭化水素等について検討したが，ケイ光波長が PCB のそれとかなり異なり，紫外線による安定性ならびに Rf 値等にも問題があり適用することができなかった。

4,4′-Dichlorobiphenyl（以下4,4′-DCB と略す）は PCB の一成分であるため，PCB と類似の態度を示し，ケイ光波長も近似している。また PCB 試験溶液に4,4′-DCB の一定量をあらかじめ加えておけば，さらに薄層上でのマイクロシリンジによるスポット量の変動をより適確に補正できる等基準物質として最も好ましい利点を有すると考えられた。しかしながら4,4′-DCB は PCB の TLC 上 KC－200，300 などの低塩素化体ではその一成分であることから，当然のことながら Rf 値は重なってくることと，紫外線による至適照射条件等を検討するにあたっても，PCB と同様の態度を示すため，真の最適条件を見い出す基準物質としては適当でなかった。したがって基準物質として硫酸キニーネ

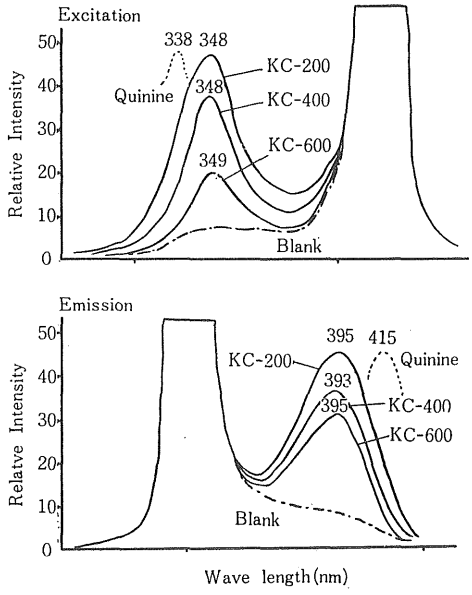


PCB	Ex. max. nm
KC-200	347
KC-300	349
KC-400	351
KC-500	353
KC-600	355
Used wave length	351
Qunine sulfate	338

	Em. max. nm
KC-200	430
KC-300	432
KC-400	432
KC-500	432
KC-600	432
Used wave length	432
Quinine sulfate	415

Fig. 3 Fluorescence Excitation and Emission Spectra of PCB on DPA-incorporated Aluminum oxide G

Irradiation : UV Light (254nm), 10min.
Developing Solvent : n-Hexane-Benzene (19 : 1) Spectra are uncorrected



PCB	Ex. max. nm
KC-200	348
KC-300	348
KC-400	348
KC-500	350
KC-600	349
Used wave length	348
Quinine sulfate	338

	Em. max. nm
KC-200	395
KC-300	395
KC-400	393
KC-500	398
KC-600	395
Used wave length	395
Quinine sulfate	415

Fig. 4 Fluorescence Excitation and Emission Spectra of PCB with DPA on Kieselguhr Impregnated with Liquid Paraffin

Irradiation : UV Light (254 nm) 60min.
Developing Solvent : Acetonitrile-Acetone-Methanol-Water
(35 : 20 : 35 : 10)
Spectra are uncorrected

をリプレート上に塗布し，PCB とは異なった展開溶媒を用いて展開する。一方4,4′-DCB を PCB の同一プレート上にその試験溶液と距離をおいてならべてスポットし，それぞれケイ光波長，強度，マイクロシリンジによるスポット量の誤差等の補正の一助とすることを目的とした。

そこで 4,4′-DCB を展開して操作したところ，励起極大波長354nm，ケイ光極大波長433nm を示す青色ケイ光スポットの得られることが認められた。つぎに励起波長 351nm，ケイ光波長 432nm で測定して求められる 4,4′-DCB のケイ光強度に対する PCB の各スポットの強度の比率によって検討したところ，8枚の異なる薄層間での変動係数は2.98％と３％以下に改善できる，適用上の有意性が認められたので以下4,4′-DCB をケイ光内標準とし，DPA-アルミナ，逆相クロマトの薄層に一定量を用時塗布し分析を行なうこととした。

ケイ光強度の安定性

薄層 a に KC－200～600 を 100ng，薄層 b には1000 ng を塗布したのち上記の測定条件下でそれぞれの常法に従って操作を行なったときに得られるスポットを室温暗所に放置し，経時的にケイ光強度を測定し比較した。Fig. 5 はその結果のうち KC－500 について示したが，横軸に照射し終った時からの時間を示し，縦軸にスポットの硫酸キニーネ基準物質との相対ケイ光強度を表わした。

すなわち薄層 a では最初の測定値を 100 とした場合，

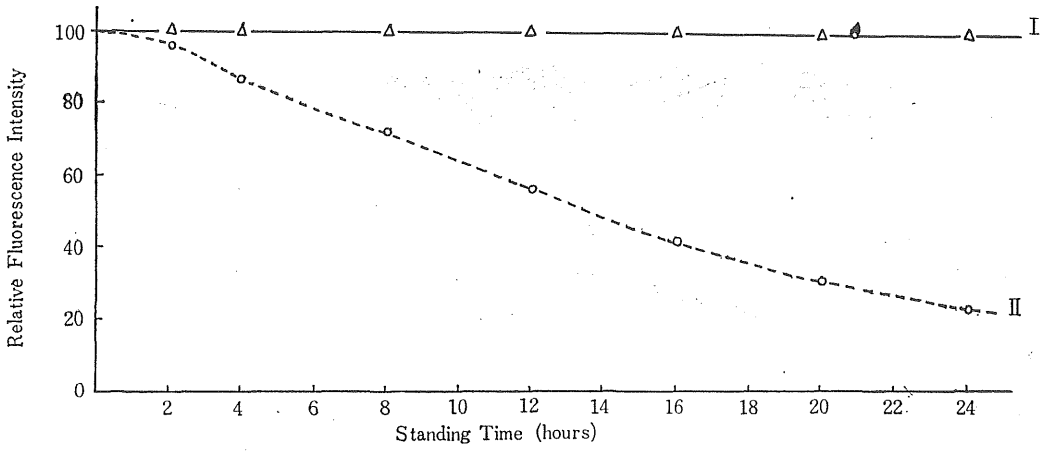


Fig. 5 Effect of Standing Time on Fluorescence

I. DPA-Al_2O_3, KC-500, 100ng

II. Liq. Paraffin-Kieselguhr, KC-500, 1000ng

24時間後におけるケイ光の強度は97でほとんど消光が認められず安定であった。薄層 b による操作では２時間までは98と安定であったが24時間ではかなりの消光があった。従って，とくに薄層 b では紫外線を照射してから，２時間以内にケイ光強度を測定することが必要である。

PCB の定量および同定

今回著者らは２種類の薄層プレートを用いたが，このうち薄層 a の場合には PCB はその塩素数に関係なく単一のスポットとしてまとまり，また薄層 b による場合は塩素数によって Rf 値に差があることが認められたので，前者を用いて PCB を定量し，後者によってその塩素含有量の異なる PCB のタイプの判別を行なうこととした。

薄層 a による PCB の検量線の作成

薄層 a にケイ光内標準 4,4′-DCB（2.5ppm）および PCB 標準液（2.5～100ppm）をそれぞれ２μl 塗布し，展開溶媒①で展開後，254nm 紫外線を10分間照射，励起波長 351nm，スリット 7.5nm，ケイ光波長 432nm，スリット 5.0nm のケイ光強度を測定した。

ここに得られた各 PCB のケイ光強度と 4,4′-DCB のケイ光強度との比を求め，その値を用いて検量線を作製したが，Fig.6 にみられるように５，10，50，100 150，200ng の濃度範囲であれば KC－200～600 まですべて良好な直線関係の成立することが認められた。しかしこれらのうち塩素数の少ないものはその定量可能な範囲が高くなり，たとえば KC－300 の場合には 2000 ng でもほぼ直線性が認められた。そのほか塩素数によって，4,4′-DCB に対する相対ケイ光強度が異なり，かりに KC－400を100とした場合，200は123，

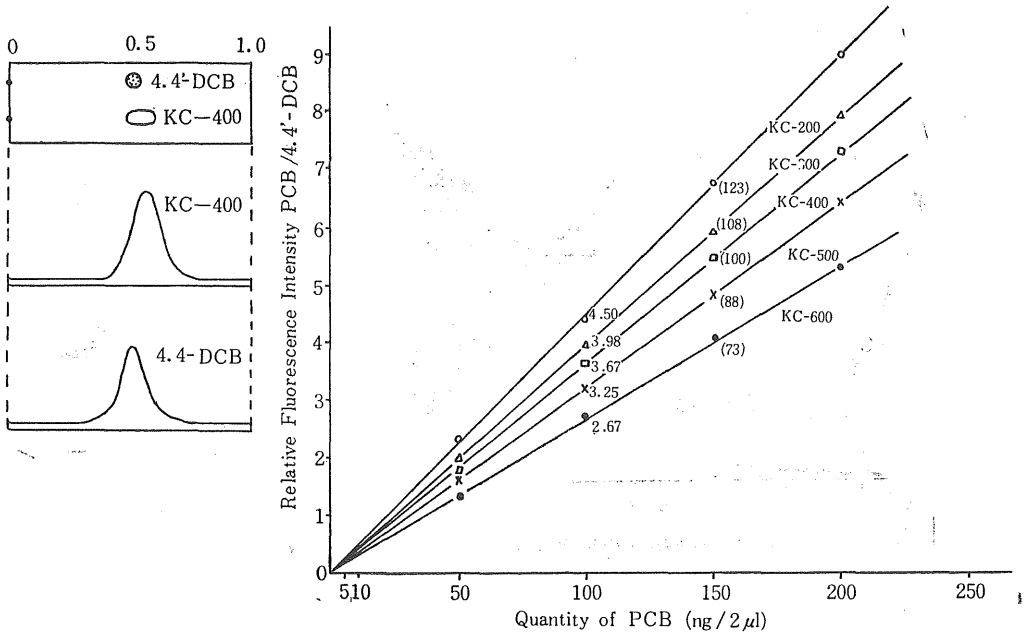


Fig. 6 Calibration Curve of PCB on DPA-incorporated Aluminum oxide G

Excitation wavelength : 351nm, Slit 7.5nm Scanning speed 2cm/min.

Emission wavelength : 432nm, Slit 5.0nm Recorder 50mV 4,4′-DCB, 5ng Detectable limit of KC, 5ng

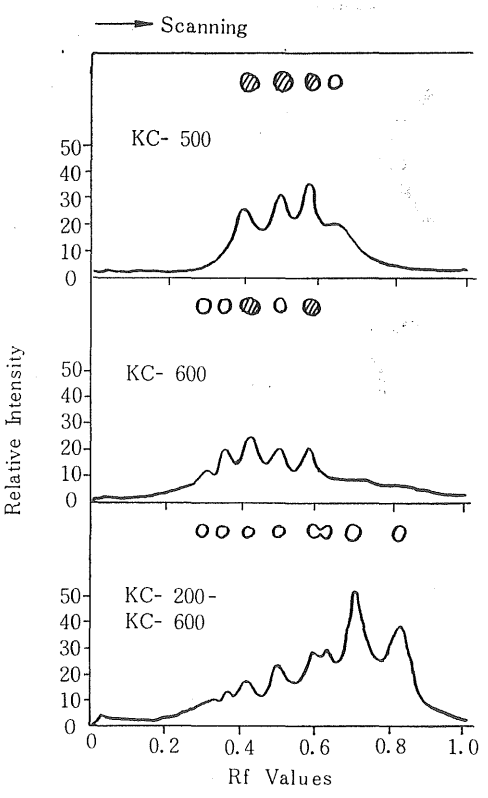
300は108，500は88，600は73と塩素数の増加に従って，強度比の減少がみられた。検出限界はいずれも5 ngであり，この濃度のケイ光は365nmの紫外線下で肉眼でも観察することができ，ケイ光スポットの Rf 値は0.54～0.63の範囲に入っていることが認められた。

薄層bによる PCB の同定

薄層bにケイ光内標準 4,4′-DCB (20ppm) ならびに PCB 標準液 (200ppm) を5 μl ずつ同一プレートに塗布し，展開溶媒②を用い展開後，DPA を噴霧処理し，254nm 紫外線を60分間照射したのち，励起波長348nm，スリット7.5nm，ケイ光波長395nm，スリット5.0nm におけるケイ光デンシトグラムを測定した。

Fig. 7 はその結果で，KC−200から600とこれらの等量混合したときのパターンを示した。原点から Scanning してチャートに得られるクロマトグラムの頂点は薄層のスポットとよく一致し，斜線の部分は個々の KC のスポットの中で特にケイ光が強いことを示した。

このスポットの分離は奥村[3]らは6～8個と報告しているが，KC− 200で3個，400と500が4個，600で5個観察された。これらの 4,4′−DCB に対する相対ケイ光強度は塩素化の低いものほど高く，また Rf 値も塩素数の少ないものほど大きくなる傾向が認められ



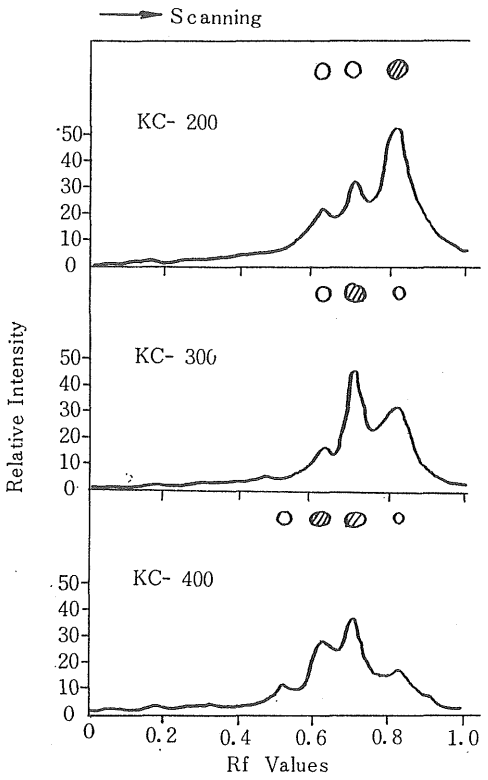


Fig. 7 Fluorescence Emission Profiles of PCB with DPA on Kieselguhr Impregnated with Liquid Paraffin

Excitation wavelength : 348nm, Slit 7.5nm Scanning speed 2cm/min Emission wavelength : 395nm, Slit 5.0nm Recorder : 200mV Amount of KC : 1000ng 4,4′-DCB : 100ng

た。それらケイ光スポットのパターンから塩素含有量の異なる PCB のタイプを区別することが可能であった。また検出限界は KC−200で200ng, 600では400ngであった。

妨害物質の検討

Westöö[3] らは試料中の PCB を GC-ECD によって定量分析する場合の clean up の手段としてアルミナ薄層を用いているが，このときも PCB と o.p′-DDT, o.p′-DDE, p.p′-DDE, Heptachlor, Aldrin などの有機塩素系農薬が分離されず同一のフラクションに存在することを述べ，除去方法としてアルカリ分解と酸化分解を用いている。また Mulhern[5] らも硝酸銀含有アルミナ薄層で肉眼的に直接半定量するとき，DDE の障害を除去するためにクロム酸酸化の処理を分析操作中に取り入れている。さらに逆相クロマトでも DE Vos[6] らが DDE との分離が不完全になると指摘している。

以上の報告は TLC において DDE が PCB の測定を障害することについて述べたデータであるが，これらと検出方法の異なる著者らが検討した DPA-アルミナ，逆相クロマトを用いる方法においても，同様に障害することは十分考えられるので，p.p′-DDE について検討することとした。

薄層 a の測定条件では p.p′-DDE は紫外線の照射によって暗赤色のケイ光スポットとして検出されるが，このスポットを PCB の測定条件に従ってケイ光デンシトグラムを測定した場合，ベースライン以下に落ちこむ現象がみられ，その他の PCB の定量値に負の誤差を与えることが認められ，KC−300の単独の場合に比較して，p.p-DDE を等量添加したケイ光強度は約20～30％の減少が観察された。

そこで DDE の除去方法として Collins[7] の方法に従いクロム酸酸化の処理操作を行なうことにより，DDE を Dichlorobenzophenone に酸化し，PCB と完全に分離させて測定することとした。

実際試料への応用

本試験法の実際試料への適用性について検討した。ただし試料は厚生省環境衛生局 PCB 分析班の PCB の定量法に準じて処理し，さらに魚と卵については Collins[7] のクロム酸酸化処理を行なった。

まず逆相クロマトでのパターンから PCB の塩素数のタイプを判別し，DPA- アルミナでケイ光強度を測定し，判別した PCB のタイプに該当する検量線によって総 PCB を求めた。また同一試験溶液を GC-ECD で測定した。その結果を Table II に示した。

Table II Analytical Result of PCB in Samples by Fluoro-Densitometry

	Sample	Liq. Paraffin-Kieselquhr Rf values (×100)					DPA-Alumina (ppm)	GC-Method (ppm)
1	Carbon-less Copying paper	62	70	82			KC-300 4900	5000
2	Immersion Oil (Nikon Co.)	42	50	58	65		KC-500 265000	250000
3	Immersion Oil (CARL Zeiss Co.)	30	35	42	50	58	KC-600 319000	250000

4	Grey mullet (Shizuoka)	42	50	60	70	KC-400 500	4.35	6.20
5	(4) Oxidation with CrO_3	42	50	60	70	KC-400 500	6.00	6.20
6	Egg	42	50	59		KC-500	0.39	0.64
7	(6) Oxidation with CrO_3	42	50	59		KC-500	0.60	0.64

KC-500 100ng $\bar{x}=3.27$, $n=8$, cv (%) $=2.98$

Mix. (KC-200～600) 100ng $\bar{x}=3.58$, $n=6$, cv (%) $=2.68$

1) の感圧紙は KC－300とよく一致し，その定量値は約5000ppm で，GC の結果とほぼ合致した。レンズ油のうち 2) のニコン製のものは KC－500に一致し，その26.5%を，3) のツアイス製は KC－600に相当し，その31.9%含有することが認められた。4) のボラはアルカリ分解してからクロム酸処理した場合 KC－400と500が認められ，その定量値は KC－500として5.8 ppm を示し，5) の卵は KC－500で0.56ppm の結果が得られ，これらの測定値を GC 法の値と比較したがほぼ一致した。

結　論

薄層上で PCB は Diphenylamine (DPA) の共存下で紫外線の照射により青色ケイ光物質を生成することが認められた。そこで PCB のケイ光薄層デンシトメトリーについて検討し，つぎのことを明らかにした。1) 薄層上で分離された PCB は254nm の紫外線を照射したのち，365nm の紫外線により特異的な青色ケイ光を発する。2) 一定条件で操作した場合 PCB の濃度とケイ光度は比例する。3) PCB は10%流動パラフィン -Kieselguhr 逆相クロマトによってタイプを判別するとともに1% DPA 添加アルミナを用いて得られる測定値によって，ほぼ総 PCB を定量できる。4) 本法の検出限界は DPA- アルミナで 5ng，逆相クロマトで 200ng である。5) 本法の変動係数は約3%である。6) 感圧紙，魚などに含まれる総 PCB を定量した値は GC の測定値とほぼ一致し，PCB の定量法として十分活用できるものと考えられる。

(1973年4月，日本薬学会 第93年会において発表した。)

文　献

1) 川城巌，細貝祐太郎：食衛誌，5，54～58 (1964)
2) 丸山正生，山根端弘，立川涼，戸谷哲也，本間春雄：科学技術庁第2回 PCB 分析法研究会検討試料，31～44 (1973)
3) 奥村保，上遠野哲郎，中谷政江：薬誌，93，79～86 (1973)
4) Westöö, G. and Noren, K. : Acta Chem. Scand., 24, 1639～1644 (1970)
5) Mulhern, B.M., Cromartie, E., Reichel, W.L. and Belisle, A.A. : J. Ass. off. Agric. Chem., 54, 548～550 (1971)
6) De Vos, R.H. and Peet, E.W. : Bull. Environ. Contam. Toxicol., 6, 164～170 (1971)
7) Collins, G.B., Holmes, D.C. and Jackson, F.J. : J. Chromatogr., 71, 443～449 (1972)

化粧品中の特殊成分試験法の設定に関する研究（Ⅸ）
ベビーパウダー，クリーム中 Hexachlorophene 等のハロゲンフェノール系殺菌剤の分離定量法

風間成孔* 水石和子* 中村義昭*
原田裕文* 戸谷哲也*

STUDIES ON EXAMINATION OF THE SPECIFIC MATERIALS IN COSMETICS (IX) THE METHOD OF SEPARATION AND DETERMINATION OF HALOGENO-PHENOLIC GERMICIDES, SUCH AS HEXACHLOROPHENE, CONTAINED IN BABY POWDER AND CREAM.

Masayoshi KAZAMA, Kazuko MIZUISHI, Yoshiaki NAKAMURA
Hirofumi HARADA and Tetsuya TOTANI

(Division of Microanalysis, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

The analytical procedure of halogeno-phenolic germicides, such as Hexachlorophene (G-11), in toilet goods is described in Standard Method of Analysis for Hygienic Chemists——as qualitative and quantitative analysis of them using silver nitrate. But it is inferior from the viewpoint of its specific and sensitivity. So we investigated the following procedure to improve those problems.

1) Baby powder, cream, soap, shampoo and hair tonic were the samples.

2) After extraction of those samples with a solution of Ethanol・n-Hexane (1 : 9), they were treated by the method of DEAE-Cellulose column to eliminate impurities, and then the sample solutions were prepared.

3) These solutions were applied to TLC method and in each solution if only one compound containing phenolic-OH was recognized, colorimetric determination using the reagent of 4-aminoantipyrine was carried out, and if two or more compounds containing phenolic-OH were recognized, FID-GC method using Tedion as internal standard was carried out to determine those compounds.

4) In the case of G-11 determination, the value of detection limit was 1 μg per ml for TLC and 1 μg per ml for GC.

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科

緒　　言

ヘキサクロロフェン（以下G-11と略す）等のハロゲンフェノール系殺菌剤は塩素系農薬，例えばDDTやBHC，または除草剤ペンタクロロフェノール（PCP）あるいはポリ塩化ビフェニール（PCB）などと構造的に類似しており，近年これらの殺菌剤が光感作アレルギーの原因物質とされ，また昨年はG-11含有の小児用浴剤やベビーパウダーが人体への有害性を指適され問題となっている。

化粧品中の特殊成分としての殺菌剤の試験法は，すでに日本薬学会協定衛生試験法にG-11およびビチオノール（以下BITと略す）の硝酸銀による定性定量法[1]が収載されているが，特異性や検出感度等の点で実用性に乏しいといえる。このほか，これまで発表された定量法としては紫外部吸収法[2)~10)]，4-アミノアンチピリン（以下4-AA法と略す）[11)~17)]または塩化第二鉄[18)~19)]によるフェノール性水酸基に基づく反応を利用する方法などがあるが，いずれも単品ないしは単純な製剤についての定量には用いられるとしても，やや複雑な処方からなる製剤への適用は硝酸銀法とほぼ同様に，感度，特異性，共存物質の影響等から困難な場合が多い。

今回，著者らはこれらの点を改良する目的で，カラム分離法を[20]中心に検討し，満足すべき結果が得られたので報告する。

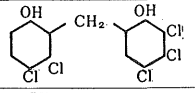
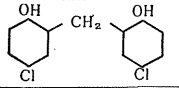
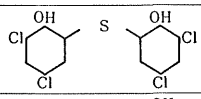
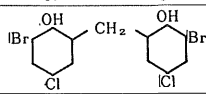
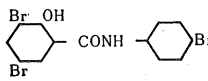
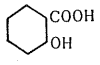
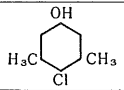
すなわち，ベビーパウダー，クリーム，石けん，ヘアートニック，シャンプーなど各種剤型中より，ハロゲンフェノール系殺菌剤をエタノール・n-ヘキサン（1：9）混液で抽出後，DEAE-セルローズカラム処理により，妨害物質を除き，溶出液をTLCで分離確認する時，フェノール性水酸基を有する化合物が一つの場合は4-AA法，二つ以上の場合は，内部標準にTedionを用い，FIDガスクロ法により分離定量した。

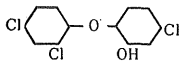
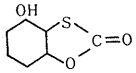
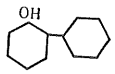
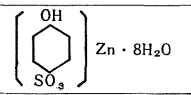
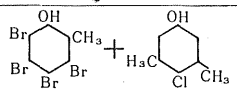
実 験 の 部

I　試料，試薬および装置

試料：殺菌剤試料はTable Iに示した14種のものを用いた。

Table I. Structural Formulas of Phenolic Germicides and the Limit Amount Allowed in Cosmetics.

	Compound	Structure	m. p.	Used Amount(%)	Max. Limit Amount (%)
1	Hexachlorophene (G-11)		164-5° (Benzene)	0.01-2	0.1
2	Dichlorophene (G-4)		177-8° (Toluene)	2-3	forbidden as of April in 1972
3	Bithionol (BIT)		186-8°	2-3	forbidden as of May in 1970
4	Bromochlorophene (BCP)		188°	?	—
5	Tribromosalicylanilide (TBS)		227-8°	0.1	0.05
6	Salicylic Acid (SAL)		158-61°	0.1-0.2	0.2
7	Benzoic Acid (BA)		121-23°	0.1-0.2	0.2
8	p-Chloro-m-Xylenol (PCMX)		114-6°	1-2	—

9	Irgasan DP-300 (DP-300)		54–57.5°	0.1–1	—
10	Thioxolone (TIOX)		160°	0.3–0.5	—
11	Resorcine (R)		109–112°	~0.1	0.1
12	o-Phenylphenol (OPP)		56–7°	~0.3	0.3
13	Zn-Phenolsulfonate (Zn-PS)		—	~2	2
14	Raluben (RAL)		mix	0.1	—

このうち分子内にクロルまたはブロムを含むハロゲンフェノール系殺菌剤は8種である。カッコ内は各化合物の略称として，以下本文中に用いる記号とした。なお化粧品に対する通常添加量と化粧品品質基準に使用を認められている最大配合量を%によって示した。このうちBITとG-4は使用を禁止されている。

また一般に，これらの殺菌剤は単独に用いられるばかりでなく，殺菌効果のうえから混合して使用される場合もあり，はじめから二種混合型殺菌剤ラルーベン（市販品名）のようなものもある。医薬部外品ではG-11は0.5%まで配合を認められており，さらに石けん等使用後直ちに洗い流してしまう剤型では2%程度まで認められているようである。G-11の安全性が問題になって以来，G-11の処方含有量の低下とともに，その他の殺菌剤，例えばPCMX，DP-300とかカルバニド系のトリクロロカルバニリド（TCC）やイルガサンCF_3，またアルミニウム・ヒドロキシ・クロリドとの混合処方もみられるようになったため，これらも標準品として用いた。

化粧品試料としては，下記の自製のクリーム$^{w}/_{o}$，$^{o}/_{w}$の両タイプおよび市販品のベビーパウダー，クリーム，石けん，ヘアートニック，シャンプー，デオドラント製品を用いた。

a）$^{w}/_{o}$ type cream（%）

cetyl alcohol	4.0
paraffin	7.0
vaseline	18.0
liquid paraffin	29.7
glyceryl monostearate	9.0
Tween 20	3.0
propyleneglycol	5.0
water	30.3

b）$^{o}/_{w}$ type cream（%）

cetyl alcohol	2.0
lanoline	1.0
mineral oil	2.0
stearic acid	13.0
glycerol	12.0
methyl paraben	0.15
potassium hydroxide	1.0
water	68.85

試薬　1）4-アミノアンチピリン溶液：1%水溶液，過ヨウ素酸カリウム溶液：0.25%水溶液，緩衝液（pH9.7）：ホウ酸ナトリウム13.75gと水酸化ナトリウム1.125gを水に溶かして1,000m*l*とする．pHメーターを用い正確に9.7に調整する。

2）陰イオン交換体：DEAE-Cellulose（Brown）0.90meq/g，GE-Cellulose（Serva）0.24meq/g，EC-TEOLA-Cellulose（Brown）0.30meq/g

3）陰イオン交換樹脂：Dowex 1—×4，Na form，100—200mesh，Dowex 2—×8，Na form，200—400 mesh，Bio-Rad AG1-X1，Na form，50—100mesh，Bio Rad AG1-X8，Na form，50—100mesh

4）TLC用：シリカゲル（Wakogel B-5，和光純薬K.K.），アルミナ（Merck，Type T，basic）

展開溶媒㋑石油エーテル：氷酢酸（88：12）

㋺酢酸エチル：メタノール（90：10）

発色試薬ⓐ濃アンモニア水，2%4-アミノアンチピリンエタノール溶液，8%赤血塩水溶液

ⓑ2%塩化第二鉄エタノール溶液，2%赤血塩水溶液

装置　島津製作所ガスクロマトグラフ GC-5 AF および GC-3 AE に低液相カラムを備え，注入にはハミルトン製マイクロシリンジ10μlを用いた。
日立自記分光光度計323型
紫外線照射ランプ（波長254mμ）：ミツミ科学産業製
紫外線検出器 SJ-1031型
展開槽（タテ6×ヨコ22×高さ21cm）
ガラス板：5×20，10×20，20×20cm

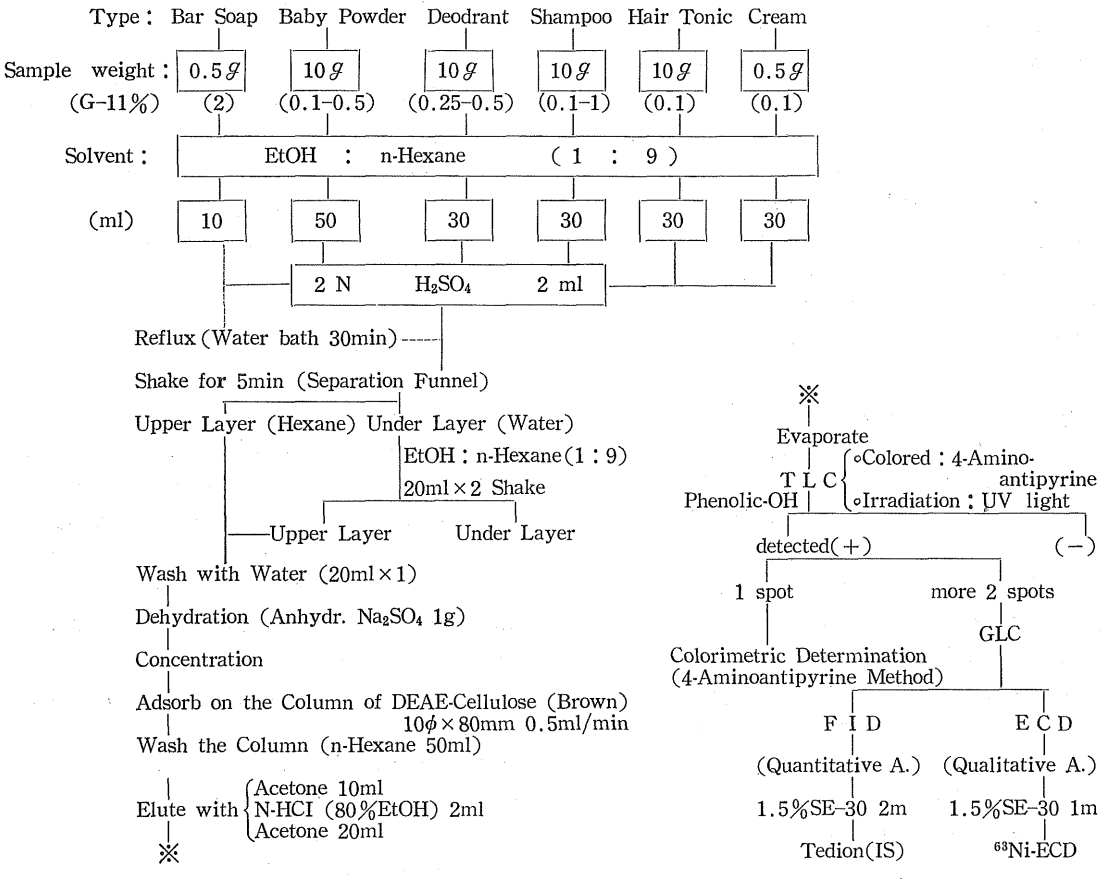
Ⅱ　試験操作

DEAE-セルローズカラムの調製　DEAE-セルローズの精製：DEAE-セルローズ10gをはかり0.1N塩酸500mlで洗い，吸引しながら液を去り，アセトン200mlで洗い，つぎに十分水洗してから0.1N水酸化ナトリウム300mlで洗ったのち，十分水洗する。洗液がフェノールフタレインで赤く呈色しなくなるまで繰り返し水洗する．アセトンで洗ったのち，エタノール・n-ヘキサン（1：9）混液中に保存する。

DEAE-セルローズカラム柱の調製：　前記のとおり精製して得た DEAE-セルローズ交換体にエタノール・n-ヘキサン（1：9）混液を加えてよく懸濁させ，下端にガラスウールをつめたコック付ガラス管（10mmϕ×200mm）に充塡し，気泡が生じないように注意しながら約8cmのカラム柱をつくる。

試験溶液の調製　G-11を中心とした場合の分離定量操作を示すと Chart 1 のとおりである。石けん，

Chart 1　Analytical Procedure of G-11 in Various Samples



ベビーパウダー，デオドラント，シャンプー，ヘアートニック，クリーム等0.5～10gを正確にはかり，抽出溶媒としてエタノール・n-ヘキサン（1：9）混液10～50mlを用い，2N-硫酸2mlを加えて抽出する。ただし，石けんの場合は水浴上30分間加熱還流溶解させる。分取したヘキサン層を1回水洗後無水硫酸ナトリウムで脱水し，5mlに濃縮し，DEAE-セルローズカラム柱に0.5ml/minの流速で流す。更にヘキサン50mlを用いてクリーム基剤などの妨害成分を除去してから，カラム下端に受器を設けてアセトン10ml，N-塩

酸（80%エタノール溶液）2 m*l*，更にアセトン 20m*l* を順次流し完全に G-11を溶出させ，溶出液を水溶上で加温し溶媒を留去する。留去しきれないで残存する塩酸を除去するために，更にヘキサン 5 m*l* 加えて加温し，この操作を2回繰り返した後，残留物をアセトン2 m*l* に溶かし試験溶液とする。

定性試験 TLC プレートの作製：①シリカゲルプレートは常法どおり作製し，②アルミナプレートは，アルミナ（Merck, Type T, basic）30 gを，微量の水で硝酸銀0.12 gを溶かしさらにエタノール 30m*l* 加えた溶液に懸濁してプレートを作製し風乾する。

操作法：試験溶液を薄層板①，②にスポットし風乾する。①にスポットした場合は㋑および㋺の展開溶媒で展開し，風乾後ⓐ又はⓑの発色試薬を順次噴霧し発色させた。②にスポットした場合は㋑の展開溶媒で展開し，風乾後紫外線照射ランプの下約 5 cm の位置で30分間照射を行なう。この時ハロゲン化合物があれば黒～灰黒色のスポットを生ずる。

定量試験 1) 4-アミノアンチピリンによる比色定量法： 試験溶液 5 m*l*を正確にはかり，緩衝液（pH 9.7）でうすめて後述の4-AA法の試験溶液とする。本試験溶液はG-11として100μg/m*l*を含む。

標準液の調製 G-11（ベンゼン再結，m. p. 164-165°）0.1 g を正確にはかり，アセトンに溶かし100m*l* とする。この液10m*l* をさらに緩衝液(pH9.7)で100m*l* に希釈し標準液とする。

試験溶液，標準液各 5 m*l* を50m*l* メスフラスコに正確にとり，緩衝液でうすめて液量約 30m*l* とする。これに4-AA溶液1.5m*l*を加え，よく振り混ぜてから，さらに0.25%過ヨウ素酸カリウム 溶液を 10m*l* 加えて，よく混和させる。緩衝液で全量50m*l* とし，別に同様に操作した空試験液を対照として510nmにおける吸光度を測定し，検量線よりG-11の含量を求める。

検量線の作製 標準液1，2，3，4，5，6 m*l* をそれぞれ 50m*l* のメスフラスコにとり緩衝液でうすめて液量約 30m*l* とし，以下定量法に従い検量線を作製する。

2) FID, ECD ガスクロマトグラフィーによる定量法： 試験溶液の一定量を正確にはかり G-11 として1～5 mg/m*l*になるように内部標準液（Tedion 1mg/m*l* アセトン溶液）で希釈する。この液 5 μl を下記 FID ガスクロ条件で測定し検量線より G-11 の含量を求める。検量線は，G-11として0.5，1，2，3，5 mg/m*l*になるように内部標準液を用いて調製し，それぞれ5 μl を注入する。ガスクロの条件は以下のとおりである。

（FID の条件）

Column：1.5% Silicone GE SE-30 on Chromosorb G（AW-DMCS）80-100mesh, glass on column, 3 mmϕ× 2 m

Detector：FID

Temperature：column 230°, injection port 250°

Carrier gas：N_2 60m*l*/min, H_2 50m*l*/min, Air 0.6 *l*/min

Sensitivity, Range：$10^2 \times 32$

Internal standard：Tedion（2, 4, 5, 4'-tetradiphenyl sulfone）1 mg/1 m*l*

（ECD の条件）

Column：1.5% Silicone GE SE-30 on Chromosorb G（AW-DMCS）80-100 mesh, glass on column, 4 mmϕ×1m

Detector：^{63}Ni 15mCi

Temperature：detector 245°, column 245°, injection port 245°

Carrier gas：N_2 40m*l*/min

Sensitivity, Range：$10^2 \times 0.1$

Internal standard：Tedion 0.2μg/m*l*

結果および考察

定量条件の検討

1. イオン交換体を用いる分離法の検討

イオン交換体の選択：著者らは先にハロゲンフェノール系殺菌剤の一つである Diaphene〔3, 4', 5-Tribromosalicylanilide と 3,5-Dibromosalicylanilide（以下 DBS と略す）の混合物〕のクリーム中よりの分離定量法[21]について報告したが，この中でクリーム中の妨害物質を除く目的で塩基性陰イオン交換体として，DEAE-セルローズカラムを用いて良好な結果を得た。そこで今回もこれらセルローズ交換体を中心に種々のハロゲンフェノール系殺菌剤に対するイオン交換能について検討した。イオン交換体としては，DEAE-セルローズ，ECTEOLA-セルローズ，GE-セルローズならびに Dowex 1-X 4, Dowex 2-X 8, Bio・Rad AG 1-X 1, Bio・Rad AG 1-X 8 を用いた。

イオン交換体を内径10mm，長さ20cm のガラスカラム柱に，前記 DEAE-セルローズカラムの調製法と同様に操作して製し，このカラムに，G-4 または G-11 などの殺菌剤をエタノール・n-ヘキサン（1：9）混液に 10mg/m*l* 溶かした各試料液 1 m*l*，および混液50

mlを0.5ml/min の流速で流し，その流液を10ml ずつ捕集して，操作法に従ってガスクロ法により，吸着の有無を調べた。その代表的なものをFig. 1 に示す。その結果，分子内にハロゲン基を4個有する Bisphenol 体については比較的安定した吸着を示したが，Cl 2 個を有する G-4 は吸着性がやや劣っていた。このようにセルローズカラムの場合は，強塩基性陰イオン交換体の GE-セルローズ，弱塩基性の ECTEOLA-セルローズでは吸着せず，その中間の塩基性の DEAE-セルローズのみが吸着，溶離の条件を満足させた。即ち，

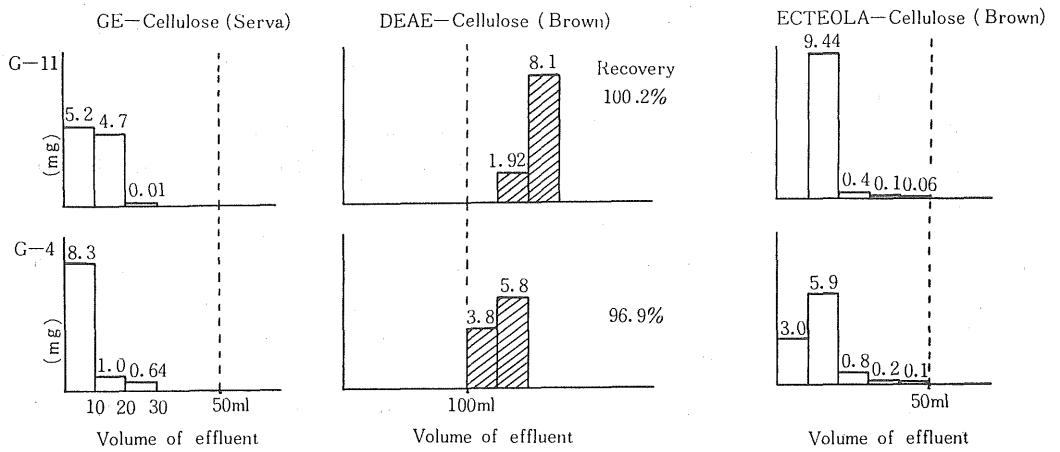


Fig. 1 Elution Patterns of Phenolic Germicides by Cellulose Column.

溶離液として，アセトン10ml，N-塩酸（80%エタノール）2 ml，アセトン20ml を順次流すと，Fig. 1 の斜線を示した部分のようにG-11が100.2%，G-4 で96.9%まで定量的に回収された。また SA，BA，Zn-PS，はこのような類似の吸着パターンを示すが，溶離の際には定量的に回収されなかった。他の殺菌剤のR，DP-300，PCMX，TCC，イルガサン CF_3 などは全く吸着せず流出してしまった。この理由としては SA の pKa は2.97，BA 4.12，BIT 4.82でG-11，G-4，BCP も恐らく pKa 4.8以下と推定され，これらの pKa 以下の範囲では DEAE-セルローズに対する吸着がほぼ完全であり，一方，Rの pKa は9.44で酸性が弱いため吸着が不完全となるものと考えられる。また，G-11のようなポリクロロフェノールは陰性度が高いため，交換性がよく，G-4 のような低クロル化合物に対しての交換性は劣っているものと推定される。このほか，イオン交換樹脂を用いて同様に行ったところ，脱着などが不完全であった。なお，交換時の溶媒として，10～50%含水メタノール，エタノール，ジオキサン，イソプロパノール・石油ベンジン（1：1），同（1：2），同（1：9）を用い同様に吸着性を調べたが，イソプロパノール・石油ベンジン（1：9）混液も定量的に吸着することを認めた。しかし，実際にはイソプロパノール・石油ベンジン（1：9）混液を用いる

Table II Rf value and Detection Limit of Halogenophenolic Germicides

	Rf value solvent ①	②	Color and Detection limit(μg) 4-AA method		$FeCl_3$ method	
G-11	0.44	0.64	red	5	blue	3
G-4	0.15	0.69	red	5	blue	1
BCP	0.48	0.61	red purple	5	blue	3
BIT	0.43	0.69	purple	5	blue	5

Layer : Silicagel (Wakogel B-5)
solvent : ① pet. ether : HOAc (88 : 12)
② ethyl acetate : methanol (90 : 10)

	Rf value Solvent ①	Detection limit (μg)
G-11	0.56	1
G-4	0.17	1
BCP	0.64	1
BIT	0.52	1

Layer : Alumina containing 0.4%$AgNO_3$
Detection : UV irradiation

場合，クリームに対する溶解性の点で問題があり，クリーム中の水分が増すことによりクリーム分を溶かしきれなくなることがあるので，エタノール・n-ヘキサン（1：9）混液を用いることとした。

2. TLC の検討

各化合物についての検出感度およびRf 値を Table Ⅱ および Fig. 2，Fig. 3 に示した。Fig. 2 は，Wakogel B-5 を酢酸エチル・メタノール（90：10）の展開溶媒を用いて展開したのち，濃アンモニア次いで 4-AA，最後にフェリシアン化カリウム溶液を噴霧すると直ちにフェノール性水酸基の呈色があらわれ，紫～赤紫のスポットが見られる。この場合Rf 値は 0.5～0.7 の間に集中するが，化合物により多少の色調の差が認められる。RAL は混合物のため赤紫の PCMX と青色のテ

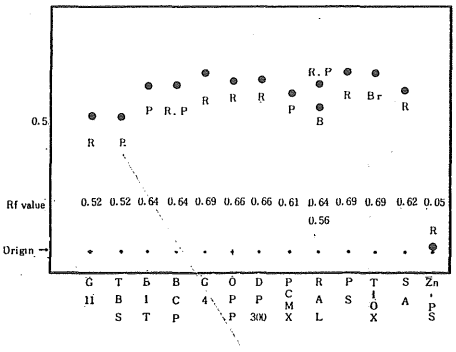


Fig. 2 Thin-Layer Chromatogram of Phenolic Germicides
R：red, R.P：red purple,
B：blue, Br：brown

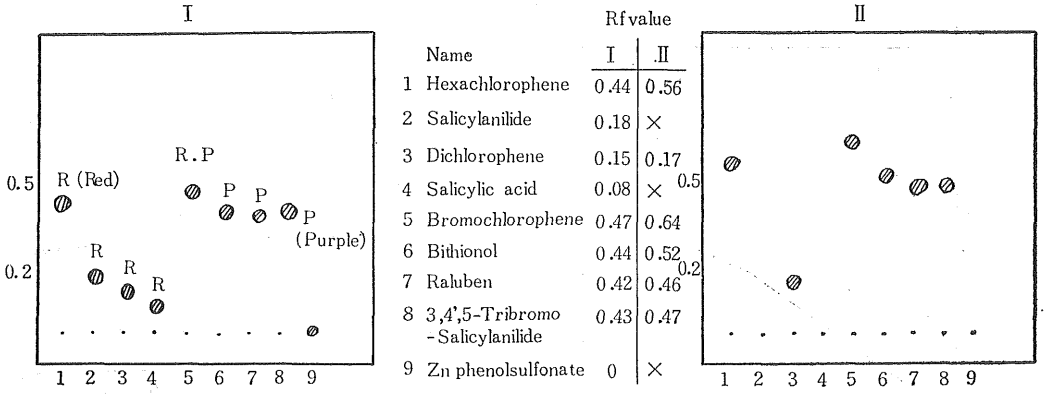


Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of Halogeno-phenol Germicides after clean up with DEAE-Cellulose column.

Layer I	:	WAKOGEL B-5
Solvent system	:	pet. ether：HOAc（88：12）
Coloring reagent	:	NH_4OH+4-AA+$K_3Fe(CN)_6$
Layer II	:	Alumina containing 0.4%$AgNO_3$
Solvent system	:	pet. ether：HOAc（88：12）
Detection	:	UV irradiation

トラブロムオルトクレゾールのスポットが僅かに重なって認められる。なお，フェノール性水酸基の呈色試薬として，塩化第二鉄・ピリジンまたは塩化第二鉄・フェリシアン化カリウムでも検出できるが，この場合は殆んど青色を呈し，そのまま放置しておくと板全体が青色になってしまうので速やかにRf 値を読みとることが必要である。Fig. 3 には DEAE-セルローズカラム処理により吸着，溶離してくるフェノール化合物 9 種の Rf 値を示した。Ⅰの Wakogel B-5 では 4-AA によるフェノール性OHの検出，Ⅱの0.4%硝酸銀含有のアルミナプレートでは紫外線30分間照射により，ハロゲン化合物の黒いスポットがあらわれる。従って硝酸銀アルミナプレートでは，ハロゲンフェノール 6 種のみが検出される。両者の展開溶媒は同一であるが，Rf値は表のような差が認められた。これにより二つのプレートと二つの呈色剤の色調の差およびハロゲン化合物の有無からおおよその確認ができるが，G-11 の Rf は BIT，BCP，RAL，TBS の Rf と接近して分離が困難であるが，前述のガスクロ法で分離確認できる。

3. 4-アミノアンチピリン法の検討

フェノール系殺菌剤の比色定量法としては，一般に 4-AA 法で酸化剤としてフェリシアン化カリウムを用

いているが，これを G-4 の定量に用いた場合，試薬ブランク溶液の発色が強く，呈色も不安定であった。F.C. Ashton[17] はフェリシアン化カリウムの代りに過ヨウ素酸カリウムを酸化剤として用いて比較的感度よ

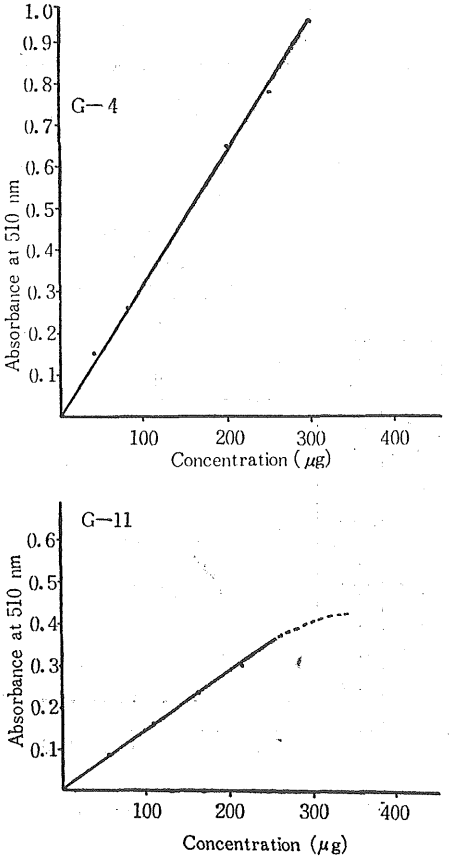


Fig. 4 Calibration Curves of G-4 and G-11

化剤とした方が約50%の呈色感度の上昇をみた。また，呈色安定性も Fig. 5 に示すように G-11 では60分，G-4 では40分まで持続した。これに反してフェリシアン化カリウムを用いた場合は G-11 では吸光度が 30%の減，呈色安定性も40分にとどまった。

4. ガスクロマトグラフィーの検討

各種剤型中のハロゲンフェノール殺菌剤の含量からみて，メチル化[22)-23)] あるいはトリメチルシリル化[24)-27)] による感度の上昇は必要ないと思われるので，直接注入する方法を採用した。しかし，高沸点化合物のためテーリングが生じたり，Rtの遅れがあったりするので，カラム充塡剤を種々検討した結果，Silicone DC QF-1 および Silicone SE-30 が最もすぐれた分離を示した。

ここでは SE-30による各化合物のクロマトグラムと G-4 を定量している。この場合の試薬ブランク溶液の発色は弱く，呈色の安定性も優れていると報告している。この方法による G-4 および G-11 の検量線を Fig. 4に示した。G-11では過ヨウ素酸カリウムを酸

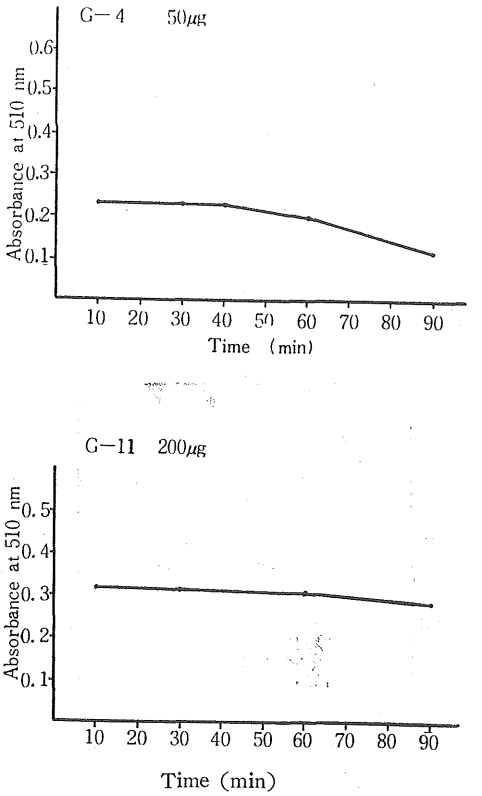


Fig. 5 Color Stability of G-4 and G-11 on Standing

-11についての検量線を FID，ECD とも Fig. 6 に示した。カラム温度は 230～250° の高温になるが，化合物の分解は認められなかった。内部標準物質に Tedion を用いたが，G-11の場合 FID で0.25～5 mg まで直線性が得られ，従って本定量法における G-11 の必要量は約 1 mgといえる。ECD の場合は検出感度は G-11で 1 μg であるが，一般の化粧品中の含有量からみて，ECD はむしろ分離確認試験として用いた方がよいと考えられる。なお，DEAE-セルローズカラムは試料無添加のブランクの状態において，アセトン，N-塩酸処理で得た溶離液の溶媒を留去後，残留物をアセトンに溶かし，その液を FID ガスクロに注入した場合に汚染するような不純物の溶出が認められず，従来のイオン交換樹脂にみられた汚染が認められない利点があった。

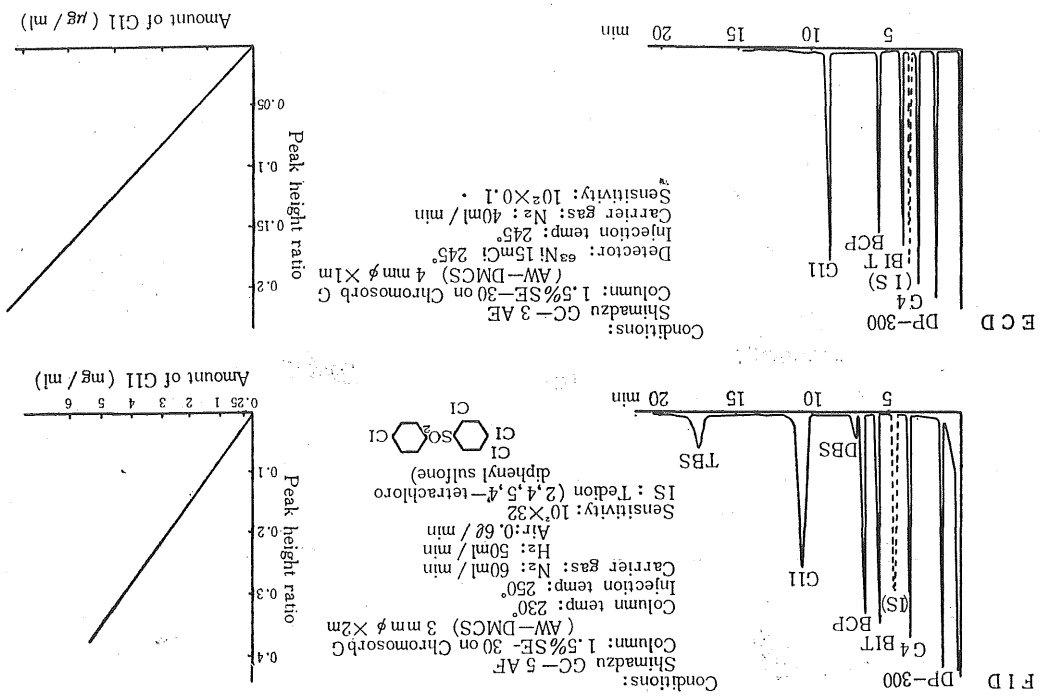


Fig. 6 Gas Chromatogram of Halogeno-phenols and Calibration Curves of G-11

本法の応用

以上の方法のうち，ガスクロ法による定量結果を特に調製した試料（クリームa)およびb)）ならびに市販品について添加試験の結果を，TableⅢ，Ⅳに示した。両者の回収率はそれぞれ95～100，91～100％でSEは0.2～0.5％で良好な結果が得られた。これらの結果から本試験法は剤型を異にする各種の試料についても広く適用できる実用性の高いものと考える。

Table III Hexachlorophene Recovery from Laboratory Formulations by GC Method

Product	Hexachlorophene % (w/w)				Recovery, %	Standard Error, %
	Added	Found				
Talc	0.5	0.483	0.499	0.489	96.7	0.24
Cold Cream[1)]	1	1.010	0.990	1.000	100.0	0.47
Vanishing Cream[2)]	1	0.973	0.986	0.983	98.1	0.32
Hair Tonic	0.1	0.096	0.099	0.090	95.0	0.22

1) W/O Type Cream
2) O/W Type Cream

Table IV Recovery after Addition to Marketed Products by GC Method (Already Containing Hexachlorophene)

Product	Hexachlorophene mg		Recovery. %
	Theoretical[1)]	Found	
Baby Powder	55.0	50.2	91.3
Bar Soap	15.0	15.0	100.0
Hair Tonic	15.0	14.3	95.3
Cold Cream	10.0	10.0	100.0
Vanishing Cream	10.0	9.96	99.6

1) Amount of hexachlorophene found by assay plus amount added.

要　　結

ベビーパウダー，クリーム，石けんなど各種剤型中より，それぞれの殺菌剤を溶媒抽出後，カラムクロマトにより妨害物質を除き，TLCで分離確認したのち，比色法またはガスクロにより分離定量した。

操作法：試料0.5～10ｇをとりEtOH：n-Hexane（1：9）を用い，２N-硫酸酸性で抽出し，ヘキサン層を濃縮脱水後，DEAE-セルローズカラムに吸着させ，更にヘキサンで洗浄する。アセトン，塩酸・エタノール溶液，アセトンの順に流して溶出させたのち，溶媒を留去し，残留物をアセトンに溶かし，次の TLC を行なう。

i）Wakogel B-5，石油エーテル：酢酸（88：12）で展開，アンモニア＋4-アミノアンチピリン＋$K_3Fe(CN)_6$ で呈色

ii）0.4% $AgNO_3$ 含有アルミナプレート，石油エーテル：酢酸（88：12）で展開後紫外線照射

TLC の結果，フェノール性水酸基を有する化合物が一つの場合は，4-アミノアンチピリン比色法，二つ以上の場合は，内部標準物質に Tedion を用い，次のガスクロ法で定量する。

ガスクロの条件：1.5% SE-30 on Chromosorb G（AW-DMCS）3 mmϕ×２m，230°，FID，N_2：60ml/min，H_2：50ml/min.，Air：0.6 l/min. Sens. 10^2，Range 32

1）妨害物質の分離に用いたカラム充塡剤にはDEAE-Cellulose が最適で，ECTEOLA，DOWEX-1 イオン交換体等では G-4 のような低クロル化合物に対しての交換性は劣っていた。

2）TLCの感度は Wakogel B-5，4-アミノアンチピリン呈色法で5 μg，0.4%$AgNO_3$ 含有アルミナプレート，紫外線照射検出法では 1 μg で優れていた。

3）4-アミノアンチピリン比色法では，試験溶液１ml あたり G-4 で20～300μg，G-11では25～250μgまで直線関係が得られた。

4）ガスクロによる定量法では，試験溶液 1 ml あたり，G-11では FIDは0.25～５mg ECD は0.5～５μg で直線関係が得られ，回収率は95%以上であった。

なお本研究の一部は日本薬学大会第93年会で発表し，衛生化学に投稿中である。

文　　献

1）日本薬学会編：衛生試験法，p. 596，金原出版，（1973）.

2）Lord，J. W.，McAdam，I. A.，and John，E. B.：Soaps，Perfumery and Cosmetics，26，783（1953）

3）Childs，R. F.，and Parks，L. M.：J. Am. Pharm. Ass.，Sci. Ed.，45，313（1956）.

4）N. N. R.，Test and Standards（1954）.

5）Elividge，D. A.，and Peutrell，B.：J. Pharm. Pharmacol.，13，111 T（1961）.

6）U.S.P. XVI，p.320，Mack Publishing Co.（1960）

7）Clements，J. E.，and Newburger，S. H.：J. Assoc Offic. Agr. Chemists，37，190（1954）.

8）Jungermann，E. and Berk，E. C.：J. Am. Oil. Chem. Soc.，38，513（1961）.

9）Van Der Pol，H. J.：Pharm. Weekblad，20，881（1958）.

10）Matuszak，J. B.，Bope，F. W. and Harris，L. E.：Drug Standards，28，68（1960）.

11）Gottlieb，S. and Marsh，P. B.：Ind. Eng. Chem.，Anal. Ed.，18，16（1946）.

12）Snell，F. D.：Colorimetric Methods of Analysis，3rd ed. Vol. 3 p.153 D. Van Nostrand Co.（1953）

13）Johnston，V. D. and Porcaro，P. J.：Anal. Chem.，36，124（1964）.

14）Klinge，K.：Seifen，Oele，Fette，Wachse，85，61-4，87-8（1959）.

15）Johnson，C. A. and Savidge，R. A.：J. Pharm. Pharmacol. 10，Supp. 171T（1958）.

16）Manowitz，M. and Johnson，V. D.：J. Soc. Cosmetic Chemists，18，527（1967）.

17）Ashton，F. C.：Analyst，85，685（1960）.

18）田村健夫，戸谷哲也：東京都立衛生研究所年報，（8），52（1956）.

19）Larson，H. L.：J. Am. Oil Chem. Soc.，28，301（1951）.

20）Skelly，N. E. and Crummett，W. B.：Anal. Chem. 35，1680（1963）.

21）田村健夫，戸谷哲也，原田裕文，観　照雄，郷一栄：東京都立衛生研究所年報，(19)，199（1967）

22）Curley，A.，Hawk，R. E.，Kimbrough，R. D.，Nathenson，G.，and Finberg，L.：Lancet，2，296（1971）.

23）Gutenmann，W. H. and Lisk，D. J.：J. Assoc. Offic. Agr. Chemists，53，522（1970）.

24）竹村　功：分析化学，20，1321（1971）.

25）Wisniewski，J. V.：Facts and Methods（Hewlett-Packard），8，10（1967）.

26) Porcaro, P. J. and Shubiak, P.: Anal Chem., 40, 1232 (1968).

27) Porcaro, P. J., Shubiak, P. and Manowitz, M.: Anal. Chem., 58, 251 (1969).

ヒト臓器中のポリ塩化ビフェニール含有量について

鈴木助治* 山野辺秀夫* 大沢映子*
小泉清太郎* 戸谷哲也*

STORAGE OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN HUMAN ORGANS AND TISSUES IN TOKYO

Sukeji SUZUKI, Hideo YAMANOBE, Eiko OHSAWA,
Seitaro KOIZUMI and Tetsuya TOTANI

(Division of Microanalysis, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Residues of polychlorinated biphenyls (PCB) in human organs and tissues: cerebrum, cerebellum, spinal cord, lung, heart, sternum, liver, pancreas, spleen, adrenal, kidney, great omentum, mesentry, skin and subcutis, were determined by gaschromatography. The samples were obtained from resident of Tokyo, 39 male and 9 female subjects, at autopsy in 1972 and whose age ranged from 15 to 89 years.

The results obtained are summarized as follows:

1) PCB residues were found in all the samples, which gaschromatograms show a pattern comparable to that of a commercial PCB mixture 'Kanechor-500' containing about 54% of chlorine.
2) The average concentrations of PCB residues in extractable fats of cerebrum, cerebellum and spinal cord were considerably lower than in those of other organs and tissues: 0.20 ppm, 0.28 ppm and 0.11 ppm respectively, and in the fats of other organs and tissues the average concentrations were in the range of 1.85 for adrenal to 3.20 ppm for liver with most values between 1.9 and 2.4 ppm.
3) The concentrations of PCB in great omentum were found to correlate with those in each of other organs and tissues between individuals except for cerebellm, spinal cord, lung and liver.

緒　言

ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略記する）による環境汚染の実態は，現在までに多くの研究者の努力によって次第に明らかにされ，特に魚介類などの食品汚染は予想以上に広範囲に及んでいることがわかってきた。PCB は化学的に安定で分解されにくく，かつ脂溶性であるため，むろん長期間にわたって環境内に循環，滞留し，食物連鎖による生物濃縮が繰返し行なわれる。その結果，水や大気中に拡散した PCB あるいは食物中に濃縮された PCB は，経口的または経気道的にさまざまな経路からヒトの体内に取込まれ，とりわけ脂肪分に富む組織中に蓄積することになる。PCB の人体汚染に関してはすでに大網組織や皮下脂

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科

肪などの体脂肪についてかなり報告がなされているが，全身的な PCB の分布については，いまだ不明確な点が多く，特定の脂肪組織以外に全般にわたって個々の臓器を調査した報告はあまりみられない。そこで今回男39例，女９例の剖検死体より得た大脳，小脳，脊髄，肺，心，胸骨（髄を含む），肝，膵，脾，腎，副腎，大網組織，腸間膜，皮膚，皮下脂肪の15臓器について PCB 含有量を測定したところ，二三の知見が得られたので報告する。

実験方法

試薬

特にことわりのない限り試薬は試薬特級を用い，また水は蒸留水をn−ヘキサンで洗浄したものを用いた。

１N水酸化カリウム—エタノール溶液：水酸化カリウム（KOH，85％以上）65.0g をエタノールに溶かして1000ml とする。

15％含水フロリジル：フロリジル（和光純薬工業，80～100メッシュ）85g に水 15ml を加え激しく振り混ぜたのち，密栓して保存する。

PCB 標準溶液：カネクロール500（和光純薬工業，以下 KC−500 と略記する）をn−ヘキサンに溶解し，1ml 中 KC−500 1 μg を含有する溶液を調製し，これを PCB 標準溶液とする。

装置

島津ガスクロマトグラフ GC−5AP$_3$FE 形（ECD 付）

試料

昭和47年６月から48年３月までの間に剖検された死体より臓器および脂肪組織の一部を入手し，−25° で冷凍庫に保存したものを分析試料とした。調査例数は総計48例，その内訳は男39例，女９例でこのうち33例は15種類の臓器を，残りの15例は心，肝，大網組織の３種類の臓器を分析した。これらの被験者はいずれも東京都内に在住していたものであり，年令は15才から89才までであった。

試験操作

1　PCBの抽出溶液の調製

大網組織，腸間膜，皮下脂肪の脂肪組織は 20g，その他の脂肪分の少ない臓器は40g の試料をとり，ホモジナイザーを用いてペースト状にしたのち無水硫酸ナトリウムを加え十分混和脱水し，ソックスレー脂肪抽出器を用いてn−ヘキサン 200ml で２時間還流し脂肪と共に PCB を抽出する。抽出液を濃縮して完全に溶媒を留去したのち，残留物を正確にはかりn−ヘキサンに溶かして全量 50ml とし，これを抽出溶液とする。

2　アルカリ分解

大網組織，腸間膜，皮下脂肪は前項で得られた抽出溶液の 10ml，その他の臓器は 40ml を正確にとり，これに１N水酸化カリウム—エタノール溶液 50ml を加え還流冷却器を付し水浴中で１時間加熱する。ケン化後，50°付近まで冷却させてからn−ヘキサン10—40ml を加えて混合し室温まで冷却する。n−ヘキサン—エタノール（1：1）混液 20ml を用いて 300ml の分液漏斗に内容液を完全に洗い込み，これに水 25ml を加え15秒間激しく振り混ぜる。静置後，n−ヘキサン層を分取し，水層は再びn−ヘキサン 50ml ずつで２回抽出を繰返して行なう。全n−ヘキサン層を合せ水100ml ずつで３回水洗したのち，約 10g の無水硫酸ナトリウムのカラムに通して脱水し 10ml 以下に濃縮する。

3　クリーンアップ

内径約１cm，長さ約 20 cm のコック付カラムクロマト用ガラス管にフロリジル ２—３g を n−ヘキサンを用いて充塡し，常法にしたがってフロリジルカラムを調製する。さらにカラムの上端に無水硫酸ナトリウム約１g を層積させ，n−ヘキサン約 20ml を流しカラムを洗浄したのちn−ヘキサンがカラムの上端にわずかに残った状態でコックを閉じておく，このカラムに前項で得られたアルカリ分解濃縮液を注意して加え，容器およびガラス管壁を約10ml のn−ヘキサンで洗浄しながらカラムコックを操作して流下させる。つぎにn−ヘキサン 50ml を２ml/min の流速で流し PCB を溶出させる。ここに得られた溶出液を KD 濃縮器を用いて濃縮し正確に ５ml としてガスクロマトグラフィーの試験溶液とする。

大脳，小脳，脊髄については，フロリジルカラムによる通常のクリーンアップでは脂肪分の除去が不完全で精製できない場合があるので，これらの試料は N. F. Wood[1] によって検討され，脂肪組織中の有機塩素系農薬の分析に用いられた方法を適用してクリーンアップを行なった。すなわちセライト545 3g に前項で得られたアルカリ分解濃縮液を加えときどき攪拌しながら送風してn−ヘキサンを除き，これを内径 2.2cm，長さ 17cm のコック付カラムクロマト用ガラス管にガラス棒を用いてできるだけ密に詰め，ドライカラムを調製する。このカラムにジメチルスルフォキサイド（DMSO）６ml を流し DMSO でカラム全体を湿潤させる。別に同形のクロマト用ガラス管に15％含水フロリジル ７g をn−ヘキサンを用いて充塡し，さらに

無水硫酸ナトリウム約10gを層積させたカラムを調製する。このカラムをさきのドライカラムの下端に接続する。つぎにミニコンプレッサー（AP-220）を用いてドライカラムを加圧し DMSO 約 3 m*l* を接続したフロリジルカラム中に流下させる。ドライカラムを取り除いたのち，フロリジルカラムのガラス管壁を少量の n-ヘキサンで洗浄しながらカラムコックを操作して DMSO を吸着させる。これに n-ヘキサン 50 m*l* を 1 drop/sec の流速で流し PCB を溶出させる。ここに得られた溶出液を KD 濃縮器を用いて濃縮し正確に 5 m*l* としてガスクロマトグラフィーの試験溶液とする。

4　定量

PCB の同定および定量は，ECD ガスクロマトグラフィーによって行なったが，その測定条件をつぎに示す。

カラム：①1.5% OV-17+1.95% QF-1（Uniport KS，100—120メッシュ）ϕ3×1000mm，ガラスカラム

②2% SE-30（Chromosorb GAW DMCS，80—100メッシュ）ϕ3×1500mm，ガラスカラム

カラム温度：180°

検出器温度：210°

検出器：^{3}H（300mc）

キャリアーガス：N_2，60m*l*/min

注入量：5 μl

以上の測定条件によって測定した各試料のガスクロマトグラムは，①および②のカラムのいずれを用いてもすべて KC-500 のそれによく一致していることが認められたため，本実験においては，①のカラムを用い KC-500 を標準品として PCB の定量を行なった。すなわち PCB 標準溶液の一部をとり，n-ヘキサンで希釈して 0.1～1.0ppm の濃度範囲に調製し，そのガスクロマトグラムのピークのうち Fig. 1 に示すNo. 2，5，6，7，8の波高の総和をもって検量線（Fig. 2）を作成した。試料については，さきのピークNo.と RT が一致するピークの波高の総和をもって検量線より試験溶液中の PCB 含有量を求めた。

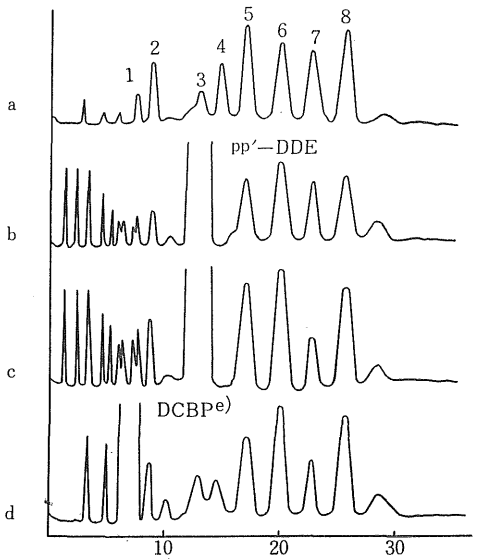


Fig. 1. Gas Chromatograms of PCB Isolated from Human Organs

GC conditions：1.5% OV-17+1.95% QF-1 on Uniport KS (100-120mesh), i. d. 3×1000mm, glass column, column temp.：180°, detector：^{3}H (300 mc), carrier gas：N_2 60ml/min, inj. volume：5μl

a) PCB standard (KC-500)
b) extract of cerebrum
c) extract of great omentum
d) extract of great omentum after oxidation with chromic acid
e) pp'-dichlorodenzophenone

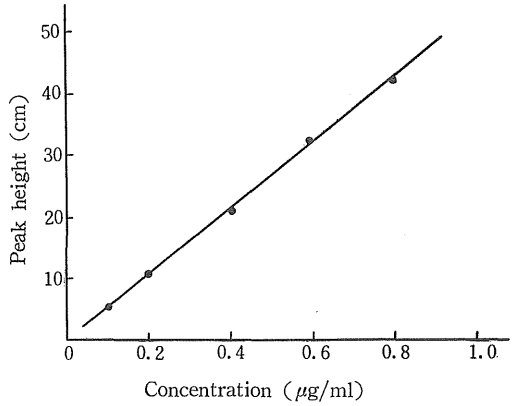


Fig. 2. Calibration Curve for PCB

結果および考察

1　抽出時間について

PCB は体脂肪中に溶存しており，したがって PCB の抽出は脂肪分の抽出率如何によって変動すると考えられるので，ソックスレー脂肪抽出器を用い，脂肪分を完全に抽出する場合に要する時間について検討を行なった。大網組織を試料として均一なペースト状となし，これを10gずつとって常法により無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，それぞれ n-ヘキサン 200m*l* を

加え，ソックスレー脂肪抽出器の還流を30～180分間行なったところ，Fig. 3 に示すように60分間の還流時間で脂肪分の抽出率はほぼ一定となることが認められた。したがってソックスレー脂肪抽出器の還流は2時間行なうことにした。

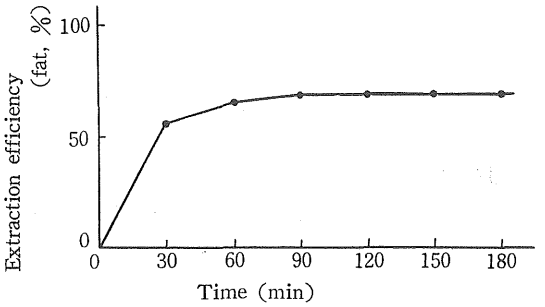


Fig. 3. Effect of Reflux Time on Extraction Efficiency of Fat with n-Hexane in Soxhlet Apparatus
Each sample was treated a 10g aliquot of great omentum

2 アルカリ分解について

アルカリ分解は厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班（以下単に研究班という）の方法[2] に準じて行なったが，試料より抽出した脂肪分をn-ヘキサンに溶かし，その溶液の一定量（10—40m*l*）をとって研究班の方法と異なりn-ヘキサンの共存下でアルカリ分解を行なった。そのためn-ヘキサンの存在がアルカリ分解の効率に影響を与えることも考えられるので，つぎの3点について研究班の方法との比較を行なった。すなわち(1)残留農薬の分解，(2)脂肪分のケン化，(3)実測値について検討した。(1)は α—BHC，β—BHC，γ—BHC，δ—BHC，pp′—DDT，pp′—DDE，aldrine, endrin の各 0.5μg の混合物およびこれに KC－500 4 μg を加えたものを調製し，それぞれn-ヘキサン50m*l*を加えてアルカリ分解したところ，Fig. 4 に示すように KC－500 は何ら変化がみられず，添加した塩素系農薬は，aldrine，pp′—DDE を除いて完全に分解消失することが認められた。(2)については，脂肪分（大網組織）4 g ずつをとり，これらを直接アルカリ分解したものとn-ヘキサン50m*l*を加えて同じくアルカリ分解を行なったものを常法によりフロリジルカラムでクリーンアップしたのち，それぞれ溶媒を留去し残留物を秤量したところ，いずれの場合も 5 mg 以下で十分ケン化が行なわれていた。(3)は脂肪分（大網組織） 1 g にn-ヘキサン 50m*l* を加えてアルカリ分解したところ，その測定値は，2.63，2.55，2.50μg，平均 2.56μg，また同様に脂肪分そのものを直接アルカリ分解した場合には，2.53，2.51，2.71μg，平均2.58μg で両者の測定値はよく一致し，それらのガスクロマトグラムの間にも著しい差異は認められなかった。したがってn-ヘキサン共存下でアルカリ分解を行なっても，農薬の分解，脂肪のケン化は十分行なわれ，PCB の定量に障害は認められなかった。ただし大脳，小脳，脊髄は，n-ヘキサンに不溶性の不ケン化物がみられ，これについてはクリーンアップの方法を変えることによって解決した。

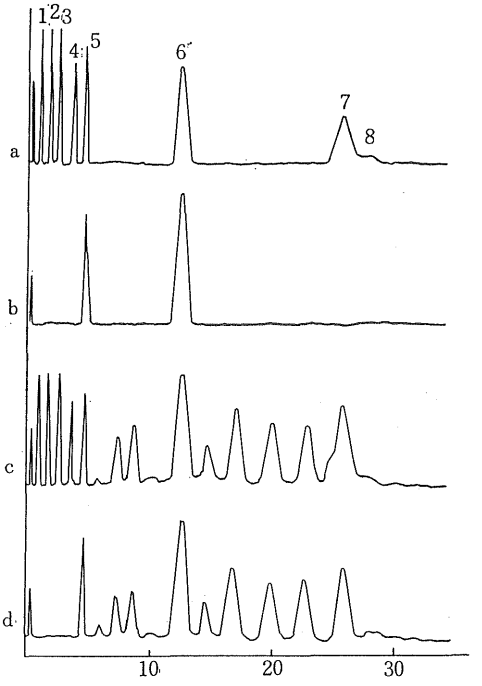


Fig. 4. Gas Chromatograms of Some Chlorinated Pesticides and KC-500 before and after Alkaline Hydrolysis
GC conditions : same as in Fig.1.
1. α-BHC 2. γ-BHC 3. β-BHC 4. δ-BHC
5. aldrine 6. pp'-DDE 7. pp'-DDT
8. endrin
a) chlorinated pesticies (0.05ppm) before alkaline hydrolysis
b) chlorinated pestcides (0.05ppm) after alkaline hydrolysis
c) mixture of chlorinated pesticides (0.05ppm) and KC-500 (0.4ppm) before alkaline hyrolysis
d) mixture of chlorinated pesticides (0.05ppm) and KC-500 (0.4ppm) after alkaline hyrolysis

3　クリーンアップについて

さきに述べたように大脳，小脳，脊髄は，アルカリ分解後，n－ヘキサンに不溶性の白色残留物がみられ，これらをフロリジルカラムやシリカゲルカラムでクリーンアップを行なっても完全に精製することができなかった。そこで大脳，小脳，脊髄の各試料については，N. F. Wood[1] の方法にしたがってクリーンアップすることとし，充塡剤としてセライト545　3g，15%含水フロリジル7gを，またカラムクロマト用ガラス管は内径 2.2cm，長さ 17cm のものを用い，この条件でPCB を溶出させるのに要する(1)DMSO の量，(2)n－ヘキサンの量について検討を行なった。(1)は KC－500 5 μg をセライトに添加して常法によりドライカラムを調製し，これにDMSOを加圧流下させてフラクションを 1 ml ずつとり，それぞれ PCB の溶出率を求めたところ，Fig. 5 に示すように PCB の溶出に必要な

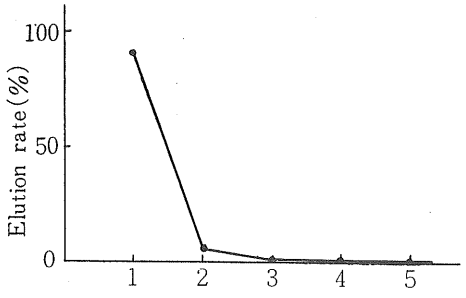


Fig. 5. Elution of KC-500 with DMSO from the Mixture of Celite 545 and KC-500

absorbent : Celite 545 (3g), solvent : DMSO, KC-500 : 5μg, fraction : 1 ml

DMSO の流下量は 3 ml であることがわかった。また(2)については，KC－500　5 μg を DMSO 3 ml に添加し，この溶液を15%含水フロリジルカラムの上端に静

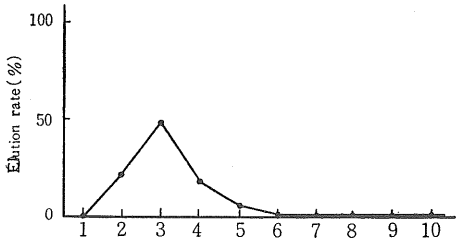


Fig. 6. Elution of KC-500 with n-Hexane on Florisil Column (7g)

absorbent : Florisil deactivated with 15% of water, KC-500 : 5μg in 3 ml of DMSO, solvent : n-hexane, fraction : 5 ml

かに加えてしませたのち，n－ヘキサンを流してフラクションを 5 ml ずつとり，それぞれについて PCB の含有量を測定したところ，Fig. 6 に示すようにn－ヘキサン 50ml を流せば，PCB の溶出はほぼ完全であることがわかった。したがって N. F. Wood の方法の溶出条件として，ドライカラムでは DMSO を 3 ml 流下させ，フロリジルカラムではn－ヘキサン 50ml を PCB の溶出に用いることにした。

4　PCBの確認について

PCB の確認は，ECD ガスクロマトグラフィーによる方法として，(1)カラムの種類による判定，(2)クロム酸酸化，(3)十塩素化法で行ない，またこのほか(4)薄層クロマトグラフィーによっても確認を行なった。(1)は 1.5% OV－17＋1.95% QF－1 (Uniport KS) と 2% SE－30 (Chromosorb GAW DMCS) の2種類のカラムを用いて試験操作の項で得られたガスクロマトグラフィー用試験溶液を測定したところ，それらのガスクロマトグラムのピークパターンは，臓器間ならびに個体間でほとんど変化はなく，いずれも KC－500 のパターンに相似していた。Fig. 1 に大網組織，大脳および KC－500 のガスクロマトグラムを示す。水谷ら[3]は大網組織を分析し，脂肪中の PCB は塩素数が4―6のクロロビフェニールであることを認め，KC－500 を標準品として定量を行なっている。また F. J. Biros[4] らも体脂肪中の PCB は Aroclor 1254 および 1260 に相当していると報告している。Fig. 1 に示すように臓器中の PCB のピークパターンは，KC－500 が主体をなしているので，PCB の定量は KC－500 を標準品として用いることにした。(2)は試験溶液を KD 濃縮器を用いて濃縮したのち，クロム酸溶液（無水クロム酸 1.5g を水 1 ml 酢酸 59ml に溶かす）2 ml を加え，水浴上で30分間加温し，冷後，n－ヘキサン 10ml ずつ2回抽出し，水洗脱水後，5 ml に濃縮した液をガスクロマトグラフに注入した。このクロム酸酸化法で15種類の各臓器について検討したところ，いずれも DDE はジクロロベンゾフェノンに分解され，RT の小さいピークに移動したが，PCB のガスクロマトグラムは，クロム酸酸化を行なってもほとんど変化が認められなかった（Fig. 1）。(3)は試験溶液を前報[5] の十塩素化法にしたがって，15種類の各臓器について検討したところ，いずれも単一のピークを示し，その RT はデカクロロビフェニールに一致することが認められた。(4)は 0.4%硝酸銀含有アルミナによる薄層クロマトグラフィー[6] で行なったが，硝酸銀 0.2g を水 3 ml とメタノール 47ml に溶かし，これにアルミナG（タイプ

E，メルク社）45g を加え，混和後，厚さ 0.25—0.3 mm の薄層を作り風乾する。この薄層に試験溶液を適当に濃縮したものを 20μl スポットし，ベンゼン-n-ヘキサン（1：19）で10cm上昇展開したのち，風乾して30分間紫外線照射し灰黒色のはん点を観察する。この方法により各臓器のクロマトグラムを観察したところ Fig. 7 に示すようにクロム酸酸化によって DDE のスポットは，Rf値の小さいジクロロベンゾフェノンに変わり，PCB のスポットを確認することができた。

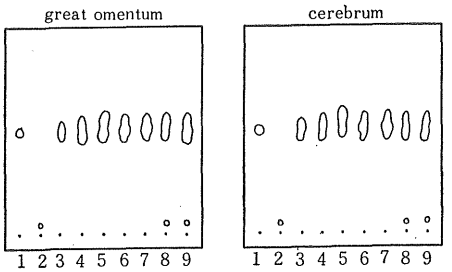


Fig. 7. Thin Layer Chromatograms of Extracts of Great Omentum and Cerebrum

thin layer：0.4% $AgNO_3$-incorporated aluminium oxide G (type E)
solvent：benzene-n-hexane (1：19)
visualization：irradiation of UV ray (2537 Å) for 30 min
1. 1μgpp'-DDE 2. 1μgpp'-dichlorobenzophenone 3. 1μgKC-400 4. 1μgKC-500 5. 1μgKC-600 6. sample 7. mixture of 6 and KC-500 8. sample oxidized with chromic acid 9. mixture of 8 and KC-500

5 回収率について

大網組織および大脳の抽出脂肪分を試料として，これに KC－500 を添加し，以下試験操作の項にしたがって回収実験を行なった。すなわち大網組織の脂肪分 1.0g にそれぞれ KC－500 を 0.5，1，2，3 μg ずつ添加し，3回ずつ回収実験を行なったところ Table I に示すように回収率は 75.4～121.6 %であった。また大脳の場合は，N. F. Wood らの方法にしたがってクリーンアップを行なったが，大脳の脂肪分 2.0g にそれぞれ KC－500 を 1，2，3 μg ずつ添加し，3回ずつ回収実験を行なったところ，Table II に示すように 91.8～102.5 %と比較的良好な結果が得られ，ほぼ定量的に回収できることが認められた。

6 測定結果

PCB の測定結果は，臓器の湿潤重量あたりの値（ppm）と脂肪分重量あたりの値（ppm）として表わし，測定値の範囲，平均値，標準偏差および臓器中の脂肪量（%）を Table III に示す。ただし数値化できなかった場合は，trace として表わし，平均値や標準偏差の算出にはこれをゼロとした。

Table III に示すように測定した対象臓器の全部に PCB が認められ，湿潤重量あたりの平均値で示すと，

Table I. Recovery of PCB (KC-500) from Extractable Fat of Great Omentum, Using Florisil Column for Cleanup

Fat (g)	PCB added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
1.0	—	2.63	—
1.0	—	2.55	—
1.0	—	2.50	—
		Mean 2.56	
1.0	0.5	3.07	101.6
1.0	0.5	3.17	121.6
1.0	0.5	2.97	81.6
1.0	1.0	3.67	118.8
1.0	1.0	3.64	101.8
1.0	1.0	3.54	97.8
1.0	2.0	4.53	98.7
1.0	2.0	4.85	114.4
1.0	2.0	4.15	79.4
1.0	3.0	5.39	94.4
1.0	3.0	5.20	88.1
1.0	3.0	4.82	75.4

Table II. Recovery of PCB (KC-500) from Extractable Fat of Cerebrum According to the Method of N. F. Wood for Cleanup

Fat (g)	PCB added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
2.0	—	0.90	—
2.0	—	0.80	—
		Mean 0.85	
2.0	1.0	1.77	92.5
2.0	1.0	1.80	95.5
2.0	1.0	1.85	100.5
2.0	2.0	2.76	95.8
2.0	2.0	2.90	102.5
2.0	2.0	2.76	95.6
2.0	3.0	3.60	91.8
2.0	3.0	3.65	93.5
2.0	3.0	3.69	94.7

Table III. Concentrations of PCB in Human Organs and Tissues Obtained at Autopsy

Organ and tissue	No. of samples	Concentration of PCB in wet material (ppm)			Concentration of PCB in fat (ppm)			Fat (%)
		Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	Mean
Cerebrum	32	0.004—0.068	0.023	0.015	0.023— 0.91	0.20	0.18	12.9
Cerebellum	31	0.005—0.05	0.025	0.010	0.061— 0.61	0.28	0.16	9.9
Spinal cord	24	trace —0.12	0.021	0.032	trace — 0.56	0.11	0.15	17.2
Lung	33	0.005—0.12	0.033	0.020	0.54 —11.83	2.57	2.23	1.6
Heart	47	0.018—1.11	0.38	0.25	0.21 — 6.61	2.18	1.24	18.5
Sternum	32	0.087—0.94	0.44	0.22	0.63 — 8.43	2.09	1.32	22.1
Liver	48	0.038—0.59	0.16	0.12	0.57 —11.42	3.20	2.34	6.4
Pancreas	32	0.053—0.91	0.37	0.21	0.61 — 6.96	1.91	1.18	22.2
Spleen	33	0.002—0.19	0.064	0.046	0.46 — 9.55	2.39	1.81	3.5
Kidney	33	0.019—0.29	0.093	0.068	0.71 — 5.14	1.91	0.88	5.2
Adrenal	33	0.13 —1.55	0.55	0.30	0.58 — 7.50	1.85	1.18	32.2
Great omentum	48	0.26 —4.38	1.54	0.87	0.67 — 8.51	2.31	1.48	66.7
Mesentery	33	0.24 —3.24	1.27	0.59	0.83 — 8.07	2.08	1.27	63.2
Skin	33	0.052—0.38	0.15	0.09	0.54 — 6.84	2.03	1.16	8.1
Subcutis	33	0.43 —4.16	1.35	0.74	0.93 — 5.91	1.97	1.00	68.9

SD : standard deviation ($\sqrt{V}$)

PCB 含有量は大脳，小脳，脊髄<肺<脾<腎<皮膚<肝<膵<心<胸骨<副腎<腸間膜，皮下脂肪，大網組織の順で高くなる。この順序は大体臓器中の脂肪量(%)に対応しているが，大脳，小脳，脊髄の各組織は，脂肪量がかなり多いにもかかわらず，PCB 含有量は，他の臓器に比べて低いことが認められた。また脂肪分重量あたりの平均値で示すと，大脳，小脳，脊髄以外の臓器間ではバラツキが小さく，ほぼ一定の値ををとる傾向がみられ，その値は約 2 ppm ぐらいであるが，大脳，小脳，脊髄は他の臓器に比べて約 1/10 低い値を示した。このような傾向は，今回調査した被験者の全例に認められた。したがってヒトの体内に蓄積した PCB は，体脂肪中にほぼ均一に分布するが，脳中の分布量は特異的に低いといえる。D.B. Peakall[7] によると，ラットに投与した Aroclor 1254 の蓄積量の減少率は，腎<心<睾丸<血液<脾<脳の順であり，脳の排泄性は高いと報告している。脳中の PCB 含有量が低いことは，このような PCB の脳からの排泄性が関連しているように思われる。なお，菊地ら[8] は油症患者の剖検例2例（男25才，男73才）について大脳，皮膚，腸間膜，肺，肝，心，骨髄，副腎，腎などの臓器中の PCB を測定し，腸間膜，骨髄などの脂肪組織には PCB が多く認められるが，脳は両者ともに微量であったと報告している。

さきに Table III において述べたように，PCB 含有量は，この物質の化学的性質から臓器中の脂肪量と対応しているものと考えられるが，さらにこの点を明確にするため，湿潤重量あたりの PCB 含有量と臓器中の脂肪量との間の関連性について検討を行なった。個体内における相関係数（r）を Table III の平均値から求めたところ，$r=0.9787$で強い相関性が認められた。このようなことは15種類の臓器を分析した33例すべてに認められ，その相関係数は，いずれも0.95以上であった。また個体間において各臓器別に PCB 含有量と脂肪量との間の相関係数を求めたところ Table IV に示すように個体内ほど強い関係は認められなかったが，心，腎など臓器によっては，ある程度の相関性がみられた。さらに個体間において大網組織とその他の14種類の臓器の PCB 含有量（脂肪分重量あたりの値）との相互間における相関係数を求めたところ Table V に示すように r の値は全般に高く，大脳，心，胸骨，膵，腎，副腎，腸間膜，皮膚，皮下脂肪にかなり強い相関性が認められた。したがって大網組織などの脂肪組織の脂肪分重量あたりの PCB 含有量からその他の臓器中の PCB 含有量をある程度推定できるものと考えられる。

今回調査した大網組織のうち，脂肪分重量あたりの値として高い値を示したものは，男41才と男85才の2例であった。すなわち大網組織，肝，心の PCB 含有量は，前者が8.51ppm，8.78ppm，6.01ppm，後者が

Table IV. Correlation between Concentrations of PCB and Fat in Organs and Tissues

Organ and tissue	No. of samples	$r^{a)}$
Within individual[b)]	15	+0.979**[c)]
Between inpividuals		
Cerebrum	32	−0.281
Cerebellum	31	−0.186
Spinal cord	24	+0.399
Lung	33	−0.010
Heart	47	+0.721**
Sternum	32	−0.096
Liver	48	+0.495
Pancreas	32	+0.636**
Spleen	33	+0.667**
Kidney	33	+0.823**
Adrenal	33	+0.550
Great omentum	48	+0.292
Mesentery	33	+0.256
Skin	33	+0.552
Subcutis	33	+0.336

a) correlation coefficient
b) Correlation coefficient of 'within individual' was calculated from mean values (Table III) of concentrations of PCB and fat in organs and tissues.
c) **P<0.01

Table V. Correlation between Concentrations of PCB in Fat of Great Omentum and Those of Other Organs and Tissues

Organ and tissue	No. of samples	$r^{a)}$
Cerebrum	32	+0.725**[b)]
Cerebellum	31	+0.570
Spinal cord	24	+0.233
Lung	33	+0.339
Heart	47	+0.891**
Sternum	32	+0.965**
Liver	48	+0.455
Pancreas	32	+0.946**
Spleen	33	+0.665**
Kidney	33	+0.876**
Adrenal	33	+0.934**
Mesentery	33	+0.941**
Skin	33	+0.895**
Subcutis	33	+0.903**

a) correlation coefficient
b) **p<0.01

7.36ppm, 5.14ppm, 6.61ppm でその死因はそれぞれ肺結核症と融合性化膿性気管支肺炎であった。この2例を含めて特に被験者の死因，病歴，職業および年令とPCB 含有量との間には関連性が認められなかった。

要　約

1　男39例，女9例の剖検死体（PCB 非曝露者）より得た15種類の臓器について PCB を測定した。

2　体脂肪中の PCB は，個体内の各臓器間ではほぼ一定の分布量を示したが，大脳，小脳，脊髄は，特異的に低く，その他の臓器の 1/10 以下であった。

3　臓器の湿潤重量あたりの PCB 含有量は，脂肪量に比例し，その相関性は，個体内では強く，個体間ではほとんど認められなかった。また個体間における各臓器の脂肪分重量あたりの PCB 含有量は，対応する大網組織の PCB 含有量との間にかなり強い相関性が認められた。

4　被験者の死因，職業，年令と PCB 含有量との間には関連性が認められなかった。

謝辞　本研究にあたり終始御協力をたまわった東京都監察医務院の河野　林博士ならびに諸先生方に深謝致します。

なお本研究は日本薬学会第93年会において発表したものである。

文　献

1) Wood, N. F. : Analyst, 94, 399 (1969)

2) 厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班：PCB 様物質による環境汚染の防止に関する特別研究「分析方法に関する研究」(1972)

3) 水谷民雄，松本正義，藤原邦達：日本食品衛生学会第23回学術講演会講演要旨，9 (1972)

4) Biros, F. J., Walker, A. C. and Medbery, A. : Bull. Environ. Contam. & Toxicol., 5, 317 (1970)

5) 原田裕文，観　照雄，植田忠彦，竹内正博，江波戸挙秀，鎌田国広，戸谷哲也：東京都立衛生研究所研究年報，23，111 (1971)

6) 荒木　峻，丸山正生，山根端弘，立川　涼，戸谷哲也，本間春雄：科学技術庁第2回 PCB 分析法研究会検討資料，31，(1973)

7) Peakall, D. B. : Bull. Environ. Contam. & Toxicol., 6, 100 (1971)

8) 菊地昌弘，御鍵覿治，橋本美智雄，小嶋　淳：福岡医誌，62，89 (1971)

ゴム製器具に関する衛生化学的研究(第1報)
乳首中の鉛および亜鉛について

西田茂一* 小林史尚*

HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON RUBBER UTENSIL (I)
LEAD AND ZINC CONTENTS IN RUBBER NURSING-BOTTLE NIPPLES

Shigekazu NISHIDA and Humitaka KOBAYASHI

(Division of Microanalysis, Department of Chemistry,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

There are few research papers for the study of lead and zinc in rubber nursing-bottle nipples, and an investigation into the actual conditions has a food hygienic significance.

Therefore, the determinations of lead and zinc were carried out under the several conditions.

The results obtained are summarized as follows:

1) Alkaline digestion method:

As the results of qualitative analysis, lead was negative and zinc was positive.

2) 4% acetic acid extraction method:

The concentration of zinc ranged from 0.10 ppm to 1.70 ppm, the mean amount was 0.60 ppm and lead was negative by atomic absorption spectrophotometry.

3) Wet digestion method:

As the quantitative analysis by dithizon method, the concentration of the total lead ranged from 0.90 ppm to 7.60 ppm and the mean amount was 4.20 ppm.

The concentration of total zinc ranged from 0.07% to 0.50% and the mean amount was 0.27% by atomic absorption spectrophotometry.

4) Hot water extraction method:

As the results of quantitative analysis, lead was negative and the concentration of zinc ranged from 0.10 ppm to 0.50 ppm.

1 緒 言

厚生省編纂衛生検査指針Ⅲ—Ⅰ—Ⅺ (1969) の飲食物用器具の項，ならびに日本薬学会編衛生試験法 (1957) 飲食物用器具試験法には，ゴム製ほ乳器具の具体的試験法[1)2)] が記載されている。これによれば，いずれも検体をアルカリと共に燃化し，分解後，試験溶液を調製し，これについて鉛および亜鉛の定性を行なっている。しかしながら現在の加硫ゴムの基本的かつ平均的配合において，酸化亜鉛または亜鉛塩を用いない

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科

製造方法は少なく，多かれ少なかれこれを添加していることが推定される[3)4)]。事実わたくしたちは，アルカリ燃化法等の分解法を用いて試験溶液を調製し，試験を行なったとき，特殊なサンプルを除き，あきらかに亜鉛の反応を認めている。

したがって著者らは，これらの実態を掌握することと共に，新たなほ乳器具基準設定の基礎資料の一助とすることを目的として，まず鉛および亜鉛について調査を行なうことにした。

すなわち，乳首中の鉛および亜鉛について，前記2成書[1)2)]による試験を行なう一方，原子吸光法，ジチゾン法等による微量定量も行なった。また使用状態を加味した私案による溶出実験も実施し，これらの状況をまとめたので報告する。

2　実験の部

(1)　試　　料

試料に用いた乳首は，国産品5種，外国製13種である。

(2)　試　　薬

亜鉛標準溶液：金属亜鉛（99.9％以上）1.000ｇを正確にはかり，1Ｎ硝酸100m*l*を加え，注意して加熱し溶解し，冷後1Ｎ硝酸を加えて1000m*l*とし保存溶液とする。用に臨みこれを0.5Ｎ硝酸で100倍にうすめ，亜鉛標準溶液として用いる。

亜鉛標準溶液1ｍ*l*＝10μg Zn

鉛標準溶液：硝酸鉛159.8mgを正確にはかり，10％硝酸10m*l*を加えて溶かし，メスフラスコに移し，水を加えて1000m*l*とし，鉛標準溶液とする。

鉛標準溶液1ｍ*l*＝10μg Pb

25％酒石酸カリウムナトリウム溶液：酒石酸カリウムナトリウム250ｇに水750mlを加え調製した。

BTB試液：ブロムチモールブルー100mgを希エタノールに溶かし，100m*l*とする。

飽和硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウムを温水に溶かし，放冷後，結晶を析出させ，その上澄液を用いる。

10％ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（以下DDTCと略す）溶液：DDTC10ｇを水に溶かし，100m*l*とする。

クエン酸アンモニウム溶液：クエン酸アンモニウム40ｇに水を加えて100m*l*とする。

亜硫酸ナトリウム溶液：亜硫酸ナトリウム15ｇに水を加えて100m*l*とする。

シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム10ｇに水を加えて100m*l*とする。

希シアン化カリウム溶液：シアン化カリウム溶液10m*l*に水を加えて100m*l*とする。

ジチゾンベンゼン溶液：ジチゾン20mgにベンゼン50m*l*を加えて溶かし，分液漏斗に入れ，うすめたアンモニア試液（1→40）50m*l*，亜硫酸ナトリウム溶液5m*l*およびシアン化カリウム溶液2～3m*l*を加えて振り混ぜたのち，水層を分取する。さらにベンゼン層にうすめたアンモニア試液（1→40）20m*l*，亜硫酸ナトリウム溶液2m*l*およびシアン化カリウム溶液1m*l*を加えて振り混ぜ，水層を分取して前の水溶液に合わせる。この液にベンゼン20m*l*を加えて振り混ぜたのち水層を分取し，うすめた塩酸（1→10）を加えて酸性とし，さらにベンゼン50m*l*を加えて振り混ぜたのち水層を捨てる。ベンゼン溶液を水50m*l*ずつで2回洗ったのちベンゼンを加えて1000m*l*とする。しゃ光し冷所に保存する。

(3)　装　　置

原子吸光分析装置：Perkin-Elmer Model 403

比色分析装置：日立自記分光光度計（323型）

(4)　試験方法

(4)—1：アルカリ燃化法による鉛および亜鉛の定性

磁製ルツボ中に硝酸カリウムと炭酸ナトリウムとの同量の混和物5ｇを熔融しておき，これに細かに切った試料2ｇを少量ずつ加え燃化し，冷後，その内容物をなるべく少量の硝酸に溶解中和し，試験溶液とする。

試験溶液について，ヨウ化鉛，クロム酸鉛，硫化鉛の反応および硫化亜鉛，チオシアン酸水銀亜鉛の反応を試み定性試験を行なった。

(4)—2：4％酢酸抽出液中の鉛および亜鉛

試験溶液の調製

試料を約5 mm³に細切し，その1ｇを100m*l*の三角フラスコに入れ，あらかじめ60°にあたためた4％酢酸100m*l*を加え，ときどきガラス棒でかきまぜながら60°で30分間放置後ろ過し，ろ液を分取する。さらに試料を少量の水で洗い，ろ液をあつめる。ここに得たろ液すなわち溶出液に多量の有機物が存在する場合は，以下の処理を行なう。

溶出液全量を，ケルダールフラスコにとり，加熱し，5～10m*l*になるまで濃縮する。冷後，硫酸2m*l*，硝酸5m*l*を加え加熱する。必要があれば少量の硝酸を加え，内容液が淡黄色～無色になるまで加熱をつづけ，さらに硫酸の白煙が発生するまで加熱する。放冷後これに水を加え，正確に100m*l*として試験溶液とした。

鉛の定量

試験溶液50mlをとり，25%酒石酸カリウムナトリウム溶液5 mlおよびBTB試験液2滴を加え，液の色が黄色から緑色になるまでアンモニア水で中和し，さらに水を加えて100mlとする。これに飽和硫酸アンモニウム溶液10mlを加え，10% DDTC溶液5 mlを加えて混和し，数分間放置したのち，メチルイソブチルケトン(MIBK) 10.0mlを加え，5分間激しく振り混ぜる。これを静置してMIBK層を分取し，原子吸光分析装置を用い波長283.3nmで吸光度AおよびAbを測定した。

別に鉛標準溶液からPbを，3，5，10，15μgを正確にとり，同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の鉛の含有量を求めた。

亜鉛の定量

試験溶液を原子吸光分析装置に直接吸入させて吸光度を測定した。測定波長は，213.8nmを用いた。

別に亜鉛標準溶液からZnを，10，20，60，150，200 μgを正確にとり，硫酸2 mlおよび水を加えて正確に100mlとする。これについて同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の亜鉛の含有量を求めた。

(4)—3　材質中の鉛および亜鉛の定量

試験溶液の調製

(i)　鉛：試料約1 gを精密にはかり，ケルダールフラスコに入れ，硫酸10mlを加え加熱する。炭化したならば，熱時において，炭化物に直接接触するように，少量の硝酸を滴加する。この操作を操り返し，液が淡黄色～無色になるまでつづける。放冷後これを試験溶液とした。

(ii)　亜鉛：試料約0.05 gを精密にはかり，ケルダールフラスコに入れ，硫酸2 mlを加え加熱する。以下鉛の試験溶液の調製と同様に処理し，分解液は水を加えて正確に100mlとし，試験溶液とした。

鉛の定量操作（ジチゾン法)[5]

試験溶液に水20mlを加え放冷後，45%クエン酸アンモニウム溶液5 mlおよびメチルオレンジ試液2滴を加え，液が黄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10mlおよび10%シアン化カリウム溶液20mlを加え，よく振り混ぜ，水浴上で10～15分間加熱する。冷後強アンモニア水1.5mlを加えたのち，分液漏斗に移し，ジチゾンベンゼン溶液10mlを正確に加え，30秒間はげしくふりまぜ，放置したのち，ベンゼン層を分取し，ベンゼンを対照とし，層長10mmで波長520nmにおける吸光度を測定する。

別に鉛標準溶液を同様に処理して得た検量線より鉛の量を求めた。

亜鉛の定量操作

試験溶液を，原子吸光分析装置に直接吸入させて吸光度を測定した。

別に亜鉛標準溶液からZnを，50，100，150，200，250，300μgを正確にとり，硫酸2 mlおよび水を加えて正確に100mlとする。これについて同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の亜鉛の含量を求めた。

(4)—4　温湯抽出液中の鉛および亜鉛

試験溶液の調製

試料の表面積1 cm²当たり2 mlの割合で60°の水を加え，60°に保ちながら30分間抽出した液を試験溶液とした。

定量操作

試験溶液を原子吸光分析装置に直接吸入させて吸光度を測定した。この際の測定波長は，鉛は283.3nm，亜鉛は213.8nmを用いた。

別に鉛標準溶液からPbを，3，5，10μg正確にとり，水を加えて正確に100mlとし，また亜鉛標準溶液からZnを，5，10，20，50，70，100μgを正確にとり，水を加えて正確に100mlとする。両者について，同様に操作して作成した検量線から試験溶液中の鉛および亜鉛の含量を求めた。

3　結果および考察

(1)　アルカリ燃化法によって調製した試験溶液中の鉛および亜鉛の定性結果は，Table Iに示すとおりである。すなわち，シリコーンゴム製をのぞくすべての乳首より鉛は陰性，亜鉛は陽性の結果を得た。

なお本操作上，ルツボ中の燃焼が爆発的で，試料の損失を招き易い例も認められたので一応留意すべき事項と考える。

Table I　Qualitative Analysis for Pb and Zn in Nipples by Standard Methods of Analysis for Hygienic Chemists

Element / Sample No.	Pb	Zn	Element / Sample No.	Pb	Zn
1	(−)	(+)	10	(−)	(+)
2	(−)	(+)	11	(−)	(+)
3	(−)	(+)	12	(−)	(+)
4	(−)	(+)	13	(−)	(+)
5	(−)	(+)	14	(−)	(+)
6	(−)	(+)	15	(−)	(+)
7	(−)	(+)	16	(−)	(+)
8	(−)	(+)	17	(−)	(+)
9	(−)	(+)	18	(−)	(+)

(2) 細切試料を4％酢酸で抽出したとき，抽出液中の鉛および亜鉛の量は，TableⅡのとおりである。

これによれば，鉛は検出されなかったが亜鉛は0.10～1.70 ppmの溶出を認めた。また平均値は0.60 ppmであった。

Table II Concentration of Pb and Zn exracted with 100 times as much as sampls 4% acetic acid of from Nipples at 60° for 30min.

ELement	Pb	Zn	Element	Pb	Zn
Sample No.	(ppm)	(ppm)	sample No.	(ppm)	(ppm)
1	0.0	0.20	10	0.0	0.34
2	0.0	0.30	11	0.0	0.45
3	0.0	0.10	12	0.0	0.29
4	0.0	0.65	13	0.0	0.90
5	0.0	0.21	14	0.0	0.20
6	0.0	1.50	15	0.0	0.96
7	0.0	0.20	16	0.0	0.28
8	0.0	0.34	17	0.0	1.70
9	0.0	0.70	18	0.0	1.70

Sample size is about 5mm³

Table III Operating Condition

Element	Pb	Zn
Wave Length (nm)	283	214
Acetylene Flow Rate(1/min)	4	6
Air Flow Rate(1/min)	23	
Burner	Three-Slot	
Lump	Hollow Cathod Lump	
Concentration	300	10
Acetylene Pressure	0.55kg/cm²	
Air Pressure	2kg/cm²	

(3) 試料を約5 mm³に細切するとき，1.7mm×1.7mm×1.7mmの場合もあれば，5 mm×1 mm×1 mmあるいは2.5mm×2 mm×1 mmの場合もある。これによって表面積はみな異なるので一定にしなければならない。またすべての検体について，一定粒度のものを手作業でつくり出すことはむずかしく，個人差の多い試料片が出来易い。ここではおおむね1.7mm×1.7mm×1.7mmの立方体を作製し用いた。

(4) 材質中の鉛の定量値は0.90～7.60 ppmで平均値は4.20 ppmであった。

材質中の亜鉛の定量値は0.07％～0.50％で，平均値は0.27％であった。このうち国産品の亜鉛含量は0.21％以下であった。これらの値は天然ゴム，ポリイソプレン等のエラストマーを用いて作製した乳首に含まれる亜鉛量としては，通常の配合に見られる数値と思われる。

「西ドイツ連邦食品取引用プラスチック推せん基準」には「乳首の亜鉛含有量は1.0％を超えてはならない」[6]旨の記載があり，今回扱った試料中にはこれを超えるものは無かった。

Table IV Concentration of Pb in Nipples by Dithizon Method

Sample No.	Pb(ppm)	Sample No.	Pb(ppm)
1	0.90	10	4.20
2	2.60	11	1.92
3	1.42	12	7.52
4	2.80	13	3.10
5	2.45	14	6.70
6	4.85	15	2.81
7	1.40	16	7.52
8	2.90	17	7.60
9	7.50	18	7.00

Table V Concentration of Zn in Nipples by Atomic Absorption Spectrophotometry

Sample No.	Zn (％)	Sample No.	Zn (％)
1	0.30	10	0.42
2	0.50	11	0.48
3	0.16	12	0.21
4	0.41	13	0.28
5	0.19	14	0.14
6	0.10	15	0.44
7	0.16	16	0.16
8	0.40	17	0.37
9	0.07	18	0.37

(5) 都内に販売されていた製品4種について，1 cm²あたり2 mlの割合で60°の水を加え，30分間抽出し，ここに得た抽出液について定量したところ，鉛は検出されなかったが亜鉛は0.10 ppmのもの1種，0.30 ppmのもの2種，0.50 ppmのもの1種であった。

(6) 回収率

材質中の鉛：試料約1 gずつを精密にはかり，湿式灰化し，これに鉛を添加して3回ずつ回収実験を行なった。回収率は平均98.1％であった。

材質中の亜鉛：試料約0.05 gずつを精密にはかり，湿式灰化し，これに亜鉛を添加して3回ずつ回収実験を

行なった。回収率は平均98.2%であった。

Table VI Recovery of Pb Added to Wet Digestive Solution of Nipple Samples

Present(μg)	Added(μg)	Found(μg)	Recovery(%)
0.94	5	5.38～ 5.41	88.8～ 89.4
1.42	5	6.09～ 6.15	93.4～ 94.6
4.20	5	9.12～ 9.21	98.4～100.2
4.85	5	9.89～ 9.90	100.8～101.0
7.00	5	12.10～12.15	102.0～103.0
7.52	5	12.66～12.67	102.8～103.0

Table VII Recovery of Zn Added to wet Digestive Solution of Nipple Samples

Present(μg)	Added(μg)	Found(μg)	Recovery(%)
70	50	120～123	100～106
80	50	130～131	100～102
105	50	153～155	96～100
140	50	187～189	94～ 98
200	50	248～249	92～ 94

4 要　約

(1) シリコーンゴム製を除く加硫ゴム製乳首中の鉛および亜鉛について試験したが，材質中の鉛および溶出液中の鉛については，衛生化学的見地より特に述べることは無いと思われる。

(2) 取扱った試料のすべてに亜鉛化合物の使用が推定されるので，アルカリ燃化法等の試験法で亜鉛を試験したとき，その結果が陽性であっても，衛生化学的標準において新たな判定基準の設定が望まれる。

(3) 現在の加硫ゴム製品の多くは，酸化亜鉛を加硫剤としているようで，これの添加は不可欠の要素のようである。しかしながら乳首中の亜鉛量は制限されるべきで，特に可溶性亜鉛塩の添加はさけるべきである。

(4) わが国の食品衛生法にはゴム製ほ乳器具の具体的試験法は告示されていない。したがって実態に測した試験法の制定が望まれるところである。たとえば，本報中の温湯抽出による結果など，試験法制定上の一助ともなれば幸である。

文　献

1) 厚生省編：衛生検査指針，協同医書出版社（1959）
2) 日本薬学会編：衛生試験法注解，金原出版株式会社（1959）
3) 古谷正之，国沢新太郎：ゴム技術ガイドブック，日刊工業新聞社（1971）
4) Food and Drug Administration ; Subpart F, 121.2562 (1971)
5) 薬事日報社：化粧品原料基準注解（1968）
6) Rudifranck, und Muhlschlegel, H. : Kunstostoffe in Lebensmittelverkehr, Carl Heymans Verlag K G (1972)

玩具に関する衛生化学的調査（第一報）
折り紙の溶出試験について

小泉清太郎* 鈴木助治* 山野辺秀夫*
大沢映子* 戸谷哲也*

HYGIENIC CHEMICAL INVESTIGATIONS ON TOYS (I)
DETECTION OF COLORING MATTERS AND HEAVY METALS EXTRACTED FROM "ORIGAMI" (COLORED PAPERS)

Seitaro KOIZUMI, Sukeji SUZUKI, Hideo YAMANOBE,
Eiko OHSAWA and Tetsuya TOTANI

(Division of Microanalysis, Department of Chemistry,
Tokyo Metroplitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

During the period from August 1972 to March 1973, coloring matters and heavy metals in water extracted from 98 samples of commercial "Origami" (colored paper-were) examined. When the samples were placed in water, the coloring matters from 39 samples out of 98 tested samples were extracted. From 13 samples none permitted coloring matters were found, including Rhodamine B Lake. Fluorescent whitening agents were detected from 8 samples. Amounts of heavy metals and arsenic in the tested solution were less than 1 ppm and 0.1ppm, respectively.

緒言

近年，乳幼児および児童の用いる玩具には多種多様のものがみうけられる。その材質からみて木製，金属製，紙製あり，合成樹脂製等がある。なかでも合成樹脂製玩具が最も多く，ラッパ，笛，粘土等にいたるまでプラスチック製のものがあり，その色も美しいものが多い。また，紙製の玩具折り紙をみてもまことに多彩であると同時にその紙質，塗工の仕様もまちまちで，容易に色の溶け出すものもあり，毛落ちのしにくいものもある。

玩具には，

口に触れることを本質とするものとして

おしゃぶり，歯がため，笛，ほおずき，ゴム風船などがあり，また，

口に触れるおそれのあるものとして

がらがら，人形，積木，ブロック，動物玩具，ままごと用具，乗物玩具，ボール，おめん，粘土そして折り紙などがある。

玩具による衛生上の問題として，有害性物質としての重金属，法定外着色料，発癌性を疑われるけい光染料などの溶出ならびに可塑剤，溶剤などによる臭気や舌苦味，舌のしびれ，皮膚のカブレなどがある。

昭和47年8月，食品衛生法施行規則の一部改正により，玩具またはその原材料の規格および玩具の製造基準が設定公布され，特に，うつし絵，折り紙については明確な規格が公示された（厚生省告示第257号）

昭和47年8月より48年3月までに東京都衛生局食品監視課より送付された玩具類のうち，特に，折り紙を中心に着色料，重金属等の試験を行なった。

*東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科

元来，折り紙は比較的安価な商品であって幼児から学童まで広く使われているものであるが，その衛生化学的面からの試験成績についてはあまり知られていない。以下，折り紙について行なった試験の結果について報告する。

1 試　料

A	上質紙，顔料使用	20種
B	上質紙，染料使用	20種
C	和　紙	10種
D	上質紙，コーティング	26種
E	コート紙，オフセット印刷	4種
F	包装紙，オフセット印刷	13種
G	セロファン紙	5種

2 試験溶液の調製

(1) ヒ素および重金属試験用として

試料の表面積 1 cm^2 につき 2 mlの割合の40°に加温した水をとり，試料を浸した後，時計ザラでおおい，40°に保ちながらときどきかきまぜて30分間放置して得た液を用いる。

(2) 着色料試験用として

上記(1)の溶出試験溶液の調製に従って行なうが浸出時間を10分間とする。

(3) けい光物質試験用として

水溶出，ガーゼ染色法用には，試験溶液の調製2—(1)，ヒ素および重金属試験用として調製したものを用いる。

アンモニア溶出，ガーゼ染色法用には，試験溶液の調製2—(2)に従うが，水の代りに0.1%アンモニアを用いる。

3 試験操作

(1) 着色料試験

試料より2—(2)によって着色料の溶出が認められたときは，以下により着色料の試験を行なう。

ろ紙クロマトグラフィーを行ない展開溶媒としては次の組成のものを用いる。

1 25%エタノール：5%アンモニア（1：1）
2 n-ブタノール：無水エタノール：0.5N酢酸（6：2：3）
3 n-ブタノール：無水エタノール：1%アンモニア（6：2：3）
4 アセトン：イソアミルアルコール：水（6：5：5）
ろ紙　東洋No. 51

また，薄層クロマトグラフィーでは，100°で30分間加熱活性化したシリカゲル（Wako GeL B—5），およびアルミナ（Wako Almina B—5）薄層（厚さ250μ）を用い，その展開溶媒には，

1 アセトン：イソアミルアルコール：水（6：5：5）
2 n-プロピルアルコール：ギ酸　（8：2）
3 n-プロピルアルコール：ピリジン：水（7：3：1）
4 メタノール：アンモニア　（9：1）
5 n-プロピルアルコール：酢酸エチル：水（6：1：3）
6 n-ブタノール：エタノール：$^{N}/_{2}$アンモニア（6：2：3）

を用い，衛用試験法註解中，飲食物着色料試験法等に従って行なう。

(2) けい光物質試験

けい光物質試験において，紫外線照射により強い青白色のけい光の有無を試験する方法として，

(a) 試料による直接法
(b) 試料の水溶出によるガーゼ染色法
(c) 試料のアンモニア溶出によるガーゼ染色法

を用いる。そのために必要な染色ガーゼの調製として，

(d) 水溶出ガーゼ染色

試験溶液の調製2—(1)に従い試料を40°，30分間浸出して得た水浸液100mlにガーゼ（あらかじめけい光染料が用いられていないことを確認したもの）5×5 cmを入れ，1%塩酸1—2滴で弱酸性としたのち，水浴上で30分間加熱する。ついでガーゼをとり出して水で洗い，よくしぼって水溶出・染色ガーゼとする。

(e) アンモニア溶出ガーゼ染色

試料溶液の調製2—(2)において水の代りに0.1%アンモニアを用い，40°，10分間浸出して得たアンモニアアルカリ性溶液100mlをとり，上記同様にしてガーゼを入れ，希塩酸を用いて弱酸性としたのち，以下(b)と同様に操作してアンモニア溶出，染色ガーゼとする。

ここに得た染色ガーゼ(c)，同(b)，および試料(a)について，紫外線照射器，15W Sylvania Black Light Blue U.S.A（紫外線3650Å）を用いて距離30cmで照射し，青白色の強いけい光が認められるか観察する。

(3) ヒ素および重金属試験

i 重金属（限度試験）

試験溶液2—(1)の100mlを石英ザラにとり，はじめ水浴上で加熱して大部分の水分を蒸発させたのち，直

火上で注意して乾固する。これを引続き火力を強めながら約500°で加熱して灰化する。蒸発ザラの内容物を硫酸で潤して再び加熱し，ほとんど白色の灰分がえられるまでこの操作を繰り返えし行なったのち，この残留物に希酢酸10m*l*および水10m*l*を加え，水浴上で加温して溶かし，さらに水を加えて25m*l*とし，その5m*l*をネスラー管にとり，水を加えて50m*l*とする。別に鉛標準溶液2m*l*をネスラー管にとり，希酢酸2m*l*および水を加えて50m*l*とし比較標準液とする。以下，添加物の一般試験法10，重金属試験法に従い，硫化ナトリウム試液による比較定量試験を行なう。

Table I Extraction of Dyes from "Origami" (Colored Paper)

Sample	Extracted with water at 40° for 30 min.				Total
	Extracted			Not extracted number	
	Number	Classification*			
A	5	3	2	15	20
		4	3		
B	17	1	16	3	20
		2	1		
C	10	1	9	0	10
		4	1		
D	5	4	5	21	26
E	0	———		4	4
F	1	3	1	12	13
G	1	3	1	4	5
Total	39			59	98

*: The number in the left column express degree of classification, while those in the right column indicate the number of papers classified in the degree. As for the degree of classification, see Table III.

A : wood free paper colored with pigment
B : wood free paper colored with dye
C : Japanese paper
D : wood free papar coated
E : coat paper
F : packing paper
G : cellophane paper

ii 重金属溶出量試験試験

試験溶液2—(1)の100m*l*を蒸発乾固させ，乾固物に硫酸0.5m*l*，硝酸1m*l*を加え，直火で加熱し完全に灰化する。冷後少量の水でこれを潤し，少量の塩酸を加えて，水浴上で乾固し，これを3N塩酸で溶かし一定量とし，その一部をもって常法に従いポーラログラムをとる。ついで各金属（鉛，銅，アンチモン，カドミウム）の頂点電位での波高を求め，検量線から各金属の含量を求める。

iii 重金属（材質中の重金属試験）

試料1gを石英ザラにとり，硫酸1m*l*で潤し，電熱器上であらかじめ炭化させたのち，電気炉に移し，500°以下で灰化させる。以下，(3)—iiに従って操作する。

使用機器にはク形波ポーラロ，柳本製P8型を用い，3N塩酸を支持電解質とし，日本薬局方の常法により，銅，カドミウム，鉛，アンチモンの定量を行なう。

iV ヒ素試験

試験試液の調製2—(1)による試験溶液10m*l*をとり，添加物の一般試験法の項19ヒ素の試験法に従い試験を行なう。

Table II Results of Analysis of Dyes in "Origami" (Colored Paper)

Samle	No.	Color of paper	Extraction*1 test at 40° for 10min.	Dye found*2	C. I. *4 (1956)
A	1	Yellow	−		
	2	Orange	−		
	3	Light blue	−		
	4	Greenish blue	−		
	5	Green	−		
	6	Black	−		
	7	Brown	−		
	8	Blue	−		
	9	Gray	−		
	10	Yellowish orange	−		
	11	Brownish red	+	Rhodamine B (R213) and others*3	45170
	12	Pink	+	None permitted coloring matters	
	13	Reddish purple	+	None Permitted coloring matters	
	14	Purple	+	Methyl Violet	42535
	15	Green	−		
	16	Blue	−		
	17	Light purple	−		
	18	Reddish pink	−		
	19	Red	−		
	20	Skin color	+	Lake Red C (R203)	15585
B	1	Light purple	+	Acid Violet 6B (Vl)	42640
	2	Purplish blue	+	Brilliant Blue FCF (Bl)	42090
	3	Gray	+	Brilliant Blue FCF (Bl)	42090
	4	Reddish purple	+	Acid Red (R106)	45100
	5	Black	−		
	6	White	−		
	7	Purple	+	Acid Violet 6B (Vl)	42640
	8	Blue	+	Brillant Blue FCF (Bl)	42090
	9	Green	+	Tartrazine (Y4) Brilliant Blue FCF (Bl)	19140 42090
	10	Yellowish green	+	Tartrazine (Y4) Brilliant Blue FCF (Bl)	19140 42090
	11	Light yellowish green	+	Tarazine (Y4) Brilliant Blue FCF (Bl)	19140 42090
	12	Rebbish brown	+	Tartrazine (Y4) Brilliant Blue FCF (Bl) New Coccine (R102) Sunset Yellow FCF (Y5)	19140 42090 16255 15985
	13	Brown	+	Brilliant Blue FCF (Bl) New Coccine (102) Sunset Yellow FCF (Bl)	42090 16255 15985
	14	Yellow	+	Tartrazine (Y4)	19140
	15	Light yellow	+	Tartrazine (Y4) Sunset Yellow FCF (Y5)	19140 15985
	16	Orange	+	Sunset Yellow FCF (Y5)	15985
	17	Reddish orange	+	Sunset Yellow FCF (Y5) New Coccine (R102)	15985 16255

Sample	No.	Color of paper	Extraction*1 test at 40° for 10 min.	Dye found*2	C. I. *4 (1956)
B	18	Red	−		
	19	Light pink	+	Phloxine (R104)	45410
	20	Light reddish brown	+	New Coccine (R102)	16255
C	1	Red	+	New Coccine (R102) Sunset Yellow FCF(Y5)	16255 15985
	2	Purple	+	Acid Violet 6B (Vl)	42640
	3	Light purple	+	Acid Violet 6B (VI)	42640
	4	Orange	+	New Coccine (R102) Sunset Yellow FCF (Y5)	16255 15985
	5	Yellowish green	+	Brillant Blue FCF (Bl) Tartrazine (Y4)	42090 19140
	6	Brown	+	New Coccine (R102) Sunset Yellow FCF (Y5) Brilliant Blue FCF (Bl)	16255 15985 42090
	7	Pink	+	Phloxine (R104)	45410
	8	Light Blue	+	Brilliant Blue FCF (Bl)	42090
	9	Yellow 1	+	Tartrazine (Y4)	19140
	10	Yellow 2	+	Tartrazine (Y4) Sunset Yellow FCF (Y5)	19140 15985
D	1	Red	−		
	2	Yellow	−		
	3	Purple	−		
	4	Yellowish green	−		
	5	Orange	−		
	6	Light blue	−		
	7	SKin color	−		
	8	Black	−		
	9	Brown	−		
	10	Blue	−		
	11	Reddish purple	+	None permitted coloring matters	
	12	Light purple	+	Methyl Violet	42535
	13	Green	−		
	14	Pink	−		
	15	Gray	−		
	16	Light orange	−		
	17	Purplish blue	+	Methyl Violet	42535
	18	Pink	+	None permitted coloring matters	
	19	Cream color	−		
	20	Yellowish brown	−		
	21	Dull red	+	None permitted coloring matters	
	22	Light yellowish green	−		
	23	Blue	−		
	24	Gold	−		
	25	Silver	−		
	26	White	−		
E	1	Pink	−		

Sample	No.	Color of paper	Extraction*1 test at 40° for 10 min.	Dye found*2	C. I. *4 (1956)
E	2	Green	−		
	3	Red	−		
	4	Yellow	−		
F	1	Yellowish green	−		
	2	Orange	−		
	3	Red	−		
	4	Reddish purple	−		
	5	Green	−		
	6	Blue	−		
	7	Pink	−		
	8	Purple	−		
	9	Red	−		
	10	Green	−		
	11	Blue	−		
	12	Pink	+	Eosine (R103)	45380
	13	Purple	−		
G	1	Red	−		
	2	Pink	+	Rhodamine B(R213)	45170
	3	Yellowish green	−		
	4	Black	−		
	5	Green	−		

1 : +(extracted), −(not extracted)

2 : Code number in parentheses following name of dye represents official name in Japan

3 : a mixture of Rhodamine B and other colorings

4 : Colour Index number

Table III Classification of Dyes Detected from "Origami" (Colored Paper)

No.	Classification	Frequency	Distribution (%)
1	Food dyes allone	25	64.1
2	Food and cosmetic dyes	1	2.6
3	Cosmetic dyes allone	4	10.3
4	Ohters	9	23.0

試験結果と考察

(1) 着色料

市販の折り紙について着色料の試験を行なったところ，98試料中39試料か色素が溶出した（Table Ⅰ），さらに溶出した色素を分折したところ TableⅡ に示すような結果を得た。これを整理すると TableⅢ に示すようになる。即ち，食用色素のみが検出された試料は溶出した試料39件中25試料で64.1%を示し，食用色素の検出されたものは多い。さらに，検出された色素についてその使用頻度を調べると，タートラジン（黄色4号）が最も多く39試料中9試料から検出され，ついでブリリアントブルー FcF（青色1号）が8試料からニューコクシン（赤色102号）が7試料から，サンセットエロー FcF（黄色5号）が6試料から検出された。食用許可外色素ではローダシンB（赤色213号）が2試料から，メチルバイオレットが3試料から，また，エオシンが1試料から検出された。全試料をとおして言えることは，染料を用いて手塗り方式でつくられた無加工ものに溶出するものが多く，コート紙，包装紙を用いた印刷もの，顔料，溶剤，プラスチック接着剤等を用いコーティングをほどこしたものには色の溶出するものは少ない。

折り紙から色素が溶出してもそれが食用色素である限り問題はないとされているが，その使用対象が幼い

Table IV Extraction of Fluorescent Whitening Agent from "Origami" (Colored Paper)

Color of sample (A)	No.	a	b	c	Color of sample (B)	No.	a	b	c
Red	1	−	−	−	Red	1	+	−	+
Skin color	2	−	−	−	Yellow	2	+	−	+
Pink	3	−	−	−	Purple	3	+	−	+
Orange	4	−	−	−	Yellowish green	4	+	+	+
Light orange	5	−	−	−	Orange	5	+	−	+
Light pink	6	−	−	−	Light blue	6	+	−	−
Yellow	7	−	−	−	SKin color	7	−	−	−
Light brown	8	−	−	−	Black	8	+	+	+
Brown	9	+	+	+	Brown	9	−	−	−
Light blue	10	−	−	−	Light blue	10	−	−	−
Yellowish green	11	+	−	+	Reddish purple	11	+	+	+
Green	12	+	−	+	Light Purple	12	+	−	+
Light blue	13	+	+	+	Green	13	+	−	+
Blue	14	−	−	−	Pink	14	−	−	−
Light purple	15	−	−	−	Gray	15	−	−	−
Purple	16	−	−	−	Light orange	16	+	−	+
Gray	17	−	−	−	Blue	17	+	+	+
Black	18	−	−	−	Pink	18	+	−	+
Reddish purple	19	−	−	−	Cream color	19	−	−	−
					Brownish yellow	20	−	−	−
					Bright red	21	−	−	−
					Light green	22	−	−	−
					Cobalt blue	23	−	−	−
					Gold	24	+	+	+
					Silver	25	+	+	+
					White	26	+	−	−

A : Hand Brushing Method

B : Coating Method

a : irradiation with UV ray directly

b : test of fluorescent whitening agent by the same solution used for the test of heavy metals, 40° 30 min. (using absorbent gauze colored)

+ : fluoresced by UV ray

− : not fluoresced by UV ray

者であることを考えると，着衣の汚染などもあることで，容易には色落ちのしないコーティングをほどこしたものがより望ましい。

Table V Extraction of Fluorescent Whitening Agent from Origami (Colored Paper)

Sample	a	b	c
White 1	+	−	+
White 2	+	−	+
White 3	++	−	+
White 4	−	−	−
White 5	++	−	−
White 6	−	−	−
White 7	−	−	−
White 8	−	−	−
White 9	+	−	−
White10	++	+	++
G–BK	−	−	−
O–BE	−	−	−
C–RP	−	−	−
Paper napkin	++	+	++
Memo paper	++	+	++

a : irradiation with UV ray directly
b : test of fluorescent whittening agent by the same solution used for the test of heavy metals, 40° 30 min. (using absorbent gauze colored)
c : test of fluorescent whitening agent, 40° 10 min., 0.1% ammonia (using absorbent gauze colored)
White : colored paper (white)
G–BK : colored paper (gravure, black)
O–BE : colored daper (offset, blue)
C–RP : colored paper (cellophane, red dish purple)

(2) けい光物質

折り紙に紫外線を照射するとき，これにローダミンB，エオシン，フロキシン等の着色料が用いられている場合には，それぞれに特有な橙赤～黄色のけい光を発する。しかし，これとは別に，けい光増白剤の使用によるものと思われる青白色の強いけい光を発するものがある。

折り紙の試験規格に，けい光物質についての明確な規定はないが，けい光染料も食品衛生法上は着色料に含まれ，かつ，その規制をうけるものであって，このことは玩具の製造基準をみても明らかである。これがため，折り紙にけい光染料がどの程度使用されているかを調べるため試験を行なった。その方法については，折り紙の試験規格に明示のある温度条件40°Cをとり入れた試験操作3—(2)，水溶出・ガーゼ染色法(b)，アンモニア溶出・ガーゼ染色法(c)および直接法(a)により行なったがその結果を TableⅣ に示す。即ち，無加工もの(A)とコーティングをほどこしたもの(B)についてけい光染料を試験したところ，無加工もの19種のうち，褐色および淡青色のもの2試料については，試験方法a)，b)，c)のうち，いずれによっても，紫外線照射による青白色の強いけい光を認めた。一方，コーティングをほどこしたものについては26試料のうち，黄緑，黒，赤紫，青，金，銀の各色6試料において同様に強いけい光を認めた。ついで，上質紙を用いた白色の折り紙10種と，上質紙のグラビア印刷，包装紙のオフセット印刷もの，着色セロファン紙の3種の折り紙および対照として紙ナプキン，純白色のメモ用紙2種計15種について同様に行なった試験の結果を TableⅤ に示す。これによると，上質紙を用いた白の折紙10試料のうちの1試料については，a)，b)，c) のいずれの方法によっても，ほかの白い試料に見られない格段の強い青白色のけい光を観察した。そのけい光の強度は，ペーパーナプキン，純白色のメモ用紙のそれに匹敵する。他方，着色セロファン紙，グラビア，オフセットものについてはそのいずれも全く，けい光は認められない。

以上，試験の結果からみて，市販の折り紙にはけい光物質としてスチルベン誘導体に属するけい光染料とみられるけい光増白剤が使用されていることは明らかである。

けい光物質の溶出については，他の着色料と異なり，コーティングをほどこしたものに必ずしもその溶出が少ないとしない。これはそのもとになる白紙の品質の

Table VI Quantity of a Few Harmful Metals in 'Origami' (Colored Paper) Extracts, by Use of Distilled Water at 40° for 30 min

Color	Cd (ppm)	Pb (ppm)	Cu (ppm)	Sb (ppm)
R—P	none	0.01	0.01	none
R	none	0.01>	none	0.026
B	none	0.01>	none	none
V	none	none	0.06>	none
O—Y	none	0.01>	none	none
Gold	none	none	none	none
Silver	none	none	none	none

R—P : reddish purple　　R : red
B : blue　　O : orange
Y : yellow　　V : violet

良否如何およびコーティングの仕方の良否によるものと思考される。

また，40°，30分間水溶出による水溶出・ガーゼ染色法によって青白色のけい光を認めるものはアンモニア溶出法を行なうまでもなくけい光物質試験では不適となるので，この水溶出・ガーゼ染色法はけい光染料試験の簡易試験法として役立つものと思考される。

食品包装材料には，けい光染料の使用を禁止若しくは制限している事実に鑑み，折り紙は口に触れることを本質とするものではないが，しかしその製造にあたっては，これにけい光染料を用い，またはこれを含有する材料を用いることをさけるよう配慮が必要である。

(3) 重金属

折り紙より溶出するヒ素および重金属の試験を折り紙の規格に従い行なった結果，98試料のすべてが，基準であるヒ素0.1ppm，重金属 1 ppm のおのおのについて，基準以下であった。

なお，その重金属を分けて，折り紙から40°，30分，水から溶出するカドミウム，鉛，銅，アンチモンについて定量したところ結果は TableⅣ のとおりである。これにより，鉛，銅，アンチモンの溶出量は，最高鉛において0.01ppm，銅において0.06ppm，アンチモンにおいて0.026ppmであった。

Table VII Contents of a Few Harmful Metals in 'Origami' (Colored Paper)

Color	Cd (ppm)	Pb (ppm)	Cu (ppm)	Sb (ppm)
R—P	none	2.0>	7.0>	none
R	none	6.0>	15.0>	620>
B	none	4.5>	75.0>	135>
O—Y	3.0>	6.0>	50.0>	none
Gold	none	none	65.0>	none
Silver	none	none	60.0>	none

R—P：redrish purple　　R：red
O—Y：orange yellow　　B：blue
V　：violet

折り紙に用いる着色料にはその鮮色効果を大とするために顔料として，アンチモンを用いたローダシンBレーキや銅フタロシアニン等が用いられる場合もあるといわれる。そこで，試料折り紙のうち，赤，青，紫赤系のものについて材質中の金属（鉛，銅，カドミウム，アンチモン）の試験を行なった。その結果を TableⅦに示す。

これによると材質中の金属ではアンチモンが赤色系から最高620ppm，青色系から135ppm，また銅が赤色系から15ppm，青色系から75ppm検出された。また，金紙，銀紙について試験の結果，銅が金紙から最高65ppm，銀紙から60ppm検出された。

材質中の金属を試験した結果，折り紙には鉛のほか，アンチモン，銅を含有することが明らかとなった。また，有害性金属の溶出試験において，多少なりとも赤系統にアンチモンの紫系統に銅の溶出が見られており，安全性の面で欠ける。

なお，折り紙の臭気については，まま，問題になるが今回の試料中にも，臭気を認めたものが3件あった。上質紙にグラビア印刷を，コート紙にオフセット印刷をほどこしたもの等に臭気のあるものを認めたが，これはインキの乾燥中溶媒の蒸発によるものか，インキの樹脂の酸化重合により乾燥途上の臭気によるものとみられる。

文　献

1）厚生省編：“衛生検査指針Ⅲ”食品衛生検査指針Ⅰ，Ⅺ，協同医書出版社（1959）
2）日本薬学会編：衛生試験法註解，金原出版株式会社（1972）
3）Society of Dyers and Colourists: Colour Index, 2 nd Ed. American Association of Textilechemists, and Colorists: Supplement (1963)
4）辰濃隆，神蔵美枝子，谷村顕雄：衛生試報，88，99（1970）

動物性食品中の細菌発育阻止物質の簡易推定法に関する研究

村上　一*　神崎政子*　松本昌雄*
神保勝彦*　春田三佐夫*

STUDIES ON SIMPLE SCREENING PROCEDURE FOR ANTIMICROBIAL AGENTS IN FOOD ANIMAL TISSUES

Hajime MURAKAMI, Masako KANZAKI, Masao MATSUMOTO, Katsuhiko JIMBO and Misao HARUTA

(Division of Milk and Meat Sanitation, Department of food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Studies were made for the detection of antibiotics and other antimicrobial agents, which might have a chance to contaminate food animal tissues, experimentally incorporated into emulsified pork. The procedure adopted in this experiment was a simple pulp disk zone inhibition technique. The bacteria used were *Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C-953, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* var *mycoides* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Escherichia coli* NIHJ and its TC resistant strain.

Consequently, antibacterial spectra obtained on each 12 agent such as, penicillin, streptomycin, chroltetracycline, chloramphenicol, erythromycin, leucomycin, oleandomycin, novobiocin, kanamycin, makarbomycin, spiramycin and cycloserine was specific and distinguishable one another, when single agent was incorporated. However, when more than two agents were incorporated it was no longer possible to identify an individual antimicrobial agent through its antibacterial spectra.

緒　論

動物性食品，特に畜産食品中に残留する抗生物質を検出する際に，さしあたって当面する困難な問題は，ペニシリン以外の抗生物質に対する簡易な同定法がないということであろう。もし，不明の抗菌性物質を食品中から検出した際に，現在世界保健機構（WHO）および国連食糧農業機構（FAO）の合同食品添加物専門委員会が勧告している検査法[1]を用いて検査を進めるとすれば，限られた期間内に抗生物質の種類を同定することは当抵不可能であり，根気よく検査を継続するとしてもばく大な検査材料を必要とすることになるであろう。

今回我々は，第一線の小さな研究室でも容易に実施し得る簡易な抗菌性物質のスクリーニング法を開発するために，実験的な基礎検討を行なった。以下今日迄に得られた結果について報告する。

材料および方法

1）使用菌株，実験に使用した菌株は，Bacillus stearothermophilus var. B. calidolactis C-953, Bacillus

＊東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科

subtilis ATCC 6633, Sarcina lutea ATCC 9341, Bacillus cereus var. mycoides ATCC11778, Staphylococcus aureus ATCC6538P, Esherichia coli NIHJ およびテトラサイクリン耐性の NIHJ 変異株（以下それぞれ C-953, ATCC 6633, ATCC 9341, ATCC 11778, ATCC 6538P, NIHJ および NIHJ TC res. と略す）の7株である。

2）使用培地

a）Tryptose agar 菌の継代用斜面寒天，ATCC 6633株および ATCC 11778株の芽胞形成用寒天平板および C-953株以外の菌株を用いる抗生物質検出用寒天平板の作成に用いるもので Difco 製のつぎの組成の粉末培地である。培地 1,000m*l* あたり，Bacto-tryptose 20g，Bacto-dextrose 1 g，塩化ナトリウム 5 g，および Bacto-agar 15 g で，溶解後 121°C で15分間滅菌して使用した。

b）Tryptose phosphate broth ATCC 9341株，ATCC 6538P株，NIHJ 株および NIHJ TC res. 株の増殖用液体培地として用いるもので Difco 製のつぎの組成の粉末培地である。培地 1,000m*l* あたり，Bacto-tryptose 20g，Bacto-dextrose 2g，塩化ナトリウム 5g，リン酸二ナトリウム 2.5g で，溶解後121°C で15分間滅菌して使用した。

c）C-953 株用増殖培地，C-953 株用増殖培地は IDF[2] によって定められた組成のものを用いた。組成は，培地 1,000m*l* あたり，酵母エキス（Difco）10g，トリプトン（Difco）20g，dextrose（和光純薬）0.5g で pH 8.0 ±0.1，121°C15分間滅菌後使用した。

d）C-953株用平板培地，C-953株を用いる抗生物質検出寒天平板の作成に用いるもので，培地 1,000m*l* あたり，酵母エキス（Difco）2.5g，トリプトン（Difco）5 g，dextrose（和光純薬）1 g，Bacto-agar（Difco）15 g の組成で，pH7.0 ± 0.1，121°C 15分間滅菌後使用した。

3）パルプディスク　東洋製作所製の直径 10mm，厚手No.26ディスクで，1枚当りの吸水量が0.07～0.08m*l* のものである。使用に先立ち121°C 15分間高圧滅菌し，乾燥器中で十分乾燥させ，ブランクテストによって細菌の発育阻害物質を含有していないことを確かめたものを使用した。

4）標準抗生物質　実験に用いた抗生物質は，ペニシリン G（PC），ストレプトマイシン（SM），クロルテトラサイクリン（CTC），クロラムフェニコール（CP），エリスロマイシン（EM），ロイコマイシン（LM），オレアンドマイシン（OM），ノボビオシン（NB），カナマイシン（KM），マカルボマイシン（MM），スピラマイシン（SpM），およびサイクロセリン（CS）の12種類の標準抗生物質である。

5）緩衝液

a）上記の抗生物質の希釈に用いた緩衝液は，農林省告示第1213号に規定された動物用抗生物質製剤検定基準に定められたそれぞれの抗生物質に至適の組成および pH のものをそれぞれ使用した。

b）pH 5.6 クエン酸・アセトン緩衝液

実験的に各種抗生物質を添加した食肉からの各種抗生物質の回収率を調べるための抽出剤として，pH 5.6 の 1/10M クエン酸緩衝液35容，アセトン35容および蒸留水30容からなる混合液を用いた。なお，pH 5.6のクエン酸緩衝液は 1/5M クエン酸 1 容に N/2KOH 1 容を混合して調製した。

6）芽胞浮遊液の作成　ATCC 6633，ATCC 11778株の芽胞浮遊液の作成法は，継代保存した種菌を使用に当ってルーびん中の tryptose agar 培地に接種し，37°C で7日間培養し，芽胞を作らせたのち菌苔をかきとって適当量の蒸留水で2回洗浄し，沈澱を蒸留水に再浮遊させ，65°C20分間，24時間間隔で2回加熱し，1,000rpm で5分間遠心し，その上清を適当な濃度に希釈して，1 m*l* ずつをアンプルに入れ凍結乾燥して保存した。

7）検査法　検定菌に対する発育阻止物質の検出は，国際酪農連盟（IDF）によって定められた牛乳中のペニシリン検出法[2] に準じて行なった。すなわち，あらかじめ加熱溶解後30分以上 55°C の恒温槽中に保持した前述の7種の菌に用いる寒天培地に，新たに接種調製したそれぞれの菌の16～18時間培養液を寒天量の1/5量加え，十分かく拌したのち，内径 8.5cm の滅菌プラスチックペトリザラに 8 m*l* ずつ分注し，水平に保って放冷し凝固させた。ただし，ATCC 6633 および ATCC 11778株用の平板は，溶解した寒天 100m*l* に対して芽胞浮遊液 1 m*l* を加えて調製した。供試した標準抗生物質は，上記の7種の菌株によって，その検出限界が都合よく把握できるような濃度に調製したものを，10倍段階希釈または2倍段階希釈し，前述のパルプディスクにそれぞれ吸収させたのち，7種類の菌接種平板上に1枚ずつ水平に置き，ピンセットの先で軽くおさえたのち，倒置してそれぞれの菌の至適発育温度で培養した。すなわち，C-953株は55°C，ATCC 9341株および ATCC 11778株は30°C，その他の株は35°C で18時間培養後，出現した阻止円の大きさをノギスを用いて測定した。

8）標準回帰直線　各標準抗生物質の種々の濃度の希釈列が示した，阻止円の直径の平均の2乗値から個々の検定菌ごとに回帰係数を求め，各抗生物質ごとにそれぞれの検定菌に対する回帰直線をグラフ上に描いて，その抗菌スペクトルを表現した。

実験成績

1）標準抗生物質の抗菌スペクトル：個々の抗生物質がそれぞれ特徴のある抗菌スペクトルを示すことは，広く一般に知られているところであるが，われわれはこの性質を抗生物質の種類の推定に利用することを考え，前記7株の検定菌を用いて実験を行なった。

用いた12種類の抗生物質の種々の希釈列が示した阻止円の直径の2乗値は，個々の検定菌ごとに異なった数値を示し，その回帰係数は個々の抗生物質ごとに特

Table 1. Regression Coefficient and Minimum Inhibition Dose of The 12 Representative Antibiotics Calculated by The 7 Pilot Organisms

antibiotics	test organisms used						
	C- 953	ATCC 6633	ATCC 9341	ATCC 11778	ATCC 6538p	NIHJ	NIHJ TCres.
penicillin	5.0 ($10^{-2.2}$)	0.6 (10^{0})	7.0 ($10^{-1.2}$)	—(>$10^{1.1}$)	5.8 ($10^{-0.5}$)	1.5 (10^{0})	—(>$10^{1.1}$)
streptomycin	2.0 ($10^{0.8}$)	3.9 ($10^{0.7}$)	3.4 ($10^{1.0}$)	1.4 ($10^{1.0}$)	— ($10^{2.7}$)	3.0 ($10^{1.2}$)	4.4 ($10^{1.1}$)
chlortetracycline	3.3 ($10^{0.5}$)	1.4 ($10^{0.7}$)	3.0 ($10^{1.0}$)	3.8 ($10^{0.8}$)	1.6 ($10^{0.7}$)	— ($10^{2.7}$)	2.1 ($10^{1.7}$)
chloramphenicol	5.6 ($10^{1.7}$)	3.0 ($10^{1.9}$)	6.5 ($10^{0.9}$)	3.5 ($10^{0.8}$)	3.5 ($10^{1.3}$)	2.9 ($10^{1.3}$)	3.5 ($10^{1.2}$)
erythromycin	3.4 ($10^{-0.2}$)	2.2 ($10^{0.1}$)	2.7 ($10^{-0.6}$)	1.5 ($10^{0.6}$)	0.4 ($10^{0.6}$)	0.7 ($10^{1.7}$)	0.8 ($10^{1.7}$)
leucomycin	2.5 ($10^{-0.1}$)	1.5 ($10^{0.9}$)	3.5 ($10^{-0.2}$)	1.9 ($10^{0.8}$)	1.5 ($10^{1.5}$)	0.6 ($10^{2.0}$)	—(>$10^{3.12}$)
oleandomycin	2.6 ($10^{1.5}$)	1.3 ($10^{1.5}$)	3.2 ($10^{0.1}$)	2.3 ($10^{1.7}$)	1.2 ($10^{2.0}$)	— ($10^{3.0}$)	—(>$10^{3.1}$)
novobiocin	4.1 ($10^{-0.8}$)	3.0 ($10^{1.1}$)	4.1 ($10^{0.5}$)	3.7 ($10^{0.9}$)	0.8 ($10^{0.4}$)	— ($10^{2.7}$)	—(>$10^{3.1}$)
kanamycin	2.7 ($10^{1.3}$)	3.0 ($10^{1.0}$)	— ($10^{2.5}$)	2.6 ($10^{1.8}$)	0.6 ($10^{1.9}$)	3.6 ($10^{1.3}$)	0.2 ($10^{1.5}$)
makarbomycin	1.8 ($10^{1.4}$)	2.0 ($10^{0.3}$)	—(>$10^{3.1}$)	1.3 ($10^{0.2}$)	0.6 ($10^{-0.3}$)	— ($10^{2.3}$)	1.5 ($10^{2.0}$)
spiramycin	3.0 ($10^{0.2}$)	2.8 ($10^{0.7}$)	3.1 ($10^{-0.1}$)	1.1 ($10^{1.2}$)	0.7 ($10^{1.4}$)	0.4 ($10^{1.9}$)	—(>$10^{3.1}$)
cyclocerine	— ($10^{2.4}$)	9.9 ($10^{2.0}$)	— ($10^{2.6}$)	— ($10^{2.2}$)	3.2 ($10^{1.8}$)	— ($10^{2.1}$)	3.9 ($10^{2.0}$)

徴のある組合せを示した（Table 1）。表中に同時に示した最少阻止濃度（MIC）の組合せも，抗生物質の種類の推定を行なうための有力な手掛りになることが判明した。

一方，個々の標準抗生物質について得られた成績を各検定菌ごとに回帰直線で表してみると Fig. 1．a～Fig. 1．cとなり，一目で各抗生物質ごとに特徴のあるパターンを示していることが判る。

2）動物性食品からの抗生物質抽出法の検討：現在用いられている抗生物質の検査法の場合，食品中から抗生物質を抽出する際に用いる抽出剤は，それぞれ各抗生物質ごとに至適の抽出剤が詳細に規定されている。しかし，日常検査に当って，どのような抗生物質が残留しているか不明の食品から抗生物質を検出しようとするスクリーニング試験のための抽出法としては，複雑すぎて不適当である。そこで著者らは，有機溶媒に易溶性の抗生物質と，水に易溶性のそれとを同時に1回の抽出操作のみで抽出することを考え，前述のような組成の緩衝液を用いて，豚肉中に実験的に添加された種々の抗生物質について，それぞれの回収率を至適検定菌を用いて調べてみたところ，Table 2 のような成績を得た。すなわち実験に用いた12種類の抗生物質のうち，ほとんどが80％以上の回収率を示したが，LM 72％，SpM60％，NB 及び KM は 50％の回収率で MM の回収率は5％に過ぎなかった。

考　察

動物性食品，特に畜産食品中への抗生物質の残留を調べるに当って，生物学的検査法によって検出された物質が果して本当に抗生物質そのものであるのか，あるいはその他の抗菌性物質や食品添加物であるのかを区別できないために，多くの時間と労力を費して検査を実施しても必ずしも期待するような結果を得ることができない。すなわち，生物学的な検出法にたよって検査を進める場合，如何に感度のよい検定菌や検査法を選び用いても，測定するのは総合的な抗菌活性であるという本質的な欠点を補うことができないものとすれば，むしろ，われわれ第一線の検査室で，残留抗生物質の検査を実施しなければならない立場に置かれている者としては，牛乳中の PC 検出のスクリーニング

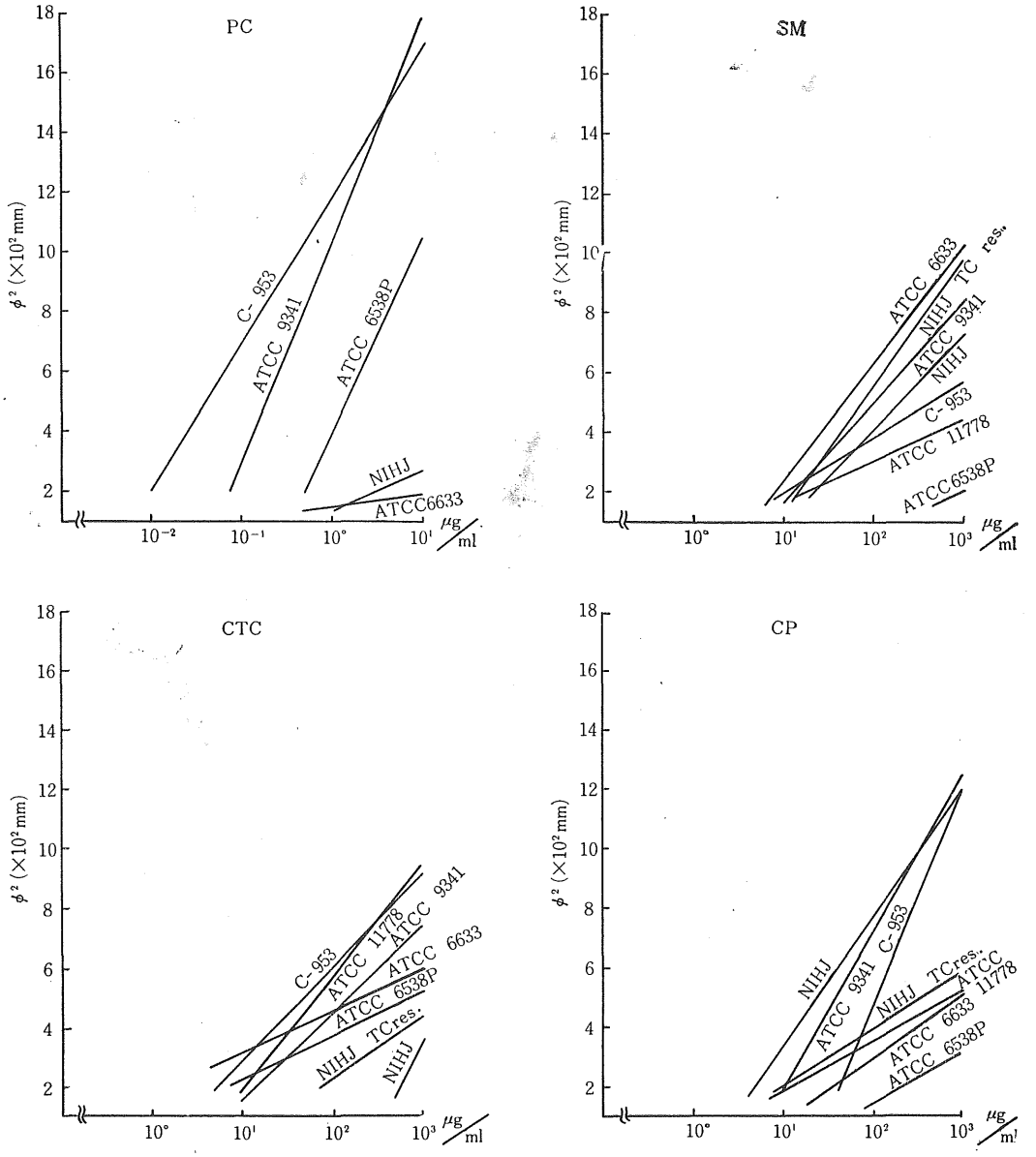


Fig. 1. a Antimicrobial spectra of antibiotics expressed by regression lines

PC : penicillin SM : streptomycin

CTC : chlortetracycline CF : chloramphenicol

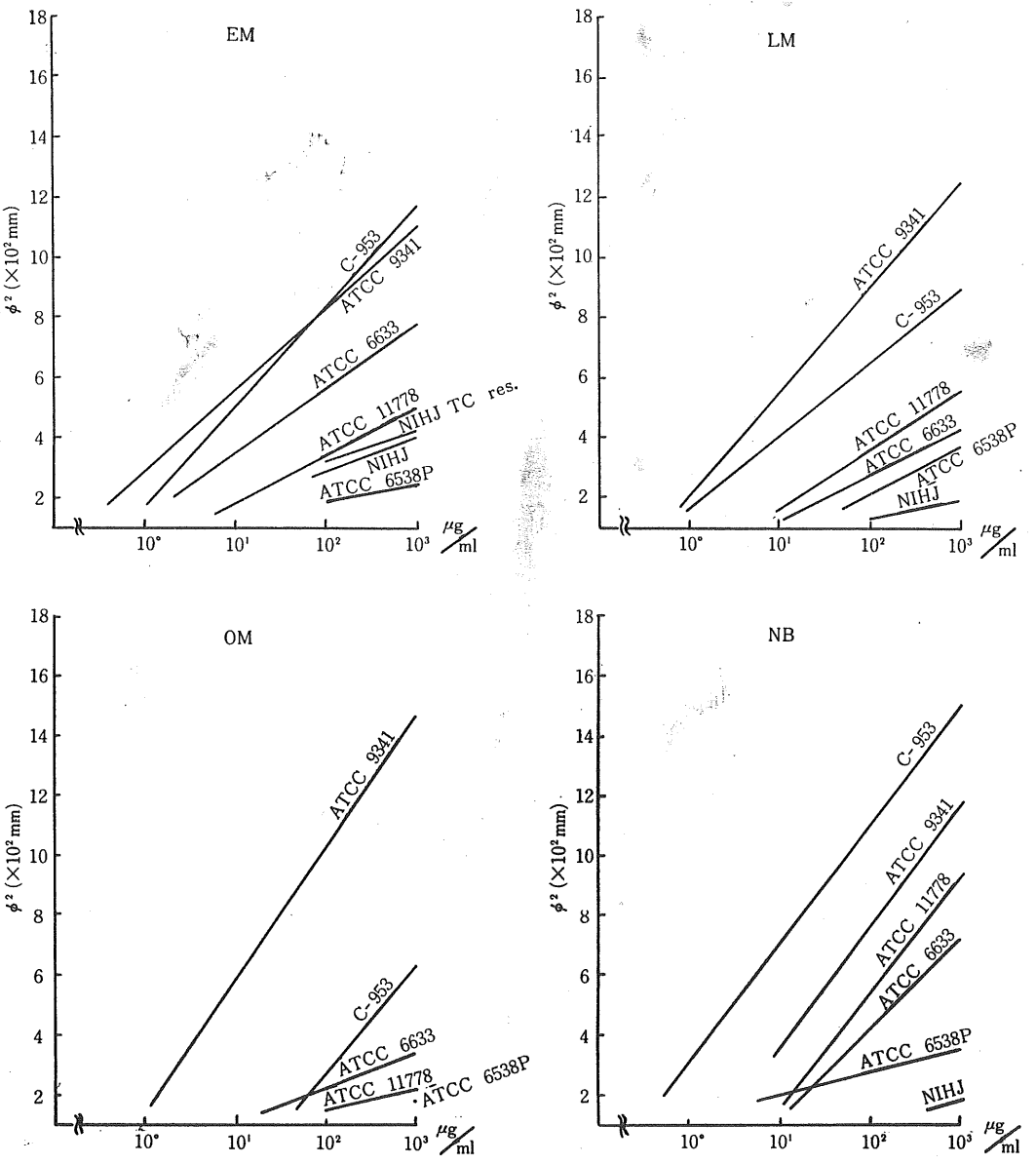


Fig. 1. b Antimicrobial spectra of antibiotics expressed by regression lines

EM : erythromycin LM : leucomycin

OM : oleandmycin NB : novobiocin

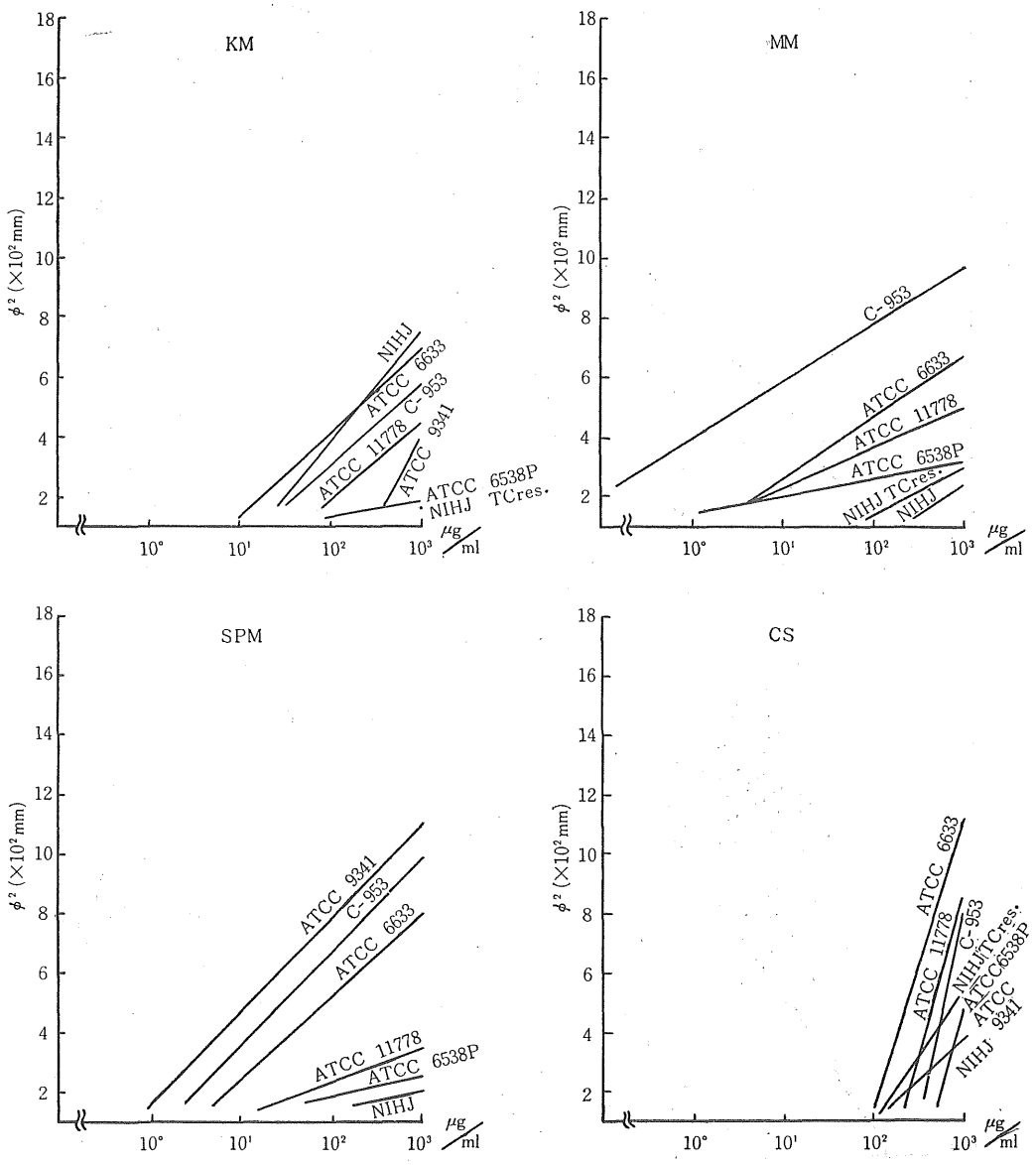


Fig. 1. c Antimicrobial spectra of antibiotics expressed by regression lines

KM : kanamycin MM : makarbomycin

SPM : spiramycin CS : cycloserine

Table 2. Recovery of Experimentally Incorporated Antibiotics in Pork

antibiotics	amount added	amount detected	recovery rate	test organism
penicillin	0.4IU/g	0.4IU/g	100%	C- 953
streptomycin	200 ug/g	184 ug/g	92%	ATCC 6633
chortetracycline	200 ug/g	200 ug/g	100%	ATCC 11778
chloramphenicol	200 ug/g	184 ug/g	92%	ATCC 9341
erythromycin	40 ug/g	37.6ug/g	94%	ATCC 9341
leucomycin	200 ug/g	144 ug/g	72%	ATCC 9341
oleandomycin	200 ug/g	160 ug/g	80%	ATCC 9341
novobiocin	200 ug/g	100 ug/g	50%	C- 953
kanamycin	200 ug/g	100 ug/g	50%	ATCC 6633
makarbomycin	200 ug/g	10 ug/g	5%	C- 953
spiramycin	200 ug/g	120 ug/g	60%	ATCC 9341
cycloserine	2,000 ug/g	1,680 ug/g	84%	ATCC 6633

法として実用化されている TTC法[3] のような簡易法の開発に力を入れるべきであると考える。

著者らが本実験において検討した，単一の標準抗生物質の抗菌スペクトルが各抗生物質ごとに異なっていたことから，食品中に単一の抗生物質が，或る程度の濃度迄濃縮することができる位の量残留していた場合の抗菌スペクトルを標準抗生物質のそれと比較することにより，その種類を推定することが可能なことを証明した。しかし，日常検査に応用するためには，如何に微量の抗生物質を有効に濃縮するか等未だ多くの解決しなければならない点を残しているようである。ひるがえって，抗生物質使用の現状は非常に広い分野に及んでおり，事実，家畜や家禽の治療用には，数種の化学療法剤が抗生物質と共に複合使用されていることが多く，それらを分別定量することは，単一の抗生物質さえ簡易に同定することが困難な現状において，殆んど不可能に近いことである。今回，われわれが検討した方法も，2種類以上の抗生物質を混合した場合，その抗菌スペクトルが重なり合うため，それらの種類の推定は不可能であった。

抗生物質の分別定量に関して，河端[4] は数種の薬剤が混在しているときの CP の分別定量について，薄層クロマトグラフィー（TLC）とバイオオートグラフィー（BAG）の手抜を用いて，あらかじめ各種標準抗生物質の総合 TLC-BAG のパターンを調べておき，検体から得られた物質のそれと比較して，検出された2種類以上の物質の同定を行なうことを報告しているが，これを食品中の微量の残留抗生物質の系統的な分別定量の日常検査法として確立する迄には，未だ多くの解決しなければならない点を含んでいるようである。

結　論

個々の抗生物質がそれぞれ特徴のある抗菌スペクトルを示すことは，広く一般に知られているところであるが，著者らは種々の抗生物質に対して異なった抗菌スペクトルを示すことが期待された7株の抗生物質検定用の標準株を用いて，12種類の標準抗生物質の抗菌スペクトルを調べたところ，それぞれ特徴のある抗菌スペクトルを示し，抗生物質の種類の推定が可能であることが判明した。しかし，2種類以上の抗生物質が微量に食品中に残留した場合の，簡易分別定量はできなかった。要するに，現段階では検査法が不備であるので，動物性食品中に残留するおそれのある抗生物質およびその他の抗菌性物質の使用の規制を十分に行なうことが先決であると思われる。

文　献

(1) FAO Nutrition Meetings Report Series, No. 45A WHO/Food Add/69,34 (1969)

(2) IDF Sessions in Moscow, V-Doc 86 (1968)

(3) Neal C.E. & Calbert H.E.: J.Dairy Sci., 38, 629 (1955)

(4) 河端俊治：昭和45年度厚生科学研究課題　研究報告書，7 (1971)

市販飲用乳の抗生物質汚染の実態と原料生乳から分離したブドウ球菌の抗生剤感受性について

松本昌雄* 神保勝彦* 春田三佐夫*

INCIDENCE OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN MILK AND SENSITIVITY OF COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCAL ISOLATES FROM RAW MILK AGAINST SEVERAL ANTIBIOTICS

Masao MATSUMOTO, Katsuhiko ZINBO and Misao HARUTA

(Division of Milk and Meat Sanitation, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

During the period from 1970 through 1973, 4166 smples of market milk obtained from retailers in Tokyo were tested for the presence of antibiotic residues.

In addition, a total of 150 strains of Staphylococcus aureus isolated from raw milk was examined for their sensitivity against 8 antibiotics such as, benzylpenicillin (PC), tetracycline (TC), streptomysin (SM), leucomycin (LM), oleandomycin (OM), chloramphenicol (CP), kanamycin (KM), noboviocin (NB) by means of the agar plate dilution method.

The results obtained are summarized as follows.

1) Incidence of the antibiotic residues in milk was 16.3% in August 1970, 3.9% in October 1970, 0.4% during the period from January to March 1971, none was detected during the period from April 1971 to March 1973.
2) Among 124 resistant cultures, the resistance patterns included 79% of single resistance and 21% of multiple resistance.
   Of the drug-resistant strains, PC-resistant strains were isolated most frequently and followed by SM-, KM- and NB-resistant strains.
3) Minimum concentrations for complete inhibition were as follows: 0.2～50 Iu/ml by PC, 0.2～100 mcg/ml by TC, 0.39～100 mcg/ml by SM, 0.78～12.5 mcg/ml by LM, 1.56～12.5 mcg/ml by OM, 3.125～12.5 mcg/ml by CP, 0.78～100mcg/ml by KM and 0.2～12.5 mcg/ml by NB.

はじめに

治療薬として用いられた抗生物質が牛乳へ移行残留するに及んで「抗生物質入り牛乳」として1970年にマスコミにとりあげられて大きな社会問題にまで発展したが，その後，直ちに衛生行政面からの指導監視並びに生産者，酪農指導員，乳処理業者等関係方面の積極的努力により「抗生物質入り牛乳」は1971年以降，都内から姿を消してしまった。

この抗生物質の移行残留問題は，乳牛の健康障害特に乳腺炎の発生に対する抗生物質の乱用に端を発して

＊東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科

いる。

このことは必然的に各種抗生物質に対する耐性菌の増加を招来し，ひいては，これが人あるいは動物の感染症の治療及び予防上，障害の要因ともなり得るところから等閑視できない問題と思われる。

そこで，都内市販飲用乳の抗生物質汚染の実態を報告し，あわせて，飲用乳向け原料生乳由来ブドウ球菌の薬剤感受性を知るために都内牛乳処理場に搬入される原料生乳を対象に調査を行なったので，その結果も報告する。

材料および方法

1　牛乳の抗生物質汚染調査

1970年から1973年にかけて，都内で市販されている牛乳並びに加工乳について残留抗生物質の検査をNeal & Calbert の TTC テスト[1] 並びに国際酪農連盟が標準法として採用しているディスク法[2)3)] にそれぞれ準じて行なった。

2　飲用乳向け原料生乳由来黄色ブドウ球菌の抗生物質感受性検査

a　検査材料

1971年9月に福島，宮城，栃木，群馬，茨城，埼玉，千葉，神奈川，山梨及び長野の10県からタンクローリー車で都内牛乳処理場に搬入された生乳を検査材料とした。

b　分離培養

各材料を卵黄加マンニット食塩培地平板に塗抹後，35°C 48時間培養し，その結果，マンニット分解及び卵黄反応が陽性を示した集落を釣菌し生物学的性状を調べ黄色ブドウ球菌（以下「黄色ブ菌」と略記）であることを確認[4] した。

c　抗生物質感受性試験

テトラサイクリン(TC)，ペニシリン(PC)，ストレプトマイシン(SM)，ロイマイシン(LM)，オレアンドマイシン(OM)，クロラムフェニコール(CP)，カナマイシン(KM) 及びノボビオシン(NB) の8種類の抗生物質を用いた。

感受性の測定は日本化学療法学会標準法に準拠し，寒天平板倍数希釈法で37°C に18時間培養後の最小発育阻止濃度（MIC）を求めた。

成　績

1　市販飲用乳中の抗生物質検査成績

1970年から1973年にかけて収去した都内市販の飲料乳中の抗生物質の検査結果は表—1 に示した。

1970年8月に都内市販の飲用乳595例を対象に検査した結果は，TTC テストで陽性が1.2％，ペーパーディスク法による陽性が16.3％で，ペニシリン 0.01IU/m*l* 以上含有のものが4.2％であった。この時のペニシリンの最高含有量は0.04IU/m*l* であった。

以上のような成績にもとづいて都では10月1日に各メーカーに対して文書をもって警告するとともに改善対策を講ずるように勧告した。しかる後に10月下旬から11月にかけて再び市販飲用乳646例について同様の検査を行なったところ，TTCテスト陽性が0.3％と一挙に ¼ に陽性率が低下し，ペーパーディスク法でも3.9％とこれも ¼ 程度に陽性率の低下をみ，ペニシリン 0.01 IU/m*l* 以上のものは前回の4.2％から1.7％まで低下し，著しい改善の跡をみせた。

続いて1971年1～3月に市販飲用乳897例についてTTCテスト及びディスク法による検査を実施したところ，TTCテスト陽性が1例（0.1％），ディスク法陽性が4例（0.4％）と更に陽性率が減少し，1971年4月～1972年3月にかけて実施した1,333例（牛乳884例，加工乳449例)中，1例だけがディスク法で陽性で，量も FAO/WHO の示す許容基準 0.01IU/m*l* であった。

1972年度は725例（牛乳591例，加工乳134例）に

Table 1. Detection of Residual Antibiotics from Normal Liquid Cow's Milk in Tokyo

Year	No. of tested	No. of positive		
		TTC	Pulp disk	penicillin (0.01 Iu/ml)
Aug. 1970*	595	7(1.2)	97(16.3)	25(4.2)
Oct.～Nov.	646	2(0.3)	25(3.9)	11(1.7)
Jan.～March 1971	867	1(0.1)	4(0.4)	4(0.4)
April 1971～March 1972	1,333	0	1 (0.0)	1(0.0)
April 1972～March 1973	725	0	0	0

Note: Figures in the parentheses indicate per cent positive. * Before the issue of the warning on the use of antibics to dairy cows.

ついて検査したが，TTCテストはもちろん，ディスク法でも陽性を示すものは1例も認められなかった。

なお，ディスク法で陽性を示した例についてその都度，ペニシリナーゼ処理を行なってみたところ，数例をのぞき殆んどすべてペニシリンの残留であることを確認した。

2　各種抗生剤のＭＩＣ分布

分離黄色ブ菌に対する各種抗生剤の MIC 分布を薬剤別に図―1に示した。

すなわち，MIC 分布は SM や KM のように1.56mcg

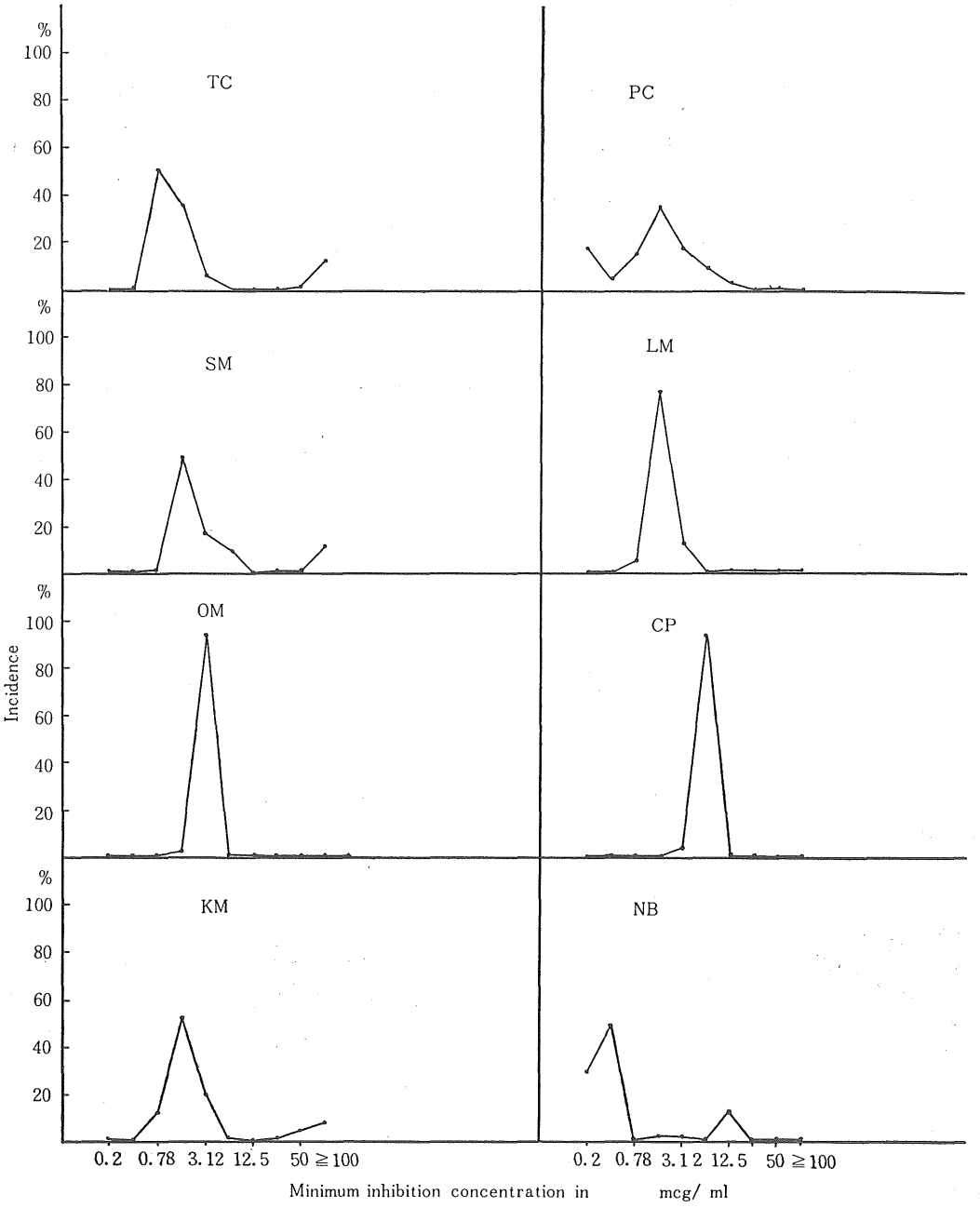


Fig. 1. Distribution of minimum inhibition concentration of several antibiotics against *S. aureus* isolates obtained from raw milk.

Table 2. Incidence of Antibiotic Resistant Organisms Isolated from Raw Milk

Prefecture	Total isolates	No. of antibiotic resistant strains isolated							
		TC	PC	SM	LM	OM	CP	KM	NB
Fukushima	49	2(4.0)	37(75.6)	3(6.1)	0	0	0	3(6.1)	3(6.1)
Miyagi	25	2(8.0)	17(68.0)	6(24.0)	1(4.0)	0	0	6(24.0)	7(28.0)
Nagano	22	1(4.5)	22(100)	1(4.5)	0	0	0	1(4.5)	1(4.5)
Ibaragi	9	0	8(88.9)	0	0	0	0	0	0
Tochigi	8	0	7(87.5)	1(12.5)	0	0	0	0	0
Gunma	10	0	2(20.0)	3(30.0)	0	0	0	2(20.0)	2(20.0)
Kanagawa	5	1(20.0)	5(100)	1(20.0)	0	0	0	1(20.0)	1(20.0)
Yamanashi	20	5(25.0)	20(100)	6(30.0)	0	0	0	6(30.0)	5(25.0)
Saitama	2	0	2(100)	2(100)	0	0	0	2(100)	2(100)
Sum	150	11(7.2)	120(80.0)	23(15.3)	1(0.6)	0	0	21(14.0)	21(14.0)

Note: Figures in the parentheses indicate per cent positive.

Table 3. Incidence of Antibiotic Resistant Organisms Isolated from Raw Milk

Antibiotic resistant characteristics observed on	No. of positive	Per cent positive
TC, PC, SM, KM, and NB	11	7.3
PC, SM, KM, and NB	9	6.0
PC, LM, and NB	1	0.7
SM, KM, and NB	1	0.7
PC, and SM	4	2.7
PC	98	65.3
Sensitive to all 8 antibiotics	26	17.3
Total	150	100

/m*l* と 100mcg/m*l* 以上にそれぞれ分布のピークが認められる2峯性のものと，OM のように 3.13mcg/m*l* 単独のピークをもった1峯性のものとに大別される。

3 耐性黄色ブ菌並びにその耐性型の分離頻度

三橋[5)6)]に準拠して，PC では 0.39IU/m*l*，TC で 12.5mcg/m*l*，SM で12.5mcg/m*l*，LM で6.25mcg/m*l*，OMで25mcg/m*l*，CP で25mcg/m*l*，KMで12.5mcg/m*l*，NB で 6.25mcg/m*l* の MIC 値以上を耐性，それ以下を感受性株として各薬剤別にみた耐性菌及び耐性型の分離頻度を表—2，3に示した。

すなわち，全供試株数150株中120株（80%）はPCに，11株（7.2%）は TC に，23株（15.3%）は SM に，1株（0.6%）は LM に，21株（14.0%）は KM に，21株（14.0%）は NB に耐性菌であった。

すなわち，8種類の供試薬剤のうち OM 及び CP 以外の薬剤に，それぞれ耐性菌が検出された。

これら耐性菌の耐性型をみると，全供試株150株中，単剤耐性型（すべてが PC 耐性型）が98株（65.3%）で検出率が最も高く，次いで，5剤耐性11株（7.3%），4剤耐性9株（6.0%），2剤耐性4株（2.7%）及び3剤耐性2株（1.4%）で合計124株（82.7%）が耐性菌であった。

各薬剤別の耐性値の最高は，PC 50IU/m*l*，TC 100 mcg/m*l*，SM 100mcg/m*l* 以上，LM 12.5mcg/m*l*，OM 12.5mcg/m*l*，CP 12.5mcg/m*l*，KM 100mcg/m*l*，NB 12.5mcg/m*l* であった。

25mcg（あるいは IU)/m*l* 以上の各薬剤耐性菌の分離頻度は TC 11株（7.2%）(50mcg/m*l* 1株（0.6%），100mcg/m*l* 10株（6.6%)), PC 1株（0.6%）(50IU/m*l* 1株)，SM 25株（16.7%)(25mcg/m*l* 4株(2.6%)，50mcg/m*l* 3株（2.0%），100mcg/m*l* 7株（4.7%），100mcg/m*l* 以上 11株（7.3%)), KM 21株（14%)(25

mcg/ml 1株（0.6%），50mcg/ml 7株（4.7%），100 mcg/ml 13株（8.7%））で，それ以外の薬剤すなわち LM，OM，CP 及び NB では 25mcg/ml 以上の耐性菌は検出されなかった。

TC，SM，KM などの 25mcg/ml 以上の耐性菌はすべて TC，SM，KM の2剤あるいは3剤の 25mcg/ml 以上の耐性菌であった。

TC 50～100mcg/ml 耐性菌は，すべて 100mcg/ml 以上の SM 耐性菌で，かつ，50～100mcg/ml の KM 耐性菌であった。

一方，KM 50～100mcg/ml 耐性菌は 100mcg/ml 以上の SM 耐性菌であった。

原料乳生産県別に分離ブ菌の各薬剤耐性菌の各薬剤耐性菌をみてみると，各生産県とも同じような薬剤耐性の分離頻度を示し，PC 耐性菌が最も高率で，次に SM，KM，NB 耐性菌が高い率で検出された。

考　察

牛乳の残留抗生物質問題は，マスコミに社会問題としてとりあげられた昭和45年に突然発生したのではなく，かなり以前から識者間で種々論議されていた問題である。

それは，特に醱酵乳製品の醱酵阻害あるいは醱酵阻止などの原因として残留抗生物質が以前から産業面で注目されていたのである。

著者の一人春田は，これを抗生物質含有牛乳の摂取に伴って懸念される過敏症[7)8)]，菌交代症[9)]及び耐性菌[10)]などの発現，それに治療上の障害など抗生物質による健康障害の問題として注目して，昭和38年に市販飲用乳225例について TTC テストを実施し，高い陽性率（18%）を示したと報告したにもかかわらず，わが国では当時これに対して何等の行政措置を講じなかったために今日の社会問題を惹起するに至ったのである。

牛乳中の残留抗生物質は乳腺炎の治療のために，乳房中に注射された抗生物質が排泄されたものが多い。

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令[11)]には「乳に影響する薬剤を服用させ，または注射した後3日以内のものは搾乳してはならない」と定められている。

しかし，これがほとんど無視され，素人が獣医師の指示なしに抗生物質を乱用し，かつ，法に定める搾乳出荷制限を遵守しなかったことが，この牛乳中の抗生物質問題を惹起したのである。

乳腺炎の治療の目的で投与した抗生物質の排泄速度は抗生物質の剤形によって異なり，当然，油懸濁剤は水懸濁剤にくらべて排泄は遅いはずである。この問題については，藤田[12)]，Calbert[13)]，菊間[14)]，楠山[15)]，らが，それぞれ注入後の経時的な残留調査を行なって，3日以上残存するものもあると報告している。

そこで，省令に定める搾乳制限期間3日間の妥当性について更に検討を要すると考える。

1970年8月に都内市販飲用乳の抗生物質の検査をしたところ16.3%が陽性であったので，生乳の都への供給14県衛生部担当者会議の開催，各メーカーに対し自己検査成績と違反品の自主的措置の報告を求め強く指導した結果，抗生物質の検出される牛乳は急速に減少し1971年1月に0.4%が陽性を示すほどに著しく改善された。その後，関係業者の抗生物質の適正な使用，自主検査の励行，指導取締の強化により牛乳中の抗生物質はなくなった。

今後も更にその対策を推進してゆく必要があるが，抗生物質の根本的対策としては乳牛の健康管理，搾乳衛生管理に留意して乳腺炎罹患を防止するための積極的な努力を払うことであろう。

抗生物質の乱用に伴って耐性菌の出現もまた無視できない問題である。

現在，連鎖球菌性の乳腺炎は減少し，ペニシリンに耐性となっているブドウ球菌性の乳腺炎が増加しているので，一般に使用されているベンジルペニシリンは治療効果があまり期待できないと藤田[12)]は述べている。

乳腺炎治療に使用されている抗生物質は，PC，TC，SM，OM，CP，コリスチン，ネオマイシン，バシトラシン，ポリミキシンBなど数種混合剤で，これら薬剤の乱用に伴ない必然的に耐性菌が漸増して自然界を汚染し，食中毒あるいは感染症において新しい脅威となりつつある。

このたび，都内乳処理場の原料生乳から分離したブ菌について薬剤感受性試験を行なったところ，耐性株は全供試株の82.7%に達し，そのうち PC 耐性株が各原料乳生産県とも最も高頻度に分離され，次いで SM，KM などの耐性株が高頻度に分離されて，かつ多剤耐性化が目立った。これは乳中の疾病の予防，治療などに PC，SM 及び KM などが多用された結果生じた現象と考えられる。したがって，この現状をそのまま放置すれば今後ますます耐性菌の耐性度並びに耐性頻度は増加するであろう。

薬剤耐性は供試株の由来，例えば病巣由来株と健康体由来株のいかんによって，かなり異なると考えられるし，事実，乳腺炎の乳汁由来のブ菌[16)]と本調査の

分離株の薬剤耐性の耐性度並びに分離頻度は異なっているが，元村[17]らの生乳由来ブ菌の耐性とほぼ同じような傾向を示している。

なお，薬剤に対する感受性は，上記の分離材料のみならず，地域及び年月などによっても異なるので，調査成績はその利用という点から常に新しいものが要求される。

本調査は，乳腺炎由来のブ菌の抗生剤感受性を調べる目的ではなく，都内牛乳処理場で受乳されている原料生乳由来のブ菌の薬剤耐性の現状を把握すると同時に乳牛の治療に多用されている抗生物質を推定して，それら残留抗生物質同定検査の参考資料並びに予防衛生上の指標としたいと考えて実施したのである。

抗生物質は家畜の疾病の予防や治療，さらには発育促進を目的とする飼料添加剤などに使用されているが，使用方法によっては残留抗生物質によるアレルギー性疾患，菌交代症の発生，耐性菌の増加による自然界の汚染などによる直接あるいは間接的な人の健康障害の発生が危惧されるところから公衆衛生上，一大関心事[18)~20)]になっている。

スワン委員会[21)]は人の健康を考慮すれば，家畜への抗生物質の使用を現状のまま放置することは，有害であるとして家畜用の抗生物質を「飼料用」と「治療用」とに区別し，また人の疾病治療に使用しない抗生物質ならば，家畜飼料に少量使用してよいことなどをイギリス国会に勧告している。

一方，FDA[22)]は，人の治療用抗生物質でも指定基準に適合しないものは，家畜飼料として使用することを禁止し，さらに，CP，半合成ペニシリン類，ジェンタミシン，KMは絶対に使用すべきでないと述べている。

これらの勧告が示すように，抗生物質の乱用は人の健康に及ぼす影響を考慮して絶対に避けるべきであり，また，家畜の体重増加，飼料効率を高める生産性向上を目的とする飼料添加剤としての抗生物質についても，家畜の治療用抗生物質と同様，獣医師の監督指示のもとに慎重に使用されるべきものと考える。

要　約

1970年から1973年にかけて，都内市販飲用乳について残留抗生物質の検査を行なうかたわら，1971年9月に都内乳処理場で受乳された10県の原料生乳から，それぞれ黄色ブドウ球菌を分離して，その薬剤耐性を調査して次のような成績を得た。

(1) 1970年8月に都内市販飲用乳595例の残留抗生物質の検査をしたところ，16.3%が陽性であったが，1970年10~11月に陽性率1.7%，1971年1月に陽性率0.4%と急減し，その後現在に至るまで飲用乳から抗生物質は検出されていない。

(2) 飲用乳から検出された抗生物質は，ほとんどペニシリンであり，最高含有量が0.07IU/mlであった。

(3) 原料生乳由来ブ菌を対象に8種類（TC，PC，SM，LM，OM，CP，KM及びNB）の抗生物質に対する感受性を調査したところ，150株中82.7%が耐性菌で，中でもPC耐性菌が各原料乳生産県とも最も高率に検出され，次いでSM，KMなどの耐性菌が高頻度に分離された。

(4) PC，TC，SM，LM，OM，CP及びKMに対する耐性型をみてみると，単剤耐性65.3%(PC耐性型)，2剤耐性2.7%，3剤耐性1.4%，4剤耐性6.0%，5剤耐性7.3%と多剤耐性化している。

(5) 供試薬剤の各耐性値の最高は，PC 50 IU/ml，TC 100mcg/ml，SM 100mcg/ml以上，LM 12.5mcg/ml，OM 12.5mcg/ml，CP 12.5mcg/ml，KM 100mcg/ml，NB 12.5mcg/mlであった。

(6) TC，SM，KMなどの25mcg/ml以上の耐性菌はすべてTC，SM，KMの2剤あるいは3剤の25mcg/ml以上の耐性菌であった。

文　献

(1) Neal, C. H. and Calbert, H. E. : J. Dairy Sci. 38 (6), 629~633 (1955)

(2) I. D. F. : I. D. F. Sessions in Moscow V-Dot 86 (1968)

(3) 日本国際酪農連盟：第53回国際酪農連盟年次会議報告，資料18号（1669）

(4) 桑原省吾，他：微生物検査必携，175~195(1966) 東京

(5) 石山俊次，他：Chemotherapy, 16, 98~99(1968)

(6) 三橋進，他：モダンメディア，17，6，257~267 (1971)

(7) Borrie, P. and Barrett, J. : Brit. Med. J., 2,1267 (1961)

(8) FAO, Nutrition Meetings Report Series, No. 11 (1965) : Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser., 107(1956)

(9) Stolz, E. I. and Hankinson, D. J. : Appl. Microbiol., 1, 24~29 (1953)

(10) 渡辺力：モダンメディア，17(5),244~254(1971)

(11) 厚生省監修：食品衛生小六法，（昭和46年版）東京

(12) 藤田昌彦：食衛誌，5，1，82～91（1964）
(13) Calbert, H. E.: J. Milk and Food Tech., 14,61～64（1951）
(14) 菊間利治，他：第170回日本臨床獣医学会講演，（1971）
(15) 楠山永雄：畜産の研究，25(2)273～277(1971)
(16) 丸山国美，他：日獣会誌，25,5，219～221(1972)
(17) 元村昭典，他：食品衛生研究，19，3，112～125（1969）
(18) 渡辺力：科学，39，554(1969)
(19) 渡辺力：科学，41，25(1971)
(20) Anderson, E. S. : Bacterial Rev., 22, 131(1968)
(21) Report of Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandary and Veterinary Medicine, Her Majesty's Stationery office London(1969)
(22) ホプキンス，ハロルドC.：食の科学，11，119～121(1973)

昭和48年流行した新しいインフルエンザB型ウイルスの電子顕微鏡的研究

前木吾市* 坂井富士子**

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION OF NEW B TYPE INFLUENZA VIRUS ISOLATED IN 1973

Goichi MAEKI and Fujiko SAKAI

(Division of Milk and Meat Sanitation, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Division of Virology, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Heath)

Summary

Electron microscopic observation on the newly isolated B type influenza virus was made, in comparison with that of the conventional B type laboratory strain, since newly isolated B type strains have been confirmed to have been having an unique antigenic composition.

Negative staining and shadowing techniques were applied in this study on partially purified virus obtained through ultra centrifugation of crude virus suspensions.

Results obtained were summarized as follows:

1) It was found that the new B type virus has been containing a few filamentous virus among the spherical ones, and it was never found on the specimens of conventional B type virus strain.
2) Deeper electron density observed on the new B type virus, in comparison with that of the conventional one, has enhanced effectiveness of negative staining and shadowing procedures.
3) It was also found that negative staining method is an effective procedure for the sescrimination of virus particle from other host cell derived components.

緒　言

昭和48年流行したインフルエンザB型ウイルスによる集団カゼは，従来のB型による集団カゼに比べ伝染力が強く，血清学的検査により抗原構造の著しい変異が突き止められるに至った[1]。吾々は変異に伴う形態学的な変化を，電顕レベルで追究することを企てた。現在迄A型ウイルスについては幾度か電顕観察[2]の経験を重ねて来たが，B型ウイルスは昭和30年以来2度目である。その間，ウイルス精製法，電顕試料作製法及び電顕性能の進歩は目覚ましい。従来からのシャドウイング法と現在，生体高分子観察に賞用されているネガティブ・ステイン法を併用し，新しいB型ウイルスに試みたところ新知見が得られたので報告する。

*東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科（中央機器室）
**東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科

Ⅰ　実験目的

(1)　新しく分離されたB型ウイルスの抗原構造の変異に関連して，形態学的に何等かの特徴ある変化がウイルス粒子上に認め得るか手掛かりを摑みたい。
(2)　電顕が新型機種（JEM-100B）に更新されたのでその性能を生かし，ウイルス粒子に対するネガティブ・ステイン技法の最適条件を見出したい。

Ⅱ　実験材料及び方法

A　実験材料

1　供試ウイルスは昭和48年春，微生物部ウイルス研究科で「集団カゼ」より分離直后のインフルエンザB/東京53/73（以下B53と略す）であり，対照株として昭和48年度に分離したインフルエンザB/東京63/73（以下B63と略す）を使用した。

2　ウイルス精製の段階は，孵化鶏卵漿尿膜液を先づトリ赤血球で吸着して集め，次いで超遠心処理（4万回転，2時間）した沈渣をPBSにて再浮遊させたものを原液とした。

B　実験方法

試料作製法[3]としては，Crシャドウイングにより試料についてあらましの傾向を知り，次の段階として燐タングステン酸（PTAと略記）を用いるネガティブ・ステインを実施する二段構えとした。

具体的にネガティブ・スティンの内容を記す。PTA試薬として2種類を使用した。一つは従来用いて来た燐タングステン酸の3％水溶液で，KOHでpH7.0付近に調整，昭48年3月作製の古い液であり，他の一つは燐タングステン酸ソーダ（塩の形になっている）を2％水溶液としたもの pH7.2である。後者は使用直前に調製して用いた。

染色手技として以下3通りを実施してみた。

PTA 染色—(1)

原液（ウイルスのPBS浮遊液）の一白金耳をメッシュ上に載せ濾紙で吸取り乾燥させ，そのあと蒸留水でメッシュ上に析出した食塩結晶を取除く。続いて3％ PTA（古）を一滴々下して染め再び濾紙で吸取り，自然乾燥后検鏡に供する。

PTA 染色—(2)

電顕観察妨害の原因となる食塩結晶を除きPTA染色を効果あらしめるため，原液の溶媒PBSを蒸留水に置き換える前処置をする。それには超遠心処理と透析による方法が考えられるが，前例にならい超遠心処理を実施した。以下メッシュ上でインスタント的に染色を行う方法である。先づ試料一滴を載せ続いて3％ PTA（古）を滴下し濾紙で吸取りの后自然乾燥する。

PTA 染色法—(3)

試料は上の(2)と同じ蒸溜水浮遊液としたウイルス液を使用し，燐タングステン酸ソーダから調整した2％ PTA液を用いてメッシュ上で染める。

Ⅲ　観察所見

（A）シャドウイング試料について

(1)　昭48年6月インフルエンザB53及び対照ウイルスB63のシャドウイング標本観察から始めた。B53を比較的多く載せ過ぎたメッシュを観察したところ，マッチの棒に似た形のものを数多く認めた。マッチ棒の頭に相当する部分のサイズは，ウイルスの直径に匹敵する大きさであった。フィラメント状ウイルスかと誤認しかけたこのものの正体は，マッチの軸木に相当する部分が，蒸溜水で除去し切れなかった食塩結晶の残渣らしいことが漸次推定されるに至った。この中に混ってフィラメント状ウィルスと覚しい像が僅かに存在するのを認めた。きれいな視野について検討したところフィラメント状ウイルスの存在を確認した。（写真2）

(2)　対照株B63のシャドウイング像の特徴はB53に比し著しくコントラストが低いことである。そしてフィラメント状ウィルスが全く観察されず，サイズの揃った円形粒子状のウイルスの大群が観察された。（写真5）

(3)　B53，B63について形態上特に変っているもの，すなわち縄状，おび状及び膜状を呈する像につき撮影し検討した。その結果B53は確実にフィラメント状のものが僅かながら認められた。一方B63にあっては認められず，稀に疑わしい像があっても膜の切れ端であったり，球形粒子が連鎖をなしているものばかりであった。

（B）PTA 染色試料について

PTA染色によればミキソウイルスの表面に存在するスパイク（spike）を指標として，球形粒子ならびにフィラメント状ウイルスの同定が可能である。シャドウイング法ではスパイクは識別不可能であり，ウイルス粒子判断の根拠としては，粒子の数，サイズ及びコントラスト等から推定しているに過ぎない。したがってフィラメント状ウイルスのように変った像を呈するものを判断するにはネガティブ染色法が適しており，今回の観察にも早速応用した次第である。

(1)　前掲したPTA染色—(1)の結果

染色の仕上がりが濃厚で，視野がきたない。特にB

53の方がひどかった。試料をメッシュ上で一度乾燥させる処置がよくないらしい。B53の観察では長さ4 μに及ぶフィラメント状ウィルスが認められた。

(2) PTA 染色—(2)の結果

ウイルス試料の前処置として超遠心処理により溶媒の PBS を蒸溜水に置き換え，しかる后に染色するというこの手段は，従来吾々が最善の方法として採用してきた方法である。染色液として3％ PTA（古）を使用したが，直径1 μ前后に凝集した PTA の大顆粒が，マイクログリッドメッシュ上の随所に散在出現し，甚だ不本意な染色仕上がりを生ずるに至った。狭い局部的な視野領域では一応みられる像を呈している。（**写真3**），写真中の球形粒子に注目すると，その中央部付近に PTA の侵入を示す陥凹部が認められ奇異な形状を示すものが数多く見られる。その他フィラメント状ウイルスが切れ切れになったかと想像される形のもの，スパイクを有する大顆粒，大きな膜様構造物が凝集塊をなしているなど，要約すれば染色液側の不適合による失敗例と云い得よう。フィラメント状ウイルスの有無の比較は省略したい。

(3) PTA 染色—(3)の結果

上記(1)，(2)の結果から染色液に疑問を抱いたので，新たに燐タングステン酸ソーダ（塩の形のもの）を入手し，2％水溶液としたところ pH7.2 を示した。そこで pH を調整することなくその儘使用に供してみた。ウイルス液は(2)と同じで溶媒の PBS を蒸溜水に置き換えたものである。置き換え后約1ヶ月間 8 °C の冷蔵庫中に保管し続けた試料を染色した。支持膜はコロジオン単膜（カーボン補強なし）を使用した。

新しく調整した2％ PTA 液によるB53の染色像を**写真1**に示す。多数の球形ウイルス粒子の外にフィラメント状ウイルスの典型的なものが右下方に見え，その上方に細長いフィラメント状のもの，そして大きな顆粒が数個散在しているが，何れにもスパイクが認められウイルス構成々分であることを示している。

新 PTA 液による対照株B63の例を**写真4**及び**6**に示す。多数のウイルス粒子の殆んどが球形をなしており，そのサイズが揃っているのが特徴である。

（Ⅳ） 考 察

インフルエンザ試料精製法は従来孵化鶏卵漿尿膜液を直接超遠心処理していたが，最近はトリ赤血球で吸着する前処置をつけ加えたため純度が向上し，電顕像が一段ときれいになって来た。

(1) フィラメント状ウイルスの出現について

今回の実験ではシャドウイング法と PTA によるネガティブ・ステインを併用し，その両方から新しく分離したインフルエンザB53中のフィラメント状ウイルスを認めた，過去の経験においてA型ウイルスからは数多くのフィラメント状ウイルスを認めたが，このものがウイルスの毒力，変異又は増殖形式などとどのような関係にあるのかは定かではない。しかし今回の実験で対照に用いたB型株からは殆んど認められなかった事実と比較すると，何等かの関係があるのではなかろうか。

フィラメント状ウイルスの出現頻度はかなり少ないが，このことについて考察を加えてみたい。今回の実験ではウイルス精製の初期にトリ赤血球でウイルスを吸着し集めているが，此の段階におけるフィラメント状ウイルスの吸着収量はどのようになっているのだろう。フィラメント状ウイルスの赤血球への吸着部位は，その両端で行なわれるとの説があるが，もしそうだとすれば可成りのロスがこの過程で生じることも考えられる。又ウイルス試料を白金耳で試験管からメッシュ上へ載せ，濾紙で吸取ると云った手技段階での再現性も気がかりである。理想的には噴霧法が最も有効のようであるが大掛りな設備が必要となる。

B53の PTA 染色像にみられるスパイクを持つ大顆粒の存在も，今度の実験で新たに湧き起って来た謎である。

(2) ウイルス試料のコントラストについて

シャドウイング及び PTA 染色像の観察を通じて，電顕試料の側からみられた特徴は，B53，B63の間の甚だしいコントラストの相違である。B53はコントラストが良く，一方B63は著しくコントラストが劣る。これはウイルス粒子の内部成分の充実さを表わしているものと考えられる。

シャドウイングの場合蒸着金属に粒子の粗い Cr を用いる理由は，安価簡便なことの外に Pt–Pd に比しコントラストが強くつき易いからである。B63ウイルスは Cr シャドウイングを施してもコントラストが不足であった。

PTA 染色の場合，新 PTA 液の使用によりB53ウイルスは良好な染まり具合をみるに至ったが，B63では著しいむらを生じた。又B63の場合，濃く染まった個所は強拡大で仔細に観察すると PTA が微結晶をなしていることが判明した。このような個所ではスパイクなどの微細構造が隠蔽されて認め難くなっている。

(3) PTA によるネガティブ・ステイン法について

一般にネガティブ・ステイン法は入門し易い一方，

熟練の域に達することの難しいテクニックと云われている。今度の実験では新型高性能電顕を使用したので，スパイク（巾40Å 長さ100Å）の存在が確認し易い強味があった。成否の鍵はマイクログリッド等の支持膜作成，染色液調製及び染色手技等の巧拙にかゝってくるわけである。今度の実験で進展をみた点は，第一にPTA 試薬を吟味し，従来使用してきた燐タングステン酸からいち早く燐タングステン酸ソーダに転換したことを挙げておかなくてはなるまい。前者の試薬では何らかの微妙な原因で，メッシュ上で大きな凝集塊を生じ染色の大きな障害となった。後者では懸念されたPTA の結晶化が殆んど気にならない程度であったのが幸いした。

支持膜はマイクログリッドを自製し使用するのが適当であるが，たまたま手持ちが切れたのでコロジオン単膜をカーボン補強なしで使ったところ，直接5万倍迄の撮影ができた。これは僥倖と云うべきであろう。

PTA 染色するために，ウイルス試料の溶媒を PBS から蒸溜水に置き換え長く保存することは，ウイルスの生物活性を失わしめることになり非常に気がかりであったが，電顕観察してみると意外に破壊されてないことが判った。保存期間が長くなるに及んでB63ウイルス液中に，雑菌の侵入が目立って来たのは注意を要すべきである。

(4) 今后の課題

B53にみられたフィラメント状ウイルスの消長を，今后の流行の機会に出来る限り追ってみたい。又継代に伴う形態上の変化ならびに生物学的活性と如何に対応するかなど興味深い。ウイルス試料の作製法についても，ウイルス濃度を更に高める濃縮精製の工夫の外，ウイルスを吸着したトリ赤血球そのままの段階から電顕観察ができるよう工夫を講じたい。PTA 染色法についても pH の吟味，ウイルス試料と PTA との混ぜ方，食塩結晶等人工産物の除去問題そして PTA 結晶化の防遏等課題は尽きない。

V まとめ

1973年に流行したインフルエンザB型はその抗原構造が大きく変動してきたので，吾々は分離して間もないウイルスについて形態学的な特徴の有無を調べる目的で電顕観察を行った。試料作製法として血球吸着后超遠心精製したウイルスにつき，シャドウイング法及びネガティブ・ステイン法を応用し対照株と比較検討した。得られた結果を次に示す。

(1) 新しいB型ウイルスに僅かな数ではあるがフィラメント状ウイルスの出現が認められ，対照株には認められなかった。

(2) 新しいB型ウイルスは対照株に比し電顕像のコントラストが著しく優れ，シャドウイング及びネガティブ・ステインの効果が良好であった。

(3) 新型高性能の電顕使用と相俟って，ネガティブ・ステインの実用性を高めることができるようになり，ウイルスと夾雑物との鑑別が容易になった。

終りに，本実験に際し種々の御助言賜った秋田大学医学部天野保二博士に厚く御礼申上げます。

文 献

1）坂井富士子，他：都立衛生研究所研究年報(24) 81（1972）

2）前木吾市：都立衛生研究所研究年報，(21)，25（1969）

3）前木吾市，他：都立衛生研究所年報，(23)，27（1971）

写　真　説　明

写真1，2，3は昭48年新しく分離したB型ウイルスのもの，4，5，6は対照に用いた従来の型に属するB型ウイルスである。

1：新しいB型ウイルスの PTA 染色像，右下にフィラメント状ウイルスが見える。その他細長いもの，大顆粒の何れにもスパイクが認められる。（×50,000）

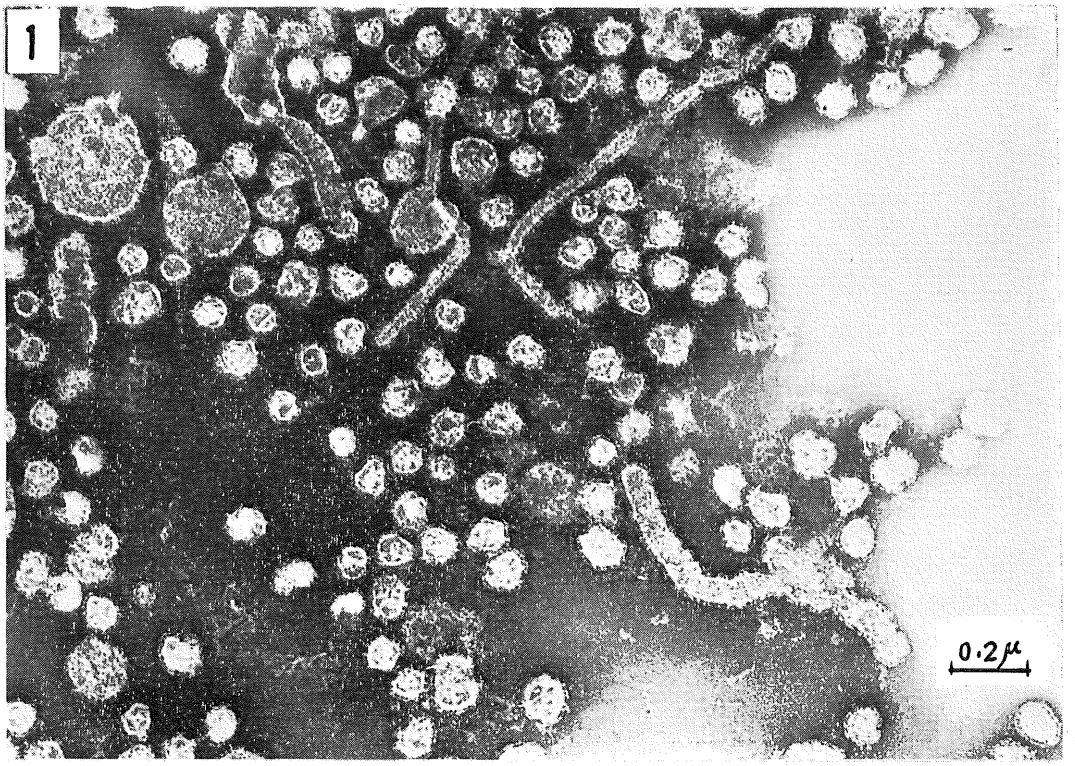
2：新しいB型ウイルスの Cr シャドウイング像。僅かながら出現するフィラメント状ウイルスに注目したもの。（×50,000）

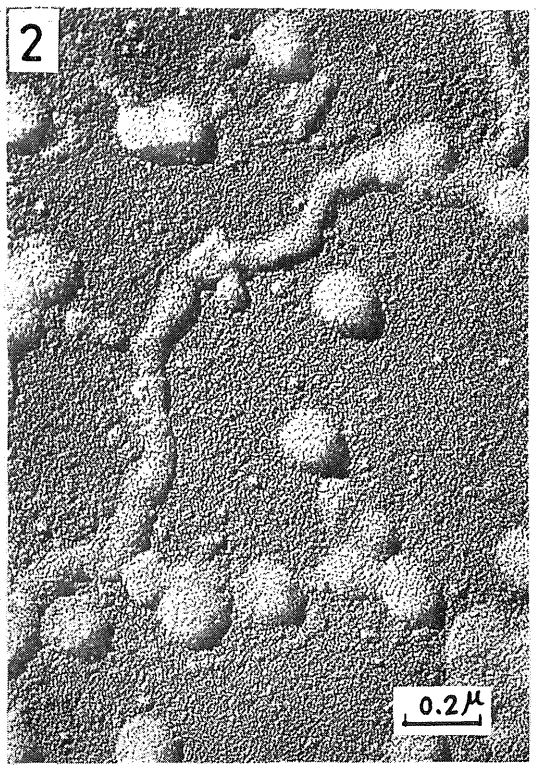
3：新しいB型ウイルスの PTA 染色像。球形粒子の中央部に PTA が侵入し凹部のようにみえる。3％ PTA（古）で染色。（×100,000）

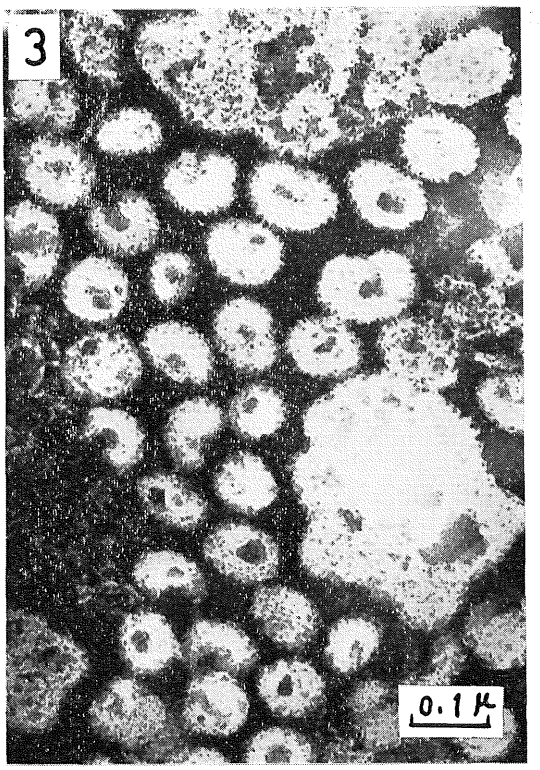
4：対照B型ウイルスの PTA 染色像。サイズの揃った球形粒子が大部分で，フィラメント状ウイルスは認められない。（×25,000）

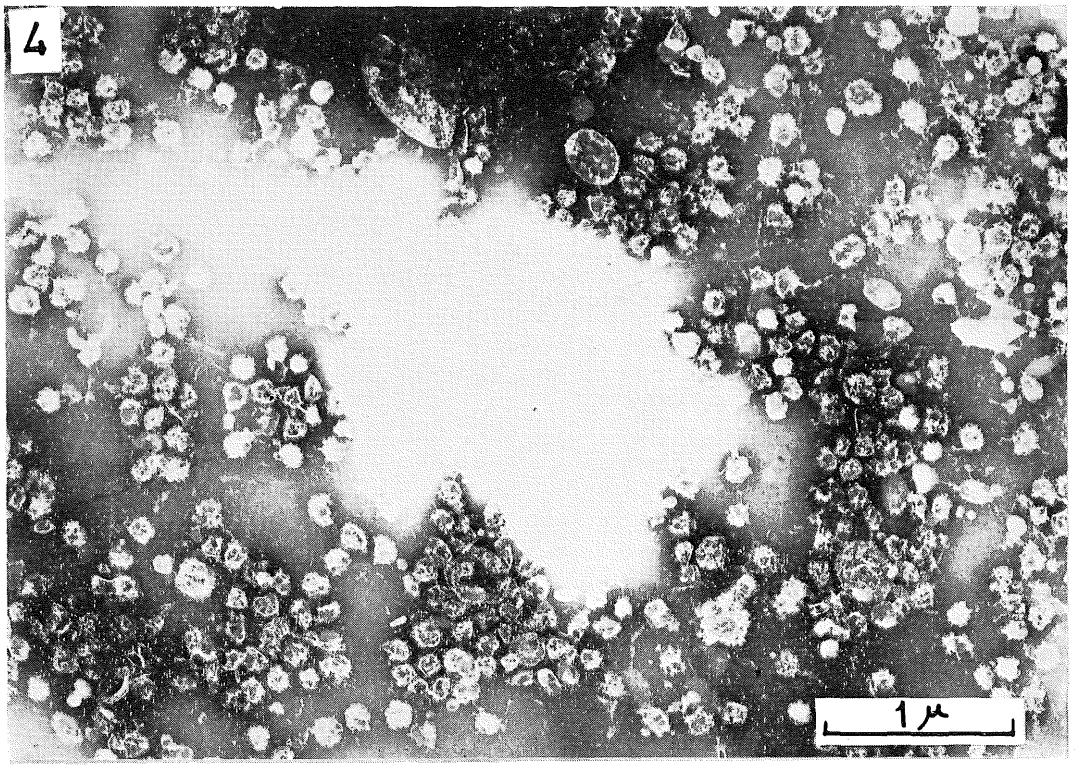
5：対照B型ウイルスの Cr シャドウイング像。大半がサイズの揃った球形粒子である。（×25,000）

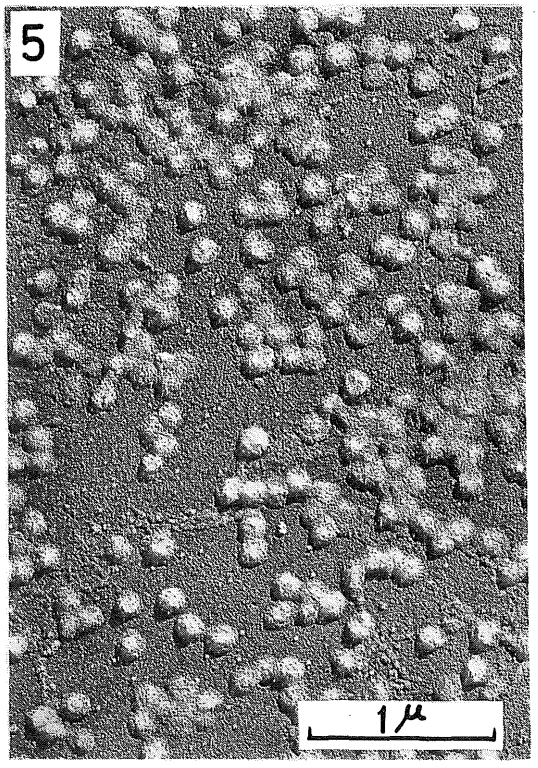
6：対照B型ウイルスの PTA 染色像。写真4と同じ試料の強拡大像で，スパイクを持つ球形粒子のサイズが揃っていることを示す。（×50,000）

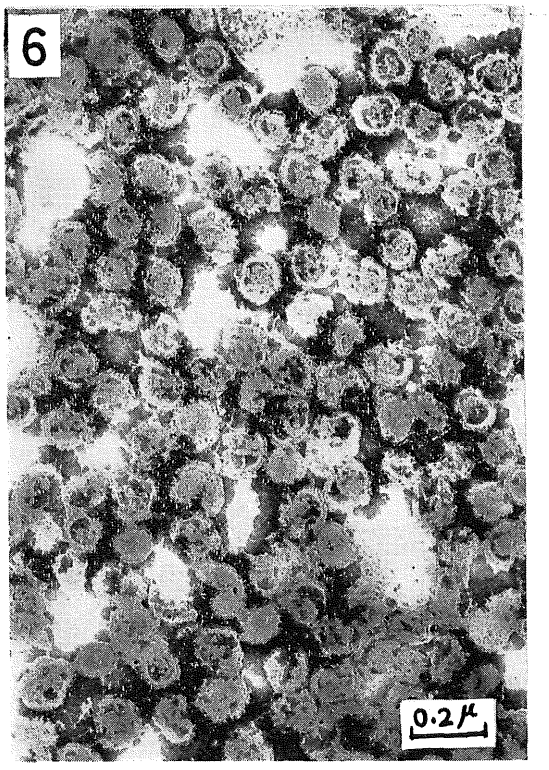

1
0.2μ


2
0.2μ


3
0.1μ


4
1μ


5
1μ


6
0.2μ

食品中のマイコトキシンに関する研究(第4報)

醸造食品中のステリグマトシスチン試験法の検討

直井家寿太* 小川仁志* 風間栄治*
斎藤和夫* 志村公子* 木村康夫*

STUDIES ON MYCOTOXINS IN FOODS (4) DETERMINATION OF STERIGMATOCYSTIN IN MISO AND SOY SAUCE

Yasuta NAOI, Hitoshi OGAWA, Eiji KAZAMA,
Kazuo SAITO, Kimiko SHIMURA, Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Aspergillus versicolor producing sterigmatocystin is widely distributed in foods. About 70% Aspergillus versicolor isolated from foods produce sterigmatocystin. The authors developed a sterigmatocystin testing method for *miso* and soy source, typical fermented foods in Japan.

(1) As many flourescent materials were extracted from *miso* and soy source with methanol and chloroform, cleaning-up is an indispensable step. As the carrier in a column, a combination of Florisil and Kiesel Gel or Florisil and Celite was useful.

(2) Sterigmatocystin was recognized as yellow spots under irradiation of UV light, after spraying 20% aluminium chloride-ethanol solution on TLC plate and heating at 80°C for 10 minutes. It was determined quantitatively with a fluorescent densitometer. The recovery was 90–96%.

(3) When sterigmatocystin co-exists with Aflatoxin, it can be isolated and determined quantitatively by this method.

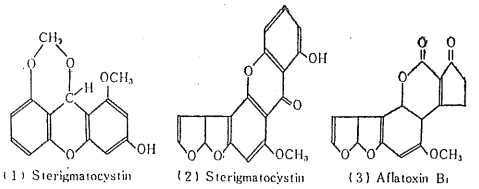
1 緒 言

Sterigmatocystin は1954年初田[1),2)]らによって発見されたマイコトキシンの一種である。初田らは Aspergillus versicolor の培養沪液中より淡黄色結晶を分離し, Sterigmatocystin と命名, (1)の構造式をあたえた。その後 Bullock[3)] らが本物質の化学構造について詳細な研究をおこない, (2)の式を決定した。(3)はマイコトキシンの中でもっとも強い発癌性があるとされている AflatoxinB$_1$ の構造式であるが, 両者はよく似ていることがわかる。

Sterigmatocystin は Dickens[4)] らによる研究では, 動物試験において癌原性のあることが認められ注目されるにいたった。

aspergillus versicolor は自然界に広く分布しているが, 宮木[5)] らは農家の保有米から多数の本菌を分離し, これらのうち約31%が Sterigmatocystin を産生することを報告した。

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科



(1) Sterigmatocystin

(2) Sterigmatocystin

(3) Aflatoxin B_1

Fig. 1 Chemical structure of Sterigmatocystin and Aflatoxin B_1

更に Sterigmatocystin 産生能を有する Aspergillus versicolor が一般食品中に普遍的に存在することも報告[6]されており，従ってわが国においては，aflatoxin による汚染の問題以上に食品衛生上 Sterigmatocystin は重要な問題を提起する可能性がある。そこで我々は食品中の Sterigmatocystin 試験法を早急に確立する必要性をみとめ，まづ醸造食品からの試験法を作製するために研究に着手した。

2 実験の部

(1) 試 料

味噌，醤油（いずれも市販品）

(2) 試 薬

メタノール，n-ヘキサン，クロロホルム，エチルエーテル，アセトニトリル，ベンゼン，塩化アルミニウム，無水硫酸ナトリウム，エタノール，シリカゲル（メルク），フロリジル，セライト

(3) 標準品

Sterigmatocystin（MAKOR BIOCHEMICALS FOR RESEARCH）

(4) 味噌試験法（その1）

(1) 抽出法

味噌中の Sterigmatocystin 試験法はまづ国立衛試五十畑らによって提示された方法について，添加実験による検討から始めた。すなわち Table 1 に示すとおり味噌50 g を精秤し，sterigmatocystin20 μg を添加しよく撹拌，n-ヘキサン100ml，メタノール175ml を加え，5分間ブレンドした後遠心分離する。4層にわかれるのでメタノール層100ml を分液ロートにとりクロロホ

Table. 1. Analytical procedure of Sterigmatocystin in Miso and Soy sauce.

SAMPLE 50g

n-Hexane 100ml
MeOH 175ml
blend (5min)
centrifuged (2500r. p. m.) 10min

n-Hexane | Suspended matter | MeOH 100ml | Precipitate

Chloroform extraction (50ml) twice

$CHCl_3$

filtration (Na_2SO_4 anh)
concentration
dissolve in 1ml 2% CH_3CN in Benzene

TLC

developed plate with Benzene: Acetic-acid: Methanol (90 : 5 : 5)
sprayed plate evenly with 20% $AlCl_3$ in Ethanol
heated plate 10min at 80°C

Densitometry

ルムで抽出（50ml 2回）したのち，クロロホルム層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水，濾過，濾液は減圧濃縮，残渣をベンゼン-アセトニトリル混液1 mlに溶解し，薄層クロマトグラフィに附した。展開溶媒はベンゼン-メタノール-酢酸（90：5：5）である。

展開終了後 TLC プレートは20%塩化アルミニウムエタノール溶液を噴霧し，10分間，80°C で加熱したのち紫外線照射すると，Sterigmatocystin は黄色の明瞭なスポットとして確認できる。$Rf = 0.8$

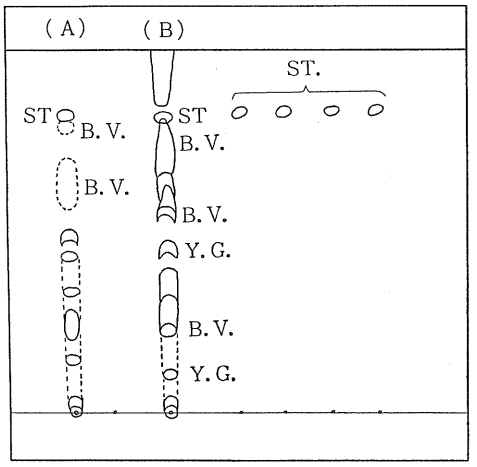
この方法による結果は Fig. 2 に示すとおりである。すなわち図中(A)は Clean up 操作を加えなかったもので，Sterigmatocystin と他の螢光物質との分離がよいものであるが，(B)は別の味噌について同様の操作をおこなったもののクロマトグラムで，他の螢光物質が重なって分離ができず，目的の Sterigmatocystin の存在すら確認できない。このように本法は味噌の種類によっては Sterigmatocystin の定性試験は困難となることがあり，定量試験も不可能であることがわかった。

(2) clean up 方法の検討

以上の結果から clean up 操作の必要性を痛感し，五十畑らによって示された方法すなわちカラム担体としてキーゼルゲル，洗滌溶媒としてベンゼン-アセトン（99：1）を使用してみたが，Sterigmatocystin の90%以上がこの洗滌溶媒に流出してしまうことが判明した。

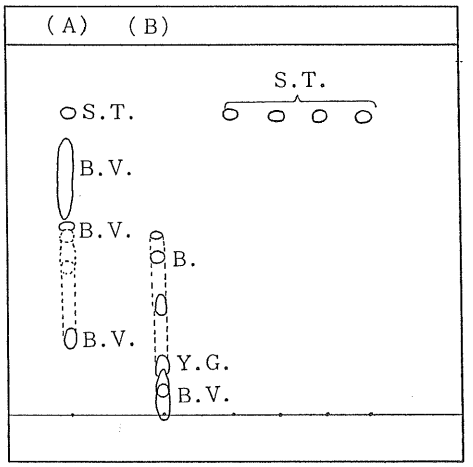
Fig 3 にみられるとおり，クロマトグラム(A)は洗滌溶媒ベンゼン-アセトン(99：1）混液を減圧濃縮乾固したのち TLC をおこなったもので，standard と同じ位置に Sterigmatocystin の明瞭なスポットを確認できる。クロマトグラム(B)は同一カラムに続いて溶離溶媒であるベンゼン-メタノール(9：1）混液を流したのち，減圧濃縮し TLC をおこなったものであるが，Sterigmatocystin はまったく確認できない。

以上の結果から我々はキーゼルゲルのみの clean up は不適当であると考え，他の担体を用いて clean up をおこなうことを検討した。カラム担体としてフロリジル，セライトを選び，添加実験をおこなった処，フロリジルを用いた場合は Sterigmatoystin は洗滌溶媒のベンゼン-アセトン(99：1）混液中にはまったく溶



B, V： Blue Violet.
Y. G： Yellowist Green.
ST： Sterigmatocystin
Developer： benzene： methanol： acetic acid (90：5：5)

Fig. 2. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in Miso.
(A) Hacho Miso. (non clean up)
(B) Shinshu Miso.



V, B： Violet Blue
S, T： Sterigmatocystin.
B, V： Blue Violet
Y. G： Yellowish Green,
B.： Blue
Developer： benzene： methanol： acetic acid (90：5：5)

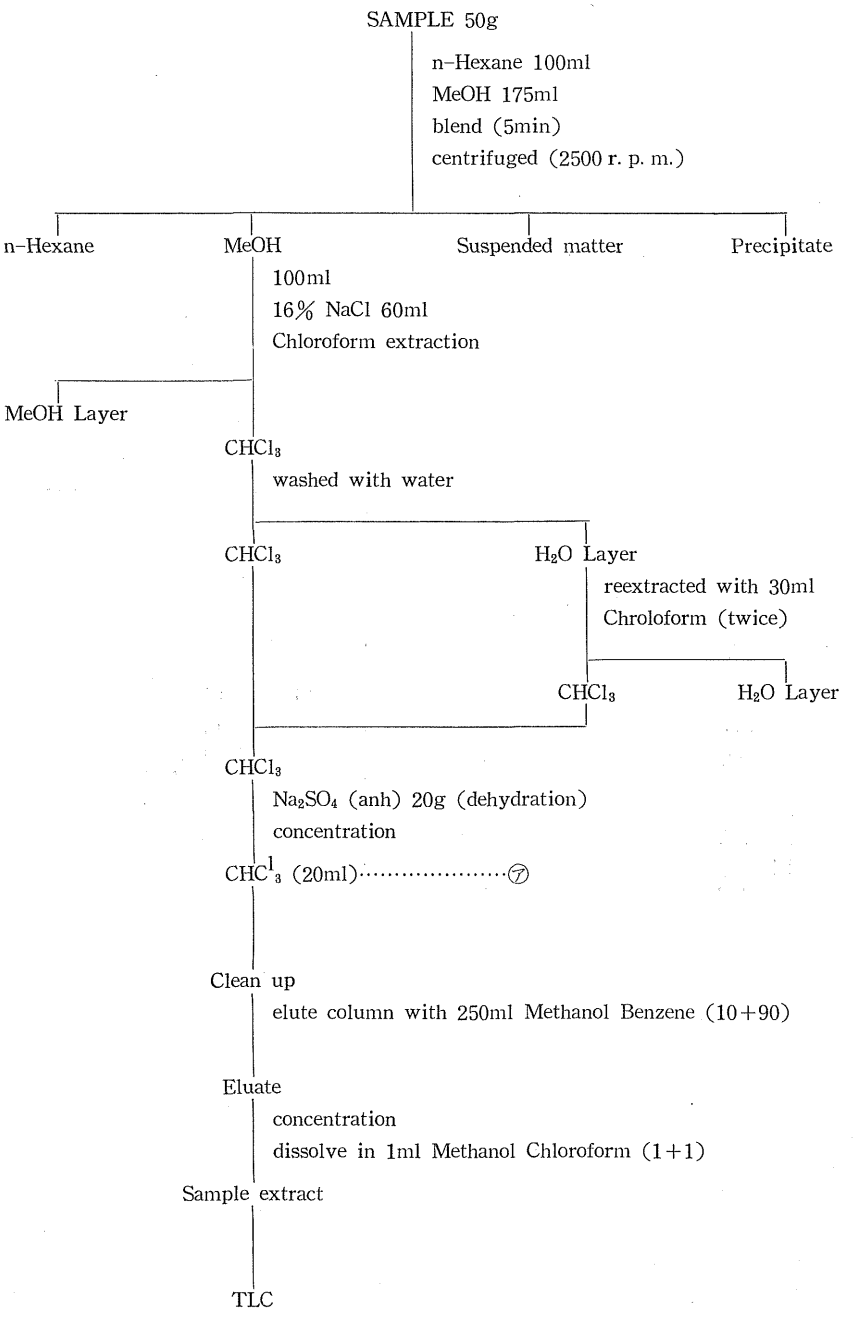
Fig. 3. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in Miso.
Column carrier, Kiesel gel.
(A) Benzene： Acetone (99：1)
(B) Benzene： Methanol (9：1)

離流出せず，次に流したベンゼン-メタノール（9：1）混液中に100％近く溶離する。この事実はキーゼルゲルのみを用いたときと逆の結果である。次にセライトも Cleanup 効果を著るしく高めることがわかったので，カラムの担体としては，フロリジル，キーゼルゲル，セライトの組合わせを又洗滌溶媒はベンゼン-アセトン（99：1）混液の他にエーテル，ベンゼンについても検討を進めることにした。

(5) 味噌試験法（その2）

(1) 抽出法

Table. 2. Analytical procedure of Sterigmatocystin in Miso.



試料50gを精秤し，メタノール175mlおよびn-ヘキサン100mlを加えホモジナイザーで5分間攪拌した後遠心分離すると4層にわかれる。メタノール層 100mlを分液ロートにとり，16%塩化ナトリウム溶液60mlを加えた後，クロロホルム 50mlで3回抽出する。クロロホルム層を合し，蒸溜水30mlで2回洗浄する。(洗浄液はクロロホルム 30mlで軽く振ったのちクロロホルム層を前記クロロホルム層に合わせる)。次にクロロホルム層は無水硫酸ナトリウム20gを投じ脱水後濾過，濾液は約 20mlになるまで減圧濃縮する。

(2) Clean up および試験溶液の調製

試料中に含まれる脂肪および螢光物質を除くためにClean up をおこなう。本法では次の3種のカラムを用意し，いづれか1種を使用する。

① フロリジル・セライト545

カラム管（22mm×500mm）にクロロホルムを約半分までみたし，Na_2SO_4 (anh) 10g，次にフロリジル10gを除々に加え，Na_2SO_4 (anh) 10g，セライト10gを静かに積層し，最後に Na_2SO_4(anh)10gをのせる。クロロホルムをほとんど流下したのち，⑦のクロロホルム層（20ml）を加える。

② キーゼルゲル・フロリジル

①の方法に従がい Na_2SO_4(anh)10g，キーゼルゲル10g，Na_2SO_4 (anh)，フロリジル10g，Na_2SO_4 (anh) 10gの順に積層する。

③ フロリジル

①の方法に従がい Na_2SO_4(anh)10g，フロリジル10g，Na_2SO_4(anh)10gの順に積層する。

次にカラムの洗滌溶媒としてはベンゼンかベンゼン-アセトン（99：1）混液又はエーテルを使用する。使用量はいづれも250mlである。

溶離溶媒はベンゼン-メタノール（9：1）混液250mlを用いて Sterigmatoeystin を溶出する。（5～10ml/min)

溶離液は減圧濃縮したのち，残渣はクロロホルム-メタノール（1：1）混液1mlを加えミキサーで激しく混和溶解する。これを試験溶液とする。

(3) 分離検出

TLCプレート（メルクシリカゲル，厚さ0.25mm）に試験溶液5μlと，Sterigmatocystin 標準液を5μlスポットし，ベンゼン-メタノール-酢酸（90：1：5）で展開をおこなう。展開終了後プレートは暗所で風乾したのち，20%塩化アルミニウムエタノール溶液を噴霧，80°Cで10分間加熱する。次に紫外線灯下で Sterigmatocystin の有無を検する。Sterigmatocystin は明瞭な黄色のスポットとして確認できる。Rf 0.65

次に螢光デンシトメトリーにより定量する。

(6) 実験結果および考察

(1) 抽出法および分離検出

試験法(その2)においては第1次抽出に1%塩化ナトリウム水溶液，メタノール，n-ヘキサン混液でブレンドすると，第2次抽出のときにクロムホルム層が著るしく乳化し抽出操作に困難をきたすので，試料にメタノール，n-ヘキサンを加えてブレンドし，脱脂と第1次抽出をおこなった。得られたメタノール層に対して16%塩化ナトリウム水溶液を加えて塩析効果も期待し，クロロホルムによる第2次抽出をおこなうことにした。これによってクロロホルム層の乳化は避けられ，どの種類の味噌においても抽出操作が容易になった。

Sterigmatocystin は水に不溶性であるので，この性質を利用して我々はクロロホルム層を蒸留水で洗うことにより，水に可溶性の螢光物質，非螢光物質の多くを除去することに成功した。

試験溶液の調製のとき五十畑らは2%アセトニトリルベンゼン混液を使用しているが，この方法だと味噌の場合は濃縮残渣がよく溶解しない。そこで我々はメタノール-クロロホルム（1：1）混液を使用したところ，よく溶解することがわかった。

TLC の際五十畑らは展開溶媒としてベンゼン-メタノール-酢酸（90：5：5）を使用しているが，これではRf値がやや高過ぎて（Rf＝0.8）妨害螢光の影響を受け易いので，我々はベンゼン-メタノール-酢酸（90：1：5）を使用した。この展開溶媒では Rf＝0.65附近で妨害螢光との分離に好結果をあたえる。

Sterigmatocystin は高濃度に存在する場合，TLCプレート上で紫外線照射すると，暗赤色のスポットとして確認できるが，低濃度では困難である。しかし20%塩化アルミニウムエタノール溶液を噴霧し，80°Cで10分間加熱することにより，紫外線照射下黄色のスポットとして確認できるようになる。この黄色螢光は不安定であるという報告[10]もあるが，我々の実験では室内に24時間放置したのちでも，螢光強度は減衰しないことを確認しており極めて安定である。

(2) TLC 螢光デンシトメトリーによる定量

Sterigmatocystin アルミニウムキレートの黄色螢光は極めて安定であることがわかったので，ただちに螢光デンシトメトリーによる定量法について検討した。

Sterigmatocystin 100ng を TLC プレート上にスポットし展開，20%塩化アルミニウムエタノール溶液を噴霧，加熱，黄色のスポットを得たのち，螢光分光々

度計で励起波長および螢光波長を測定した結果 Fig 4 と Fig 5 に示すとおり，励起波長 355mμ，螢光波長は 496mμ であった。

次に 20ng～100ng/SPOT の範囲内で Sterigmatocystin を展開した TLC プレートを展開方向に移動させ，励起波長 355mμ，螢光波長 496mμ で螢光デンシトメトリーをおこなった。その結果ピーク面積と螢光強度の間に直線関係が成立する。Fig. 6 は 20ng～100ng/SPOT の濃度におけるデンシトグラムであり，Fig 7 はその時の検量線である。検量線は定量のつど作製する。

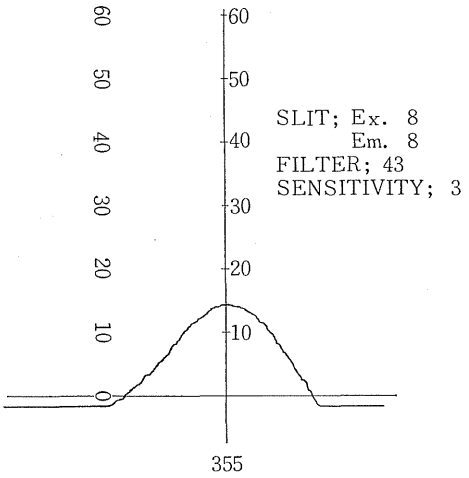


Fig. 4 Excitation wavelength

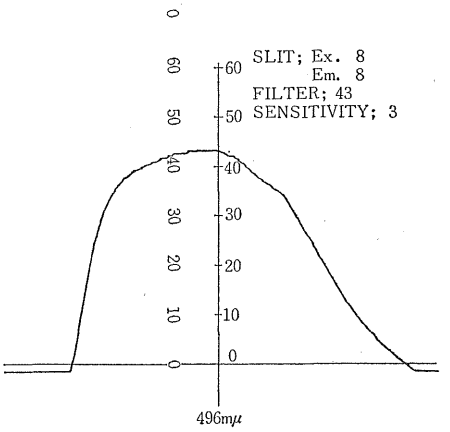


Fig. 5 Emission wavelength

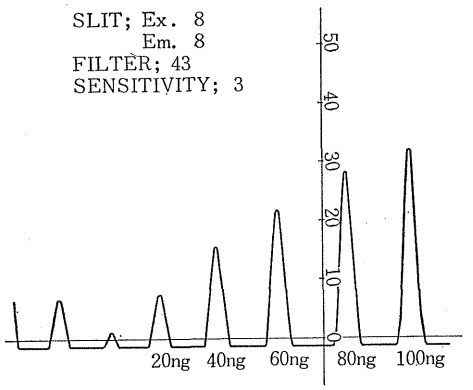


Fig. 6 Densitogram of Sterigmatocystin on TLC plate.

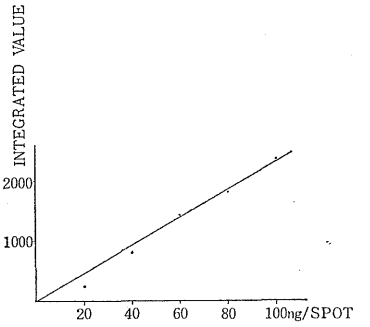


Fig. 7 Calibration curve of Sterigmatocystin in TLC densitometry.

(3) 試料に対する添加実験と，Clean up 条件の検討

カラムの担体としてキーゼルゲルのみの使用は不適当であることがわかった。一方 aflatoxin 試験法の中で使用した酸性アルミナとキーゼルゲルの組合せによるカラムを応用してみたが，アルミナの酸性，中性，アルカリ性に関係なく Sterigmatocystin の溶出はまったくみられなかった。このことはアルミナ層の中ですでに Sterigmatocystin はアルミニウムキレートをつくるのではないかと疑われる。これらの結果からカラム構成は①フロリジル・セライト 545 ②キーゼルゲル・フロリジル③フロリジルの 3 種とし，これに洗滌溶媒を組合せ検討を加えた。組合せ条件は Table 3 のとおりである。

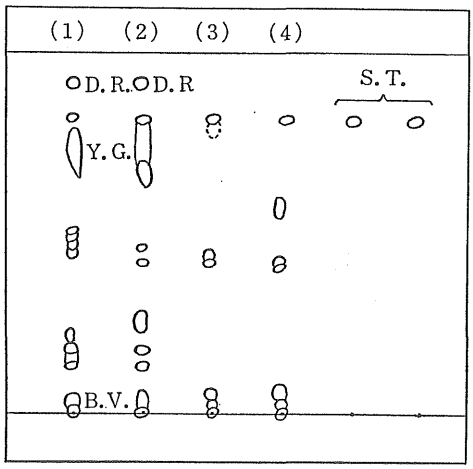
試料は妨害螢光物質の多い赤味噌と比較的少ない白味噌を用い，これらに Sterigmatocystin 20μg を添加したのち，Table 2 の方法に従って抽出操作をおこなった。

Table 3 (1)の条件――味噌の種類によっては clean upの状態が良好なものもあったが，回収率は50％と低率であった。又赤味噌では Fig8の(1)にみられるように黄緑色の強い妨害螢光が出現し，定量不可能であった。

(2)の条件――Fig 8 の(2)のクロマトグラムにみられるようにTLCプレート発色後は Sterigmatocystin のスポットの直下に弱い妨害螢光があり，又上方に淡いレンガ色のスポットが出現する。赤味噌，白味

Table. 3.

COLUMN CARRIER	CLEAN UP	
	$CHCl_3$ LAYER WASH (WATER)	COLUMN SOLVENT (WASHED)
1 Celite 5g Florisil 10g	1	Benzene: Acetone (99 : 1) 250ml Ether 250ml
2 〃	2	Ether 250ml
3 〃	2	Benzene (100ml) Benzene (99 : 1) 250ml
4 Florisil 20g	2	Ether 250ml
5 Florisil 10g KieselGel 10g	1	Ether 250ml
6 〃	2	Ether 250ml
7 〃	1	Ether 250ml Benzene: Acetone (99 : 1) 250ml
8 〃	2	〃
9 〃	1	Benzene (100ml) Benzene: Acetone (99 : 1) 250ml
10 〃	2	〃
11 Celite 10g Florisil 10g	2	Ether 250ml Benzene: Acetone (99 : 1) 250ml



D. R: Dark red
B. V: Blue violet
Y. G: Yellowish green
S. T: Sterigmatocystin.
Developer: benzene: methanol: acetic acid (90 : 1 : 5)

Fig. 8. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in Miso.

噌共に定量困難であった。

(3)の条件——Fig 8 の(3)のクロマトグラムにみられるように Sterigmatocystin の直下に淡い青紫色の螢光があり，定量不可能であった。

(4)の条件——Fig 8 の(4)のクロマトグラムにみられるように，クロロホルム層の水洗2回とカラムのエーテル洗滌 (250ml) のみで，充分な Clean up がなされ，定量可能であった。回収率80%

(5)の条件——この条件ではクロロホルム層の水洗1回の場合はFig 9 の(5)のクロマトグラムにみられるように Sterigmatocystin の確認はできるが，スポットの上，下に続く黄緑色の妨害螢光の存在によって定量は困難である。

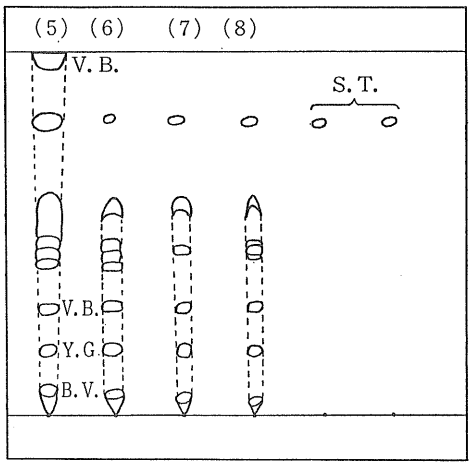
(6)の条件——条件(5)のクロロホルム層水洗を2回おこなったものであるが，Fig. 9 の(6)のクロマトグラムにみられるように Clean up 効果は大きく，Sterigmatoystin の上，下にみられた妨害螢光は完全に除去されている。定量も可能となり，回収率は90％と良好な結果であった。

(7)および(8)の条件——Fig 9 の(7)，(8)のクロマトグラムにみられるとおりクロロホルム層の水洗は1回と2回に関係なく充分な Clean up 効果がみられる。すなわち Sterigmatocystin の上下に出現する妨害螢光は完全に除去されている。定量の結果いづれも95％と良好であった。

(9)および(10)の条件——Fig.10 の(9)と(10)のクロマトグラムにみられるように Sterigmatocystin のスポットの直下に淡い青色の螢光があり，定量不可能であった。

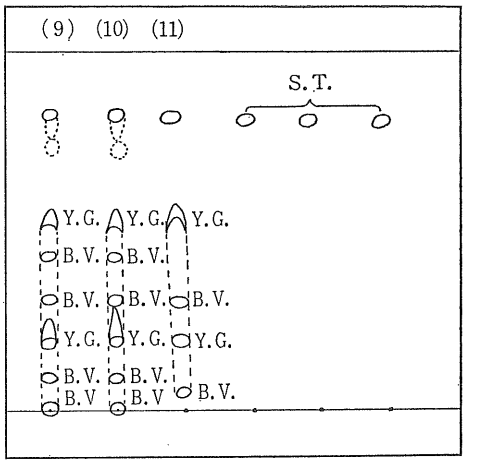
(11)の条件——カラム担体としてセライト・フロリジルを用いクロロホルム層の水洗2回，洗滌溶媒はエーテル，ベンゼン－アセトン混液使用という条件を設定したところ，Fig.10 の(11)のクロマトグラムにみられるように充分な Clean up 効果があった。定量の結果90％と良好であった。

以上の結果から試料が味噌の場合，条件(6)(7)(8)(11)による clean up が良い結果をあたえることがわかった。



B. V : Blue Violet.
V. B : Violet Blue
Y. G : Yellowish Green.
S. T : Sterigmatocystin.
Developer : benzene : methanol : acetic acid (90 : 1 : 5)

Fig. 9. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in Miso



B. V : Blue Violet.
V. B : Violet Blue
Y. G : Yellowish Green
S. T : Sterigmatocystin.
Developer : benzene : methanol : acetic acid (90 : 1 : 5)

Fig 10. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in Miso.

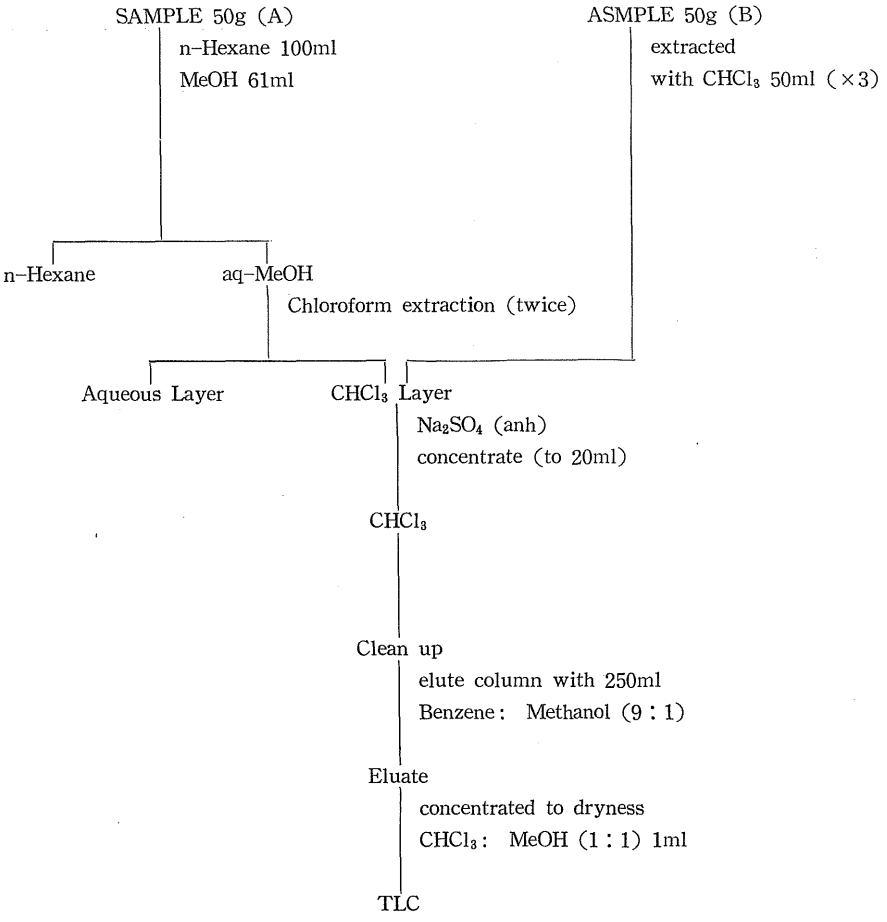
(7) 醤油試験法

醤油中の Sterigmatocystin 試験法は試料が液体であるので Table 4 に示したように抽出法をA法とB法にわけて検討をおこなった。

(1) 抽出法

A法——試料50 g を精秤し分液ロートにとる。次にn-ヘキサン100m*l*，メタノール61m*l* を加えて振盪脱脂する。n-ヘキサンを注意して除いた後，メタノール水層についてクロロホルム 50m*l* で2回抽出をおこない，クロロ

Table. 4. Analytical Procedure of Sterigmatocystin in soy sauce.



ホルム層を合わせ，蒸留水 30m*l* で2回洗う。クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム 10gを投じて脱水濾過するクロロホルム層は約20m*l* まで減圧濃縮して，Clean up をおこなう。

B法——試料50gを分液ロートに精秤し，クロロホルム 50m*l* で3回振盪抽出をおこない，クロロホルム層を合わせ 30m*l* の蒸留水で2回洗う。クロロホルム層に無水硫酸ナトリウム10gを投じ脱水，濾過，濾液は 20m*l* まで減圧濃縮して Clean up をおこなう。

A法，B法共に Sterigmatocystin 20μg を加える。

(2) Clean up

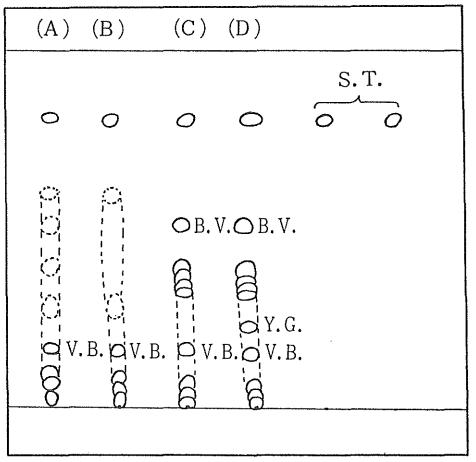
Table 3 の条件(8)および(11)の方法にしたがっておこなったのち，ベンゼン-メタノール（9：1）混液250 m*l* で溶離した。

(3) 試験溶液の調製および分離検出

溶離液を減圧濃縮し，残渣にクロロホルム-メタノール（1：1）混液 1m*l* を加え，ミキサーで激しく混和溶解する。これを試験溶液とする。分離検出は味噌の場合と同一の方法でおこなった。

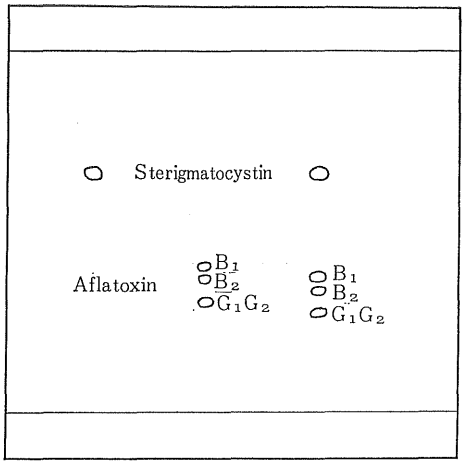
(4) 実験結果

① A法では Clean up の際に条件(8)でおこなった時，Fig. 11の(A)のクロマトグラムに示されるように充分な Clean up 効果があり，定量の結果80%以上の回収率を示した。Fig. 11の(B)に示されるクロマトグラムはA法による抽出のとき，メタノールを加えずに先にn-ヘキサンで脱脂した場合のn-ヘキサン層を濃縮してスポットしたもので，Sterigmatocystin の大部分がn-ヘキサン層に移行してしまったことがわかる。従ってメタノールを加えてからn-ヘキサンと振盪しなければ



B. V: Blue Violet.
Y. G: Yellowish Green.
V. B: Violt Blue.
S. T: Sterigmatocystin,
Developer: benzene: methanol: acetic acid (90 : 1 : 5)

Fig. 11. TLC chromatogram of Sterigmatocystin in soynsauce.



Developer: benzene: methanol: acetic acid (90 : 1 : 5)

Fig. 12. TLC chromatogram of Sterigmatocystin and Aflatoxin mix.

ならない。

② B法による抽出をおこなったのち，クロロホルム層の Clean up を Table. 3の(8)および(11)の条件でおこなうと，Fig.11 の (C) (D) のクロマトグラムに示されるようにいづれの場合も Clean up 効果は充分で，Sterigmatocystin の上下に妨害螢光はみられない。TLCデンシトメトリーによる定量の結果回収率も83%～96%と良好であった。

(8) Sterigmatocystin と Aflatoxin が共存する場合の試験法

味噌が Sterigmatocystin と aflatoxin によって汚染されている場合を考え実験をおこなった。すなわち味噌にそれぞれの standard を同時に添加し，Table 2 の方法によって抽出後，Table 3 の条件(8)および(11)に従って Clean up をおこなった。溶離液を濃縮して薄層クロマトグラフィに附した。展開溶媒はベンゼン-メタノール-酢酸（90：1：5）である。

aflatoxin は溶離溶媒のベンゼン-メタノール（9：1）混液中に溶出されないことがわかった。従って両者は分離することが可能である。

更に Sterigmatocystin と aflatoxin 標準液の混液をTLCプレート上にスポットして，上記展開溶媒で展開すると，Fig12にみられるように Sterigmatocystin は Rf 0.65 又 aflatoxin は Rf 0.40 附近に出現し，この展開溶媒で両者は完全に分離することができる。

3 結　論

(1) Table (2)で示した方法はメタノールの量を変えることにより，味噌，醤油の両方に適用できる試験法である。又醤油は液体試料であるので，クロロホルムによる直接抽出も可能である。

(2) 味噌，醤油からメタノールおよびクロロホルムによって抽出されてくる螢光物質は種類が多く，必らず Clean up をおこなわなくてはならない。その方法として，Ⓐクロロホルム抽出層を蒸溜水で2回洗うことが極めて効果的であった。又Ⓑカラムの担体としてはキーゼルゲルのみでは不充分である。従って Table. 3の条件(8)すなわちフロリジル10gとキーゼルゲル10gの組合わせか又は条件(11)のセライト10g，フロリジル10gの組合せを用いなくてはならない。

(3) Sterigmatocystin と aflatoxin が共存する場合でも，Table(2)に示した方法の下で，ベンゼン-メタノール（9：1）混液では aflatoxin は溶離せず，又仮に aflatoxin が同時に溶離してきた場合でも，ベンゼン-メタノール-酢酸（90：1：5）の展開溶媒では Rf 値に著るしい違いがあり，TLCプレート上で分離検出することが可能である。

Sterigmatocystin の試験法については Vorster[7] や

Stack[8] らによって報告されており，いづれも薄層クロマトグラフィによって確認をおこなっている。一方武田[9]らは穀類中からの試験法について報告したが，我々は醸造食品中には，多種類の螢光物質が存在することから，武田らの方法では困難を感じ，試験法全般について検討を加えることにより，味噌および醤油中の Sterigmatocyotin 試験法を確立した。終りに本研究を進めるにあたり，有益な御助言を賜わった国立衛生試験所，五十畑技官，竹田技官に深謝します。

文　献

1) 初田勇一，久山真平：農化，28,989（1954）
2) 初田勇一，久山真平他：農化，28,992（1954）
3) Bullock, E. et al. : J. Chem. Soc., 4179（1962）
4) Dickens, F., etal. : Brit. J. Cancer., 20,134(1966)
5) 宮木高明他：食衛誌，11,373（1970）
6) 五十畑悦子，武田由比子，et al：第25回食品衛生学会講演要旨集，42（1973）
7) Vorster, L. J. et al. : analyst, 93,694（1968）
8) Stack, M. et al. : J. Assoc. Offici. agri. chemist, 54,86（1971）
9) 武田由比子，五十畑悦子，他：第23回食品衛生学会講演要旨集，29（1972）
10) 真鍋勝，他：農化，45，12，565～570（1971）

L-グルタミン酸の多量摂取に対する衛生学的検討

第3報 L-グルタミン酸ナトリウム投与における生体成分の変動

西垣　進*　田村行弘*　真木俊夫*
山田　洋*　鳥羽啓子*　嶋村保洋*
木村康夫*

HYGIENIC STUDIES ON A LARGE AMOUNT OF L-GLUTAMIC ACID INGESTION

(Ⅲ) STUDIES ON VARIATION OF BIOCHEMICAL COMPONENTS IN SERUM AND URINE AFTFR ORAL ADMINISTRATION OF MONO SODIUM L-GLUTAMATE IN MAN

Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

The cause of Chinese Restaurant Syndrome (CRS) has not been clarified, and the behaviors of living body components on taking much monosodium L-glutamate (MSG) has not been reported in detail. For researching the mechanism of the on set of the disease the authors gave MSG to normal adult men in a hangry state with a dose of 50mg/kg or 83mg/kg (B.W.) together with water, and changes of some ingredients in the serum and the urine were observed. In the serum, Glu. Asp. reached at the maximum level 20~30 minutes after administration, and returned to the normal level after about 2 hours. Blood Sugar and β-ripoprotein varied a little, but showed no significant difference. Other amino acids, nitrogen-containing substances, enzymes concerning to metabolism of Glu., cholin-esterase and inorganic electrolytes did not vary and showed no difference between the patients and the normal control. Considering the results of the experiment, there was not found any phenomenon having close relation with CRS, except a temporary increase of Glu. Asp. in the blood: however, excretion in the control tended to be more quick than that in the patient, and the difference in the function of metabolism seemed to have some relation.

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

緒　　言

われわれは第一報で L-グルタミン酸モノナトリウム（以下 MSG と略す）の多量摂取による事故例について[1]，第二報で MSG 投与後における人の体質と感受性について[2]の相関を報告した。現在までのところ MSG多量摂取により惹き起こされる Chinese Restaurant Syndrom（以下 CRS と略す）の発症理由は，アセチルコリン様物質によるという説はあるが必ずしも明確ではなく，また MSG 多量摂取時の生体成分の変動についていくつか報告はある。——Rosenblum I[3]は MSG 添加チキンスープを服用させたのち，血清中のカルシウム，リン，糖，尿素態窒素，総蛋白，総コレステロール，アルブミン，総ビリルビン，アルカリフォスファターゼ，LDH，GOT 等を測定したが，特に異常を認めなかったと報告しているが詳しい測定値については報告されていない。また Mariselli P.L.[4]は肉汁に MSG を添加し，服用させたのち，血圧，脈搏，呼吸数の変動を測定したが，生理的変動の範囲を越えた有意差はみられなかった。また，Kenney R.A.[5]も血圧，心搏，心電図，呼吸数の変動をみたが変化はなかったといい，Shaumburg H.H.[6]は CRS の症状の一つである胸部圧迫感を訴えた人を対象に，心電図を測定したが，変化はみられなかったと，更に Stegink I.D.[7]は，授乳中の母親に MSG を投与し，母乳，尿および血清中のアミノ酸をしらべ，その結果母乳中ではグルタミン酸濃度は変化ないが，アスパラギン酸，アラニンの濃度は上昇を示し，また血清中ではグルタミン酸，アスパラギン酸濃度が一過性の上昇を示したが，尿中では変化がみられなかった——等あるが詳細な報告はなされていない。そこで本報では，CRS発症機構の解明の第一段階として，健康な成年男子に対して空腹時 MSG を 3g/man または 83mg/kg-Body Weight を水と共に服用させ，血清中および尿中の生体成分すなわち，遊離アミノ酸，グルタミン酸の代謝に関与する各種酵素，含窒素態，無機電解質，コリンエステラーゼ活性，血糖，更に脂質代謝に関与する β-リポ蛋白およびコレステロール等について，経過時間毎の変動を測定した。なお測定方法は主としてオートアナライザーを用い，遊離アミノ酸についてはアミノ酸分析機を用い定量をおこなった。

実 験 の 部

1　被験者の選定

健康な成年男子を対称とし，実験 I では MSG 3gを摂取したとき，確実に CRS の症状を訴える人（年令27才，体重50kg）および訴えない人（年令28才，体重80kg）の各１名を選び，また実験 II，III でも同様の症状を訴える人および訴えない人を対称に実施した。

2　投与法および投与量

MSG（試薬特級，柱状晶）を水200m*l* と共に服用させ，投与時間は朝食後少なくとも２時間以上経過した時点で実施した。投与量は実験 I では 3g/man，実験 II，III では 83mg/kg-Body Weight を投与した。

3　採血および採尿

一定時間毎に実験 I では投与前，投与後30分および105分，実験 II，III では投与前，投与後20分，40分，60分および120分に採血を肘静脈よりおこなった。採尿は採血したのち，直ちに，各時間毎におこなった。

4　測 定 法

①　遊離アミノ酸

㋑血液——血清５m*l*を取り，１％ピクリン酸溶液25m*l* を加え数分間振盪したのち，3000r.p.m. で10分間遠心分離し上澄液を取り採出する。次いで Dowex 2×8 Cl^- 型樹脂をつめたカラムに流し，更に0.02NHCl 3 m*l* で３回カラムを洗滌し，洗液は前の流出液と一緒にし，ロータリーエバポレーターで約0.5m*l* となるまで濃縮し1 NNaOH を加えpH７～８とした後，４時間放置する。その後1 NHCl を加えpH ２とし，更に pH2.2のクエン酸緩衝液を加え５m*l* とし，これを試験溶液とする。

㋺尿——尿10m*l*を取り２NNaOHでpH12としデシケーター中で吸引しながら数時間放置し，アンモニアを除去したのち，６NHClでpH２とし，更にpH2.2のクエン酸緩衝液で10m*l*とし試験溶液とする。

以上の試験溶液を KLA—３B 型日立アミノ酸分析計に注入し，塩基性および中酸性アミノ酸を測定した。

②　オートアナライザー——血清および尿

尿素態窒素——Diaceyl monoxime 法

クレアチニン——百瀬法

アルカリフォスファターゼ—Kind-King 法

コリンエステラーゼ——△pH

GOT, GPT——Karmen 法

血　糖——Hoffman 法

カルシウム——Cresolphthalein complex 法

リ　ン——Youngberg 法

③　ナトリウム，カリウム——血清および尿

炎光分析法

④　塩素イオン——血清および尿

イオン電極法

⑤ マグネシウム——血清および尿

マンダイ法

⑥ 蛋白分画——血清

電気泳動（(Beakman microzone electrophoresis), セルロースアセテート膜を使用し測定。

⑦ 総蛋白質——血清

屈析法

⑧ β-リポ蛋白質——血清

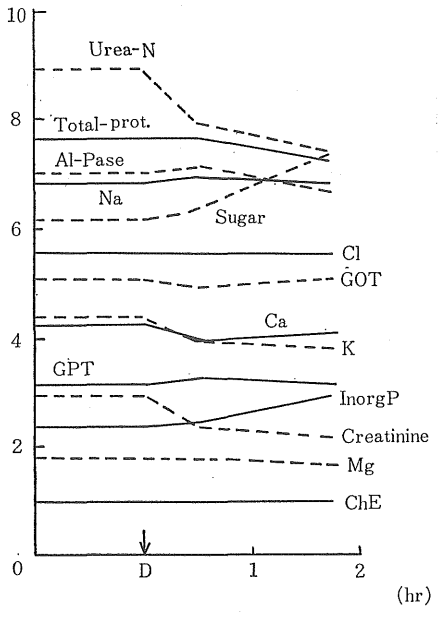
免疫化学的方法

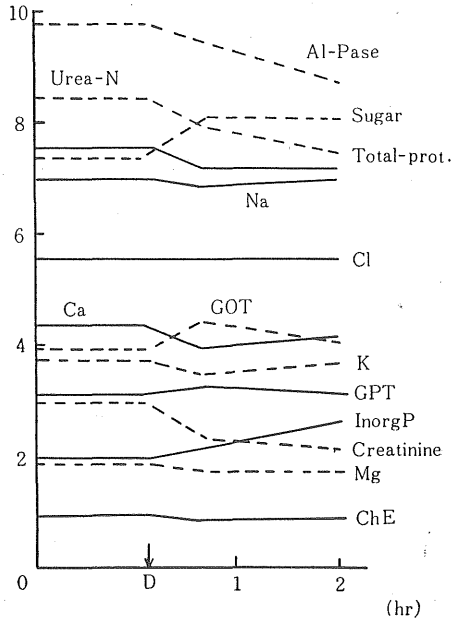
⑨ 総コレステロール——血清

Zak-Henly 法

結果と考察

実験をはじめるにあたり MSG 投与に伴ない生体成分の全体の変動の傾向をとらえるために，実験 I をおこなった。第一報で報告した事故品の結び昆布や MSG 3 g/man の服用で確実に CRS の症状を訴える人（以下 Symptom ⊕という）と訴えない人（以下 Symptom ⊖という）の各1名づつを対称に，MSG 3 g/man を水と共に服用させ，投与前，投与後30分および105分後に各々血液および尿を採取し，次のような生体成分を測定した。Fig 1，3および4は血清中の成分の変動を示し，Fig 2 は尿中の変動を示し，Fig 3，4は MSG 投与前の測定値を基準に投与後の変動を比で表わした図であり，これらは多量の MSG 投与により，尿素態窒素，蛋白類，クレアチニンへの変換がおこなわれているか，グルタミン酸の代謝に関与する GOT，GPT 等の酵素の変化があるか，また多量のMSG投与に伴ないナトリウムが多量に取り込まれるため無機電解質に変動があるかどうか，糖代謝に異常を来たさないか，CRS症状がアセチルコリン中毒症に似ているところからコリンエステラーゼ活性が阻害されていないか，更に遊離アミノ酸の変動等について測定し比較した結果である。Fig 1 より Symptom ⊕と⊖の両者間を比較すると，特に血糖値の上昇の型と GOT の型





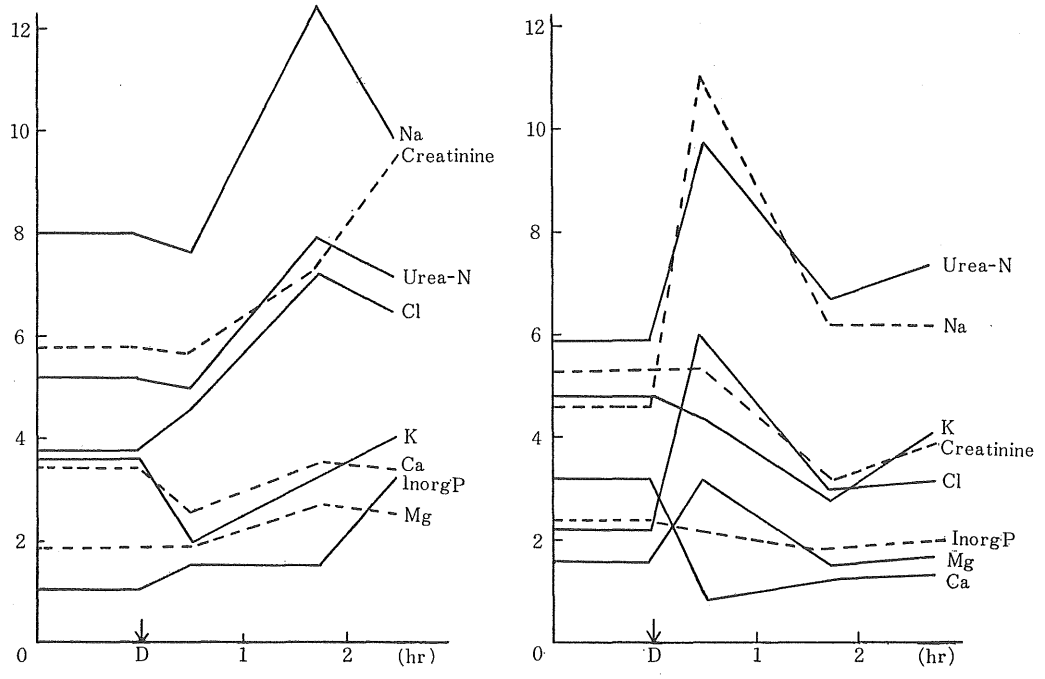
Symptom（+）: Age 27, B. W. 50kg　　Symptom（−）: Age 28, B.W. 80kg

Fig 1 Experiment I: Variation of Biochemical components in Serum after oral administration of MSG 3g/man.

D : Dose

Unit : Na, Ca, Mg, Cl (1/20 Scal), K ····· mEq/1
P, Urea-N (1/2 Scal), Creatinine (2x Scal), Suger ····· mg/dl
Al-Pase (1/2 Scal) ····· K.A.U.
GOT, GPT (1/10 Scal) ····· Kar.U.
Total-Protein ····· g/dl
ChE ····· △pH

に差違が認められ，血糖値は Symptom ⊕の人では上昇の一途をたどり，Symptom ⊖ の人では，30分後に平衡に達し，それ以上の濃度への上昇はみられなく，オキザロ酢酸への transamination が活発におこなわれている様相がうかがわれる。この他にもいくつか変動はみられるが Symptom ⊕，⊖の両者間では大きな差はなく，またいずれも生理学的変動の範囲を越えることはなかった。



Symptom (+): Age 27, B. W. 50kg　　Symptom (−): Age 28, B. W. 80kg

Fig 2 Experiment I: Variation of Biochemical components in Urine after oral administration of MSG 3g/man.

D : Dose

Unit : Na, Ca, Mg, Cl (1/20 Scal) ..... mEq/l

Inorg. P, Urea-N, Creatinine (2x Scal)..... mg/dl

K ..... mEq/l

血液の採取と同時に採尿をおこない，無機電解質，クレアチニンおよび尿素態窒素について調べた。その結果を Fig 2 に示したが，Symptom ⊕ の人と ⊖の人両者間の変動型に差異が認められ，各成分の排泄のピークの出現に時間的なずれが生じており，Symptom⊕の人では1時間45分と遅く，Symptom⊖の人では非常に早く30分後にピークが現われており，その代謝の速度に違いがあることが認められた。Fig 3 は遊離アミノ酸について示した図で，血清中の グルタミン酸 (Glu.)，アスパラギン酸(Asp.) およびアラニン(Ala.) において特に変動がみられたが，他のアミノ酸の変化はみられなかった。図のように，Glu. では特に投与後30分の時点で Symptom ⊕の人に 4 倍の上昇がみられたが，Symptom ⊖ の人ではこのような変化はみられなかった。Fig 4 は血清蛋白質の変動について示した図であるが，両者間に差はなくまたこれらの変動は生理学的変動の範囲内にあることを示した。

以上のような実験 I の結果より Symptom ⊕および⊖の人の両者間に Glu. の代謝能力の差があるように思われ，更に CRS の発症に関連があるように考察された。そこでこれら実験結果をもとにして，更に詳しく知るために次の実験をおこなった。初めに血液中の Glu. 濃度と CRS の症状を訴える人および訴えない人との間に実験 I でみられたような差があるかについて Symptom ⊕および⊖の人を各々2人づつを選び，実験 I の時と同一条件下で，MSG 83mg/kg を服用させ

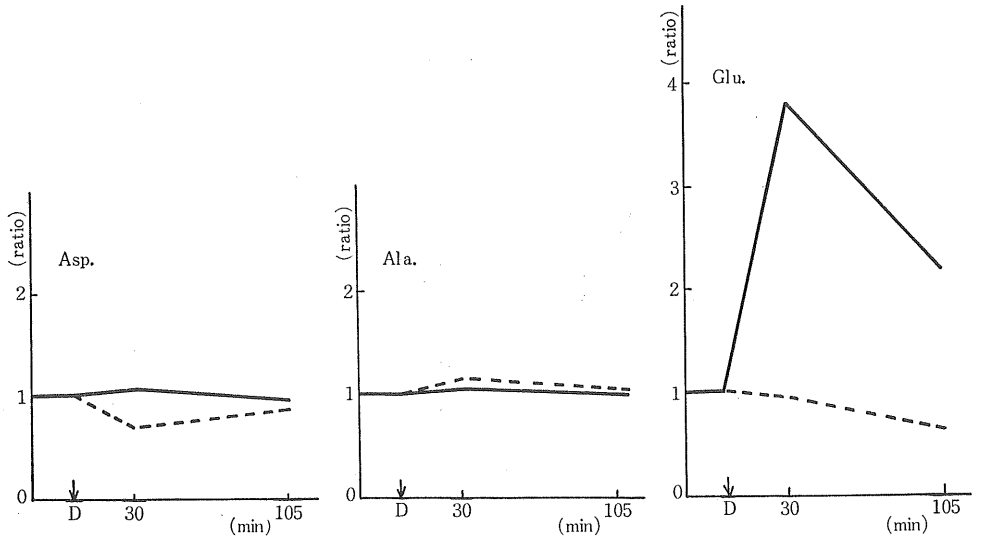


Fig 3 Experiment I: Variation of free Amino acid in Serum after oral administration of MSG 3g/man.

D : Dose

Subject : ——— Symptom (+) : Age 27, B. W. 50kg

---- Symptom (−) : Age 28, B. W. 80kg

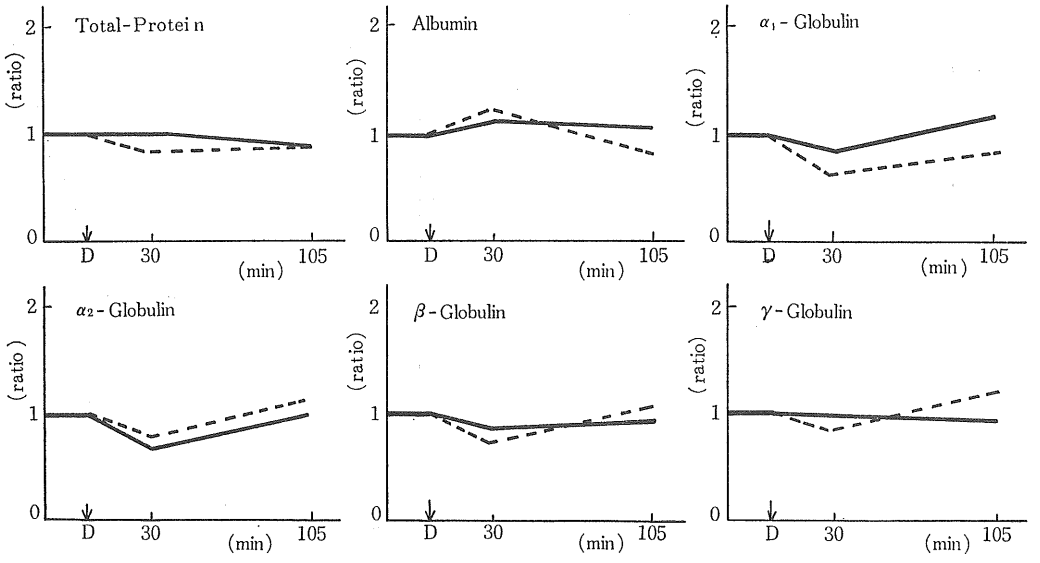


Fig 4 Experiment I: Variation of individual Protein in Serum after oral administration of MSG 3g/man.

D : Dose

Subject : ——— Symptom (+) : Age 27, B. W. 50kg

---- Symptom (−) : Age 28, B. W. 80kg

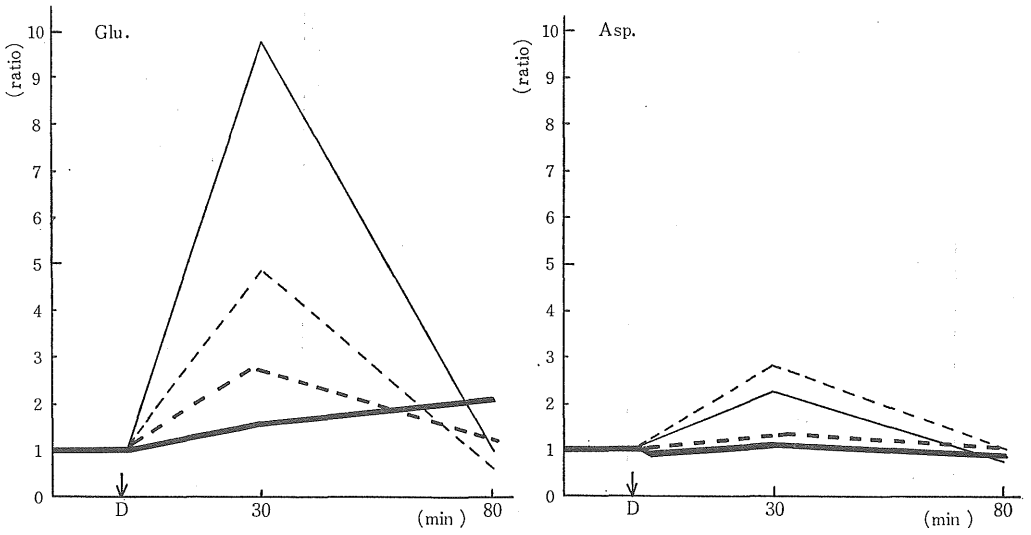


Fig 5 Experiment II: Variation of Glutamate (Glu.) and Aspartate (Asp.) in Serum after oral administration of MSG 83mg/kg.

D : Dose

Subject : ▬▬ Symptom (+), ····· Symrom (−)

—— Symptom (+), - - - - Symrom (−)

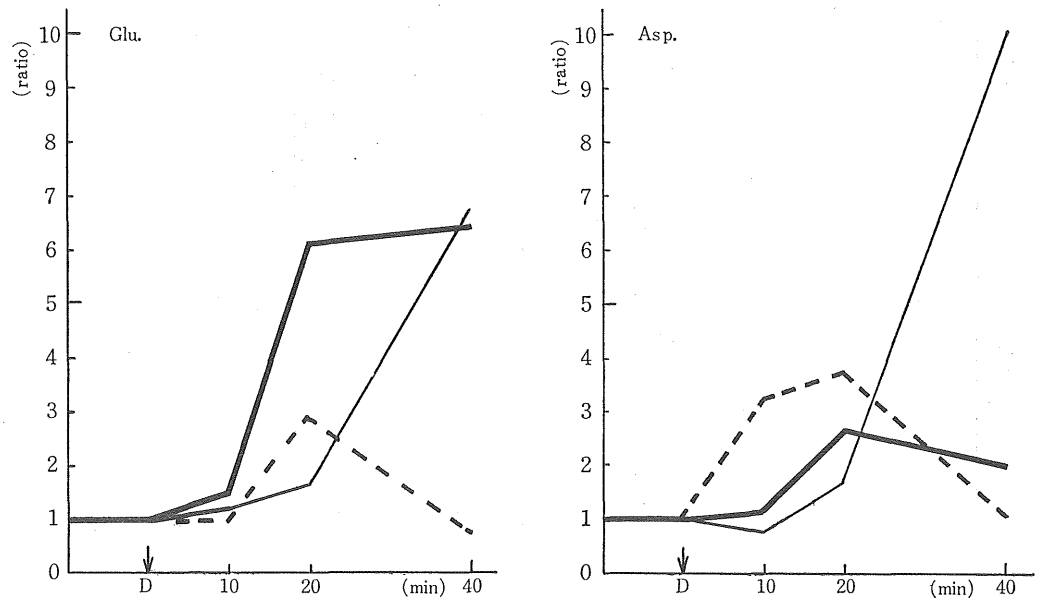


Fig 6 Experiment II: Variation of Glutamate (Glu.) and Aspartate (Asp.) in Serum after oral administration of MSG 83mg/kg.

D : Dose

Subject : ▬▬ Symptom (+), - - - - Symptom (−)

—— Symptom (+)

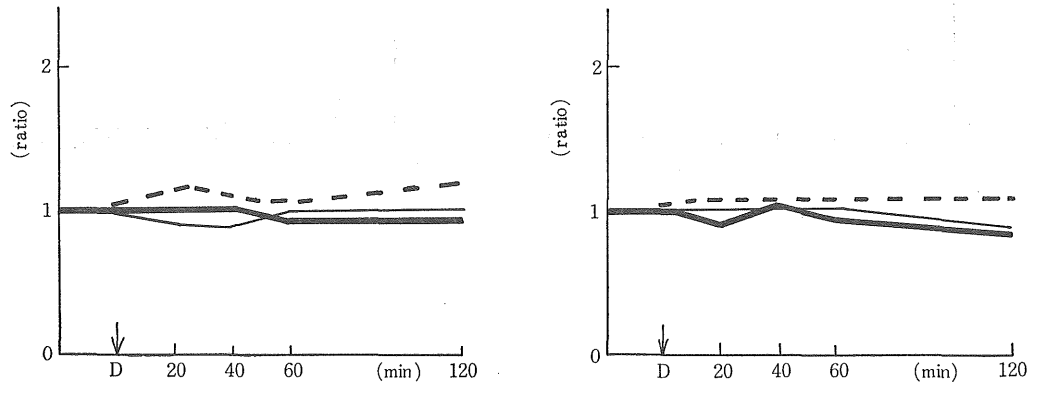
た。その結果 Fig 5 に示すように Symptom ⊕および⊖の人のいずれも投与後 Glu. 濃度は可成りの上昇がみられ，そのピークは30分前後にあり，Symptom ⊕の太い実線の人を除き投与後80分に投与前の値にもどった。なおこの太い実線の人は，その後頭痛を訴え午後8時過ぎまで残っていたため頭痛薬（アスピリン）を服用したが効果はなかったが，翌日には回復したという報告があった。この図にみられるように，血清中の Glu. の濃度は Symptom ⊕ の人で1.5～10倍，Symptom ⊖の人でも2.5～5倍と上昇をしめしている。Mushawar I. K.[8] は一時的なグルタミン酸濃度の増加による陰イオン濃度のバランスのくずれにより，CRS を発症するという説を報告しているが，今回の結果から Symptom ⊕，⊖のいずれの人も可成りのグルタミン酸濃度の増加をしめしているため，その増加が直接 CRS の要因になっているとは思われない。なおアスパラギン酸の増加は，グルタミン酸の transamination による当然の変動である。

一般に，CRS の発症は MSG 摂取後約15～30分後に起っているため，アミノ酸の変動ピークもまた30分より以前に存在する可能性があるため，採血時間の間隔を投与後10分，20分，40分と短かく置き調べてみた。Fig 6 に示すように Symptom ⊖の人では Glu. 濃度のピークは20分前後にあるが，Symptom ⊕の人ではそれより遅いことが認められる。これらの結果より，血清中のグルタミン酸の濃度上昇は実験Ⅰの結果と同様 CRS 症状の直接原因ではないが，Glu. 濃度ピークの表われ型に差があり，これは代謝能力に差があると思われその能力の低い人に CRS 症状が表われると考えられる。

我々は当初 CRS の症状からコリンエステラーゼ活性阻害を予想し，また1971年 Ghadimi H.[9] は，MSG 投与後一過性の血清コリンエステラーゼ活性阻害が認められたと報告していることから，実験Ⅰではその変動は認められなかったが更に追試をおこなった。

Symptom ⊕の人を3名選び，実験Ⅰと同様の条件下で，83mg/kg の MSG を服用させ，投与前，投与後20分，40分，60分および120分毎に各々採血し，更に他日 MSG 投与の代わりに水を飲ませ同様の条件のもとで採血をして，その両者について比較した。その結果3名共可成り強い CRS 症状を訴えたにもかかわらず，Fig 7 に示すようにコリンエステラーゼ活性阻害は認められなかった，従って，Ghadimi のいうように CRS の発症はアセチルコリン中毒症ということであれば，コリンエステラーゼ活性に関係なく，アセチルコリンまたはアセチルコリン様物質の過剰蓄積によることが有力であろう。

実験Ⅰで変動のみられた GOT，他に GPT，アルカリフォスファターゼについて，また，Creasey W.A.[10] は glucose uptake に CRS 発症が関連していると報告しているため血糖について，更に Kwok R.H.[11] は高濃度のナトリウムによる一時的過ナトリウム症によると推定していることから無機電解質の変動についても実験をおこなった。Fig 8 に示すように実験Ⅰで変動のみられた GOT の動きは平常時に比べ差はなく，これら変動は CRS の発症に関係なく，個人差にあると



Oral administration of MSG 83mg/kg　　Oral administration of Water

Fig 7　Experiment II: Variation of ChE activity in Serum.

D：Dose

Subject：Symptom（＋） 3 persons

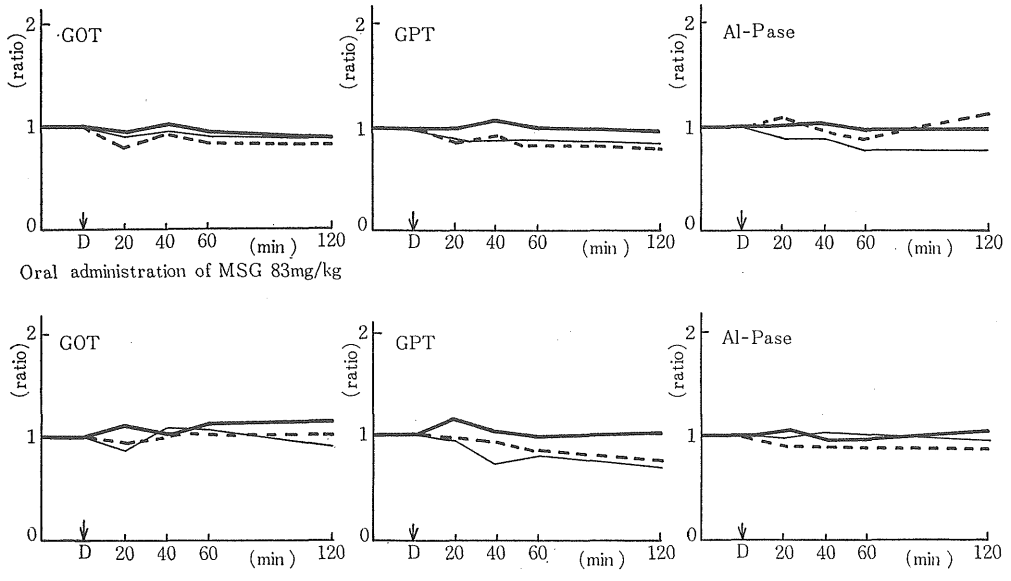


Fig 8 Experiment II: Variaton of Enzyme in Serum.

D : Dose

Subject : Symptom (+) 3 persons

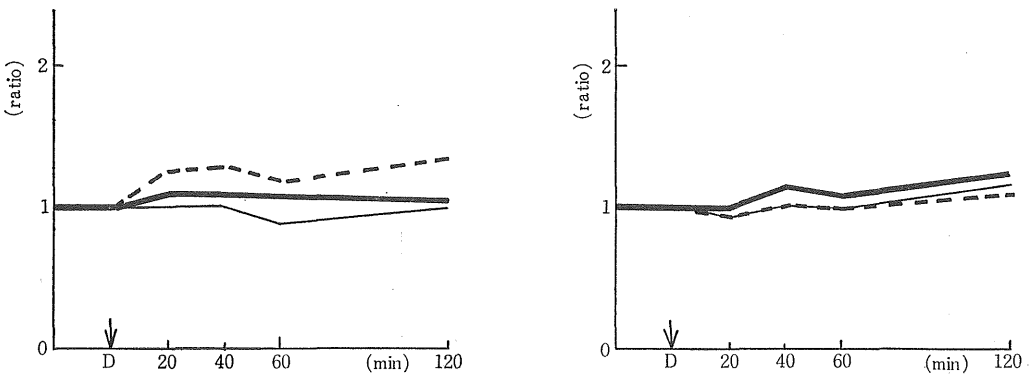


Fig 9 Experiment II : Variation of Blood Sugar.

D : Dose

Sbject : Symptom (+) 3 persons

考えられる。Fig 9 は血糖の変動を捕えた図であるが，MSG投与の結果，3名中1名に上昇が著しく表われたが，これは代謝過程の表われであると考えられCRSとの関連性は認められない。Fig10，11は無機電解質すなわちナトリウム，カリウム，リン，カルシウム，塩素イオンについて変化を調べ平常時と比較した図であるが可成りの量のナトリウムが摂取されているにもかかわらずコントロールと比較して有意な変動はみられなかった。最後に被験者を変えて Symptom ⊕の2名および Symptom ⊖の1名について，血清コレステロールおよび β-リポ蛋白質について調べた結果，Fig12 に示すように Symptom ⊕の人にわずかに減少

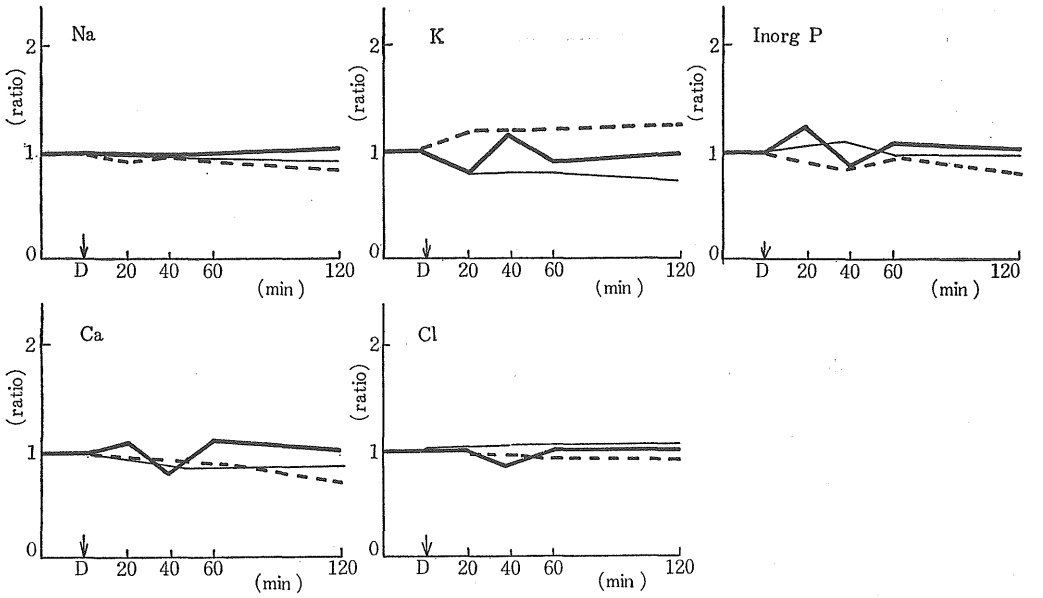


Fig 10 Experiment II Variation of Inorganic components in Serum after oral administration of MSG 83mg/kg.

D : Dose

Subject : Symptom (+) 3 persons

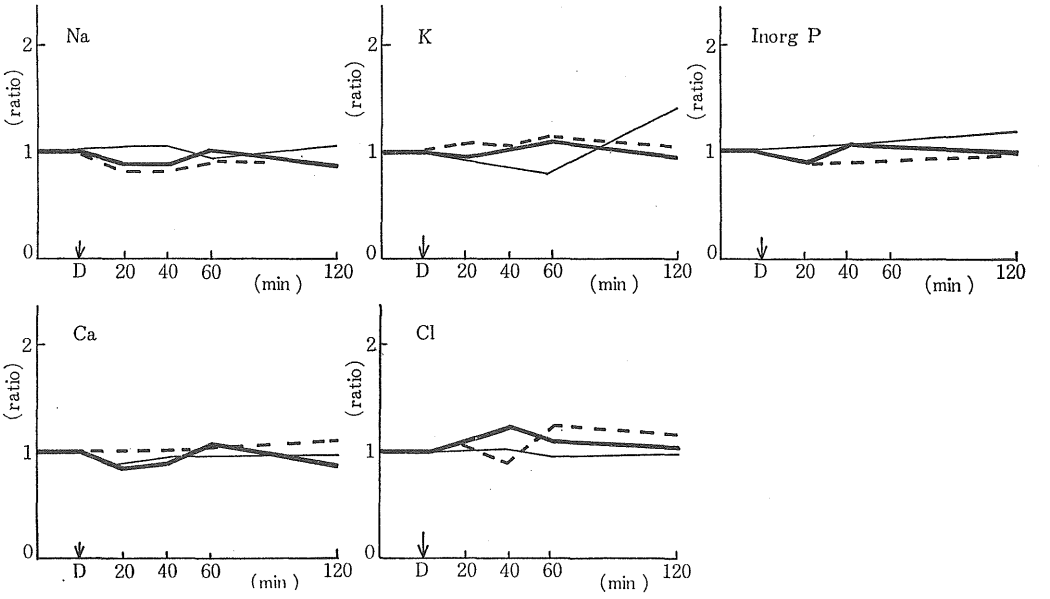
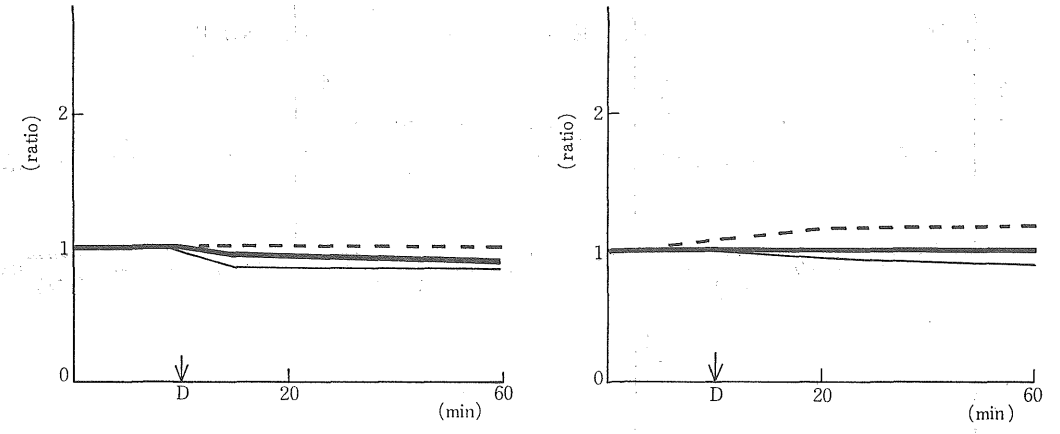


Fig 11 Experiment II Variation of Inorganic components in Serum after oral administration of Water.

D : Dose

Subject : Symptom (+) 3 persons



Oral administration of MSG 83mg/kg　　Oral administration of Water

Fig 12 Experiment III Variation of T-Cholesterol and β-Lipoprotein in Serum.

D : Dese

Subject : ▬▬ Symptom (+), ——— Symptom (+)

·---- Symptom (−)

の傾向はみられたが特に CRS 発症に関連はないと考えられる。

以上のほか，ヘマトクリット，ヘモグロビン，白血球，赤血球，血圧，脈搏などについて調べたが変動は認められなく，CRS発症との関連性もまた認められなかった。

なお，尿中の各種成分の変動については，実験Ⅱで1時間当りの排泄量として，実験Ⅰでおこなった成分について換算すると，短時間間隔に採尿をおこなったため，尿量が一定とならないためかコントロールのバラツキが大きく，比較検討が困難であった。また，尿中の遊離アミノ酸にはグルタミン酸およびアスパラギン酸の排泄は認められなかった。

ま と め

今回の調査結果より MSG 多量経口投与により，血液中の遊離アミノ酸，特にグルタミン酸の濃度は一過性の増加をしめし，Symptom ⊕の人で 1.5～10 倍，⊖の人で 2.5～5 倍といずれも増加しているが，CRS 発症の原因と直接関連性はないと考えられ，またそのほかの今回調査した成分についても同様に関連性はないと考えられる。しかしながら個人個人の MSG の代謝能力の差が CRS 発症の原因に何らかの形で関連があると考えられるため，代謝に関係する補酵素やコファクター，更に神経伝達物質の遊離や蓄積に関して検討する必要が認められ，また群馬大の田所等[12]は行動薬理的立場から，MSG 多量投与時のマウスの動きを行動薬理的に捕え中枢神経系に作用する薬品を併用させた結果，それが中枢神経に影響をおよぼしていると推定している。そこでわれわれは引き続いてアセチルコリン，セロトニン，遊離ヒスタミン等が生体内で遊離され CRS を誘発すると推定し，これらについて検討を現在おこなっている。

謝　辞

この調査にあたり，いろいろご指導を賜わり更にオートアナライザーの使用などにご便宜をはかっていただきました東京逓信病院の大森昭三博士に深く感謝いたします。

なお，本報は第25回日本食品衛生学会に発表したものである。

文　献

1）西垣　進，田村行弘，山田　洋，鳥羽啓子，嶋村保洋，木村康夫：東京都立衛生研究所　研究年報，*23*，205，(1971)

2）西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田　洋，鳥羽啓子，嶋村保洋，木村康夫：Ibid.，*23*,211,(1971)

3）Rosenblum, I., Bradley, J. D. & Coulston, F. : Toxicol. Applied Pharmrcol., *18*, 367, (1971)

4) Marselli, P.L. & Garattini, S.
: Nature, *227*, 611, (1970)
5) Kenney, R. A. & Tidball, C.S.
: America J. Clinical Nutr., *25*, 140, (1972)
6) Schaumburg, H. H., Byck, R., Gerstl, R. & Mashman, J. H. : Science, *163*, 826, (1969)
7) Stegink, L. D., Filer, L.J., JR., & Baker, G. L.
: Proc. So. Exp. Med. Biol., *140*, 836, (1972)
8) Mushawar, I. K. & Koeppe, R.E.
: Biochem. Biophys. Acta., *244*, 318, (1971)
9) Ghadimi, I. & Kumar, S.
: Biochem. Med., *5*, 447, (1971)
10) Creasey, W. A. & Malawista, S. E.
: Biochem. Phamacol., *20*, 2917, (1971)
11) Kwork, R. H. M.
: New Eng. J. Med., *278*, 796, (1968)
12) 田所作太郎, 樋口洋一郎
: 第48回 日本薬理学会関東部会講演要旨(1973)

DDTC-MIBK 抽出を利用する重金属の原子吸光同時分析法の検討（第Ⅰ報）

多量のカルシウムおよびリンを含む食品中からのクロム分析について

西垣　進*　田村行弘*　真木俊夫*
山田　洋*　鳥羽啓子*　嶋村保洋*
木村康夫*

DDTC-MIBK EXTRACTION SYSTEM FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF HEAVY METALS IN FOODS BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY (I)

ANALYSIS OF CHROMIUM IN FOODS CONTAINING A LARGE AMOUNT OF CALCIUM AND PHOSPHATE

Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

In heavy metal contamination of foods, there should be considered contamination not only a single metal but multiple metals. When quantitatively determining heavy metals in foods, simultaneous determination of metals is desirable, but there has been no report on atomic absorption spectrophtometry applied to foods containing highly toxic 6-valent chromium in DDTC-MIBK method.

Many foods contain much calcium and phosphate, which disturb greatly the analysis of chromium: however, chromium can be determined by using ammonium persulfate.

The results obtained were as follows:

1) Chromium can be sufficiently oxidized with ammonium persulfate at pH4, though much calcium and phosphate are contained.
2) As the pH range is so narrow for MIBK extraction of Cr-DDTC complex that pH should be adjusted with a buffer solution.
3) There is obtained a calibration curve of chromium which is linear to 3ppm through the 0 point. The detection limit is 0.01ppm.
4) Up to 1000μg of iron or tin does not affect the analysis of chromium.

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

1 緒 言

近年，種々の食品の微量金属元素による汚染が問題となっている。

これらの汚染金属を単一に取り上げたデーターや，各種食品中の天然保有量の調査でも元素により別々の方法で分析された資料が多い。[1)~4)] こうした調査をおこなうに当り，多くの金属元素の同時分析をおこなうことは，金属元素の生体に対する影響を考える場合，[5)~8)] 複合汚染による影響も考慮しなければならない時点に来ている。また，ルーチン分析を行う場合，手間や分析時間の短縮のために一斉分析が望まれる。これら，超微量分析を必要とするものが多く，直接水溶液での原子吸光法では感度が悪く[9)]，ナトリウム等の食品中に多く含まれる元素の干渉により標準添加法で定量しなければならないので手数がかかる。従ってこれらの分析上の問題点を考慮して有機溶媒抽出—原子吸光法が多く用いられている。[10)~13)] その中でもDDTC-MIBK 法が衛生試験法にも採用され，一番多く使われているが，食品中からのクロム，その他重金属同時分析法についての報告が見られない。

そこで我々は DDTC-MIBK 法で Cd, Pb, Cu, Zn, Co の金属元素と同時に Cr も定量できる方法について検討し，食品中に多く含まれるカルシウム，リンの影響をうけずに分析できる方法を確立し，併せて食品中のクロム含有量の調査した一部について報告する。

2 実験法

2・1 装 置

パーキンエルマー社製403型原子吸光分光光度計を用いた。光源には各々の金属単一中空陰極ランプを，又，バーナーには長さ10cm のスリースロットバーナーを用い，空気—アセチレンフレームにより測定を行った。

pH は日立—堀場 M-5型 ガラス電極 pH メーターによって測定した。

抽出実験にはスキーブ型分液漏斗を用い，イワキ製シェーカーで振り混ぜて抽出した。

2・2 試 薬

クロム（VI）標準溶液：和光純薬製の標準試薬重クロム酸カリウム 2.828g をイオン交換蒸留水（以下蒸留水とする）に溶かし 1 l とし標準原液とする。（Cr（VI）として 1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して 1 ml 中 10μg Cr（VI）を含有する液を調製する。

カドミウム標準溶液：和光純薬製金属カドミウム 99.999％100mg を希硝酸に温時溶かし蒸留水で100ml とし，これを標準原液とする。（Cd として 1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して 1 ml 中 10μgCd を含有する液を調製する。

鉛標準溶液：金属鉛 99.996％ British Chemical Standard 製 100 mg を希硝酸に溶かし蒸留水で 100 ml とし，これを標準原液とする。（Pb として 1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して 1 ml 中 10μgPb を含有する液を調製する。

銅標準溶液：金属銅 99.95％ British Chemical Standard 製 100mg を希硝酸に溶かし，蒸留水で 100ml とし，これを標準原液とする。（Cu として 1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して 1 ml 中 10μgCu を含有する液を調製する。

亜鉛標準溶液：金属亜鉛 99.9％ 和光純薬製 100mg を希硝酸に溶かし蒸留水で 100ml とし，これを標準原液とする。（Zn として1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して1 ml 中 10μgZn を含有する液を調製する。

コバルト標準溶液：コバルト粉末99％，和光純薬製 100mg を希硝酸に温時とかし蒸留水で100ml とし，これを標準原液とする。（Co として 1000ppm）この原液を蒸留水で希釈して1 ml 中 10μgCo を含有する液を調製する。

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）液：和光純薬特級試薬 DDTC 2 g を蒸留水にとかし 100ml とする。この溶液は用時調製する。

メチルイソブチルケトン（MIBK）：和光純薬特級品をそのまま用いた。

過硫酸アンモニウ溶液：和光純薬特級品，過硫酸アンモニウム 5 g を蒸留水にとかし100ml とする（5％）

酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液：1 M-氷酢酸（和光純薬特級品）5.9ml と 1 M-酢酸ナトリウム（和光純薬特級品）14.1ml を加え混ぜて pH メーターで pH 5 に調製する。

2・3 定量操作

試料 5 ～10g をパイレックスビーカーに精秤し，赤外ランプで炭化電気炉（500°C）で一昼夜灰化する。灰化不十分の場合，2 N- 硝酸 5 ml で潤し，ガラス棒でつぶし，赤外ランプ下で乾固したのち再び電気炉で灰化を進める。灰化後，2 N-硝酸 10ml で 1 時間温とう放置する。次に 5 ％-過硫酸アンモニウム液 1 ml を加え SSG アンモニア水（1→2）で pH 4 に調製，直ちに時計皿でふたをして15分間沸騰水浴上で酸化を進める。酸化終了後，放冷して 100ml のスキーブ型分液漏斗に移し，約40～50ml の蒸留水を数回に分け

てビーカー中を洗い，洗液を分液漏斗に合わせ，1 M-酢酸，酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0液 5 m*l* を加え全量を60m*l* にする。2 %DDTC 液 5 m*l* を加えて 5 分間放置，MIBK 10.0m*l* を加え，3 分間振とう抽出し，静置後，MIBK 層を分離，原子吸光用検液とする。同様にして空試験液をつくる。

3 実験結果および考察

3·1 測定条件

各種重金属の波長，スリット幅，バーナーの位置，空気およびアセチレン流量は table 1 の通りである。

Table 1. Instrument Settings for Determination of Heavy Metals

Element	Wave length Å	Lamp Current mA	Slit Width	Acetyl eneflow rate (l/min)	Air flow rate (l/min)	Burner height (cm)
Cr	3579	25	3	2	8	1.8
Cd	2288	8	4	2	8	1.8
Pb	2833	35	4	2	8	1.8
Cu	3247	20	5	2	8	1.8
Zn	2139	15	5	2	8	1.8
Co	2407	20	5	2	8	1.8

3·2 錯体の生成および抽出に対するクロムの酸化条件の検討

Cr (III) は置換不活性金属として最もよく知られている。Cr (III) は水との親和力が強く容易に他の配位子と置換しない。不活性な六水和物 $Cr(H_2O)_6^{3+}$ は普通の条件で DDTC と反応しないか，遅いのはこのためと思われる。[14)~17)]

Taube の置換反応理論によると配位子の置換され易さは中心金属イオンの電子数（d 電子が Cr(III) の場合，$d^1d^1d^1d^2sp^3$ の混成軌道をとるため空の d 電子がないので，不活性化を呼び起こしている）に左右される。[18)]

Cr (VI) の電子配列は Cr (III) のそれから 3 本の d 電子スピンを失い，$d^0d^0d^0d^2sp^3$ の活性化の形になり，反応性が起こると思われる。

そこで Cr (III) から Cr (VI) への酸化条件，Cr(VI)-DDTC 錯体を MIBK に抽出する pH 等について検討を行った。

3·2·1 pH の影響

Cr (VI) と DDTC の反応や生成錯体の MIBK 抽出の最適 pH 域を知るため，抽出された錯体のクロムと pH の関係を調べたところ，Fig. 1 に示すとおり pH 4～6 の範囲で最大かつ一定値を示した。

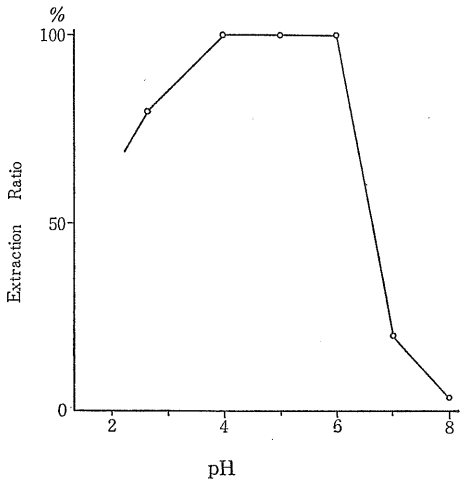


Fig. 1 pH Dependence of Extraction of Cr (VI) from DDTC-MIBK System.

3·2·2 クロムの酸化条件

Cr (III) は DDTC と錯体形成がされにくく，MIBK に抽出されないために，適当な酸化剤で Cr (VI) に酸化したのち，DDTC-MIBK 抽出を行わなければならない。

我々は過硫酸アンモニウム酸化剤による Cr (III) 酸化率と pH の関係を調べたところ Fig. 2 に示す通り pH 5 迄は十分酸化が進んだ。しかし pH 5 よりアルカリ性側ではクロムの水の配位子が取れて水酸化物を形成する為[19)] 酸化に困難さをきたした。以後 pH 4 で酸化を行った。

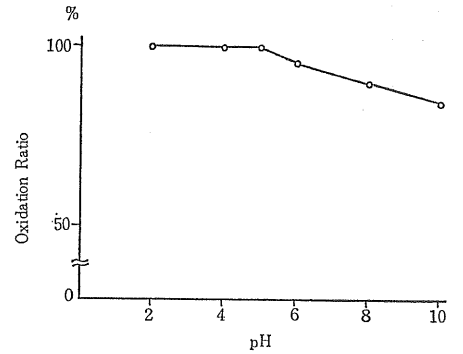


Fig. 2 Relation Between Cr (III) Oxidation Ratio by Ammonium Persulfate and pH

3·2·3 過硫酸アンモニウム濃度とクロム (III) 酸化率の関係

pH 4 における酸化と酸化剤濃度の関係は Fig. 3 に示す通りで 1 %以上では一定値を示したので以後 5 %

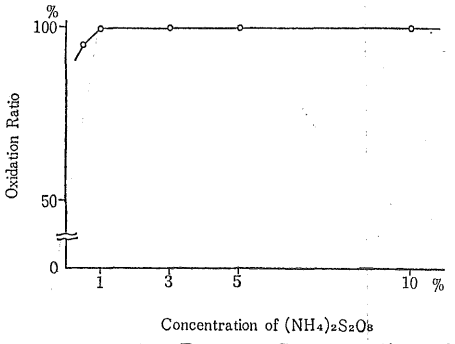


Fig. 3 Relation Between Concentration of $(NH_4)_2S_2O_8$ and Cr (III) Oxidation Ratio.

を用いる事にした。これは，Cr (III) 5000 μg 迄酸化させる事ができた。

3·2·4 酸化加熱時間とクロム (III) 酸化率の関係

Cr (III) 10μg を含む水溶液にアンモニア水(1→2)で pH 4 に調製，5 %過硫酸アンモニウム 1 ml を加え，沸騰水浴上で 5，10，15，30，60，100分加熱酸化を

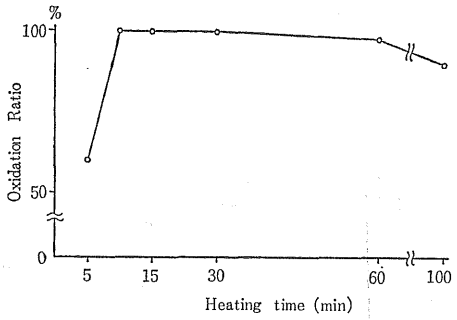


Fig. 4 Relation Between Heating Time for Oxidation and Cr (III) Oxidation Ratio.

行ったところ，Fig. 4 のように10分より一定の酸化率を示した。長時間の加熱は恐らく溶液中の pH 変動による酸化低下をきたしたと思われる。そこで酸化加熱時間は15分間と決めた。

3·3 カルシウムおよびリン共存中のクロム (III) 酸化率とリン酸カルシウム沈殿の pH 関係

一般に食品には 0.01%～0.6% のカルシウム，0.01%～0.5% のリンを含有するので，それらの水溶液において pH 5 よりアルカリ性側では白濁から白沈を生じて来る。この段階でクロム酸化を進めると Fig. 5 に示す様にクロム酸化率とリン酸カルシウム沈殿生成率の関係は対称形のグラフが描けるため，アルカリ性酸化は不都合であり，Ca，P の存在する場合は，過酸化

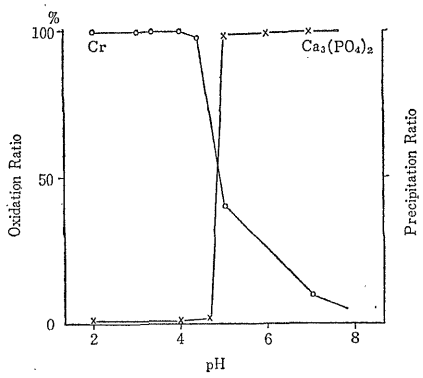


Fig. 5 Relation Between Cr (III) Oxidation Ratio and $Ca_3(PO_4)_2$ Precipitation in the Preence of Ca, PO_4 at Various pH.

水素水酸化は用いられない。従って実際検体の場合，pH 5 以下で酸化を進める酸性酸化剤が必要であった。又酸性過マンガン酸カリ溶液酸化は Mn イオン-DDTC 錯体を作るため検討から除外をした。[20]

3·4 クロム (VI) の定量範囲と検量線

以上の検討の結果をもとにして Cr (VI) の定量条件を 2·3 の様に定め，Cr (VI) 濃度と抽出錯体のクロムの吸光度との関係を調べたところ，Fig. 6 に示す様に検量線は 0～3.0μg Cr/ml において原点を通る直線

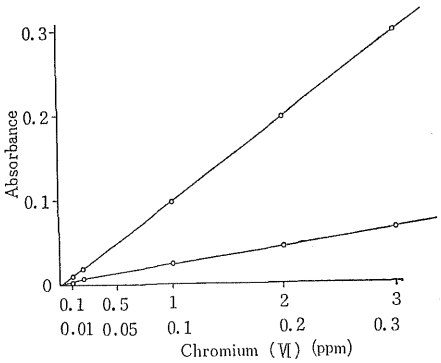


Fig. 6 Calibration Curves of Cr (VI)-DDTC Complex.

関係が得られた。

検出限界は 0.01μg/ml であった。

3·5 MIBK 抽出後のクロム (VI)-DDTC 錯体の安定性

Cr (VI) DDTC 錯体の MIBK 抽出後の経時変化を調べたところ，Fig. 7 に示す様に 5 時間経過後も変動

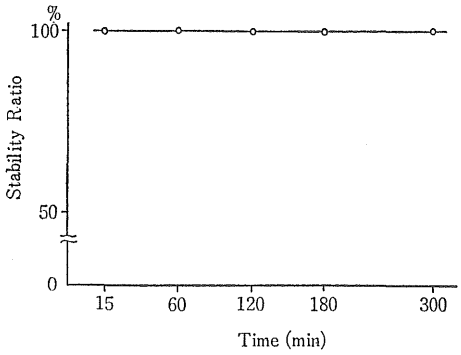


Fig. 7 Stability of Cr (VI)-DDTC Complex after Extracted with MIBK

がなかった。

3·6 各種重金属（カドミウム，鉛，銅，亜鉛，コバルト）の DDTC 錯体の MIBK 抽出 pH 域

各種金属が DDTC 錯体を作り MIBK に抽出される pH 域を調べたところ Fig. 8 に示す様にクロム (VI)

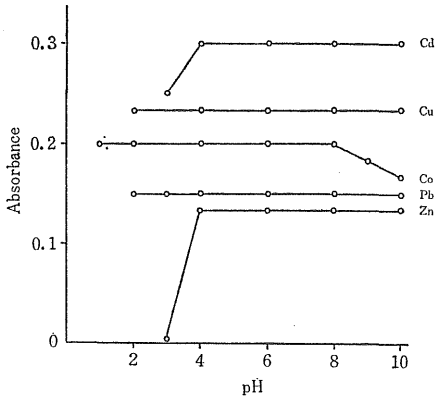


Fig. 8 pH Dependence of Extraction of Heavy Metals (Cd, Pb, Cu, Zn, Co) from DDTC-MIBK System.

を含めて各種重金属の DDTC 錯体を pH 5 において同時定量分析法が可能であった。

3·7 共存オンの影響

食品中に多量混入してくる，鉄，スズ，食塩がクロム，その他各種重金属分析にどの様な干渉作用があるか検討を行った。[21)~23)] Cr (VI) 10μg のほか，各種重金属をそれぞれ添加してある試料に，Fe (III) 5，10，20，50，100，250，1000，2000μg を添加し，2·3の様に定量分析をしたところ Fig. 9 の様に 1000μg 迄は各種重金属の回収率に影響なかった。又缶詰食品にはスズが存在し，特にメタスズ酸による重金属吸着が考えられるため [24)~27)] Sn (II) の添加回収実験を行ったところ Fig.10 に示す様に 1000μg 迄は影響がなかった。

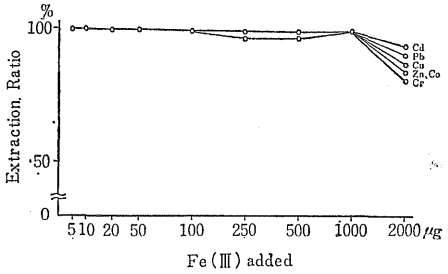


Fig. 9 Effect of Amount of Fe (III) on the Extraction Ratio of Heavy Metals.

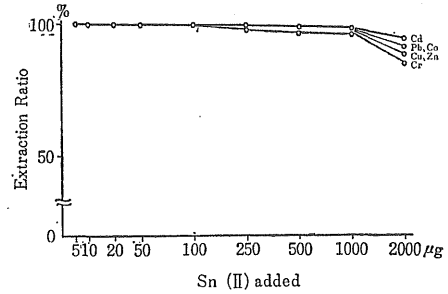


Fig. 10 Effect of Amount of Sn (II) on the Extraction Ratio of Heavy Metals.

又，加工食品には多量の食塩を含んでいるので NaCl の影響を調べた。Table 2 に示す通り，NaCl 3 g 迄は

Table 2. Effect of NaCl at the Oxidation of Cr (III)

Metal	NaCl Added	MIBK	Recovery
Cr(III)10μg	1g	10.0ml	98%
〃	3	〃	98
〃	5	〃	79
〃	10	〃	40

Cr (III) の酸化に影響がなかった。

4·1 食品中の添加回収実験

クロムおよびその他重金属 10μg を試料に添加し，2·3の操作に従い，回収実験を行ったところ，Table 3 に示す様に Cr 98～102%，Cd 96～102%，Pb 97%～101%，Cu 88～102%，Zn 98～121%，Co 95～103% の回収率を示した。

4·2 食品中の重金属同時定量分析結果

以上の結果より魚貝類，粉乳，牛乳，植物蛋白，

Table 3. Recovery of Heavy Metals in Foods

※ dryweight

Metal ions / Samples	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn	Co
Mackerel	98	97	98	102	113	99
Short-neck clam "fresh"	99	97	101	101	117	98
Arkshell "fresh"	98	97	98	101	118	95
Mirugai (clam)	101	100	97	101	115	96
"entrails"	102	102	98	101	110	103
Hen clam "fresh"	98	97	101	88	117	96
Milk powder	101	98	98	101	99	100
Milk (cow's)	100	100	97	90	98	100
Bacon	100	97	97	101	119	96
※Vegetable Protein	101	97	100	90	120	100
〃	100	102	97	100	120	102
Juice	99	96	97	94	120	100
Sake	101	100	100	100	118	97

10μg heavy metals was added to each samples

unit : %

のり，ジュース，酒等について分析をしたところ，Table 4 の様な結果が得られた。

Table 4. Trace Metals Concentration in Foods

※ dryweight

Metal ions / Samples	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn	Co
big-eye tuna	0.08	0.034	0.14	0.5	8.4	tr.
yellowfin tuna	0.12	0.012	0.19	1.1	6.1	0.06
blue marlin	0.11	0.015	0.12	0.4	7.3	tr.
Swordfish	0.07	0.022	0.24	0.3	11.3	0.13
Mockerel	0.05	0.072	0.44	1.5	7.5	0.04
Red sea-bream	0.08	0.020	0.14	0.5	2.6	tr.
Mackerel "fresh"	0.10	0.014	0.18	1.3	3.1	tr.
Jack mackerel "fresh"	0.10	0.028	0.41	0.9	3.4	tr.
Shiba-ebi	0.18	0.020	0.10	5.9	8.5	tr.
Yellowtail	0.10	0.014	0.36	0.8	3.6	tr.
Pacific saury	0.09	0.044	0.28	1.3	8.6	0.06
Short-neck clam "fresh"	0.51	0.063	0.84	1.5	30.8	0.14
Arkshell "fresh"	0.18	0.160	0.26	0.8	10.8	0.13
〃 entrails	0.30	1.011	0.20	1.4	23.2	0.20
Milshell	0.04	0.084	0.16	1.1	10.0	0.09
〃 entrails	0.63	0.300	0.12	4.5	18.6	0.31
Milk powder	tr.	tr.	0.08	0.5	8.4	tr.
Milk (cow's)	tr.	tr.	0.12	0.1	1.3	tr.
Bacon	0.02	0.075	0.20	0.4	20.0	tr.
※ Vegetable Protein	0.28	0.094	0.39	5.8	26.1	0.16
〃	0.24	0.114	0.55	4.5	33.2	0.09

tr. trace, unit : ppm

クロムの値は Gsell[3] らの値と大差なかった。

5 結 言

DDTC-MIBK 法を用い pH 5 で，過硫酸アンモニウムにより Ca，P の多量に存在する多くの食品中からこれらの影響を受けずに Cr (VI)，Cd (II)，Pb (II)，Cu (II)，Zn (II) および Co (II) を含めて同時抽出して測定出来る条件を決めた。

又 Fe, Sn について1000μg迄の共存は Cr (VI) その他重金属の定量に影響を与えなかった。NaCl の 3 g 迄の共存は過硫酸アンモニウム酸性酸化に影響を与えなかった。

本研究は第25回日本食品衛生学会（昭和48年 5 月，東京）において発表した。

文 献

1) 山本俊夫：日化，*81* (3)，388 (1960)
2) Gleen, H. Booth, J. and Dairby, W. J: Anal. Chem., *43* (7)，831 (1971)
3) Grell, D.S and Straub, S.M: Internat. Z. Vit-Ern. Forschung, *41*, 116 (1971)
4) 石崎有信，福島匡昭，坂元倫子：日衛誌，*25* (2)，207 (1970)
5) 井上勝弘，仲山良二，石原辰雄，小谷玲子：公害と対策，*9* (5)，29 (1973)
6) 蟹沢成好：腐研報，*24*，1 (1971)
7) 蟹沢成好：食衛誌，*12*，423 (1971)
8) 大森義仁他：食品と毒性 p.63 (1971)
9) Moten, L. : J. A.O.A.C, *53*, 916 (1970)
10) 深町和美，森本昌宏，柳川正男：分析化学，*21*，26 (1972)
11) Delanghter, B. : Atomic Absosption Newsletter. *4*, 273 (1965)
12) Midgett, M.R. and Fishman, M.J. : ibid., *6*, 128 (1967)
13) 下村滋，福本佳子，棚瀬弥一郎：衛生化学，*16*，144 (1970)

14) 田中元治他訳：キレート化合物の抽出 p.86～87, 172～173 (1972) (培風館)
15) Mckaveney, J.P. : Anal. Chem., *30*, 1965 (1968)
16) Delépine, M. : Bull. soc. chim. France, *3*, 643 (1908)
17) 黒田他訳：化学反応のマスキングとデスマスキング (1971), (講談社)
18) 柴田村治著：錯体化学入門 p55, (1968), (共立出版)
19) 藤永太一郎他：日化, *92*, 339 (1971)
20) Clinch, J, : Analyst, *83*, 430 (1958)
21) 丸田俊久, 武内次夫, 鈴木正巳：分析化学第20会年会講演集 B256, (1971)
22) Yanagisawa, M. : Anal. Chem. Acta., *52*, 386 (1970)
23) 広井功：分析化学第21年会講演集 2D17, (1972)
24) 西田宏：分析化学, *12*, 57 (1963)
25) 西田宏：ibid., *13*, 59 (1964)
26) 西田宏：ibid., *13*, 760 (1964)
27) 西田宏：ibid., *14*, 473 (1965)

マグロ類およびその他の水産食品の水銀含有量調査(第1報)

西垣　進*　田村行弘*　真木俊夫*
山田　洋*　鳥羽啓子*　嶋村保洋*
木村康夫*

INVESTIGATION ON MERCURY LEVELS IN TUNA, MARLIN AND MARINE PRODUCTS (I)

Susumu NISHIGAKI, Yukihiro TAMURA, Toshio MAKI, Hiroshi YAMADA, Keiko TOBA, Yasuhiro SHIMAMURA and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

From February to May in 1973, total mercury levels and methyl mercury contents of tuna and marlin were determined by the location in fish, the fish in a class and the area in the sea, and the other fishes and processed products from Tokyo central market were also researched as to mercury levels on total 165 samples of 44 species of these.

In tuna and marlin, not so large difference was observed in the total mercury level and methyl mercury content among various muscle tissue. In any class of tuna and marlin, the levels varies considerrably depending on individual fishes, but the ratio of methyl mercury to the total mercury was more than 80% except blue marlin, and the ratio in blue marlin were remarkablly lower than the others and the highest total mercury level were observed at 4.3ppm in this research.

Although most of tuna and marlin had more than 0.5ppm total mercury level and swordfish showed more than 1 ppm in an average, the greater parts of other fishes etc. showed less than 0.1ppm mercury level.

It was remarked that mercury present as methyl mercury in fish muscle.

緒　言

1972年8月，東京都公害研究所等の調査[1]で東京築地市場の職員の毛髪に高レベルの水銀が含まれていることがわかり，新聞などで報道されたが，東京都では直ちに，公害対策専門委員会水銀保健対策分科会を設立し，人体内蓄積の調査をはじめ，毛髪からの水銀多量検出者に対する臨床検査，まぐろを主体とした魚介類等の水銀含有量調査をプロジェクトチームを組んで一貫して実施することとなった。

食品研究科では，このうち，まぐろ類の同一魚体の各部位の肉中の総水銀（以下T-Hg）とメチル水銀（以下Me-Hg）の分布状態と，同一魚種の個体別，採取海域別の，各水銀量調査を主体に，比較試料として，その他の魚介類とその加工品も併行して調査することになった。

続いて，この調査とは別に，築地市場に陸上げされた魚介類についても水銀含有量の検査をおこなったが，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

これらの調査で特筆されることは，クロカワカジキの一体が，4.3ppmという高濃度のT-Hg量を示したことと，クロカワカジキを除くと，Me-HgのT-Hgに対する比率（以下M/T）が80%以上を示し，従来の我が国のデータを大幅に上まわり，ほとんどの魚介類中の水銀が，Me-Hgの形で存在するという結果が得られたことの二点であるが，各水銀の検査法についても若干の検討をおこなったので併せて報告する。

調査の部

1. 検査試料

東京築地市場をとおして，マグロ，カジキ，クジラは解体されて切身，頭および尾部の一部を，その他の魚介類はそのままの形で衛生局公害保健課から搬入された。（貝類の一部はむき身で，サメの一体は切身の形で搬入されたものもある。）

これらの試料は，可食部を切り取り，ミキサーで均一に混ぜ合わせたのち，試験に供した。

本調査で試料とした魚介類は44種，165検体である。

2. 検査法

(1) T-Hg……酸素燃焼フラスコによる乾式壊機をおこない，以後は循環式還元気化によるフレームレス原子吸光法で2537Åを用いて定量した。

酸素燃焼フラスコは，日局（XIII）記載の500mlのものを用い，サンプルサイズは，150～300mg（湿重量）とし，直径3cmの円形に切った薬包紙上に精秤して一夜，シリカゲルデシケーター中で乾燥した。以後の操作は浮島[2]の方法に従い，吸収液は0.15%$KMnO_4$の1N-H_2SO_4溶液40mlを用い，燃焼後，5分間振盪機にかけて振盪吸収させ，20%塩酸ヒドロキシルアミン3滴を加え，30% H_2SO_4 80mlで洗滌して全量120mlとする。還元剤には，10%$SnCl_2$ 10mlを用いた。

なお0.1ppm以下のものについては，H_2SO_4, HNO_3, $KMnO_4$による湿式分解液について測定をおこなった。

(2) Me-Hg……いわゆるFDA法に準じた。

Westöö[3][4]が確立した方法をFDAのKamps等[5]が追試して，欧米諸国で用いられている方法を若干改良して分析をおこなった。

サンプルサイズは5～10gとし，最初のベンゼン層から，システィンでの振り落しは，それぞれ250ml，100mlの分液ロートで，5分間づつ同じ振盪機にかけ，一定条件で抽出をおこなった。

システィン濃度を1/10の0.1%とし，振り落し時の添加量を12mlとして，遠心分離後のシスティン液の採取量を2mlに変更した。

特に本法での最大の難点はシスティン振り落し後に遠沈しても水層が乳濁して分離が困難なことで，このような場合，共栓遠沈管のまま，冷蔵庫中のフリーザーで凍結し，その後，室温で自然融解させることにより，水層の分離をおこなった。

また，最終のG.C.測定ベンゼン液は，無水硫酸ナトリウムでの脱水操作はおこなわないで，試験に供した。

G.C.の条件は，次のとおりである。

Col. 5%DEGS Chromosorb AW〔HMDS〕
80～120mesh
0.6m×3mm Glass

機種 島津 GC-4B ^{63}Ni ECD

温度 Col. Temp. 150°
Inj. Temp. 190°
Det. Temp. 250°

なお本法での回収率は85%であるので，試料中のMe-Hg濃度は，この値で補正してある。

調査結果と考察

1. 試験法の分析精度について，Table 1.に，T-Hgを2試料について各6回測定した時のバラツキを示しておいたが，かけはなれた値一つの消去して平均値を出した場合，危険率5%として，±10～18%以内の誤差にとどまる。

Table 1. Deviation of total mercury levels when empoyed Oxigen flask method.
(Sample size : ca 0.2g)

Sample	Total Hg (ppm)		
Big-eye tuna	0.72	0.71	0.75
	0.70	0.69	*0.57
	(AV. ± S.D.)	0.71 ±	0.035
Swordfish	1.14	1.38	1.16
	1.27	1.10	*1.64
	(AV. ± S.D.)	1.21 ±	0.11

*Except from calculation of average.

また，H_2SO_4, HNO_3と$KMnO_4$による湿式分解法と，酸素燃焼フラスコ法との比較をTable 2.に示しておいたが，特に有意差は認められない。

今回の調査では，一試料を4回分精秤し，最初にその二つを壊機して測定をおこない，二つの値が平均値から10%以上のバラツキのある時は，さらに残りの

Table 2. Comparssion of total mercury levels on Oxigen flask method and Wet digestion.

Sample	Total Hg (ppm)	
	Oxigen flask	Wet digest
Bluefin tuna	0.85	0.81
Blue marlin	0.51	0.45
Big-eye tuna	0.94	0.99
Big- eye tuna	1.02	1.00

二つを測定し，四つの値のうち，かけはなれた値があればこれを除いて平均値を取った。

Table 3. Recovery of methyl mercury added to fish muscle homogenate.

Sample	Sample size(g)	Added Me-Hg (asHg) μg	Founded Me-Hg (as Hg) μg		Recovery (%)
			befor the addition	after the addition	
Big-eye	5	2.5	3.05	5.25	88
tuna	5	5.0	3.15	7.50	87
Sword-	10	10.0	10.4	18.5	81
fish	5	5.0	7.15	11.3	83
					AV.85

Table 4. Mercury levels of various muscle tissue in Tuna and marlin.

Species	Area of capture	Sample	Total Hg ppm	Methyl Hg (as Hg) ppm	M/T (%)
Bluefin tuna	Tohoku offing, Japan (Pacific ocean)	rich fat	0.60	0.54	90
		medium fat	0.64	0.51	80
		lean	0.63	0.55	87
		head	0.57	0.52	91
		tail	0.58	0.56	97
Southern bluefin tuna	Pacific Ocean (Madagascal offing)	rich fat	0.46	0.39	85
		medium fat	0.42	0.40	95
		lean	0.47	0.40	85
		head	0.37	0.31	84
		tail	0.59	0.39	66
Big-eye tuna	Kinki offing, Japan (Pacific oceam)	rich fat	1.02	0.77	75
		medium fat	1.57	0.84	54
		lean	1.08	0.98	91
		head	1.33	1.06	80
		tail	1.10	1.02	93
Striped marlin	Kinki offing, Japan (Pacific ocean)	rich fat	0.67	0.61	91
		medium fat	0.85	0.70	82
		lean	0.91	0.61	67
		head	0.55	0.54	98
		tail	0.53	0.46	87
Striped marlin	Tohoku offing, Japan (Pacific ocean)	rich fat	0.75	0.54	72
		medium fat	0.87	0.59	68
		lean	0.73	0.66	90
Blue marlin	Pacific Ocean (Madagascal offing)	head	4.3	0.70	16
		rich fat	3.5	0.66	19
Blue marlin	Pacific Ocean	tail	0.59	0.14	24
		medium fat	0.55	0.10	18

M/T : Ratio of Methyl Hg (as Hg) to Total Hg

Me-Hg については，Westöö，Kamps 等によって充分に検討された方法で，特に問題はなく，我々が若干の改良をおこなった方法では，回収率は85%で，マグロとカジキに Me-Hg-Cl の50%アルコール溶液を添加した時の回収率を Table 3. に示しておいた。

ここで，システィン濃度1%を0.1%に変更した理由は，システィン液から塩酸酸性でベンゼン層に Me-Hg を振り上げる時，システィン濃度の低い方がベンゼンへの Me-Hg-Cl の移行率の良いことを西等[6]が報告しており，我々も検討をおこなったところ，大差はなかったが，魚肉の場合，硫化物の混入は考える必要がないので，この濃度に変更した。

また，システィン液量を2倍量の12m*l*とすると，6 m*l*に比べて分離が容易になる。

我々の経験では，この分離が長びく程，低い値がでるので，Me-Hg の分析には，G. C. 用ベンゼン液の分離までの操作を，2時間以内になるようにしている。

2. マグロ，カジキの同一魚体の各部位の切身中の水銀分布

Table 4. にマグロ，カジキの5魚種の分析結果を示しておいたが，クロカワカジキの一体は，T-Hg で4.3ppm という今調査を通じての最高値が見られ，M/T も他のものと比較して著しく低い値を示した。この T-Hg 量は我が国でだされた結果の最高値である。

Rivers 等[7]はハワイでのクロカワカジキの分析で最高14ppm の T-Hg があったと報告し，さらに，これは火山活動の活発なハワイでの水銀量の高い海域から獲れたもので，魚体が大きくなる程T-Hg が多くなり，Me-Hg は，T-Hg より低い傾向で増加するので M/T が小さくなっていることを示している。

今回の調査では，切身として搬入され，魚体の大きさを知ることはできなかったが，今後，こうした点を考慮に入れた調査が必要であると考えられる。

Table 5. にこれらのデータを統計的に処理してまとめておいた。

各部位による T-Hg と Me-Hg のバラツキは，バチとマカジキが，他のものに比べてやや大きいが，全体として，Me-Hg のバラツキの方が，遙かに小さい傾向が見られた。したがって，Me-Hg は，どの部位を

Table 5. Statistical analysis on distribution of mercury levels in various muscle tissue of tuna and marlin.

unit : ppm

Species	Hg form	$\bar{x} \pm$ S. D.	Range
Bluefin tuna	Total Hg	0.60±0.03	0.57～0.64
	Methyl Hg	0.54±0.02	0.51～0.56
	M/T (%)	89±6	80～97
Southern bluefin tuna	Total Hg	0.46±0.08	0.37～0.59
	Methyl Hg	0.38±0.04	0.31～0.40
	M/T (%)	83±11	66～95
Big-eye tuna	Total Hg	1.22±0.21	1.02～1.57
	Methyl Hg	0.93±0.13	0.77～1.06
	M/T (%)	79±16	54～97
Striped marlin	Total Hg	0.70±0.17 (0.78±0.08)	0.53～0.91 (0.73～0.87)
	Methyl Hg	0.58±0.09 (0.60±0.06)	0.46～0.70 (0.54～0.66)
	M/T (%)	85±12 (77±12)	67～98 (68～90)
Blue marlin	Total Hg	3.9±0.6 (0.57±0.03)	3.5～4.3 (0.55～0.59)
	Methyl Hg	0.67±0.03 (0.12±0.03)	0.66～0.70 (0.10～0.14)
	M/T (%)	18±2 (21±4)	16～19 (18～24)

取っても，その魚体の代表値と見て差支えないと思われる。

T-Hg についても，赤身，大トロについての分析値を取れば，代表値としても，そう違いはないと思われるが，この点については，さらに多くの試料について調査する必要がある。

また，M/Tもクロカワカジキを除いて80%以上を示し，現在までの我が国での分析値のうち，田中等[8]のメカジキ一体が80%というのがあるが，多くは[1),8),9)]20～70%にとどまっている。

この点については，4.項の中で考察をおこなう。

3. マグロ，カジキの個体別，採取海域別の水銀量

Table 6. に分析結果を，Table 7. にマグロ，Table 8. にクロカワカジキと，他のカジキの統計的に処理した

Table 6. Mercury levels of muscle tissue in tuna and marlin fishes

Species	Area of capture	Sample	Total Hg ppm	Methyl Hg (as Hg) ppm	M/T (%)
Southern bluefin tuna	Indian Ocean	tail	0.63	0.55	87
	〃	〃	0.70	0.57	85
	〃	〃	0.65	0.58	89
	〃	〃	1.01	0.78	77
	〃	〃	0.59	0.39	66
Big-eye tuna	Pacific Ocean	tail	0.47	0.47	100
	〃	〃	0.71	0.72	101
	〃	〃	0.84	0.84	100
	〃	〃	0.86	0.50	58
	Kishyu offing (Japan)	〃	1.10	1.02	93
Yellowfin tuna	Pacific Ocean	tail	0.96	0.97	101
	〃	lean	0.80	0.68	85
	〃	tail	0.26	0.19	73
	〃	〃	0.42	0.43	102
	〃	〃	0.49	0.45	92
Striped marlin	Pacific Ocean (Australia)	tail	0.58	0.57	98
	〃 (〃)	〃	0.59	0.59	100
	〃 (Coral Sea)	〃	1.08	1.02	94
	〃 (Madagascal)	〃	0.53	0.46	87
	Kesennuma (Japan)	lean	0.73	0.66	90
	Chyoshi offing (〃)	〃	1.13	1.06	94
	Katsuura offing (〃)	tail	0.88	0.83	94
Swordfish	pacific Ocean (Peru)	trunk	1.63	1.46	90
	〃 (〃)	lean	1.84	1.39	76
	〃 (〃)	tail	1.16	1.08	93
	〃 (〃)	〃	1.44	1.39	97
	Pacific Ocean	〃	0.49	0.50	102
	〃	lean	1.66	1.61	97
	〃	〃	0.89	0.78	88
	Katsuura offing (Japan)	tail	1.16	1.15	99
	〃 (〃)	〃	0.90	0.82	91
	〃 (〃)	〃	1.21	1.22	101
Blue marlin	Middway	head	4.3	0.70	16
	Pacific Ocean	tail	0.59	0.14	24
	〃	lean	0.85	0.46	54

Table 7. Statistical analysis on mercury levels in muscle tissue of tuna fishes.

Species	Hg form	x>1ppm	1ppm≥x>0.5ppm	0.5ppm≥x	$\bar{X}$ ±S.D. (ppm)	Renge (ppm)
Southern bluefin tuna (n=5)	Total Hg	1	4	0	0.72±0.17	0.59～1.01
	Methyl Hg	0	4	1	0.57±0.14	0.39～0.78
Big-eye tuna (n=5)	Total Hg	1	3	1	0.72±0.25	0.47～1.10
	Methyl Hg	1	2	2	0.71±0.23	0.47～1.02
Yellowfin tuna (n=5)	Total Hg	0	2	3	0.59±0.29	0.26～0.96
	Methyl Hg	0	2	3	0.54±0.29	0.19～0.97
Av. of above three species (n=15)	Total Hg (%)	2 (13)	9 (60)	4 (27)	0.70±0.23	0.26～1.10
	Methyl Hg (%)	1 (7)	8 (53)	6 (40)	0.61±0.22	0.19～1.02

Table 8. Statistical analysis of mercury levels in muscle tissue of marlin fishes.

Species	Hg form	x>1ppm	1ppm≥x>0.5ppm	0.5ppm≥x	$\bar{X}$ ±S.D. (ppm)	Range (ppm)
Striped marlin (n=7)	Total Hg	2	5	0	0.79±0.25	0.58～1.13
	Methyl Hg	2	4	1	0.74±0.23	0.46～1.06
Swordfish (n=10)	Total Hg	7	2	1	1.24±0.41	0.49～1.84
	Methyl Hg	7	2	1	1.14±0.35	0.50～1.46
Av. of above two species (n=17)	Total Hg (%)	9 (53)	7 (41)	1 (6)	1.05±0.40	0.49～1.84
	Methyl Hg (%)	9 (53)	6 (35)	2 (12)	0.94±0.35	0.46～1.46

Species	Hg form	x>1ppm	1ppm≥x>0.5ppm	0.5ppm≥x	$\bar{X}$ ±S.D. (ppm)	Range (ppm)
Blue marlin (n=3)	Total Hg	1	2	0	1.91±2.03	0.59～4.31
	Methyl Hg	0	1	2	0.43±0.40	0.14～9.70

データを示してある。

これらの表から明らかなように，メカジキはほとんどのものが，T-Hg，Me-Hgともに1 ppmを上まわり，今回調査した魚種の中で，どの個体をとっても各水銀量が高く，ついでマカジキ，バチ，インドマグロ，キワダと少なくなっている。

個体差は，いずれの魚種にもかなり見られるが，特にキワダ，マカジキにこの傾向が強く，バチ，インドマグロ，メカジキは比較的少なかった。この個体差は，採取海域にも一定の関連が見られないことから，Bache 等[10]がニジマス，Barber 等[11]が深海魚について，魚体が大きい程，水銀量が高くなることを調査データから割り出しており，また，清水等[12]がマグロの水銀蓄積について総説しているように，このバラツキは，各魚種により独特の濃縮係数をもっていて，海域による差ではなく，魚体の大きさによるものと考えられる。

また，海域による差が認められず，太平洋のどこで獲ったものでも高い値を示すことは，Miller 等[13]の調査のように，人為汚染とは考えられない。

今回の各魚種の個体別の T-Hg レベルと，そのレンジは，土井[1]の調査結果とほぼ類似したものであった。

4. マグロ，カジキの Me-Hg の T-Hg に対する比率

先に，少し触れておいたが，今調査で得られた M/T は，クロカワカジキを除いて，ほとんどの個体が80

～100％であり，この結果は，従来の我が国のデータを上まわり，欧米諸国でのものと同じ程度であった。

このことは，FDA の Kamps 等[14]が，スエーデン，日本，アメリカと，国によってこの比率が違っているために，主としてメカジキについて，FDA 3ヶ所とスウェーデンの間で，同一試料で，この相違をクロスチェック等によって検討をおこなったところ，これらの試料中の水銀は，ほとんど Me-Hg として存在していることを確かめ，Westöö[3][4]の調査でも，多くの食品中の水銀は，大部分が Me-Hg であることを示している。

各魚種別のM/Tを Table 9. にまとめておいたが，クロカワカジキを除くと，ほとんどが，80％を超えていて，大部分が Me-Hg として存在していると認められた。

Table 9. Ratio of methyl mercury to total mercury of tuna and marlin muscle tissue (Except blue marlin).

Species	Common Name	n	$\bar{X}\pm$S.D. (M/T%)
Tuna	Southern bluefin tuna	5	81± 9
	Big-eye tuna	5	90±18
	Bluefin tuna	5	91±12
Marlin	Striped Marlin	7	94± 4
	Swordfish	10	93± 8
Av. of above two species		32	91±10

その他の魚介類についても同様の結果が得られている。

5. クロカワカジキの水銀量

クロカワカジキだけは，今まで述べた魚種と異り，M/Tが16～54％と極端に低く，T-Hgは，最高4.3ppmと異常に高い値を示した。

今調査では，3体と少ないので全体の傾向を推定することはできないが，Rivers 等[7]の調査から見て，特異な濃縮経過をたどるものと考えられる。

今後，魚体の大きさ別に調査することにしている。

6. ブリの同一魚体中のT-Hg 分布

Table 10. にまとめてあるが，尾部の切身に，やや高い値を示す傾向があるが，その他の部位には，ほとんど同じ程度含まれていた。

最高値は，0.39ppmで，大部分が0.2ppmを下まわるため，Me-Hg の分析はおこなわなかった。

7. クジラ，サメ，カツオ，アサリ，バカ貝，ミル貝，赤貝，竹輪，カマボコ中の水銀量

Table 10. Mercury levels of various muscle tissue in yellowtail.

Landing place	Body Length (cm)	lample	Total-Hg (ppm)
Isumi-Ohara (Chiba)	80	head	0.13
		back	0.13
		abdomen	0.12
		tail	0.24
Awa-Amatsukominato (Chiba)	90	head	0.15
		back	0.14
		abdomen	0.15
		tail	0.22
Awa-Amatsukominato (Chiba)	85	head	0.10
		back	0.12
		abdomen	0.12
		tail	0.16
Muroto-Mitsu (kōchi)	85	head	0.14
		back	0.20
		abdomen	0.15
		tail	0.39
Muroto-Mitsu (kōchi)	85	head	0.23
		back	0.20
		abdomen	0.21
		tail	0.13

Table 11. にまとめてあるが，サメは，これらの中で高い値を示し，T-Hgで0.5ppm，Me-Hg で0.3ppmが最高値で，M/Tも，カスザメ，吉切ザメが低い値を示したが，その他は80％を越えていた。その他カツオでT-Hg 0.19ppmが最高値であった以外は，0.1ppm以下であったので Me-Hg の分析はおこなわなかった。

これらについては，マグロ，カジキ類より遙かに低い水銀量であり，比較資料として，分析値のみにとどめておく。

8. その他の魚介類の水銀量と Me-Hg の T-Hg に対する比率

以上の調査とは別に，築地市場に陸上げされた21種の魚介類について調査をおこなったが，その結果は Table 12. にまとめておいた。

メヌケ，T-Hg 0.72ppm，レンコダイ，0.47ppm，キンメ，0.64 ppm，ベニズワイガニ，0.52 ppm と高い値を示し，そのほか，フグ，チダイ，サバにやや高い水銀量を示すものが見られたが，大部分は，0.1ppm前後から，それ以下であった。しかし，M/Tは，ほとんどのものが，80％を超え，マグロ，カジキと同じ

Table 11. Mercury levels of fishes, shellfish, whales and processed products.

Species		Area of Capture or landing Place	Body Length (cm)	Sample	Total Mercury ppm	Methyl Hg (as Hg) ppm	M/T (%)
Whale	Balaenopteva boralis	Arctic Ocean	—	back muscle	<0.1	—	—
		Antractic Ocean	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
	Mink whale	〃	—	〃	〃	—	—
Shark	Great blue Shark	Chiba	56	back muscle	1.19	0.34	29
	Mejiro Shark	Miyagi	53	〃	0.26	0.22	85
	Isuropsis Glauca	〃	66	〃	0.42	0.33	79
	Squatina Japonica	Chiba	71	〃	0.50	0.18	36
	Triakis scyllium	Kanagawa	—	〃	0.28	0.24	86
Bonito		Tokyo	55	abdomen muscle	<0.1	—	—
		〃	56	〃	〃	—	—
		〃	53	〃	〃	—	—
		Wakayama	54	〃	〃	—	—
		〃	54	〃	0.19	—	—
Short-necked clam		Chiba	—	shucked	<0.1	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		Yamaguchi	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
Miru gai (clam)		Okayama	—	siphon, entrails	<0.1, <0.1	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		〃	—	siphon	<0.1	—	—
		Fukuoka	—	siphon, entrails	<0.1, <0.1	—	—
		〃	—	Liver, except entrails	〃	—	—
Trough shell		Chiba	—	shucked	<0.1	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		Ehime	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
Ark shell		Yamaguchi	—	Liver, except entrails	<0.1, <0.1	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
		〃	—	except entrails	<0.1	—	—
		Republic of Korea	—	〃	〃	—	—
		〃	—	〃	〃	—	—
Chikuwa (rolled fish cake)		Aomori	—	—	<0.1	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
		Mie	—	—	〃	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
Kamaboko (fish jelly product)		Fukushima	—	—	<0.1	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
		Kanagawa	—	—	〃	—	—
		〃	—	—	〃	—	—
Frozen-minched fish	Great blue sherk	—	—	—	0.33	—	—
	Pollack	—	—	—	<0.1	—	—
	〃	—	—	—	〃	—	—
	Atka macherel	—	—	—	〃	—	—
	Pollack	—	—	—	〃	—	—

ように，水銀の大部分が，Me-Hg として存在していることを示している。

今後さらに，この種の魚介類の水銀調査を続けることになっており，1973年6月，マグロ類を除いた魚介類中の水銀量の暫定基準として，T-Hg 0.4ppm，Me-Hg 0.3ppm が決められ，本調査の結果から判断すると，大部分のものは，この基準を下まわると予想されるが，深海魚に問題があり，こうした点を加味して今後，調査を進めてゆく予定である。

ま と め

1. マグロ，カジキ類はいずれも高い水銀量を示し，大部分のものが，T-Hgで0.5ppm を越え，メカジキでは，ほとんどのものが1 ppmを上まわった。

2. クロカワカジキでは，T-Hg が4.3ppm のものがあり，今調査の最高値を示した。

Table 12. Mercury levels of muscle tissue of shore fishes. *deep-sea fishes

Species	Landing place	Total Hg ppm	Methyl Hg (as Hg) ppm	M/T (%)
Mackerel	chiba	0.26	0.25	96
	Shizuoka	0.17	0.17	100
	Fukui	0.19	0.15	79
Horse Mockerel	shimonoseki	0.01	<0.01	—
	Mie	0.03	0.02	67
	〃	0.02	<0.01	—
	〃	0.16	0.14	80
Sardine	Chiba	<0.01	<0.01	—
Mackerel Pike	Manazuru	0.07	0.05	71
Rainbow Runner	Mie	0.06	0.06	100
Saury	Hokkaido	0.19	0.13	68
	Kishyu	0.14	0.13	93
Theragra chalcogramma	Hokkaido	0.15	0.13	87
Sole	Fukushima	0.06	0.05	83
	〃	0.02	0.02	100
Flat fish	Chiba	0.07	0.06	86
	Aomori	0.04	0.04	100
Sillago Sihama	Chiba	0.03	0.02	67
	Yokohama	0.04	0.03	75
	Mie	0.03	0.03	100
Sea eel	Yokohama	0.05	0.04	80
	Okayama	0.12	0.09	75
	Fukushima	0.14	0.13	93
Eel	Hamanako	0.09	0.08	89
*Ocean perch	Aomori	0.72	0.61	85
	〃	0.61	0.53	87
*Dentex tumifrons	Shimonoseki	0.47	0.45	96
*Evynnis Japonica	Fukuoka	0.23	0.19	83
*Beryx	Kanagawa	0.64	0.50	78
*Cachucho	Numazu	0.15	0.15	100
Globefish	Shimonoseki	0.26	0.23	88
Metapenaeus jorneri	Saga	0.03	0.02	67
Prawn	Hamanako	<0.01	<0.01	—
*Red Crab (boiled)	Fukui	0.52	0.45	87

3．マグロ，カジキ，ブリの同一魚体内の各部位の切身の水銀の分布状態は，多少のバラツキはあるが，大トロまたは赤身について分析をおこなえば，その個体の肉中のT-Hg，Me-Hg の代表値とすることができる。

4．クロカワカジキを除いたほとんどの魚介類は，M/Tが80～100％にあり，魚肉中の水銀は，大部分Me-Hg として存在している。

5．クロカワカジキと2種のサメはM/Tが，14～54％と低く，この点について，さらに多くの試料の分析をおこなうことにしている。

6．マグロ，カジキ類の水銀含有量には，個体差がかなり認められ，採取海域には関連は認められない。

7．マグロ，カジキ類，レンコダイ，メヌケ，キンメ，ベニズワイガニの深海魚を除いて，今回調査した約20種の魚介類については，水銀量は，暫定基準(T-Hg 0.4ppm，Me-Hg 0.3ppm）を下まわっていた。

謝　辞

本調査の試料採取に御便宜を計っていただいた，都衛生局公害保健課長崎護氏ならびに，公害保健課各位，および検査に御協力いただいた食品化学第5研究室の各位に，深く感謝いたします。

文　献

1）土井陸雄：東京都公害研究所年報，*4*，257（1973）
2）浮島美之：第八回全国衛生化学技術協議会総会（大阪）講演要旨集，34，(1971年10月18～19日）
3）Westöö, G. :Acta Chem. Scand., *21*, 1970 (1967)
4）Westöö, G.: Ibid, *22*, 2277, (1968)
5）Kamps, L.R. and Mcmahon, B.: J. A.O. A. C., 55, (3), 590 (1972)
6）西末雄，堀本能之：Japan Analyst, *17*, 1247 (1968)
7）Rivers, J. B., Pearson, J. E. and Shultz, C.D.: Bull. Environ. Contami. Toxicol., *8*, (5), 257 (1972)
8）田中克彦，島田武憲，福井昭三，菅野三郎：Journal Hygien. Chem., *18*, (4), 256 (1972)
9）山中すみへ，鈴木三恵，近藤武，上田喜一：Jap. J. Hyg., *27*, (1), 117 (1972)
10）Bache, C. A., Gutermann, W.H. and Lisk, D. J.: Science, *172*, 951 (1971)
11）Baber, R. T. and Vijayakumar, A.: Science, *178*, 636 (1972)
12）清水誠，土井陸雄：科学，*43*, (6), 357 (1973)
13）Miller, G. E., Grant, P. M., Kishore, R., Stelnkrvger, F. J., Rowland, F. S. and Guinn, V.P.: Science, *175*, 1121 (1972)
14）Kamps L. R., Carr, R. and Miller, H.: Bull.Environ. Contami. Toxicol., *8*, (5), 273 (1972)

天然由来による食品中の安息香酸に関する研究〔I〕
あんず　およびうめについて

西島基弘*　上田　工*　大西　操*　高橋尚子*
上村　尚*　中里光男*　木村康夫*

STUDIES ON NATURALLY DERIVED BENZOIC ACID IN FOOD (1)
DETECTION FROM APRICOT AND PLUM

Motohiro NISIJIMA, Kou UEDA, Misao OHNISHI, Shyoko TAKAHASHI, Hisashi KAMIMURA, Mitsuo NAKAZATO and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Depertment of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

According to the Japanese Food Sanitation Law, the use of benzoic acid in foods is strictly prohibited, and only it has been allowed to use as a food preservatives in caviare, soft drinks and soy source. However, there are some fruits which contains naturally derived benzoic acid in them, and they will sometimes cause some administrative confusion on the commercial fruit products, whether the benzoic acid detected are the one comes from naturally or the one intentionally added as a food preservatives.

A series of survey conducted on the 104 specimens had clarified that 5～30ppm of naturally derived benzoic acid is always present in a raw apricot, and 10～50ppm of it in raw plum respectively.

Thus it was concluded that the benzoic acid detected from apricot or plum products in the amount between 10～250ppm is considered to be the naturally derived one.

〔I〕緒　言

安息香酸は各国において保存料として種々の食品に使用されている[1]。

わが国においてもキャビア，清涼飲料水およびしょう油に保存料として添加することが許可されている。しかし，安息香酸は食品中に天然物としてしばしば見出されているため，安息香酸の添加を許可されてない食品から検出された場合に，添加されたものか，あるいは天然物中に成分として，または前駆物質として，存在しているものか否かが判明しないものについては行政上のトラブルの原因となる場合がある。

すでに天然物中の安息香酸については Clan berry[2]，Wein[3]，Green tea[4] しょう油原料の大豆[5] および小麦[6] などに存在することが報告されている。

また，発酵乳中から検出される安息香酸については前駆物質の存在も報告されている[7][8]。われわれは市販あんず，干うめおよびそれらを原料とした加工品中から10～250ppm の安息香酸を検出したが，これが添加されたものか，天然物中に存在するかの判断が必要となった。

そこで生あんず，生うめおよびそれらの市販加工品

＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

について，若干の検討をおこなったので，その結果を報告する。

〔II〕実験の部

1　試料

あんずおよびうめについては長野県安茂里より直接採取したもの，および食品機動監視班が収去した市販品を試料とした。

2　試薬

エチルエーテル（以下エーテルという）石油エーテル，炭酸水素ナトリウム，アセトン，リン酸，過マンガン酸カリウム，亜硫酸ナトリウムおよび安息香酸は，すべて和光純薬，試薬特級をもちいた。

ピリジンピラゾロン法で使用した試薬はすべて和光純薬試薬特級をもちい JIS KO101—1966 に準じた。

エムルシン（東京化成）
アミグダリン（東京化成）
ベンズアルデヒド（半井化学）
シリコン樹脂　KM681F（信越化学工業）

3　装置

自記分光々度計
　日立 EPS　3T
ガスクロマトグラフ
　島津 GC-5AF
回折格子赤外分光々度計
　日本分光 IR-G

4　試験溶液の調製

4-(1) 水蒸気蒸留による方法

試料 50g を 500m*l* の二頸フラスコに秤取し，リン酸 1m*l*，シリコン 2～3滴，食塩約 80g を加えたのち，全量を水で約 200m*l* とする。

これを水蒸気蒸留に付し留液 500m*l* をとる。この留液を分液ロートにとり，リン酸 2～3滴を加えて，エーテル，石油エーテルの等量混液 500m*l*，250m*l*，100m*l* で3回抽出し，全エーテル，石油エーテル混液をあわせ，水 50m*l* で洗い，洗液はすてる。つぎにエーテル，石油エーテル混液をエバポレーターをもちい，除々に濃縮し，約 50m*l* とする。

濃縮液を分液ロートに取り，1％炭酸水素ナトリウム 10m*l*，5m*l*，5m*l* で3回抽出し，炭酸水素ナトリウム層をあわせ，全量を 25m*l* としこれを試験溶液とした。

4-(2) 直接抽出による方法

試料の一定量に等量の水を加え，ホモジナイズする。

ホモジナイズした試料を分液ロートに洗い込み，リン酸々性としたのち4-(1) 水蒸気蒸留による留液と同様の操作法をおこなって試験溶液を作製する。

5　試験操作

5-(1) 紫外部吸収スペクトルによる方法

試験溶液 10m*l* をビーカーにとり，水酸化ナトリウム 4～5粒を加え，溶解させたのち，5％過マンガン酸カリウムを紫色が，もはや消失しなくなるまで加え，リン酸を加え明らかに酸性としたのち，亜硫酸ナトリウムを加えて脱色する。

この液を 50m*l* のメスシリンダーに移し，エーテル 10m*l* を加えて振り混ぜ，静置し，再びエーテルを加え，10m*l* に補正したのち，エーテル層の紫外部吸収を測定し，272mμ付近の吸光度について，あらかじめ作成した検量線により定量した。

5-(2) ガスクロマトグラフィー

試験溶液 10m*l* を分液ロートに分取し，リン酸酸性としたのち，等量のエーテルで3回抽出する。エーテル層をあわせ，水 5m*l* で洗い，洗液はすてる。

エーテル層は無水硫酸ナトリウムで脱水したのち，ロ過し，エバポレーターで除々に濃縮し，最後は二連球を用いて，送風乾固する。残渣にアセトン 5m*l* を加え測定溶液とする。

測定溶液 5μ*l* をとり下記の条件によりガスクロマトグラフィーをおこない，このガスクロマトグラムについて，ピークの保持時間およびピークの高さを測定し，同時に作成した検量線をもちいて定量をおこなった。

測定条件

Phase：5％ Diethylene glycol succinate polyester
　＋1％H_3PO_4
　Chromosorb W 60～80mesh
Column：glass on column 3mmϕ×2m
Tempeaure：column 180°C
　：detector 220°C
　：injection port 220°C
Sensitivity：10^2—10^3
Range：8—32
Carrier gas：N_2 60m*l*/min

〔III〕結果および考察

1　市販品中の安息香酸含量

市販のあんず，うめおよびそれらの加工品については 4-(1) 水蒸気蒸留法および 5-(1) 紫外部吸収法により測定した。

Table 1. Amout of Benzoic Acid detected from Apricot, Plum and their products

Specimens tested	No. of specimens tested	Amount of Benzoic Acid detected (in ppm)					
		<10	10～50	50～100	100～150	150～200	200<
Raw Apricot	16	2	14				
Dried Apricot	41	5	20	5	3	2	6
Processed Apricot	34	12	9	6	4		3
Raw Plum	6	3	3				
Dried Plum	3		3				
Processed Plum	4		1	1	1		1

Table 2. Amount of Benzoic Acid detected from dried Apricot

Place from where Specimens imported	No. of specimens tested	Amount of Benzoic Acid detected (in ppm)					
		<10	10～50	50～100	100～150	150～200	200<
China	15	3	5	3	1	2	1
U. S. A	1		1				
Rumania	5	1	4				
Spain	1		1				
Australia	3		2	1			
Turkey	1		1				
Africa	2		1		1		

結果は（Table 1）に示したとおりであり，採取されたままの状態，いわゆる生あんずについては16検体中，安息香酸含量が10ppm 未満のものが 2 件，10～30ppm のものが14件であった

干しあんず 37 検体については 10 ppm 未満が，5 件，10～50ppm が20件，50～100ppm のものが 3 件，150～200ppm が 2 件，200ppm を上回るものが 6 件あった。あんず寒天，あんず甘煮砂糖がけあんずなどの，いわゆる加工品については，34検体中 10ppm 未満が12件，10～50ppm が 9 件，50～100ppm が 6 件，100～150ppm が 4 件，200ppm を上回るものが 3 件あった。

うめについては生うめ 6 検体中 10ppm 未満が 3 件，10～50ppm のものが 3 件あった。

うめ干しについては 3 検体おこなったがいずれも10～50ppm であった。

うめ酢，うめジャムなどの加工品については 4 検体おこなったが 10～50 ppm，50～100 ppm，100～150 ppm，200ppm を上回るものそれぞれ 1 件であった。

これらのうち，干あんずについて輸入国の判明しているものを分類したところ（Table II）に示したとおりであり，特に国別による安息香酸含量の差違は，認められなかった。

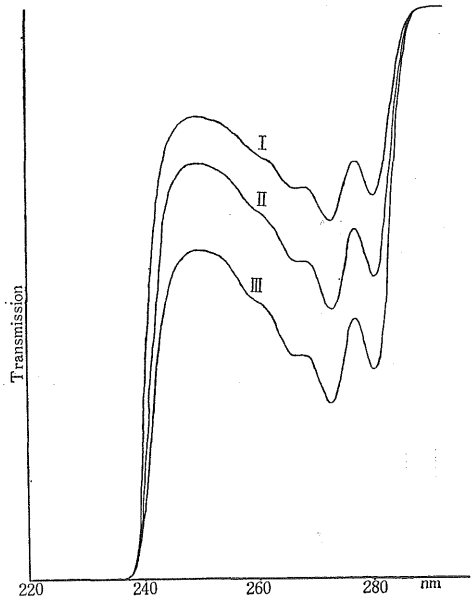


Fig. 1. Comparision of UV absorption spectra of extracts of Apricot and Plum with standard Benzoic Acid
1 Standard Benzoic Acid
II Apricot extract
III Plum extract

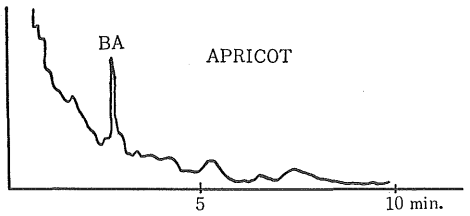
2　生あんず，生うめ中の安息香酸の確認

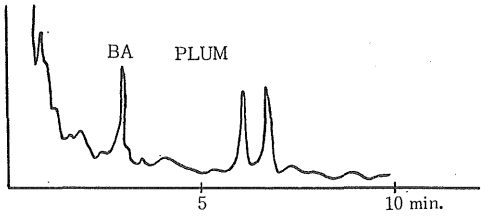
市販あんずおよびうめから検出された安息香酸が，添加されたものか，成分として含有されているものかを確認するため，産地で直接採取したあんずおよびうめについて4-(1) 水蒸気蒸留法，5-(1) 紫外部吸収スペクトル法で得た吸収スペクトルは（Fig 1）に示すとおりである。

また，a 紫外部吸収スペクトルで得た測定溶液，b 4-(2) クロマトグラフィーで得た測定溶液およびc あんず，うめの各 4 kg を直接抽出法により得た試験溶液（過マンガン酸カリウムによる分解をおこなわないもの）および安息香酸を，ガスクロマトグラフィーに付したところ，それぞれのガスクロマトグラムは(Fig 2-a)（Fig 2-b）および（Fig 2-c）に示したとおりである。

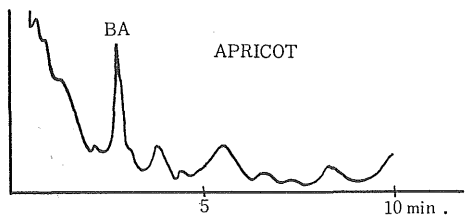
また，直接抽出法で得た試験溶液を昇華器に移し，アセトン溶液を留去し乾固したのち，直火で加熱して得た昇華性物質について赤外吸収スペクトルを測定したものは（Fig 3）に示したとおりであり，

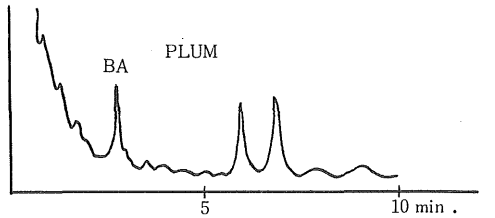
−COO基にもとずく $\gamma C=O$ を示唆する 1690cm^{-1} の



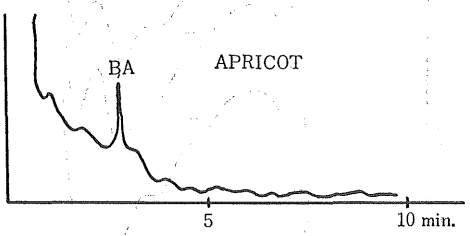


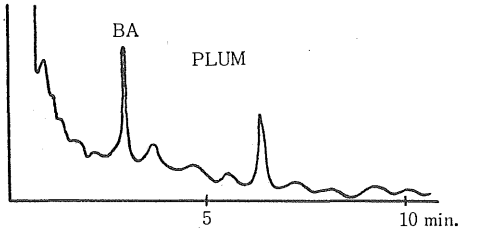
(Fig. 2-a)





(Fig. 2-b)





(Fig. 2-c)

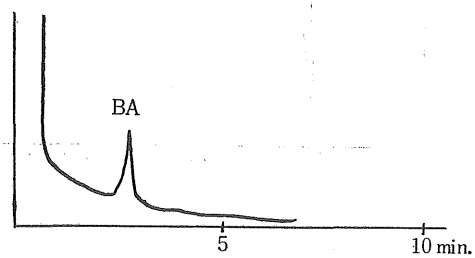
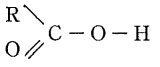


Fig. 2. Gas chromatograms of extracts of Apricot and Plum compared with that of standard Benzoic Acid

吸収。



C＝O伸縮とC－O－H変角との混合しあった2個の内面振動による吸収を示唆する 1415cm^{-1}，1285cm^{-1} の吸収。ベンゼン核の振動による吸収を示唆する1605 cm^{-1}，1590cm^{-1}，1455cm^{-1}，ベンゼン核についた水素原子のC－H面内変角振動を示唆する1175cm^{-1}，1125 cm^{-1}，1070cm^{-1}の吸収。ベンゼン核に隣接して存在す

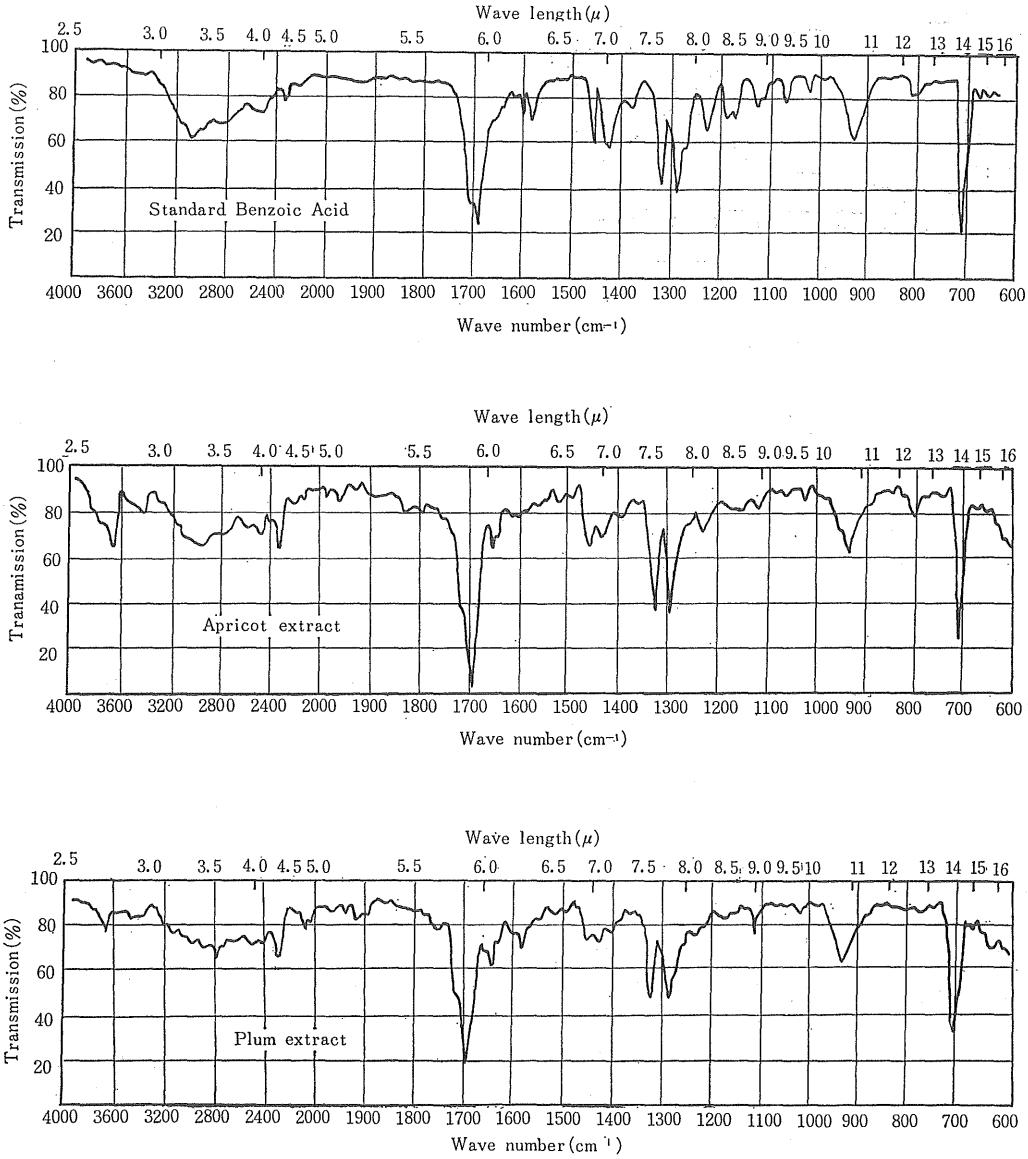


Fig. 3. Comparision of Infrared absorption spectra of extracts of Apricot and Plum with that of Benzoic Acid

る2個の水素原子が，同時に同方向に動く面内振動を示唆する 710cm^{-1} の吸収を得た。

以上の紫外部吸収スペクトル，ガスクロマトグラム，赤外吸収スペクトルにより安息香酸であることを確認した。

3　干あんず中の安息香酸含量

あんずは干した状態，いわゆる干しあんずとして保存されるのが一般的である。

市販干あんずおよびその加工品に安息香酸含有量が高いのは（Table 1）で示したとおりであるが，この安息香酸が乾燥中に何らかの作用をうけて生成されたものか，あるいは水分が蒸発したために，単に濃縮された状態で，単位あたりの量が増加したものかについて検討を，おこなった。

生あんずを二つ割りにして種子を除去したもの 100 g を1ロットとして糸でつるし，一週間，天日乾燥をおこない，安息香酸含量の経時変化を測定した。その結果は（Fig 4）に示したとおりである。

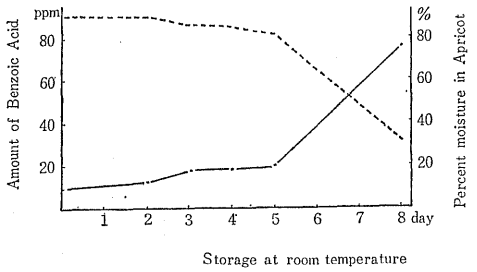


Fig. 4. Effect of experimental storage on the relative amount of Benzoic Acid in Apricot.

・————・ Amount of Benzoic Acid

・－－－－・ Per cent moisture in Apricot

試験中の天候が不順であったこと，また，窓際で干したため，市販品よりは乾燥条件が緩和であると思われるが初日は安息香酸が10ppm（水分90％）程度検出されたものが7日目には76ppm（水分32％）と水分の減少に伴い明かに増加の傾向を示した。

以上の結果より，干あんずおよびその加工品の安息香酸含量は天日乾燥することによる水分の蒸発が濃縮の状態となってあらわれる単位あたりの含量増加と思われる。

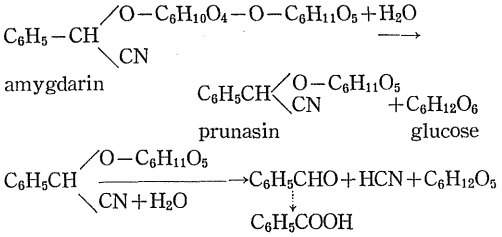
市販品の干あんずの水分含量は5～50％と非常に幅があるため，前記の事実より10～250ppm程度の安息香酸は当然検出されるものと考えられる。

4　前駆物質の検討

4-a　アミグダリン

あんず，うめの成分は類似しており[8)9)]，糖分5～10％，リンゴ酸，クエン酸，酒石酸などの有機酸が1～2％，タンニンが0.1％，その他微量の無機質，アミノ酸であるがこれらは構造上，いずれも前駆物質とはなり得ない。

しかし，あんず，うめの種子，いわゆる仁にはアミグダリンが3～6％程度含有されているため，果肉中にアミグダリンが存在する場合にはベンツアルデヒド，青酸およびグルコースに分解し，このベンツアルデヒドが試験中に酸化をうけて，安息香酸になることも考えられる[10)]。



そこで，あんず，うめの果肉中にアミグダリンが存在するか否かをみるための簡易法として，生うめ，生あんずの果肉部分をホモジナイズしたのち，エムルシンを作用させたものについてピリジンピラゾロン法で青酸の検出を試みたところ，あんずの果肉中からは青酸が検出されなかった。このことからアミグダリンは，存在しないものと考えられる。うめの果肉中からは2 ppm の青酸が検出された。

この青酸は青酸塩の形で存在することも考えられるがすべてアミグダリンの分解生成によるものと仮定した場合，ベンツアルデヒドは約 8 ppm 存在することになる。

そこでベンツアルデヒド 100mg について4-(1)水蒸気蒸留法，5-(1) 紫外部吸収スペクトル法にしたがって調整した試料で，ガスクロマトを用い測定したところ，0.04μg (0.4ppm) の安息香酸が検出されるにすぎなかった。実際のうめの果肉中から安息香酸が10～50ppm 検出することから考えた場合，アミグダリンが前駆物質とは，考えられない。

4-(b) 安息香酸エステル類

前駆物質として安息香酸エステル類が存在し，試験中に一部安息香酸として検出されることも考えられる。

そこで，あんず，うめの果肉に等量の水を加えてホモジナイズしたものについて，おのおの 100g を秤取し，エーテル，石油エーテルの等量混液 100ml，80ml，50ml で3回抽出をおこない全有機層を合わせる。

有機層を1％炭酸水素ナトリウム 20ml で3回洗ったのち，洗液はすてる。

有機層をエバポレーターをもちい留去したのち，残留物に10％水酸化ナトリウム溶液 2 ml，水 3 ml および沸騰石数個を加えて還流冷却器を付し，15分間煮沸したのち冷却する。ここに得た分解液について安息香酸の試験をおこなったところ，安息香酸は検出されなかったことからエステルの形では，存在しないものと思われる。

以上の結果，あんず，うめ中より検出される安息香酸は前駆物質の存在が認められないことから，遊離または，塩の形で存在するものと推定される。

〔IV〕要　約

1　生あんずの果肉中には 5～30ppm の安息香酸または，その塩類が存在する。

2　生うめの果肉中には 5～50ppm の安息香酸または，その塩類が存在する。

3　干あんず，干うめおよびそれらの加工品から検出される10～250ppm程度の安息香酸は天然由来によるものと思われる。

なお，本報は第9回全国衛生化学技術協議会総会に発表したものである。

謝辞

本研究を進めるにあたり検体の採取に御配慮，御援助いただいた長野市農林部ならびに長野市安茂里農業協同組合に深謝いたします。

文　献

1　日本貿易振興会：世界の食品規格，規則（ジェトロトレードブックス）(1969)
2　Nelson, E. K. : J. A. C. S., 49, 1300 (1927)
3　Heinlein : Z. Biol., 81, 284 (1924)
4　Yamanishi, T., Kobayashi, A., Uchida, A. and Kawashima, Y. : Agr. Biol. Chem., 30, 1102 (1966)
5　Hanaoka, Y. and Yokotsuka, T. : J. Ferment. Technol., 45, 9, 826 (1967)
6　西本孝男，他：食衛誌，9，1，60 (1968)
7　西本孝男，他：食衛誌，10，6，410 (1969)
8　岩田久敬著：食品化学，各論 (1969)
9　佐々木理喜子訳：食品の無機質含量表(第一出版) (1966)
10　Strom, W. and Hanssen, E., : Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch., 135, 249 (1967)

炭酸飲料水中のキニーネに関する研究

西島基弘* 大西 操* 高橋尚子*
上村 尚* 中里光男* 木村康夫*

DETECTION AND IDENTIFICATION OF QUININE IN MARKET AERATES WATERS

Motohiro NISHIJIMA, Misao OHNISHI, Shyoko TAKAHASHI
Hisashi KAMIMURA, Mitsuo NAKAZATO and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Depertment of Food Hygiene and Nutrition,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Tonic water containing some fluorescent substance was brought from a health center with the claim. It was later found that the products have been containing some amount of quinine in them. According to the Japanese Food Sanitation Law, however, there was no regulation for the presence of quinine in food.

Thus, a series of survey was conducted on the 54 market aerated waters for the presence of quinine in the products.

Results obtained are summarized as follows:

1) All the tonic waters tested at the period from May to August in 1972 had been containing 1～80ppm of quinine in the products which manufactured by the 4 Japanese companies. However, in December 1972 and May 1973, 30～70ppm of quinine was found in the products of the 2 ɔompanies.
2) None of the aerated waters other than tonic waters tested had contained quinine in the products.
3) As conclusion, it is required to make some restriction on the use of quinine in food in Japan, since many countries have already been taking some effective administrative action on the use of quinine in food.

〔1〕はじめに

昭和47年5月，食品衛生監視員が飲食店におけるナプキン，コーヒーフィルター等の螢光物質使用の有無について一斉検査をおこなっていた際，清涼飲料水に紫外線照射器を照射したところ，螢光を発するものがあったとして衛生研究所に送付してきた。

この清涼飲料水はトニックウォーターと称し，一般的に氷で冷やしてそのまま飲用するか，またはジンと混ぜて，いわゆるジントニックとして世界的に飲用されている炭酸飲料水である[1]。

このトニックウォーター中の螢光物質を調査したところ，キニーネであることが判明した。キニーネを食品に添加する場合，キナ抽出物であれば，天然物の範中に入り，食品衛生法上は，問題は生じないが，化学的合成品としてのキニーネ塩類を添加することは現行法で認められていない。

このキニーネ塩類は副作用があるとして，昭和46年3月に厚生省薬発第306号により風邪薬の処方から削除するように定められた物質であり。また，昭和46年

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

6月薬発第476号により，キナはその成分が医薬品として使用されるものの範中に入れられている。この様な物質が食品に添加されていることは問題である。また，わが国では炭酸飲料水中のキニーネに関する報告はほとんど見当らない[2) 3)]。

そこでわれわれは昭和47年5月～8月，同年12月および昭和48年5月の3回にわたり，トニックウォーターを中心に炭酸飲料水中のキニーネについて市販品の調査をおこなったので，その結果を報告する。

〔2〕 実験の部

1 試　薬

塩酸キニーネ，硫酸キニーネ，エチルエーテル（以下エーテルと云う），水酸化ナトリウム，n-ブチルアルコールおよび酢酸はすべて和光純薬の試薬特級をもちいた。

2 機　器

(1) 自記分光々度計
　島津マルチパーパス　MPS—SOL

(2) 螢光々度計
　日立螢光々度計　MPF—4

(3) 回折光子赤外分光々度計
　日本分光　IR—G

3 試　料

保健所監視員，食品監視機動班が収去したものおよびわれわれが直接購入したもの計54検体

内訳

トニックウォーター	32検体
その他の炭酸飲料水	21検体
トニックウォーター原液	1検体

4 抽出法

試料50gをビーカーに取り，水浴上で，もはや発泡しなくなるまで加温し，冷後200ml の分液ロートに移す。10%酒石酸5ml およびエーテル50ml を加えよく振とうしたのち，エーテル層をすてる。再度，等量のエーテルを加え，同様の操作をおこなう。

水層は，10%水酸化ナトリウムを加え，アルカリ性にしたのち，エーテル50ml，30ml，10ml で3回抽出し，エーテル層を合わせ10ml の水で洗い，洗液はすてる。

エーテル層をエバポレーターで留去したのち，残留物についてエーテル20ml を加え，試験溶液とする。

5 試験操作

5-1 ペーパークロマトグラフィー

試験溶液 10～50μl を口紙にスポットし，下記の条件で展開し確認する。(Fig 1)

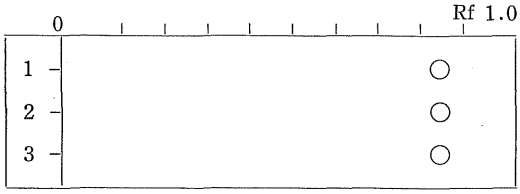


Fig. 1 Paper chromatogram of quinine and extract from tonic water
1 Standard quinine
2 Tonic water extract
3 Mix (standard quinine and tonic water extract)
solvent n-butyl alcohol: acetic acid; distilled water (5：1：4)
paper Toyo filter paper No. 50

口紙：東洋口紙 No.50
展開溶媒：n-ブチルアルコール：酢酸：水＝5：1：4
展開距離　10～15cm
検出　(a) マナスルライト（紫外線照射器）2536Åまたは3650Åを照射するとRf＝0.84附近に青緑色の螢光のスポットを認める。
(b) 塩化白金—ヨウ化カリウム混液を噴霧すると，同スポットは青らん色に呈色する。

5-2 紫外部吸収スペクトルによる方法

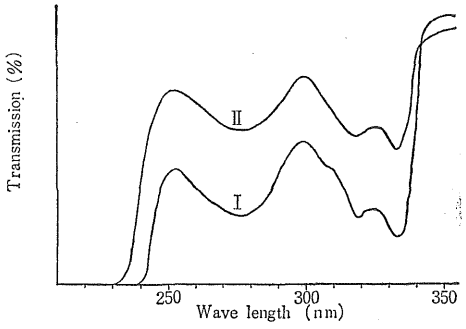


Fig. 2 Comparisino of UV absorption spectra of standard quinine and extract of tonic water
1 Tonic water extract
11 Standard quinine

試験溶液をキニーネ含量10～50ppmになるようにエーテルを加えて調製し，液層10 mmで220～260 nmを測定した透過度曲線は（Fig 2）に示すとおりであり，標準品と同一のパターンを示した。

5-3　赤外吸収スペクトルによる方法

試験溶液を水浴上で乾固したのち，真空検体乾燥器で乾燥したもののKBrタブレットによる赤外吸収スペクトルは（Fig 3）に示したとおりで，キニーネ標準

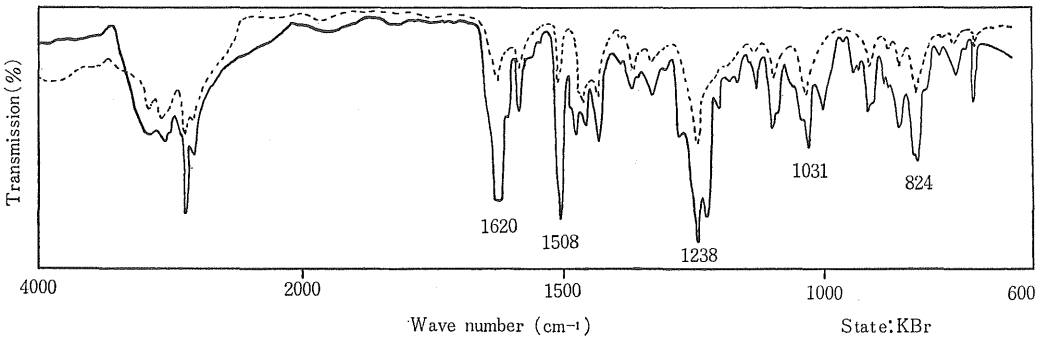


Fig. 3　Comarision of Infrared spectra of standard quinine and extract of tonic water

---------- Standard quinine

———— Tonic water extract

品を同様に処理したものと，同一の吸収スペクトルを示した。

5-4　螢光々度スペクトルによる方法

試験溶液を10～20m*l*のナス形フラスコに分取し，エーテルを留去する。

残留物に1 N硫酸をキニーネ含量1～10ppmになるように加えたものの励起波長，および励起波長352mμにおける螢光強度曲線は（Fig 4）に示したとおりであり，試験溶液と標準品は，いずれも同一のパターンを示した。

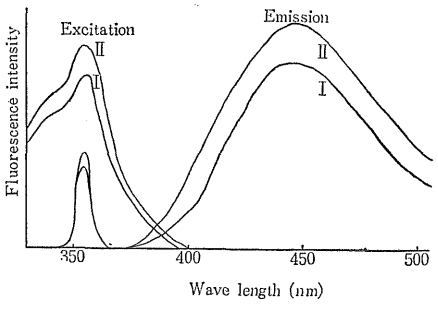


Fig. 4　Comparision of fluorescence spectra of standard quinine and extract of tonic water

I　Standard quinine

II　Tonic water extract

6　定量試験

前記抽出法と同様の操作を，おこなって得た残留物に，1 N硫酸100m*l*を加え，試験溶液とする。

試験溶液中のキニーネ含量が高い場合は1～10ppmになるように，一定量の1 N硫酸で希釈したのち，励起波長352nmにおける460nm附近の螢光強度を測定し，同時に作成した検量線により定量をおこなった。

〔3〕 市販品の調査結果および考察

1　昭和47年5月～8月にかけて市販されていた炭酸飲料水中のキニーネ含量の結果は（Table 1）に示すとおりである。

A社のトニックウォーターからは硫酸キニーネとして（以下キニーネという）22～27 ppm程度検出された。

しかし，同社の製品である炭酸水およびジンジャーエールからは検出されなかった。

B社については富山県で市販されていたトニックウォーターから88ppm検出されたが都内で市販されていたものからは検出されなかった。

C社のトニックウォーターのうち，キニーネが1 ppm，17ppm検出された2検体は食品衛生監視員が，スナックから収去したものである。

また，長野県で市販されていたものからは10ppm検出された。

Table I Quinine content in market aerated waters (May～August 1972)

Maker	Sample	Amount detected (ppm)	Note
A	Tonic Water	23	Tokyo
	〃	25	〃
	〃	26	〃
	〃	22	〃
	〃	24	〃
	〃	24	〃
	〃	27	〃
	Jinger Ale	—	〃
	Tansan	—	〃
B	Tonic Water	88	Toyama
	〃	—	Tokyo
	〃	—	〃
C	Tonic Water	17	Tokyo
	〃	1	〃
	〃	10	Nagano
	〃	—	〃
	〃	—	Toyama
	〃	—	Chiba
	〃	—	Tokyo
	Jinger Ale	—	〃
D	Tonic Water	67	〃
	〃	65	〃
	Soda Water	—	〃
	Lemonade	—	〃
	Cream Soda	—	〃

しかし，都内，富山県，千葉県で市販されていたもの，および同社の製品であるジンジャーエールからは検出されなかった。

D社については都内で市販されていたトニックウォーターから65～67ppm程度検出されたが，同社の製品である炭酸水，レモネードおよびクリームソーダからは検出されなかった。

2　昭和47年12月に都内で市販されていたトニックウォーター中のキニーネ含量についての結果は（Table 2）に示したとおりである。

Table II Quinine content in tonic water (December 1972)

Maker	Sample	Amount detected	Note
A	Tonic Water	36	
	〃	36	
B	〃	—	2
C	〃	—	3
D	〃	71	
	〃	72	
	cinchona sap	25,000	

A社については36ppm，D社については71ppmおよび72ppmのものが検出された。また，同社のトニックウォーター原液から25,000ppm検出された。

B社のもの2検体，C社のもの3検体についておこなったがいずれからも検出されなかった。

3　昭和48年5月に都内で市販されていた炭酸飲料水中のキニーネについての結果は（Table 3）に示したとおりである。

Table III Quinine content in aerated waters (May 1973)

Maker	Sample	Amount detected	Note
	Ramune	—	5
	Tansan	—	2
	Saida	—	8
A	Tonic Water	34	
B	〃	—	
C	〃	—	
D	〃	70	

A社のトニックウォータからは34ppm，D社のトニックウォーターからは70ppm検出された。

なお，B社，C社，の製品からは，検出されなかった。

また，A～D社以外の炭酸水であるラムネ5種類，タンサン水2種類，サイダー8種類について検査をおこなったが，いずれからも検出されなかった。

4　諸外国におけるキニーネの許可状況[4]

外国における清涼飲料水中のキニーネの許容量については（Table 4）に示すとおりである。

各国における許可基準は一定でなく，キナ抽出物のみを許可している国，キニーネ塩を許可している国，

Table IV ***Official order permitting the use of Quinine in Soft drinks***

Country	Amount permitted	Note	Country	Amount permitted	Note
Belgium	100ppm	a	France	70ppm	c
Netherlands	40*	a	U. S. A	83	c
Norway	100	a	Australia	40	
Switzerland	80	a	Brazil	50	
Yugoslavia	83	a	Canada	+	
Austria	80	b	Italy	+	
Denmark	100	b	Morocco	+	
Finland	100	b	Poland	+	
India	100	b	Portugal	80	
Tunisia	80	b	South Africa	100	
Germany (FR)	80	c	Sweden	100	
Spain	83	c	West Pakistan	+	

(a) as quinine hydrochloride
(b) as quinine sulphate
(c) as quinine

* minimum permitted

また，最高を規定している国もあれば最低を規定している国もありまちまちである。

西ドイツにおいてはキニーネとして1 *l* あたり最低25mg 最高 80mg の基準を設けかつ標示を義務づけている。

アメリカにおいては炭酸飲料水の着香料として83 ppm，イギリスにおいてはキニーネとして1パインあたり½グレイン以上となっている。

いずれにしても (Table 4) から明らかなように最高値を定めているすべての国が 100ppm 以下を許容量としている。

〔4〕 おわりに

現在わが国においてはトニックウォーターという飲料水の存在は一般的に知られていず，ましてやその中に苦味を出すため，いわゆる香味料としてキニーネが添加されていることはほとんど知られていない。

近年，世界的にトニックウォーターの生産量が増大していることから考えて，わが国も将来消費の増大が見込まれる。

現在，国内で市販されているトニックウォーターの使用実態や検出量からみて，有害性の危れは考えられないが諸外国の例からみて，将来わが国においてもトニックウォーターにキニーネを添加することについて，何らかの行政上の配慮が必要と思われる。

なお，本報は第25回日本食品衛生学会に発表したものである。

文　献

1) 野村鉄男：New Food Industry, 14 (5), 49～53 (1972).
2) Hey, H.：Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch., 148, Heft 1 (1972).
3) van Gils, W. F. and Hidskes, G. G.：Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsh., 148 (2), 89, (1972).
4) 日本貿易振興会：世界の食品規格，規則（ジェトロ トレード ブックス）(1969).

薄層クロマトグラフィーによるかんきつ果実中のジフェニルの定量 (第3報) シリカゲルとエタノールの相互作用

鈴木二郎* 友松俊夫* 冠 政光*
中沢久美子* 片倉栄一* 木村康夫*

DETERMINATION OF BIPHENYL IN CITRUS FRUITS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (III) INTERACTION OF ETHANOL WITH SILICA GEL SURFACE

Jiro SUZUKI, Toshio TOMOMATSU, Masamitsu KANMURI, Kumiko NAKAZAWA, Eiichi KATAKURA and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Detection of biphenyl in citrus fruits has been made by means of Thin Layer Chromatography-Ultra Violet absoption (TLC-UV) procedure in Japan. However, as it was reported in the previous paper, recovery rate of biphenyl is greatly varied according to the solvent used.

Thus in this paper, the mechanism of interaction between the surface of silica gel layer and the solvent are discussed as well as the selection of the suitable solvent which should be adsorpted for this porpose.

Results obtained are summarized as follows:

1) It was found that immersed ethanol layer on silica gel particle showed a decline of transparency of the solvent begining at 210mμ, and the phenomenon was continiously absorved even on the solvent applied after the several times washings of silica gel specimen.
2) The diffuse reflection IR spectra of the evaporated residue of the ethanol layer, have strongly support the possibiliy of chemical or physical reaction of alkyl groups of ethanol with silica gel particle.
3) In order to recover all the biphenyl from 0.3g of silica gel, it was found that 5 ml of a solvent consisting of 98 volumes of cyclohexane with 2 volumes of ethanol is the most suitable one, since it contains the most appropriate amount of ethanol to cover the silica gel surface as single molecule layer.

*東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

1 緒 言

かんきつ果実中のジフェニル定量法として薄層クロマトグラフィー・紫外部吸収スペクトル法が用いられている。[1] これはシリカゲル薄層プレート上に展開されたジフェニルをシクロヘキサンあるいはエタノールなどの溶媒を用いて抽出する方法である。

われわれは，さきに，ジフェニル抽出の効率が溶媒の種類によりどのように変動するかを実験的にしらべた結果，シクロヘキサンではジフェニルのシリカゲルに対する吸着が無視できず，したがって回収も不充分であるが，エタノールでは吸着効果が無視されるほど小さいということからジフェニルの回収は完全に行なわれることを知った[2)3)]。

しかしながら，シクロヘキサンを用いるとブランクには吸収が認められないが，エタノールを用いると220mμ 附近に強い吸収を示すのみならず，その吸収端はジフェニルの吸収領域（248mμ）にもおよぶため，紫外部吸収スペクトル法により，ジフェニル濃度を測定するにさいして，何らかの補正をしなければならない。

このことは，シリカゲルがエタノールに溶解する為と考えられるが，アルコール類がシリカゲル表面のシラノールグループと化学的に反応することはよく知られている。しかし，その知見はほとんど200°C以上の反応温度で得られたものであり，室温でも同様に反応するかどうかは知られていない。

そこで，われわれは室温でシリカゲルをエタノール処理した場合，その上澄液が透過率の減少をきたすという事実から，その原因を究明する目的のため，ジフェニルを薄層プレートから抽出するさいのエタノールとシリカゲルの相互作用について検討した。なお，シリカゲルに吸着したジフェニルを効率よく回収し，しかも，紫外部吸収によるジフェニル濃度の測定に支障のない新しい溶媒系についても併せて検討をおこなった。

2 実験操作

2-1 試薬，器具および装置

〔試薬〕シクロヘキサン（和光純薬，特級），エタノール（和光純薬，特級），薄層クロマトグラフ用シリカゲル（H および HF_{254}・メルク社製），ジフェニル（99.5%東京化成・エタノールから再結晶した）

〔器具・装置〕

分光光度計：島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50L型

赤外分光光度計：日本分光 IRA—2型赤外分光光度計

粉体反射測定装置：日本分光D—31型粉体反射装置

真空凍結乾燥機；共和式真空凍結乾燥機 RL—20NA型

2-2 ジフェニルの回収実験

エタノール含量 0.05，0.1，0.2，0.5，1.0，2.0，5.0 および 10.0%になるように，それぞれ添加したジフェニル・シクロヘキサン溶液 5 ml を共栓試験管にとり，シリカゲル 0.3 g を加えて吸着平衡に達せしめたのち，毎分 4,000 回転で遠心分離し，上澄液のジフェニル濃度を紫外部吸収スペクトル法により測定し回収率を求めた。

2-3 シリカゲル溶出物の測定

エタノール 5 ml にシリカゲル0.3 g を加え 5 分間振盪したのち，遠心分離し上澄液の紫外部吸収スペクトルを測定した。また，沈澱したシリカゲルに再び 5 ml のエタノールを加え，同様の操作を行なう。この操作を十数回繰り返し，そのつど紫外部吸収スペクトルを測定した。

2-4 エタノール処理後のシリカゲルの性状

前項と同様に処理した後の沈澱部のシリカゲルと上澄液を室温で蒸発乾固させて得られた白色の粉末を，それぞれ凍結乾燥器を用いて室温，10^{-2}torr で一週間乾燥する。それぞれの試料を粉体反射赤外吸収スペクトルを用いて測定した。

3 結果および考察

3-1 シクロヘキサン・エタノール 混合 溶媒によるジフェニルの回収

前報で述べたように，シリカゲルに吸着したジフェニルを溶媒抽出する場合，シクロヘキサンを溶媒として用いるとジフェニルの回収は不充分であるがエタノールを用いれば回収は，ほとんど 100 %達成される。しかしながら，後者では遠心分離後の上澄液の紫外部吸収スペクトルに未知物質のバックグランドが現われ，ジフェニル濃度を簡単に決められないという欠点がある。そこで，エタノール・シクロヘキサン二成分系の溶媒によるジフェニルの抽出効果に注目した。

まず，エタノール0.05～10.0%を含むシクロヘキサンを溶媒としてジフェニルのシリカゲル 0.3 g よりの回収率を前報と同様の方法で行なった実験結果を Fig. 1 に示す。

図から明らかなように，エタノールの割合が増える

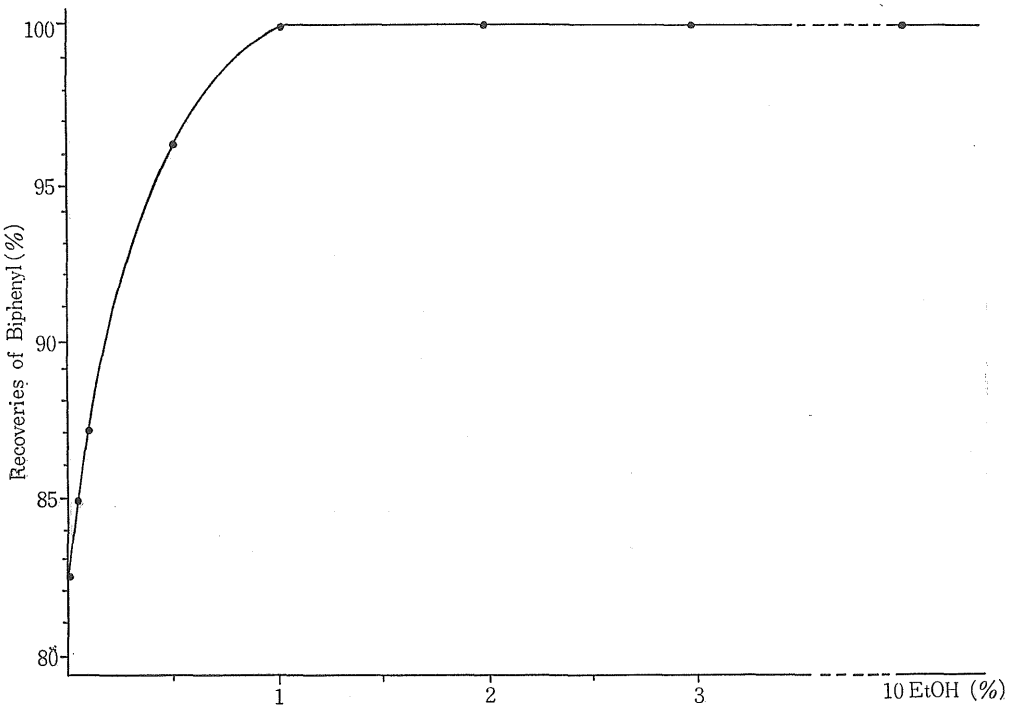


Fig. 1. Recoveries of Biphenyl by EtOH-Cyclohexane Silica Gel 0.3g

とともに回収率が急激に上昇し，ほぼ2％以上になるとジフェニルの回収率はほとんど100％に達することがわかった。このことはエタノールをシクロヘキサンに約2％加えればジフェニルがシリカゲルに実質的に吸着しないことを意味する。シリカゲル0.3 gの表面はおよそ 10^{21} 個の水酸基があると思われる*。一方，2％エタノール 5 ml もエタノール分子数約 10^{21} 個に相当する。したがって，このことは，シリカゲルに吸着したジフェニルのすべてを抽出するにはシリカゲル表面を単分子層で覆うていどのエタノールを添加すれば充分であることを意味している。また，エタノールよりシクロヘキサンの方がジフェニルをよく溶解するにもかかわらず，エタノールを含むシクロヘキサンあるいはエタノールだけを用いて抽出する方がジフェニルの回収が良いということは，エタノールがシリカゲル表面と強く相互作用してジフェニルの吸着を阻止するためと思われる。そこで，この点について検討をおこなった。

3-2 シリカゲルのエタノールへの移行

シリカゲルをエタノール処理し遠心分離後，上澄液

*シリカゲル0.3 gの表面積を $150\times10^4 cm^2$ とし，水酸基が $1 cm^2$ あたり 10^{15} あると仮定した。

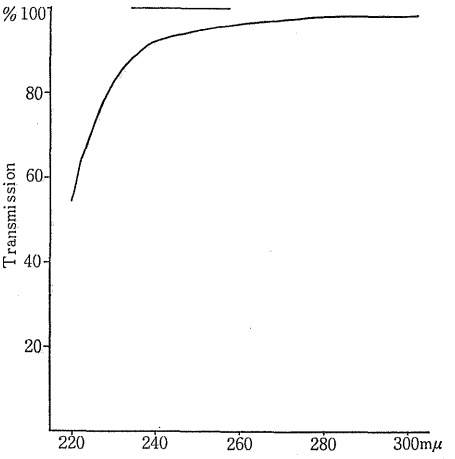


Fig. 2. UV Absorption Spectra of Silica Gel-treated Ethanol

の紫外部吸収スペクトルはFig. 2から明らかなように短波長側に強い吸収を示すことがわかった。

これが投射光の散乱によるものか，あるいは何らかの吸収物質の存在を意味するものか明らかではないが，この上澄液を濃縮すると白いシリカゲル様の物質が析出する。このことはシリカゲル表面の一部がエタノール層に移行することを示すものと考えられる。この上

澄液が完全な溶液かどうかはわからないが，この移行を一応溶出としておく。

次に，上澄液を分離した残りのシリカゲルを再びエタノールで処理する操作を十数回繰り返し，そのつど上澄液の紫外部吸収スペクトルを測定した。いま，248mμ における吸収をもって溶出物に由来する吸収強度と見なし，その強度をエタノール処理の回数に対してプロットしたところ Fig. 3 に示す結果を得た。

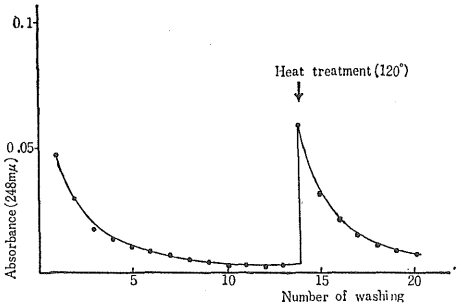


Fig. 3. EtOH Treatment of Silica Gel

この図が示すように，はじめは多く溶出し除々に少なくなるが十回以上エタノール処理を繰り返しても溶出がとまることはなかった。このことにより，この吸収はシリカゲル自身に由来するものであると考えてよいであろう。また，シリカゲルを加熱すると，溶出物の吸収強度が増すことも，このような説明と矛盾しない。

なお，螢光剤入りシリカゲルと市販シリカゲルを比較しても同一の吸収を示すことから螢光剤が問題の吸収を与えるとは考えられない。

3-3 シリカゲル表面の反射赤外吸収スペクトル

シリカゲルをエタノール処理し，その可溶部と不溶部のそれぞれについて粉体反射赤外吸収スペクトル法により表面の性状をしらべた。可溶部の試料は溶媒を室温で蒸発乾固したのち 10^{-2}torr で乾燥したものを，また，不溶部つまり沈澱したシリカゲルも同様にして乾燥させたものを試料とし，それぞれ粉体反射赤外吸収スペクトルを測定することより表面物質をしらべた。得られたスペクトルを Fig. 4 に示す。

両試料とも 2950～2850cm^{-1} にかけてC—H基による伸縮振動の吸収を有しており，したがってアルキルグループが存在すると考えられる[5) 6)]。シリカゲルの未処理のものはかかる吸収を示さなかった。このことより，可溶部と不溶部のシリカゲルはともにアルキルグループを保有していること，いいかえれば両者の間

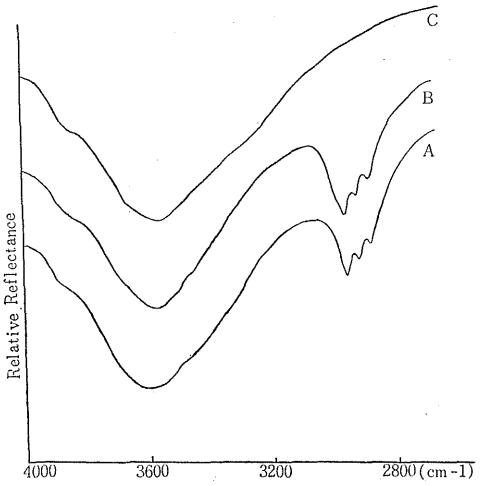
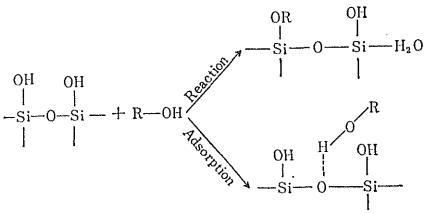


Fig. 4. The diffuse reflection IR spectra of native and EtOH-treated Silica Gel

A Soluble
B Insoluble } Silica Gel
C Native

に化学的な差は見られず，他方，溶出したシリカゲルは微細な物理的形態を示した。

また，0.1，0.5，2.0％のエタノールを添加したシクロヘキサンでシリカゲルを処理した場合も沈澱部のシリカゲルは 2950～2850cm^{-1} に吸収を示し，エタノールの量が単分子層以下であってもアルキルグループを保有することを示した。これらのアルキルグループがすべてシラノール基とエタノールの脱水縮合により生成したとする証拠はない。強く吸着したエタノールに由来する可能性があるからである。いずれにしてもエタノールはシリカゲルと下に示すように，一部は反応し他は吸着していると考えられる。



4 結 論

1～2％エタノールを含むシクロヘキサンを抽出溶媒として用いると，シリカゲル 0.3 g に吸着したジフェニルはすべて回収されるのみならず，上澄液の紫外部吸収スペクトルにおいても問題の欠点を最小限に留めることが判明した。この混合溶媒におけるエタノー

ルの役割はシリカゲル表面のシラノールグループと強く相互作用することにより，ジフェニルの吸着を抑制するためと考えられる。

以上のことから，前報で行なった一点スポット法を併用して分析を行なうと，シリカゲル量が約0.02 g と極めて少量ですむ，したがって，このシリカゲル表面を単分子層で覆うエタノール量も 0.2 %でシリカゲルに吸着したジフェニル全量を回収出来ることが判明した。

本報は，昭和48年 4 月，日本薬学会第93年会，分析化学部会において発表した。

5 謝 辞

本研究の実施にあたり，粉体反射赤外分光光度計利用の便宜を与えられた日本分光（株）に感謝します。

文 献

1) Official Method of Analysis of A. O. A. C, 11th Ed., 490 (1970)
2) 鈴木二郎，友松俊夫，冠政光，押田久美子，片倉栄一，木村康夫：東京都立衛生研究所研究年報，23，231 (1971)
3) 鈴木二郎，友松俊夫，冠政光，押田久美子，片倉栄一，木村康夫：東京都立衛生研究所研究年報，23，237 (1971)
4) Lowen, W. K and Broge, EC: J. phys. chem., 65, 16 (1961)
5) 北原重登，浅野利之介：日本化学雑誌，92，773 (1972)
6) 宇津木弘：日本化学雑誌，92，2237 (1972)

生あん中のシアンの定性定量法について

上田　工*　勝木康隆*　安田和男*
佐藤彌代子**　木村康夫*

DETERMINATION OF CYANIDE IN BEAN PASTE

Kou UEDA, Yasutaka KATSUKI, Kazuo YASUDA, Yayoko SATO and Yasuo KIMURA

(Division of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Division of Food Additives, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Recently a large amount of beans, which naturally containing cyanide glycoside in them, are imported from various countries, and used for the preparation of bean paste.

Detection and determination methods for cyanide in bean paste and beans are given in the Ordinance of Japanese Food Sanitation Law as a component specification. However, the procedures are not satisfactory for the testing and they may be improved. Thus, in the present paper, methodology for the detection of cyanide in bean paste is discussed according to the specification of the component.

1) Qualitative Determination: In the conventional method, it has been decided that the test should be made under an acidic state by tartaric acid, but it is not adequate to apply it to the substance containing in the state of cyanide glycoside. Therefore, the method is modified to perform under the weakly alkaline condition with ammonia. The limit of the test obtained with this procedure was 5.0μg, and the results were satisfactory.

2) Quantitative Determination: The titration with silver nitrate is not suitable for fine quantitative determination as its endpoint is obscure and the sensitivity is poor. Thus, the method was replaced by the pyridine-pyrazolone method. The recovery of standard cyanide by the destillation through the modified procedure was 90～93% and the detection limit obtained was 2.5μg.

はじめに

でん粉性の豆類を煮て，すりつぶしたものを〝生あん〟と称し，生あんに砂糖を加えて加熱しながら練り上げたものが，〝あん〟（練りあん）である。

製あん原料としては，シアン含有雑豆（いわゆるシアン豆で，バター豆，サルタニ豆，サルタピア豆，ライマ豆をいう。）が東南アジア諸国から大量に輸入されている。シアン豆は，製あんという日本的かつ特殊な用途に使用する場合，その製造過程でシアンが除かれるため，目的を限って輸入が許可されている。

＊東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
＊＊東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

シアン豆中のシアン化合物は，ケトンのシアンヒドリン配糖体であって，酸または酵素によって容易に糖とシアンヒドリンに分解し，シアンヒドリンはさらにケトンとシアンとに分解する。

一定条件（生あんの製造基準）のもとで製造すれば，シアンを除去できるとされているが，実際の製造にあたって，各製造所毎に条件はさまざまである。多量の豆を槽いっぱいに処理したり，煮熟不充分であったり，その他処理操作が不完全なために，ときどきシアン含有の生あんが発見される。

生あんおよび豆類中のシアンの検査法は，食品衛生法に成分規格として定められているが，改良すべき点がいくつか見うけられる。また，制定されてから，すでに十数年を経過し，その間に各種の試験法が開発されているので，この点も考えあわせ，今回この成分規格にそって検査法の検討を行った。

実験の部

1　試　料

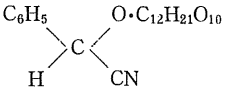
生あん（小豆，テボ，うずら豆，バター豆，ライマ豆，サルタピア豆を原料とする各種あん）

2　定性試験

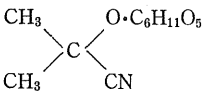
生あんの成分規格によると，〝生あんはシアン化合物の検出されるものであってはならない〟とされている。この場合のシアン化合物の検出法は，乾燥物10g[註1]に相当する生あんをとり，豆類の成分規格の検出法を準用することになっている。すなわち，クエン酸緩衝液50m*l* を加え，ピクリン酸紙をつるしたコルク栓で密栓し25～35° でときどき静かに振り混ぜながら，3時間放置した後酒石酸2g を加え，ただちにさきのコルク栓で密栓し，ときどき振りまぜながら50～60° で1時間放置するときシアン化合物が存在すればピクリン酸紙は赤褐色に変る，というものである。

この検出法（以後ピクリン酸紙法と称する）は，簡便で広く用いられてきた。今回このピクリン酸紙法に改良を加える意味でいくつかの条件の検討を行った。

南方産 Phaseolus 属のインゲン豆に含まれるシアン配糖体（アァゼオルナチン）は，キョウニン中のアミグダリンとよく似た構造を有し，同様の作用機序で分解が進むものと考えられるので，キョウニン水（局方）を用い，標準溶液を調製して実験を行った。



Amygdalin



Phaseolunatin

(1)　試薬の調製

(i)　アンモニア（特級）

(ii)　クエン酸緩衝液

クエン酸（特級）128.1g，水酸化ナトリウム（特級）64.4g を水に溶かし1000m*l* とし，用時10倍容にうすめクエン酸，水酸化ナトリウムで pH を5.9に調製する。

(iii)キョウニン水標準溶液

キョウニン水（局）を0.01N硝酸銀溶液で滴定し1m*l* 中の総シアン（mg）を算定する。シアンとして10.0mg に相当する量をとり，水で 1000m*l* とする。総シアンの⅓は遊離シアンの形で存在する。

キョウニン水標準溶液1 m*l*＝0.01mg CN

(iv)シアン標準溶液

シアン化カリウム（特級）2.5g に水を加えて溶かし 1000m*l* とする。0.01N 硝酸銀溶液で滴定し1 m*l* 中のシアン（mg）を算定する。

シアンとして 10mg に相当する量をとり水で100m*l* とする。つぎにこの液 10m*l* を 100m*l* のメスフラスコにとり，0.1N 水酸化ナトリウム溶液 50m*l* および水を加えて 100m*l* とする。

シアン標準溶液1 m*l* ＝ 0.01mg CN

(v)　ピクリン酸紙

ろ紙（東洋ろ紙 No. 50）を1％ピクリン酸水溶液に浸し，室温で乾燥したのち，10×40mm の大きさに切る。

(2)　条件の検討

（i）　酵素分解について

クエン酸緩衝液を加えて，25°～35° で3時間放置する操作は，酵素（Linamarase）を働かせて分解を行ない，シアンを遊離させるためのものであるが，本操作は，十分に加熱処理した後のあんについては省略してさしつかえない。

実際に試験を行った場合，3時間放置することによりかえって感度は低下する。

註1　乾燥物10g に相当する生あんの量

生あん中の水分（105° 乾燥減量）は生あん2～3g を精秤し，常法により105° で3～5時間乾燥し，生あん中の水分含量（％）を求める。

この方法により，生あん数種を試験したところ水分含量は，59～62％であった。したがって乾燥物10g に相当する生あんの量は24.5～26.7gである。

（ii） キョウニン水標準溶液による定性試験

キョウニン水標準溶液を用い，成分規格試験を行ない，シアン標準溶液との比較を行った。キョウニン水およびシアン標準溶液からそれぞれシアンとして，2.5 μg～250μg に相当する量をとり，酒石酸酸性で常法により試験を行った。(pH2.5) その結果シアン標準溶液の 5 μg，25μg，50μg はそれぞれキョウニン水の25 μg，125μg および 250μg とよく一致したことにより，遊離シアンのみ反応したものと思われる。(写真１)

（iii） 酒石酸酸性とアンモニアアルカリ性の比較

キョウニン水標準溶液を用い，シアンとして2.5μg，25μg，50μg，125μg，250μg に相当する量をとり，酒石酸酸性（pH2.5）およびアンモニアアルカリ性（pH 8.0）による発色の程度を比較した。この結果，アンモニアアルカリ性の呈色度は酒石酸酸性の時の５倍量になり，（写真２）成分規格法によるシアン標準溶液の呈色度と一致した。(写真３)

検出限度は 5 μg である。

（iv） 定性試験の最適 pH

生あん 25g にキョウニン水標準溶液 5 ml（CNとして50μg）を添加しクエン酸緩衝液50ml を加え，pH5.9 としたのちさらに10％アンモニア水および10％酒石酸溶液を用いて，pH 3.0～12.0に調製し，ピクリン酸紙法を行った結果弱酸性～中性～弱アルカリ性の広い pH 域でよく発色する。強アルカリ性ではピクリン酸紙の発色はほとんどみられない。(写真４)

（v） 発色時間

生あん25g にクエン酸緩衝液 50ml を加え，キョウニン水標準溶液 5 ml（CNとして 50μg）を添加し pH 8.0 に一定して，50°～60° の水浴上で呈色度の経時変化を観察した。はじめの15分では，ほとんど変化はないが，30分経過後より急速に発色する。75分で最大となり，以後変らないが，時間の経過と共に着色部分が，フラスコ内の蒸気で流れ出し不明瞭になるおそれがある。(写真５)

（vi） 10％炭酸ナトリウム溶液の量

10％炭酸ナトリウム溶液の液量は規定されていないが発色条件をそろえ，比較検討に便利な様に毎回一定量とした。マイクロシリンジで20μl をとり，ピクリン酸が流れないよう滴板上で注意して吸収させる。

（vii） ピクリン酸紙の保存性

ピクリン酸紙の感度は，この試験の最も重要なポイントである。

今回の実験には，すべて新製のものを用いたが，この点については現在検討中である。

（viii） Gutzeit 法の応用

三角フラスコにコルク栓でピクリン酸紙をけん垂する方法のかわりに，ヒ素試験装置を応用し，シアンの比色を試みた。

実験例が少なく，ここで結論を述べることはむずかしいが，有用性があり，さらに検討を加える予定である。

3 定量試験

シアンの定量分析は豆類にのみ定められているが実務上，生あんから定性試験によってシアンが検出された場合，行政指導する上で含有量を調査する必要がある。そのため，定量試験は，豆類だけでなく生あんの場合も必要とされる。

豆類の成分規格に定められている定量分析法は，水蒸気蒸留後，ヨウ化カリウム溶液を指示薬とした硝酸銀滴定法である。

硝酸銀滴定法は，検出感度が悪く実用的ではない。硝酸銀法の改良法，およびこれにかわる試験法として，比較的妨害物の影響が少なく，微量のシアン測定に適しているといわれる，日本工業規格 K 0101，ピリジンピラゾロン法の応用を試みた。

(1) 試薬の調製

(i) 水酸化カリウム（特級）

(ii) 酒石酸（特級）

(iii) シリコン（信越化学 KM 681 F）

(iv) 酢酸（特級）

(v) フェノールフタレイン（特級）

(vi) クロラミンT（特級）

クロラミンT 1.25g を水に溶かして 100ml とする。用時調製する。

(vii) リン酸緩衝液

リン酸一カリウム 3.40g とリン酸二ナトリウム（無水）3.55g を水に溶かして全量を 1000ml とする。（pH 6.8）

(viii) ピリジンピラゾロン試液

1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 0.25g を 75° の温水 100ml に溶かして室温まで冷却し，これにビス（1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン）0.02gをピリジン（特級）20ml に溶かした液を，加えて混合する。用時調製する。

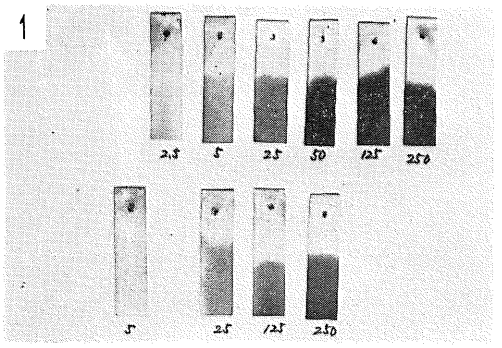
(2) 装置および機器

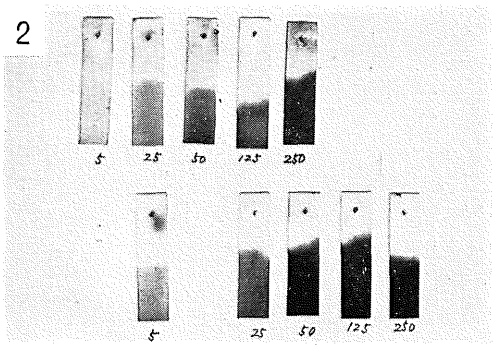
加熱蒸留装置（マントルヒーター100 V 4.5 A）

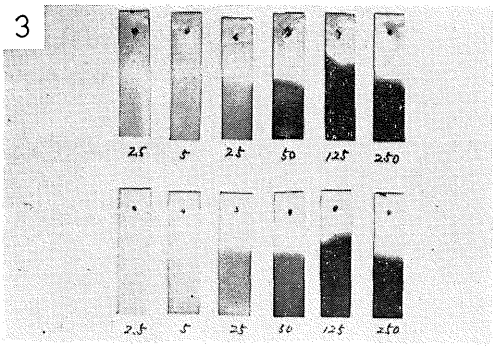
自記分光光度計（日立，EPS-3T形）

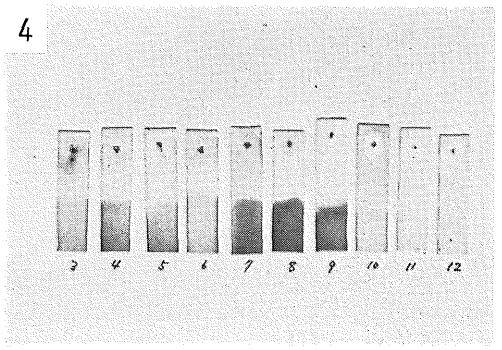
pH メーター（日立堀場 M 5 型）

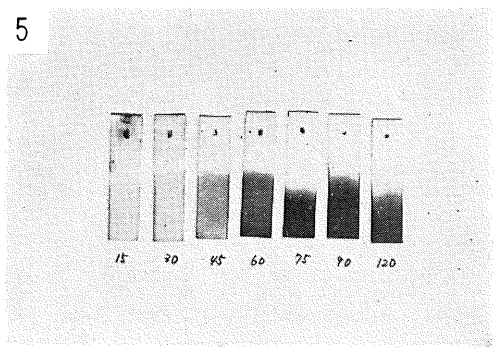
(3)蒸留条件の検討











写真説明　1　pH 2.5で実施したときの呈色度，上段はKCN，下段はキョウニン水，数字はCN μg を示す。
2　上段はpH 2.5，下段はpH 8.0の場合のキョウニン水の呈色度で，数字はCN μgである。
3　上段はpH 2.5におけるKCN，下段はpH 8.0におけるキョウニン水の発色で，数字はCN μgである。
4　キョウニン水の発色に与えるpHの影響，数字はpH値を示す。
5　発色時間の検討，数字は50～60°における放置時間（分）を示す。

（i） 蒸留法について

成分規格の定量分析法に規定されている水蒸気蒸留法は装置の規模が大きくなるのと蒸留速度を調整するのが困難であるので，加熱蒸留法を用いた。蒸留速度を一定に保つためマントルヒーターを用い，スライドトランスで電圧の調整を行う。(Fig. 1)

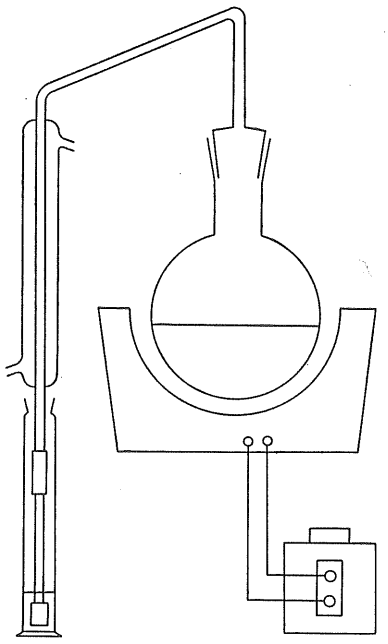


Fig. 1. Apparatus used for the distillation

（ii） シアン留出速度

すでに，「工場排水試験方法の改正 JIS 説明会テキスト」において述べられているごとく，留出速度とシアン回収率とは密接な関係があり留出速度が大であるほど，回収率は低下する。また，この傾向は，シアン含有量が少ないほど大きい。同テキストを参照し，2.0m*l*/min, 2.5m*l*/min および3.0m*l*/min を比較したが，大きな差は認められなかった。今回は3.0m*l*/minを採用した。(Table 1)

（iii） pH とシアン回収率

生あんにキョウニン水標準溶液 4 m*l* を添加，pH 1.0～8.0で回収実験を行った。

留出速度30m*l*/min，留出液量50m*l* で Table 2 の結果が得られた。

Table 1. Relation between distillation speed and recovery rate of cianide

Rate / No.	CN Recovery (%)		
	3.0 ml/min	2.5 ml/min	2.0 ml/min
1	91.3	87.5	85.6
2	91.9	85.0	88.7

Table 2. Effect of pH on the recovery rate

pH	Recovery (%)
1.0	27.9
2.0	52.9
3.0	91.5
4.0	92.5
5.0	94.0
6.0	89.2
7.0	79.6
8.0	56.3

（iV） 受器および捕集液

受器として，底の広い三角フラスコでは捕集が不完全なため，100m*l* の共栓メスシリンダーを用いた。また特に蒸留初期に集中的に留出するため捕集液が5％水酸化カリウム 5 m*l* では十分な吸収ができず回収率にバラツキが生じ易い。このため捕集液量を 30m*l* として捕集液のアルカリ濃度の検討を行った。生あん 25g にキョウニン水 5 m*l* (5000 μg CN) を添加，pH 4.5 で蒸留し，留出液量 50m*l* で行った。その結果を Table 3 に示す。

Table 3. Effect of alklainity of the absorption liquid (%) on the recovery of cianide

Concentration of KOH	Recovery
1 %	92.0%
2 %	88.0%
4 %	89.4%
8 %	87.4%

（v） 蒸留液量とシアン回収率

バター豆を用いて，採取液量の検討を行った。pH 4.5，3.0m*l*/min で蒸留，捕集液1％水酸化カリウム 30m*l* として，30m*l* づつ順次留液を分取したところ Table 4 の結果を得た。

（vi） 蒸留装置末端部分の改良

蒸留装置の末端にバブラーを用いることにより捕集

Table 4. Relation between quantity of distillate and recovery of cianide

Item	Distillate (ml)	Quantity detected (μg)	Recovered per cent
Fraction 1	0～ 30 (30ml)	640.0	93.8%
〃 2	～ 60 (30〃)	30.2	4.4%
〃 3	～ 90 (30〃)	8.9	1.3%
〃 4	～120 (30〃)	3.3	0.5%
Total	0～120(120ml)	682.4	100.0%

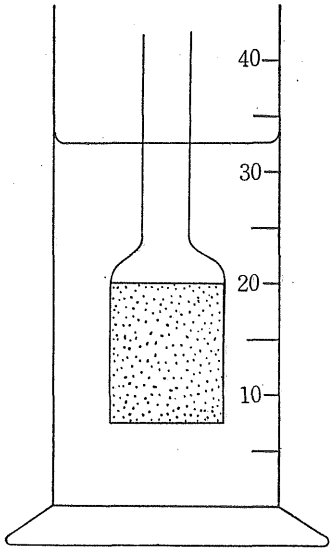


Fig. 2. End of the distillation apparatus (bubbler No.2)

のバラツキがなくなり回収率も，向上する。(Fig. 2) シアン添加量40μg で蒸留し比較したところ回収率(%)は Table 5 のようであった。

(vii) KCN とキョウニン水の回収率の比較

pH 4.5 で蒸留するとき，KCN とキョウニン水とではほぼ同様に回収される。(Table 6)

(4) 硝酸銀滴定法

0.01N硝酸銀溶液を用いて検出限度の試験を行った。(成分規格，定量分析法では0.05N硝酸銀溶液の使用が規定されている。) シアン化カリウム標準溶液を用い，10%ヨウ化カリウム溶液を指示薬とした場合，白

Table 5. Effect of bubbler on the recovery of cianide

Without bubbler		With bubbler	
No.	Recovery (%)	No.	Recovery (%)
1	81.9	1	92.0
2	63.8	2	91.3
3	63.4	3	90.4
4	78.8	4	90.4
5	70.7	5	91.3
6	55.2	6	92.5
7	64.0		
8	55.4		
9	55.6		

Table 6. Recovery tests made on KCN and Aqua armeniacae at pH 4.5

No.	Recovery (%)	
	KCN St. sol.	Aq. armen.
1	86.9	90.6
2	86.9	90.0

濁を生ずるまで滴定を行ったところ，終末点は判断し難く，検出限度は 0.1mg であった。なお，ヨウ化カリウム溶液にさらに，10%アンモニア水 1 ml を添加してアルカリ性で滴定を行うと，終末点の判定は同様に困難ではあるが，検出限度は 0.05mg まで向上する。

改良法として，指示薬に p- ジメチルアミノベンジリデンローダニンアセトン溶液を用いた場合，終末点は見易いが，やはり検出限度は 0.1mg である。(1.0～4.0mg の範囲ではやや正確に測定できる。)

成分規格の定量分析法では0.05N硝酸銀溶液を使用することになっているので，いずれの方法によっても，検出感度はさらに悪くなる。

(5) ピリジンピラゾロン法

この方法は，シアンを加熱蒸留して，アルカリ液に吸収させたのち，中和して，クロラミンTおよび，ピリジンピラゾロン試液により生ずる青色の吸光度を測定する方法である。Fig. 3 にその吸収曲線を示す。なお，キョウニン水標準溶液は，シアン標準溶液と全く同様の色調を呈する。

(i) ピリジンピラゾロン法の発色の安定性

常法により発色させ，自記分光光度計で波長を 620 mμ に固定して呈色液の吸光度の経時変化を測定した。Fig. 4 にその変化の状態を示す。

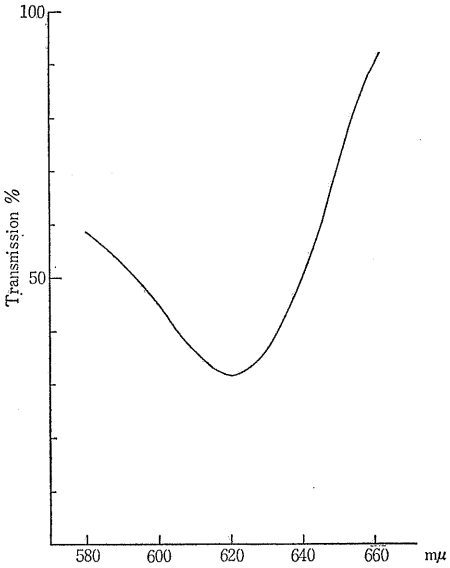


Fig. 3. Absorption spectrum of cianide obtained through pyridine-pyrazolone Method

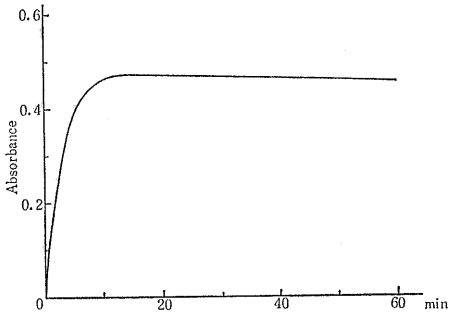


Fig. 4. Stability of pyridine-pyrazolone Method

発色後15分で安定な青色となり，40分後からわずかに減少を始めるため，測定には15分～30分の間が適当である。

（ii） 検量線

キョウニン水標準溶液の10倍稀釈液（0.001mg/m*l*）0.5～10m*l* をとり発色させて得られた検量線を Fig. 5 に示す。上記標準溶液の範囲において直線性を示した。

結果および考察

以上の実験から得た結果を，定性試験法および定量試験法として以下に要約する。

1 定性試験法（ピクリン酸紙法）

生あん25gを 200m*l* 三角フラスコにとりクエン酸緩

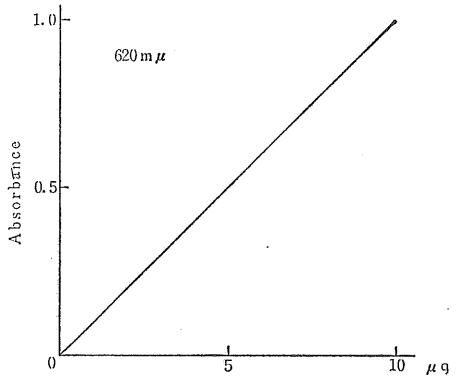
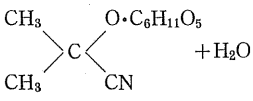


Fig. 5. Calibration curve of standard CN

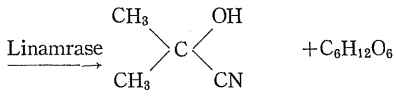
衝液50m*l* を加えた後，5％アンモニア試液 1 m*l* を入れ，pH 7.0～8.5 とする。直ちにピクリン酸紙をつるしたコルク栓で密栓し，ときどき振り混ぜながら，水浴上 50～60° で 1 時間以上加温する。シアン化合物が存在すれば，ピクリン酸紙は橙色～赤褐色に変る。ピクリン酸紙は，用時10％炭酸ナトリウム溶液で下端をうるおす。

検出限度は 5.0μg である。

ファゼオルナチン（$C_{10}H_{17}NO_6$ mp141°）は酵素により，水の存在で α- ヒドロキシイソブチロニトリルとグルコース各 1 分子に分解し，

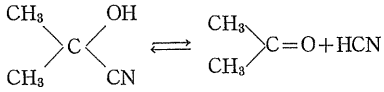


Phaseolunatin

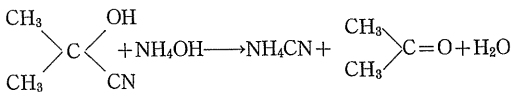


α-hydroxy isobutyronitrile

α- ヒドロキシイソブチロニトリルは水溶液中でアセトン＋シアンと平衡を保つと考えられる。



結合シアンの，強酸性および強アルカリ性における加水分解では，シアン発生量は非常に少なく，中性付近におけるそれに及ばない。アンモニア弱アルカリ性で，α- ヒドロキシイソブチロニトリルは，分解してアセトンとシアン化アンモニウムを生じ，



また，遊離のシアン化水素もアンモニアと反応してシアン化アンモニウムになると考えられる。

$$HCN+NH_4OH\longrightarrow NH_4CN+H_2O$$

ピクリン酸紙法による定性試験の場合，中～弱アンモニアアルカリ性で実施することにより，シアン発生量が大きく，安定した呈色度が得られる。

2　定量試験法

(1)　試験溶液の調製

生あん25gを500m*l*丸底フラスコにとり水200m*l*および5％酒石酸 1 m*l*を加え（必要があれば消泡用シリコン樹脂数滴を加える。）蒸留管をつけて，加熱蒸留する。受器は100m*l*広口共栓メスシリンダーを用いあらかじめ1％水酸化カリウム溶液30m*l*を入れておく。蒸留装置の末端はバブラーを用い水酸化カリウム液中に浸しておく。留出速度3.0m*l*/minで受器中の液量が90m*l*になったら蒸留をやめる。(回収率は90～93％である）留出液はフェノールフタレインを指示薬として10％水酸化カリウムおよび10％酢酸を用いて中和し，水で全量を正確に 100m*l* として試験溶液とする。

(2)　ピリジンピラゾロン法

簡易定性試験で得た結果から，試験溶液の 0.5～20 m*l* を 50m*l* の共栓比色管にとる。水で 20m*l* にした後，緩衝液 10m*l* とクロラミンT溶液0.25m*l* を加え，ただちに密栓して静かに振りまぜ，5分間放置する。ピリジンピラゾロン試液15m*l* を加え，室温25° に20分間放置したのち，生じた青色の吸光度を波長620mμで測定する。同時に標準溶液による検量線を作成し，シアンの量を求める。発色による定量範囲は 0.5～10 μg であり本法の検出限度は2.5μg である

なお，硝酸銀滴定法は，大量のシアン検出には誤差なく測定できるが，生あん中のシアンのような微量のシアンには検出感度が悪く，満足な結果が得られなかった。アンモニアアルカリ性でヨウ化カリウムを指示薬として滴定した場合，検出限度は50μg であった。

むすび

シアン配糖体は，酵素（Linamarase）および水の存在で容易に分解して，シアンを遊離するといわれ，食品中のシアン化合物は厳密に検査する必要がある。

シアン配糖体の分解は，pH 7～8 において顕著であり，残存配糖体およびシアンヒドリンを摂食するとき，腸内で加水分解されて，シアンを発生する可能性が当然考えられる。少しづつ遊離するので，シアン化カリウムそのものを飲んだほど激しい症状を呈することは少ないが，未熟なうめ，もも，あんずの果肉や種子を食べた時のような症状をあらわすことがあるであろう。

したがって，生あんについては，酵素を十分に働かせて，分解して生ずるシアンを，製造工程中で除去することが望ましい。

製あん工程中の浸漬，蒸煮，水さらし，渋切の各段階について検討を加える必要があるが，このあんの製造基準および豆の中のシアンの定量分析については，現在，実験を継続中である。

謝　辞

本実験にあたり，有益なご助言を戴いた明治薬科大学川田公平教授，研究資料入手にご協力戴いた食品機動監視班山之内淳氏に深謝いたします。

文　献

1)　Hanssen, E. und Sturn, W. : Lebensmitt. Untersuch. Forsch., 134, 69 (1967)
2)　Hanssen, E. und Sturn, W. : Ibid., 135, 249 (1967)
3)　川城巌，川田公平，竹内末久，漆畑喜子：衛生試験所報告，第76号，201 (1958)
4)　川城巌，川田公平：食品衛生研究，6，45 (1958)
5)　食品資材研究会編集スタッフ編：ニューフードインダストリー，11，別丁 (1969)
6)　宮道悦男，嶋野武：動植物成分，共立出版 (1958)
7)　第8改正日本薬局方
8)　衛生試験法注解：日本薬学会編 (1973)
9)　三村秀一，米倉茂男：工場排水試験方法の改正 JIS 説明会テキスト，財団法人日本規格協会 (1972)
10)　日本工業規格：K0101 (1966)
11)　日本工業規格：K0102 (1971)

サッカリンの分解について（I）

遠藤英美* 半田八十三* 広門雅子*
石井和恵* 藤居瑛*

STUDIES ON DECOMPOSITION OF SACCARIN (PART I)

Fusayoshi ENDO, Yasomi HANDA, Masako HIROKADO,
Kazue ISHII and Teru FUJII

(Division of Food Additives, Department of Food Hygiene and Nutrition,
Tokyo Metroploitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Since bladder carcinogen due to cyclohexylsulfamate was reported, there has been researched on the report that bladder carcinogen and tumor were observed in the animal experiment giving saccharin orally.

As the result, sulfonamides, impurities in saccharin, are presumed to be a cause for formation of tumor.

The authers studied on influences of acids and alkalis on saccharin under the heating conditions for processing foods to which saccharin with other additives in foods, and found a few observations from the experimental results.

1 はしがき

1970年，米国 Oser[1] によるラットにサイクラメートおよびサッカリンの混合飼料を2年間連続投与することにより，膀胱癌が発生したという報告がなされてから，米国はじめ世界各国でサイクラメートの禁止が行われ，我国でも同年11月に禁止された。

それ以後，サッカリンの毒性についても検討がなされるようになり，最近では，スルホンアミド類が膀胱結石および腫瘍を形成するということが判り，サッカリン中に含まれる不純物のこれらが米国において問題とされるようになってきている[2]。

我国の市販品は比較的純度が高く，これら不純物の含有も少ないのであるが，サッカリンの性質は，酸，アルカリに対して不安定であり，その分解生成物にスルホンアミドを生ずることは，館氏[3]，Hill[4] らも報告しているところである。

現在，サッカリンが食品衛生法上唯一の合成甘味料として汎用されているが，本品の食品加工時における安定度について再検討を行う目的で，加工時に予想される熱時の酸，アルカリの影響および常時使われ，残留量も認められている酸化，還元剤すなわち，塩素，亜硫酸，亜硝酸，過酸化水素などの添加物との反応について検討を行うことにした。

これらの検討に際し，定性的手段として，薄層クロマトグラフ法を，定量的手段として，ポーラログラフ法を用いて行うことにした。またこれらの補足手段として紫外部吸収スペクトル法を行った。

2 実験の部

2.1 試薬および装置

2.1.1 試薬

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

サッカリン：食品添加物用サッカリンナトリウム（大東化学製　製品検査合格品）を水より2回再結晶したのち，遊離のサッカリンとし，エーテルより再結晶したものを用いた。mp. 229°

PH2塩酸．塩化アンモニウム，ポーラログラフ用支持電解質溶液：塩化アンモニウム(和光　試薬特級) 5.35gを水に溶かして 1000m*l* とし，ガラス電極 pH メーターを用いて pH2 となるまで塩酸を用いて調整した。

オルトスルホ安息香酸アンモニウム：東京化成　試薬特級

2.1.2　装　置

紫外線鑑識器　ミツミ科学 SJ型

ポーラログラフ装置　柳本P－8型

二波長分光光度計　日立 356型

2.2　酸，アルカリによる影響

2.2.1　試料溶液および分解液の調製

0.1Mサッカリン溶液：サッカリンを105°で2時間乾燥したのち，18.319gを秤取し，水600m*l*を加えてよく混ぜながら，水酸化ナトリウム試液でガラス電極pHメーターを用いて pH6.4 となるように調整したのち，水を加えて全量を1,000m*l*とした。

0.2 N 塩酸溶液：塩酸（和光純薬　精密分析用）19 m*l* を秤取し，水を加えて全量を 1,000m*l* とした。

0.2 N 酢酸溶液：氷酢酸（和光純薬　試薬特級）12 m*l* を秤取し，水を加えて全量を 1,000m*l* とした。

0.2 M クエン酸溶液：クエン酸（和光純薬　試薬特級）42.0gを秤取し水を加えて全量1,000 m*l*とした。

0.1 M リン酸三ナトリウム溶液：無水リン酸三ナトリウム（和光純薬　試薬特級）120°で2時間，ついで，200°で3時間乾燥したもの，16.4gを秤取し，水を加えて全量を1,000m*l*とした。

0.1 M 炭酸ナトリウム溶液：無水炭酸ナトリウム（和光純薬　試薬特級）300°で3時間乾燥したもの 10.6gを秤取し，水を加えて全量を1,000m*l*とした。

2.2.2　試験溶液の作製

0.1 M サッカリン溶液および，各種分解液 25m*l* ずつを秤取し，還流冷却器をつけて，直火で加熱を行ない，沸騰しはじめてから所定の時間（30，60，120，180，240分）煮沸したのち，流水下で急冷し，冷後ガラス電極 PH メーターを用いて，酸，アルカリで pH 7となるよう調整し，水を加えて全量100m*l*とし，これを試験溶液とした。

2.2.3　定　性

薄層クロマトグラフ法[5]

あらかじめ110°で30分間活性化した，Kieselgel,60 F_{254}（20×20cm）の薄層プレート上の下端より2.5cmのところを原点とし，これに0.1Mサッカリン，0.1M オルトスルホ安息香酸アンモニウム溶液 10μl および各試験溶液 50μl をスポットし，乾燥させたのち，展開溶媒（n-ブタノール：氷酢酸：水；3：1：1）を用いて約 13cm 展開し，風乾後，紫外線下（波長254 nm および 366nm）にて螢光および吸収の有無を観察した。

2.2.4.　定　量

ポーラログラフ法

各々の試験溶液 1m*l* を秤取し，ポーラログラフ用支持電解質溶液を用いて全量を 50m*l* とし，下記条件下でポーラログラフを行ない，−0.9～−1.4Volt の範囲の交流ポーラロ波を測定し，その−1.35Volt 附近の最高波高と，別に同様に操作して得たサッカリン標準溶液の示す波高から，試験溶液中のサッカリンの分解率を算出した。この測定を3回繰り返し行った。(波高の測定は薬学会協定衛生試験法注解[6] ポーラログラフ測定法の第2法によった。)

ただし，サッカリン標準溶液は，0.1 M サッカリン溶液および各種分解液を 25m*l* ずつ秤取し，pH メーターで，酸，アルカリにより，pH7 に調整し，水を

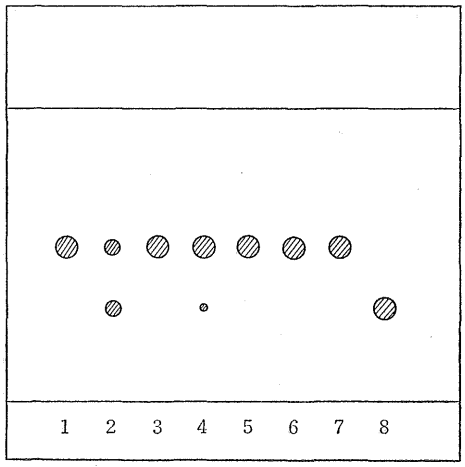


Fig. 1　TLC of Saccharin on Boiling for 240 min.

1. 0.1M Saccharin
2. 0.2N HCl
3. 0.2N AcOH
4. 0.2M Citric Acid
5. 0.1M Na_3PO_4
6. 0.1M K_3PO_4
7. 0.1M Na_2CO_3
8. 0.1M NH_4-o-Sulfobenzoic acid

Table.I Wave-height and its Ratio on Polarography after Boiling in Acids and Alkalis Soln.

	Boiling time (min)	1		2		3		Average ratio	Rate of decomposition (%)
		Wave-height(cm)	Ratio	Wave-height(cm)	Ratio	Wave-height(cm)	Ratio		
HCl	0	4.55	1.000	4.59	1.000	4.31	1.000	1.000	
	30	4.05	0.890	4.08	0.889	3.85	0.890	0.890	11.0
	60	3.63	0.798	3.62	0.789	3.43	0.796	0.794	20.6
	120	3.11	0.684	3.11	0.677	2.89	0.671	0.677	32.3
	180	2.62	0.576	2.59	0.564	2.40	0.557	0.565	43.5
	240	2.04	0.448	2.01	0.437	1.79	0.415	0.433	56.7
AcOH	0	4.25	1.000	4.21	1.000	4.17	1.000	1.000	
	30	4.23	0.995	4.21	1.000	4.25	1.101	1.032	0
	60	4.31	1.101	4.19	0.995	4.20	1.007	1.034	0
	120	4.22	0.992	4.13	0.981	4.13	0.990	0.988	0
	180	4.10	0.964	4.13	0.981	4.10	0.983	0.976	2.4
	240	4.15	0.996	4.15	0.985	4.05	0.971	0.977	2.3
citrc acid	0	4.80	1.000	4.80	1.000	4.66	1.000	1.000	
	30	3.84	0.800	3.86	0.804	3.69	0.792	0.798	20.2
	60	3.89	0.810	3.90	0.812	3.80	0.815	0.812	18.8
	120	3.71	0.772	3.83	0.798	3.73	0.800	0.790	21.0
	180	3.71	0.772	3.71	0.773	3.65	0.783	0.776	22.4
	240	3.60	0.750	3.70	0.771	3.63	0.779	0.766	23.4
Na_3PO_4	0	8.41	1.000	8.59	1.000	10.27	1.000	1.000	
	30	8.00	0.951	8.39	0.976	10.03	0.976	0.968	3.2
	60	8.00	0.951	7.96	0.926	9.63	0.937	0.938	6.2
	120	7.80	0.927	7.69	0.895	9.47	0.922	0.915	8.5
	180	7.15	0.892	7.51	0.874	9.24	0.899	0.888	11.2
	240	7.39	0.878	7.33	0.853	8.78	0.854	0.861	13.9
K_3PO_4	0	6.90	1.000	6.92	1.000	6.65	1.000	1.000	
	30	6.82	0.988	6.76	0.976	6.40	0.962	0.975	2.5
	60	6.70	0.971	6.68	0.965	6.43	0.966	0.967	3.3
	120	6.43	0.931	6.36	0.919	6.29	0.945	0.931	6.9
	180	6.11	0.885	6.04	0.872	6.08	0.914	0.890	11.0
	240	5.99	0.868	6.00	0.867	5.92	0.890	0.875	12.5
Na_2CO_3	0	4.20	1.000	4.02	1.000	4.23	1.000	1.000	
	30	4.12	0.981	3.94	0.980	4.19	0.960	0.983	1.7
	60	4.10	0.976	4.02	1.000	4.20	0.992	0.989	1.1
	120	4.00	0.952	3.72	0.925	4.09	0.966	0.947	5.3
	180	3.99	0.956	3.99	0.992	3.99	0.943	0.963	3.7
	240	3.88	0.923	3.93	0.977	3.95	0.933	0.944	5.6

加えて全量を 100m*l* とした。その 1 m*l* をとりポーラログラフ用支持電解質溶液を用いて全量 50m*l* とした。

測定条件

Sens (SW)	100
RC sens	20μA/mm
SW Volt	20mV
Damping	4
Drop Time	0.96sec/Drop

2.2.5 実験結果

240分間加熱を行った試験溶液 50μl ずつを，0.1M サッカリンおよび 0.1M オルトスルホ安息香酸アンモニウム各溶液，10μl を標準物質として薄層クロマトグラフを行った結果は Fig. 1 のごとくになった。

各種の酸，アルカリ溶液による分解後の試験溶液の示すポーラログラフの波高およびそれの標準溶液の波高に対する比，またその比より得られた分解率は Table. 1 のごとくである。Table. 1 の結果をグラフにまとめると Fig. 2 のごとくになった。

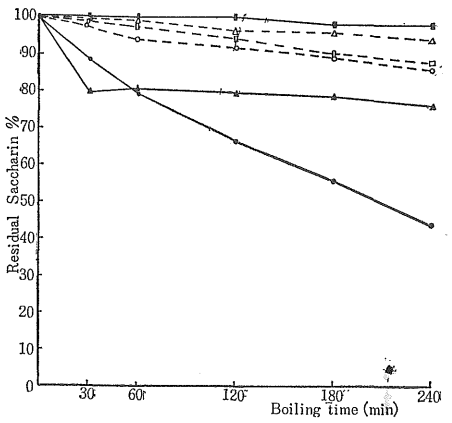


Fig.2 Effect of Acids and Alkalis on Saccharin

●——●0.2N HCl　○……○0.1M Na_3PO_4
■——■0.2 AcOH　□……□0.1M K_3PO_4
▲——▲0.2M Citric Acid　△……△0.1M Na_2CO_3

2.3 酸化，還元剤による影響

酸化，還元剤として食品に使われるものは，殺菌料として塩素剤（塩素ガス，次亜塩素酸ナトリウム液，高度サラシ粉など），過酸化水素，漂白剤として亜硫酸塩類，発色剤として亜硝酸ナトリウムがある。われわれは，これらのものが，食品に使われる範囲内の濃度において，サッカリンと反応を起すか，否かに重点をおいて実験を試みることとした。

2.3.1 反応液の調製

次亜塩素酸ナトリウム溶液：オーヤラックス（有効塩素として4％含有，オーヤラックス社製）を用いて，Cl_2 として，100，200，500，1,000μg/ml の濃度溶液を水に用いて調製した。

亜硫酸ナトリウム溶液：無水亜硫酸ナトリウム（和光純薬，試薬特級）を用い，SO_2 として，100，500，1,000，2,000，4,000μg/ml の濃度溶液をホルマリン中和水（ホルマリン 10ml を水 500ml に混和したのち水酸化ナトリウムで中和して，水を加えて全量を1,000ml としたもの）を用いて調製した。

亜硝酸ナトリウム溶液：亜硝酸ナトリウム（和光純薬，試薬特級）を100°で5時間乾燥し，その1.5gを秤取して水に溶かして全量を100ml とした。これを原液とし，NO_2 として100，200，500μg/ml の濃度溶液を水を用いて調製した。

過酸化水素溶液：30％過酸化水素水（三菱江戸川化学製）を用いて，200，1,000，2,000，4,000μg/mlの濃度溶液を水を用いて調製した。

2.3.2 試験溶液の作製

0.1Mサッカリン溶液25mlおよび各濃度の酸化，還元剤溶液 25ml ずつを各共せん三角フラスコに秤取し，酢酸 1 ml を加えて，マグネチックスターラーを用いて，密せんしながら5分間攪拌したのち，一夜放置し，この液を，5分間煮沸して未反応の酸化，還元剤をのぞき，流水下で冷却し，冷後ガラス電極 pH メーターを用いて，水酸化ナトリウム試液で pH 7 に調整したのち，水を加えて全量を100ml とし，これを試験溶液とした。

過酸化水素反応溶液については，一夜放置後，10分間加熱し，希硫酸 10ml を加え，0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液を液が5分間微紅色を呈するまで加えたのち，エタノールを加えて，脱色し，以下同様に操作して試験溶液を作製した。

2.3.3 定　性

薄層クロマトグラフ法

酸化，還元剤とサッカリンとを一夜反応させた試験溶液をそれぞれ 50μl および0.1Mサッカリン溶液と0.1Mオルトスルホ安息香酸アンモニウム溶液は 10μl ずつ薄層板上にスポットし，2.2.3 の薄層クロマトグラフ法と同様に操作した。

2.3.4 定　量

ポーラログラフ法

各濃度の試験溶液 1 ml ずつを秤取し，ポーラログラフ用支持電解質溶液を用いて全量を 50ml とし，2.2.4 のポーラログラフ法と同一条件下で行った。

ただし，サッカリン標準溶液は，0.1 M サッカリン溶液 25ml を秤取し，酢酸および水 25ml を加え，試験溶液の作製と同様に操作して液 1 ml をとり，ポーラログラフ用支持電解質溶液を用いて全量を 50ml とした。

2.3.5 実験結果

10mg/ml Cl_2，4,000μg/ml SO_2，500μg/ml NO_2，4,000μg/ml H_2O_2 溶液を用いて作製した試験溶液を50μl，0.1Mサッカリンおよび0.1Mオルトスルホ安息香酸アンモニウム溶液，10μl を標準として薄層クロマトグラフを行った結果は Fig. 3 のようであった。

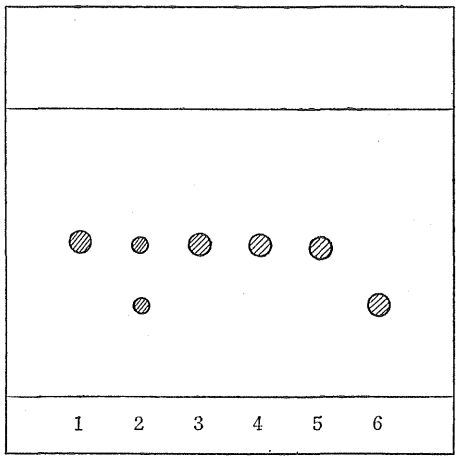


Fig.3 TLC of Saccharin on Oxidants and Reductants

1. 0.1M Saccharin
2. 10mg/ml Cl_2
3. 4000μg/ml SO_2
4. 5000μg/ml NO_2
5. 4000μg/ml H_2O_2
6. 0.1M NH_4-o-Sulfobenzoic acid

Table.II Wave-height and its Ratio on Polarography of Saccharin after Reaction with Cl_2, SO_2, NO_2, and H_2O_2

	Concentration(μg/ml)	1		2		3		Average ratio	Rate of decomposition (%)
		Wave-height(cm)	Ratio	Wave-height(cm)	Ratio	Wave-height(cm)	Ratio		
Cl_2	0	6.84	1.000	6.68	1.000	6.78	1.000	1.000	
	100	6.60	0.964	6.57	0.983	6.69	0.986	0.977	2.3
	200	6.57	0.960	6.62	0.991	6.82	1.005	0.985	1.5
	500	6.63	0.969	6.69	1.001	6.75	0.995	0.988	1.2
	1000	6.27	0.917	6.22	0.931	6.21	0.916	0.921	7.9
	10000	3.98	0.582	3.83	0.574	3.96	0.584	0.580	42.0
SO_2	0	7.07	1.000	6.90	1.000	6.98	1.000	1.000	
	100	7.05	0.997	6.99	1.013	6.92	0.991	1.000	0
	500	7.05	0.997	6.93	1.004	6.95	0.995	0.998	0.2
	1000	7.07	1.000	6.91	1.001	6.83	0.978	0.993	0.7
	2000	6.88	0.973	6.79	0.973	6.76	0.968	0.971	2.9
	4000	7.11	1.005	7.02	1.017	6.99	1.001	1.007	0
NO_2	0	6.90	1.000	6.91	1.000	7.11	1.000	1.000	
	100	6.92	1.000	7.03	1.017	7.20	1.012	1.009	0
	200	6.97	1.010	6.98	1.010	7.23	1.016	1.012	0
	500	6.82	0.988	7.11	1.028	7.11	1.000	1.005	0
H_2O_2	0	11.26	1.000	11.17	1.000	11.23	1.000	1.000	
	200	11.46	1.017	11.38	1.018	11.26	1.002	1.012	0
	1000	11.04	0.980	11.50	1.029	11.15	0.992	1.000	0
	2000	11.07	0.983	10.84	0.970	10.72	0.954	0.969	3.1
	4000	11.11	0.986	10.97	0.982	10.62	0.945	0.971	2.9

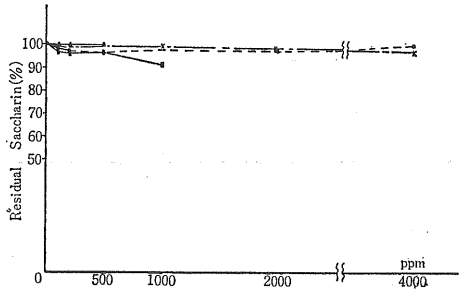


Fig.4 Effect of Cl_2, SO_2, NO_2, and H_2O_2 on Saccharin.

各濃度の Cl_2, SO_2, NO_2, H_2O_2 溶液との反応後の溶液の示すポーラログラフの波高，それの標準溶液の波高に対する比およびその比より得られた分解率は Table. Ⅱ のごとくであった。それのグラフは Fig. 4 である。

3 考察

酸による影響を考察すると，0.2 N 塩酸の場合，サッカリンは煮沸により Table. Ⅰ のごとく，著しく影響を受け 240 分では残存量56.7%であり，Fig. 2 から煮沸時間による経時変化は直線的な減少を示した。クエン酸による場合は，30分後に約20%減少し，その後の増減はあまり認められなかった。酢酸では，あまり分解せず，240 分後も 3 %以内の分解率であった。

アルカリでは時間とともに徐々に分解していくが，240 分後の分解率は，リン酸ナトリウムでは14%，リン酸カリウムでは13%，炭酸ナトリウムでは 6 %であった。これら酸，アルカリの 240分 間煮沸において分解物が薄層上に認められるものは，塩酸およびクエン酸による試験溶液であった。この分解物は，オルトスルホ安息香酸アンモニウムと同じ Rf 値を示した。

Oliver De Garmo[7] らの報告によると，サッカリンとその分解物オルトスルホ安息香酸アンモニウム塩の紫外部吸収は，いずれも 267nm 付近に最大吸収を示し（Fig. 5 参照），その分子吸光係数の ちがい から分解率を算出しているが，この定量法は繁雑であるので（Fig. 6 参照），筆者らは館氏らの文献[3] によるサッカリンの分解物は ポーラログラフ法によれば，−0.9〜−1.4 Volt 付近にポーラログラフ波を示さないという報告にもとづいて，本実験でのサッカリンの定量をポーラログラフ法で行ってみた。標準サッカリン溶液を用いて検量線を作成した結果は Fig. 7 のごとく直線性を示し，サッカリンをポーラログラフ法で定量することの妥当性を確認した。

薄層クロマトグラフ法により分離したサッカリンお

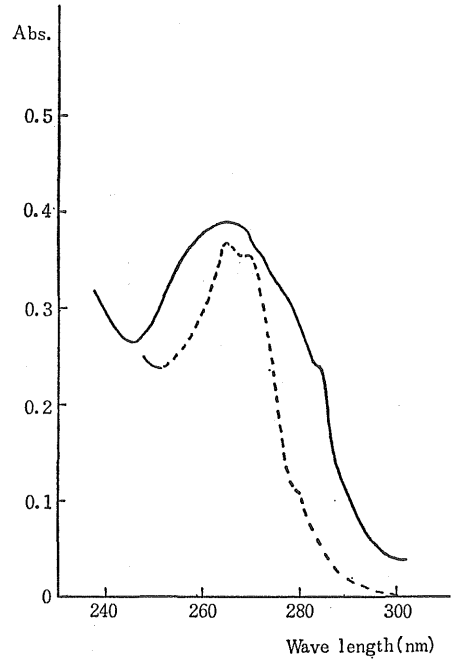


Fig.5 UV Absorption Spectrum at pH 2
——— 0.1M Saccharin
····· 100ppm NH_4-o-Sulfobenzoic acid

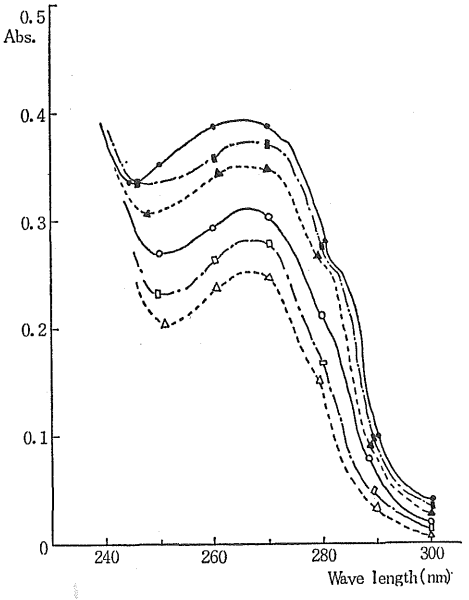


Fig.6 UV Absorption Spectrum of Saccharin after Boiling in 0.2N HCl Soln.
●——● 0　　○——○ 120min
■-·-·-■ 30min　　□-·-·-□ 180min
▲·····▲ 60min　　△·····△ 240min

よびその分解物は薄層板よりかきとり，これを，ポーラログラフ用支持電解質溶液にとかし，紫外部吸収を測定したところ，各々，サッカリン，オルトスルホ安息香酸アンモニウムの吸収スペクトルと同一のものを得た。その結果，酸分解物はオルトスルホ安息香酸アンモニウムであると推定できた。

なお二波長分光測定におけるサッカリンおよびオルトスルホ安息香酸の定量は，吸収スペクトルが似ているので測定不可能であった。

酸化，還元剤の場合，Table. Ⅱ および Fig. 4 より，SO_2 (100～4,000μg/ml)，H_2O_2 (200～4,000μg/ml)，NO_2 (100～500μg/ml)，の範囲の濃度ではほとんど影響がみられなかった。Cl_2 の場合は 1,000ppm で 7.9 %分解し，他の酸化還元剤と比較して，いくらか影響がみられたので，参考として，1 %の高濃度について実験した。その結果，42%の分解率を得た。薄層板上でも分解物と思われる明瞭なスポットが得られた。この Cl_2 による反応液の分解物のスポットは，オルトスルホ安息香酸アンモニウム塩と同様の Rf 値を示した。このスポットをかきとり，紫外部吸収を測定したところ，オルトスルホ安息香酸アンモニウムと同一の吸収スペクトルを示し，薄層クロマトグラフおよび紫外部吸収の結果より，分解物は，オルトスルホ安息香酸アンモニウム塩と思われる。

4 結 論

本実験においてサッカリンの熱時，酸，アルカリに

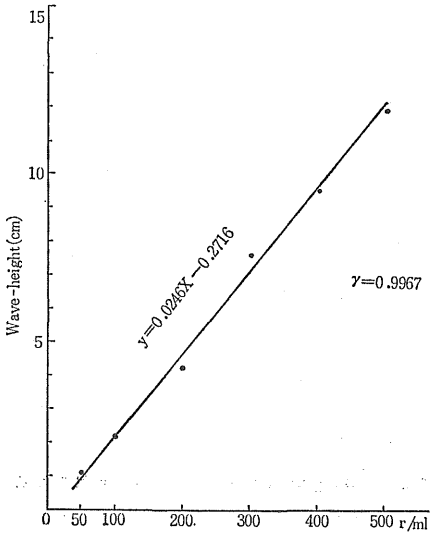
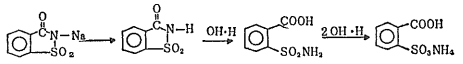


Fig.7 Calibration Curve of Saccharin Standard Solution

よる影響がみとめられた。酸，アルカリによって，サッカリンが分解されることは，1918年，Richmond, Hill[4] らがサッカリンの定量法を検討する際に，強熱，強アルカリにより短時間に分解することを報じており，Remsen, Burton はこの分解機構を次のように推定している。



これらの点より，食品加工に際し，強熱，強アルカリの使用は行われないであろうが，常時用いられる程度のものでも，分解が起っていることが判った。オルトスルホ安息香酸アンモニウムにまで分解されていれば，衛生上問題は少ないかも知れないが，途中のオルトスルホンアミド安息香酸の生成する点を考えると，その食品加工後のサッカリンの安全性に疑問を生ずる。

また塩素によるオルトスルホ安息香酸アンモニウムの生成機構については不明であるが，オルトスルホンアミド安息香酸の中間体の生成も予想され，食品を過度に塩素殺菌を行うことは注意すべきであると思う。

なおサッカリンの苦味は，グルタミン酸ナトリウムの添加により消えるといわれているが，この点についても今後検討を行ってみたいと思う。

附　記

本研究は昭和47年度当研究所研究課題「サッカリンの分解に関する研究」として実施したものである。

文　献

1) Oser, B. L.: *Science*, 167, 1131～1132 (1970)
2) Bryan, G. T. and Yoshida, O.: *Arch. Environ. Health*, 23, 6～12 (1971)
3) 館勇，塚本勝：農芸化学，25，(1951)
4) Hill, C. A.: *J. Soc. Chem. Ind.*, 37, 264～249 (1918)
5) King, R. E. and Wragg, J.S.: *J. Pharm. Pharmac.*, 18, Suppl, 22～27, (1966)
6) 衛生試験法注解，1973年版（未刊）
7) Oliver, G.D.: *J. of A.O.A.C*, 41, 17～18 (1952)

熱硬化性樹脂食器の衛生性（メラミン樹脂について）

佐藤彌代子* 佐藤憲一* 中島世津子*
吉田令子* 柴英子** 藤居瑛*

HYGIENIC CHEMICAL STUDIES ON THERMOSETTING PLASTICS (Melamine Ware)

Yayoko SATO, Kenichi SATO, Setsuko NAKAJIMA,
Reiko YOSHIDA, Hideko SHIBA and Teru FUJII

(Division of Food Additives, Department of Food Hygiene and Nutrition,
Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health)
(Division of Pharmacology, Department of Toxicology
Tokyo Metropolitan Reserch Laboratory of Public Health)

Summary

32 Samples of chopsticks made of melamine formaldehyde resin were tested according to Foods Hygienic Law, and 0.6ppm (1.7ppm at the maximum) of H-CHO was detected in an average. For comparison the effluent with 4% acetic acid was employed and the value of 2.6ppm of H-CHO in an average (8.0ppm at the maximum) was obtained. The extracted H-CHO was increased proportionally. $KMnO_4$ consumption, which is an index for effluent of readily-oxydizable organic substances, was 3.6ppm in an average (9.3ppm at the maximum), and did not exceed the limit of specification, 10ppm. It was interesting that the values of $KMnO_4$ consumption was above the theoretical one to formaldehyde in any sample.

Isolation and quantitative determination of melamine which was thought to efflute out of melamine resin tablewares and ammeline which is a hydrolysis product of melamine were studied. By UV absorption method with Amberlite IR-120, an ion-exchange resin, 235mμ melamine (2N-HCl) and 230mμ ammeline (0.5N-HCl) can be determined quantitatively; in practice, from 4 samples of tablewares effluent of ammeline was not recognized but 0.29-0.08ppm of melamine was detected.

1. はじめに

熱硬化性樹脂の代表的なものに，ユリア樹脂・メラミン樹脂・フェノール樹脂等があるが，このうち食器に用いられるものは，ホルムアルデヒドの溶出が問題となった昭和41年以後ユリア樹脂はほとんど姿を消してメラミン樹脂，フェノール樹脂が使用されている。特にメラミン樹脂は着色性がよく，また陶磁器に似た感触が喜ばれて乳幼児用食器・集団給食用食器などに広く使用されている。

一般に熱硬化性樹脂は，その成型条件によって品質

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科
**東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

が大きく影響されるが，メラミン樹脂製食器の中でも肉厚の差が大きいために成型時の加熱・加圧等が不均一になりやすいハシついて，ホルムアルデヒドの溶出を中心に試験を行った。またメラミンの加水分解生成物であるアンメリンは，ヒナの盲目（Blindness）の起因物質と推定されており，メラミン樹脂におけるメラミンおよびアンメリンの溶出についても検討したので合わせて報告する。

2. メラミン樹脂製ハシについて

2.1 試料

試料は，環境衛生部食品監視課から送付されたもので，メラミン樹脂製ハシ32検体について試験を行った。

2.2 試験溶液の調製

試験溶液の調製は，現行の合成樹脂製器具および容器包装の規格試験[1]にしたがい，60°の水および4％酢酸溶液を用いて30分間保温浸出を行った。なおこの場合，ハシの表面積はグラフ用紙を使って算出し，1 cm^2当り2 mlの割合の浸出溶液を用いて試験溶液を調製した。

2.3 試験法

1） ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドは，ホルマリンおよびヘキサミンを標準溶液として，アセチルアセトン法で行ない，島津ポジュロム回折格子型光電比色計「スペクトルニック20」を用いて415mμの吸光度を測定し，検量線作製の上定量した。浸出液は水蒸気蒸留を行なうことなく，そのまま5 mlをとり常法により発色させた。

2） フェノール

フェノールについては，4-アミノアンチピリン法で行ない，前記「スペクトルニック20」で510mμの吸光度を測定し，検量線作製の上試験を行なった。

3） 重金属

重金属については，4％酢酸浸出液200mlを水浴上で蒸発乾固し常法によって HCl 処理をしたのち電解液（2M HCl・2M NH_4Cl〔1：1〕）10mlに溶解し，柳本ポーラログラフィーP-8を用いて測定した。

4） 過マンガン酸カリウム消費量および蒸発残留物

この両者については，規格試験にしたがって操作した。

2.4 試験結果

試験結果の概要を Table I に示す。

Table I. Result of the Standard Tests

	Formaldehyde		Evaporated Residue	$KMnO_4$ Consumption	Heavy Metals	Phenol
	H_2O	4%AcOH				
Maximum	1.7ppm	8.0ppm	7.2ppm	9.3ppm	Pb Cd Zn Cu <0.1ppm	not detected
Minimum	0.0	0.1	0.0	0.6		
Average	0.6	2.6	1.5	3.6		

ホルムアルデヒドの溶出の分布は Fig 1 のようであったが，同時に行なった4％酢酸浸出液におけるホルムアルデヒドの溶出との間に，Fig 2 にみられるような関係が認められた。

過マンガン酸カリウム消費量の分布状況は Fig 3 のようになっているが，これをホルムアルデヒド溶出量との関係からみると，Fig 4 にみられるような結果となる。ここで，実線はホルムアルデヒドが完全に CO_2 と H_2O まで酸化されたときの理論上の過マンガン酸カリ消費量を示し，点線はホルムアルデヒド標準溶液について定量した実測値を示している。

ホルムアルデヒドの酸化は，完全に行なわれるとすれば，

$$5HCHO+4KMnO_4+6H_2SO_4 = 5CO_2+2K_2SO_4+4MnSO_4+11H_2O$$

となり，その対応はつぎのようになる。

$5HCHO : 4KMnO_4$

$1.0 : 4.21$

$2.37 : 10.00$

蒸発残留物の分布は Fig 5 のようであって過マンガン酸カリウム消費量との関係については，その相関性は認められない。

なおフェノールについては，検出するものは全くなく，重金属についてもほとんど検出するものがなかったので省略する。

3. アンメリンの問題

3.1 検討の動機

1966年8月から1968年10月頃までの間に，東海・近畿・九州・四国地方において，初生ヒナの盲目 Blind-

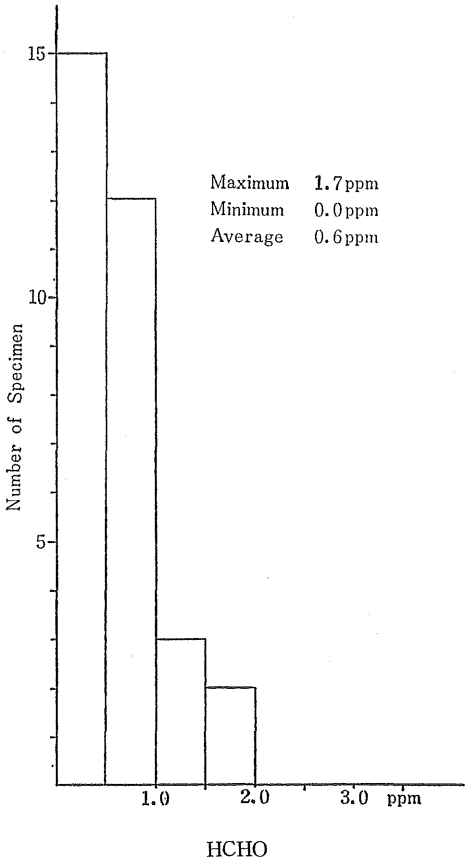
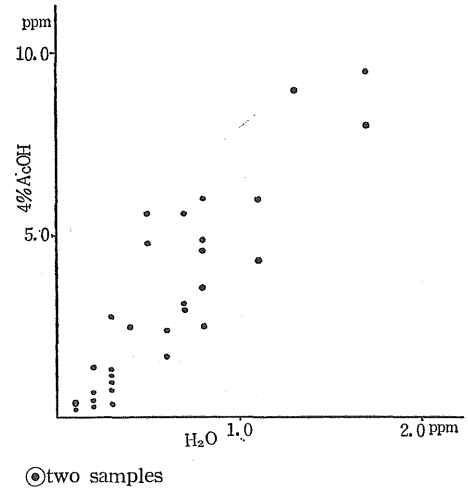


Fig 1. Distribution of Formaldehyde extracted with H_2O



⊙two samples

Fig 2. Relationship between Formaldehyde extracted with H_2O and 4%AcOH

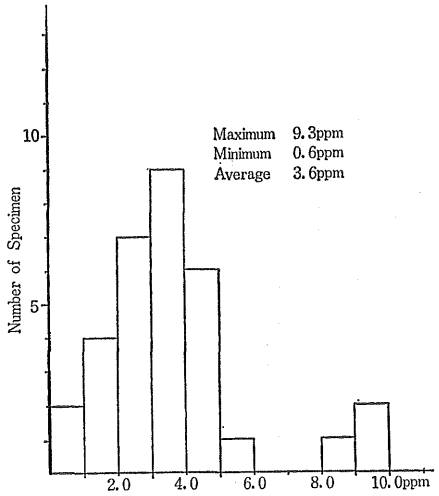
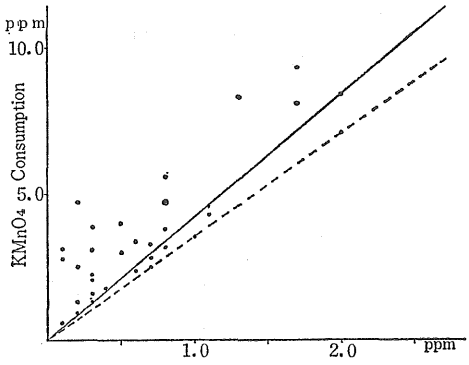


Fig 3. Distribution of $KMnO_4$ Consumption



HCHO

—— theoretical value of $KMnO_4$ consumption to HCHO

····· practical value of $KMnO_4$ consumption to HCHO

⊙two samples

Fig 4. Relationship between Formaldehyde and $KMnO_4$ Consumption

ness(B) が集団的に発生した。そしてその原因物質は，飼料に故意に加えられた魚粉添加物中のアンメリンであることが報告されている。[2) 3) 4)]

それらによると，アンメリンの盲目作用量は鶏種 Warren Sex-Sal-Link F を用いた実験で，100％Bを発生させうるアンメリンの最低飼料混合比は2％であり，ヒナのBを発生させる最低飼料混合費は0.5％であるという。またメラミンのヒナに対する毒性は強く，飼付後数日以内に斃死するという。

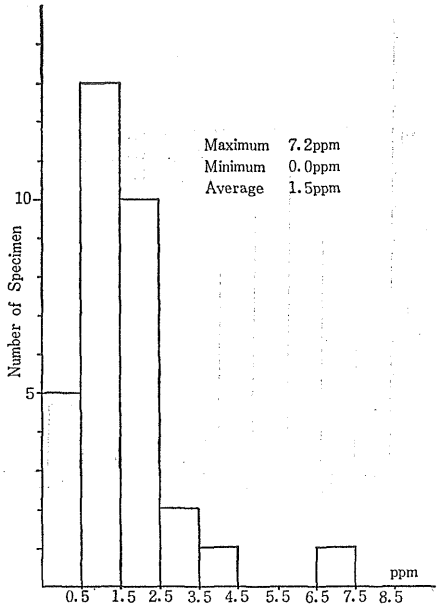


Fig 5. Distribution of evaporated Residue

アンメリンは，メラミン樹脂の成型時にその流動性を高めるため成型材料中に配合される場合もあり[5]また粗製メラミン中にアンメリン0.2％程度含有されることもある。さらにメラミン樹脂において，S-トリアジン環誘導体であるメラミンおよびその加水分解生成物であるアンメリン・アンメリド・シアヌル酸などが生成することが考えられる。(Fig 6)

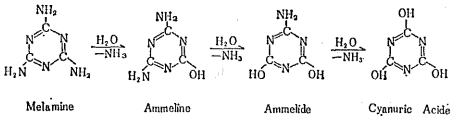


Fig 6. Hydrolysis Products of Melamine

そこで，メラミン樹脂製食器におけるメラミンおよびアンメリンの溶出とその定量について検討した。

3.2 メラミン，アンメリンの検出

S-トリアジン環誘導体の分離・定量については，滝本による詳しい報告[6]があるのでこれによって行なうことにした。これはメラミン・アンメリンのイオン交換樹脂に対する吸着力の差を利用して分離し，S-トリアジン環の共役二重結合性による紫外部吸収により，吸光光度測定を行なう方法である。

3.3 検量線の作製

メラミン，アンメリンは，酸性においてそれぞれ235mμ，230mμに極大吸収を有する。そこでメラミンを2N-HCl，アンメリンを0.5N-HClに溶かし，島津マルチパーパス自記分光光度計MP・S-50L型を用いてそれぞれ235mμ，230mμの吸光度を測定して検量線を作製した。(Fig 7, Fig 8)

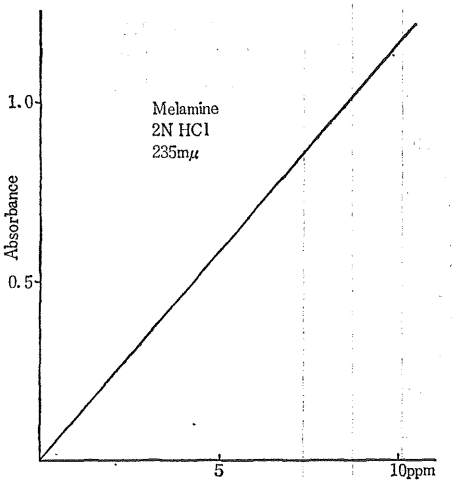


Fig 7. Calibration Curve of Melamine

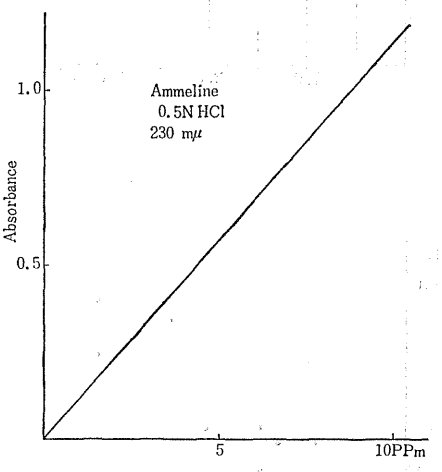


Fig 8. Calibration Curve of Ammeline

3.4 イオン交換樹脂による分離

イオン交換樹脂アンバーライトIR-120 (48～50メッシュ) を長さ150mm，直径12mmのカラムに充塡し，遊離型として用いる。このカラムに2 μg/ml の濃度のメラミンおよびアンメリンを100ml通して吸着させたのち，0.5N-HClを流速1.5ml/minになるように流出させ，流出液をフラクションコレクターにより10ml

ずつ集めてアンメリンを溶出させる。つぎに同様にして2N-HClによりメラミンを溶出させる。

この方法によると，0.5N-HCl 700ml中にアンメリンは94.9%，2N-HCl 500ml中にメラミンは83.0%回収できることがわかった。

3.5 検体への応用

以上のように，メラミン，アンメリンの分離定量が可能なことがわかったので，実際の食器について試験を行なった。

メラミン樹脂製コップ(容量200ml)A，Bは沸騰水150mlを入れ，30分間放置したものを試験溶液とした。

メラミン樹脂製ハシ（表面積約50cm²）A′，B′については共栓比色管にハシを入れ，沸騰水100mlを加えて30分間放置したものを試験溶液とした。

この試験溶液を3.4の方法によって分離・定量した結果は，TableⅡのとおりで，アンメリンは検出しなかったが，メラミンは少量であるが溶出していることがわかった。なおメラミン樹脂製コップを粉砕して沸騰水中で煮沸浸出した試験溶液について，試験した結果もアンメリンは検出されなかった。

Table II. Result of Ammeline and Melamine effluted from Samples

	Ammeline	Melamine
Cup A	—	0.25ppm
Cup B	—	0.08
Chopsticks A′	—	0.29
Chopsticks B′	—	0.21
Melamine Ware pawdered	—	

4. 考察

メラミン樹脂製ハシについて，合成樹脂製器具および容器包装の規格試験を行なった結果をみると，ホルムアルデヒドは32試料とも限度以下であるが，最高1.7ppmを検出し，この検体は4%酢酸浸出溶液からは8.0ppmのホルムデヒドを検出している。メラミン樹脂製品は，一般にはホルムアルデヒドの溶出は少なく，正常に成型されていれば1.0ppm以下のものがほとんどである。また4%酢酸浸出溶液について試験した場合も2.0ppm以下がほとんどである。水浸出液で1.0ppm以上のものは，4%酢酸浸出液によってホルムアルデヒド溶出量の増加が大きいことを経験している。ハシは特に肉厚の差が大きいので，成型条件の設定がむずかしいものである。

過マンガン酸カリウム消費量についてみると，いずれも限度10ppmをこえるものはないが，溶出したホルムアルデヒド相当量よりいずれも大きく，ホルムアデヒド以外の易酸化性物質の溶出が認められている。規格試験では，ホルムデヒドを原料とする合成樹脂製品については，過マンガン酸カリウム消費量を判定の基準にしないことになっているが，然るべき規制は必要と考えられる。

ヒナのBlindness起因物質と推定されているメラミンの加水分解生成物アンメリンについて，検体について試験した結果は検出されなかったが，今後とも十分な注意が必要であろう。メラミンの毒性はLD_{50} 5g/kg(マウス)[7]程度とされ，あまり大きなものではないが，ヒナに対する毒性の報告[2]もあり，溶出物質の一つの指標として，メラミン樹脂としての樹脂別の規格基準を定める場合には考慮されるべきであろう。

5. むすび

現行の合成樹脂製品の規格試験法では，ホルムアルデヒドを原料とする合成樹脂には，過マンガン酸カリウム消費量を規制していないが，溶出物の指標として他の樹脂製品と同様に規制する必要があるのではなかろうか。ホルムアルデヒドの検出限度は4ppm程度と規定されているが，メラミン樹脂製品では正常成形品は，ほとんどが1.0ppm以下であり，メラミン食器業界の自主規制もホルムアルデヒド2.0ppm以下を表明しているので，樹脂別の規格基準制定の折にはさらに考慮されるべきであろう。

「付記」

本研究は，昭和47年度当研究所研究課題「合成樹脂製器具容器包装の衛生学的研究」として実施したものである。

文献

1) 食品，添加物等の規格基準（厚生省告示第176号）第3のAの6
2) 久葉昇，橋本芳信，西村元喜，近藤正彦，松原弘道：日獣会誌，23，291-298(1970)
3) 金子史郎：畜産技術，3(1970)
4) 神戸肥料検査所報告(1967，1968，1969)
5) Elmer, C., Anas, T. and Rider, S. H.: U. S. Patent, 2740736(1956)
6) 滝本雅祥：工化誌64，1234(1961)
7) Goldberg, B. and Schoenbach, E. B.: Cancer, 4, 1125-1139(1951)

焼ミョウバンの焼成温度による不溶化について
(オートアナライザー法によるアルミニウムの定量)

大畠敏子* 安野哲子* 小野綾子*
柴山良一* 藤居瑛*

RELATION BETWEEN THE TEMPERATURE AND THE AMOUNT OF INSOLUBILITY IN PREPARATION OF BURNT ALUM
(Determination of Aluminum by Use of Auto Analyzer)

Toshiko OHATA, Tetsuko YASUNO, Ayako ONO,
Ryoichi SHIBAYAMA and Teru FUJII

(Division of Food Additives, Department of Food Hygiene and Nutrition,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

In the Japanese Standard of the Food Additives, a gravimetric method is employed for determining burnt alum, as converting to aluminum oxide. The authors studied on a colorimetric determination with oxine by an autoanalyzer: aluminum in burnt alum was converted to oxine complex, which was extracted with chloroform and the absorbance at 400mμ was observed.

A satisfactory result was obtained with standard solutions having 0.5-5.0μgAl/ml. The authors determined commercially available burnt alum and samples prepared at every 50°C in the range of 200-850°C burning temperatures. The obtained results were compared with those obtained by the usual gravimetric method.

1. 緒　言

食品添加物の一つとして漬物や煮物の保色剤，あるいは合成膨脹剤の一成分に広く使用されている焼ミョウバンは，食品添加物公定書における規格試験中，その「水不溶物」および「定量」の項目について不適となることがしばしばある。これの原因として，焼ミョウバンの製造のさい，高温をかけすぎるため，水に不溶性の酸化アルミニウムが限度以上に（限度は2.5%）できることがあげられる。また合成膨脹剤の規格試験中，「硝酸不溶物」の項目があるが，これについても不合格となる検体が比較的多い。この場合の一つの原因としても上に述べたような，合成膨脹剤の一成分である焼ミョウバンの焼き過ぎが考えられる。

そこで筆者らは焼ミョウバンの焼成温度がその定量値に及ぼす影響を検討することにし，定量の方法として，オキシンによるアルミニウムの比色法をとりあげ，これをオートアナライザーで処理することを試みて，食品添加物公定書に採用されている従来の酸化アルミニウムとして測定する重量法との比較を行なった。

2. 実験方法

2.1 試　薬

アルミニウム標準溶液：再結晶により精製したカリミョウバンを用い，1ml中に0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0μgのアルミニウムを含む溶液を調製し，

*東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科

Table I. Change of pH Value by Reagents

Reagent / Al(μg/ml)	Standard Sol. 10ml	+2%-Oxine Sol. 2ml	+2N-CH_3COONH_4 1ml	+H_2O → 50ml
1.0	5.0 →	3.88 →	5.0 →	5.1
2.0	4.75	3.90	5.0	5.05
3.0	4.62	3.88	5.0	5.12

標準溶液とする。

オキシン溶液（1％，酢酸溶液）：オキシン10gを氷酢酸25mlに加温して溶解し，1000mlに希釈する。

2N—酢酸アンモニウム溶液

クロロホルム

2％塩化アンモニウム溶液

メチルレッド試液：メチルレッド0.1gをアルコール100mlに溶かし，必要があればろ過する。

アンモニア試液：アンモニア水（比重，約0.90）10gに水を加えて30mlとする。

試薬はいずれも小宗製の特級，もしくは精製したものを用いた。

2.2 装　置

テクニコン標準オートアナライザーBA型

356形-日立2波長自記分光光度計

2.3 オキシンによるアルミニウムの比色定量

アルミニウムの比色定量法としては，①アルミノン，ヘマトキシリン，アリザリンS，エリオクロムシアニンR，スチルバゾなどの有機試薬がアルミニウムと反応して生成する有色キレート（それぞれ赤色，赤紫色，橙色，赤紫色，およびバラ色）を比色する方法，②オキシンによりアルミニウム塩を沈殿させたのち，これをクロロホルムを用いて抽出し，その黄色を比色する方法，③オキシン，モリンなどのアルミニウムキレートが発する螢光を利用する螢光比色法などが知られているが，筆者らは②の方法を検討することにした。

アルミニウム・オキシン錯塩のクロロホルム抽出溶液は淡黄色を呈し，390mμに吸収の極大がある。またオキシンもクロロホルムに抽出されるが，このものは無色で，大きな吸収は370mμ以下にある。また，本島[1]によればアルミニウムはpH4.5～9.5で定量的にクロロホルムに抽出される。

アルミニウム標準溶液のそれぞれ10mlを正確に100mlの分液漏斗にとり，オキシン溶液2mlを加えたのち，2N-酢酸アンモニウム溶液1mlを加えpHを約5に調製し，水で全液量を50mlとする。標準溶液に各試薬を加えた場合のpHの変化をTable Iに示す。

ついでクロロホルム10mlを正確に加え，1分間激しく振り混ぜる。クロロホルム溶液はあらかじめ無水硫酸ナトリウムの1gを入れた共栓試験管に移し，軽く振って，混入してくる水分を除き，同様に処理したブランクを対照として390mμにおける吸光度を測定する。アルミニウムのオキシン錯塩の水に対する溶解度はきわめて小さく，一方クロロホルムにはきわめて易溶であるので，この場合一回の抽出でオキシン錯塩は定量的にクロロホルム層へ移ると考えてさしつかえない。

上述の予備実験によりアルミニウムの定量にじゅうぶん利用できる結果が得られたので，これに基づいてオートアナライザーにかける場合の諸条件を設定することにした。

オートアナライザーの装置図をFig 1に示す。

各サンプルを吸いあげる時間と，サンプルとサンプルのあいだの洗浄時間はともに，プログラム設定カムの選び方によって決まってくる。筆者らは，(40,2/1)，すなわち1時間に40個のサンプルを吸いあげ，そのサンプル採取時間と洗浄時間の比が2：1であるようなカムを用いることにした。さらにベースラインの安定をはかるために，サンプルカップの方にも，サンプル1カップ，ついで水2カップの割合でセットし，洗浄時間をじゅうぶんにとることにした。

Fig 1の中で，各チューブに記してある数値はそれぞれのチューブの内径であり，この大きさにより，送り出す液量が決められる。それぞれのチューブの内径の決定は，前述の予備実験における各試薬の対応量に基づいているが，クロロホルムだけは，のちの分離のさいに及ぼす影響もあって，大きめの径のチューブを用いた。TableⅡには，各チューブの内径に対応する標準の送り量を記しておいた。なお，クロロホルムの流れる箇所にはアシドフレックス・チューブを用い，他はすべて透明標準チューブを使用した。

サンプルカップから吸いあげられた検液には，順次試薬が加えられ，最終的には，クロロホルムに抽出されたアルミニウムのオキシン錯塩が400mμのフィル

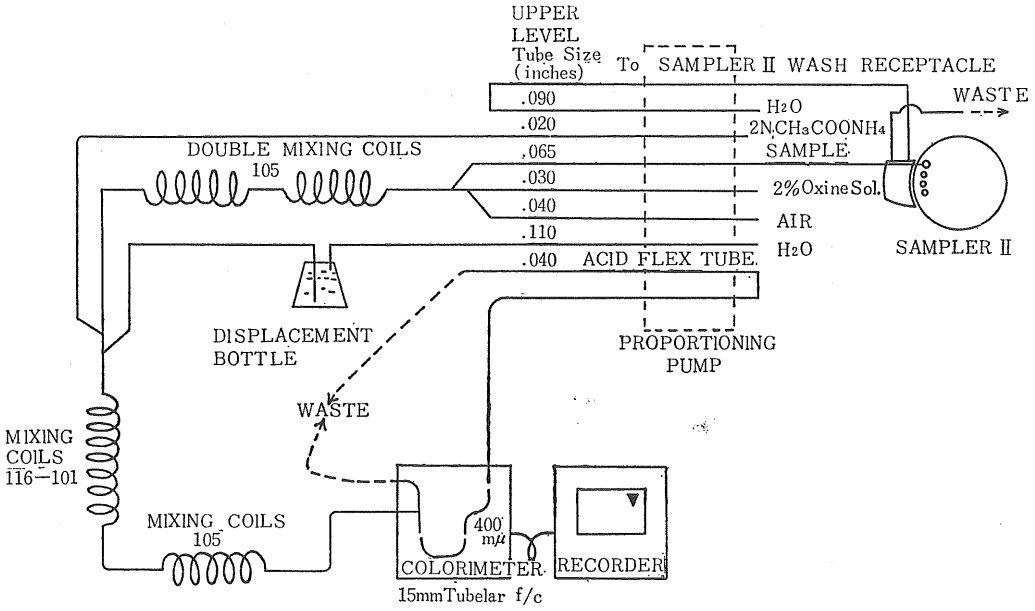


Fig. 1. Flow Diagram

Table II. Amount of Flow of Tubes

I. D. (in.)	Amount of Flow (ml/min)	
	Standard	Acidflex
0.020	0.16	
0.030	0.32	
0.040	0.60	0.53
0.065	1.60	
0.090	2.90	
0.110	3.90	

ターによりその透光度を記録されるわけであるが，水系の一定の流れの中に有機溶媒であるクロロホルムを組み入れるために，送流その他で各検液ごとに毎回一定量のクロロホルムが送りこまれることが困難であり，これを解消するため筆者らはFig 2 に示すような装置を組み入れたところ，良好な結果が得られた。

2.4 重量法

焼ミョウバンの粉末を200°C で4時間乾燥したのち，その約0.5g を精密にはかり，水 100m*l* に振り混ぜながら水浴中で加熱して溶かし，ろ過し，水で不溶物をよく洗い，洗液をろ液に合わせ，さらに水を加えて250m*l* とし，塩化アンモニウム1g およびメチルレッド試液4滴を加えて沸とうするまで加熱し，ただちに，液の赤色が黄色にかわるまでアンモニア試液を加え，

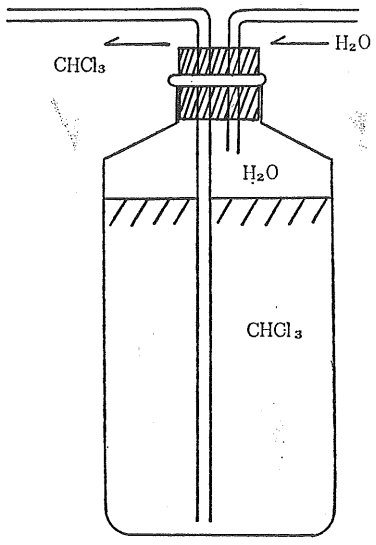


Fig. 2. Displacement Bottle

さらに2分間煮沸したのち，ただちに沈殿を定量分析用ロ紙（東洋ロ紙，5A）を用いてこしとり，熱2％塩化アンモニウム溶液で，洗液が硫酸根の反応を呈しなくなるまでよく洗い，ロ紙と共に乾燥し，恒量になるまで電気炉を用い 900°C で熱灼し，Al_2O_3 として

Table III. Amount of Aluminum in Burnt Alum Prepared at Various Temperatures
——By Colorimetric Determination——

No. of Measurement / (°C) Temperature	Al μg/ml (%)			
	i	ii	iii	Average
200	2.5 (10.1)	2.5 (10.0)	2.5 (9.9)	(10.0)
250	2.5 (10.1)	2.6 (10.2)	2.5 (10.2)	(10.2)
300	2.5 (10.1)	2.5 (10.1)	2.6 (10.3)	(10.2)
350	2.5 (9.8)	2.4 (9.8)	2.4 (9.7)	(9.8)
400	2.5 (10.0)	2.5 (10.0)	2.5 (10.1)	(10.0)
450	2.5 (10.1)	2.5 (10.0)	2.5 (9.9)	(10.0)
500	2.6 (10.4)	2.5 (10.1)	2.5 (9.9)	(10.1)
550	2.3 (9.2)	2.1 (8.5)	2.4 (9.7)	(9.1)
600	2.1 (8.5)	2.1 (8.5)	2.1 (8.4)	(8.5)
650	1.9 (7.7)	1.9 (7.7)	1.9 (7.7)	(7.7)
700	1.8 (7.0)	1.7 (7.0)	1.7 (7.0)	(7.0)
750	0.2 (0.8)	0.2 (0.9)	—	(0.9)
800	—	—	—	—
850	—	—	—	—

Table IV. Amount of Aluminum in Burnt Alum (15 Samples)
——By Colorimetric Determination——

No. of Measurement / Sample No.	Al μg/ml (%)				
	i	ii	iii	iv	Average
1	2.5 (10.1)	2.5 (10.1)	2.6 (10.2)	2.5 (9.9)	(10.1)
2	2.2 (8.8)	2.2 (8.7)	2.2 (8.9)	2.2 (8.8)	(8.8)
3	2.4 (9.6)	2.4 (9.7)	2.4 (9.7)	2.4 (9.8)	(9.7)
4	2.5 (9.9)	2.5 (9.9)	2.5 (9.9)	2.5 (10.0)	(9.9)
5	2.1 (8.3)	2.1 (8.6)	2.2 (8.6)	2.1 (8.6)	(8.5)
6	2.4 (9.5)	2.4 (9.8)	2.5 (10.0)	2.5 (10.0)	(9.8)
7	2.4 (9.8)	2.4 (9.7)	2.4 (9.6)	2.5 (9.9)	(9.8)
8	2.4 (9.4)	2.3 (9.2)	2.3 (9.3)	2.4 (9.5)	(9.4)
9	2.3 (9.2)	2.3 (9.2)	2.3 (9.1)	2.3 (9.3)	(9.2)
10	2.3 (9.3)	2.3 (9.3)	2.3 (9.1)	2.3 (9.4)	(9.3)
11	2.4 (9.7)	2.4 (9.5)	2.4 (9.5)	2.4 (9.5)	(9.5)
12	2.3 (9.3)	2.3 (9.1)	2.3 (9.3)	2.3 (9.4)	(9.3)
13	2.3 (9.3)	2.3 (9.3)	2.3 (9.3)	2.3 (9.2)	(9.3)
14	2.6 (10.2)	2.6 (10.2)	2.6 (10.2)	2.6 (10.2)	(10.2)
15	2.2 (8.8)	2.2 (9.0)	2.2 (8.8)	2.2 (8.9)	(8.9)

ひょう量した。

3. 実験結果

3.1 比色法

カリウムミョウバン（特級，小宗製）を用い，200°C～850°C まで 50°C ごとの各焼成温度における焼ミョウバンを調製した。加熱にはいずれも電気炉を使用し，時間は4時間とした。それぞれの焼成温度におけるサンプルを，200°C で4時間乾燥したのちその 0.5000 g をはかり，水100m*l* 中に振り混ぜながら水浴中で加熱して溶かし，200m*l* のメスフラスコにろ過し，水で不溶物をよく洗い，洗液をろ液にあわせ，さらに水を加えて 200m*l* にメスアップする。これの 5 ml をとり水で正確に500m*l* に希釈する。この溶液を検液として，オートアナライザーによりその中のアルミニウムを定量した結果を Table Ⅲ に示す。

焼成温度が550°C 以上になると，水不溶物が増してきて，それにともない検液部分のアルミニウム量の減少がみられる。また，750°C 以上の温度で調製されたものは，この検液濃度では測定不可能であった。なお，アルミニウム標準溶液による検量線は，7サンプルの測定ごとに1回作成してある。おのおののサンプルについて3～6回の測定を試みたが，各サンプルとも測定値間のばらつきは少ない。

焼ミョウバン中のアルミニウム量の理論値は 10.44 %である。

Table Ⅳ には，市販の焼ミョウバン15サンプルについて，同様に処理して得られた結果をのせておく。

3.2 重量法

前述の 200°C～850°C まで 50°C ごとの各焼成温度における焼ミョウバン，および市販焼ミョウバンの15サンプルについて，2.4の方法に従って定量を行った。Table Ⅴ に示してある値は，Al_2O_3 を Al に換算した値である。

重量法の場合もやはり焼成温度が550°C 以上のもので，アルミニウム量の減少がみられた。また，それぞれのサンプルについて各測定値間のばらつきは少ないが，比色法と比較して全般にやや高い数値が得られた。

4. 考察および結語

本報告においては，焼ミョウバンの焼成温度がその定量値におよぼす影響について，オートアナライザーを用いてアルミニウム・オキシン錯塩を比色定量する方法と，酸化アルミニウムとして測定する重量法との二面において検討したわけであるが，Fig 3 からあきらかなように，どちらの場合においても550°C 以上で

Table V. Amount of Aluminum in Burnt Alum
——By Gravimetric Analysis——

No. of Measurement / (°C) Temperature	Al %				Sample No.	Al %
	i	ii	iii	Average		
200	10.5	10.5	10.5	10.5	1	10.4
250	10.5	10.5	10.5	10.5	2	8.3
300	10.2	10.2	10.3	10.2	3	9.3
350	10.5	10.5	10.5	10.5	4	10.6
400	10.5	10.4	10.5	10.5	5	9.8
450	10.5	10.4	10.4	10.4	6	9.4
500	10.4	10.4	10.5	10.4	7	9.2
550	9.4	9.3	9.4	9.4	8	9.0
600	8.9	8.8	9.1	8.9	9	9.6
650	8.1	8.2	8.1	8.1	10	9.9
700	6.8	7.3	7.7	7.3	11	9.7
750	0.4	0.3	0.4	0.4	12	9.8
800	0.1	0.1	0.1	0.1	13	10.1
850	—	—	—	—	14	9.2
					15	10.4

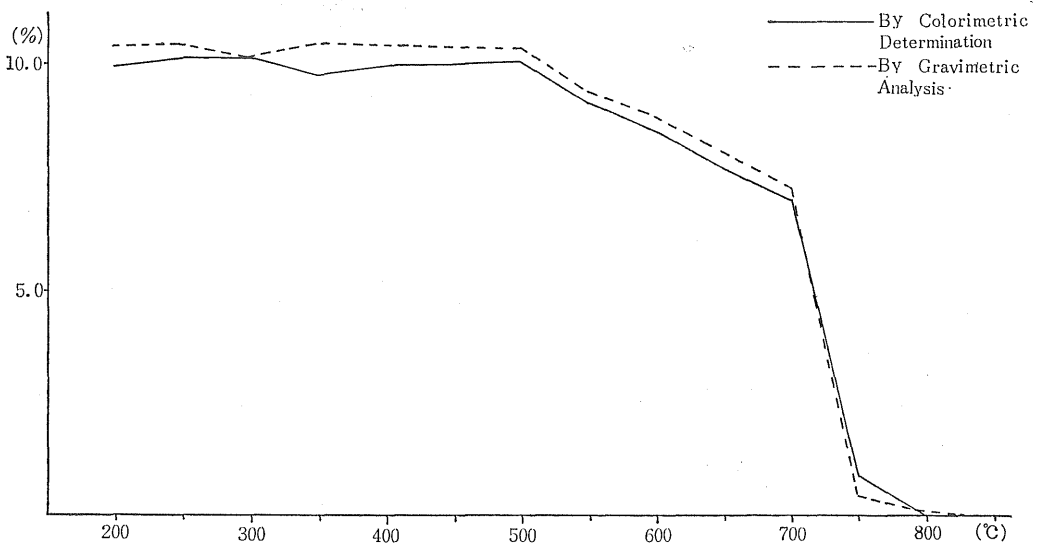


Fig. 3. Amount of Aluminum in Burnt Alum Prepared at Various Temperatures

調製したものは，不溶物の増加にともない定量値の減少がみられる。そして，焼成温度が550°C 以上のものは，検液部分のアルミニウム量が，食品添加物公定書において定められている限度（〔$Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4$〕として96.5%，Alとしては10.1%）以下であった。今回測定に供した市販品15サンプルのうちのほとんどが，やはり限度以下であった。これは焼ミョウバンの製造のさい，合成膨脹剤の防湿を，その一原料である焼ミョウバンに頼る必要上故意に，また習慣的に高熱をかけているためであると予想される。

比色法に比較して重量法では全般に高めの値を得たが，これの一原因として沈殿を熱灼するさいのルツボと温度による影響が考えられる。沈殿を電気炉で熱灼するさい磁製のルツボを使用したが，加熱後の吸湿性も考慮してその温度を900°C に設定した。そのため，Al_2O_3 が非吸湿性の α-Al_2O_3 にならず吸湿性の γ-Al_2O_3 の状態にとどまっていて，このことが測定値に影響したものと思われる。

オートアナライザー法においては，何よりもその操作方法の簡便さと検体処理時間の迅速性において重量法よりはるかにまさっている。そして今回のデータによればじゅうぶん，焼ミョウバンの定量法としてこれからの検体処理に採用しうる方法であることが認められた。ただ欠点として，チューブその他の部品の高価であること，たえず試薬を流している状態で測定するシステムであるため試薬の消費量の多いことがあげられる。

焼ミョウバンの定量のさい，これを純水を用いて溶解すると一部加水分解をおこして塩基性塩を生じ，難溶性あるいは不溶性となることがある。これは溶解時の液性を酸性サイドにすることで解消されると思われるが，このことが定量値にどの程度の影響を及ぼすか，ひきつづいて検討中である。

おわりに，検体収去に当たられた食品監視課の各位に謝意を表します。

参 考 文 献

1）本島健次：日本化学雑誌，76，8，71（1955）
2）坂口武一，上野景平：〝金属キレート〔Ⅱ〕〟（1972）南江堂
3）食品添加物公定書注解編集委員会：〝第二版　食品添加物公定書注解〟（1968）金原出版

ポルフィリン体の生化学的研究（I）
ポルフィリン体の定量法と その周辺について

武士俣 邦 雄* 霜 田 さと子* 小笠原 公*

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE PORPHYRINS (I) QUANTITATIVE METHOD AND REFERENTIAL FACTORS ON THE URINARY PORPHYRINS

Kunio BUSHIMATA, Satoko SHIMODA and Kimi OGASAWARA

(Division of Nutrition, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Urinary out·put of coproporphyrin is quantitatively determined on screening test of lead poisoning or examination of porphyria. The technique was so complicated that the authors tried to simplify, and a satisfactory result was obtained. There were also researched on the time of oxidation of iodine, changes of fluorescence and analytical data.

(1) A process for extracting repeatedly could be eliminated by making the ratio of sample vs. solvent, for instance lml. of a sample vs. about 50ml. of the extract solvent. Porphyrin could satisfactorily transfer by a single dissolution step with 1.5N hydrochloric acid solution after completely removing the water layer carefully, and it could be directly subjected to fluorescence determination. In repetitional experiments on a sample, S. D.=1.4336, C. V.=0.0312; the values were small and satisfactory.

(2) A high observed value was obtained when oxidation of iodine was performed before extraction.

(3) The variation of fluorescence depending on pH change was considerably in a thinner solution.

(4) Except the cases having more than 4mg urinary urobilinogen/L, a simple average was higher in the male, and varied depending on age, that is, the value tended to reduce following to elevation of age.

はじめに

ポルフィリン体は，天然には動植物体および微生物等に広く存在している。特にこれが，ヘモグロビンやチトクロームあるいはクロロフィルの配合族であるため，生命にかかわる重要な代謝成分の一部として，多方面からの研究がある[1]。近年，特に動物界において，血液代謝生理作用の阻害による，一連の関連成分が尿中に多量に排泄される疾患が多数発見されて来た。昨今，特に鉛による δ-aminolevulinic acid dehydratase,

＊東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科

Hem-synthetase の阻害作用が知られ[2)3)4)]，鉛中毒が問題視されている。鉛中毒を最初に記載したのは Hippocrates であった 様だ。我が国での明確な記録は，徳川末期から明治にかけての役者や芸者の白粉による鉛中毒がある[5)]。

一般に鉛中毒の認識が高まり，S42年4月に施行の鉛中毒予防法，S43年4月の四アルキル鉛中毒予防規則公布がなされており[5)6)]，すでに周知の通り，S45年春に，アンチノック剤としてガソリンに添加されている四エチル鉛が，自動車およびその他のエンジン等の排気ガスと一緒に大気中に放出され[5)7)] 鉛が大気汚染をなしている指摘がなされた。更に，大気中鉛が人体の造血代謝生理に関与し，住民を貧血の危機に至らしめているという重大事となった。

鉛中毒の臨床検査項目は，鉛中毒予防法に記されている一次検査すなわち，自覚症状，鉛縁，全血比重，血色素量，Ht. または赤血球数，好塩基性斑点赤血球，コプロポルフィリン尿など，更に二次検査には血中鉛，尿中鉛，尿中コプロポルフィリンおよび尿中 δ－アミノレブリン酸の定量検査がある[5)6)8)]。

検診に用いられるコプロポルフィリン検査には定性および定量がある。定性検査方法としては，Fischer 法，Brugsch 法，Scott 等の方法などがあるが，判定に個人差があり，これを避ける意味においても定量検査が望まれている。

定量測定方法は種々報告されているが，中でもエーテルを抽出溶媒として使用する Askevold 法，Rimington法や，酢酸エチルを抽出溶媒に用いるSchwartz, Zieve, Watson の方法，西川氏法，久留米大公衛改良法などがある[9)]。しかし，これ等の方法での難点は，繰り返し抽出を行う必要があり，操作が繁雑で時間がかかる，そのために急を要するスクリーニングテストには，検体数の消化上不向きであり，簡略化の検討が要望されている。

更に，最終塩酸抽出液を測定する方法に，分光学的方法とけい光学的方法とがある。又，便中のポルフィリンを抽出して，ガスクロマトグラフィーで分析した報告もある[10)]。

我々の研究室で検討した分析法を，微量けい光法として，その他吟味した部分と共に述べる。

尿中コプロポルフィリンの定量分析方法

1 最大吸収波長，λmax[11)]

0.1N－HCl：399.5mμ
1.0N－HCl：401.0mμ
25％－HCl：406.0mμ

2 分光学的定量法

2-1) Rimington法[9)]

尿 20～30ml
- ←氷酢酸 2 ml（pH 4）
- —エーテル 50ml

エーテル抽出液
- ≲3％酢酸ナトリウム 20～30ml
- ≲0.005％ヨード液 50ml

洗浄エーテル抽出液
- —5％HCl 2～3 ml 3回抽出

標量塩酸抽出液

401，380，430mμで測定

$$\text{コプロポルフィリン}\ \mu g/L = \{2Emax - (E_{380} + E_{430})\} \times 837 \times \frac{v}{V}$$

Emax：Soretの吸光度
v ：終末塩酸液の液量 ml
V ：用いた試料尿量 ml

2-2) 久留米大公衛改良法[9)]

精製水 10ml

尿 20ml
- ←氷酢酸・飽和酢酸ナトリウム・混合液（4：1）10ml
- —酢酸エチル

酢酸エチル抽出液
- ≲1％酢酸ナトリウム 10ml で2回洗浄
- ≲0.005％ヨード液 5 ml で洗浄

洗浄抽出液
- —1.5N－HCl 5 ml ずつで3～4回抽出

塩酸抽出液（20ml 標量）

分光光度計で401，380，430mμで測定

$$E_{401}\ (Corr) = \frac{2 \times E_{401} - (E_{380} + E_{430})}{1.833}$$

3 けい光学的定量法

3-1) Schwartz, Zieve, Watson の方法[12)]

精製水 20ml

尿 5 or10ml
- ←氷酢酸・飽和酢酸ナトリウム混合液（4：1）5 ml
- —酢酸エチル 100ml
- 1分間振盪

酢酸エチル抽出液
- ≲1％酢酸ナトリウム液で2回洗浄
- ≲0.005％ヨウ素溶液で1回洗浄

洗浄抽出液

—1.5N−HCl 5 m*l* で数回抽出
（けい光がなくなるまで抽出し，一定量にする）

標量1.5N−HCl溶液

けい光光度計にかけてけい光の強さを測り標準液のそれと比較して値を算出する。

＊この際，溶存する酢酸エチルは毎常ポルフィリンのけい光を8％だけ強めるから，それを補正し，コプロポルフィリンの10.8μg/d*l*（1.5N−HCl 溶液）をもって10μg/d*l*の標準液とする。

＊＊本法においてはコプロポルフィリンの他にプロトポルフィリンが存在すれば同時に測り込まれて区別されない。

3-2) 微量けい光法[13]

0.005％ヨード・1％酢酸ナトリウム溶液 10m*l*

尿 1 m*l*

←氷酢酸・飽和酢酸ナトリウム混合液(4：1) 1 m*l*
（pH3～4.5になり等電点付近になる）
—エチルエーテル 約50m*l*
（シェーカーにて3分間位振盪）

エチルエーテル抽出液

≦1％酢酸ナトリウム溶液で2回洗浄
（約5分間位の静置の間に3回洗浄液を除去する。完全除去をする）

洗浄抽出液

—1.5N−HCl 5.0m*l*で抽出をする。

1.5N−HCl溶液を直接に日立自記けい光分光光度計，MPF-2A型でけい光測定をし，標準液のけい光と比較して分析値を算出する。

実験結果

微量けい光法の吟味について[13]

同一検体を10個の分液ロートを用いて，繰返し抽出等の検討をした分析結果を Table 1 に示す。

Tabel 1 Calcuation of reitrate analyses.

No.	Value(μg/L)	Mean± S.D.	C. V.
1	47.40		
2	48.11		
3	47.09	46.01	
4	45.56		
5	45.66	±	0.0312
6	48.01		
7	44.54	1.43	
8	44.13		
9	44.94		
10	44.64		

標準偏差（S. D.）および変動係数（C. V.）ともに小さく，本法での定量値は安定的である。しかし，回収率の実験では70～80％位で余り良い結果となっていないので更に詳細な検討が必要である。けれども，洗浄液を集めて再抽出を行った結果では，測定されていないところに，試料のみの場合と添加標準液との関係に疑問はある。

同一試料を直接にヨード酸化をなしてエーテルで抽

Table 2 Effect of hydrochloric acid extraction on oxidization or non- with iode.

	Non-oxidization				Oxidization			
	HCl Normality			Total	HCl Normality			Total
No.	0.03	1.5	2.8		0.03	1.5	2.8	
1	23.8	22.8	5.1	51.7	30.7	25.6	0.	56.3
2	45.8	56.6	12.1	114.5	61.8	56.1	0.	117.9
3	21.7	28.1	5.7	55.5	31.1	29.3	0.	60.4
4	20.0	37.9	7.7	65.6	32.6	30.4	0.	63.0
5	35.5	50.0	9.1	94.6	57.8	53.1	0.	110.9
6	55.5	78.9	13.4	147.8	83.3	79.0	0.	162.3
7	31.1	41.5	7.7	80.3	49.4	46.7	0.	96.1
8	24.8	35.4	7.1	67.3	43.9	41.6	0.	85.5
9	25.4	32.1	6.2	63.7	40.5	31.8	0.	72.3

（μg/L）

出をした場合と，酢酸エチルで抽出を行った時とではほぼ同じ位の値であった。

ヨウ素酸化の意義について[13]

一般的にポルフィリノーゲンを空気にさらすと自酸化してポルフィリンとなる。これは，$-\overset{H_2}{\underset{}{C}}-$が酸化されて$=\overset{H}{\underset{}{C}}-$となるもので，ヨードやキノンの添加によっても容易に行われる[12)14)]。これはポルフィリノーゲンをポルフィリンに転換して，総ポルフィリンとして定量する目的で分析方法に応用されている。

我々は試料の直接ヨウ素酸化および非酸化の溶媒抽出の効果について検討した。

その結果を Table 2 に示す。

表を見ると非酸化の場合，2.8N－HCl溶液まで測定されているが，試料を直接酸化を行った場合には1.5N－HCl溶液で完全に移行している。(他の吟味で0.5N－HCl での完全移行をも認めている。) 更に，合計の欄を見ると，酸化しない時よりも，酸化した場合の方が値が高くなっている。そこでヨウ素酸化と非酸化について，試料ⅠおよびⅡにおける1.5N－HCl 溶液での励起波長の吸収スペクトルとけい光を Fig. 1 に示す。

吸収スペクトルに見る強さには関係なく，けい光は酸

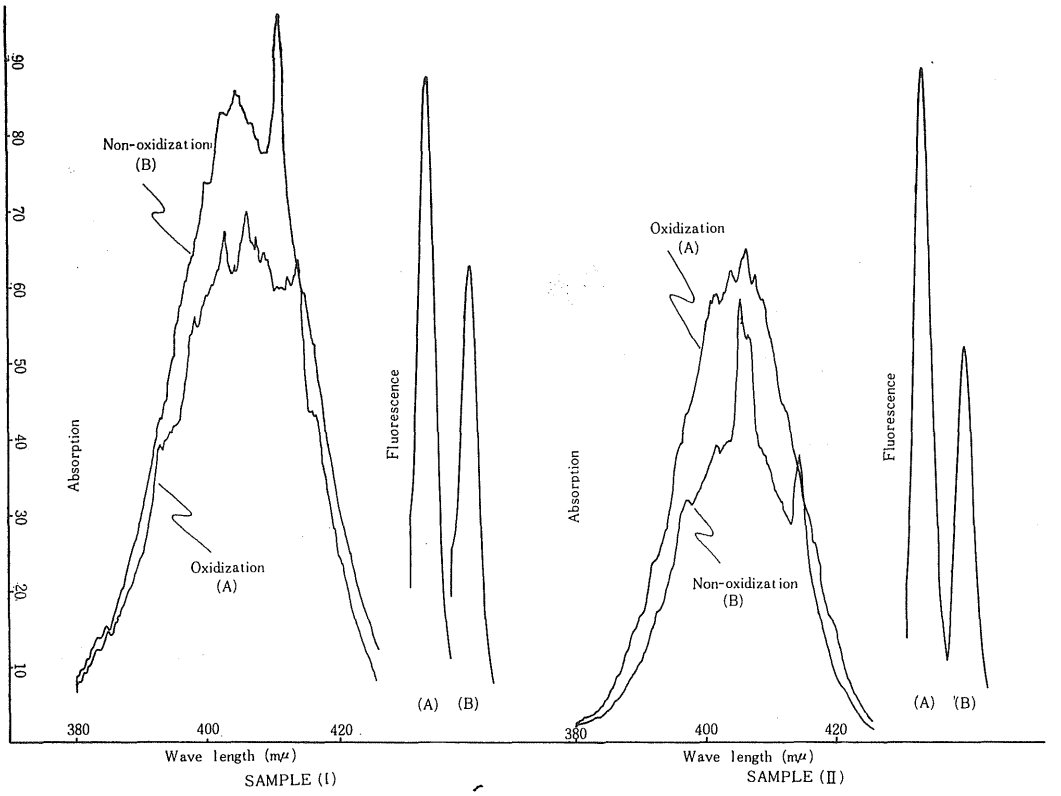


Fig. 1 Absorption curve and fluorescence for sample of urine (I) and (II), which is comparison of the oxidized of iodine before ethyl ether extraction with non-, in the final 1.5N-HCl extract.

化を行った場合に高く記録され，表2との関係が分る。

塩酸濃度によるけい光の変化について[13]

ポルフィリンの水溶液のけい光は，その等電域で最小を示すとされておりけい光と pH との関係は個々のポルフィリンによって可成の特色があり，互に異性体であるものの区別にも使われている[1)]。

しかし，Fig. 2 に示す如く，同一物においてもその pH の差によりけい光の強さが変ることを認めた。

この Fig. 2 を見ると稀薄溶液側で変化が著しく，曲線的であるが，1.5N～3.0N－HClの範囲ではおおむね直線的けい光の減少を認める。

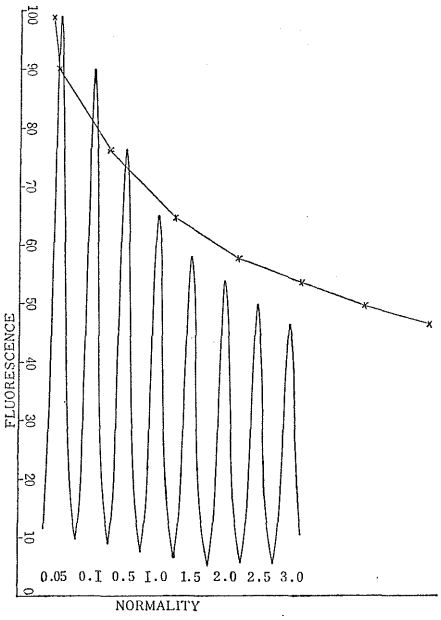


Fig. 2 Relationship between coproporphyrin fluorescence and each normality of hydrochloric acid.

東京都衛生局鉛害検診受診者の分析結果[13]

S.46年9月～S.47年6月までに受診した人達のデータについて，すでに医学分野では認められている肝臓疾患者をウロビリノーゲンを指標として，定量値で4.0mg/L 以上の人の 例を除いて 単純平均値を算出したものをTable 3 に示す。

性差および年令層間差が見られ，高令化に従って排泄量の減少傾向がうかがわれる。

考　　察

すでに述べて来たように，尿中コプロポルフィリンの定量分析の方法には色々あるが，これというほど卓越した方法のないのが現状である。

松本は[9]，久留米大公衛改良法を用いて，その回収率99.5%～104.8%と，我々の行ったけい光微量法での回収率70%～80%に比べて，非常に良い結果を報告している。しかし，図1に見られる様に，尿からの抽出成分は複雑であり，酢酸エチル抽出での吸収スペクトルを取って見ないと断言は出来ないが，疑問点も残る。即ちプロトポルフィリンの同時抽出である。吉田ら[15]はヨード酸化について，エーテル抽出後，抽出

Table 3 Mean value of coproporphyrin on the screening test, not included on a case of urobilinogen more than 4.0 mg/L.

Age		—29	30—39	40—49	50—59	60—69	70—	Total
Men (N=110)	Mean (μg/L)	63.3(n=13)	76.7(n=20)	51.6(n=19)	49.4(n=26)	44.1(n=21)	49.7(n=11)	55.8
	Range (μg/L)	24.4—158.6	17.6—165.0	11.6—119.1	11.3—144.3	13.5— 85.1	10.6— 88.8	
Women (N=163)	Mean (μg/L)	45.9(n= 8)	41.6(n=47)	50.5(n=34)	42.1(n=36)	43.7(n=29)	35.6(n= 9)	43.2
	Range (μg/L)	22.0— 61.0	11.9— 91.0	9.9—123.1	12.0—119.9	8.0—120.1	13.9— 64.9	

液を洗浄する時に加えた場合と，ヨードを加えないで24時間放置した尿とで比較すると，ヨード添加の効果は著明でないとし，又，森ら[16]は，その定量方法の中で，尿を4 °C 暗所に保存した場合，Cp 測定値は3～4日で最大となり，新鮮尿では酸化することにより上昇するが，3日以後は逆に低下する事から，尿を数日冷暗所に放置した後に，ヨード酸化を省いて分析を行うのが良いとしている。しかし，エーテル抽出を行う以上，試料を直接酸化し，保存して量的変化を来した尿試料を用いるよりも，新鮮尿での分析値を出すことがより必要であるし，診断補助価値も出て来ると考える。

大橋[17]は，エーテルおよび塩酸によるCpの抽出条件が測定値の精度に可なり大きな影響を及ぼすと指摘している。これは我々が考えた事とも同じ様で，けい光分析の場合の pH による影響，ヨード酸化と抽出量に関する事などが，表2からも考えられる結果となる。

実際的に起っているヨード酸化と非酸化で生じている差，（表1及び図2の如く）について，なぜかが求明されなければならないので，努力中である。これは回収率との関係に大きくかかわって来る事と思われるが，由来は不明である。

次に，field test については，サンプリングが主に冬季に片寄っているため，更に例数を増して，通年的な調査が必要である。

ま と め

コプロポルフィリンの定量分析は非常に難しく，今だ定まった分析方法がない。しかし，昨今のように早急な検体消化の要望が急激に増している時，我々の開発した微量けい光法での分析は，多少の検討すべき部分が残ってはいるが，疾病の診断補助とスクリーニングテストに応用し得ると考えられる結果だった。

すなわち，分析方法の吟味としては，1) 試料量を1 ml，抽出溶媒（エチルエーテル）約50mlと，対試料比を大きくすると，重複操作が省けて，簡易的となった。同一検体における繰返し実験では S.D.＝1.4336 C.V.＝0.0312と小さく，良い結果であった。 2) 抽出前にヨード酸化を行うと高い測定値を得る。これはヨード酸化の効果が認められた。3) 塩酸濃度差（pHの変化）によるけい光強度を調べたところ，稀薄溶液での変化が著しく，けい光分析の際に注意を要するところである。 4) 肝臓疾患を疑わせる尿中ウロビリノーゲンの4 mg/L 以上の例を除いて，単純平均を行ったところ，総体的に男性に高く，年令層間には変動があり，高令化に伴って排泄量の減少がうかがわれた。

本報告の概要は，日本衛生検査学会第21回学術講演会で発表した。

文 献

1）上代皓三，中尾喜久：血色素の生理と臨床；医学書院，(1958).

2）山村雄一，熊谷 朗，熊原雄一：病態生化学1；朝倉書店，(1968).

3）吉川春寿，中尾喜久：血液の生化学—基礎と臨床—；朝倉書店，(1972).

4）Nakano, K., Wada, O & Yano, Y.: Clin. Chim. Acta, 19, 319～325 (1968).

5）原田 昭：臨床病理，18，699～701，(1970).

6）久保田重孝，北山孝允：労働の科学，22，19～24，(1967).

7）和田 攻：公害による疾患；南山堂，(1971).

8）山本丈夫，祐田泰延，青木 稔，高橋亮司：産業医学，12，341～346，(1970).

9）松本久男：臨床病理，19，56～62，(1971).

10）日本分析化学会編：分析化学—進歩総説—，130 R (1968).

11）Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, Jones, K. M.: Data for Biochemical Research, 2nd Edition, Oxford University Press, (1969).

12）関根隆光，笹川泰治，森田茂広，他：化学の領域増刊33，光電比色法 各論1，南江堂，(1962).

13）武士侯邦雄，小笠原 公，霜田さと子：衛生検査21，318，(1972).

14）黒田嘉一郎，吉川春寿，他：血液化学，朝倉書店 (1966).

15）吉田恭子，孤池義彦，堀口俊一：産業医学，12，54，(1970).

16）森 正敬，栗原真純，他：Jap. J. Hyg. 24，137 (1969).

17）大橋 誠：鉄道薬学研究年報 13，178～186，(1965).

ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅱ）
一時尿のδ-アミノレブリン酸，コプロポルフィリン，ウロビリノーゲン等の関係について

武士俣　邦　雄*　霜　田　さと子*
小笠原　　公*　野　牛　　弘**

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE PORPHYRINS (Ⅱ)
RELATIONS ON THE δ-AMINOLEVULINIC ACID, COPROPORPHYRIN AND UROBILINOGEN IN TEMPORARY URINE

Kunio BUSHIMATA, Satoko SHIMODA,
Kimi OGASAWARA and Hiroshi YAGYU

(Division of Nutrition, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Division of Environmental Health, Department of Environmental Health, Tokyo Metopolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Urinary δ-aminolevulinic acid (δ-ALA), coproporphyrin (Cp) and urobilinogen (Ug) are the items to be tested for screening of lead poisoning. The observed values of each item were discussed statistically as to the results of inhiditants' health examination.

The data were classified depending on the sex and the age and the limit of rejection with the level of signifcance of 1% was obtained, and the average in the limit of rejection was calculated. Generally, the value of each item was higher in tha male. As the above results were obtained from a sample of temporary urine, creatinine ratio (/gCn) used for correction of the analytical value was discussed. The urine of a normal individual was pursuded all day long to observe the behavior. The coefficients of correlation on the observed values between the δ-ALA, Cp or Ug and the creatinine were high i. e., δ-ALA=0.9666, Cp=0.9478, Ug=0.9787, but coefficients of variation on the absoulte quantities per hour of creatinine (=0.0549) were relatively small comppared to the others, i. e., δ-ALA=0.3258, Cp=0.2704, Ug=0.2632. Therefore, it is questionable to calculate creatinine ratio, which may be only a theoretical figure-treating technique.

はじめに

尿中排泄デルタ・アミノレブリン酸（δ-ALA），コプロポルフィリン（Cp），ウロビリノーゲン（Ug）は動物体赤血球の主成分であるヘモグロビンの生合成および生体内分解にかかわる，逆反応のない代謝過程上の関連物質である。[1) 4) 5)]

体内におけるポルフィリンないしヘム代謝異常により，ポルフィリンおよびその前駆物質であるδ-ALA，

*東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科
**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

ポルフォビリノーゲン（PBG）等の著明な増加を来す疾患群は，ポルフィリン症（Porphyria）と称され，一般的に Watson に従った分類が行われている[2]。

ポルフィリン代謝の異常としてあげられるものには，人間の先天的代謝異常に基く Porphyria と，種々の外的要因（例えば，重金属中毒，化学薬剤投与，又は或る種の疾病および細菌感染 etc.）による後天的代謝阻害に原因する場合に，尿中排泄増加を示すポルフィリン尿症（Porphyrinurea）とがあり，互に区別されている[3][4]。

特に近来とりざたされた事は，鉛が ALA-dehydratase, Hem-synthetase を強力に阻害することが明らかにされ，関連各尿中排泄成分の検査，分析値は鉛中毒の診断に利用されるに至っている[3][4][5]。

又，分解産物である Ug は，ビリルビンが胆汁と共に腸管内に排泄され，腸内細菌によって還元をうけ，いわゆるウロビリン体へと移行する途上の物質である。これ等ビリルビン代謝産物の大部分は糞便と共に排泄されるが，一部分は再吸収されて肝臓に運ばれ，いわゆる腸肝循環を繰返している。この時一部分は血中に入り，次いで尿中に現われる。これは赤血球の崩壊が大きい時に，ウロビリン体生成が多くなり，必然的に尿中へのウロビリン体排泄も増加して来るようになる。さらに肝臓疾患の際には腸内へのビリルビン排出が悪くなるので，ウロビリン体の生成も減少するが，この様な時には腸肝循環も悪いので，尿中へのウロビリン体排泄量はかえって増加する[6]。このため尿中 Ug 検査は肝疾患の指標として，臨床検査部門では日常的に行われている。

生理的な，これ等一連の代謝成分の尿中排泄量は，一般的には男性に多いと云われているが，年令層間との量的範囲や関連等は明らかではない。我々は多数の検体を扱う機会に遭遇したので尿中の δ-ALA，Cp，Ug の定量分析をなし，統計処理を行って見た。しかし，一般住民検診の性格上，試料が一時尿となる事は避け難く，測定値や統計数値に問題が残る。

そこで，一時尿試料の測定値を是正する目的で行われている，クレアチニン補正（Creatinine correction）に関する検討が望まれた。この補正の基本理論については，クレアチニンがクレアチンの無水物であり，筋肉中にある高エネルギーリン酸化合物であるクレアチンリン酸の終末代謝産物として，体内ではかなり恒常的な速度で生成され，その生成量は筋肉量にほぼ比例し，食事とほとんど無関係な物質である。この様な事実をふまえて，体重から割り出したクレアチニン係数[7][8]なるものが算出されているところである。また，血液中の濃度もかなり一定に保たれ，尿中への排泄量は尿量と無関係で，その絶対排泄量は，おおむね一定となっている[6]。これ等の代謝生理事実に基いて，クレアチニン比を算出すれば，常に一定比率が得られて，補正が成り立つという理論からである。しかし，クレアチニンの恒常性に比べ，変動のない成分ならばまだしも，変動する尿中排泄量とを比較する事は誤りであろう。そこで我々は，健康個人尿の追跡調査をなし，クレアチニン補正に関する一部実態調査を行った。

以上のことに関連して，尿中 δ-ALA，Cp，Ugについての field test およびクレアチニン補正について，当研究室で行った研究結果を述べる。

分析方法

1） Urinary δ-aminolevulinic acid[9][10]

和田等の方法を一部改良して応用した。

即ち，n-ブチルアルコール（n-BuOH）は 20°C で 7.8ml/100ml H_2O[11]，25°C においては 9.1ml/100ml H_2O[12] の溶解能を有するが，15°C において n-BuOH の1容は 0.3 容の H_2O を溶解する[13]。そこで我々は，水飽和の n-BuOH を 10ml 用いて，呈色をプラスに妨害する，エールリッヒ試薬陽性物質の除去を行った。さらに，比色測定の段階で，吸収管（セル）への水滴付着によるトラブル防止および粗大粒子を除去する目的で，呈色物のクロロホルム抽出操作後に，無水硫酸ナトリウムの適当量を加えて，クロロホルム層の乾燥をなし，次いで吸光度の測定を行った。

改良結果を検討すると次のようであった。

まず，n-BuOH によるエールリッヒ試薬陽性の妨害物質の除去については，Ug の定量値が 18.4mg/L の尿試料について，8 ml の n-BuOH H_2O saturate を用いた時の δ-ALA の値は 3.75mg/L で，10ml を用いた場合は 3.80mg/L という結果であった。妨害物質除去溶媒の少い方が 0.05mg/L だけ低く，誤差範囲であり，妨害物質の除去は充分に行われている。

無水硫酸ナトリウムによるクロロホルム層の乾燥については，標準液 5r の吸光度を下に示す。

	吸光度			
非乾燥	0.1382	0.1518	0.1264	0.1457
乾燥	0.1487	0.1487	0.1472	

これ等の改良の結果，標準液の吸光度が一定性を示し，試料測定の場合についても，誤差の生ずるのを未

然に防止出来る結果であった。

2) Urinary coproporphyrin[13) 14)]

筆者等が開発した，微量けい光法に従って分析した。（励起波長 403mμ，けい光波長 590）

3) Urinary urobilinogen[15) 16)]

採尿当日に還元操作をなし，約15時間経過後(翌日)，佐藤法に基いて測定した。

4) Urinary creatinine[17) 18)]

Jaffe の反応を用いた Folin 法により分析した。

実験の部

Creatinine correction に関する吟味

尿中クレアチニン量は，尿が正しく採取されたか否かを判定する目的のためにしばしば測定される[19)]。しかし，その変動は測定誤差よりも大きく，単位時間内の排泄量も一定ではない事などから，単に尿量をチェックするための "目安" 程度とする報告もある[20)]。

この様な事情の中で，尿成分のクレアチニン補正を行っている報告をしばしば見受ける。我々はそのような場合の数値の信頼性について追求を行った。

結　果

まず，健康男子の尿排泄を終日，しかも定時的に採取して試料に供した。途中15時～18時の時間帯の採尿直前に入浴を行い，人為的に稀薄尿を作り，その後水分摂取をひかえて濃厚尿を作った。

各時間帯の試料量を計量し，前記の分析方法に従って，各々の時間帯における尿成分の定量測定を行った。

各項目の分析値の関係を Table 1 に示す。

Table 1. Results of analyses in urinary components on a normal adult man.

Item	Time / Unit	6—9	9—12	12—15	15—18	18—21	21—1	1—6	6—9	Mean ± SD	C. V.
U. V.	ml	170	265	360	520	48	170	380	155		
	ml/hr.	56.7	88.3	120	173.3	16	42.5	76.0	51.7	76.6	
δ-ALA	mg/L	1.78	1.48	1.28	1.08	3.13	2.38	1.65	1.90	1.83± 0.61	0.3348
	A. Q. mg/hr.	0.10	0.13	0.15	0.19	0.05	0.10	0.13	0.10	0.12± 0.04	0.3258
	mg/gCn	1.65	2.14	2.61	3.31	0.98	1.67	2.06	1.74	2.02± 0.66	0.3250
Cp	μg/L	48.9	61.7	42.7	26.4	144.3	99.4	43.6	65.6	66.6 ±35.7	0,5355
	A. Q. μg/hr.	2.77	5.45	5.12	4.58	2.31	4.23	3.31	3.39	3.90± 1.05	0.2704
	μg/gCn	45.49	89.68	87.50	81.23	45.09	69.75	54.50	59.91	66.6 ±16.9	0.2540
Ug	mg/L	1.55	1.50	1.10	0.95	4.10	2.60	1.25	1.90	1.87± 0.97	0.5205
	A. Q. mg/hr.	0.088	0.133	0.132	0.165	0.066	0.111	0.095	0.098	0.111± 0.029	0.2630
	mg/gCn	1.44	2.18	2.25	2.92	1.28	1.83	1.56	1.74	1.90± 0.50	0.2621
Cn	mg/dl	107.5	68.8	48.8	32.5	320.0	142.5	80.0	109.5	113.7 ±84.8	0.7450
	A. Q. mg/hr	60.92	60.77	58.56	56.33	51.20	60.56	60.80	56.58	58.22± 3.19	0.0549

U. V. : Urine Volume, δ-AlA : δ-Aminolevulinic acid, Cp : Coproporphyrin, Ug : Urobilinogen, Cn : Creatinine, A. Q. : Absolute Quantity, C. V. : Coefficient of Variation.

各時間帯における値は，直接には比較することが出来ない。

Cp および Ug の測定値とクレアチニン比とを見ると，平均値はほとんどかわりがないが，標準偏差は，クレアチニン比の方が測定値の約½となっている。しかし，δ-ALA に関しては，クレアチニン比の平均値の方が高く，標準偏差も少し大きい。さらに，変動係数 (C. V.) については，測定値が一番大きく，次いで絶対排泄量 (A.Q.) で，クレアチニン比が一番小さい。クレアチニン自体は，代謝生理に基いており，その絶対排泄量の変動係数は非常に小さい結果である。

この表から，尿中排泄クレアチニン測定値と各項目の尿中排泄測定値の関係をグラフにして Fig. 1 に示す。

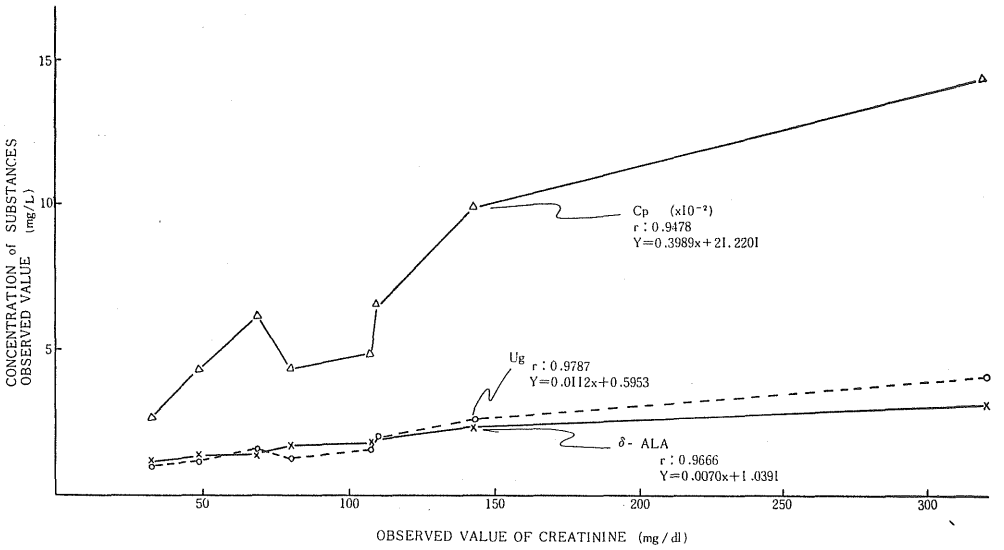


Fig. 1. Relationships between the δ-aminolevulinic acid, coproporphyrin or urobilinogen and the creatinine, on the observed values of temporary urine.

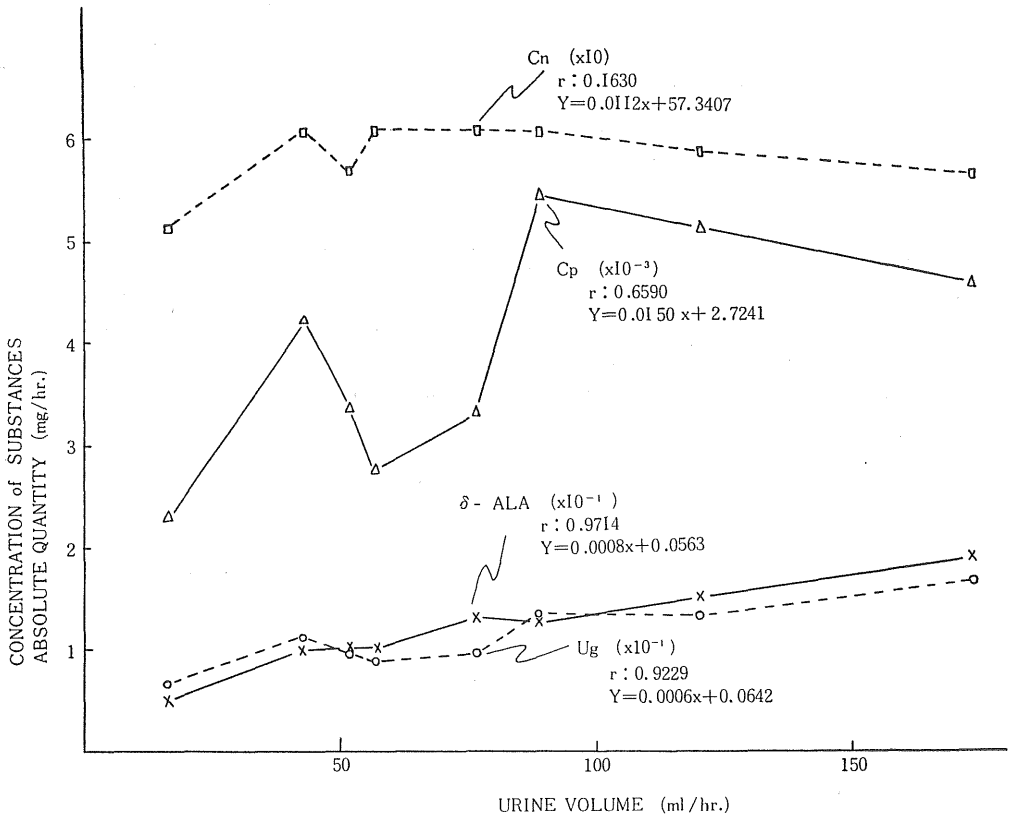


Fig. 2. Quantitative relationships between the absolute quantities of urinary δ-aminolevulinic acid, coproporphyrin, urobilinogen or creatinine and the urine volume.

各項目とも相関係数（r：coefficient of correlation）は非常に大きく，良い相関を示している。

次に，1時間当りの絶対排泄尿量と，各々の尿排泄絶対値との関係を Fig. 2 に示す。

δ-ALA，Cp，Ug については変動はあるが，一貫して尿量の増加に伴って増えているのに反し，クレアチニンは極少量尿の時（濃厚尿）および多量尿（稀薄尿）となった時に減少傾向を示している。

更に，1時間当りのクレアチニン絶対排泄量と他の三項目のそれとを Fig. 3 に示す。

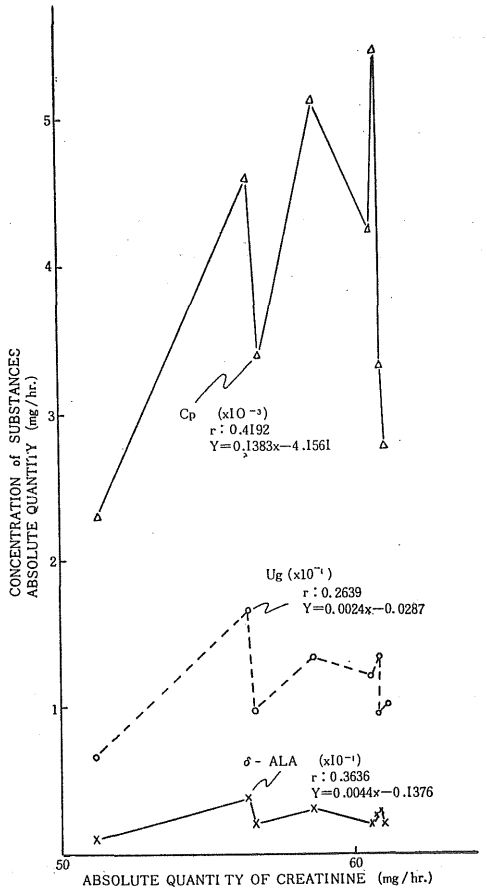


Fig. 3. Relationships between the δ-amino-levulinic acid, coproporpyrin or urobilinogen and creatinine, on the absolute quantities in urine.

微量ながら変動しているクレアチニンとの間の相関係数は小さく，表1からも明らかなように，変動関係がはっきりと分る。中でも Cp の変動は大きい。

Creatinine correction に関する考察

クレアチニン補正を行った数値の報告は多く，しかも種類に富んでいる。尿中ホルモンの補正[21]，尿中チアミンの補正[22]，尿中酵素活性の補正[23]や尿中 δ-ALA，Cp や尿中鉛の補正[24]などの文献が見られる。しかし，酵素活性のそれは，クレアチニン量の一定性がなく，比率算出を否定する指摘をなした。更に，クレアチニンは，進行性筋ジストロフィー，先天性筋無緊張症，甲状腺機能亢進症や特に多い疾患と思われる肝障害などにおいて減少が見られるとしている[7][8]。

ゆえに，我々の実験結果から見ても，一般的に濃厚尿の場合にはまあまあとしても，稀薄尿において Creatinine correction を行った場合に，疾患面からも，尿量の増加に伴って減少するクレアチニンと増加する物質との関係からも，好ましくない事である。

よって補正操作を行うより，クレアチニン自体の測定値と照し合せて，他成分の成績を読むことが望ましい。クレアチニン補正の正否について，さらに実態面からの検討を行っている。

Field Test の部

調査方法

都内主要道路交叉点付近の在住者で，東京都衛生局鉛害検診受診者の13～15時頃の一時尿を試料として定量分析を行い，データを推計統計的に処理した。

期間等については，尿中 δ-ALA については '71年5月から '72年7月までの1,041名，尿中 Cp は '71年9月から '72年7月までの678名，尿中 Ug は '71年9月から '72年7月までの759名の検診受診者の分析値を対象にした。

まず，分析値を性別，年代層別および全体のグループに分け，危険率1％における棄却限界上限値を，限界値以上のデータ例を含まなくなる迄，削除方法にて求めた。（棄却限界下限値は全てマイナスであった。）更に，各々のグループの棄却限界上限値範囲内の平均値を算出した。計算結果を Table 2 に示す。

棄却限界上限値以上の値を示した例は，δ-ALA：$^{3}/_{1041}$名（約0.3％），Cp：$^{41}/_{678}$名（約6％），Ug：$^{68}/_{759}$名（約9％）あり，肝障害を疑わせる人が1割近く居る実態であった。

表に見られる様に，全体的に棄却限界値および平均値共に男性側に高く，一般的に云われている通りであった。又，年代層別に各項目を見ると，男性群での Cp，Ug は30才代において棄却限界上限値および平均値の双方が高く，高令化に伴って排泄量の減少傾向が

Table 2. Mean value of δ-aminolevulinic acid, coproporphyrin and urobilnogen on the screening test of inhabitants in Tokyo metropolitan area.

Item	Age / Sex	20—29	30—39	40—49	50—59	60—69	70—	Total Mean
Cp (μg/L)	M	76.0 (40) 171.2	84.2 (43) 201.7	63.3 (49) 151.0	51.4 (47) 132.3	45.3 (56) 99.9	54.8 (23) 130.6	58.3 (249) 133.4
	W	63.1 (21) 154.4	55.7 (96) 133.6	58.2 (94) 147.5	54.0 (92) 129.7	51.6 (65) 134.3	54.7 (21) 138.3	55.1 (388) 132.6
δ-ALA (mg/L)	M	2.60(76) 5.28	2.52 (77) 4.54	2.28 (93) 4.78	2.14 (83) 4.23	2.19(108) 4.87	2.11(35) 4.09	2.30(469) 4.61
	W	2.41(38) 5.23	2.10(138) 4.25	1.86(130) 3.67	1.92(139) 3.89	1.90(100) 3.83	1.70(23) 3.53	1.96(569) 3.93
Ug (mg/L)	M	1.76(45) 3.89	1.83 (45) 4.17	1.56 (53) 3.69	1.60 (55) 3.85	1.63 (63) 3.80	1.84(25) 4.19	1.69(290) 3.81
	W	1.87(26) 4.51	1.54(105) 3.75	1.40 (86) 3.34	1.40 (93) 3.35	1.46 (72) 3.54	1.29(20) 3.60	1.46(401) 3.49

Lower of each section is rejection limit on 1% level of significance.
( ): Number of samples, M: Men, W: Women

うかがわれるが，70才以上の群で高い数値を示している。δ-ALA は多少変動しているが，減少傾向である。女性群では，全項目ともに多少の変動は見受けられるが，70才以上の Cp 以外については，高令化に伴って漸減傾向である。これらの値は，現在の都居住者の特定地域住民の一部分の Back Ground Average であり Field Test の性格上，正常値の算出を行ったものではない。

比較の便宜上，今迄に報告されている正常値を次に記載する。

Urinary δ-ALA

2.9±1.4mg/L[25]，0.8～2.8mg/L[7]，4.0mg/L（統計上限値）[26]，<6.0mg/L（英国基準）[27]

Urinary Cp

70±40μg/L[25]，50～200μg/L[7]，110μg/L（統計上限値）[26]，60～180μg/day[17]，<150μg/L（英国基準）[27]

Urinary Ug

0～4.0mg/day[18]，0.2～3.0mg/day[28]，0.5～2.0mg/day[17]

以上の如く，正常値としている値にも相当の種類がある。

Field Test に関する考察

我々は，東京都の一部の住民から表2のような成績を得ているが，大橋ら[29]は，正常者群の成績から，危険率5%における棄却限界上限値を，尿中 Cp：78.0 μg/L，尿中 δ-4.0mg/L を求め，また堀口[26]は，笠原が得た鉛職歴のない健康日本人についての，統計上限値，尿中Cp：110μg/L，尿中 δ-ALA：4 mg/L を記している。

さらに，健康者についての値を，谷嶋[30]は，尿中 Cp：100μg/L 以下（88/89名）であったと示し，磯貝らは，尿中 δ-ALA の96名に見る分析結果を 3.01±1.26mg/L[31]，2.3±1.9mg/L[32]と報告している。我々が算出した棄却限界上限値と比較すると，特に尿中 Cp：133μg/L および男性における尿中 δ-ALA：4.61 mg/L においてその差は，東京都一部住民の尿中排泄量が多い事を示唆しているが，原因については，過去のデータ不足から解析不能である。

高令化に伴う，各尿成分の排泄量の漸減傾向と，70才以上の群に見る，尿中 Cp および Ug の平均値と棄却限界上限値が高くなる事は，肝障害やその他の疾患によるものか又は，生理代謝機能の衰退と旺盛さを物語るのかは不明であるが，吟味する事も望まれよう。

総合的に見て，棄却限界上限値以上の例の出現率が，尿中 δ-ALA：0.3%，尿中 Cp：6%は尿中 Ug の9%に対比して低いが，これは肝障害によるものか，鉛中毒に見る δ-ALA dehydratase, Hem synthetase の阻害によるか又はその他の要因に基くかなどを明らかにするには，血液理化学的検査との複合的判定に待たねばならないことである。δ-ALA が低いのは，鉛中毒との因果関係が薄い事を思わせる結果であった。

ま と め

我々は，尿中排泄 δ-ALA，Cp，Ug の Field Test を，特定地域住民の一時尿で行った。一時尿の問題点を解決するため，一般的に分析値を補正する目的で行われている，クレアチニン比（/gCn）算出について吟味を行った。

まず，健康個人尿を終日追跡し，その成分変動について調べた。測定値間における Cn との相関係数は，δ-ALA＝0.9666，Cp＝0.9478，Ug＝0.9787と高いが，1時間当りの絶対排泄量に見る変動係数は，Cn＝0.0549と小さいのに比べ，δ-ALA＝0.3258，Cp＝0.2704，Ug＝0.2636 と大きい。更に，1時間当りの尿量と絶対排泄量との相関係数を比べると，Cn＝0.1630 と小さく，δ-ALA＝0.9714，Cp＝0.6590，Ug＝0.9147 と大きい。ゆえに，Cn との相関度は高くとも，変動係数の小さいもので大きなものを比率化することは尿量に伴った補正とはならなく，単に理論的な数字処理法に終る。よって，Cn 自体の測定値と照合して，複合的データ判断を行う方が望ましい結果であった。

Field Test の結果については，尿での成績上，詳細にわたる解析が出来ないが，高令化に伴って各成分の漸減傾向が認められる。

過去のデータ不足により，東京都民の現在までの健康推移と状態に関する見解が述べられないのは残念なことである。

現在のように複雑な要因を伴う大都市社会での生活においては，食品，大気，水質などの行政検査や，国が行っている栄養実態調査などと同じ様に，住民の健康動態の追跡調査が，疾患予防や保健衛生上から見ても，必要と思われる。

本報告の概要は，第9回関東甲信衛生検査学会で学術講演を行った。

参考文献

1） 上代皓三，中尾喜久：血色素の生理と臨床，医学書院（1958）
2） 山村雄一，熊谷　朗，熊原雄一：病態生化学2，朝倉書店（1968）
3） 吉川春寿，阿部正和：代謝—基礎と臨床—，朝倉書店（1970）
4） 山村雄一，熊谷　朗，熊原雄一：病態生化学1，朝倉書店（1968）
5） 吉川春寿，中尾喜久：血液の生化学—基礎と臨床—，朝倉書店（1972）
6） 黒田嘉一郎，吉川春寿，他：血液化学朝倉書店（1966）
7） 古川哲雄：血液・尿化学検査—その数値をどう読むか—，日本臨床，364号（1973）
8） 植田啓嗣，伊藤友昭，他：臨床科学，5，785～791（1969）
9） Wada, O. and Toyokawa, K. etc.,: Brit. J. Industr. Med., 26, 240～243（1969）
10） 野牛　弘，秋山和幸，他：東京都立衛生研究所研究年報，23，287—294（1971）
11） 有機合成化学協会：溶剤ポケットブック，オーム社（1970）
12） Paul G. Stecher, et al.: The MERCK INDEX, Merck & Co., Inc.（1968）
13） 武士侯邦雄，霜田さと子，小笠原　公：衛生検査，21，318（1972）
14） 武士侯邦雄，霜田さと子，小笠原　公：東京都立衛生研究所研究年報，(24)，1972，投稿中
15） 陳　敏馨：臨床検査，6，497—499（1972）
16） 陳　敏馨：臨床病理，11，207—210（1963）
17） 金井　泉：臨床検査法提要，金原出版 K. K,（1964）
18） 柴田　進，高橋　浩：臨床化学の技術，金原出版 K. K（1963）
19） 柴田　進：病態生化学—その基礎—，金芳堂（1966）
20） 浅井正樹，中根清司：衛生検査，20，783—787（1971）
21） 佐伯　彬，金野昭夫：臨床病理，20総会号，54（1972）
22） 渡辺嶺男：日本衛生学雑誌，17，13（1962）
23） 石田美智子，辺見明子，他：第9回関東甲信衛生検査学会講演集，38頁（1972）
24） 田口徹也，鈴木庄亮，横橋五郎：産業医学，12，482—483（1970）
25） Nakano, K., Wada, O. & Yano, Y.: Clinica Chim. Acta, 19, 319—325（1968）
26） 堀口俊一：からだの科学，(46)，(1972)
27） 久保田重孝：からだの科学，(49)，(1973)
28） 斎藤正行：光電比色計による臨床化学検査，南山堂（1952）
29） 大橋　誠，塚本博康：交通医学，22，311—312（1968）
30） 谷嶋森寿：住友産業衛生，5，188—197（1969）

31） 磯貝元男，池見和子　他：臨床病理，18　総会号，182（1970）

32） 磯貝元男，大場康寛，他：臨床病理，19　総会号，178（1971）

東京都民の尿成分検査成績
ウロビリノーゲン、糖、タンパクの出現状況

小笠原 公* 武士俣 邦 雄* 霜 田 さと子*
可 児 利 朗* 野 牛 弘**

RESULT OF URINALYSIS OF THE INHABITANTS IN TOKYO ON THE EXAMINATION OF URINE UROBILINOGEN, SUGAR AND PROTEIN

Kimi OGASAWARA,* Kunio BUSHIMATA,* Satoko SHIMODA,* Toshiro KANI* and Hiroshi YAGYU**

(Division of Nutrition, Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Division of Environmental Health, Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Tokyo Metropolitan Health Bureau is performing the inhabitants health examination as to the lead polution. For revealing the practical state of inhabitants from the standpoint of testing on abnormal urinary components, components of temporary urine (urobilinogen, sugar and protein) were qualitatively determined as to 842 inhabitants (390 males and 452 females of 10–70 ages) living near main streets in Tokyo in the term from May in 1971 to March in 1972. The results are as follows:

(1) The positive ratio of urinary components were, 7.6% with strongly positive of urobilinogen, 8.07% with sugar and 7.96% with protein.
(2) The positive ratio of urinary urobilinogen is high in summer and also high in the male; it is almost similar in any age group.
(3) Urinary sugar is high in summer and January, and is also high in the male. It is high in the group of older than 40 years of age.
(4) Urinary protein appears regardless with the season. The positive ratio is high in the female and increases following to increase of age.

はじめに

近年，食生活の欧風化並びに生活様式の変化等によって，肝臓疾患，糖尿病，腎臓病などの成人病[1]が増加の傾向にあるといわれている。このため住民の保健指導対策の一環として，各地で健康障害者の早期発見を図る集団検診が行なわれるようになった。

これらの疾病を早期にスクリーニングする臨床試験としては，平易に検査ができる尿ウロビリノーゲン，尿糖，尿タンパク定性試験が常用されている。

報告によるとこれら尿成分の陽性率は，各地で行なわれた検査対象集団に差異があるので，一概には論じられないがいずれをみてもかなり高い陽性率を示して

＊東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科
**東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

いる。

東京都民に関しては各保健所が循環器集団検診，成人病検診の項目として一部の尿検査を行なっているが，広域の住民に対する尿成分集団検査報告が乏しい。そのため機会を得て，住民の尿成分異常出現状況を明らかにすることは保健指導のうえから意義があるものと考える。

東京都衛生局は昭和45年5月新宿区牛込柳町に端を発した鉛害事件以降，鉛公害の疑いによる一般住民の集団検診を続けている。この検査はほぼ都内全域にわたる非鉛中毒地域住民について現在もなお継続実施中である。

われわれは鉛害関連の尿検査を担当したので，これを機会に尿成分臨床検査の面から，一般住民の健康障害の程度を推察したいと考えて尿成分（ウロビリノーゲン，糖，タンパク）定性試験を行なったので，東京都住民の尿成分について異常出現の状況を報告する。

検査方法

1. 検査対象について

都内の交通量が多い主要道路近辺に居住する都民で，Table I に示す25保健所管区内の受診を希望するもののうち一地域50名を目標に行なった。

検査人数は年令20歳～70歳代を主とし，6名だけ20歳未満者を含む男390人，女452人の計842人である。

2. 検査期間について

昭和46年5月～47年3月の約1年間にわたり，毎月検査を実施した。

3. 採尿および試験方法について

検査地区ごとに毎回午後2時前後の一時尿を採取し，同日のうちにつぎに示す方法[2]で試験を行なった。

尿ウロビリノーゲン定性：エールリッヒ氏アルデヒド反応

尿糖定性：ニーランデル法

尿タンパク定性：スルホサリチル酸法

4. 検査の判定について

尿ウロビリノーゲンについては正常陽性の2倍～3倍量程度のものを中等度陽性とし，4倍量以上のものを強陽性とした。

エールリッヒ氏アルデヒド反応による中等度の陽性はウロビリノーゲン以外の物質すなわちポルフォビリノーゲンやインドール誘導体も関与して現われるので，アルデヒド反応中等度以上の陽性を示した尿については，飽和サク酸ナトリウム液を添加し，これにクロロホルムを加えて振盪したのち判定した。また陽性の強弱判定を容易にするため，ウロビリノーゲン定量用試薬（シノテスト5号）を併用した。

尿ウロビリノーゲンの試験は検査室温にも影響され，高温では陽性になりやすい。そのため検査室温は年間を通じ20～25°Cで行なうように留意した。

尿糖についてはニーランデル法のほかにヘマコンビスティックス法を併用してみたが，この方法は陽性としてひろいあげる危険率が高いため，主としてニーランデル法を用いた。ニーランデル法陽性のもののうち判定に疑問を生じたものについては，服用薬剤等が陽性として関与しないベネジクト法を用いた。

尿糖判定に際して明らかに陽性にはできないものすなわち尿糖量100mg/dl前後のものは疑陽性にした。

尿タンパクについてはスルホサリチル酸法のほかにヘマコンビスティックス法を併用していたが，この方法は陽性にしやすい難点があるため[3]主としてスルホサリチル酸法を用い，弱陽性および疑陽性を示した尿については煮沸法を用いて確認した。強弱程度の判定は放置後沈殿を生ずるものを強陽性として区分した。

検査成績および考察

1. 尿成分の陽性率について

尿成分（ウロビリノーゲン，糖，タンパク）それぞれの陽性率を Table I に示す。すなわち尿ウロビリノーゲン異常陽性率は23.87％であるが，これには中等度陽性のものが16.27％含まれる。従って強陽性は7.6％であった。性別に尿ウロビリノーゲン出現は，中等度陽性，強陽性のいずれも男が高率であった。

尿ウロビリノーゲン異常陽性率に中等度のものを加えて表現した。その理由としては正常陽性の2倍～3倍量のいわゆる中等度陽性であっても，定量を行なってみると，定性試験の判定とは必ずしも一致せず比較的高値を示すものがあるためであり，また集団検診の一次検査で尿ウロビリノーゲン異常陽性者につき精密に肝臓機能検査を行なってみると，かなりの障害者が発見されるとの報告[4]をも考慮したためである。

東京都民の尿ウロビリノーゲン陽性率23.87％は他地方の住民のそれと比べていかにあるのか，比較するにも住民に対する報告は少ない。われわれが行なったものは一年間を通じて得られたものであり，検査対象にも差異があるので比較は疑問であるが，東京都内では定時制高校生635人に対し11.2％，大学生600人に対し15.2％，製造関係会社員263人に対し27.0％である報告[3]のほか，地方の住民に関するものでは兵庫県町民[4]20歳～60歳の967人について1970年7月～9月

に行なったもの14.5%，徳島県下山村民6.8%，同町民25.4%と報告[5]されているごとく，尿ウロビリノーゲンは高率に出現するようである。

つぎに尿糖陽性率は8.07%であった。このほかに疑陽性のものが3%近く出現した。性別に尿糖の出現率を比較すると男のほうが高い出現率であった。

糖尿病は難治性と無自覚性さらには合併症併発のためにも早期に発見する必要がある。この検査方法としては尿糖定性検査であっても発見率が高いため，集団検診による尿糖陽性率に関する報告例が多い。東京都民の尿糖陽性率を，報告されている地方住民の陽性率と比較すると，1967年に行なわれた鹿児島市民[6]の3.68%，北関東地方農民[7]1,457人について6.7%と報告され，官公庁職員や会社員に関するものとしては，高知市内会社員[8]2,516人に対し11.2%，京都市職員3,080人に対し5.2%，新潟で行なわれた官公庁および会社職員[9]636人に対し19.5%，広島県下工場従業員[10]10,438人に対し4.0%の報告がなされている。

また1969年全国の各種職業従業者16,379人について糖尿病研究班[11]が行なった集計では17.0%と報告されているようにそれぞれかなり高率の出現である。全国糖尿病罹病率が37年～38年の調査では7.6%であり，これに疑糖尿病を含めると14.7%になるとの報告[12]やさらには40歳以上の罹病率が1959年は4.6%であり，東京地区が5.4%で最高であると報告[13]され，4年後の1963年には7.1%と高率であったとの報告[13]から推察して，東京都民についてもかなり高率の尿糖出現が想定される。

つぎに尿タンパク陽生率は7.96%である。このうちに強陽性のものが1.54%含まれる。この性別出現率を比べると，前述した尿ウロビリノーゲンや尿糖とは逆に女のほうが高率な出現であった。またこのほかに疑陽性に出現したものがかなり多く6.06%であった。

尿タンパク定性試験も成人病予防対策の一環として，腎疾患の指標に慣用される種目である。この尿出現は生理的にも出現[2]することがあり，また疲労とも関係ぶかい報告[14]があるようように，腎疾患に特異的ではないにしても，腎疾患は成人病のうち罹病率順位が高いことを考えると尿タンパク定性試験を行なう重要性がある。従って疑陽生率をも報告した。またさらに尿タンパク出現程度が強陽性であるものは，追跡調査によると死亡率が高いとの報告もあるので強陽性率についても表現した。

尿タンパクの集団検査は疫学的調査としての報告や，定時制高校生635人に対して21.6%，大学生600人に対して1.8%，製造関係会社員263人に対し，9.5%を示した報告[3]のように，特殊な集団について行なわれたもののほか，地方でわずかに1968年鹿児島市民につき成人病対策検査として実施し，9.57%を報告[6]したものが散見されるが東京都民の尿タンパク陽性率を比較するには問題が多く，比較に適当なものは乏しい。

Table 1. Positive Ratio of Urinary Components

Items of Examination	Number of Person and Sex	Positive Ratio(%) (Abnormal) Total	Subdivide
Urobilinogen	Total 842	23.87	M. P. 16.27 S. P. 7.60
	Male 390	31.27	M. P. 20.51 S. P. 10.77
	Female 452	17.47	M. P. 12.61 S. P. 4.86
Sugar	Total 842	8.07	M. P. — S. P. — W. P. 2.96
	Male 390	10.26	M. P. — S. P. — W. P. 4.61
	Female 452	6.19	M. P. — S. P. — W. P. 1.55
Protein	Total 842	7.96	M. P. — S. P. 1.54 W. P. 6.06
	Male 390	6.41	M. P. — S. P. 0.77 W. P. 5.38
	Female 452	9.29	M. P. — S. P. 2.21 W. P. 6.63

W. P.: Weakly Positive
M. P.: Moderately Positive
S. P.: Strongly Positive

2. 地区別の尿成分出現状況について

尿検査は地区別に行なったので，25保健所管区ごとの検査数と尿成分陽性率をTable 2に示す。すなわち尿ウロビリノーゲン異常陽性率は地区によって差異が明らかにみられ，9.3%～45.7%の範囲であった。地区ごとの陽性率を総検数の異常陽性率23.87%と比較すると，向島，赤坂，三鷹，城東，青梅，千住，中央および牛込地区が高率であった。この異常陽性のうち強陽性であったもののみについて総検数の強陽性率7.6%と比較すると，前記地区のうち三鷹，城東，千住地区は低率であった。このことから，これらの地区住民は中等度陽性の出現が多いことである。

このように異常陽性出現が高率であった8地区は，

検査を行なった時期が夏季である。尿ウロビリノーゲンは気温や疲労により出現[2),3)]しやすいといわれるので，その吟味として，次項に検査月ごとの尿成分出現傾向について述べる。

地区ごとの尿糖出現は0％～18.7％の範囲を示し，総検数に対する陽性率8.07％に比較して三鷹，城東，中央，麴町および雪谷地区が高率であった。

つぎに地区ごとの尿タンパク出現は2.7％～16.1％の範囲を示し，総検数に対する陽性率7.96％に比較して三鷹，板橋東，麴町，牛込，王子および碑文谷地区に高率な出現をみた。

以上のように地区別にみた尿成分の異常出現状況は比較的高率な値を示した地区もあったが，今回は東京都内のうちわずか25保健所管区であったこと，さらには一地区住民の検査数が少ないことのために，地区別尿成分異常出現率の比較考察はむりがあり，今後に検討が残る。

Table 2. Positive Ratio of Urinary Components at Each District

Area	Number of Person and Sex			Positive Ratio (%) (Abnormal)			
				Urobilinogen		Sugar	Protein
	Total	Male	Female	T. P.	S. P.	T. P.	T. P.
Takaido	22	10	12	22.7	9.1	9.1	4.5
Mukojima	38	21	17	28.9	10.5	10.5	10.5
Akasaka	25	7	18	28.0	12.0	8.0	4.0
Mitaka	42	19	23	35.7	7.1	11.9	11.9
Johto	32	25	7	34.3	3.1	18.7	6.2
Ohme	41	25	16	39.0	19.5	9.8	7.3
Senju	46	33	13	34.7	0	8.7	10.9
Chuo	22	18	4	45.7	22.7	13.6	4.5
Shiba	42	4	38	26.2	14.3	7.1	4.8
Honjo	41	20	21	24.4	12.2	9.8	7.3
Kohjiya	22	10	12	26.2	0	0	9.1
Itabashi East	50	20	30	22.0	10.0	8.0	14.0
Nakano North	50	10	40	18.0	4.0	2.0	4.0
Asakusa	28	14	14	21.4	10.7	7.2	3.6
Ohmori	50	24	26	20.0	4.0	6.0	4.0
Kohjimachi	13	4	9	15.4	0	15.4	15.4
Ebara	46	29	17	23.9	4.3	10.9	4.3
Meguro	36	20	16	19.1	5.6	2.7	2.7
Koganei	29	12	17	13.8	3.5	6.9	6.9
Ushigome	11	11	0	36.4	36.4	0	16.1
Yukigaya	37	18	19	13.5	2.7	13.5	10.8
Tamagawa	32	10	22	9.3	6.3	3.1	3.1
Ohji	29	8	21	13.8	0	10.4	13.8
Himonya	24	8	16	12.5	4.2	8.3	15.8
Musashino	34	10	24	11.8	2.9	0	8.9
	842	390	452	23.87	7.60	8.07	7.96

T. P.: Total Positive

S. P.: Strongly Positive

3. 月別の尿成分出現状況について

尿検査は5月～3月のおおよそ1年間にわたって毎月実施したものである。従って季節により尿成分出現に差異があるか否かの吟味として，検査した月ごとに尿成分異常出現状況をしらべた。結果をTable 3に示す。

月ごとに尿ウロビリノーゲン異常陽性率をみると月によってかなりの差異があり，11.5％（2月）～38.2％（8月）の出現範囲を示し，夏季と冬季では総検数の異常陽性率23.87％を界に，6月（31.4％），7月（37.0％），8月（38.2％）が明らかに高率，12月(16.9％)，1月（18.7％），2月（11.5％），3月（12.1％）は逆に低率であった。これは性別にみても同様の傾向であった。しかし強陽性出現率は，総検数の陽性率7.6％に比較して，夏季でも低率（8月　7.3％）を示した月があり，また逆に冬季でも高率(1月　10.5％)に出現する月があった。季節による尿ウロビリノーゲン出現率を比較考察するため，全平均異常陽性率に対して比較的高率であった6月，7月，8月と，逆に低率であった12月～3月の陽性率との差の検定を行ない，1％の危険率で有意であった。すなわち尿ウロビリノーゲン異常陽性出現は夏季に高率であった。

つぎに尿ウロビリノーゲン強陽性のものについても6月～8月と12月～3月の陽性率の差の検定を行ない，有意差が認められなかった。このことは強陽性は年間を通じて季節に関係なく出現することである。したがって尿ウロビリノーゲン異常陽性のうち中等度の陽性は夏季に出現しやすいということであろう。

ウロビリノーゲンは肝機能障害を早期にスクリーニングできる鋭敏な方法であるが，その強弱出現の程度がいかなる意義を表わすかは，尿ウロビリノーゲン反応が肝疾患に特異的でないだけにむつかしい。以上述べてきたごとく尿ウロビリノーゲン中等度の陽性率は夏季に高率であったことで明らかなように，その出現は気温や疲労に影響されるので，この点を考慮した検査が必要と考える。

地区別の尿ウロビリノーゲン出現率についてはすでに前項で述べたが，高率に出現がみられた地区は夏季に検査を行なったものであり，中等度陽性者が多いための尿ウロビリノーゲン高率出現と考えられる。

月ごとの尿糖出現傾向は，総検数の陽性率8.07％に比較して6月(10.5％)，7月(13.7％)，8月(10.3％)の夏季と1月（10.4％）がやや高率であった。このことから尿糖出現も季節と無関係ではないようである。

月ごとに尿タンパクの出現状況は総検数の陽性率7.96％に比較して1月（12.5％）と3月（13.8％）が高率であるほかは，いずれの月も低率であった。尿タンパクは季節による出現の差異はないようである。

Table 3. Positive Ratio of Urinary Components at Each Month

Items of Examination	Positive Subdivide	No. of Person and Sex / Positive Ratio (%)		5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
			Total	22	105	73	68	105	128	109	65	48	61	58	842
			Male	10	47	50	51	34	44	57	32	29	18	18	390
			Female	12	58	23	17	71	84	52	33	18	43	40	452
Urobilinogen	T. P.		Total	22.7	31.4	37.0	38.2	25.7	20.3	21.1	16.9	18.7	11.5	12.1	23.87
			Male	30.0	34.0	42.0	41.1	29.4	31.8	28.1	28.1	11.1	11.1	16.7	31.27
			Female	16.7	29.3	26.1	29.4	24.0	14.3	13.5	6.1	11.6	11.6	10.0	17.47
	S. P.		Total	9.1	9.5	12.3	7.3	10.5	8.0	3.7	6.2	10.4	3.3	3.5	7.60
Sugar	T. P.		Total	9.1	10.5	13.7	10.3	6.7	5.5	9.2	4.6	10.4	6.6	3.4	8.07
			Male	0	14.9	16.0	9.8	5.9	9.1	9.5	3.1	6.9	16.7	11.1	10.26
			Female	16.7	6.9	8.7	11.8	7.1	3.6	7.7	6.1	15.8	2.3	0	6.19
Protein	T. P.		Total	4.5	9.5	6.9	8.8	6.7	7.8	5.5	4.6	12.5	8.2	13.8	7.96
			Male	10.0	6.4	8.0	3.9	5.9	2.3	5.3	3.1	13.8	0	22.2	6.41
			Female	0	12.1	4.4	23.5	7.1	10.7	5.8	6.1	10.5	11.6	10.0	9.29

T. P.: Total Positive
S. P.: Strongly Positive

4. 年令別の尿成分出現状況について

年令別に尿成分出現状況をしらべた。すなわち10歳間隔で表現した年代層による尿の各成分陽性率をTable 4に示す。被検者の年令構成について，20歳未満のものは総検数に対し，わずか0.7％で，70歳以上の5.4％，20歳代～60歳代の10.7％～20.4％に比べて少数である。したがって今回は20歳未満のものについての検討は行なえない。

総検数に対する尿ウロビリノーゲン異常陽性率23.87％の年代別出現状況は，50歳代が3.1％で比較

的低率であったが，20歳代～60歳代のいずれも大差なくほぼ同率（3.7%～5.7%）の出現であった。

年代別に尿ウロビリノーゲン出現率をみたものに1970年兵庫県下町民967人に対し，7月～9月の3カ月にわたる検査において，20歳～60歳の年代別出現に有意差がないとの報告[4]がある。今回東京都民842人について行なった成績でも同様のことがいえる。

性別による各年代ごとの尿ウロビリノーゲン出現傾向は，男については20歳以上60歳代の各年代にほぼ同率に出現する。女では30歳以上の各年代に同率に出現し，しかも各年代とも男のほうが高率であった。

つぎに尿ウロビリノーゲン強陽性率7.6%について，各年代ごとの出現率を比較すると，どの年代もほぼ同率の出現をみた。強陽性のものも性別にはいずれの年代でも男が高率であった。

年代別に尿糖の出現状況について述べる。総検数に対する陽性率8.07%の各年代出現をみると，20歳代（0.6%）～30歳代(1.1%)の陽性率1.6%に比較して，40歳代は2.3%，50歳代は1.4%，60歳代は1.9%と高令に従い高率に出現する。このように尿糖出現は年令と関係が深く，同様のことが報告[15]，[16]でも表現されているように，尿糖は高令に従って出現率が高くなる成分であるといえる。

尿糖集団検査は40歳以上のものについて行なわれた報告が多いので，東京都民の40歳以上のものにかぎって陽性率を表現すると，40歳以上の人員構成583人に対し9.26%になり，若年層より高率出現である。この陽性率を1963年糖尿病研究班が，各種職業を持つ40歳以上の3,171人について行なった成績[13]の7.6%と比較すると，東京都民がより高率であった。さらに各種の集団について行なわれた成績との比較には，集団対象が異なるための問題があるが，京浜地方工場関係従事者[17]1,061人に対し10.3%，四国地方農民および工場従事者[18]1,018人に対し13.4%，勤労者や富裕階級[19]の1,462人に対し18.2%，新潟県下の職業従事者[20]1,265人は対し24.5%等より低率であった。

性別に各年代ごとの尿糖出現率は，20歳代と40歳代において男に高率であった。

尿タンパクの総検数に対する陽性率は7.96%である。この年令別による出現状況は，20歳代～30歳代はそれぞれ0.2%，0.5%であるが40歳代は1.4%，50歳代は1.8%，60歳代は3.4%と年令の増加に従って高率な

Table 4. Positive Ratio of Urinary Components at Each Age

Items of Examination	Positive Subdivide	No. of Person and Sex / Positive Ratio (%)		—19	20—29	30—39	40—49	50—59	60—69	70—
			Total	6	90	163	185	180	172	46
			Male	4	60	62	78	68	91	27
			Female	2	30	101	107	112	81	19
Urobilinogen	T. P.		Total	0.1	3.7	4.9	5.0	3.1	5.7	1.4
			Male	0.3	5.9	5.9	5.9	3.1	8.2	2.0
			Female	0	1.8	4.0	4.2	3.1	3.5	0.9
	S. P.		Total	0	1.4	1.4	2.0	1.2	0.8	0.7
			Male	0	2.3	2.6	2.3	1.3	1.0	1.3
			Female	0	0.7	0.4	1.8	1.1	0.7	0.2
Sugar			Total	0	0.6	1.1	2.3	1.4	1.9	0.7
			Male	0	1.3	1.0	3.3	1.8	2.1	0.8
			Female	0	0	1.1	1.3	1.1	2.0	0.8
Protein	T. P.		Total	0	0.2	0.5	1.4	1.8	3.4	0.7
			Male	0	0.5	0.3	0.5	1.3	3.1	0.8
			Female	0	0	0.7	0.2	2.2	3.5	0.7
	S. P.		Total	0	0	0.1	0.1	0.4	0.6	0.4
			Male	0	0	0	0	0.3	0.3	0.3
			Female	0	0	0.2	0.2	0.4	0.9	0.4

T. P.: Total Positive
S. P.: Strongly Positive

出現をする。性別に各年代ごとの尿タンパク出現率を比較すると，尿ウロビリノーゲンや尿糖とは逆に，30歳以降どの年代でも女に高率な出現であった。

尿タンパクの強陽性率は1.54％であるが，これは高令者に，しかも女に多く出現をみた。

5. 複種の尿成分出現状況について

尿ウロビリノーゲン，尿糖，尿タンパクは単独に出現することが多いが，これらが複種に出現する場合もある。肝臓疾患，糖尿病，腎臓病のいずれも合併症を起しやすい疾患といわれている。そのため尿成分の検査で複種の成分が出現することは，有病性をスクリーニングするには意義が大きいと考える。

東京都民842人の尿成分検査の結果，尿ウロビリノーゲンと尿糖同時出現率は32人の3.8％で，このうち男が26名を占めた。尿ウロビリノーゲンと尿タンパク同時出現は27人の3.2％で，うち15名が女であった。尿糖と尿タンパクの同時出現は14人の1.7％で，うち9人が男であった。尿ウロビリノーゲン，尿糖および尿タンパクの三種重複出現は8名の0.95％であった。

考　按

東京都内居住の地区住民について尿成分定性検査を行なった結果，いずれの成分も各地で報告されている成績と近似の陽性率を示した成分もあったが，検査した年度や季節さらには対象が異なるので正しく比較することができなかった。

検査成績のところで述べたように都民の尿成分陽性率は意外に高率であったが，このことは被検者無作為抽出方式の検査ではなく，東京都民の鉛害検診の受診希望者であることに問題点があるともいえる。しかし広域的に年間にわたり多数の集団について検査が行なわれる機会は乏しいものであるから，この際検査を行なった成績を報告した。この尿成分陽性率のなかには，被検尿が一時尿であるため，季節的に濃縮尿，または希釈尿であったり，一時的に出現しているものも含まれると思われる。従って陽性率が直ちに罹病率ではない。真の健康障害を早期に発見するためには，くり返し検査や精密検査が必要なことは勿論である。

今回報告した成績は一時的検査であっても各々の尿成分が高率に出現していることに着目し，住民の健康維持を図るための，機関が行なう保健指導対策や各種検診に際しての受診勧奨の資料として意義があるものと考える。

まとめ

東京都内主要道路近辺に居住する検診希望者男390人，女452人，計842人について，一時尿のウロビリノーゲン，糖，タンパク定性試験を約1年間にわたって行ない，これら尿成分の異常陽性率を求めた。さらにこの月別，性別および年代別出現状況について考察した。

1. 尿ウロビリノーゲン異常陽性率は23.87％で，このうち強陽性のものは7.6％であった。また尿糖は8.07％，尿タンパクは7.96％の陽性率であった。

2. 尿成分の月別出現状況は，尿ウロビリノーゲンについて，強陽性は年間を通じてほぼ同率の出現傾向であったが，中等度陽性は夏季に出現しやすい。尿糖も夏季に出現しやすい傾向であったが，尿タンパクは季節的な関係がみられなかった。

3. 尿成分の年代別並びに性別出現状況は，尿ウロビリノーゲンについては各年代にほぼ同率に出現し，性別には男が高率であった。尿糖出現は40歳以上の年代に陽性率が高く，男に高率であった。尿タンパクは年令の増加に従って陽性率が高くなり，性別には女が高率であった。

文　献

1) 厚生省問題研究会：成人病広報資料，厚生，22(1)，51(1967)
2) 金井泉：臨床検査提要（改訂20版），金原出版，東京(1961)
3) 石館敬三，他：公衆衛生，33(6)，53(1969)
4) 足立源二，谷清三郎：日本公衆衛生学雑誌，18(10)，240(1971)
5) 福井忠孝，他：日本公衆衛生学雑誌，18(10)，241(1971)
6) 千早正寿，他：日本公衆衛生学雑誌，15(2)，89(1943)
7) 塚田穣，他：北関東医学，12，154(1962)
8) 松田清，他：糖尿病，8，90(1965)
9) 西川光夫，他：診断と治療，49，2107(1961)
10) 森田専一，他：広島医学，16，924(1963)
11) 小林芳人：日本の医学の1959年，第15回日本医学会総会学術集会記録Ⅰ，641，第15回日本医学会総会記録刊行会，東京(1952)
12) 海藤勇，他：東北医誌，47，113(1952)
13) 小林芳人：日本の医学の1963年，第16回日本医学総会学術講演集，301，日本医書出版協会，東京(1963)
14) 村上長雄，他：京都大学医学部〔人文〕，第7集(1961)
15) 徳光行弘，他：日本公衆衛生学雑誌，16(13)，111(1969)

16) 佐々木陽，他：日本公衆衛生学雑誌，12(4),370 (1965)
17) 山口与市，他：糖尿病，7，119(1964)
18) 油谷友三，他：四国医学雑誌，17，301(1961)
19) 中山光重：日本臨床，16，45(1958)
20) 横山徹，他：日本公衆衛生学雑誌，14 (5)，574 (1967)

清掃工場におけるPCB収支試算

秋山和幸* 長嶋親治* 藤谷和正*
辰市裕久** 高橋利恵子* 佐藤泰仁*
溝口勲* 野牛弘*

AN ESTIMATION OF THE INTAKE AND THE OUTPUT OF PCBs IN THE INCINERATION PLANT

Kazuyuki AKIYAMA,* Chikaharu NAGASHIMA,* Kazumasa, FUJITANI,* Sukehisa TATSUICHI,** Rieko TAKAHASHI* Yasuhito SATO,* Isao MIZOGUCHI,* and Hiroshi YAGYU*

(Division of Environmental Health, Department of Environmental Health Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Tokyo Metropolitan Cleansing Laboratory)

SUMMARY

PCB conents of refuse, combustion gas, ash and waste water were estimated at an incineration plant.

Concentrations in combustion gas were determined by modified methods including the techniques of either n-hexane impingers or a glycerine coated florisil column. It was found that both of these methods have excellent recovery rates.

PCB contents of flue gas samples were 0.33$\mu g/m^3$ on the average, and those of ash and wastewater samples were as low as undetected levels.

Ⅰ 緒 言

PCBによる環境汚染が生じていることが1960年代に報告され[1]，その後非常に広範な汚染状況とその危険性が指摘されて，我国では1972年に生産が中止された。その間我国では1970年には年産11,000トンと頂点に達し，これ迄の使用総量は約6万トン，その用途は電機に63%，熱媒体15%，感圧紙9%，その他開放系用途に5%で，回収可能なのは3万トンとされている[2]。即ち我国に限っても約万3トンが回収されない計算になる。また地域的には工業や消費活動の活発な都市で多く使用され，1962年から71年までの間近畿地域で，26,000トン，関東地域が11,000トンという数字が挙げられている[2]。このように使用されたPCBの完全回収は困難でまた適切な処理方法が確立されていない現状では，流通過程における最終段階である廃棄物の処理が問題となる。PCBの熱分解には高温を要するので[3][4][5]，ゴミ中のPCBは清掃工場で焼却してもそのまま排出される可能性が指摘されているが[4][5]，その実体については報告がない。著者らは某清掃工場について，生ゴミ，残灰，排洗水，排ガス等に含まれるPCBの測定を行ない，これらの資料をもとに清掃工場におけるPCBの収支試算を行なったので報告する。

Ⅱ 実験方法

1. 調査対象施設

調査は東京都某清掃工場を対象とした。施設概要図

*東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
**東京都立清掃研究所 第2研究室

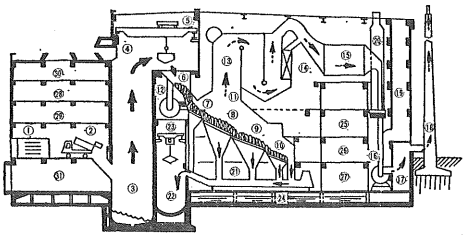


Fig. 1. Incineration Plant

⇒ refuse

⇢ combustion gas

→ ash

をFig. 1に示すが，連続燃焼式焼却炉（300t/24hr×2基），乾式集じん機，廃水処理施設（重金属用および活性汚泥処理）等が設置されている。排気量66,000 Nm^3/h×2基，残灰は水で消火冷却処理される。

2. PCBの測定

2.1 生ゴミ

ゴミピット内のゴミをクレーンを用いて混合してから取出し，更にポリ袋の内容も取出して平板上に広げ四分して対角線上に縮分を6回くりかえし，3個の試料を調製した(各約500g)。それぞれテトラヒドロフラン約5 *l* で朝比奈式抽出器を用いて60時間連続抽出し，その一部をとり10m*l* に濃縮後エタノール40m*l* を加え，水酸化カリウム4.4g を加え2時間加熱還流し，以下厚生省分析研究班の方法[5] に従い検液を調製した。但しシリカゲルカラムクロマトは次のドライカラム法によった。即ち和光シリカゲルS-1を130°C，3時間加熱活性化し，その2gを径1cmのコック付クロマト管に軽く詰め，無水硫酸ナトリウム1gを重層し，濃縮液2m*l* を加えn-ヘキサン50m*l* で加圧溶出し（毎分約2m*l*），はじめの5m*l* を除き溶出液を濃縮し正確に5m*l* となし，これを検液としてガスクロマトグラフィーにより測定した。またPCB濃度の数値化は樫本らの方法[7][8] に従った。

ガスクロマトグラフィー条件

装置：島津ガスクロマトグラフ装置。5AP$_3$FE 型

カラム1：2%OV-1 on Gaschrom Q 80～100mesh
Aw-DMCS, 3mm×2m 温度，190°C

カラム2：1.5%DEGS-0.5% H_3PO_4 on
Chromosorv W 60～80mesh,
AW-DMCS 3mm×2m 温度，170°C

検出器：^{63}Ni ECD 温度，250°C

キャリアーガス：N_2 45m*l*/min

試料注入部温度：205°C

2.2 排洗水

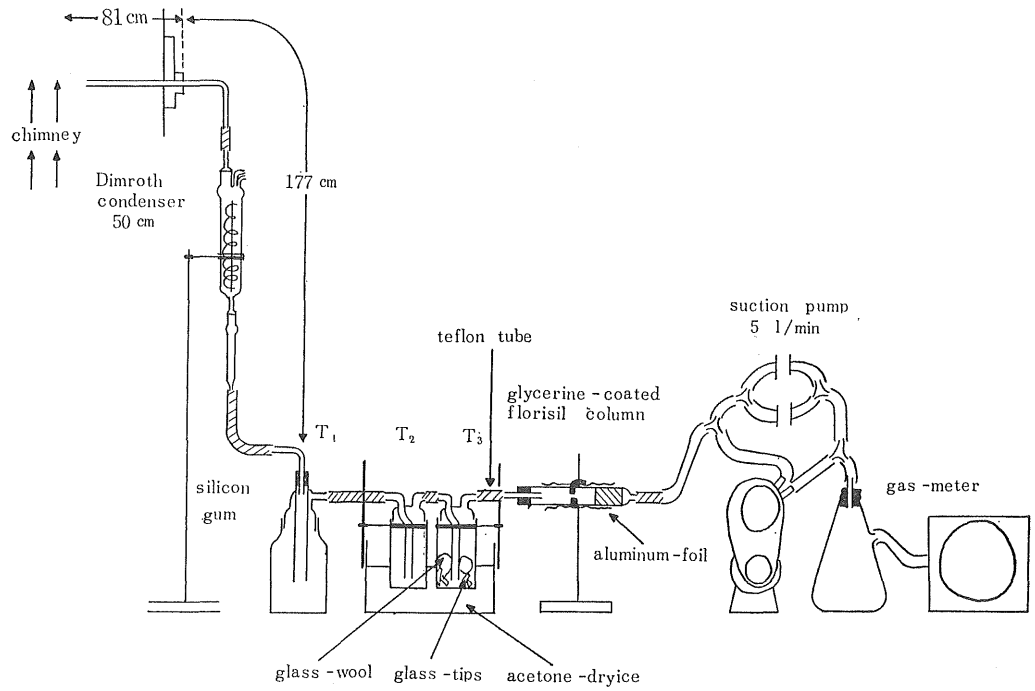


Fig. 2. Apparatus for the Determination of PCBs in Combustion Gases

試料1 l をn-ヘキサン各 100ml で2回抽出し，約5 ml に濃縮後1N-KOH-エタノール溶液 50ml を加え，以下生ゴミ試料と同様に処理した。

2.3 焼却残灰

コンベアから放出される残灰を約10分間少量ずつ取出し試料とした（約500 g）。試料を乳鉢で混合し，その20 g をとり1N-KOH-エタノール溶液50mlを加え2時間加熱還流後吸引沪過し，エタノール 30ml で洗い洗液を合せ，以下生ゴミ試料と同様に処理した。

2.4 排ガス中 PCB の捕集測定法の検討

燃焼排ガス中の PCB 測定法は未だ公定法が制定されておらず，また報告も殆んどないので，一般大気に使われている方法[8) 9)] に検討を加え，Fig, 2 に示す方法で測定した。

即ち水冷導管を経て気液分離後，アセトン-ドライアイス浴で −50°C 以下に冷却したミストトラップ（Fig 3）を2個接続し，n-ヘキサン（75ml）を吸収液とするインピンジャー2個連結（A法，Fig 4），または5 %グリセリン-フロリジルカラム（B法，Fig 5）により捕集した。装置内はn-ヘキサン100ml で洗滌し，同じ液で水層を抽出し，吸収液と合せて 5 ml に濃縮後アルカリ処理以下生ゴミ試料と同様に処理した。またB法ではエタノール 40ml で溶出し，水酸化カリウム 2.2 g を加え同様に処理した。

また測定に先立ち捕集効率の検討を次のように行なった。即ち燃焼ガスに類似させた塩酸—水蒸気—空気系試料発生装置（Fig. 6）を用いそれぞれの方法で捕集した。なお塩酸濃度は凝縮水の実測例より1Nとし

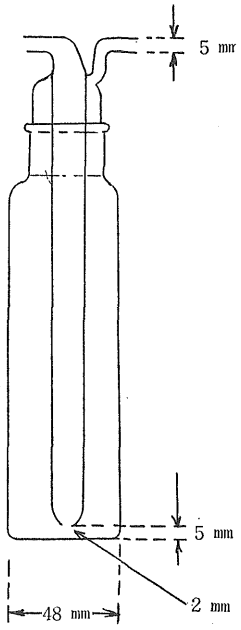


Fig. 4. Impinger

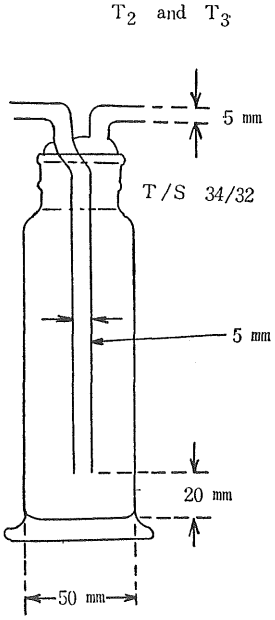


Fig. 3. Mist-trap

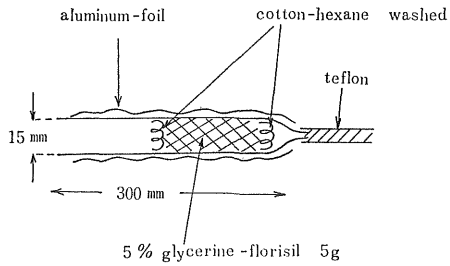


Fig. 5. Glycerine-coated Florisil Column

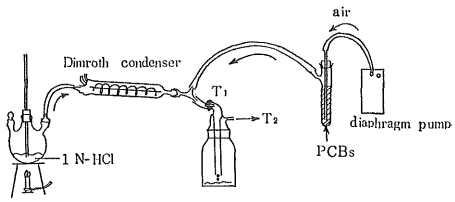


Fig. 6. Apparatus for the preparation of gas samples

Table I Recovery Rate of PCBs in Gases

Method	PCBs content $\mu g/m^3$	Flow rate l/min	Period min	Flow volume l	Peak No.*	1	2	3	4	5	6	7
A	248	5.2	75	390.6	Recovery	96.9	89.2	96.2	96.9	96.6	96.6	96.9
B	436	3.8	65	250.2	rate %	95.1	95.9	83.0	96.6	—	92.0	92.3

8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	average
97.1	97.8	97.6	97.2	97.4	97.4	—	97.6	97.4	—	97.4	92.2	86.9	—	93.9	95.7
92.8	94.3	94.9	94.0	94.4	95.1	—	95.4	95.7	91.1	95.9	90.6	—	89.1	85.9	92.9

* correspond to those of ref. 7 (column 1)

Table II Intake and Output of PCBs in the Incineration Plant

Running period		Intake	Output		
		Refuse	Combustion gases	Ash	Waste water
1972.4～1973.1		459.4～632t/day*1	2×66,000Nm³/h*1	94.4～128.3t/day*1	1,720m³/day*1
	average	551.9		113	
Estimation date		1973.4.18	1973,2,14～15	1973,2,15	1973,2,15
PCBs content		A 0.38ppm B 0.14 C 0.22	A*2 0.54$\mu g/m^3$ B*2 0.41 B*2 0.22 B*2 0.16	N.D (～0.01ppm)	N.D (～0.00005ppm)
	average	0.25	0.33	0.01	0.00005
Total PCBs g/day		64.3～240.1	0.5～1.7	～1.2	
	average	138	1	1	0.08
		138	2		
$\frac{\text{Output}}{\text{Intake}}$ (%)		100	0.2～2.6	0.4～1.5	0.03～0.13
			0.7	0.7	0.06
			1.5		

*1 cited from ref. 12

*2 see Table I

た。また捕集実験はA法ではインピンジャー3連，B法ではグリセリン—フロリジルカラムを2連にして行ない末端部の捕集量を差引くことにより捕集率を求めた。Table Ⅰに示すようにA，B法ともに2～7塩素化体まで各成分についてほぼ一様に捕集されることを認め，A法は平均95.7%，Bは92.9%の捕集率が得られた。しかしなお水分凝結によるインピンジャーの目づまりが起る傾向が見られ対策が必要であろう。

3. 生ゴミ試料中の塩素およびイオウ分の測定

JIS M8813 石炭類およびコークス類の元素分析方法に準拠して行なった。

Ⅲ 結果および考察

測定結果を Table Ⅱ に示す。PCB等を焼却処分する場合の排ガス中の PCB の暫定排出許容限界[3] として

Table. III. Chlorine and Sulfur Contents of Refuse

Sample	A	B	C	Standard Refuse Samples*			
				Range	average	S. D.	n
Volatile Chlorine %	0.63	0.15	0.20	0.50～1.51	1.03	0.33	10
Volatile Sulfur %	0.07	0.06	0.08	0.03～0.20	0.10	0.05	—

* cited from ref. 12

平均0.15mg/m³（液状の PCB 等の焼却施設0.10mg/m³），最高 0.25mg/m³（同，0.15mg/m³）の値が定められているが，測定値はほぼ 1/100 の濃度の濃度である。また排水については検出限界以下であり，暫定的指導指針[10]，0.01ppm 以下である。また残灰も検出限界以下であった。検体の採取日時は異なるが，収支計算を試みると，この工場1日当りのゴミ459～632トン中の PCB は64～240g，排出量は排ガス中に0.5～1.7g，残灰中 1.2g 以下，排水中に 0.08g 以下で，それぞれ負荷量の約0.7%，0.7%，0.06%となり殆んど全て分解していることになる。また東京都清掃局の昭和47年度年間総収集量4,521,000トン，焼却量1,317,000トン，焼却残灰量201,000トンの値[11]から計算すると，ゴミ中PCB年間総量632～1710Kg，および残灰中2Kgとなる。これらの値は濃度値の変動，特にゴミ試料の代表性の問題等から非常に粗い概算であることはいうまでもない。ゴミ試料のサンプリング誤差推定の一助として揮発性塩素量および揮発性イオウ分の測定値を標準ゴミ試料[12]と比較してみるとイオウは標準試料に近いが，しかし塩素は低値である。PCBについては少なくとも，これ以上のサンプリング誤差は見込む必要があろう（TableⅢ）。

また本調査が行われたのは PCB が一般的に使用中止後で，またゴミの分別収集実施前の時点であり，少なくともゴミ中の PCB 量は減少傾向にあったものと思われる。

次に PCB の熱分解に関して，空気中800～900°C以上，1秒間程度の滞留時間で殆んど分解することが認められているが[3]，清掃工場の焼却炉は800～900°C，部分的には1,000°C 以上の高温であり，高濃度のゴミが混入した場合も分解が期待されるが，今後の検討が必要である。

Ⅳ 結　論

燃焼排ガス中の PCB 測定法について検討し前処理を加えればn-ヘキサン吸収法，並びにグリセリンーフロリジル法により測定出来ることを確認し，これらの方法を用いて清掃工場について排出される PCB 量および搬入されるゴミ中の含有量を測定した。ゴミ中PCBは0.14～0.38 ppm，排ガスは0.16～0.54μg/m³，残灰および排水は不検出であり，焼却に際して殆んど分解する計算になるが，熱分解についての結論を下すためには今後の一連の化学量論的実験による検討が必要である。

（本研究の概要は第32回日本公衆衛生学会総会で発表した。）

謝辞：調査に際し種々御便宜を与えられた東京都清掃局の方々に深謝致します。

文　献

1）Koeman, J. J., Ten Noeverde Brauv, M. C. and de Vos, R. H：Nature 221, 1126（1968）
2）通商産業省資料（1972）
3）山田剛：公害資源研究所資料（1972）
富田弘：東京工業試験所資料（1972）
4）米国政府 PCB 合同対策本部報告書，監修，上田喜一，訳，PCB海外情報調査グループ：公害と対策，8（No.10）924（1972）
5）立川涼：PPM，(8)，44（1972）
6）厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班報告（1972）
7）鵜川昌弘，中村彰夫，樫本隆：食衛誌，14，415（1973）
8）環境庁通達，環大規第141号（1972）
9）奥野年秀，辻正彦：大気汚染研究，7（2），109（1972）
立川涼，脇本忠明，渡辺功：同上，7，(2)，111（1972）
秋山和幸，長嶋親治，藤谷和正，高橋利恵子，野牛弘：日衛誌，28（1），82（1973）
10）建設省通達：建設省都下企発第56号（1972）
11）東京都清掃局資料（1973）

12) 栗原四郎：ごみ処理の科学，76，77（東京都立清掃研究所，1971）

微小位置差によるオキシダント濃度差の比較研究

溝口　勲*　佐藤泰仁*　牧野国義*
大沢誠喜*　野牛　弘*

COMPARATIVE STUDY ON THE DIFFERENCES OF OXIDANTS CONCENTRATIONS DEPEND ON TWO SITES IN A SCHOL YARD AND BUILDINGS.

Isao MIZOGUCHI, Yasuhito SATO, Kuniyoshi MAKINO, Masanobu OSAWA and Hiroshi YAGYU

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

Summary

Concentrations of oxidants of large areas have been already examined. We observed that even in a small area there are differences of the concentration of oxidants, and that such factors as buildings, windows, and curtains cause the differences. This may show that how the photochemical smog affects the human body depends on the place, and also this might shown us what is to be done in order to reduce the damages upon human bodies from the photochemical smog.

1) はじめに

現在，光化学スモッグの指標としてオキシント濃度は東京においては，13カ所の大気汚染観測所で常時測定されており，大気汚染コントロールセンターと結びついてネットワークとして動いている。このネットワーク以外に各区あるいは市などで独自に測定所をもっているところもある。したがって広域的なオキシダント濃度の動向については，海陸風の収斂域に高濃度発生がおきやすいことや，東京都全域あるいは東部，中部，多摩地区といった広汎な地域を覆うひろがりで高濃度発生がおきていることなどが知られてきた[1)2)]。

一方，被害の起き方には地域的なばらつきがきわめてはげしく，同じように校庭で遊んでいた児童，生徒のなかでもわずか数百メートルしかはなれていない学校で被害が全くなかったり，続出したりするという例もしばしばある。また同じ校庭や校舎内でも同時刻に被害をうけたり，うけなかったりする集団的現象がみられる[3)4)]。

これには運動やその他の影響をうける人体側の条件が大きな寄与をしていることが知られてきたが[5)6)]，それだけではなく汚染物質，特にオキシダントのように反応性の大きな汚染物質は建物の内外，校舎の水平的，垂直的な位置の差によっても濃度のことなることが生じうるのではないかと考えられる。

また校舎の窓の開閉カーテンなどによるオキシダントの濃度の変動を知ることは，光化学スモッグ注意報，予報発令時の児童，生徒の対処についての教育委員会の指示や学校当局者の措置のためにも必要である。

いままで微小地域に着目してのオキシダント濃度差の調査報告はなされていない。われわれは，1972年7

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

月，東京都中野区の新井小学校において，校舎内外，校庭などでの位置の差でオキシダント濃度差を示すかどうかの調査を行い，いくつかの結果を得たのでここに報告する。

2) 方　法

オキシダント濃度測定には二台のマストオゾンメーターを用いた。マストオゾンメーターは中性ヨウドカリウム法を用いクーロメトリーでオキシダント濃度を測定するものである[7]。応答時間が非常にすみやかで95％応答時間は10秒以内である。二台のマストオゾンメーターはわれわれの実験室にあるスモッグチャンバー内でいろいろの濃度のオキシダントによって正確に較正比較を行なって，同時測定値が異なった測定機による誤差ではないことを確かめて使用した。

同時に測定して記録したチャートは1分から3分の移動平均をとって作図して比較した。

3) 結　果

窓を閉じているときの教室内と外気中のオキシダント濃度差は大きく，外では時刻によっての濃度変化がみられたが，教室内での濃度はほとんど変化しなかった。図1がその濃度差を示したものである。

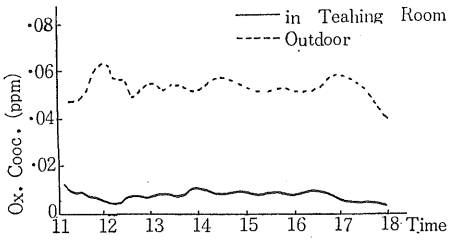


Fig. 1. Comparison between Ox. conentrations in teaching room and outdoor when the windows are closed.

窓をあけているときの変化について図2，図3で示す。図2の場合，まったく同じ濃度を示し，図3の場合にはかなりの濃度差を示した。前者の場合，風向が測定期間中一定で校長室の風上側に窓があり，後者の場合には風がほとんどなく，13時少し前にわずかに風が保健室内に入る時間があったのみであった。窓を開けているときには外の濃度と室内の濃度はきわめて似た変化を時刻とともにしていることがわかった。

窓をあけている教室内で窓に近いところと反対側で

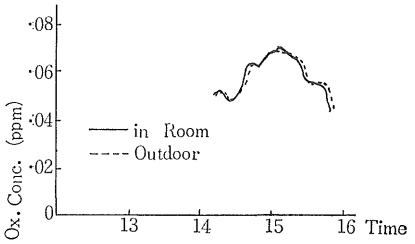


Fig. 2. Comparison btween Ox. concentrations in principal room and outdoor when the windows are open.

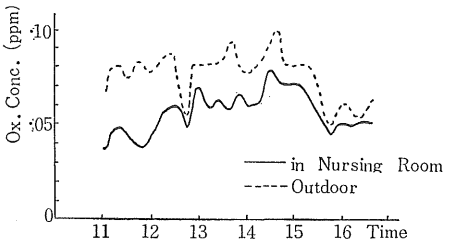


Fig.3. Comparison between Ox. conctrations in nursing room and outdoor when the windows are open.

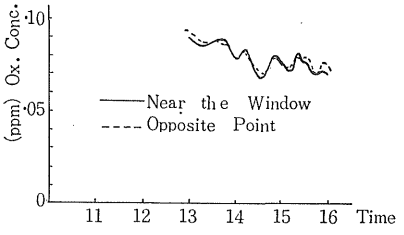


Fig. 4. Comparison Ox. concentions of two different sites in class room when the windows are open. (1)

オキシダント濃度差がどうであるかは，図4，図5に示されているほとんど差がない場合と差のある場合もあるが，その差はあまり大きくない。

窓をあけていてカーテンを張った場合，建物内外の濃度差は図6，図7のような結果であった。薄いカー

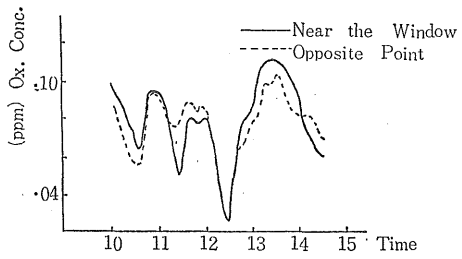


Fig. 5. Comparison between Ox. concentrations of two different sites in class room when the windows are open. (2)

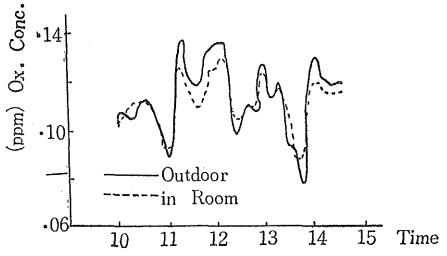


Fig. 6. Comparison between Ox. concentrations in music room and outdoor when the windoows are open and single curtains draw. (1)

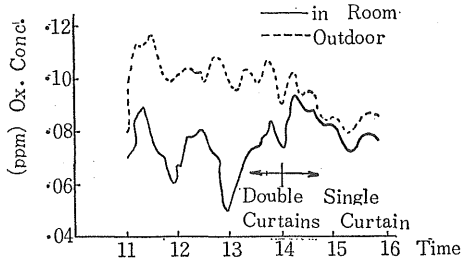


Fig. 7. Cmparison between Ox. concentrations in teachrs' room and outdoor when the windows are open and double curtains or single curtains draw. (2)

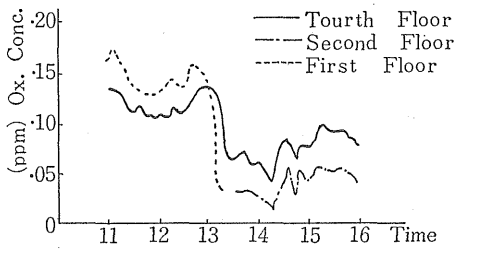


Fig. 8. Comparison of Ox. concentrations at different heights of emergency staircase. (1)

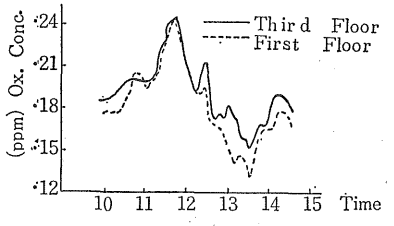


Fig. 9. Comparison of Ox. concentrations at different heights of emergency stircase (2)

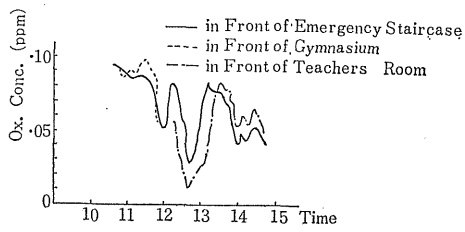


Fig. 10. Compason of Ox. concentrations at different sites in the school yard. (1)

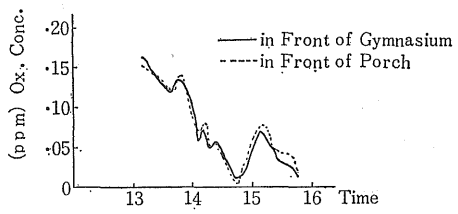


Fig. 11. Comparison of Ox. concentrations at different sites in the school yard. (2)

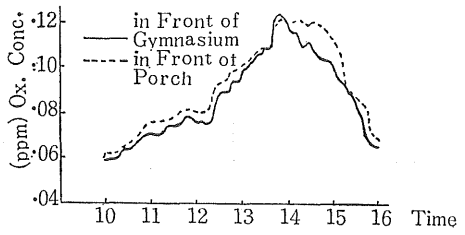


Fig. 12. Comparison of Ox. concentrations at different sites in the school yard. (3)

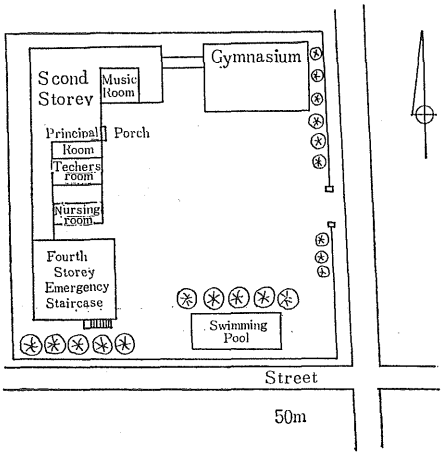


Fig. 13. The School Buildings

テン一枚では濃度差はほとんどなく二重にすると大きな濃度差が生ずることがわかった。

校舎外の高度のちがいでも相当大きな濃度の生ずる場合があることが，図８。図９より知られる。各階は3.5メートルの高度差があるので１階と４階の非常階段の差はわずかに10.5メートルであるが，それだけしかはなれていないのに50％も濃度差を生ずる場合のあることは意外であった。

校庭の位置によるオキシダント濃度差は，図10，図11，図12に示すとおりであった濃度の時間的変動は同じ傾向を示すが，時にはかなりの濃度差を生ずる場合のあることがわかった。図13は各々の測定場所を示す学校の平面図である。図10の非常階段と体育館前がもっとはなれた距離で80メートルである。

4) 考　察

微小地域でのオキシダント濃度差は予想以上に大きな場合のあることが知り得たが，この差が測定上のなんらかの誤差でないことを確かめることが必要であった。そのためには使用した二台のマストオゾンメーターの較正が正しく行なわれることであって，これはスモッグチャンバー内でのくり返しての濃度比較によって行なわれた。さらにオキシダント測定上プラスあるいはマイナスに干渉する大気汚染物質の問題がある。プラスに干渉する物質に二酸化窒素，塩素などがあり，マイナスの干渉を行なうのは亜硫酸ガス，濃度によっては一酸化窒素がある[7]。そのような物質が微小地域で変動した濃度になることは発生源がきわめて近接している場合以外には考えられない。新井小学校は住宅地にあり，汚染物質の発生源は自動車排ガス以外にはない。自動車排ガス中の一酸化窒素の影響の可能性を考慮して，校庭で道路に近い体育館前と非常階段の測定点での濃度変化をみても，移動平均ではこれらの影響は除外されてしまうことがあきらかである。したがって測定点による濃度差はオキシダントの差とみることができる。

オキシダントの校舎内外での濃度差が生ずるのは，すべての測定例から，風向が決定的な影響を与えていることがわかった。外気が開かれた窓から教室内に流入するか否かで外部と室内の濃度差が生ずるや否やがきまるわけである。これはカーテンを張った場合も一重で差なく，二重で差がでたということは，カーテンによってオキシダントが分解される効果よりは気流の流入を遮断する効果のほうがはるかに大きいことを示すものである。

オキシダントは反応性が大であるとはいえ秒速２～３メートルで薄い布地を通過しても１～２％の濃度低下しかしないこと[9]からもカーテンでの分解が，気流遮断に比して問題にならない位に少ないことは確実である。気流が少ないときには，室内ではオキシダント濃度は外部に比して減少する傾向がみとめられる。これは当然のことながらオキシダントが外部から補給されなければ，反応して減少することによるわけである。それでそれには時間が必要なことも考慮されなければならない[10]。

校庭あるいは非常階段といった屋外の垂直で約10メートル，水平で30～80メートルというわずかの差にもかかわらず，短かい時間とはいえ最大では50％近い濃度差の生じた場合のあったことは注目されなければならない。乱流や周囲の条件によるものであろうが，この成因については今後の検討が必要とされる。図13にも示されているように，校舎，校庭の南側，東側には大きな樹木が並んでおり，７月には葉も茂り，また校

舎自体も一階建，二階建，四階建がL字型にならんで校庭をとりかこむ形になっているので乱気流のおきやすい条件はある。オキシダントが広域的に高濃度に生成された場合，局所的にはそれ以上の濃度になることは考えられないので，この生じた濃度差は，オキシダントがなんらかのメカニズムで分解されることを通じて，地表にきわめて近いところでは比較的大きな濃度差を示すほどに低下する場合のあることが想定される。かつて三年前日本ではじめて光化学スモッグの人体被害が出た頃，オキシダントは非常に不安定なので，カーテン一枚で分解されてしまうというような説が流布されたことがあった。それ程ではないことは，この調査からもあきらかであるが，一方地表付近ででの大きな濃度差の生ずるメカニズムは今後追求されなければならない。

5) 要　約

広域的なオキシダント濃度分布についてはすでに多くの報告がなされている。われわれが微視的観点から行ったオキシダント濃度差の調査では，(1)窓を閉じれば現在のオキシダント濃度では室内の濃度は相当程度低下し戸外の濃度の変化とは対応しなくなる。(2)カーテンの効果はオキシダントの分解よりも気流の停止あるいは遮断によるところが大きい。。(3)高度および位置の差によって生ずるオキシダント濃度差は，風（局地風），日射方向および近接の建物，樹木などの影響が考えられる。結論としてオキシダントの局所的な濃度差は生じやすく，時には可成り大きな差を生ずることがわかった。このメカニズムについてはさらに検討されるべき点が多い。

文　献

1) 福岡三郎，伊藤政志他：オキシダント広域汚染現象の解明：東京スモッグ生成機序・植物被害に関する調査研究部会中間報告，p. 87（1972）
2) 藤井徹，他：各地における光化学反応による大気汚染の現状：光化学反応による大気汚染 ： p. 197，日本公衆衛生協会(1972)
3) 土井陸雄，関沢理子，他：光化学スモッグの人体影響に関する調査：東府都公害研究所年報，3，p. 221（1972）
4) 大友富美：私信
5) 三上理一郎，工藤翔二他：大気汚染の人体に及ぼす影響の基本的諸問題：内科30巻p. 124(1972)
6) 三上理一郎，工藤翔二：わが国におけるいわゆる光化学スモッグによる急性障害：日本臨床，31巻(6)，123(1973)
7) Stern A. C, ed.: Air Pollution II, p.86, Academic Press, New York.（1968）
8) Katz. M.: Measurement of Air Pollutants: p.106, W.H.O, Geneva.（1969）
9) 溝口　勲，佐藤泰仁：未発表論文。
10) 柳原茂，嶋田勇，他：スモッグチャンバーによる光化学反応の実験：光化学反応による大気汚染 p. 35，日本公衆衛生協会(1972)

オゾンによるシヨウジヨウバエの遺伝的影響について

千種　翠* 中田英吉*

GENETIC EFFECTS OF OZONE ON FECUNDITY (NUMBERS OF EGGS), HATCHABILITY, EMERGENCE RATE AND LONGEVITY IN Drosophila melanogaster.

midori CHIGUSA and Eikichi NAKADA

(Division of Environmental Health, Department of Environmental Health
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

We could observe the biological damages induced by ozone in the Drosophila experiments, which were done by measuring fecundity, hatchability, emergence rate and life-span of the offspring from the exposed parents.

In the high concentration of ozone exposure, the reduction of egg-laying rate was found. This result might be caused by incapability of mating. On the otherhand, the life-span shortening of male offspring from the exposed females and the decreasing of hatchability were observed. It is considered that these damages are partially resulted in its genetic effects. We are doing additional experiments.

緒　言

かって，オゾンは健康に良いものとされオゾン濃度は空気清浄のバロメーターとされてきた。また，オゾンに殺菌脱臭作用があることから，殺菌脱臭器として，オゾン発生器も販売されてきた。しかしながら，オゾンは生体への刺激性が強く，現在では微量であってもオゾンの存在は人体に有害な影響を及ぼすのではないかと問題になってきている。[1] 自動車の排気ガスや産業大気汚染度の高い大気中では，太陽紫外線のもとに高濃度のオゾンを主とする光学的オキシダントが生じるし，また，電気集塵器，特殊計器類，水銀灯などを操作する際にも発生する[2] このように，われわれが長時間オゾンにあたる可能性は多くあるにもかかわらず，オゾンが遺伝的影響を及ぼすかという問題については人間の培養細胞で染色体の切断や欠失が観察された[3] ほかには行なわれていないようであるので，ショウジョウバエを材料として，遺伝的影響について検討することとした。

In vitro の実験で，染色体の切断，欠失がみられるなら，in vivo で，致死や半致死，生存力低下などの結果がでるのではないかという推定のもとに，ショウジョウバエの産卵数，孵化率，羽化率，寿命を調べて，致死因子，半致死因子，生存力低下因子などの有害因子の存在を推察した。

材料及び方法

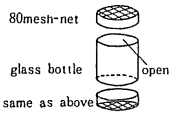
材　料

a　キイロショウジョウバエの野生型（山梨県勝沼産）
b　雌雄とも羽化後2～3日のもので，雌は未交尾のもの。
c　飼育には，飼育ビン（3cm×10cmのガラスビン）を使用し，25℃，20％イースト培地で飼育する。

方　法

羽化後2～3日の雌雄を別々に Fig 1 に示すような曝露ビンに移し入れ，それを曝露チャンバー（Fig 2）で，オゾンを 10PPm と 27PPm で，それぞれ毎日1～3時間づつ，4日間曝露する。曝露終了後ただちに

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科



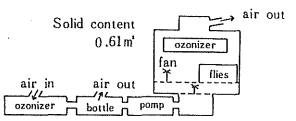


Fig.1 Vial for exposure Fig.2 Smog-chamber

飼育ビンに雌雄 2－3 匹づつ入れるが，この雌雄の組合せは，曝露♀×曝露♂ 曝露♀×正常♂（曝露したハエと同時に羽化し無処理のまま飼育したもの），曝露♂×正常♀（正常♂と同じ）とし，これを24時間交尾させて，卵を産ませる。24時間後に親を取り除いて産卵数を調べその後，孵化率（2～3日後）羽化率（9～10日後）を調べる。羽化したらただちに，雌雄別々に約20匹づつ飼育ビンに移し，25°C で寿命を調べる。餌は2日毎に取り替える。コントロールでは，実験区と同様に，羽化後2～3日の雌雄を別々に曝露ビンに移し入れ，実験区と同時間だけ放置しておく。これは，摂食条件を同一にするためである。曝露終了と同時にコントロール♀×正常♂(実験区と同じ)，コントロール♂×正常♀を作り，産卵数，孵化率，羽化率，寿命を調べる。

オゾン濃度測定は，中性ヨウ化カリ法[4] で行った。

結 果

オゾン濃度（10PPmと27PPm）は平均値で，その測定値は Table 1 である。10PPm 曝露を実験 I とし，

Table 1. Concentration and exposure time of ozone.

Groups		Conc. (ppm)				Ave. conc.	Hours/day	Days	Total hours
Experiment I	a	10.2	9.1	11.1	11.0	10	1	4	4
	b	10.2	9.1	11.1	11.0	10	3	4	12
Experiment II	a	24.4	17.6	35.0	31.0	27	1	4	4
	b	26.0	26.3	16.3	47.0	27	1.5	4	6
	c	36.2	21.1	16.3	29.8	27	2	4	8

Table 2. Fecundity, hatchability and emergence rate in Experiments I and II.

		Lots	No. of Pairs tested	No. of eggs after 24 hours	Hatched % (numbers)	Emergence % (numbers)
Experiment I	a	Control	20	1014★(50.7)	★★93.9 (952)	★★★99.4 (946)
		♂* × ♀	19	712 (37.5)	90.9 (647)	98.6 (638)
		♀* × ♂	20	942 (47.1)	81.6 (769)	96.6 (744)
		♀* × ♂*	25	1119 (44.8)	81.0 (906)	99.2 (899)
	b	Control	20	1168 (58.4)	93.8 (1096)	98.9 (1084)
		♂* × ♀	18	574 (31.9)	88.7 (509)	98.8 (503)
		♀* × ♂	20	802 (40.1)	85.2 (683)	99.1 (677)
		♀* × ♂*	25	1058 (42.3)	82.8 (876)	98.9 (866)
Experiment II	a	Control	30	1383 (46.1)	95.1 (1315)	98.8 (1299)
		♂* × ♀	29	924 (32.0)	91.6 (846)	96.8 (819)
		♀* × ♂	26	519 (19.2)	80.2 (416)	94.5 (393)
	b	Control	18	838 (46.6)	94.5 (792)	98.2 (778)
		♂* × ♀	20	518 (25.9)	87.5 (453)	98.7 (447)
		♀* × ♂	26	376 (15.3)	68.3 (257)	98.1 (252)
		♀* × ♂*	19	559 (29.4)	39.8 (222)	97.1 (216)
	c	Control	36	1857 (51.6)	93.2 (1730)	98.2 (1699)
		♀* × ♂	32	600 (18.7)	52.6 (316)	98.9 (312)
		♀* × ♂*	40	804 (20.1)	28.4 (228)	94.3 (215)

♀* ……Female exposed
♂* ……Male exposed
★ ……Eggs/female
★★……Hatchability against numbers of eggs
★★★……Emergence rate against hatched eggs

27PPm 曝露を実験Ⅱとする。

Table 2 に示すのが，産卵数，孵化率，羽化率である。

産卵数がコントロールの平均より減っているのは，曝露された親バエがフラフラな状態あるいは一時的なショック状態となり，交尾能力が低下したためであって，遺伝的影響ではないと思われる。孵化率が減っているのは，致死遺伝子が存在したり，あるいは生理的な変化をおこしていたりするためであろう。羽化率をみると，平均98%近く羽化しているので，この段階での遺伝的影響はないといえる。羽化した F_1 から無作為に選んで寿命を調べたのが Table 3，Table 4 である。

Table 3. Mean and relative longevities of offspring from exposed parents, compared with controls, and statistical significance of maximum differences (d) between survival curves of control and experiments, in Experment I.

		Lots	Sex of F1	No. of flies tesed	Life-span (days) median	Life-span (days) mean	Relative longevity	d 1	d 0.1	d	Significance
Experiment I	a	Control	♀	88	49.3	53.3	1.00				
		♂* × ♀	♀	96	54.5	55.1	1.03	23.9	28.7	+22.1	
		♀* × ♂	♀	76	53.4	52.1	0.98	25.4	30.4	+14.6	
		♀* × ♂*	♀	110	57.2	58.2	1.09	23.3	27.9	+24.1	+
		Control	♂	92	48.2	51.5	1.00				
		♂* × ♀	♂	122	44.1	45.8	0.89	22.5	26.9	19.4	
		♀* × ♂	♂	114	44.8	50.8	0.99	22.7	27.1	8.5	
		♀* × ♂*	♂	83	44.5	47.2	0.92	24.6	29.4	12.9	
	b	Control	♀	142	54.1	53.3	1.00				
		♂* × ♀	♀	142	60.5	59.8	1.12	19.2	23.0	+20.1	+
		♀* × ♂	♀	156	61.7	58.8	1.10	18.9	22.6	+18.3	
		♀* × ♂*	♀	158	50.9	52.3	0.98	18.7	22.4	15.8	
		Control	♂	92	48.6	51.5	1.00				
		♂* × ♀	♂	86	42.0	43.4	0.84	24.5	29.3	23.8	
		♀* × ♂	♂	56	33.2	35.9	0.70	27.5	33.0	34.2	**
		♀* × ♂*	♂	132	42.1	45.7	0.89	22.2	26.5	24.8	*

♀* ……Female exposed
♂* ……Male exposed
* ……Significant at 1% level
** ……Significant at 0.1% level

Teble 3，4 をみると F_1 雌の寿命比は実験Ⅰでは2%短かくなるが，そのほかはコントロールより長くなり，実験Ⅱでは，すべての実験区で4～21%短かくなる。F_1 雄の寿命比は，実験Ⅰで1～30%，実験Ⅱで0～24%短かくなっている。F_1 雌雄の寿命を比べると，雄の方が一般に短かくなっている。実験区の寿命がコントロールの寿命に比べて有意な差があるかを調べるのに Kholmogorov-Smirnov 法を用いた。この方法は平均値を比較するより良いといわれている。何故なら，平均値より中央値がより安定した値であるからだ[5]。これは F_1 の生存日数と生存率を軸にして生存曲線を描き，コントロールと実験区の最大差を調べ，有意差検定を行なう。有意差検定方法は次のような式で表わされる。

Table 4. Mean and relative longevities of offspring from expossd parents, compared with controls, and statistical significance of maximum diffences (d) between survival curves of control and experiments, II,

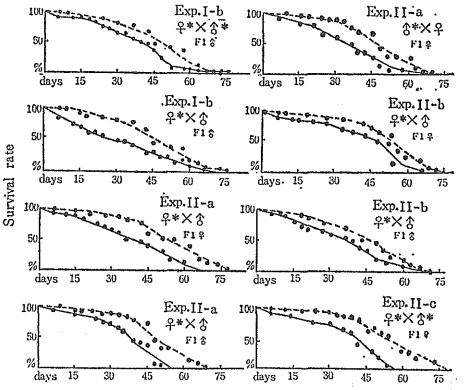
		Lots	Sex of F1	No. of flies tested	Life-span (days) median	Life-span (days) maen	Relative longevity	d 1	d 0.1	d	Signifi cance
Experiment II	a	Control	♀	60	51.9	50.1	1.00				
		♂* × ♀	♀	51	45.3	45.8	0.92	31.1	37.2	28.2	
		♀* × ♂	♀	50	41.8	44.2	0.88	31.3	37.4	32.4	*
		Contol	♂	63	47.1	45.2	1.00				
		♂* × ♀	♂	52	34.6	34.2	0.76	30.3	36.3	32.8	*
		♀* × ♂	♂	48	37.9	34.9	0.77	31.3	37.4	32.3	*
	b	Control	♀	78	54.3	53,3	1.00				
		♂* × ♀	♀	60	51.9	50.9	0.96	28.1	33.5	17,9	
		♀* × ♂	♀	119	52.8	51.0	0,96	23.6	28.3	8.9	
		♀* × ♂*	♀	112	48.2	46,4	0,87	24,0	28,7	34.5	* *
		Control	♂	92	49,2	51,5	1.00				
		♂* × ♀	♂	86	46.5	46,7	0.91	24.5	29.3	19.7	
		♀* × ♂	♂	102	40.1	40,0	0.78	23.5	28.1	23.9	*
		♀* × ♂*	♂	101	40,3	41,8	0.81	23.1	27.7	21.3	
	c	Control	♀	77	51.7	50.6	1.00				
		♀* × ♂	♀	40	43.2	43.1	0.85	31.8	38.0	25.1	
		♀* × ♂*	♀	40	40.5	40.2	0.79	31.8	38.0	40.3	* *
		Control	♂	90	48.8	49.3	1.00				
		♀* × ♂	♂	45	40.8	41.0	0.83	29.7	35.5	25.3	
		♀* × ♂*	♂	54	49.0	49.3	1.00	28.0	33.5	7.9	

♀* ……Female exposed
♂* ……Male exposed
* ……Significant at 1 % level
* *……Significant 0.1% level

$$dp = Kp\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}$$

(1%水準のとき$K_1=163$ 0.1%水準で$K_{0.1}=195$
n_1 n_2 はコントロールと実験区で使用したハエの数)

二つの生存曲線の実際の最大値 d（%値）を測り dp と比較して有意差があるかを決めた。Table 3, 4 の有意差のあるものについて生存曲線を描いたのが Fig.3 である。



Days after emergence

Fig.3 Compaison by life-span curves between control and experimentals in lots in which significant differences were seen (Experiment I and II). Solid line: experimental; dashed line: control.

考　察

オゾンをシヨウジヨウバエの親に曝露した結果，どの程度の遺伝的影響が F_1 に表わいているかを Table 2. 3. 4 から検討したい。まず，Table 2 の産卵数，孵化率，羽化率であるが，前述のように，産卵数，羽化率においては，遺伝的な影響は見られない。孵化率の

減少は有害遺伝子の発現によるものと思われるが，ただ，この減少のすべてが遺伝的なものかどうか，また，生理的影響がどの位含まれているかが問題である。Table 3，4に示されたように，実験Ⅰではほとんど影響を受けていないといえるが，実験Ⅱでは，F_1の寿命の短縮がF_1♀よりもF_1♂にみられる。

キイロショウジョウバエにX線を照射してX染色体上に有害因子があらわれ，その結果F_1の寿命が短縮されるという[6]結果が出ている。さらに，オゾンがX線に類似した性質を有していることから（R. Brilman[7] et al 1958, L. Scheel et ll 1959,[8] H. Stobinger[9] 1962, K. Hattri et al 1963[10] H. Lamberts at al 1964），次のようなことが推察される。

曝露された雌親からのF_1♂は，曝露されたX染色体を受けついでいる。もし，曝露されたX染色体上に，劣性の有害遺伝子が誘発されうるならば，曝露♀より生じるF_1♂においては，X染色体は hemizygous の状態になり，その効果を発現するだろう。しかし，F_1♀においては，そのX染色体は非曝露の正常染色体と heterozygous の状態となり，劣性有害遺伝子はその作用を発現されないであろう。同様に，曝露♂より生じるF_1♀において，X染色体は正常染色体と heterozygous の状態となり，劣性遺伝子はその発現を抑制されるであろう。

いうまでもなく，常染色体上にも影響をおよぼしているであろうし，又，その他に雌雄の異なりで生殖細胞への影響が違っていたり，卵子を通して主に伝えられる細胞質に異なりを生じうる可能性も考慮に入れなければならないであろう。

結　語

以上のようにオゾンをショウジョウバエに曝露すると，そのF_1の孵化率と寿命において障害があるという結果が得られた。障害が次世代に現われることから，この原因の中には遺伝的なものも含まれる。また，X線照射による資料などから推定して，オゾンによって誘発された劣性有害遺伝子にその原因があることも考えられる。特に，曝露雌からのF_1♂に寿命の低下が見られるので，X染色体を使って，この追証を行っている。

文　献

1) Stockinger, H.and Coffine, P.：Air Pollution I 446（1968）
2) 多田治，中明腎二：労働科学，6，41（1965）
3) Fetner, R.H.：Res. Engr. 11, 11（1960）
4) 寺部本次：公害と対策，4，333（1970）
5) Vetuknive, M. ：Evolution 11, 348（1957）
6) 森脇大五郎，戸張厳夫：J. of Rad. Res, I. 14（1960）
7) Brikman, R, and Lamberts, H.：Lancet, I, 133（1958）
8) Scheel. L. et al.：J. of Appl. Physiol, 14, 67（1959）
9) Stockinger. H.：Air Pollution, I, lst ed. chap 9（1962）
10) Hattori, K. Kato,N. Kinoshita, M. and Sunada, T.：Nature, 196, 1220（1963）

粘菌のオゾン反応

狩野文雄

OZONE REACTION ON SLIME MOLD

Fumio KANOH

(Division of Environmental Health, Department of Environmental Health
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

To determine the effct of ozone, the motive force responsible for protoplasmic streaming in the Slime Mold, Physarum polycephalum was measured by "Double chamber method" which was developed by Kamiya (1943).

The effects of ozone on the motive force was investigated by comparison of the "Dynamoplasmogram" of control with that of ozone exposure. The following results were obtained. In the case of high concentration exposure, thickening of plasmagel, inversion of the period of flow and reduction of the extreme point were observed. Dynamoplasmogram was changed undershift and motive force was decreased. On the other hand, succinoxidase of exposed homogenate showed stronger activity than that of control. It is certain that the "Pasteur reaction" takes place when plasmodium is kept under high ozone exposure condition. It appears that ozone inhibited a part in the process of glycolysis.

I　まえがき

最近，大都市を中心に発生するいわゆる「光化学スモッグ」は，その発生原因とともに人体，植物影響についても多くの不明な所を残しながらますます拡大する傾向にある。

現在のところ，光化学スモッグ発生の最も有効な指標はオキシダントと言われるオゾンを主体とした強酸化汚染質であると言われている。米国等においてもロスアンゼルスのスモッグ解明に関して，数年前よりオゾンに着目した人体，植物影響研究が続けられている。そうした研究の結果，オゾンの生体作用について，ごく微量であってもきわめて毒性の高い物質として認められつつある。

最近，Balchum ら[1] はオゾンによる生体膜系の変化を追求し，膜を構成している不飽和脂肪酸の過酸化によって二次的に細胞質内に遊離された活性のある遊離基（Free Radical）が蛋白酵素の不活化（S—H基をブロックすることによるらしい），ミトコンドリアの大幅膨化それによるエネルギー代謝の消失，さらに核を攻撃して発癌性を誘発するという基本的図式を提出している。また，生体影響についての Stokinger らの総説[2],[3] を見ても，オゾンの毒性をただ呼吸気道への影響ととらえていなくて，その標的となる器官は一つでなく，気管上皮細胞の組織的変化（繊毛の消失，上皮筋肉の肥厚化）に始まり，肺胞隔膜の膨張，赤血球の膨化，さらには心筋繊維の核の損傷までをも一連の変化としてとらえている。こうした組織的変化は生体の代謝機能を乱し，やがては慢性的な機能障害として固定化し病変として発現してくるものと思われる。

そこで，我々はオゾンを用いて，その一次攻撃点である細胞における初期的過程の変化を粘菌の変形体という特殊材料を使って，その原形質流動を指標として研究を続けている。

＊東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科

Ⅱ　材料と方法

真性粘菌の一種である Physarum polycephalum は生活史（図１）の一時期に，変形体（Plasmodium）という多核の原形質のかたまりとなり活発に栄養を取り

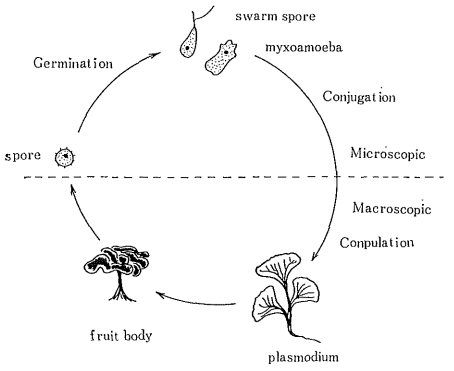


Fig. 1.　Life cycle of true Slime Mold, Physarum polycephalum

こむ，変形体内部には核をはじめミトコンドリア，色素顆粒その他が原形質とともに往復流動している。その流動は毎分数ミリにも達する活発なもので，古くより生体運動研究の好材料として用いられてきた。今日ではそれから収縮性蛋白質である F－アクチンとミオシンAが抽出され分子レベルでの解明がされて，筋肉収縮機構についでその機構が明らかになってきた[5) 6) 7)]。

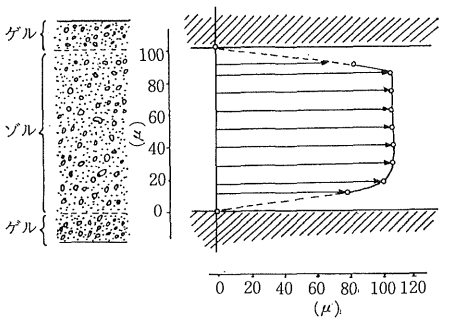


Fig. 3.　Part of Plasmodium

太田ら[8) 9) 10)]は流動の化学機械的な（Mechano-Chemical）エネルギー転換系を明らかにするため，各種ガスを使用し，流動への影響を調べ，呼吸阻害下においては流動の変化は見られずむしろ増大するのに対し（Pasteur 効果と思われる）解糖系の阻害下において著しい減少を認め，よって流動のエネルギー源としては解糖により作られる ATP（アデノシン三リン酸）が使われていることを示唆している。そうすると，筋肉収縮も粘菌の原形質流動も高エネルギーリン酸結合化合物である ATP 分解に共役したミオシンAとF－アクチンとの相互作用による蛋白質の構造変化であるということにおいて全く一致するわけで，粘菌はまさに裸の「黄色の筋肉」ということができる。その意味で生体運動機能を解明する上での好材料のひとつである。

1）培養法

培養は camp の簡易法[11)]を使った。ポリバケツの

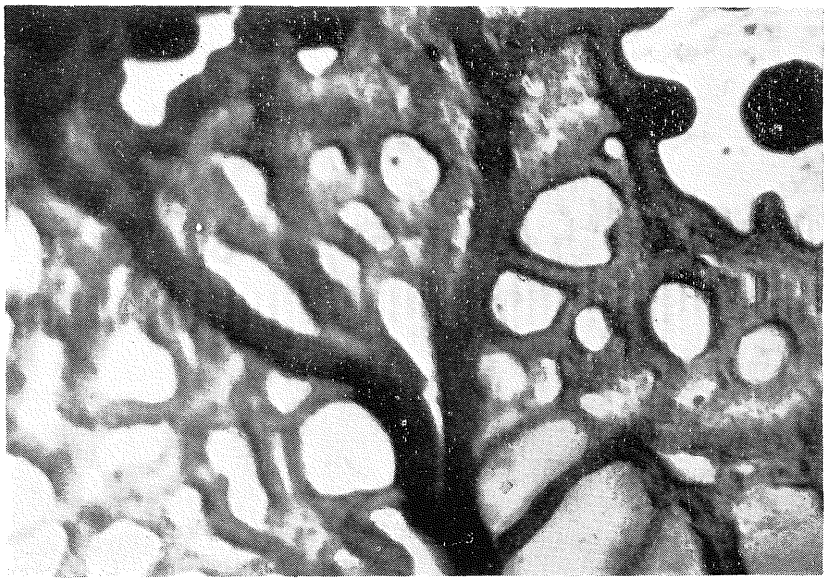


Fig. 2.

底に湿ったペーパータオルを敷き，粘菌をはわせ，毎日オートミールを餌として与えた，始め1cm 四方であった菌核（Sclerotium）は一週間もすれば底面全体に広がり，やがて壁面にはいのぼってくる。その先端部分は比較的細菌や原生動物に汚染されていないもので，今回の実験にはこの部分を用いた。なお，顕微鏡下において流動を観察する場合は，少量の原形質を無栄養寒天培地に移し，暗所で20°C で培養したものを使用した。

2）顕微鏡のステージにガラス製のチャンバーを置き内部にシャーレを入れ，透過法によって粘菌の変形体を観察する，オゾンは放電式による発生器を用いた。チャンバー内気流は無視しうる程小さい。

3）複室法[12) 13) 14)] による原動力測定

流動の変化を定量化するため，神谷らにより開発された「複室法」を用いて流動の原動力を測定した。

変形体の流動の流速分布[15)] は図3のように，ゾルゲル界面から中央にいく程流速が増し，中央部分では速度勾配は零になる。こうした速度勾配をもつ流れは，ある構造粘性をもつ液体が管の中を両端の圧力差によって起こされた受動的な流れ（passive flow）であることが理論的にも証明されている[16)]。つまり，流動力の発生部位は変形体の両末端であり，その内部圧の変化が往復の流動を起こしていることが確かで，これにより，流動力の直接的測定が可能になる。

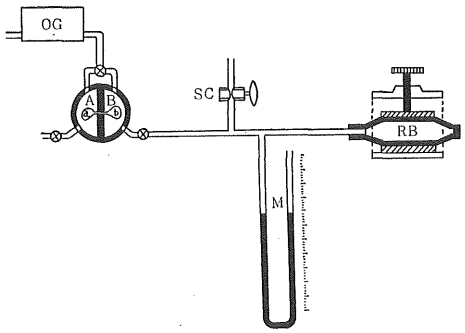


Fig. 4. Apparatus for experimental estimation of the pressure required to arrest protoplasmic streaming.
M：manometer RB：rubber bulb s：screw
OG：Ozone generator AB：Double chamber
ab：plasmodium（From Kamiya. 1959）

複室内に変形体をはわせて，その糸状部分を顕微鏡で観察し，常に流動が止まった状態に圧力を調整し，15秒毎に均衡圧を水圧力計で読みとるという方法で測定した。（図4）

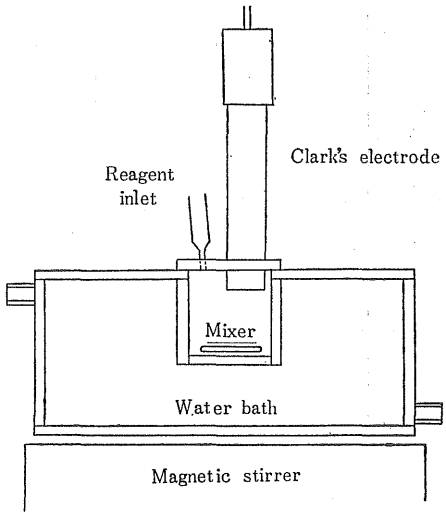


Fig. 5. Oxygen electrode apparatus

3）酸素電極法[17) 18) 19)] による呼吸測定

オゾンによる変形体内酸化酵素活性変化を測定するために Clark 型の酸素電極を用いてアクリル樹脂製の反応容器を試作した（図5）。内容積 1.7 m*l*，反応液のかくはんには鉄ピンをガラスに封入したかくはん子を使った。電極は，東芝 Beckman 社の酸素センサーを用いた。

反応容器の気密性については，リン酸衝液中にサスペンドしたホモジネートを使って内部呼吸をさせ，その直線性から確かめた。

恒温槽によって，反応容器内の温度は，26°C ± 0.5 °C に保った。

変形体を1g，先端部分より取り，約5倍量の反応液に懸濁する。それをテフロン軸頭をもつ Potter Elvehjem 型ホモジナイザーでホモジネートする。すべての操作は氷で 0 °C に保ちながら行なった。

反応液は室温で充分に振盪し，大気と平衡させたものを用いた。反応液の組成は次の通りである。5 mM リン酸緩衝液，10mM KCl, 0.1mM EDTA, 3mM $MgCl_2$, 0.01M, Tris-HCl, 0.1mM ショ糖，最終 pH7.2である。

実験は次のように行なった。

反応容器の洗浄（反応液で2回程）→反応液添加→5分間温度平衡→ホモジネート添加（0.4m*l*）→内部呼吸→基質（コハク酸）添加（10mM）→ ADP 添加（約200μM）→……

基質および ADP 添加にはマイクロピペットを用いて，反応液量の増加を極力おさえた。実験は，対照群

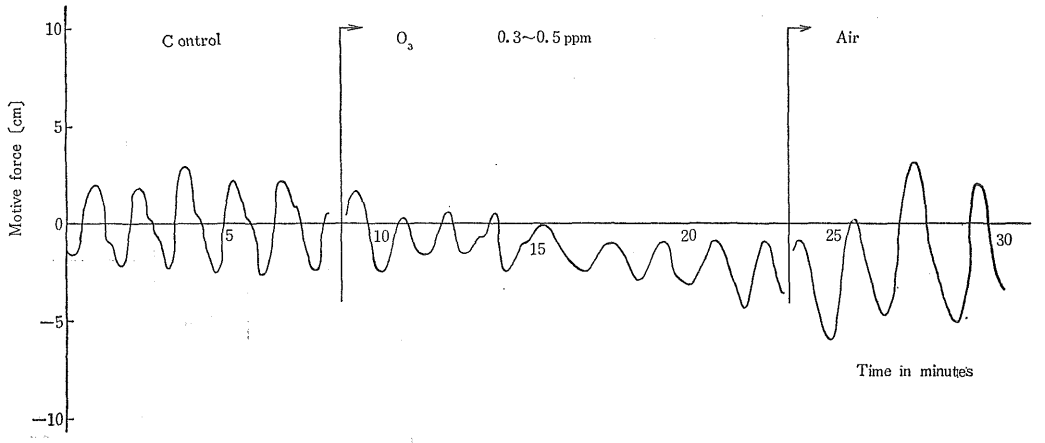


Fig. 6. Motive force (cm of water)

と曝露群と全く同一の条件下に行ない，両者の呼吸活性の変化を比較した。

またホモジネートに，DNP などの脱共役剤を添加し，呼吸調節現象に変化が起こるかどうか調べた。なお，こうした阻害実験はミトコンドリアによって本来行なわなければならないものであり，今回のものは予備的なものである。

Ⅲ 結 果

光化学スモッグの主成分と言われるオゾンを用いて流動への影響を調べてみると，高濃度（10ppm以上）の曝露により明らかな変化が現われてくる。

変形体には顕微鏡で見るとたくさんの小顆粒がつまった外側の動かない部分（ゲル）とその内部に網目状に通じた流動部分（ゾル）があるが，これらゾルとゲルは相互に転換可能で，変形体は内部のゾルを流動によって移動させ徐々に全体の位置を動かしていく。つまり，ゾルが前に行き，ゲルが後に残るわけだが，後端ではゲルからゾルへの，前端ではゾルからゲルへの転換が起っていてその外形を作っていく。

ところで，オゾンの曝露によりこの現象に著しい変化が起ることが観察された。まず，流動の周期（往復に要する時間）が逆になり今まで先端部分であったものが急激なゲル化により後退し，このゲル化は変形体全体にまで及びゾルの網目が消え，流動の停止が起る。かって，Seifriz は原形質を三つに分けて，乳濁液（emulsion）と真溶液，それにゲル形成系（gel-forming system）があると言っているが，この現象からもゲル形成系の存在は明らかである。つまり，オゾンは変形体の防御機構と思われる内部恒常性維持をはかるためのゲル形成系に作用していると思われる。

複室法で，オゾン 0.3～0.5 ppm を流通系でA室に曝露した時の結果を図6に示した。このグラフを見ると，曝露によって対照と比べわずかな流動力の減少が起こり，陰圧の方にずれてきていることがわかる。これは曝露された部分にゾルのゲル化が生じ，全体としての発生力が減少したこと，またゾルを補う意味で一方からの流入が起こっていることを示し，一見変形体はオゾンに対して正の走化性（Positive taxis）を示しているようにも見えるがこれはむしろ機能低下に対しての生体の恒常性（ホメオスタシス）維持のための防御反応と見るべきだと思う。（本研究の概要は第13回大気汚染全国協議会大会で発表した。）

酸素電極法を用いたホモジネートの呼吸測定の結果を図7，8に示した。

対照群に比べて，オゾン曝露群においては内部呼吸，基質添加後の酸素消費量とも増加の傾向を示している。

内部呼吸について，通常，代謝係数と言われるものを計算してみると，対照群の Qo_2 は 9.5 μl/mg hr オゾン曝露群の Qo_2 は 13.6 μl/mg·hr である。

基質添加後，ADP を添加すると，わずかに呼吸が高まるが，（これが Chance の State 3 に相当するものであるか疑問である。）添加後の折れ曲がりは観察されず，呼吸調節能は認められなかった。

基質とともにチトクロームC（酵母製）を添加した場合の呼吸活性の変化はさらに著るしかった。

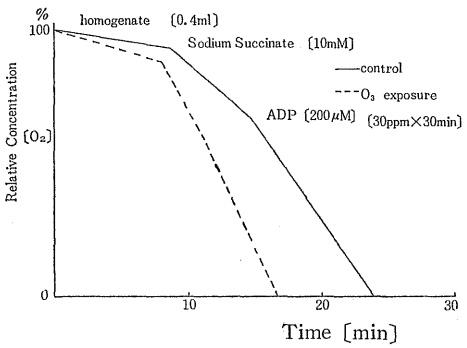


Fig. 7. Effect of Ozone upon O_2 consumption curve of Plasmodium homogenate.

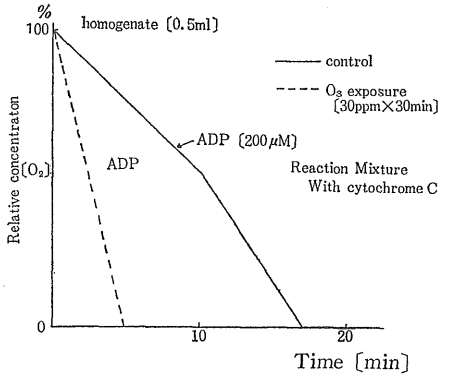


Fig. 8. Effect of Ozone upon O_2 consumption curve of Plasmodium homogenate.

また，DNP の添加による効果は見られなかった。

Ⅳ 考 察

以上の結果より，オゾンの生体影響について主としてエネルギー代謝の面から考察してみることにする。

粘菌の原形質流動機構について現在までに明らかにされたことをまとめてみると次のようになる。これについては多くの総説があり，変形体の原形質流動は筋肉と同様のアクトミオシン－ ATP 系によるものであることがわかっている[20) 21) 22) 23)]。流動力と ATP によるエネルギー産生の関係について呼吸と流動力との同時測定の結果より，呼吸阻害下（低酸素圧，HCN，CO 処理下）で流動力は減少せずむしろ増加するのに対して，解糖を阻害する条件下(モノヨード酢酸，NaF 処理下）で，呼吸を全く押えない濃度で流動力の発生が著るしく押えられる事実より，流動力発生に使われる ATP は，呼吸により TCA 回路で作られるものよりも，解糖（Embden-Meyerhof Parnas 経路）によって作られるものが用いられているらしい。解糖阻害によってただちに流動力の低下が見られることは，変形体内に高等動物の筋肉に見られるクレアチンリン酸やアルギニンリン酸などのエネルギー貯蔵サイクルがないことを考えると容易に理解できる。DNP によって，有酸素下および無酸素下でも同様に流動力の発生が押えられることにより，抑制の原因は，酸化的リン酸化（Oxidative Phosphorylation）の阻害とは一応関係がないと見られる。

呼吸により多量に産生される ATP が何故，流動力の発生に利用されず，解糖の ATP が利用されるかについて，神谷らは ATP 生産場所と利用場所の位置関係に解決を求めている。変形体の呼吸に関する研究[8)]も多く，それらをまとめると，呼吸の中心はミトコンドリアであり，チトクローム a．b．c が存在し，末端酸化酵素がチトクロームオキシダーゼ[24)]であり，コハク酸脱水素酵素がミトコンドリアに集中[25)]し，その存在や形態が寺田により電子顕微鏡的に確認されている[26)]。

これらの事実をもとに，オゾンの生体作用について，呼吸と解糖の関係から類推してみる。粘菌のオゾンに対する反応には，解糖系の阻害を思わせるものがある。これは一応，Pasteur 効果という仮説の下に説明できよう。Pasteur 効果[27)]とは，生化学的には酸素による解糖の阻害ということであり，その阻害機構にはわからないところが多いが，同じ量のグルコースから多量のエネルギーを獲得するために好気的条件下における効率の良い TCA 回路が働き，解糖を押えるという，見事な細胞制御の一例である。その機作としては，ミトコンドリアにおける酸素呼吸と共役してリン酸化 ADP＋Pi→ATP が起こり，ADP.Pi が欠乏し，解糖には，ADP，Pi が必要なので，これの欠乏が反応を停止するためといわれ，ADP が反応の律速因子として働いているらしい。

変形体には，ミトコンドリアの機能についてまだ不明な点も多いが，この器官が，細胞内調節に果している役割は大きく，オゾンにより，呼吸活性が上昇することによって，酸化的リン酸化が起こり，過剰の ATP が生成され，解糖を阻害しているようである。変形体内の（至適）ATP レベルは 4×10^{-4}M であり，これよりレベルが高くなると流動力の低下が起こるという報告がある[28) 29)]。

また，オゾンには，ラジカル反応によって細胞内に H_2O_2 を形成する作用があり，これが ATP 分解酵素

活性を低下させる可能性がある，粘菌のミオシンB[30]を用いて活性の変化を調べる必要があろう。

ミトコンドリアを純粋に分離しての阻害実験[31]，さらに，オゾンの慢性的影響として発癌性の問題が提起されている。「エネルギー源が呼吸系の不可逆的な損傷によって解糖系に移行することが細胞ガン化の原因である」という有名な Warburg の発ガン仮説などから，エネルギー代謝の研究は，これからの大きな課題となろう。

V むすび

粘菌を使ったオゾンの生体影響について，Pasteur 効果による解糖系の阻害という事実が明らかになった。現在のところ，それは可逆的な単なる生体恒常性の維持現象としてとらえることができる。

光化学スモッグ被害の症例中に過呼吸症候群とか，赤血球の膨化による溶血現象が認められ，また筋肉のけいれん等の報告がある。

こうした組織レベルの異常をただちに細胞の機能変化に結びつけることはさけたいが，生理的活動にはかなり一般性があり，基本的代謝には多くの共通の原理法則が支配しているということは今日まで明らかにされてきた生理学上の鉄則である。

粘菌からの基礎的知見が，他の生理学の分野にも応用され，今もって不明なスモッグ解明の一助けとなることを期待する。

VI 謝辞

本研究を始めるにあたり，多くの指導と文献紹介，さらに複室（Double Chamber）を便宜してくださったお茶の水女子大学太田次郎教授，また早稲田大学理工学部生物物理研究室恩師浅井博博士はじめ当研究室の方々に厚く感謝します。

付記

本研究は昭和47年度当研究所研究課題「光化学スモッグに関する基礎医学的実験的研究」として実施したものである。

文献

1) Balchum, O.J.et al. : Arch. Environ. Health, 22, 32 (1971)
2) Stokinger, H.E. : Arch. Environ. Health, 10, 719 (1965)
3) Stokinger, H.E. & Coffin, D.L. : Biologic effects of Air Pollutants, Air Pollution Vol, 2 (1968)
4) Kamiya, N. : Cytologia, 15, 184～204 (1949)
5) 秦野節司：生化学，38，707～718 (1966)
6) 秦野節司：蛋白質，核酸，酵素，15, 1076～1087 (1970)
7) 中島宏通：生体の科学，11，67～73 (1960)
8) Ohta, J. : J. Biochem, 41, (4), 489～497 (1954)
9) Ohta, J. : Cytologia, 17, 300～310 (1952)
10) Ohta, J. : Cytologia, 23, 232～238 (1958)
11) Camp, W.G. : Bull. Torrey Bot. Club, 63, 205～210 (1936)
12) Kamiya, N. : Science, 92, 462～463 (1940)
13) Kamiya, N. : Kagaku, 13, 10～12 (1943)
14) Kamiya, N. : Proc. Japan Acad. 43, 531～536 (1967)
15) Kamiya, N. & Kuroda, K. : Protoplasma. 49, 1 (1958)
16) Oka, S. : Profiles of Japanese Science and Scientists, 151～155 (1970)
17) 萩原文二：蛋白質，核酸，酵素，10 (16), 1689～1702 (1965)
18) 河合清三：蛋白質，核酸，酵素，13 (6)，599～601 (1968)
19) 水上茂樹：医学のあゆみ，54，551 (1965)
20) 太田次郎：生物科学，20，163～169 (1968)
21) 太田次郎：生物科学，21，27～33 (1969)
22) 神谷宣郎，中島宏通，阿部重美：生体の科学, 5 (4)，2～11 (1954)
23) 神谷宣郎：蛋白質，核酸，酵素，4 (3)，177～185 (1959)
24) Johnson, G.T. & Moors, C. : J. Cell. Comp. Physiol. 48, 243～252 (1956)
25) Holter, H. & Pollock, B.M. : Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér, Chim. 28, 221～245 (1952)
26) Terada, T. : Ann. Rep. Sci, Works Osaka Univ. 10, 47～67 (1962)
27) 江上不二夫：生化学，岩波全書 (1964)
28) Kamiya, N., Nakajima, H. & Abe, S. : Protoplasma 48, 94 (1957)
29) 高田充：第22回日本植物学会大会（東京，1957, X）
30) Hatano, S. & Ohnuma, J. : Biochimica et Biophysica Acta, 205, 110～120 (1970)
31) 小林茂保，田川邦夫：蛋白質，核酸，酵素，10 (15)，1596～1609 (1965)
32) Warburg. O, : Science, 124, 269 (1956)

PCBによるヒナ腎病変

大井　玄*　関　比呂伸*　前田　ヒロ子*
湯目邦雄*　野牛　弘*　加納堯子**
北川知行***

PATHOLOGICAL CHANGES IN THE KIDNEY CAUSED BY PCBs

Gen OHI, Hironobu SEKI, Hiroko MAEDA
Kunio YUNOME, Hiroshi YAGYU,
Takako KANO and Tomoyuki KITAGAWA

(Division of Environmeatal Health, Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Sequential histopathological observations were made with cockerels fed diet which contained 500 ppm Aroclor 1254. The most early pathological change appeared in the kidney and heart pari passu the formation of hydro-pericardium, ascites and subcutaneous edema: renal tubular dilatation and degeneration in the nephrogenic zones and lypmphocytic infiltration among the cardiac muscle fibers.

The significance of characteristic localization of the renal lesion was discussed with special reference to the formation of the chick edema.

緒　言

人間においては，PCBによる腎障害は特に注目されていない。カネミ油症では眼瞼の浮腫が一般的であり，また同症妊産婦では四肢の浮腫がみられたがその発生機構は追求されていない[1) 2)]。これに反し鶏では，1957年初めて PCB 中毒が発生した際 "chicken edema disease" と名づけられたごとく，全身の強い水症が特徴的であり，かつ幼弱のヒナほど顕著におかされることが知られ，浮腫生成に関して心，腎，肺等の病変も記載されている[3) 4) 5) 6)]。

しかし，ここでも腎を中心においた十分な検索はなされておらず，また特に幼いヒナほどおかされ易い理由も明確にされていない。

我々はPCBプロジェクトチームの一端として，別の目的でヒナを用いて PCB 中毒実験を行った際，特異的にヒナに水症を惹起す機構を説明するために看過できない腎病変を観察したので別紙に報告した[7)]。

今回の実験は，腎，心を中心として "chicken edema disease" のため死にいたる期間，臓器の経時的病変を観察し，上記報告の事実を確認したものである。

材料と方法

一日令雄白色レグホンのヒナ80羽を二群にわけ，一群にアロクロール1254（AC 1254）500ppm を含む飼料を与え，他群をコントロールとした。飼育開始後，5日目ごとに両群から5羽ずつ選び，屠殺，剖検し，各臓器の組織学的検索を行った。

PCB 投与群では第2週以降，chicken edema disease で死亡する例が増えたが，その際屠殺数を減らし，一群の各5日間に剖検される数を5匹に近づけた。投与群中最後のヒナは32日目に死亡したので，残りのヒナは35日目に屠殺，剖検した。

別に白色レグホン雄成鶏（6ヶ月令）5羽中3羽に AC1254，500ppm を含む飼料を与え，2羽はコントロ

*　東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
**　東京都立衛生研究所微生物部細菌第二研究科
***　癌研究会附属病院病理部

ールとし，35日目に全羽を屠殺，剖検し，ヒナに対応する病理組織的検索を行った。

全群に飼料と水を ad libitum に与え，毎日二回動物の生死，弱り方を観察し，死にかけているヒナは呼吸停止直前，ないしは死亡後できる限りすみやかに（12時間以内）剖検した。

また，各動物は毎週二回体重を測定した。

剖検時において，腹水心のう水の有無，肝・肺・心・腎・脾重量をはかり，これに先立って心臓より血液を採り，血清蛋白，アルブミン・グロブリン比，非蛋白性窒素を測定した。

結　　果

ヒナPCB投与群では第2週後半までに斃死したもの

Table 1 Control Group

Period	Days	Body Weight	Organ Weight (g)					Body Weight Ratio (%)					A./G.	N.P.N.
			Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Heart	Lung	Liver	spleen	Kidney		
		g												
I	1	34.6	0.28	0.45	1.17	0.03	0.37	0.81	1.33	3.39	0.07	1.06	0.74	38.8
II	5	46.3	0.37	0.43	1.73	0.04	0.57	0.78	0.99	3.59	0.09	1.24	0.61	30.8
III	10	92.0	0.89	0.88	3.54	0.09	1.14	0.98	0.95	3.84	0.10	1.24	1.05	44.6
IV	15	153.4	1.19	1.28	4.78	0.17	1.79	0.78	0.83	3.11	0.11	1.17	1.02	37.5
V	20	191.2	1.62	1.29	7.33	0.23	2.39	0.85	0.67	3.80	0.12	1.24	0.67	45.1
VI	21～25	253.0	1.98	2.05	7.70	0.36	2.88	0.78	0.81	3.04	0.14	1.14	1.04	28.0
VII	30	339.0	3.05	3.63	10.01	0.57	4.27	0.89	1.06	2.95	0.17	1.26	0.92	36.8
VIII	35	431.0	3.20	4.35	12.95	0.71	5.04	0.74	1.00	3.00	0.16	1.17	0.78	40.1
							I～VIII Average	0.83	0.96	3.34	0.12	1.19	0.85	37.7
							III～VIII Average	0.84	0.89	3.30	0.13	1.20	0.91	38.7

A./G. : Albumin/Globulin
N. P. N. : Non-Protein Nitrogen (mg/dl)
*All of the above is shown mean values

Table 2 Administered Group (Ac1254)

Period	Days	Body Weight	Organ Weight (g)					Body Weight Ratio (%)					A./G.	N.P.N.
			Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney		
		g												
I	1	35.3	0.28	0.48	1.14	0.02	0.39	0.78	1.37	3.28	0.06	1.10	0.68	38.8
II	2～5	50.8	0.37	0.45	2.47	0.04	0.56	0.72	0.88	4.70	0.08	1.08	0.73	36.1
III	6～10	76.0	0.81	0.91	4.44	0.05	1.08	1.07	1.20	5.80	0.06	1.42	1.11	36.3
IV	11～15	104.8	1.01	1.03	5.59	0.09	1.36	0.99	1.03	5.38	0.08	1.31	0.86	39.1
V	16～20	99.0	1.04	1.16	4.94	0.07	1.60	1.08	1.19	5.36	0.08	1.67	0.69	53.6
VI	21～25	120.0	1.31	1.41	6.71	0.09	2.39	1.04	1.15	5.59	0.07	2.44	0.80	67.3
VII	26～30	126.0	1.37	1.54	7.39	0.12	2.62	1.02	1.22	6.07	0.09	2.13	—	—
VIII	31～32	153.0	1.88	1.64	9.34	0.25	2.53	1.29	0.78	5.95	0.15	1.69	1.26	36.0
							I～VIII Average	1.00	1.10	5.27	0.08	1.61	0.88	43.9
							III～VIII Average	1.08	1.10	5.69	0.09	1.78	0.94	46.5

はなかったが，以後死亡例が生じて16～20日期に6羽，21～25日期に8羽，26～30日期4羽，32日までに全数死亡した。この間，成鶏PCB投与群，非投与群での死亡は無く，ヒナコントロール群では2羽死亡したのみであった。

剖検時，ヒナPCB投与群では15日目から皮下浮腫，心のう水腫，腹水が認められはじめ，斃死した動物では管水症は一般に更に強く認められた。また，これ等の動物には心房拡大，弾力性喪失，腎の白ロウ様変化が注目された

体重と臓器重量との比は，剖検時異常の認められはじめた11～15日 以降について，PCB 投与ヒナで心臓

1.08，肝臓5.69，対照群で心臓0.84，肝臓3.29％と明らかに有意差があり，肝・心肥大の印象を裏づけるものであった。しかし成鶏にはその様な差は認められていない。(Table 1，2)

血清蛋白，アルブミン・グロブリン比は，投与群3.23mg/dl，0.88，対照群3.06mg/dl，0.85，で有意差は無く，非蛋白性窒素量は平均，投与群45.0，対照群37.4mg/dlであった。

組織学的に腎は，被膜直下の尿細管々腔が著しく拡張し，中に淡青色の物質が，時に石灰沈着のある脱落上皮をまじえて滞留していた。この様な変化は，20日目に屠殺された投与グループから認められ始め，深部の実質内にも散在性にあるが，殆んどいずれも未熟な，ネフロン形成層に近接した部分に存在する。拡張した尿細管上皮は扁平化し，部位の判定は困難であるが，近位及び遠位曲尿細管に近似した部位がそれぞれある。尿細管の拡張は時に，腎盂に向う集合管にも著明に認められる。この様な病変は深部の成熟した尿細管にはその部位を問わず全く認められない。糸球体にも著変は無いが，その数は著しく少ない。なお間質には浮腫とうっ血が認められる。(写真1—4)

心筋は，淋巴球浸潤が認められ，PCB投与群において特に顕著であるが対照群にも存在した。

肝には少数例に小巣状壊死あるいは脂肪浸潤があったほかは概して著変なく，他の臓器の変化も副次的であった。

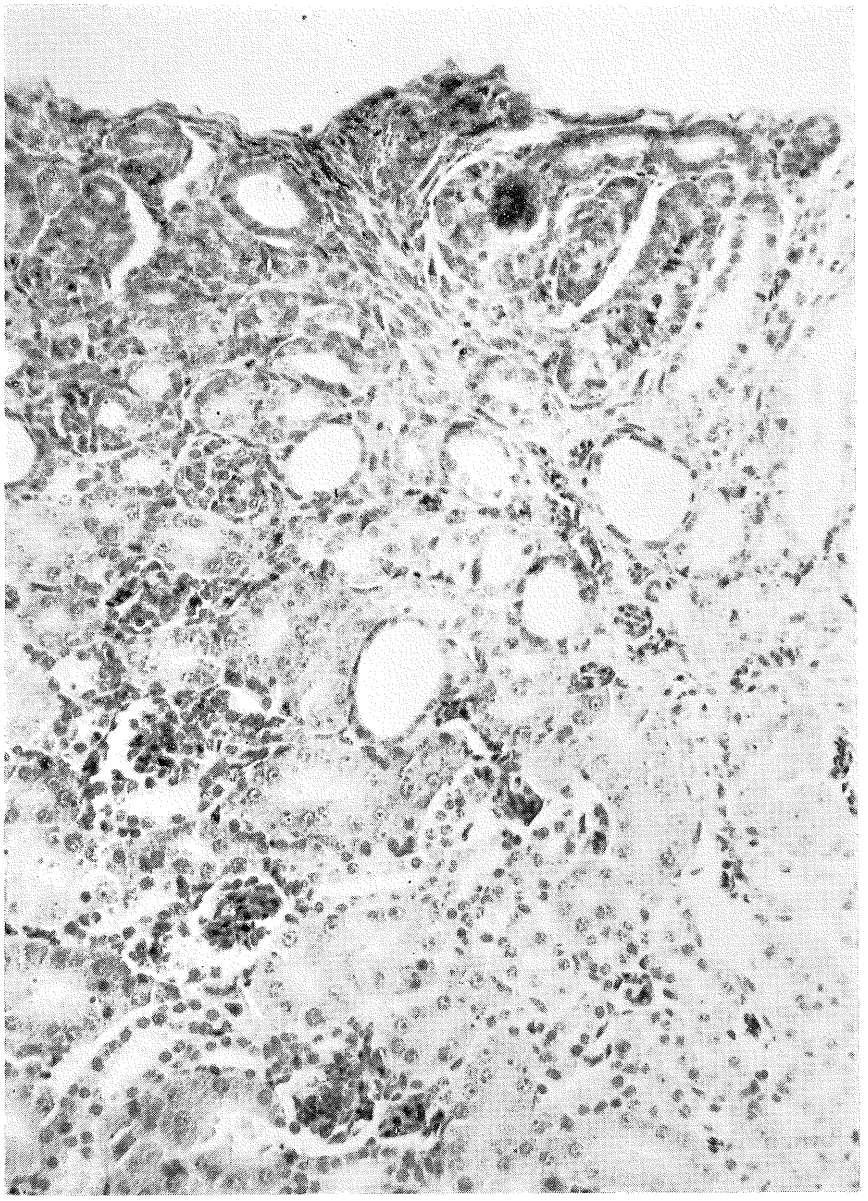


Photo. 1 The Kidney of a 15 day old chick fed diet containing PCB H. E. x80.

Note : Dilatation of the proximal tubules in the nephrogenic zone

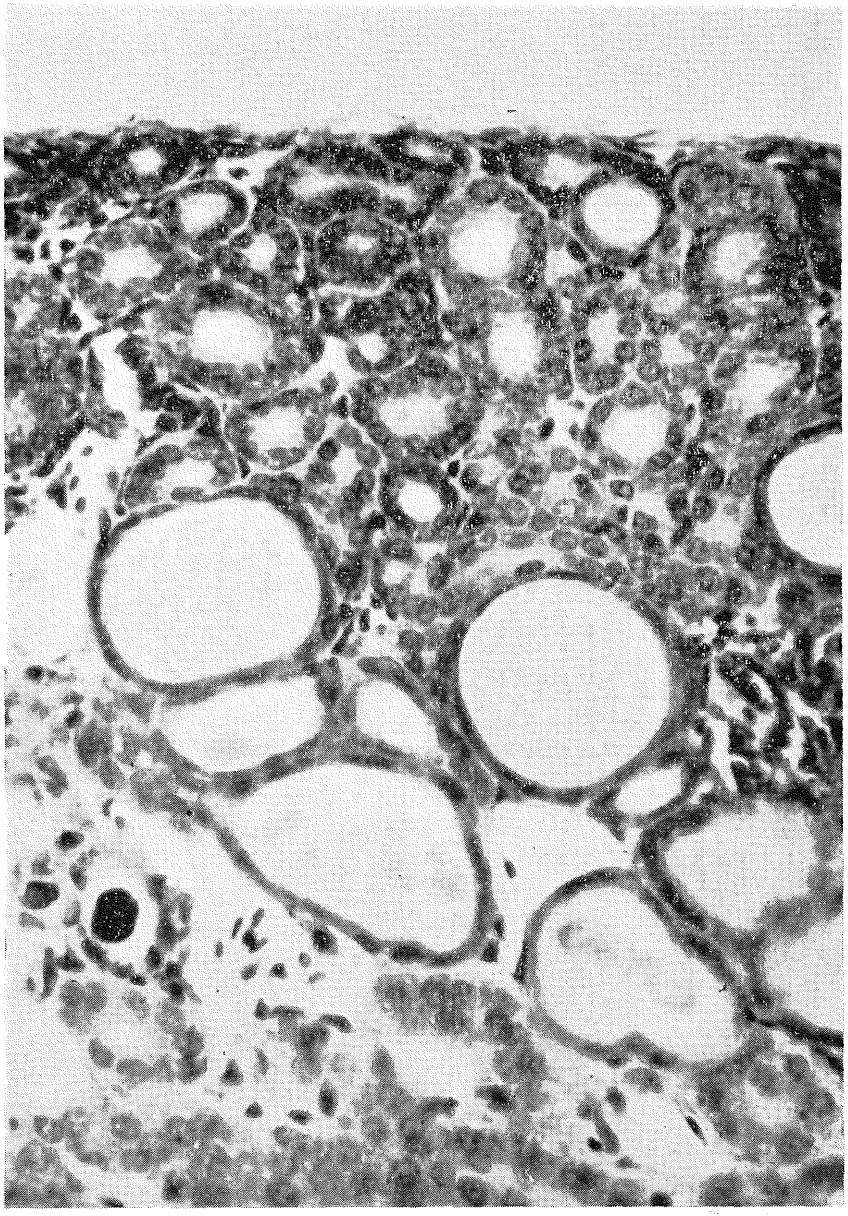


Photo. 2 The kidney of a 20 day old chick fed diet containing PCB H. E. x160.

Note : Further dilatation of tubules and flattened epithelial cells

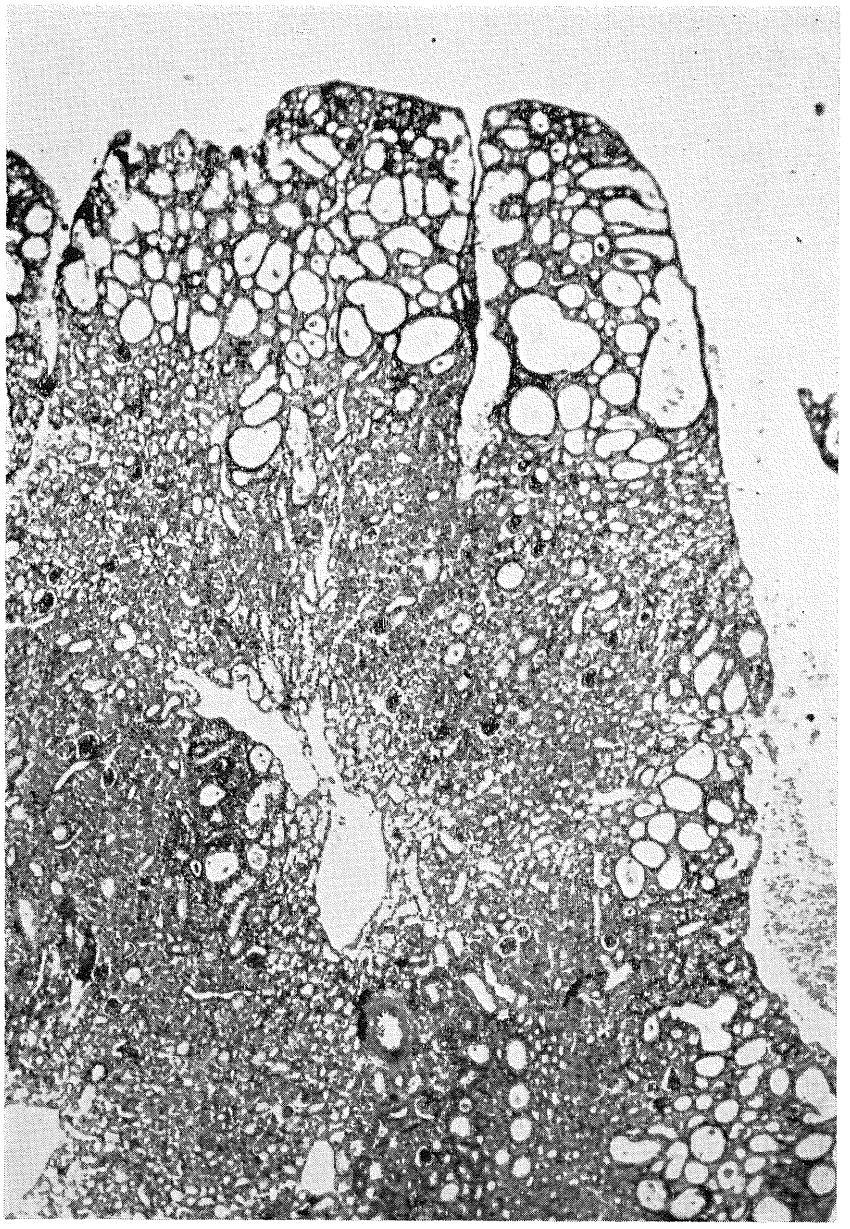


Photo. 3 The kidncy of a PCB fed chick which died on the 20 th day H.E. x8.

Note : Pathological changes are confined to subcapsular area

考　　按

我国においてダークオイル事件が起る以前1964年にAllen は chicken edema factor による浮腫生成機構を調べ，総蛋白，アルブミン・グロブリン比，非蛋白性窒素がPCB投与されたヒナでも正常であること，及び右房右室圧の上昇と心筋の組織所見に基づいて，浮腫は腎，肝性のものではなく，心不全に伴って生ずるものとした。

我々の得た結果でも生化学的所見は Allen のそれにほぼ匹敵するものであり，浮腫の形成の主たる機作は心不全によるものと考えられる。しかし病理解剖所見からは，PCBにより惹起された腎障害も二次的な原因たり得るほどのものであった。事実，哺乳動物では腎臓中全ネフロンの半数が障害されなければ尿素窒素は上昇せず半数以上が障害されると尿素窒素値は急上昇する。したがって，非蛋白性窒素値がPCB投与群でわずかに上昇しているの（45.0mg/dl，N＝12，37.4 mg/dl，N＝22）は示唆的である。

以前の報告者達は，いずれも尿細管の拡張性変化を記載しており，被膜下において特に著しいとも報告されている[3]。我々の観察ではこの拡張性変化は形成層及びその直下の部分に集中されており，形成期のネフロンの選択的障害であろうと考えている。一部に腎盂に近い集合管の強い拡張も認められるが，これは形成ネフロンの腎盂への連結障害が起るのではないかと推定される。

一般に新生児期の腎では付加的なネフロンの形成及び成熟が盛んに行われているのであり，かつ生理的，組織生化学的に未成熟である[8) 9) 10)]。

我々の実験例では，54日令でも未熟な形成層が存在する[7]。PCB が何故この部分に特異的に障害を起すのか，その理由は不明であるが，生後の急激な生長に対応すべきネフロンの形成がこれによって遅れることは，幼弱なヒナほど水症を起し易い事実を説明する一機作であろう。

結　　語

ヒナ80羽について経時的な病理組織学的変化を中心に観察するため，PCB投与，非投与群にわけて実験した。また成鶏5羽を使って，ヒナに対応する変化の検察を行った。

その結果，ヒナの浮腫発生の一原因と思われる変化を腎で観察した。ヒナPCB投与群では16～20日目頃から組織学的変化が認められ，腎の特に形成期のネフロンに選択的に障害されていた。

成鶏では，特に変化は認められなかった。

文　　献

1）奥村　恂，他：福岡医誌，60，440—446，(1969)．
2）滝　一郎，他：同　上　，60，471—474，(1969)．
3）Sanger, V. L., et al.: J. Am. Vet. Med. Assoc., 133, 172—176, (1958).
4）McCune, E. L., et al.: Poltry Sci., 41, 295—299, (1962).
5）Flick, D.F., et al.: ibid., 44, 1460—1464, (1965).
6）Allen, J. R.: Am. J. Vet. Res., 25, 107, 1210—1219, (1964).
7）大井　玄，他：医学のあゆみ，86，5，265，(1973)．
8）Hirsch, G. H. and Hook, J. B.: Science, 165, 29, 909—910, (1969).
9）Rennick, B., et al.: Am. J. Physiol., 201, 4, 743—746, (1961).
10）Wachstein, M., and Bradshaw, M.: J. Histochem. Cytochem., 13, 44—56, (1965).

水中有機物に関する調査研究　第Ⅰ報　水中のフタル酸エステル（ジオクチルフタレート，ジブチルフタレート）について

森田昌敏*　中村　弘*
三村秀一*

STUDITES ON ORGANIC SUBSTANCES IN WATER SYSTEM. PART I PHTHALIC ACID ESTERS (DOP AND DBP) IN WATER

Masatoshi MORITA, Hiroshi NAKAMURA and Shuichi MIMURA

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Health
Tokyo Metropolitan Research Labortory of Public Heaɪth)

summary

Phthalic acid esters which have been produced in a laɪge quantity (330,000 tons in Japan) as soluvents and plasticizers are now recognized as a new enviromental pollutant spread over in a wide range.

We surveyed a water pollution involving river water and well water and also the city water of Tokyo Metropolis. Further, clarifying processes were cheked.

The results were as follows :

1) Total average of DOP and DBP was 4.3ppb in the Tama River, and 3.4ppb in the tap water.
2) DOP and DBP had not been detected from the well water
3) The coagulation using almiuium sulfate was revealed to bə effective for removal of phthalic acid esters.

緒　論

飲料水たとえば水道水，井戸水の中には多種類の有機物が溶けこんでいる。これら有機物量は現在までCOD（化学的酸素要求量），BOD（生物化学的酸素要求量），TOC（総有機炭素量），活性炭吸着物質量，n-ヘキサン抽出物質量といった指標を用いて，その総量が測定されてきたが[1]，個々の有機物質の同定，定量については不十分な研究しか行なわれてなかった。この理由は総量として有機物質を 1ppm 含む水においても，個々の有機物質で考えると（水中には数百種以上の有機物質が含まれているので）1ppb 程度の濃度となり，分離，同定が困難なためである。一方合成化学物質は，その生産量の急速な膨脹に併って，環境中へ大量に導入され，飲料水の安全性に対し影響を及ぼしうるまでになりつつある。衛生学的な見地からも，如何なる物質が如何なる濃度レベルで含まれているかを知ることが，その物質の毒性研究に先だって重要となっている。

滝沢等は東京都の水道水中に含まれる，p-クマル酸，フェルラ酸により，カシンベック病が発現することを報告している[2]。しかしながら，我々は両物質共水道

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

水中より検出することが出来ず，彼等の見解には否定的である。従って現在までのところ，幸いにして，水道水中の有機物質により発病したといの明確な報告はない。しかしながら，発病のような劇的な影響ではないが，生体に及ぼす“subtle effect”については十分な検討が必要になろう。

河川水中の p-クマル酸，フェルラ酸を追跡する過程で，ガスクロマトグラフ上に最も大きなピークとして出現する2つの物質フタル酸ジブチル（DBP）とフタル酸2-エチルキシル（通称 DOP）とを同定した。これらの物質はプラスチック可塑剤や溶剤として用いられているものであるが，環境中に見い出されることについての報告は，最近急速に増している[3]。河川中のフタル酸エステルの存在については田中[4]，片瀬[5]，D. L. Stalling[6] 等の報告がある。フタル酸エステルの中でも，DBP と DOP は生産量の約78％を占め，生産高第1位，第2位である。本報告では，河川水中の DOP，DBP を定量し，その汚染の実態を調べると共に，飲料水中のフタル酸エステルについても調査した。また可能な浄化法についても検討した。

1. 実　験

(1) 試薬と装置

エーテル：特級試薬を苛性ソーダを加えて2回蒸留

塩酸：特級塩酸を蒸留してガラス容器に保存

無水硫酸ナトリウム：特級試薬を鉄皿上で200°C以上，2時間加熱

ガスクロマトグラフィー：島津 GC 5A

マススペクトロメーター：島津 GC-MS LKD9000

赤外スペクトロメーター：日立 EPI-2

(2) サンプリング

河川水：多摩川の表流水（深さ 0.1m～1.0m）を川の中心部主として橋の上から採取

水道用原水，浄水：各浄水場の原水，浄水また各送水管に沿って家庭蛇口水を採取

井戸水：練馬，杉並，豊島区の井戸水計5本を採取

サンプリングにはガラスサンプラーを用いプラスチックからの汚染を回避した。試水は採水後6時間以内に処理した。

(3) 分析操作

試水 500ml に蒸留塩酸を加えて pH を2.0にした後エーテル 350ml を用いて3回抽出。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後，K-D 濃縮器で 500μl に濃縮し，ガスクロマトグラフィー試料とする。

ガスクロマトグラフィー条件は次の通り。

検出器 FID 温度 270°C 感度 $10^2\Omega$，レンジ1，H_2 流速 50 ml/min，空気流速 1.0 l/min，キャリアガス N_2 60ml/min，投入口温度 270°C

カラム① OV-17（1.5％）on Shiwalite W（80-100）温度 210°C

カラム② SE-30（5％）on Shiwalite W（80-100）温度 230°C

定性には SE-30 カラムを，定量は主として OV-17 カラムを用いて行なった。

D 浄化法試験

ジャーテスターを用いて試験，試水（水道水又は河川水に標準 DBP，DOP を添加）に粉末活性炭又は硫酸アルミニウム—炭酸ソーダ系を加えて，150rpm で30分間攪拌。12時間後，上澄液を分析に供す。

2. 結果と考察

(1) 河川水中のフタル酸エステル

多摩川について行なった調査結果を他の化学的な水質検査と共に 表1 に示す。一般的に上流ではうすく

Table 1 DBP and DOP in the water of the Tama River

Place	Water Temp. (C°)	COD (mg/l)	Cl6 (mg/l)	NH3 (mg/l)	Total Residue (mg/100ml)	DBP (μg/l)	DOP (μg/l)	SumD ($\mu g/l$)	Ratio (Dop/DBP)
1) Hikawa	2	0.5	4.9	1.0	25.6	0.73	1.3	2.0	1.5
2) Sawado	3	0.9	7.0	1.0	23.6	1.53	0.9	2.4	0.6
3) Higashiakigawa	3	0.8	7.0	1.0	20.8	0.71	1.8	2.5	2.5
4) Hamura	5	1.5	9.6	1.2	26.1	2.76	2.6	5.5	0.9
5) Hino	7	3.8	29.9	2.1	32.5	1.06	4.4	5.5	4.1
6) Sekido	7	4.7	19.1	2.3	25.2	1.06	1.9	3.0	1.8
7) Koremasa	7	3.6	19.1	2.5	27.9	1.09	2.0	3.1	1.8
8) Kawahara	7	4.9	24.5	2.6	33.4	1.38	3.8	5.2	2.9
9) Suido	6	6.6	19.7	1.3	24.3	1.10	2.4	3.5	2.2
10) Maruko	7	6.5	25.2	3.2	24.3	3.11	3.2	6.3	1.0
11) Daishi	7	9.4	7430	3.2	1567	3.14	3.7	6.8	1.2
12) Haneda	7	10.6	11500	3.3	2264	2.75	3.5	6.3	1.3

下流では濃度が高いといえるが，その差はそれ程大きくはない。過マンガン酸カリウム消費量で測定したCODとDBPやDOPの濃度との間には明瞭な相関関係は見出されない。このことはCODは他の多くの有機化合物の含有量によって決定され，その一成分にすぎないPAE量とは直接関係がないことを意味している。またフタル酸エステルは過マンガン酸カリウムでほとんど酸化されないという報告もあり，CODの問題点を明らかにしている。PAE量はまたNH_3量とも明瞭な関係がない。河川における化学種は生物による吸収や変換をうけ，その濃度は著しく変動する。その変化の速度は個々の化学種によって異なるし，又河川全体の化学的生物的環境に依存している。従ってPAEの河川の各地点における濃度変化が，河川の汚染指標とうまく対応しないのは当然かも知れない。

多摩川での測定結果を既報の他の河川と比較すると第2表のようになる。分析上のいくつかの問題点の為に，これらの値には混乱が見られるようである。河川水としては，北米で大体 1～10 ppb であり，また多摩川においても 0.5～4 ppb であるので，フタル酸エステルによる河川汚染の度合は，日本も北米も余りかわらないのかも知れない。

Table 2. Reports on phthalic acid esters in water system

Place	Reporter	DBP (μg/1)	DOP (μg/1)
Charles River	R. A. Hites	—	0.08～1.9
Off the Mississippi River Delta	E. F. Corcoran	—	600*
Lake Superior	F. L. Mayer et. al	—	300
Lake Huron	F. L. Mayer et. al	0.04	—
Lake Huron	F. L. Mayer et. al	—	5.0
Tama River	T. Katase	1～350	—
Yodo River	Y. Tanaka	?	?
Missouri River	F. L. Mayer et. al	0.09	4.9

*Corresponding peak was assumed to DOP.

我々の測定結果は片瀬等の報告に比べかなり小さい。彼等は 1～350ppb と報告しており，とくに 350ppb という値は夏の干上った川のドロドロした部分における濃度としている。サンプリングの時期とやり方によってはこのような値を示すことがあるのかも知れない。我々は年間を通じての定点観測を行なっていない。唯一の比較出来る測定は羽村取水口での水の PAE であり，1月と10月の値では幾分10月の方が多いけれども，その差はほとんどないといってもいい程度である。（1月，水温5°C，DBP 2.8ppb，DOP 2.6ppb；10月水温 16°C，DBP 3,0ppb，DOP 2.7ppb)。

DOP/DBP 比は0.6～4.2の間を変化し，平均1.5である。日本における，46年度の生産高におけるこの比は4であるので，DBP は DOP よりかなり環境中に漏出しやすいことがわかる。これは DOP が主として可塑剤として使用されるのに対し，DBP は印刷用インキ，接着剤，農薬等の溶剤として使用される割合が多いためであろう。

フタル酸エステルは微生物分解[7)8)]をうけやすいことは知られているが，河川においてどのようにどの程度分解されるのかは明らかではない。PAE 代謝物の一つとして予想されるフタル酸は多摩川の水から 1 ppb 以上の濃度で見出されなかった。

多摩川の PAE 汚染源としては流域の工場ではないかと推定される。その理由は，主とした汚染源は溶剤として使用した製品であろうと考えられる為であり，これらは家庭よりも工場での使用が多いからである。

(2) 井戸水

井戸水中には，(これらは浅井戸に属するが)，DBP，DOP 共に検出されなかった。最上流の河川水に検出されることと比較して興味深い。PAE は土壌中の有機成分[9)]として，また土壌フルボ酸成分[10)]として報告されている。従って PAE 含有水も地下に浸透する際に途中の土壌層で吸着されるのであろう。同様なことは PCB においても見い出されており，工場付近の PCB 汚染地帯の井戸から見い出されないことが多い。

(3) 水道用原水および水道水中のフタル酸エステル

浄水場取水口における原水凝集沈殿したあとの浄水，また送水された末端である各家庭蛇口水中での PAE の濃度を検討した。(表3) 浄水場の原水は通常 2～8 ppd の DBP と 2～5 ppb の DOP を含んでおり，平均値はこの調査時点では 4.50 ppb (DBP)，2.7 ppb (DOP) であった。これに対し浄水は幾分低い値を示し，平均値で 3.5ppb (DBP)，1.8ppb (DOP) であった。このことは凝集沈殿によりいく分取り除かれることを示している。家庭蛇口では，これらの値は 2.34 ppb (DBP)，1.1ppb (DOP) となり，浄水場の水より更に低い値を示している。塩素添加により一部分解するのかも知れない。

フタル酸エステルの毒性については最近急速に研究が進みつつある[11)]。水中動物に対する毒性はかなり高く[12)]，また工場より流出した DOP により多数の川魚が死んだという事件がフィンランドで報告されている。水中動物による濃縮については，ヨコエビの一種

Table 3. DBP and DOP in well water, original and purified water, and domestic water

Sample		DBP (μg/1)	DOP (mg/1)
well water (4 samples)		N. D.	N. D.
Higashimuraya	raw	4.31	1.9
	purif.	3.22	2.5
	tap	1.43	1.2
Asaka	raw	8.16	4.7
	purif.	2.04	1.3
	tap	2.30	1.0
Kanamachi	raw	4.87	2.4
	purif.	3.23	1.2
	tap	2.11	1.2
Nagasawa	raw	3.90	2.5
	purif.	5.50	2.2
	tap	2.57	1.8
Kinuta	raw	2.74	1.7
	purif.	14.27	3.1
	tap	3.31	1.8
Hamura		3.04	2.7
Mean value of	raw water	4.50	2.7
〃	purified water	3.50	1.8
〃	tap water	2.34	1.3

で 13,400[12] 倍の濃縮が報告されているが，金魚ではないとされている。一方哺乳動物に対する毒性は余り高くなく，また非蓄積性とみなされている。ある種の PAE については chick embryo[13] に対する催奇型性が報告されている。厚生省は最近食品添加剤としての DBP と BPBG 使用を禁止した。

WHO 暫定委員会は DBP の1日最大許容摂取量を 2 mg/Kg/Day としている[14]。水道水を1日2 l 飲用すると仮定して，1日の DBP および DOP の摂取量は平均4.7ｒ，3.6ｒであり，衛生学的に特に問題となる量ではないと思われる。水質基準として問題になるとすれば工場排水であろう。

(4) 浄水法

粉末活性炭による処理により，DBP および DOP はかなりよく除かれる。(表4) 多量の活性炭 (100ppm) を用いれば 100ppb の DBP および DOP を 15ppb の濃度にまで下げることが出来る。活性炭の種類を選んだり，あるいはカラム法を用いれば除去効果を高めることは出来よう。

硫酸アルミニウムによる処理の場合，水道水のように浮遊物質がない時と，河川水のように浮遊物質が存在する場合とでは効果が異なる。浮遊物質と共に沈殿

Table 4. Purification Yield by activated carbon and alminium sulfate

1) Reagent : powdered actived activated carbon Water : PAE added city water

PAE conc. (μg/1)	carbon conc. (mg/1)	residual (ppb)	DBP elimination yield (%)	residual (μg/1)	DOP elimination yield (%)
50	50	16.4	65	30.3	40
	100	14.1	57	11.8	76
010	50	15.5	84	29.7	41
	100	14.8	85	14.4	86

2) Reagent : alminium sulphate Water : PAE added city water

PAE conc. (μg/1)	alum conc. (mg/1)	residual (μg/1)	DBP elimination yield (%)	residual (μg/1)	DOP elimination yield (%)
50	25	46.8	6.4	9.0	82
	50	34.7	30	8.3	84
100	25	64.5	36	17.0	83
	50	55.6	44	4.5	96

3) Reagent : alminium sulphate Water : PAE added river water (#)

PAE conc. (μg/1)	alum conc. (mg/1)	residual (μg/1)	DBP elimination yield (%)	residual (μg/1)	DOP elimination yield (%)
25	25	15.6	38	1.9	92
	50	5.8	77	0.9	96
50	25	23.4	53	3.8	92
	50	10.5	79	1.5	97

Suspending substances are present in this sample.

する割合はかなり多く，浮遊物質の存在は除去率を飛躍的に高める。この傾向は DOP において特に著しく，その除去率は90％を超える。DBP が DOP に対して除去されにくい傾向は浮遊物質の有無に拘らず認められるが，これは水に対する溶解度が大きい為であろう。(DBP 28ppm，DOP 18ppm 26°C)，もう一つ指摘されることは投入バンド濃度を高めることにより，除去率を高めることである。

工場排水中のフタル酸エステルの処理としては活性汚泥法のよいことが指摘されている。浄水の処理としては活性炭処理よりも，凝集沈殿の方が有効なようにみえる。

結　論

1) 河川水およびそれを原料としている水道水中にはそれぞれ平均 4.50ppb，3.4ppb の DBP と DOP が含まれていた。一方井戸水中には検出されなかった。

2) PAE を含む水の処理法としては，硫酸アルミニウムを用いた凝集沈殿が有効である。

おわりに

採水に協力していただいた東京の各浄水場の皆様に感謝いたします。

引用文献

1) 上水試験法（日本水道協会），Standard Methods (American public Heath Association) など
2) Takizauwa, T.： Kaschin-Beck's disease
3) 次報告にまとめてある。
4) 田中美太郎：水道協会雑誌，367，33（1965）
5) 片瀬隆雄，半谷高久：用水と廃水，14（10），3-11(1972)
5) Stalling, D. L., Hogan, J. W. and Johnson, J. L.：Environmental Health Perspctives PAES 159 (1973)
7) Breger, I. A.； Chem and Eng. News, 14(1972)
8) Shell, G. L. Boyd, J. L. and Dahlstrom, D. A.：Chem, Eng, 78 [14] 97 (1971)
9) Cifrulak, S. D.： Soil. Sci, 107，63-69 (1969)
10) Ogner, G. et al.： Science, 170，317-318(1970)
11) Jaeger, R., Rubin, R.： SCience, 170，460 (1970) Lancet, July 18，151 (1970) その他多数，日本では片瀬らの総説がある。
12) Mayer, F. L., Stalling, D. L., Johnson, J. L.：Nature, 238，411-413 (1972)
13) Williams, R. T.： Arch, of Env. Health, 16，493 (1968)
14) McCollister, D. D.： Food & Cosmeiic Toxicol., 2，23 (1964)

食品中のフタル酸エステル（DBP　DOP）について

森田昌敏*　中村　弘*　三村秀一*

PHTHALIC ACID ESTERS (DOP AND DBP) IN FOODS

Masatoshi MORITA, Hiroshi NAKAMURA, and Shuichi MIMURA

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Health,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

Dibutyl phthalate DBP and di-2-ethylhexyl phthalate DOP which occupied about 80 % of total industrial production of phthalic acid esters were surveyed in several kinds of vegetables, fishes, animals, milk and milk products. They were not found to be abvoe detection limit (DBP 0.2ppm, DOP1.0ppm) except milk and milk products. In a kind of butter, high contamination by DBP was observed which had its source in the adhesive involving DBP as a solvent.

1　まえがき

フタル酸エステル類（以下PAEと略す）が環境中に見い出される原因としては①溶媒として用いられたPAEの散布例えばPAEを含んだ殺虫剤が空中，水，土壌に直接まかれている。②可塑剤として用いられたPAEの蒸発あるいは溶出。③いくつかのバクテリヤや真菌類による合成PAE。の3つの可能性がある。現在世界各地においてフタル酸エステル類の検出例が報告されはじめており（第一表）これらは主として産業汚染として即ち第3の生合成による部分は極めて小さいと見做されている。

Table 1. Reports on phthalic acid esters as an environmental pollutant

First	Water	River①～⑤ Lake①　Sea⑥
	Atomosphere	Hamilton City⑦
	Earth	Soil⑧⑨　Oil⑩⑪
	Aquatic animals	Chaoel Catfish① Tadpoles①　Pike⑫
	Plants	Dragonflyniads① Mitsuba⑬
Second	Food and other materials	Fish foods① Smoke of tobacco⑭

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

		Bone meal① Casein① Corn starch① Gelatin① Wheat midllings① Cake⑮ Tomato ketchup⑯
	Mamalian animals	Heat musle of rats, dog, mouse and cow⑰ Pineal Gland of Ox⑱
Last	Human	Blood (factory worker)⑲ Liver (Patients)⑳

環境汚染はⒶ大気，Ⓑ水，Ⓒ土壌のような基礎環境から，Ⓚ魚，Ⓛ植物，Ⓜ哺乳動物，Ⓝ加工食品群などの中間環境をへて，ⓧヒトという最終環境に至る3つの段階的構造をもっている。この視点から眺めるとき，既知の報告例（第一表）には中間段階および最終段階に著しい不十分さが目立っている。本研究はフタル酸エステル類による環境汚染は工業生産物による汚染であるという立場にたちつつ，いくつかの植物，魚類，哺乳動物，いくつかの加工食品群中のフタル酸エステルを定量し，汚染経路，蓄積性の有無等に検討を加えようとしたものである。

フタル酸エステル類は，年産約33万トンに達する石油化学製品に属し，そのうちジオクチルフタレートが約63%，ジブチルフタレートが約15%を占めている。（昭和46年度）本研究は生産高1位2位を占めるこの2つのフタル酸エステルに限定して行ったものである。

2 サンプルと分析法

(1)サンプルとして以下の物を用いた。豚の内臓および人体脂以外は店頭にて買い求めたものである。豚の内臓は多摩食肉センターより，また人体脂は監察医務院より入手したものである。包装紙は東京都衛生局より供給された。

植物：ほうれん草，いちご，バナナ，りんご，みかん，夏みかん

魚類：さば，かれい，かます，あじ，いわし，いさき，ぶり，ニジマス，たかべ，いか，えび，かに，たらこ

肉類：牛肉，ブタ肉，鶏肉，ブタの各部分もも，背ロース，肩，肩ロース，肺，腎，すい臓，胆のう）

乳：牛乳，バター，チーズ，スキムミルク

ヒト：人体脂

(2)試薬と分析装置

（ｉ）フロリジル80——80—100メッシュの試薬を140°C 24時間加熱により活性化

無水硫酸ナトリウム——特級試薬を250°Cで2時間加熱

(ii)エーテル——特級試薬を苛性ソーダ粒と共に2回蒸留

(iii)n-ヘキサン——マリンクロット社製残留農薬試験用をそのまま使用

(iV)エタノール——局方エタノールを2回蒸留

（V）ガスクロマトグラフ——島津ガスクロマトグラフ GC—5A 条件：検出器FID, H_2ml/minair 1.0 l/min キャリアーガス$N_2$60ml/min. Injection 温度270°C 検出器温度270°C 感度1×10^2カラム。条件①SE—30（5%）ou Shiwalite W（80—100）カラム温度 230°C ②OV—17(1.5%) on Shiwalite (80—100)カラム温度210°C

(Vi)赤外スペクトル——日立EPI—G 3

(Vii)マススペクトル——島津ガスクロマトグラフマススペクトルグラフィ

条件カラムOV-17(1.5%)ou Shiwalite W, 温度180°C, キャリアーガスN_2（55ml/min）

(3) 分析法

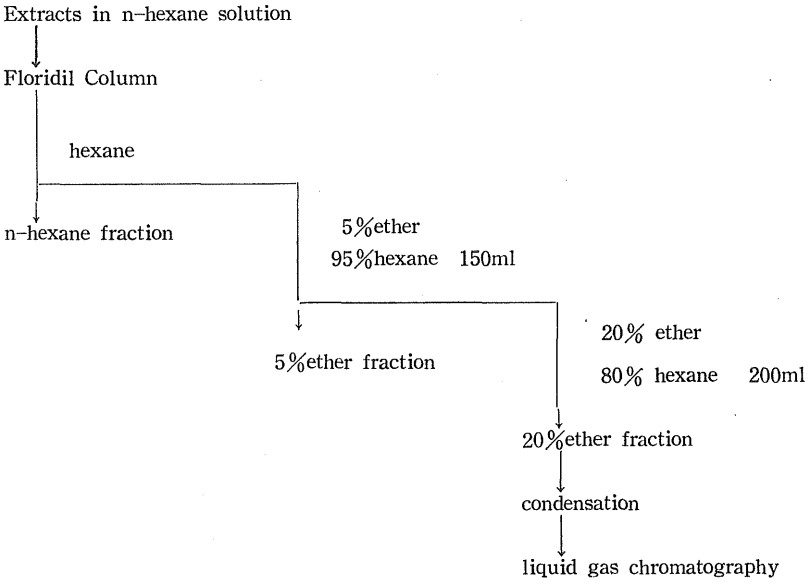
AOACの脂肪抽出法に準じ，n-ヘキサン溶液として抽出し，これをフロリジルカラムにかけてクリーンアップ後，濃縮しガスクロマトグラフ用試料とした。(図1）

3 結 果

(1)分析法の検討

(i) クリーンアップ 分析の困難さは主として脂肪との分離にある。D. L. Stalling 等の方法に準じてフロリジルカラムクロマトグラフィを用いた。オリーブ

Fig 1. AnalyticalProcedure



油に溶解したPAE標準液（DBP 100γ，DOP 110γ，オリーブ油 0.9g，ヘキサン 50ml）を図1の操作法に従い精製した。脂肪の大部分は5%エーテル区分に来るので除くことが出来る。エーテル20%区分の溶出曲線は図のようになり，極性の低い DOP が先に溶出し，次にDBPが溶出してくる。くり返し行った回収率は平均DBP100%，DOP94%であった。

(ii) ガスクロマトグラフィ用試料は極性の異なる2本のカラムを用いて定性定量した。

OV-17だけを用いたカラムでは保持時間の偶然の重なりにより他の物質がDBPと同じ位置に現われたが，ガスクロマトグラフマススペクトログラフを用いた結果，DBPではないことが判明した。必ず2本以上のカラムを用いて定量することが必要である。

(2)植物，魚類，肉類からの検出

市販されていたサンプルからはいずれも検出されなかった。検出限界はジブチルフタレート 1.0ppm であった。魚類で検出された。唯一の例はニジマス1検体であった。追試した他の2検体では検出されなかった。（表2）

Table 2. Phthalic acid esters in fishes

Sample	number of Sample	DBP(μg/g)	DOP(μg/g)
mackerel	3	—	—
flatfish	2	—	—
Sawy-pike	3	—	—
horse mackerel	2	—	—
sardine	2	—	—
thunberg	1	—	—
yellow tail	2	—	—
raibow trout	3	0.6	—
takabe#	1	—	—
cuttle fish	2	—	—
shrimp	2	—	—
crab	1	—	—
cod roe	1	—	—
detection limit		0.2	1.0

a kind of harvest fish

Table 3. DBP in milk and milk products

sample	DBP(μg/g)
milk	(0.05)*
skim milk	0.2
butter-a	4-11
-b	—
cheese	—
butter-a	—
surface	11
core	2

* almost near to the detection limit

Table 4. DBP in wrappers

sample	DBP(μg/g)
butter-a	1000
-b	—
-c	140
cheese-a	300
-b	1000
-c	—
-d	—
skim milk	100

(3) 牛乳および乳製品中のPAE

牛乳および乳製品中には検出されるものがあった。（表3）これらの汚染源は包装紙と考えられたので，その分析を行った結果いくつかの包装紙について検出された。（表4）バターA中のDBD対応ピークのマススペクトログラムおよび包装紙抽出物の赤外，マススペクトラムを図2に示す。赤外スペクトルは標準物質に極めてよく一致しており，またマススペクトルにおいてもm/e149の基準ピークと278の親ピークが観測されている。

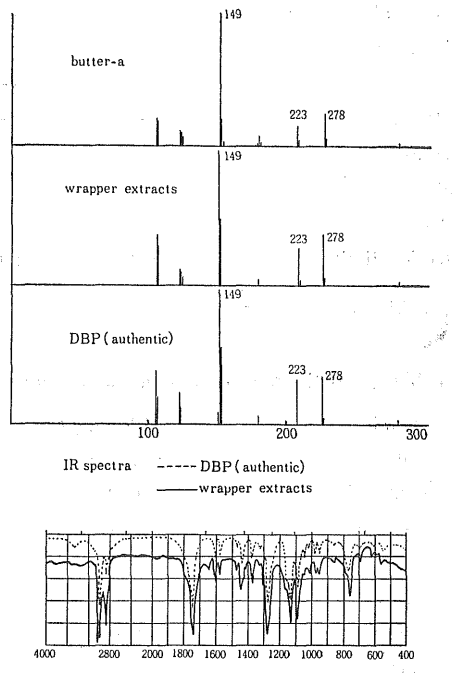


Fig. 2. Mass and IR spectra of DBP contained in butter and wrapper

(4) 人体脂中のPAE

人体脂3検体中からはDBP，DOPはいずれも検出されなかった。（検出限界DBP0.2ppm，DOP1.0ppm）

4 考 察

(1) 環境汚染としてのフタル酸エステル工業製品による基礎環境汚染は2つのFactorによって決定される。1つは生産量（より正確には環境への流出量）であり，もう一つは生分解性である。生分解性の量的な評価は例えば環境中での半減期として表わすことが出来るが，現在未だ十分にはなされていない。

しかし，そのorderを推定することはある程度可能である。さて生産高の伸び率が，生物的な分解速度よりも十分に遅い場合，環境中に見出される濃度は生産高と生物的半減期の積で見つもることが出来る。このようにしていくつかの有機汚染物質をリストアップしていくと次表のようになる。（表5）フタル酸エステルの半減期は明らかではないが，活性汚泥による分解率の研究より推定した。PAEの環境汚染物質としての性格が割合明らかとなっている。即ち①生産高は極めて大きい②生分解性は大きい③汚染指数はBHCよりはかなり小さいがPCBには近い。

Table 5. Environmental Pollution Index *

pollutant	Introduction to (10,000ton/year) environment **	half life	*Index
ABS	60	3	180
PAE	10	3	30
BHC	10	100	1000
PCB	0.3	300	90

* The index was defined by the product of intrduction and half life

** setimated values

従って，もし蓄積が著しいときは重大な汚染物質となりうる。生物濃縮については余り情報が集まってはいない。ある種の水生動物による濃縮（ヨコエビの一種13,000倍が報告）されているが，一方金魚は濃縮しないとされている。本報告にみられるように魚，肉に検出されないことは，食物連鎖による生物濃縮はほとんどないこと（つまり蓄積よりも分解の方が速やかであること。）を示していると思われる。速やかな分解は魚およびラットで報告されており，例えばラットはDOPを24時間以内に99%以上代謝してしまう。しかしながらD. L. Stalling等は米国各地からの魚から0.2～10

ppm（総重量あたり）のDOPを検出し，残留性を問題にしている。詳細な研究が更に必要と思われる。

(2) 食品汚染としてのフタル酸エステル

前項で明らかになったように，食物連鎖を通じての食品汚染は重要ではないように見られる。牛乳の汚染としては，PVCミルクチューブ（ミルクの収集に用いる）からPAE溶出が報告されている。[23] 本報ではDBPが0.05ppm検出されているが，検出限界に近く，真に含有されていたのかどうかは疑わしい。一般に乳製品中本来的にはPAEは含まれていないとみてさしつかえなにはいであろう。或る種のバター中には多量のDBPが見いだされこれは包装紙に起因するものと推定した。その理由は①他のメーカーのバターからは不検出②バターの外側に著しく濃く分布していること③包装紙に多量に含まれていたことの3点である。この包装紙は外側のアルミはくと内側の硫酸紙とから成りたっており，この両者の接着剤の溶媒としてDBPが含まれていたものである。このような包装材は他のメーカーのチーズ等にもみられ，これ等の分析結果は表4に示した通りである。一般的に脂肪含有量の高い食品には移行しやすいので注意が必要であろう。

(3) 人体への移行と蓄積

人体へのPAEの移行経路としては，特殊な例（例えば輸血用塩ビパックより直接血液中への導入）を除けば1)大気，2)飲料水，3)食品からの3つが可能である。皮膚からの吸収は報告されていないがもし可能であれば，塩ビ製のオモチャなどは新たな経路となり得よう。大気中からはハミルトン市のゴミ焼却炉付近の大気中[7]から検出されているだけである。都においては石神井南中学校での空気試料の分析報告はあるが，DOPは検出されなかった。[21] PAE類は一般に蒸気圧が低いので重要な大気汚染物質ではないであろう。飲料水中のPAE濃度は前報で報告した。そのレベルは1日摂取量で数 μg 程度である。これに反し食品からの汚染は比較的大きいと思われる。例えば50gのバターAの中には100～600 μg のフタル酸エステルが含有されていた訳である。包装材に留意すれば，食品のPAE汚染はほとんど取り除くことは可能であろう。しかし一般的に経口的にとりこまれたPAEは消化管で加水分解をうけ[23]生のままで生体に移行することは考えにくい。

人体における蓄積については2つの報告がある。一つは医療用塩ビチューブを用いて輸血した患者の肝臓等の内臓からであり[17]，もう一つは工場労働者及び患者の血液中[20][19]からである，後者については操作中およびサンプリング途上での汚染があり，現在のところ信頼性はうすい[23]と思われる。フタル酸エステルと脂肪との分子構造上及び化学的性質の著しい類似性から，脂肪中への移行，蓄積が予想されるが，人体脂（3検体中には検出されなかった。人体中に取り込まれたPAEは臓器でトラップされ脂肪層へは移行しないのかも知れない。或は魚やラットで見られるように急速な代謝をうけて排出されるのかも知れない。

おわりに

本研究の概要は日本食品衛生学会（1973年5月）において発表いたしました。

文　献

1) Mayer, F.L., stalling, D.L. and Jchnson, J.L.: Nature, 238,411(1972)
2) Hites, R.A. : Envivonmental Health Perspectives, 17 (1973)
3) 田中美太郎：水道協会雑誌，367，33（1965）
4) 片瀬隆雄：用水と廃水，14（10），3（1972）
5) 森田昌敏，中村弘，三村秀一：東京都立衛生研究所研究年報，(1971)
6) Corcoran, E.K.: Envivonmental Health Perspectives, 13 (1973)
7) Tomas, G. H.: ibid., 23 (1973)
8) Citrulak, S.D.: Soil Scence, 107,63 (1969)
9) Ogner, G. etal.: Science, 170,317 (1970)
10) Phillips, H.F. and Breger, J.A.: Geochem. et. Cosmochim. Acta., 15,51 (1958)
11) Breger, I.A.: Chem. and Eng. News, 19 (1972)
12) Stalling, D.L., Hogan, J.W. and Johnson, J.L. : Environmental Health Perspectives, (159) 1973
13) Hayashi, S.: Tetrahedron letters,(50), 5061(1967)
14) Cerleulis, J. and Ard, J.S.: Anal, chem., 50, 646 (1967)
15) 武田常蔵：「フタル酸エステル」，p.204，国民生活センター(1973)
16) 仲西直江，米谷武士，永田省吾：日本食品衛生学会第25回学術講演会要旨集(1973)
17) Nazin, D.J.: Biochem., 10,23,4228 (1971)
18) Taborsky: J. Agr. Food chem.,15, 10,93,(1967)
19) Maxwell, T., Milne, G.W., Fales, H.M. and Law, N.: Envivonmental Healh Perspectives,139(1973)
20) Jager, R.J. et al.: Lancet, July 18(1970); Science, 170,460(1970)
21) Shell, G.L., Boyd, J.L. and Dahlotrom, D.A.:

chem. Eng., 78(14), 97(1971)
22) 環境技術研究所調査報告集
23) Wildbrett, G., Eves, K. W. and Kiermeiner, F. : Werkstoffe Korrosion, 22.753(1971)
24) 秋山，佐藤，高橋，森田中村：未発表データ
25) Shaffer, C. B., Carpeter, C. P. and Smyth,H.F.· J. Ind. Hygine Toxicol., 27, 130(1945)
26) Jaeger, R. J, and Rubin, R. J.: Sience, 170, 460 (1970)
27) Law, N.C., Fales, H.M. and Milne,G. W.A.: clin. Tox., 5(1), 17(1972)
28) Milues, G. W. A : Envirommental Health Perspectives, 193(1973)

野菜，果物中の中性洗剤の残留および農薬の洗浄除去効果について

渡辺悠二* 中村弘* 樋口育子*
会田朋子* 高橋保雄* 三村秀一*

STUDIES ON RESIDUAL SYNTHETIC DETERGENT IN VEGETABLE AND FRUIT, AND REMOVAL EFFECT OF RESIDUAL INORGANIC PESTICIDE

Yuji WATANABE, Hiroshi NAKAMURA, Yasuko HIGUCHI, Tomoko AIDA, Yasuo TAKAHASHI and Shuichi MIMURA

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

summary

The use of alkylbenzensulfonate (ABS) detergent has been bringing forward some problems on the poison or water pollution since before.

There are several reports on the determination of hard-type ABS in vegetable and fruit washed with synthetic detergent, but there are few reports about soft-type ABS (liner alkylbenzensulfonate=LAS). Therefore, studies of detergent residues of vegetable and fruit by washing with LAS detergent were performed by using letuces and strawberries. There results are shown in Table II. III. IV. and Fig. 1, 2, 3.

On the other hand, the studies of removal of residual pesticide by washing with LAS detergent were performed by using apples in which a kind of inorganic pesticide, copper was remaining. These results are shown in Table V. VI.

Namely, the amount of residual detergent in letuces and strawberries were respectively 4 and 10 ppm in usual domestic use, but more than several times of usual use in case of remarkably unusual use. And the removal effect of residual pesticide by washing with detergent solution was more than two times of that with water only, but removal effect by rub-washing with water was almost the same as shake-washing with detergent solution.

緒　言

昭和31年に発売されたアルキルベンゼンスルホン酸系（以下 ABS 系と略す）台所用合成洗剤は，ソープレスソープとも呼ばれ，寄生虫卵，農薬の除去に卓抜した働きをする云われて，一般家庭はもとより学校や病院の給食で野菜，果物や食器の洗浄に広く使用され，急速に普及してきた。

しかし，万能と思われたこの石油系洗剤も使用量の増加するにつれ，発ガン性，催奇性，下水処理における問題などの形で疑問が提起され，昭和37年，科学技術庁より「洗浄の目的から，はなはだしく逸脱しない

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

限り，人の健康をそこなう恐れはない」という見解が出され現在に至っている。が，ABS系洗剤の使用については，その毒性等の面からいまだ種々の論議がなされている。

ABS系洗剤には，生分解されにくいハード型と，生分解をうけやすいソフト型とあり，毒性，下水処理，野菜，果物中の残留洗剤量[1)2)]や洗剤による農薬の洗浄効果[3)4)5)]などについてはこれまで種々研究報告がなされている。また，昭和42年頃より環境汚染防止の立場から徐々にソフト型 ABS 系洗剤に切りかえられており，現在では殆どがソフト型と思われる。

そこでこれら毒性や環境汚染の問題の究明のために，東京都ではソフト型 ABS 系洗剤について綜合的な調査研究を行なった。筆者らは現在市販されている台所用洗剤（ソフト型 ABS 系洗剤）を用いて，野菜および果物に使用した場合の残留洗剤量ならびに農薬の洗浄除去効果についての研究を行ったので報告する。

実験方法

〔I〕野菜および果物中の残留洗剤量について

1　試料　i）野菜（レタス）：市販レタスの外葉および芯部を除いた淡緑白色の中葉を使用。ii）果物（イチゴ）：市販ダナーイチゴ（1個約12g）を使用。

2　使用洗剤　市販の台所用液体洗剤（ソフトタイプ，主成分：直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩……約30%）。

3　洗浄液の調整　0.2v/v%および0.6v/v%洗剤溶液（液体洗剤5ml または15ml を水道水で2.5 l に希釈する）。

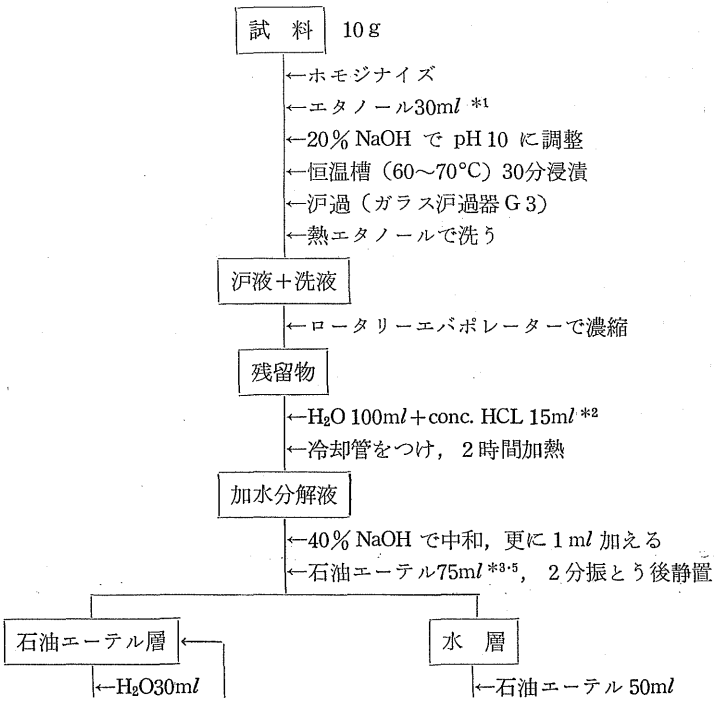
4　試料の洗浄方法　i）レタス約100gを0.2%および0.6%洗剤溶液2.5 l に浸漬したのち，振とう機（縦型，振幅4cm，70回/分）にて，10秒，30秒，1.5分，5分および20分振とうする。振とう後，これらを水洗しないもの，流水（120ml/秒）で10秒および1分間水洗したものに三分する（浸漬時間の違いによる残留洗剤量）。

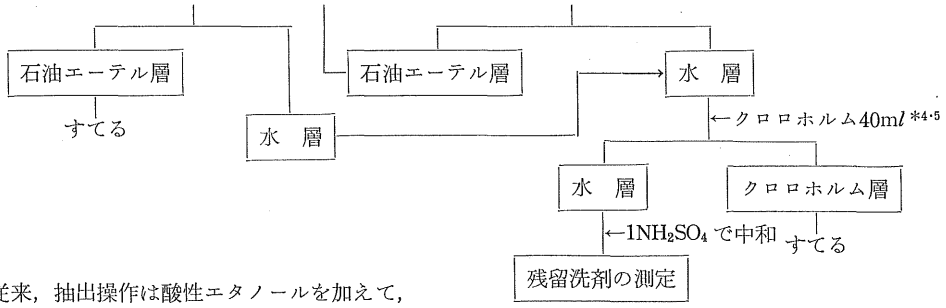
ii）レタス約250gを0.2%洗剤溶液2.5 l に浸漬したのち，振とう機（i と同じ）にて30秒および5分振とうする。振とう後，これらを水洗しないもの，流水（120ml/秒）で10秒，1分，3分，5分および10分間水洗したものに六分する（水洗時間の違いによる残留洗剤量）。

iii）イチゴ約30個を0.2%および0.6%洗剤溶液2.5 l に浸漬したのち，振とう機（i と同じ）にて30秒および5分振とうする。以下，ii）と同様の操作を行なう（水洗時間の違いによる残留洗剤量）。

5　抽出および前処理

i）レタスの場合





＊1　従来，抽出操作は酸性エタノールを加えて，6時間の浸漬によるソックスレー抽出等が行なわれているが，本操作のようにエタノールを加えたのち pH 値を9～10に調整し，30分間恒温槽に浸漬することにより，短時間で同程度の回収率が得られる。

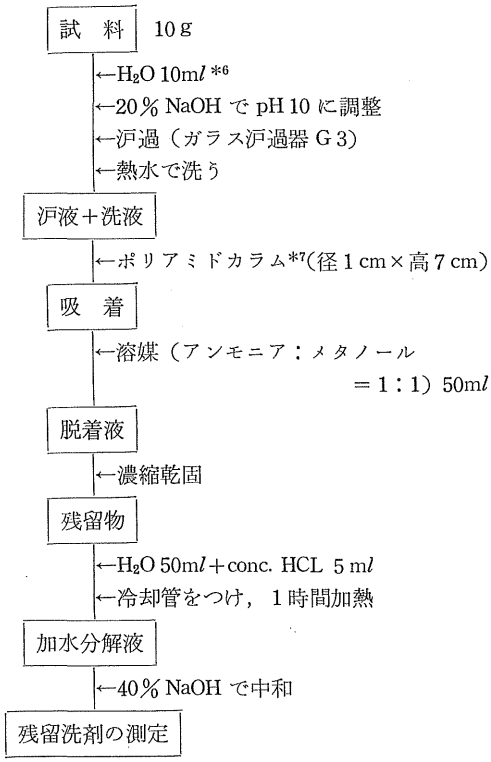
＊2　濃塩酸 15ml を加え，2時間加水分解することにより，クロロフィルその他の妨害物質をある程度分解除去できる。

＊3　石油エーテル抽出により，試料中の油脂や石油エーテル可溶分を除去できる。

＊4　クロロホルム抽出により，クロロホルム可溶分を除去できる。

＊5　上記＊3および4の操作は試料液の pH 値を10以上にして行なうと有機層と水層の分離が早い。

ii)　イチゴの場合



＊6　ホモジナイズした試料を pH10 以上に調整したのち，沪過し，残査を熱水で洗うことにより，エタノールを用いなくとも充分抽出できる。

＊7　イチゴの色素であるアントシアン配糖体は加水分解，石油エーテルやクロロホルムによる抽出操作を行なっても除去されず，定量の際，メチレンブルー活性物質の生成を妨害する。この妨害物質を除去するため，ポリアミドによる前処理を行なった。すなわち，ポリアミド3gを充てんしたカラム（径1cm×高さ30cm）にアルカリ性に調整してある試料液を展開し，ABSを吸着させたのち，混合溶媒（アンモニア：メタノール＝1：1）50ml を流すことによって脱着を行なう。

6　残留流剤の測定方法

アニオン界面活性剤の定量法として最も精度のよい Abbott 法を採用したが，野菜および果物中にはクロロフィル等の妨害物質いわゆるメチレンブルー活性物質が沢山存在するため，検討の結果，この試験法に次のような改良を加え，定量を行なった。

i)　原法において，分液ろう斗(A)に5ml のメチレンブルー溶液を加えているが，本実験ではメチレンブルー活性物質が多量に存在するため，この量では充分な活性物質の生成が定量的に行なわれない。

ii)　メチレンブルー活性物質をクロロホルムで抽出する操作を，原法では分液ろう斗を水平に振りまぜて行なうのであるが，本実験では振とう機で2分間振とう後，静置し，クロロホルム層を遠沈管に移し，5分間遠心分離を行なう。

iii)　分液ろう斗(B)におけるクロロホルム層の酸洗いを，原法では1分間水平に振りまぜるのであるが，本実験では振とう機で10分間振とうすることにより，定量的にメチレンブルー活性物質を酸性水層に移行させることが出来る。

この定量法で得られるブランク値および回収率はTable I. の通りである。

Table I. Recovery of LAS Added in Sample

Sampe (10g)	LAS added (μg)	LAS found (μg)	Recovery %
Letuce	0	46	—
	0	40	—
	0	48	—
	0	38	—
	100	117	74
	100	121	78
	100	115	72
Strawberry	0	23	—
	0	28	—
	0	22	—
	0	27	—
	100	99	74
	100	97	72
	100	104	79

（定量操作） 試薬の調整はJIS K 0101 工業用水試験方法に準じて行なう。

(1) 250ml 分液ろう斗(A)には，水50ml とアルカリ性ホウ酸ナトリウム溶液 10ml およびメチレンブルー溶液20ml（レタスの場合）または15ml（イチゴの場合）を入れ，分液ろう斗（B）には，水100ml とアルカリ性ホウ酸ナトリウム溶液 10ml およびメチレンブルー溶液5 ml を入れる。

(2) それぞれにクロロホルム 10ml を加え，30秒間激しく振とうしたのち分液する。

(3) 2～3 ml のクロロホルムでゆるやかに水層を洗う。

(4) (2)～(3)の操作を2回行なう。

(5) 抽出後，分液ろう斗（B）には 1N 硫酸溶液3 ml を加える。

(6) 分液ろう斗（A）に中和してある試験液を加える。

(7) 分液ろう斗（A）にクロロホルム 15ml を加え，2分間激しく振とう後静置する。

(8) クロロホルム層を遠沈管に移し，遠心分離（4,000回/分）を5分間行なう。

(9) クロロホルム層を分液ろう斗（B）に移す。

(10) 分液ろう斗（B）を振とう機にて10分間振とうする。

(11) クロロホルムで潤した脱脂綿をつめたろう斗を通して，クロロホルム層をメスフラスコ 50ml に移す。

(12) (7)～(11)の操作をレタスの場合3回，イチゴの場合2回行なう。

(13) クロロホルムをメスフラスコの標線まで加える。

(14) 分光々度計にて1 cm セルを用い，波長 650mμ における吸光度を測定する。

(15) 検量線より濃度を換算する。

〔Ⅱ〕農薬の洗浄除去効果について

1 試料 市販リンゴ（スターキング種1個325～344 g）を使用。

2 使用洗剤 Ⅰ—2と同じ。

3 洗浄液の調整 0.2v/v%，0.6v/v% 洗剤溶液（Ⅰ—3と同じ）および水道水（対照）。

4 洗浄方法 i) 上下振とうによる洗浄

洗浄液500ml を入れたビーカーにリンゴ1個をつけ，毎分約80回の割合で5分間手で上下に動かして洗浄を行なったのち，水道水500ml を入れたビーカーに移し，3分間，先の洗浄と同様に操作する水洗いを2回行なう。

ii) 手のこすりによる洗浄

洗浄液500ml を入れたビーカーにリンゴ1個をつけ，2分間手でたんねんにこすり洗いを行なったのち，水道水500ml を入れたビーカーに移し，2分間，先の洗浄と同様に操作する水洗いを2回行なう。

iii) 表皮に附着する全銅量

上記 i) または ii) の洗浄方法により，洗浄の終ったリンゴをそれぞれ0.2%の割合に洗剤を加えた $\frac{1}{10}$N 塩酸溶液500ml につけ，へたの部分も含めブラシでたんねんに約5分洗浄を行ない，この酸溶液に溶出した銅量に先の i) または ii) の洗浄操作によって溶出した洗浄液および水洗い液中の銅量を加えたものをリンゴの表皮に附着した全銅量とする。

5 銅の定量法 i) 洗剤を含まない洗浄液および水洗い液の場合

精密分析用塩酸 4 ml を検液に加えて加熱し，濃縮後メスフラスコ 50ml に移し水で定容にする。その適量を分液ろう斗にとり，これに25 %ロッセル塩5 ml および BPB 指示薬数滴を入れ，青色を呈するまでアンモニア水を加える。更に飽和硫酸アンモニウム溶液10ml，1 %ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液5 ml およびメチルイソブチルケトン10ml を加え，振とう抽出後，原子吸光分析を行なう。

ii) 洗剤を含む洗浄液および $\frac{1}{10}$N 塩酸溶液の場合

精密分析用塩酸 4 ml を試料液に加えて加熱濃縮したのち，硫硝酸を用いる湿式法により洗剤を分解し，

適当量の水を加えたのち BPB 指示薬を加え，アンモニア水で中和する。この液をメスフラスコ 100ml に移し，水で定容にする。その適量を分液ろう斗にとり，以下 i) と同様の操作を行なう。

結果および考察

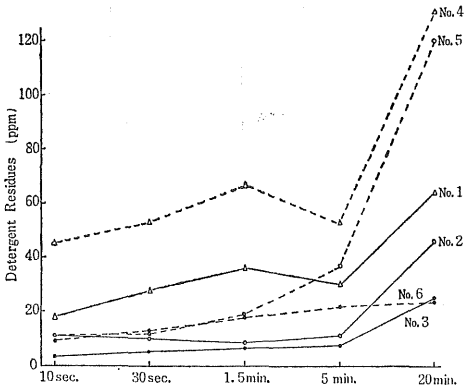
（Ⅰ）野菜および果物中の残留洗浄量について

実験の結果は次に示す通りである。

1，レタスを用いた時の浸漬時間の違いによる残留洗浄量……Table Ⅱ．Fig. 1

2，レタスを用いた時の水洗時間の違いによる残留洗剤量……Table Ⅲ．Fig. 2

3，イチゴを用いた時の水洗時間の違いによる残留洗剤量……Table Ⅳ．Fig. 3



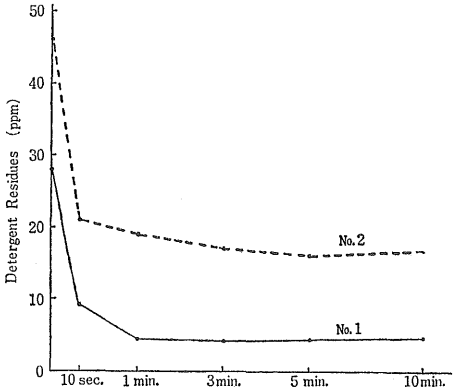
No. 1 0.2% Detergent Solution, 0 sec. rinse
No. 2 0.2% Detergent Solution, 10 sec. rinse
No. 3 0.2% Detergent Solution, 1 min. rinse
No. 4 0.6% Detergent Solution, 0 sec. rinse
No. 5 0.6% Detergent Solution, 10 sec. rinse
No. 6 0.6% Detergent Solution, 1min. rinse

Fig. 1 Detergent Residues with Difference of Soaking Time

Table II. Detergent Residues with Difference of Washing Time (Sample: Letuce The value is average of four tests)

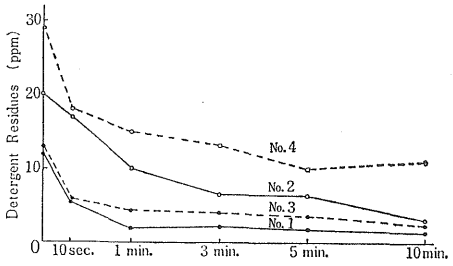
Washing Solution	Soaking Time	Rinsing Time (120ml/sec.) 0 sec.	10 sec.	1 min.
0.2% Detergent Solution	10 sec.	18ppm	11ppm	3.3ppm
	30 sec.	28	10	5.3
	1.5 min.	36	8.4	6.8
	5 min.	30	11	7.3
	20min.	64	46	25
0.6% Detergent Solution	10 sec.	45	11	9.2
	30 sec.	53	12	13
	1.5 min.	67	19	18
	5 min.	53	37	22
	20 min.	130	120	24

以上の結果，Fig. 1 より試料レタスのとき，0.2%および0.6%洗剤液とも，浸漬時間5分までは残留洗剤量は徐々に増加しているが，浸漬時間20分でその残留量は急激に増加している。そして1分の水洗で約25ppm，10秒の水洗では 0.2 %洗剤液の場合 46ppm，0.6 %洗剤液の場合 120ppm の高い残留洗剤が認められた。



No. 1 0.2% Detergent Solution, 30 sec. soak
No. 2 0.2% Detergent Solution, 5 min. soak

Fig. 2 Detergent Residues with Difference of Rinsing Time



No. 1 0.2% Detergent Solution, 30 sec. soak
No. 2 0.2% Detergent Solution, 5min. soak
No. 3 0.6% Detergent Solution, 30 sec. soak
No. 4 0.6% Detergent Solution, 5 min. soak

Fig. 3 Detergent Residues with Difference of Rinsing Time

Table III. Detergent Residues with Difference of Washing Time
(Sample: Letuce The value is average of four tests)

Washing Solution	Soaking Time	Rinsing Time (120ml/sec.)					
		0 sec.	10 sec.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.
0.2% Detergent Solution	30 sec.	28 ppm	9.1 ppm	4.4 ppm	4.1 ppm	4.4 ppm	4.5 ppm
	5 min.	46	21	19	17	16	17

Table IV. Detergent Residues with Difference of Washing Time
(Sample: Strawberry The value is average of four tests)

Washing Solution	Soaking Time	Rinsing Time (120ml/sec.)					
		0 sec.	10 sec.	1 min.	3 min.	5 min.	10 min.
0.2% Detergent Solution	30 sec.	12 ppm	5.3 ppm	1.9 ppm	2.2 ppm	1.9 ppm	1.3 ppm
	5 min.	20	17	10	6.4	6.3	3.1
0.6% Detergent Solution	30 sec.	13	5.7	4.3	4.0	3.6	2.7
	5 min.	29	18	15	13	9.8	11

また洗剤濃度による残留量の違いも認められ，浸漬時間5分では1分の水洗で0.2％洗剤液の場合約7 ppm，0.6％洗剤液の場合約20 ppmの残留洗剤が認められた。

Fig. 2より水洗時間を長くとったとき，0.2％洗剤液の場合浸漬時間30秒または5分のとき，1分の水洗でほぼ残留洗剤量は一定となり，その後の水洗でもあまり変化は認められない。そして浸漬時間30秒では約4 ppm，5分では約17ppmの洗剤が残留し，これらの洗剤は内部に浸透したものと考えられる。

Fig. 3より試料イチゴのとき，0.2％洗剤液の場合浸漬時間30秒では1分の水洗で，浸漬時間5分では3分の水洗でほぼ残留洗剤量は一定となり，その後の水洗でもあまり変化は認められない。そして浸漬時間30秒では約2 ppm，5分では約6 ppmの洗剤が残留し，これらの洗剤は内部に浸透したものと考えられる。

また0.6％洗剤液の場合浸漬時間30秒では1分の水洗で，浸漬時間5分では5分の水洗でほぼ残留洗剤量は一定となり，その後の水洗でもあまり変化は認められない。そして浸漬時間30秒では約4 ppm，5分では約10 ppmの洗剤が残留し，これらの洗剤は内部に浸透したものと考えられる。

なおこれまで報告されている川城ら[1]による野菜，果物中のハード型洗剤の残留量は例えば試料に白菜を用いたとき，浸漬時間10秒，24秒の水洗で1.4ppm，浸漬時間5分，24秒の水洗で12.6ppmの残留洗剤が認められている。実験条件の違いはあるが，浸漬時間10秒では本実験の方が高い残留洗剤が認められるが，5分ではあまり差が認められない。

（Ⅱ）農薬の洗浄除去効果について

上記の実験の結果はTable Ⅴ. Ⅵ. に示す通りである。

以上の結果，表より，水のみの洗浄と洗剤を用いた洗浄を比較した場合，上下振とうおよび手によるこすり洗いとも洗剤を用いた方が効果があり，その効果は約2倍であった。

また水のみによるこすり洗いと洗剤液による上下振とう洗浄は同程度の除去率で約45％であった。

次に洗剤濃度による除去率を比較した場合，手によるこすり洗いでは0.6％洗剤液（58.4％）にくらべ0.2％洗剤液（82％）の方が高い結果が得られた。

これは洗剤にはミセルの臨界濃度という活性剤のいろいろな物理あるいは化学的性質が急激に変化する濃度範囲があり，洗浄効果についてみるとソフト型ABSの場合約0.06％，ハード型の場合約0.15％の濃度が最適である。従って洗剤の使用濃度を高めても洗浄効果は上がらないいとう結果を示したものと思われる。

Table V. Removal of Copper from Apple by Washing

Shake-Washing

Washing Solution	Weight of Apple g	Removal: Washing Copper (a μg)	Washing %	1st rinse Copper (b μg)	1st rinse %	2nd rinse Copper (c μg)	2nd rinse %	Residues *1 after Washing Copper (d μg)	Residues *1 after Washing %	Total *2 Copper (e μg)	Total *2 Copper ppm	*3 Removal Efficiency %
Water Washing	336	16	16.3	6	6.1	0	0.0	76	77.6	98	0.29	22.4
	336	44	14.9	12	4.1	6	2.0	234	79.1	296	0.88	20.9
	Average	—	15.6	—	5.1	—	1.0	—	78.3	—	—	21.7
0.2% Detergent Solution Washing	344	65	24.8	15	5.7	10	3.8	172	65.5	262	0.76	34.4
	328	648	61.8	11	1.0	9	0.9	380	36.3	1048	3.20	63.7
	Average	—	43.3	—	3.4	—	2.4	—	51.0	—	—	49.0
0.6% Detergent Solution Washing	330	228	44.7	10	2.0	6	1.2	266	52.2	510	1.55	47.8

*1 The value obtained by brushing with 1/10N HCI solution added 0.2% detergent

*2 a + b + c + d

*3 a + b + c /e× 100

Table VI. Removal of Copper from Apple by Washing

Rub-Washing

Washing Solution	Weight of Apple g	Removal: Washing Copper (a μg)	Washing %	1st rinse Copper (b μg)	1st rinse %	2nd rinse Copper (c μg)	2nd rinse %	Residues *1 after Washing Copper (d μg)	Residues *1 after Washing %	Total *2 Copper (e μg)	Total *2 Copper ppm	*3 Removal Efficiency %
Water Washing	339	88	26.7	35	10.6	15	4.5	192	58.2	330	0.97	41.8
	337	66	30.1	26	11.9	12	5.5	115	52.5	219	0.65	47.5
	Average	—	28.4	—	11.3	—	5.0	—	55.3	—	—	44.7
0.2% Detergent Solution Washing	325	216	71.5	11	3.6	7	2.3	68	22.5	302	0.93	77.5
	329	1446	83.5	31	1.8	23	1.3	232	13.4	1732	5.26	86.6
	Average	—	77.5	—	2.7	—	1.8	—	18.0	—	—	82.0
0.6% Detergent Solution Washing	325	432	59.0	10	1.4	10	1.4	280	38.3	732	2.25	61.7
	326	74	41.6	16	9.0	8	4.5	80	44.9	178	0.55	55.1
	Average	—	50.3	—	5.2	—	2.9	—	41.7	—	—	58.4

*1 The value obtained by brushing with 1/10N HCI solution added 0.2% detergent

*2 a + b + c + d

*3 a + b + c /e× 100

なお，これらの洗浄除去率は末永らによる〝リンゴに附着するヒ素，鉛の洗浄試験〟の実験報告[4]（洗浄液が水道水の場合17～22%，0.25%洗剤液の場合36～50%）と比較すると同程度の除去率である。

むすび

合成洗剤が台所用洗剤として発売されて以来これまで急速に伸びてきたのは，その洗浄力とくに野菜や果

物に附着している寄生虫卵や農薬等の除去に効果があることにあった。しかし現在これらの汚染状況は東京都衛生局の調査でも明らかなように，寄生虫卵については46年度は93件中陽性なし，47年度は440件中鉤虫卵1件の陽性であり，また野菜，果物中の残留農薬については47年度，48年度は48件全てが検出せずまたは基準以下であった。

本実験の結果，野菜および果物の洗浄に台所用洗剤（ソフト型 ABS 系洗剤）を使用した場合，通常の使用方法でも4～10ppmの洗剤が残留し，さらに通常の使用方法より著しく逸脱して使用した場合，その2倍以上の洗剤が残留するものと思われる。

また農薬の洗浄効果も十分な水洗いを行なうことによってその目的は達せられるものと思われることなどを考慮すると，環境汚染がますます進行している現在，慢性毒性などがいまだ明らかにされておらず，しかも一般消費者から不安が訴えられている，ABS系洗剤を野菜や果物の洗浄に使用することの必要性は乏しいものと考えられる。

なお，本報は第51回東京都衛生局学会に発表したものである。

文　献

1) 川城　巌，岡田太郎，辰野　隆：食衛誌，3，392（1962）
2) 大場健吉：農化，39，508（1965）
3) 小野口邦夫：食衛誌，4，362（1963）
4) 末永泉二，斉藤晴彦：衛生化学，11，73（1965）
5) 出浦　浩：食衛誌，13，63（1972）

東京湾内底質中の PCB 量について

土屋悦輝* 小輪瀬 勉* 山崎堅吉*
松本浩一* 三村秀一*

POLYCHLORINATED BIPHENYLS LEVELS IN THE SEDIMENTS OF TOKYO BAY

Yoshiteru TSUCHIYA, Tsutomu KOWASE, Kenkichi YAMAZAKI, Kouichi MATSUMOTO, and Shuichi MIMURA.

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

PCBs are restrictedly used to closed systems as dielectrics in transtormers and capacitors. However extensive use of PCBs in paints, varnishes, waxes, and synthetic polymers may lead to direct contamination of environments through industrial waste water and sanitary dischage. Fishes are contaminated by PCBs in envirronments. As the physical properties of PCBs and the residues in fishes of PCBs clearly indicate that these materials are known to be markedly condensed (about one hundred time) following the progress of the food chain. Therefore the detection of PCBs contaminations in every natural environments are quite urgent problems.

Then authors detected PCBs, DDT and it's metabolites (DDE) in the sediments of Tokyo Bay which were collected 47 station on October 1971~February 1972. All samples were identified and measured by electron capture gas chromatography. PCBs, the sum of DDT and DDE were detected for all samples and residue levels were as followed;

	PCBs (ppm)	DDT+DDE (ppm)
Tokyo area	0.02 ~ 2.0	0.001 ~ 0.059
Kanagawa area	0.02 ~ 0.39	0.001 ~ 0.031
Chiba area	Tr ~ 0.10	Tr ~ 0.004

Concentrations of PCBs were mackedly higher than the sum of DDT and DDE in all sediments analyzed. PCBs, the sum of DDT and DDE contaminations of the sediments were highly found coastal environs, especially stations off large cities and industrial regions. Also those of all samples were contained similar Kanechlor— 600. It seems to result from paints of ships.

1. 緒 言

環境汚染物質であるポリ塩化ビフェニール (PCB) は自然界に広く分布するが，水中においては極めて微量のため検出するのは困難である。しかしその地点の底質を測定することによって汚染の状況を把握することができる。今回東京湾内の底質47地点について，PCB と有機塩素化合物である DDT とその代謝物の DDE について測定し汚染の状況を調査したので報告する。

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

2. 調査及び実験方法

2-1 試　料

1971年10月～1972年2月の間に一都二県公害防止協議会において採取した東京湾底質47試料で，その採取地点は Fig-1 に示す。江戸川から多摩川迄の間を東京側（T）10地点，多摩川以下を神奈川側（K）16地点，江戸川から湾の右側を千葉側（C）21地点である。

2-2 試　薬

n- ヘキサン；残留農薬分析用，及び市販試薬1級

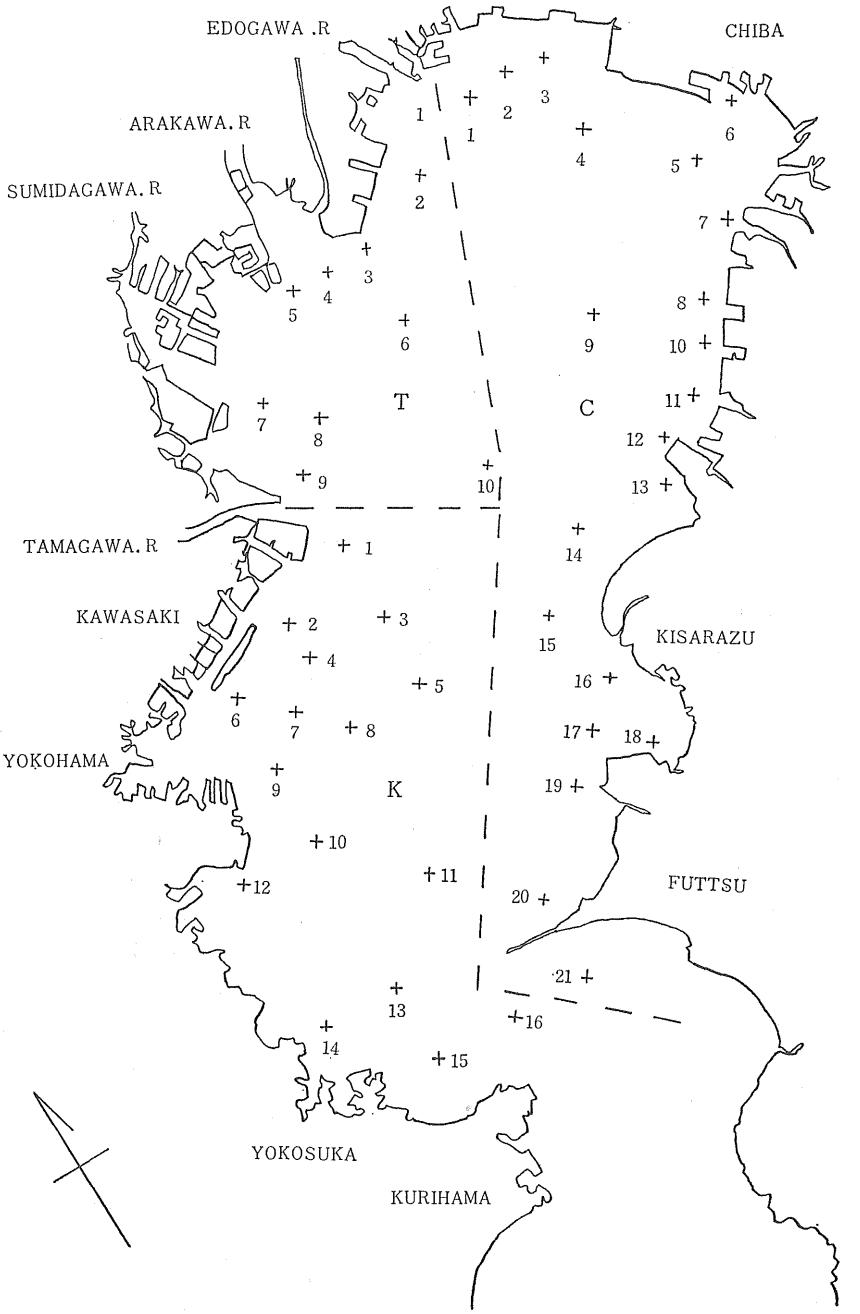


Fig 1. Sampling Station in Tokyo Bay

を亜鉛末を入れた全ガラス製蒸留器を用いて蒸留し，初留液を捨て 68～69°C の留分をとり，500倍濃縮して試料測定時と同一条件でガスクロマトグラフに入れ妨害ピークが現われないものを使用した。

ベンゼン；残留農薬分析用

エチルアルコール；残留農薬分析用

フロリジル；フロリジル P.R フロリジン社製。使用前に130°C，12時間以上活性化したものを使用。

活性アルミナ；和光純薬製，使用前450°C 6時間活性化したものを使用。

水酸化カリウム；市販試薬特級

無水硫酸ナトリウム；PCB 分析用

塩酸；市販試薬特級

酒石酸；市販試薬特級

五塩化アンチモン；PCB 分析用。

PCB 標準液；市販品 PCB KC- 300, 400, 500, 600 を使用時適当な濃度に正確に希釈し使用。

十塩化ビフェニール；和光純薬製，使用時，適当な濃度に正確に希釈し使用。

DDE 標準液；和光純薬製，使用時適当な濃度に正確に希釈し使用。

2-3 器具及び装置

Kuderna-Danish（K.D）濃縮器

アルカリ分解装置

カラムクロマト管

ガスクロマトグラフ装置；島津 5APFE形　島津 3BE形。

2-4 試験溶液の調製

底質中の PCB 分析法のフローシートを Fig 2 に示した。

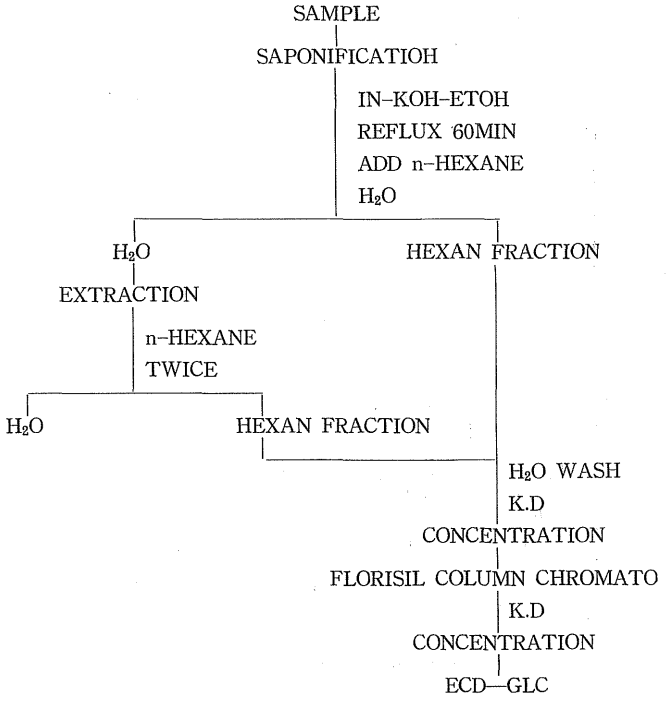


Fig 2. Flowsheet of PCB Analysis.

2-4-(1) 試料の前処理

湿潤状態の試料を適当にガラス板に取り，風乾し，ゴミ等を取除き乳鉢で細末化したもの10～40g を試験試料とした。

2-4-(2) アルカリ分解

試料をアルカリ分解装置に入れ，IN- 水酸化カリウム-エチルアルコール溶液 100m*l* を加え，60分間水溶上加熱還流する。放冷し 50°C 附近になったら，n- ヘキサン 50m*l* を加え，n- ヘキサンと水層を分け，水層を n- ヘキサン 25m*l* で2回抽出する。n- ヘキサン溶液を合せて，水 100m*l* で洗浄したのち，無水硫酸ナトリウムで脱水して KD 濃縮器で 1 m*l* に濃縮する。

2-4-(3) クリーンアップ

活性化フロリジル PR 5 g を径 1 cm のクロマト管

に充塡し先の濃縮液を加え n- ヘキサンで展開し流出液 80m*l* を取り，これを濃縮し 1 m*l* とする。

2-4-(4) PCB, DDE の定量

PCB の場合は試料液を GC に注入し，得られたガスクロマトグラムから，標準 PCB, KC-300～600 を組合せ Fig-3a, 3b のごとく試料と類似したパターンを作り，ピークの高さの総和から検量線を作り定量した。又DDT, DDE はアルカリ分解によってDDTをDDE

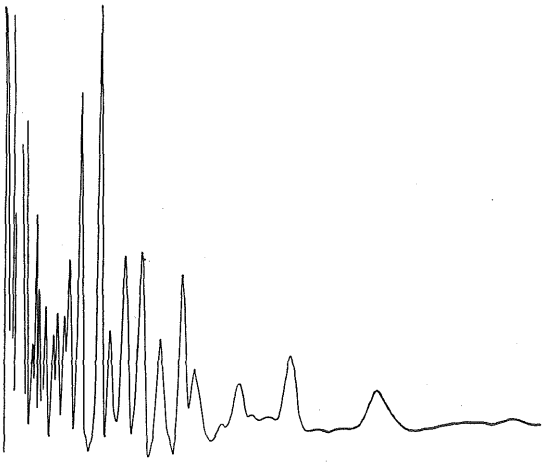


Fig 3a. Gas Chromatogram of PCB in Sediment of Tokyo Bay.

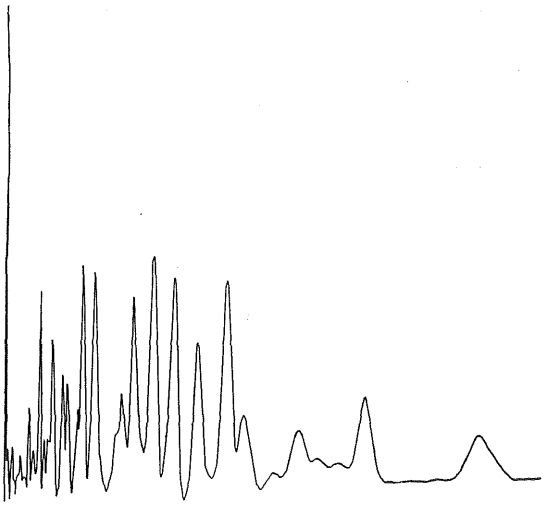


Fig 3b. Gac Chromatogram of St. PCB by Combinations.

としピークの高さから検量線を作り DDE を測定した。

2-4-(5) ガスロクマトグラフィーの条件

機種　島津 5APFE

検出器　ECD ^{3}H

充塡剤　1.95% QF-1+1.5% OV-17

Chromosorb WAW HMDS 80～100メッシュ

カラム　ガラスカラム　ϕ3mm×1m

カラム温度　180°C

検出器温度　220°C

注入口温度　230°C

キャリアーガス N_2 40m*l*/min

3. 調査結果及び考察

結果を Table 1 に示した。東京側では PCB が0.02～2.0ppm の範囲で，最高値（2.0ppm）が検出された地点（station-5）は荒川，江戸川の河口附近である。DDE は 0.001～0.059ppm の範囲で検出された。これは PCB と比較して約 1/10 低値を示している。DDE 0.059ppm が今回の調査の最高値であった。神奈川側

Table .I Concentration of PCB and DDT+DDE in Sediments of Tokyo Bay

Sampling Station	Date (D-M-Y)	Depth (m)	Wight (g) Dry Base	Mixture of PCB KC-300 : 400 : 500 : 600	Residues of PCB (ppm)	Residucs of DDTs (ppm)
T- 1	15-11-71	8.0	14	2 1 1 0.4	0.03	0.001
- 2	〃	9.9	30	2 1	0.08	0.004
- 3	〃	7.1	25	2.5 1 0.3	0.16	0.001
- 4	〃	7.0	11	2.5 1 0.3	0.69	0.007
- 5	9- 2-72	6.6	14	1.5 1 0.3	2.0	0.059
- 6	〃	15.0	16	1 1 0.2	0.02	0.002
- 7	15-11-71	10.0	15	1.5 1 0.3	1.08	0.029
- 8	9- 2-72	17.5	16	1 1 0.2	0.07	0.006
- 9	4-10-71	15.5	15	1 1 0.1	0.05	0.01
- 10	9- 2-72	25.0	16	1 1 0.2	0.02	0.003
K- 1	15- 2-72		14	1 1 0.1	0.39	0.013
- 2	〃		18	1 1 0.1	0.24	0.015
- 3	4-10-71		18	1 1 0.2	0.03	0.005
- 4	〃		15	1 1 0.1	0.07	0.007
- 5	〃		30	1 1 0.2	0.02	0.001
- 6	〃		19	2 1 1 0.4	0.15	0.005
- 7	〃		25	1 1	0.15	0.031
- 8	〃		20	1 1 0.2	0.04	0.004
- 9	〃		25	1 1 0.2	0.08	0.005
- 10	〃		25	1 0.5 0.2	0.06	0.003
- 11	〃		25	1 1 0.2	0.05	0.002
- 12	〃		25	1 1 0.2	0.11	0.006
- 13	15- 2-72		40	1 1 0.5	0.03	0.003
- 14	18-10-71		28	1 0.4 0.2	0.04	0.012
- 15	〃		20	1 0.5 0.2	0.03	0.002
- 16	〃		25	1 0.5 0.2	0.02	0.002
C- 1	15-11-71	2.0	40	1 1	0.01	Tr
- 2	〃	5.2	30	1 0.5 0.2	0.05	0.001
- 3	〃	5.5	40	2 0.5 0.1	0.03	0.001
- 4	13-10-71	10.0	23	2 1	0.01	0.003
- 5	〃	12.0	27	1 0.2 0.5	0.02	0.001
- 6	〃	18.0	13	1 1.5 0.5 0.2	0.10	0.002
- 7	〃	11.0	25	1 0.5 0.5	0.06	0.002
- 8	〃	14.0	20	1 0.4 0.2	0.01	Tr
- 9	9- 2-72	18.5	12	1 1 0.5	0.01	0.002
- 10	13-10-71	21.0	19	1 0.4 0.2	0.04	0.002
- 11	〃	18.0	14	1 0.4 0.2	0.05	0.004
- 12	〃	18.0	25	1.5 0.5 0.2	0.01	Tr
- 13	〃	2.5	45	2 1 0.5 0.3	0.01	Tr
- 14	〃	16.0	30	1.5 0.5 0.2	0.02	0.003
- 15	〃	20.2	27	1 0.5 0.2	0.06	0.003
- 16	〃	9.6	30	1 0.5 0.2	0.02	0.001
- 17	〃	8.6	30	1 2 0.5 0.2	0.03	0.001
- 18	〃	13.5	30	1 0.4 0.2	0.02	0.001
- 19	〃	13.2	35	2 1 0.5 0.3	0.04	0.001
- 20	〃	6.4	30	1 0.4 0.2	0.02	0.001
- 21	13-10-71		30	1 1	Tr	Tr

ではPCB 0.02～0.39ppmの範囲で検出され，DDEでは0.001～0.031ppmの範囲であった。千葉側ではPCB Tr～0.10ppmの範囲で，DDEはTr～0.004 ppmの範囲で検出され，東京，神奈川と比較してPCB, DDEとも低値を示した。検出されたPCBの種類はKC-300, 400, 500, 600のパターンであった。KC-600のパターンは大部分の地点で検出されたが，東京側でPCB量が多い地点ではKC-600が記入されていないが，これは標準PCBを組合せるのにKC-600の比率が他のPCBより低すぎるため試料調製で添加しなかったためであり，実際には検出されている。全般的に東京湾内のKC-600汚染は同一水準であり，この原因

は船舶の塗料に起因するものと考えられる。KC-400，500 は全試料から見出された，そして KC-300 は PCB 量が高い所で見出され。低いところでは検出されなかった。これは KC-300主成分が低塩化物であり環境中で分解，揮散していることも原因の１つと考えられる。又測定結果を図式にまとめたものが Fig 4.5 である。

この図から東京湾全体の汚染を見ると PCB は沿岸附近が高く，湾の中心部に行くにしたがって低値を示している。これは，PCB の性状などから，河川，沿岸からの汚染が広く拡散されないものと思われる。又東京，神奈川側での PCB 量が高く，千葉側では低い。この原因の１つとして，東京，神奈川側と千葉側の人

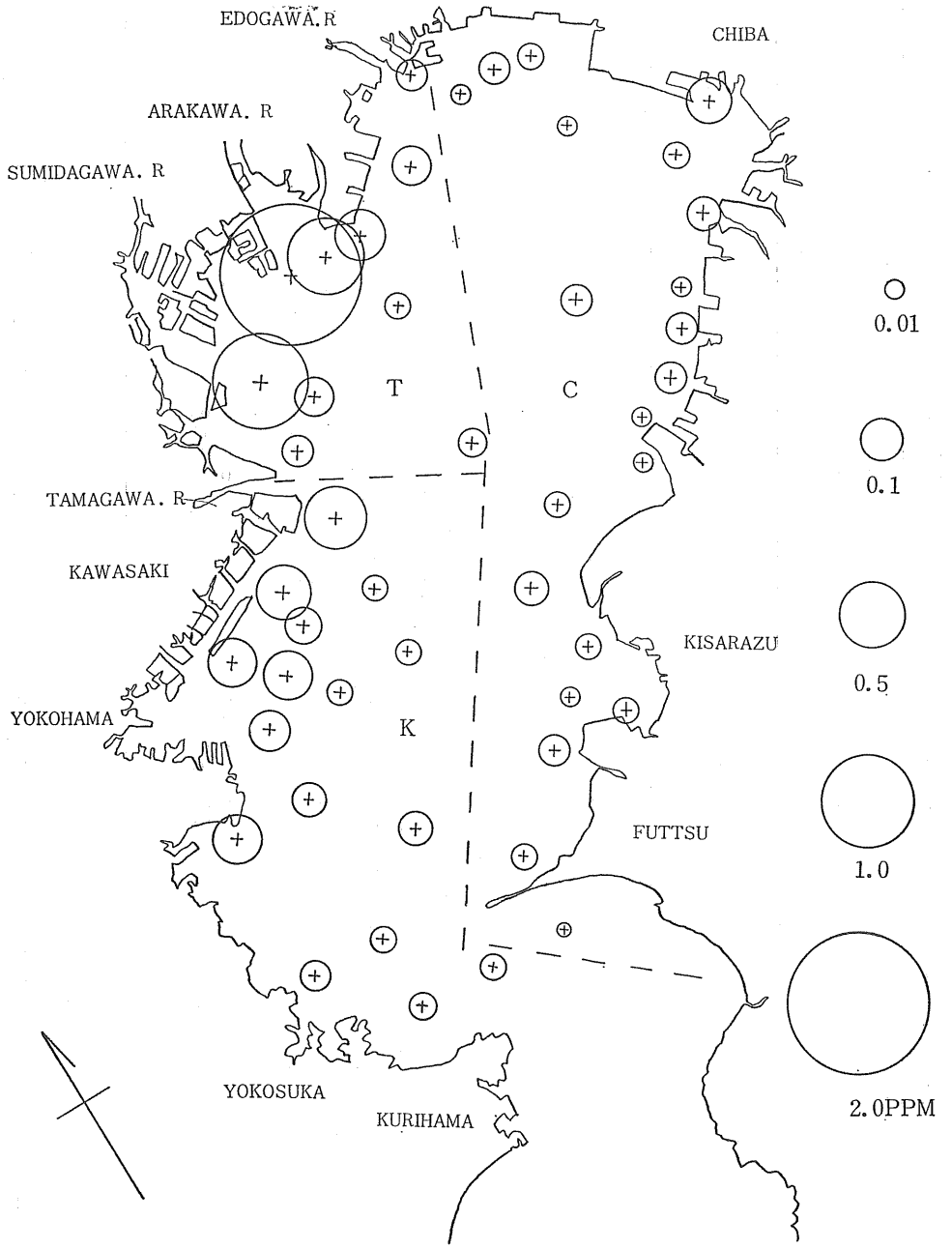


Fig 4. Concentration of PCB in Sedimets of Tokyo Bay.

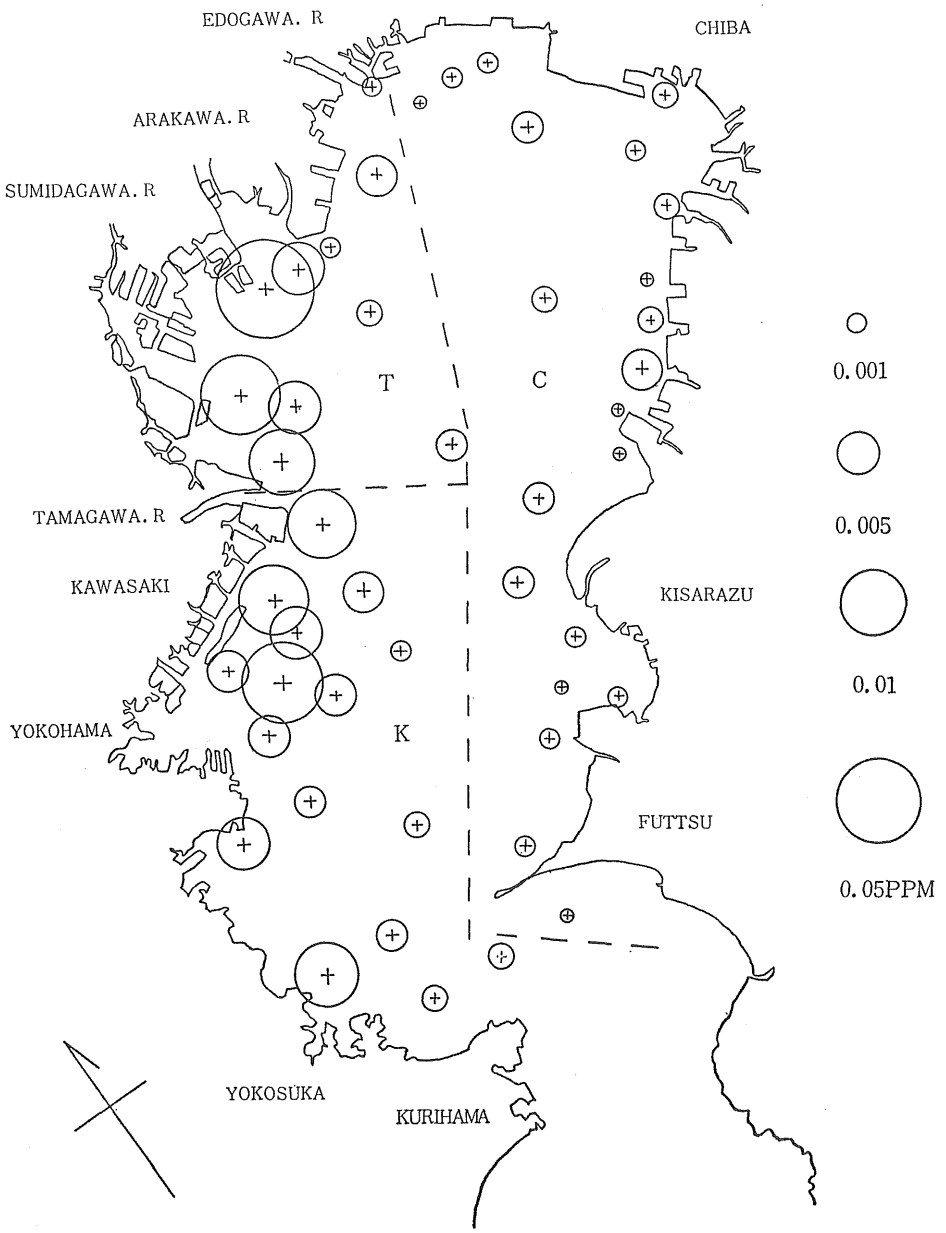


Fig 5. Concentration of DDT+DDE in Sediments of Tokyo Bay

口的比率によるもので，開放系に使用されている PCB の汚染が少ないためと思われる。又同時に千葉側では工業地帯が少なく，比較的新しいものであるのに比較して，東京，神奈川は京浜工業地帯として，閉鎖系，開放系の PCB 製品が長い間使用され，これが汚染につながったと思われる。今回の調査では河口附近の調査地点は0.5～1.0km であり，河川の流入による影響，湾内の潮流による PCB の影響についてもはっきりしない。いままでに報告されている他の海底質中の PCB 量と比較してみると（瀬戸内海0.1～1.0ppm，有明海 0.04～0.18 ppm，田子の浦 203～442 ppm，高砂西港 0.17～238.9ppm）例外的な場所を除くと東京湾の汚染は進んでいると考えられる。

DDT+DDE についても PCB と同様な汚染状況を示

し，PCB と比較して 10/1 程度低値であり，PCB の汚染の方が進んでいる。

4. 十塩素化法による低質中の PCB 測定

底質中の PCB は低塩化物が分解，揮散したりして必ずしも標準 PCB の組合せによって試料と同様なパターンを作ることが困難な場合が多いので十塩素化法について検討した。十塩素化の方法を Fig-6 に示した。

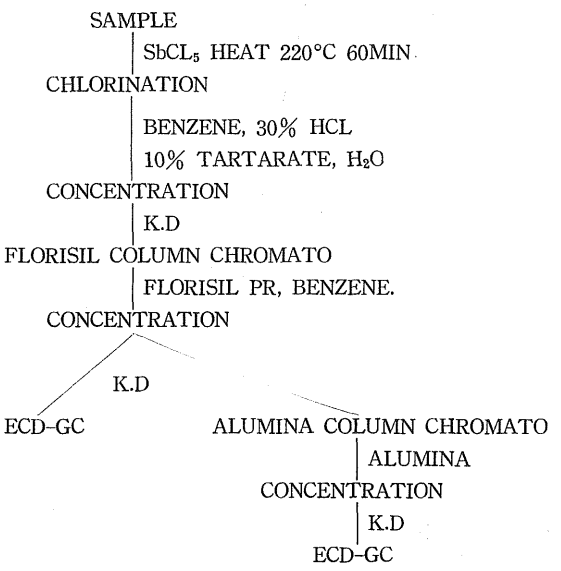


Fig 6. Flowsheet of PCB Analysis by Chlorination.

4-1 五塩化アンチモンによる十塩化法

径 1 cm×25cm のガラス管の一端を封じたものに試料液を入れ，50°C 以下で N_2 ガスを吹きかけ溶媒を蒸発させた後，五塩化アンチモン 0.5m*l* を加えてガラス管を溶封し，220°Cで60分加熱する。冷後注意しながらガラス管の一端を切り，ベンゼン 50m*l* で内容物を完全に分液ロート中に洗い込む。つづいて30%塩酸30m*l*，10%酒石酸溶液25m*l* ずつ 2 回，水25m*l* で順次洗浄する。これを無水硫酸ナトリウムで脱水し濃縮する橙赤色を呈しこれを塩酸，酒石酸で洗浄することによって無色となるが，今回の東京湾の底質試料では全部黄色～褐色を呈した。このガスクロマトグラムは，十塩化ビフェニールのピークの前に大きなピークが出現し，時には十塩化ビフェニールのピークと重なることがあり，このような試料はガスクロマトグラフ検出器，カラム充塡剤の汚染を招く，(Fig-7) この原因は底質中に存在する石油系炭化水素などいわゆる鉱油類による影響と思われる。(昭和48年度日本海洋学会において日向野らは東京湾内底質中に石油系炭化水素は40～1200ppm含まれていることが報告されている)。そこで従来からのフロリジルシリカゲルクロマトグラフィーによるクリーンアップでは完全に鉱油類を除去することは難かしい。筆者等は十塩素化を行なった後に，次に示すようなクリーンアップ法を検討し極めて良好な結果が得られた。

4-2 クリーンアップ

4-2-(1) フロリジルカラムクロマトグラフィー，活性化したフロリジル PR 25g を径 2 cm のクロマト管に充塡して，ベンゼンを展開溶媒とし標準十塩化ビフェニール 10μg を入れ，10m*l* ずつ流出画分を取り，これを GC に入れ，流出画分を求めた。(Fig-8) これによると 0～30m*l* では流出してこない。その後 50m*l* で十塩化ビフェニールが流出してくる。このことから試料については最初の 30m*l* を捨て後の 50m*l* を取りこれを試料液とする。十塩化ビフェニールの前に出現するピークは最初の 30m*l* に出て来るものが多く，呈色物も大部分除去できる。しかしこの段階でもなお濃縮液が黄色を呈する場合はさらに次のクリーンアップを行なう。

4-2-(2) アルミカラムクロマトグラフィー，活性化したアルミナ 10g を径 2 cm のクロマト管に充塡してベンゼンを展開溶媒とし，標準十塩化ビフェニール 10μg を入れ，ロフリジルクロマトと同様に処理し流出画分を求めると，最初から 30m*l* 迄に流出して来る。

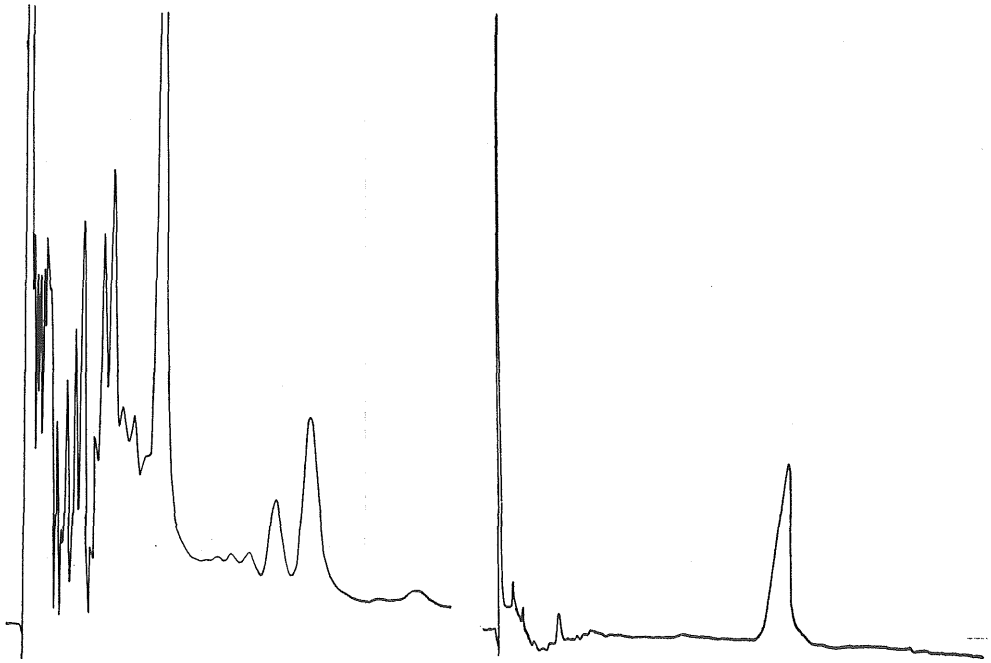


Fig 7. Gas Chromatogram of DCB (A) Before Florisil Chromatography (B) After Florisil Chromatography.

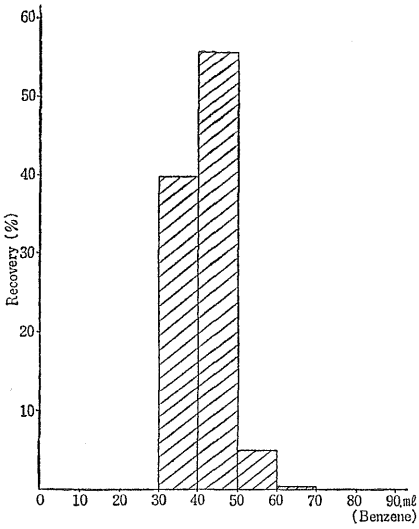


Fig 8. Histogram of eluted DCB by Floriil column Chromatography

又呈色物を良く吸着し除去できた。試料については初流出液から 30m*l* 迄の流出液を取り試料液とする。

4-3 十塩素化による総 PCB 量の定量

4-3-(1) ガスクロマトグラフィーの条件

機種　島津 3BE

検出器　ECD ^{63}Ni

充塡剤　2％ SE-30 Gaschrom Q
60～80メッシュ

カラム　ガラスカラム　ϕ3 mm×1.2m

カラム温度　200°C

検出器温度　200°C

注入口温度　250°C

キャリアガス　N_2 0.8Kg/cm^2

4-3-(2) 十塩化ビフェニールから総 PCB 量の換算，試料濃縮液を GC に入れ得られたガスクロマトグラム上の十塩化ビフェニールのピーク高に測定し，検量線から十塩化ビフェニール量を求め下式によって総 PCB 量を求める。

$$\text{総 PCB 量 (ppm)} = A \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1}{\text{試料 (g)}} \times \frac{154.2}{498.2} \times \frac{100}{50}$$

A；検量線から得られた試料注入量中の十塩化ビフェニール量 (ng)

V_1；試料溶液の全容量 (ml)

V_2；GC に注入した試料溶液の容量 (μl)

154.2；ビフェニールの分子量

498.7；十塩化ビフェニールの分子量

$\frac{100}{50}$；厚生省の分析法に従い PCB の塩素含有量を50%とし$\frac{100}{50}$を乗ずる。

4-4 十塩化ビフェニールによる総 PCB 量の測定結果

底質中の PCB の測定値を十塩素化法とピークパターン法とを比較すると，ほとんどの試料は十塩素化法の方が値が高く検出された。これは他の試料（魚，鳥，人体脂など）の場合と比較して逆の結果を生じた。底質を十塩素化した場合に十塩化ビフェニールと同一保持時間を示す妨害物が存在することが考えられる。その一つにビフェニールによる妨害がある°（ビフェニールは PCB と同様に熱媒体として使用されており，又果物の防腐剤として使用されている。これらのビフェニールが環境中に存在すると考えられる。）

4-5 PCB とビフェニールの分離の検討

ビフェニールの除去を目的として，十塩素化を行う前の段階で PCB と分離をするために，シリカゲル（WaKogel S-1，WaKogel Q-23，メルク製など）を用い，含水量を変え，シリカゲルの活性度を種々変化させ検討した。完全な分離は出来なかったが大部分除去できた。

4-5-(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィー，活性化したシリカゲル(WaKogel Q-23) 3 g を径 1 cm のクロマト管に充塡 n-ヘキサンを展開溶媒として PCB (KC-300,600) とビフェニールを用い流出液を 10m*l* ずつ取り流出画分を求めた。その結果 PCB は 20～100ml の間に流出し，ビフェニールは90m*l* 以後に流出した。ここでビフェニール 1 mg を取りシリカゲルクロマトグラフィーを行ない PCB の流出画分（20～100m*l*）を取り，十塩素化を行なったところ，十塩化ビフェニールとして検出されなかった。これはビフェニールが昇華性物質であることから，ガラス管中において溶媒を蒸発させる時に共に気散したものと思われる。試料をシリカゲルクロマトを行ない PCB の流出画分を取り濃縮した。

4-5-(2) ビフェニール除去後の十塩素化による総 PCB 量の測定結果。

ピークパターン法，十塩素化した方法の結果を，Tablc Ⅱ に示した。これらを比較すると十塩素化した値では，いずれもシリカゲルを通した試料が低値を示し，ピークパターン法と近い値を示すものが多いが，しかし 3 倍以上高値を示すものもある。この原因はほとんど分離できても残ったビフェニールがガラス管中で溶液を蒸発させる際試料中に鉱油が存在することからビフェニールが揮散されずに残っている為と，考えられる。又ビフェニール以外の妨害物質が除去されないで残っていると考えられる。このとから現在のところ，クリーアップによって，鉱油，ビフェニール，その他妨害物質を完全に分離する方法を検討しないと，底質など環境試料中の PCB を十塩素化法によって定量することは信頼性が低く危険である。

Table II. Comaparison of PCBs Analytial Methods.

SAMPLE NO.	PATTERN (PPM)	CHLORINATION	
		FLORISIL COLUMN(PPM)	SILICAGEL COLUMN(PPM)
1	0.03	—	0.02
2	0.04	0.05	0.03
3	0.05	—	0.07
4	0.05	0.16	0.10
5	0.05	0.03	0.03
6	0.06	0.16	0.08
7	0.07	0.23	0.21
8	0.08	0.18	0.08
9	0.15	0.57	0.13
10	0.39	0.96	0.60
11	1.11	—	1.02
12	2.0	2.15	1.35

5. 結　論

東京湾内の底質47試料について PCB，DDT+DDE を測定した結果全ての試料から検出された。PCB 値は Tr～2.0ppm，DDT+DDE は Tr～0.059ppm の範囲であった。PCB では湾の沿岸附近で高く中心部に行くにつれ低値を示した。地域的には千葉側で低く，東京，神奈川側の大都市附近に高く，特に工業地帯附近が高値を示した。これは工場で使用されている PCB が何らかの形で海洋に流出し汚染したものと推定される。DDT+DDE も PCB と同様な汚染状況を示している。しかしその汚染は1/10程度低値を示した。有機塩素化合物では PCB による汚染が進んでいると思われる。十塩素化法によって PCB 量を求める方法は妨害物質を完全にクリースアップし除去しないと，底質中の PCB 量を求める方法として適応できない。

本研究の概要は日本薬学会第93年会で発表した。

文　献

1. Holden, A.V.：Nature, 228, 1220 (1970)
2. Duke, T. W., Lowe, J.I., and Wilson, JR, A.J.,

：Bull. Environm. Contam. & Toxic.：5，171（1970）
3. 厚生省環境衛生局 PCB 分析研究班：分析方法に関する研究（1972）
4. 脇本忠明，立川涼，小川恒彦：公害と対策，7，517（1971）
5. 日向野良治，田口広，春戸義郎：昭和48年度，日本海洋学会春季大会講演要旨集（1973）
6. 水谷民雄：食品衛生研究，22，765（1972）
7. 水谷民雄，松本正義：食衛誌，13，398（1972）

し尿浄化槽、団地排水処理場放流水の BOD と TOC の相関に関する研究

岡本　寛*　笹野英雄**　山崎堅吉*
三村秀一*

STUDIES ON THE CORRELATION BETWEEN BOD AND TOC OF EFFLUENT IN SEPTIC TANKS AND IN SEWAGE TREATMENT PLANTS OF PUBLIC HOUSING AREAS

Yutaka OKAMOTO,* Hideo SASANO,** Kenkichi YAMAZAKI* and Shuichi MIMURA*

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Health, Tokyo Metoropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

BOD or COD has been used as an index expressing organic matters in waste water. However, it takes long times to measure BOD or COD, so that this measurement can't be said to be sufficient as an index of pollution by organic matters. Total organic carbon analyzer has recently been developed. Resultantly, we have come to be able to measure TOC simply and rapidly by means of the above instrument. TOC has been taken notice of as a substitute of BOD.

We have been researched BOD and TOC of effluents in septic tanks and sewage treatment plants of public housing areas. As the result of the above, we have known that there is a correlation between BOD and TOC.

I 緒　言

水質汚濁の主要な原因として，人間の生活活動や産業活動から排出される有機化合物がある。これらの有機化合物による汚染を表現する指標として BOD 又は COD が用いられてきた。

BOD は通常20°C で5日間ふ卵し，その間に生物により消費される溶存酸素量を以って表わす。このため測定に長時間要し，又有機化合物の種類により同化されやすい物と同化され難い物がある為有機化合物の絶対量を示さない。COD は酸化剤を用いて有機化合物を分解し，その反応によって消費された酸化剤の量を以って表わす。この為 BOD に影響しない無機化合物をも酸化し，又有機化合物の種類により酸化率が異なるので有機化合物の絶対量を示すとはいえない。

このように BOD, COD は有機化合物の直接的な指標でないこと，又殊に測定に長時間を要する為，排水の管理上短時間で知るには不都合である。

最近 Van Hall and Stenger により全有機炭素分析装置が開発され，水中の全有機炭素（TOC）が比較的簡単にかつじん速（数分間）に測定できるようになり，BOD に代わる有機汚染指標として TOC が注目されつつある。この方法は BOD や COD に比較して，ほぼ完全に有機化合物を分解する為，有機化合物の絶対的指標となる。

この為筆者らはし尿浄化槽の放流水，団地排水処理場の放流水について BOD と TOC を測定し，その相関

＊東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
＊＊東京都立衛生研究所多摩支所

を求めたところ良好な結果を得たので報告する。

Ⅱ 実験方法

1 実験材料

都内一般家庭のし尿浄化槽放流水及び都内団地排水処理場の放流水を用いた。

し尿浄化槽放流水	試料数 32
団地排水処理場の放流水	試料数 33

2 装置

ベツクマン915A型全有機炭素測定装置

（原理）装置は高温燃焼管と低温燃焼管を有する本体と非分散型赤外分析計，記録計及びキャリアガス用の酸素ボンベからなる。高温燃焼管は950°Cに加熱保持されており，内部にコバルト酸化物を含むアスベストが充てんされている。低温燃焼管は150°Cに加熱保持されており，85％リン酸で潤した石英片が充てんされている。装置のフローシートを図1に示す。

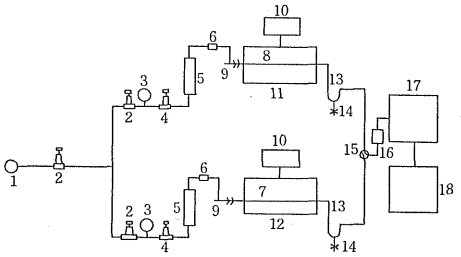


Fig. 1 Schematic diagram of total orgamic carbon analyzer

1.O_2supply 2.Pressuure regulator 3.Pressure gauge 4.Needle valve 5.Flowmeter 6.Check valve 7.Total carbon combustion tube 8.carbonate evolution tube 9.Syringe adapter 10.Controling pyrometer 11.Carbonate-carbon furnace 12.Total carbon furnace 13.Air condenser. 14.Stopcock 15.Four-way stopcock 16.Filter. 17.Infrared analyzer 18.Recorder

高温燃焼管では注入された試料中の有機炭素が酸化コバルト触媒により炭酸ガスになり，生じた炭酸ガスを非分散型赤外分析計で測定する。又この条件では同時に無機炭素も炭酸ガスになる為測定値は全炭素（TC）である。低温燃焼管では注入された無機炭素（炭酸塩と炭酸ガス）がリン酸により炭酸ガスになり，生じた炭酸ガスを非分散型赤外分析計で測定する。この条件（150°C）では有機物は分解されない為測定値は無機炭素（IC）である。全炭素と無機炭素の差より全有機炭素（TOC）を求める。

3 実験操作

3-1 BOD（生物化学的酸素要求量）の測定法

工場排水試験法（JIS KO102）による希釈法に準拠し，検水を酸素消費率が40～70％になるように適宜希釈して20°C 5日間ふ卵し，その間に消費される溶存酸素を測定してBODを求める。溶存酸素の測定は紫田—ミラー変法により定量した。

3-2 TOC（全有機炭素）の測定法

し尿浄化槽の放流水の場合はA法及びB法によって，団地排水処理場の放流の場合はB法によって測定した。

3-2-1 A 法

試料をホモジナイズした後，マイクロシリンジで試料20μlを高温燃焼管に注入してTCを測定し，次に試料20μlを低温燃焼管に注入してICを測定し，その差らかTOCを求める。

別に同時にフタル酸水素カリウム溶液（フタル酸水素カリウム2.125gを無炭酸蒸留水に溶かし，1000mlとする。1000ppmC溶液）を用いてTC測定用の検量線を，炭酸塩・重炭酸塩溶液（無水炭酸ナトリウム4.404gと炭酸水素ナトリウム3.497gを無炭酸蒸留水に溶かし1000mlとする。1000ppmC溶液）を用いてIC測定用の検量線を作成する。

3-2-2 B 法

先ず予備試験として標準物質（酢酸，ブドウ糖，デン粉，グルタミン酸，尿素，エチレンジアミン四酢酸ニナトリウム，P-トルイジン）の水溶液について，無機炭素除去法を検討した結果，無機炭素は完全に除去でき，A法とB法とによって得たTOCの結果は一致したので，次の方法を採用した。

試料を塩酸（1＋2）を用いてpHを2～3に下げた後，ホモジナイズし，更に窒素ガスで3分間バブリングを行ない，試料中のICを炭酸ガスとして除去した後，TCを測定し，それをTOCとする。

し尿浄化槽放流水の場合は20μlを，団地排水処理場の場合は50μlを試料として用いた。検量線はA法に準じてTC測定用の検量線を用いた。

Ⅲ 結果及び考察

1 し尿浄化槽放流水のBOC，TOC

し尿浄化槽放流水のBOD，A法によって測定したTOC，及びB法によって測定したTOCを表1に示す。

1-1 A法によってTOCを求めた場合

TOCとBODの相関を図2に示した。図2によればTOCとBODの相関係数は0.85で回帰直線はTOCに対するBODの回帰の場合がBOD＝1.24TOC－24.07と

Table I Water quality of effluents in septic tanks

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BOD (ppm)	9	59	89	78	33	12	312	355	83	184	99	52	11	9	67	51
TOC (ppm) A method	18	101	73	105	105	52	210	230	70	142	88	78	32	23	47	43
TOC (ppm) B method	10	35	35	58	41	30	201	234	55	119	85	46	28	22	39	32
Volatile Organic carbon	8	66	38	47	64	22	9	—	15	23	3	32	4	1	8	11

Sample No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
BOD (ppm)	68	9	142	89	45	73	78	28	54	86	30	185	73	73	49	41
TOC (ppm) A method	56	35	161	80	88	81	84	62	116	104	32	184	21	58	137	23
TOC (ppm) B method	53	35	92	41	43	50	49	24	38	56	27	150	22	43	84	26
Volatile organic carbon	3	0	69	39	45	31	35	38	78	48	5	34	—	15	53	—

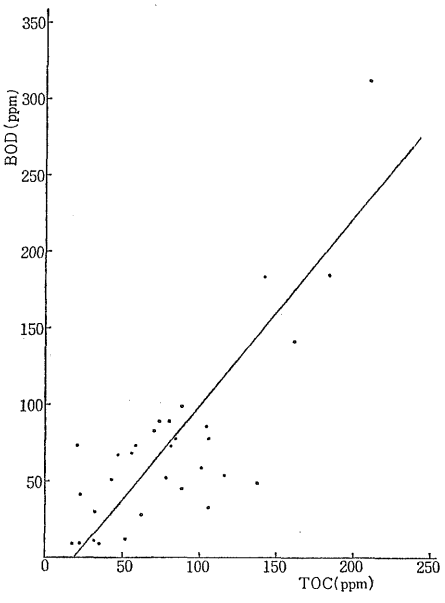


Fig. 2 Correlatin between BOD and TOC (measued by method A) of effluent in septic tanks

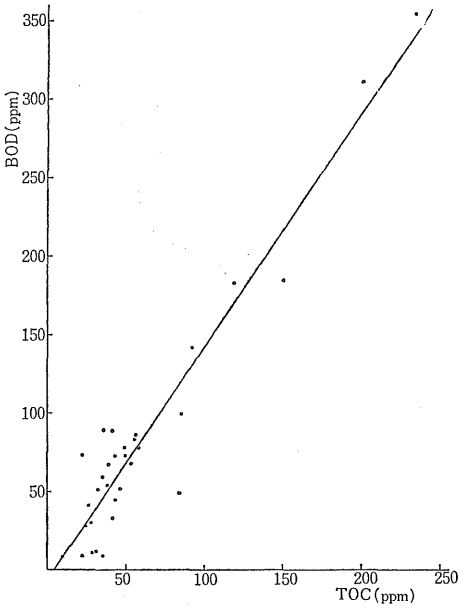


Fig. 3 Correlation between BOD and TOC (measured by meteod B) of effluent in septic tanks

なった。

1-2　B法によってTOCを求めた場合

TOCとBODの相関を図3に示した。図3によればTOCとBODの相関係数は0.95で，回帰直線はTOCに対するBODの回帰の場合がBOD＝1.49TOC－6.31となった。

表1によるとし尿浄化槽放流水中には塩酸酸性で窒素ガスでバブリングすることにより，揮発する有機化合物がかなり多く含まれていることが認められ，B法では水中の全有機炭素を正確に測定できないことが判った。

然しB法でTOCを測定した場合の方がA法でTOCを測定した場合より，TOCとBODの相関が強かったのは，塩酸酸性で窒素ガスでバブリングすることによりBODに関与しない揮発性有機化合物が除去された為と推定できる。

2　団地排水処理場の放流水のBOD，TOC

団地排水処理場の放流水のBODとTOCの測定結果を表2に示した。TOCとBODの相関を図4に示す。図4によればTOCとBODの相関係数は0.86で，し尿浄化槽の放流水に比べ相関係数が悪いが，これはTOC，BOD共に低い値であった為測定値がばらついた為と思われる。回帰直線はTOCに対するBODの回帰の場合がBOD＝0.95TOC－3.27となった。

Table II　Water quality of effluents in sewage treatment plants in public housing areas

Samle No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
BOD (ppm)	6.3	13.3	8.0	6.6	5.5	5.0	5.0	5.3	9.9	4.8	5.0	9.9	13.2	9.2	8.4	6.1	6.6
TOC (ppm)	12.3	18.0	12.1	12.8	10.8	8.6	9.3	9.6	12.4	9.6	9.6	12.1	15.8	11.4	11.7	10.1	10.5

Samle No.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
BOD (ppm)	5.2	9.4	10.6	4.4	4.7	8.6	4.3	6.7	8.2	10.4	11.4	10.6	5.7	5.7	10.0	7.5	
TOC (ppm)	7.8	11.9	11.9	9.5	9.1	14.5	8.9	8.1	13.0	14.6	13.8	13.9	11.4	8.7	12.0	11.8	

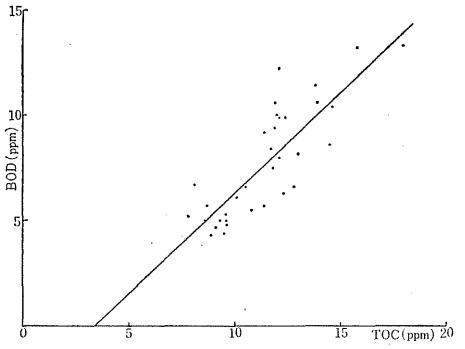


Fig. 4　Correlation between BOD and TOC of effluent in sewage treatment plants of public housing areas

3　B法の検討

試料水中の無機炭素除去の為，試料を塩酸酸性にして窒素ガスでバブリングしたが，標準物（酢酸，ブドウ糖，デン粉，グルタミン酸，尿素，エチレンジアミン四酢酸ニナトリウム，P－トルイジン）について検討した。

無機炭素50ppm含む水溶液に標準物質を炭素量として約50ppmになるように加えA法及びB法によってTOCを測定した。結果を表3に示す。無機炭素除去操作により有機炭素の損失はなく，且つ無機炭素は完全に除去できた。然しVan. Hallらは揮発性炭化水素

Table III　Determination of TOC in solutions of standard substaces by method A and by method B

Sulstance	Acetic acid	Glucose	Starch	L-Glutamic acid	Urea	EDTA	P-toluidine
TOC (ppm) A methed	44.8	47.8	43.1	50.0	51.4	49.1	41.6
TOC (ppm) B method	44.4	47.4	43.7	49.2	51.0	48.9	41.5

化合物，トルエン等はかなり損失することを確かめている。

Ⅳ 結　　論

水質汚濁が社会問題となっている現在，その規制もますますきびしいものとなると同時に試験する検体数も増加している。この様な routine work を能率化する為に，し尿浄化槽の放流水と団地排水処理場の放流水について，BOD と TOC の相関を求めた。その結果相関係数はかなり高く，TOCをBOD試験のスクリーニングテストとして用いることが可能である。

文　献

1）萩原耕一：BOD試験法解説，績文堂，東京，(1969)
2）Dobbs. R. A, and Williams. R. T.: Anal. Chem., 35, 1064 (1963).
3）Hall. C. E, Safranko. J, and Stenger. V.A.: Anal. Chem., 35, 315 (1963).
4）Hall. C. E, and Stenger. V. A.: Anal. Chem., 39, 503 (1967).
5）Schaffer. R. B, Hall. C. E, et al.: JWPCF, 37, 1545 (1965).

東京湾底泥中の硫酸塩還元菌について

松 本 淳 彦

DISTRIBUTION OF MARINE SULFATE-REDUCING BACTERIA IN THE BOTTOM SEDIMENT OF TOKYO BAY

Atsuhiko MATSUMOTO

(Division of Water Analysis, Department of Environmental Hygiene, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Summary

The distribution of sulfate-reducing bacteria in the bottom sediment was investigated from a view point of environmental pollution.

1) In each October of 1971 and 1972, the bottom sediments were collected from sixty stations covering almost whole area of Tokyo Bay. (Fig. 1) They were almost consisted of black muddy soil with marked hydrogen sulfide odor. These materials were inoculated to the Sato-Hattori medium in 1971 and the modified ISA medium in 1972 respectively according to most probable number method. Both media were prepared for the culture of marine type adding 3% of sodium chloride, and incubated anaerobically at 30°C for two weeks.
2) The horizontal distribution of sulfate-reducing bacteria were shown in Fig. 2 and Fig. 3. The sulfate-reducing bacteria was detected in maximum number from station 46 which is situated off Kisarazu both in 1971 and 1972.
3) Large number of sulfate-reducing bacteria were found in the coastal waters from Kisarazu to the cape of Futtsu in Chiba Prefecture. But bottom materials in these area were almost consisted of sandy soil. In the area where the population of sulfate-reducing bacteria was large, those of benthic animals such as Polychaeta, Molluska and Crustacea were also larger than the other area.
4) There was no correlation with the bacterial number and COD or total sulfide in these bottom sediment.
5) The sulfate-reducing bacteria were detected from 80% of bottom sediment samples in modified ISA medium at 30°C within 7 days.
6) A salt-water strain of sulfate-reducing bacteria was isolated from the bottom sediment in Tokyo Bay, and it was identified with *Desulfovibrio aestuarii*.

1 まえがき

東京湾は，湾口部（浦賀水道）が屈曲してせまいために，外洋との水の交換がわるく，都市や工場群から流入する雑多な汚濁水は，湾内に滞留しながら徐々に湾底へ沈積していくことが知られている。

硫酸塩還元菌は，自然界の土壌中に広く分布しており，また，港湾などの底泥中，特に魚港や，大都市の

*東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

河口付近では分布密度が高いといわれている[1]。そして，河口や，内湾の底泥からの硫化水素の発生は，本菌が原因していることが多い。このように，多量の硫化水素を含有するような底泥は，黒色の腐泥となっていることが多く，底生生物はもとより，水中生物にまで大きな悪影響を与えていることが知られている[2]。そのほか，悪臭発生や，埋設された鉄管類の腐蝕を促進する原因ともなっている[1]。

この調査は，東京都，神奈川県，千葉県の一都二県の合同で実施したもので，流入汚濁量，水質，底質，生物相などの相互関係を把握し，湾内の複雑な汚濁機構を明らかにする調査の一環として行なったものであ

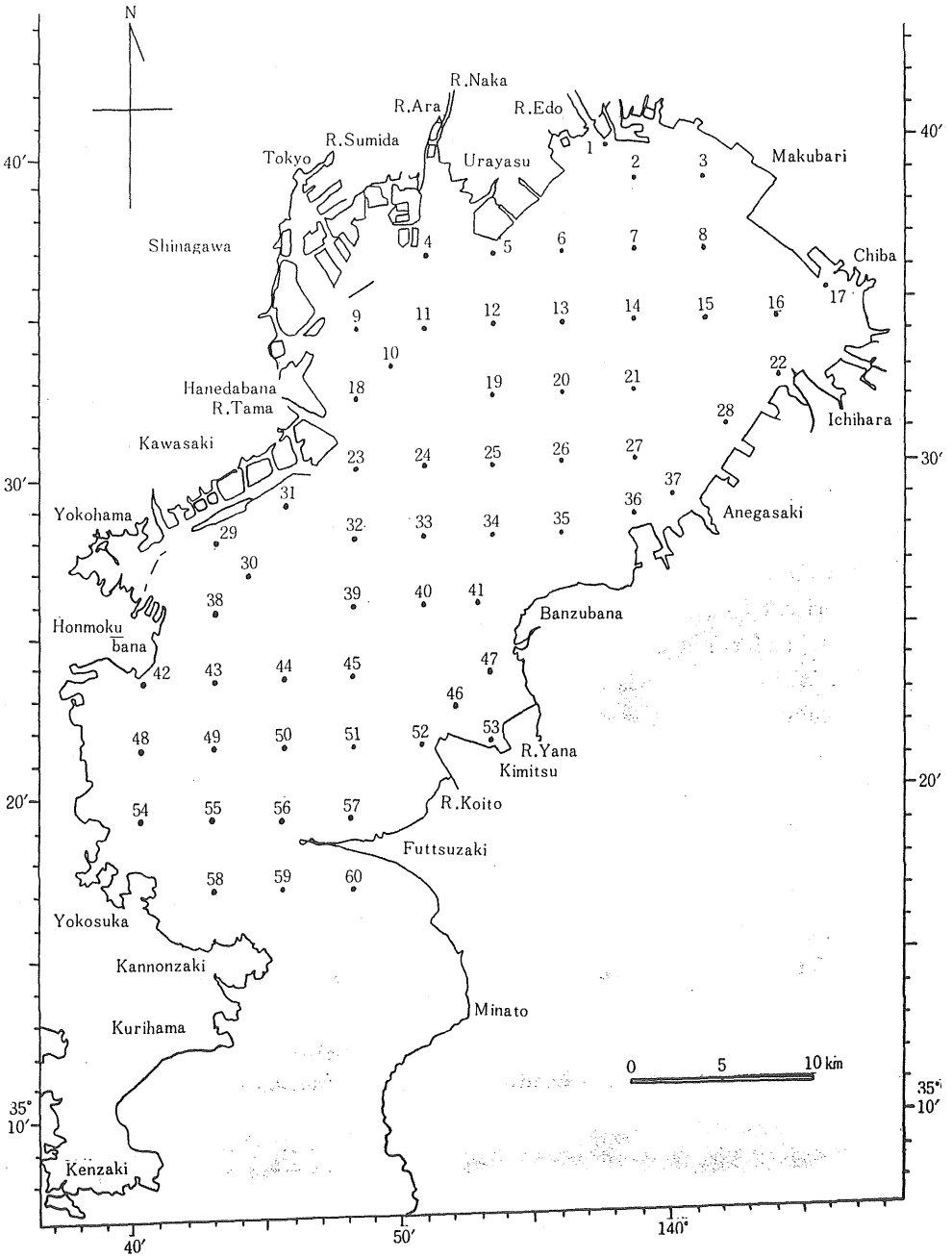


Fig. 1 Sixty Sampling Stations on Tokyo Bay, October, 1971 and 1972

る。

本編にのべる硫酸塩還元菌を，水域汚濁との関係から調査研究した報告[3]はほとんど見当らない。本報告では，東京湾底泥中の硫酸塩還元菌の分布状態を調査し，汚濁との関連を検討した。

2　調査地点と調査年月

調査地点は図—1に示すとおり，ほぼ湾内全域にわたっており，1971年度は，5月に15地点，8月に15地点，10月に72地点，および翌年2月に15地点を調査し，1972年度は10月に60地点を調査した。

3　材料と方法

3-1 硫酸塩還元菌の培養

底泥は，港研式採泥器を使用して採泥し，これを内容100mlの滅菌ポリエチレン製ビンに満たして氷箱に納め，なるべく短時間のうちに培養試験に供した。底泥試料は，できるだけ水分を除去したのち，滅菌広口ガラスビンに10gを秤取し，滅菌3％塩化ナトリウム溶液を加えて全量を100mlとした。これを約50回強く振とう後，静置し，その上澄液について最確数法および平板法によって培養を行なった。培地は，1971年度の試料については佐藤，服部培地[4]を使用した。培地組成は，ペプトン5.0g，肉エキス5.0g，乳酸ナトリウム（70％）5.0g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5g，KH_2PO_4 0.5g，Na_2SO_4 1.5g，モール塩0.1g，蒸留水1000mlである。また，1972年度の試料は，変法ISA培地[5]を使用した。この培地組成は，トリプトン10.0g，乳酸ナトリウム（70％）5.0g，Na_2SO_3 0.5g，クエン酸鉄アンモニウム 0.5g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0g，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g，蒸留水1000mlである。この両培地を使用した場合の硫酸塩還元菌の発育は，後者の方が多少良好であった[6]ので，1972年度はこれを使用した。培地は3％の塩化ナトリウムを添加し，pH 7.4±0.1に調整後，小試験管に5～6mlずつ分注してステンレスキャップをした。これを15分間高圧蒸気滅菌し，滅菌後すみやかに冷水中で冷却した。次に，底泥の上澄液を，同組成の液体培地を使用して10倍段階で希釈し，試験管培地の底部に接種して，MPN試験法に準じて培養を行なった。試料の接種後，直ちに培地の上部に硫酸パ

Table 1　Number of Sulfate-reducing Bacteria per 1g(wet weight) of Bottom Sediment

Station Number		Number of Bacteria		Station Number		Number of Bacteria	
		Oct. 1971	Oct. 1972			Oct. 1971	Oct. 1972
1	C—21	170	7,900	31	K— 2	9	11,000
2	—19	9,400	49,000	32	— 5	9	790
3	—20	6,000	33,000	33	T—23	4,000	490
4	T— 2	400	79,000	34	—24	700	1,300
5	— 3	70	790	35	—25	4,000	4,900
6	— 4	700	4,900	36	C—10	4,000	7,900
7	— 5	400	1,300	37	—11	250	790
8	C—17	170	700	38	K— 7	7	790
9	T— 6	120	790	39	— 9	40	790
10	—12	1,700	330	40	T—26	900	790
11	— 7	400	790	41	C— 7	2,500	2,400
12	— 8	700	790	42	K—10	12	170
13	— 9	700	790	43	—11	17	1,300
14	—10	170	790	44	—12	1,200	24,000
15	—11	250	4,900	45	—13	12	490
16	C—15	700	1,700	46	C— 5	40,000	740,000
17	—16	600	490	47	— 6	25,000	70,000
18	T—13	2,500	1,300	48	K—15	4	2,400
19	—15	170	1,300	49	—16	120	3,300
20	—16	900	1,700	50	—17	2,500	2,400
21	—17	12,000	1,700	51	—18	170	11,000
22	C—14	4,000	3,300	52	C— 3	40,000	1,700
23	K— 1	14	1,100	53	— 4	700	170
24	T—19	12,000	2,800	54	K—19	2,500	3,300
25	—20	4,000	1,300	55	—20	1,700	3,300
26	—21	700	490	56	—21	11,000	24,000
27	—22	400	2,400	57	C— 1	17,000	13,000
28	C—13	1,200	110	58	K—22	7,000	79,000
29	K— 3	25	700	59	—23	7,000	17,000
30	— 6	12	1,100	60	—24	9,000	9,400

ラフィンを約 1 cm の高さに重層して，空気との接触と培地の蒸発を防止した。これを 30°C で14日間まで培養し，培地の黒色化したものを硫酸塩還元菌陽性とみなして，底泥 1 g（湿重）中の菌数に換算した。また，平板培養は，1.5%の寒天を加えた培地を使用し，窒素ガスで置換した嫌気培養ビン中で，30°C，7 日間培養し，発育した黒色コロニーを計数した。硫酸塩還元菌は，嫌気状態で培地中の硫酸塩を還元して硫化水素を発生し，第一鉄塩と反応して，黒色の硫化鉄を生成することによってその発育を認めている。

3-2 硫酸塩還元菌の分離培養

海水産の硫酸塩還元菌には，*Desulfovibrio aestuarii*

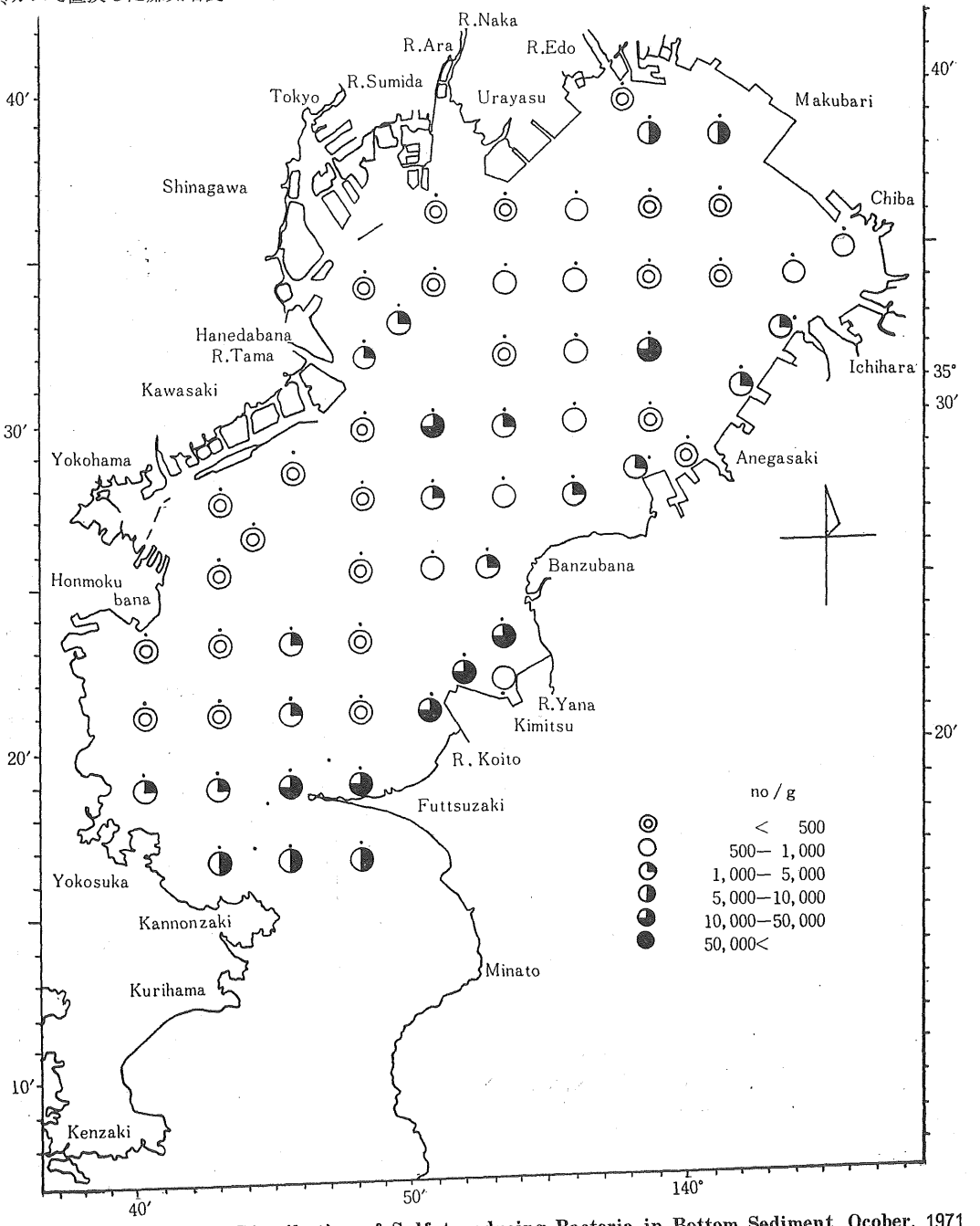


Fig. 2 Horizontal Distribution of Sulfate-reducing Bacteria in Bottom Sediment, Ocober, 1971

の一種が知られている[7)8)]。これは，海水，海泥，河口の底泥中などに生育しており，2.5～3%の塩化ナトリウムの存在でもっとも発育がよいといわれている[1)2)9)]。底泥試料を液体培地に少量接種し，窒素ガスを約1分間，細管から通気してからゴム栓で密栓した。これを 30°C で培養して培地の黒色化するのを確認した。これから少量をとって，同組成の液体培地で希釈して平板培養を行なった。数日後に発育した典型的な黒色コロニーを釣菌して，新たな液体培地に移植した。この操作を5回くり返した後，この菌に雑菌が混入していないことを確かめた。すなわち，3%の塩化ナトリウムを添加した普通寒天培地，ヘンリッチ培地，お

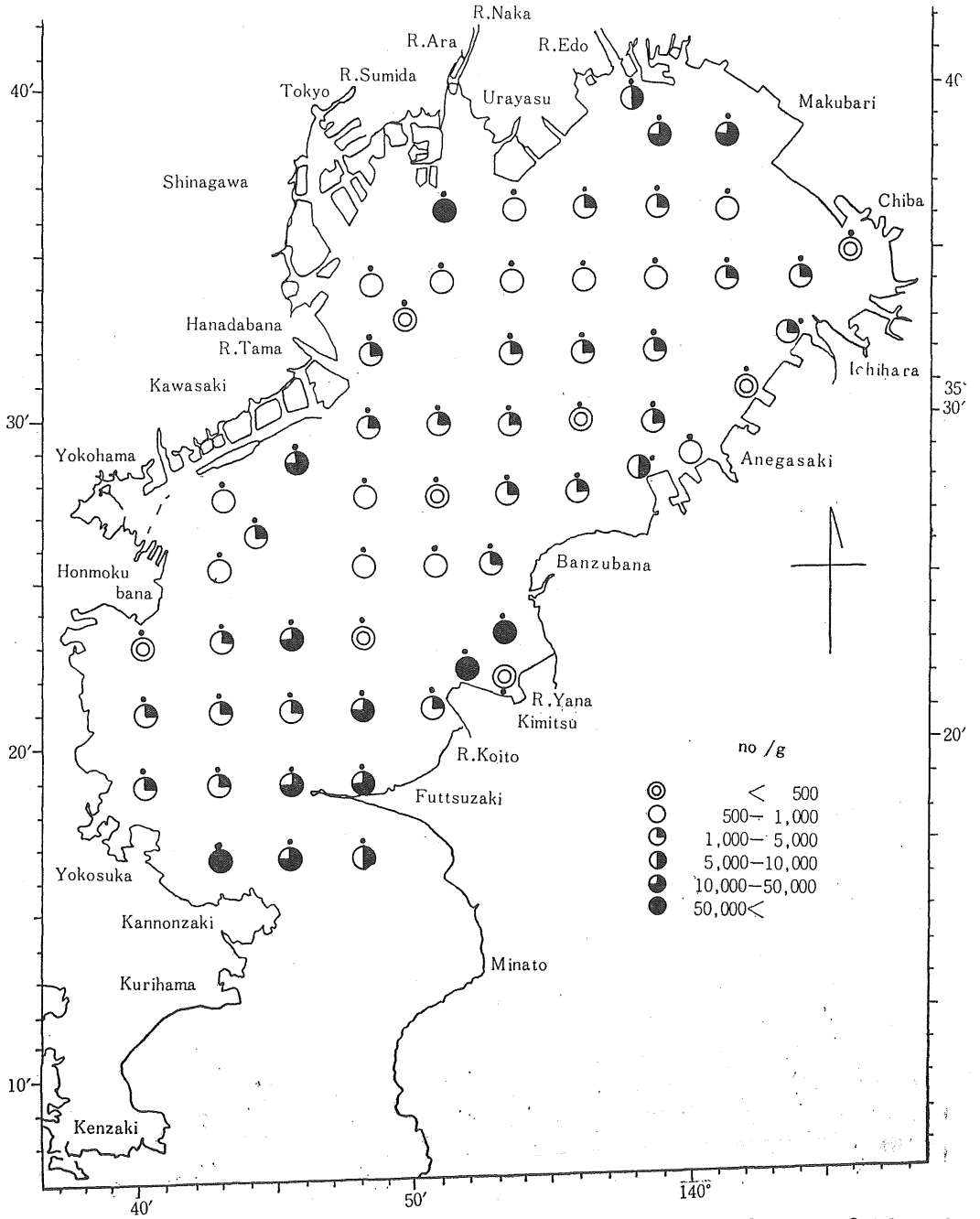


Fig. 3 Horizontal Distribution of Sulfate-reducing Bacteria in Bottom Sediment, October, 1972

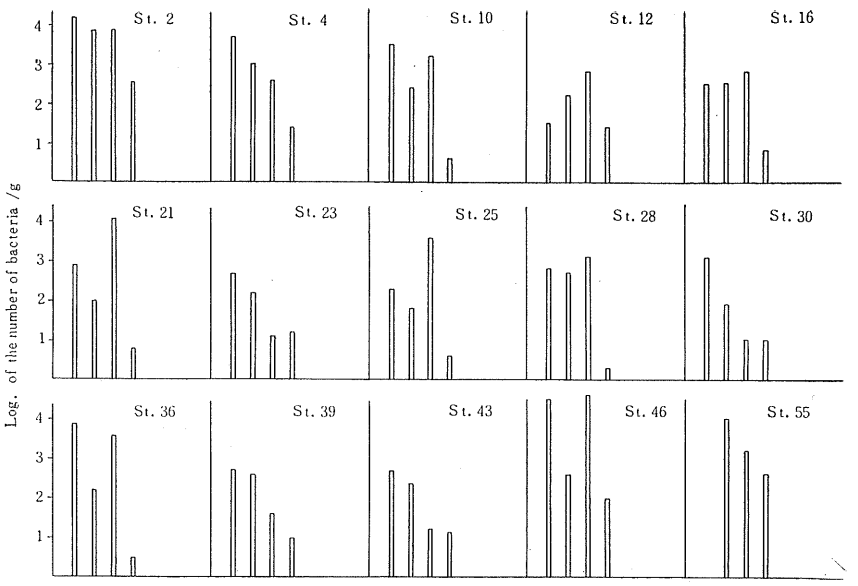


Fig. 4 Seasonal Variation of the Number of Sulfate-reducing Bacteria, May, August, October, 1971 and Feburuary, 1972

よび変法ISA培地を使用して，それぞれ好気的，嫌気的に 30°C で7日間平板培養したところ，変法ISA培地による嫌気培養の場合以外，菌の発育をみとめなかった。また，顕微鏡的にも純粋であると思われた。

4 結果と考察

湾内の底泥は，木更津沖から湾口部へかけた砂地の地域を除いて，ほとんどが灰黒色～黒色の腐泥状を呈しており，かなり強い硫化水素臭が感じられた。

4-1 硫酸塩還元菌の分布

1971年，1972年の10月時に行なった同一調査60地点について，底泥1g中の硫酸塩還元菌数を表—1に示し，その分布図を図—2，図—3に示した。1971年時の菌数は，最低4/g，最大40,000/g (St. 46, St. 52) であり，1972年時は，それぞれ 110/g，740,000/g (St. 46) を数えたが，この最大菌数が検出されたのは，両年とも同一地点の千葉県木更津沖 (St. 46) であった。また，1971年時に散在的に多く検出されている湾央部の St. 21, St. 24 (それぞれ 12,000/g) では，翌年の同時季には，1,700～2,800/g と減少していた。江戸川河口沖 (St. 1,2,3)，隅田川河口 (St. 4)，川崎沖 (St. 31) では，前年に比べてかなり多く検出されていた。湾内全体的な分布状況は，両年とも大体類似している傾向がみられるが，特に，千葉県の木更津，君津沖から富津崎にかけた地域は，底質が砂地であるにもかかわらず，もっとも分布密度が高かった。この理由は現在明確になっていない。その他，多摩川河口沖 (1,100～2,500/g)，横須賀沖(1,200～3,300/g)，市原沖(3,300～4,900/g)，姉ケ崎沖 (4,000～7,900/g) などの各地域で，比較的多く検出されていた。

4-2 硫酸塩還元菌の季節変化

1971年5月，8月，10月，翌年2月に調査した15地点について，季節による菌数変化を比較して図—4に示した。調査地点は，東京側の St. 2, 4, 10, 12, 25, 神奈川県の St. 23, 30, 39, 43, 55, 千葉県の St. 16, 21, 28, 36, 46, のそれぞれ5地点である。これをみると，同一地点でも季節によってかなり菌数にひらきがあった。5月がもっとも多くて 33～33,000/g (平均 5,400/g)，10月は 12～40,000/g (平均 5,200/g) 8月が 70～11,000/g (平均 1,500/g)，そして，水温の低い2月が 2～400/g (平均 70/g) ともっとも少なかった。

一方，同じ時季の底泥中の硫化物量，COD 値をみると[10]，硫化物量は，5月が 0.11～3.7ppm (平均 0.85ppm)，8月は 0.04～2.1ppm (平均 0.59ppm)，10月は 0.1～1.8ppm (平均 0.54ppm)，2月が 0.2～1.6ppm (平均 0.65ppm) となっている。また，COD 値は，5月0.9～92.6ppm (平均29.9ppm)，8月5.1～38.7ppm (平均24.4ppm)，10月0.7～27.8ppm (平均18.1ppm)，2月が1.4～12.3ppm (平均6.3ppm) と徐々に低くなっている。両者とも，菌数のもっとも多く検出されている5月時が，やはり平均値をみても

最高値を記録している。しかし，もっとも菌数の少なかった2月時の硫化物量は，8，10月時よりむしろ，高い値となっている。COD 値は菌数と同様に低くなっている。しかし菌数が多く検出されていても，必らずしも硫化物量，COD 値が高いわけではなく，地点によってかなりバラツキが大きかった。木俣らの報告[3]では，底泥中の硫酸塩還元菌数と硫化物量，COD値は相関があったと述べているが，今回の調査においては，いずれも相関関係を認めることはできなかった。次に，底泥中の底生動物(多毛類，軟体類，甲殻類など)の個体数分布図[10]とを比較したところ，硫酸塩還元菌の密度が高い木更津沖から富津崎にかけた地域で，多くの底生動物がみられていた。そして，湾央部の比較的菌数が少なかった地域では，底生動物が少ないか，無生物地域が広がっているという関係がみとめられた。これらのことから，今後の研究として，本菌の生理，生態，深さによる菌数密度，泥質，含泥率，酸化還元電位などについての検討が必要であると思われた。

4-3 硫酸塩還元菌の発育速度

硫酸塩還元菌の至適発育温度は 25～30°C にあるといわれている[8]。1972年度の試料について，30°Cで培養した場合の発育状況を図—5に示した。発育の速いものでは，すでに24時間後には培地の黒色化がみられた。培養を14日間まで毎日観察したが，80%(48試料)の試料が7日以内で培地の黒色化が安定した。なかでも2日間が18.3%でもっとも多く，次いで3日と7日間が15%，5日間が13%，4日間が10%であった。このことから，硫酸塩還元菌は，変法ISA培地を使用して 30°C で培養した場合は，およそ7日間で培養結果が出るものと思われた。しかし，現在試験法も確立されておらず，ほとんど最確数法によって培養が行なわれている。これは操作に多くの時間と労力を要するので，寒天培地を使用して，窒素ガスで置換した嫌気培養ビン中で，30°C，7日間平板培養を行なった。液体培地における培地の黒色化と，平板に発育した黒色コロニー数とを，同じ希釈倍率のもので比較を行なった。代表的な10例についての培養結果を表—2に示したが，平板培養でも液体培養とほとんど同じように良好な発育がみられた。この際，発育したコロニーは，空気中

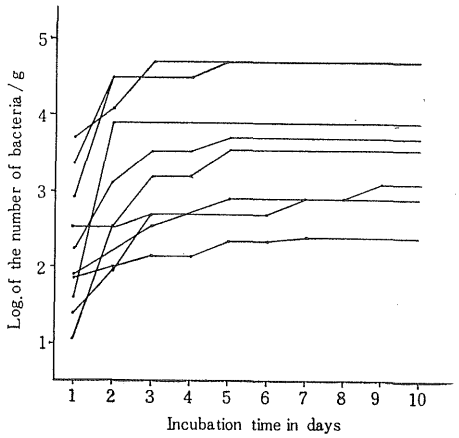


Fig. 5 The Growth Rate of Sulate-reducing Bacteria

Table 2 Growth of Sulfate-reducing Bacteria in Crude culture in the Modified ISA Medium

Samples	Dilution of inoculum	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	5(+)	5(+)	1(+)
	Number of colonies	1,300	230	44	2	0
2	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	5(+)	4(+)	1(+)
	Number of colonies	640	52	7	3	0
3	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	5(+)	3(+)	5(−)
	Number of colonies	560	53	11	1	0
4	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	4(+)	5(−)	
	Number of colonies	96	7	1	0	
5	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	3(+)	5(−)	
	Number of colonies	80	30	2	0	
6	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	1(+)	5(−)	
	Number of colonies	73	8	0	0	
7	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	2(+)	5(−)	
	Number of colonies	66	8	1	0	
8	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	3(+)	5(−)	
	Number of colonies	65	3	1	0	
9	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	4(+)	5(−)	
	Number of colonies	29	4	2	0	
10	Number of positive tubes	5(+)	5(+)	5(−)		
	Number of colonies	10	2	0		

Both the inoculated media were incubated at 30°C for 7 days.
Liquid paraffin was poured on each top of the liquid media as high as 1 cm.
The agar plates were incubated in the anaerobic jar filled with nitrogen gas.

にさらしておくと黒色が退色してしまうので，すみやかに計数する必要があった。また，菌数が多すぎると，平板全体が黒色化してしまい，計数が困難になる場合があった。

4-4 分離菌株について

底泥試料から分離培養した菌株は，わずかにわん曲した0.5～0.8×4～6μの単桿菌であり，ときに2～3連，あるいは最高8連の短鎖状の形態をとるものが観察された。運動性は不活発であった。電子顕微鏡による検鏡では1本の極毛が観察されたが，栄養型の菌体では，2個の菌体を互に連結させているように見えるものが多かった。Gram 陰性で，ゼラチンは液化せず，硝酸塩還元能はない。好気培養では発育しない。塩化ナトリウム無添加培地中では発育しない。40°C の培養温度では発育しない。この最高発育温度は，D. A. Miller 等が報告[11]している 39.0～42.5°C と類似している結果であった。上記の培地を使用したときの硫化物生成量は，30°C，7日培養後に 57.5ppm を測定した。なお，硫化物の定量はヨウ素滴定法[12]を用いた。これらの各性状試験を行なった結果，この分離菌株は，ほぼ海水産の *Desulfovibrio aestuarii* の一株であると同定した。さらにピルビン酸，コリン，マレイン酸，酢酸塩などに対する発育比較についても実験を継続している。

むすび

1971年（72地点），1972年（60地点）の10月時における同一調査60地点，および1971年四季の東京湾底泥中の硫酸塩還元菌の分布を調査し，二三の考察を行なった。

1) 底泥は，千葉県木更津沖から富津崎にかけた砂地の地域を除いて，ほとんどが強い硫化水素臭を発する灰黒色～黒色の腐泥であった。

2) 硫酸塩還元菌は，1971年時は最低 4/g，最大 40,000/g を，1972年時は最低 110/g，最大740,000/g を数え，最大菌数を検出したのは，両年とも同一地点の千葉県木更津沖（St. 46）であった。

3) 湾心部でも散在的に多く検出されている地点もあるが概して少なく，河口沖や千葉県の海岸寄りで菌数が多い傾向がみられた。

4) 菌数の分布密度は，両年とも大体類似した傾向がみられたが，季節によってかなり異なり，5，10月がもっとも多く，次いで8月であり，2月が最低であった。

5) 底泥中の硫酸塩還元菌密度と，硫化物量，COD値との間には，相関関係はみとめられなかった。

6) 硫酸塩還元菌数の多い地域で，底生動物の個体数が多くみられている傾向があった。

7) 底泥中から分離された菌株は，海水産の *Desulfovibrio aestuarii* の一株と同定した。

8) 水域と底泥中では，その環境や汚濁状況が異なるので，硫酸還元菌と汚濁とを関連ずけるのは困難であった。

謝辞

本稿は，当所主任研究員，松本浩一博士に御校閲をいただき，また，電子顕微鏡観察は前木吾市主任研究員にお願いした。ここで，厚くお礼申し上げます。

参考文献

1) 畑 幸彦：水処理技術，3，4，1～11（1962）
2) 菅野照造：用水と廃水，3，9，14～20（1961）
3) 木俣正夫，他：日本水産学会誌，21，2，102～108（1955）
4) 佐藤 匡，他：用水と廃水，3，9，21～29（1961）
5) Mara, D. D. and Williams, D. J. A.: J. Appl. Bact., 33, 3, 543～552 (1970)
6) 松本淳彦：東京都立衛生研究所研究年報，23，319～326（1971）
7) Postgate, J. R. and Campbell, L. L.: Bact. Rev., 30, 4, 732～738 (1966)
8) Bergey's Manual of Determinative Bact., 7 th. Ed. (1957)
9) 木俣正夫，他：日本水産学会誌，21，2，109～112（1955）
10) 関東地方公害対策推進本部：東京湾総合調査報告書，(1972)
11) Miller, J. D. A. and Hughes, J. E.: J. Gen. Microbiol., 52, 173～179 (1968)
12) 日本薬学会：衛生試験法注解（1973）

合成洗剤の毒性に関する研究（I）
直鎖形および分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウムの急性毒性について

小林博義* 市川久次* 藤井孝*
矢野範男* 紺野敏秀* 平賀興吾*
中村弘** 渡辺悠二** 三村秀一**

STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETFRGENTS (I)
ACUTE ORAL TOXICITY OF LINEAR AND BRANCHED ALKYL BENZENE SULFONATE

Hiroyoshi KOBAYASHI, Hisatsugu ICHIKAWA, Takashi FUJII,
Norio YANO, Toshihide KONNO, Kogo HIRAGA
Hiroshi NAKAMURA, Yuji WATANABE, Shuichi MIMURA

(Department of Toxicology,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)
(Division of Water Analysis, Department of Enviromental Public Health,
Tokyo Metropolitan Research Laboratoy of Public Health)

Summary

Acute oral toxicities of linear (LAS) and branched alkylbenzene sulfonate (ABS), using as synthetic detergents, were studied in rats (Wistar SLC (SPF) and Wistar strain) and mice (ddY/S strain), and the following results were obtained.

1) LD_{50} values (mg/kg, p. o.) in Wistar SLC (SPF) strain rats were: LAS 873–404 (male (M) mean body weight 125.6–235.7g), 760–409 (female (F) mean body weight 99.3–145.5g); ABS 700–471 ((M) 112.3–212.1g), 625–438((F) 96.5–138.5g); in Wistar strain rats: LAS 1525 ((M) 166.4g) 1280 ((F) 123.6g) and in ddY/S strain mice: LAS 1665–1575 ((M) 27.2–27.4g) 1950–1850 ((F) 22.0–23.0g); 1880–13330 ((M) 22.7–30.3g), 2090–1670((F) 18.7–24.0g).

2) There was no difference in LD_{50} values between male and female (at the same age).

3) LD_{50} values decreased with the increase of body weight.

4) There was a difference in LD_{50} values between the strains of rats.

5) There was no significant difference in LD_{50} values between LAS and ABS.

6) There was no difference in external symtoms between LAS and ABS, in the

*東京都立衛生研究所毒性部
**東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科

rats severe diarrhea and sedative, in the mice generally no action in motion and soft feces, in asmll case saltation, convulsion, torsion and paralysis in rear limbs were observed.

7) In the digestive tube macroscopic and histological changes, and in the liver congestion were found.

8) Survival rats after treated with LAS about LD_{50} value grew as much as control or more than control.

9) Degree of acute toxicity of LAS and ABS were "slightly toxic or moderaly toxic" follwing the classificasion by Hodge et al.

合成洗剤は広く家庭でも使用され，直接皮膚に触れ，また食物，食器類の洗浄に用いることにより微量ではあるが体内に摂取される機会が多く，更に合成洗剤による環境汚染の進行にともない，二次的にも水および食品等による摂取が増大していると考えられる。これらのことより合成洗剤の安全性について一般の関心が高まっていることは当然といえよう。文献的には，合成洗剤の毒性は低く，安全性が高いとするものが多いが，これらの安全性について一層の吟味を加えることは保健上極めて意義深いものと考えられる。

そこで今回著者らは，合成洗剤の安全性の検討の一つとして，最も広く使用されているものの一つあり土地や汚泥中等で微生物分解を比較的受け易いといわれている直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS，所謂ソフト型）と微生物分解を受け難い分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS，所謂ハード形）について，ラットおよびマウスにおける急性毒性を検討したところ若干の知見を得たので報告する。

実験材料ならびに実験方法

試料：1）直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（linear alkyblbenzenesufonic acid sodium salt 以下 LAS と略す）。

花王アトラス株式会社製ネオペレックスF—60, Lot No. 127（K-LAS）およびライオン油脂株式会社研究所製の有効成分約40%の原料を自家精製（東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科）したもの（L-LAS）とを使用した。

2）分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（branched-chain alkylbenzensulfonic acid sodium salt 以下 ABS と略す）。

和光純薬工業株式会社製 Laurylbenzene sulfonic acid sodium salt Lot No. AL 6526 を使用した。

K-LAS ならびに ABS のアルキル基の炭素数分布は以下の通りであった。

	K-LAS	ABS
C_9	—	4.7%
C_{10}	10.6%	6.1%
C_{11}	34.1%	10.0%
C_{12}	27.7%	60.5%
C_{13}	19.0%	8.8%
C_{14}	8.7%	4.7%
C_{15}	—	4.4%
C_{16}	—	0.8%

また各試料の成分は次のようであった。

	K—LAS	L—LAS	ABS
有効成分	60±2%	99.5 %	95.5%
未反応油分	1.5%(以下)	0.04%	1.6%
無機塩類	4.0%(以下)	0.01%	2.9%
水分	38%	0.00%	0.0%
pH（1%）	7.1	6.1	5.3
平均分子量	345.8	364.0	

実験動物：1）ラット——静岡県実験動物農業協同組合において barrier system 下に生産された（SPF）Wistar SLC 系および船橋農場生産 Wistar 系の雌雄を使用した。

2）マウス——静岡県実験動物農業協同組合生産の ddY/S 系の雌雄を使用した。動物は室温25±1°C，湿度55—65%，照明を午前6時より午后6時までに制御した環境下で船橋農場製固型飼料FⅡおよび水道水を自由に摂取させ，2週間以上飼育し実験に供した。

試験方法：試料の投与用量は公比 1.12～1.2 の割合で増量し，7～10 用量を用いた。各用量（有効成分量）は投与容量が，ラットの場合10ml/kg，マウスの場合15ml/kg となるよう精製水に溶解調製し，胃ゾンデにて経口投与した。

動物は，1群（1用量）10匹とし，実験前日午后5時より除餌し，水のみを与え，午前10時より試料の投与を開始した。投与後2時間目より餌を再び与え7日間にわたって症状を観察するとともに，この間の死亡率にもとづいて Litchfield-Wilcoxson[1] 法により50%致死量（LD_{50}）を算定した。また，死亡例については直ちに，生存例は7日後屠殺剖検した。

以上の実験は，動物の種別のほか性別，体重別および系統別の比較を行った。なお，これらの試験中L—LAS の LD_{50} 前後を投与した Wistar 系ラットの生存例については特に32日間にわたって毎日体重を測定し，投与後の体重増加の推移を観察した。観察終了後，心臓，肝臓，腎臓および脾臓の重量を測定し，無処置（対照）ラットのそれと比較した。また別に Wistar SLC 系ラットを用意し，LASおよびABSそれぞれの LD_{50} 附近量を同様に投与して5～7時間目のもの（死亡例も含む）（の重量臓器の病理組織学的検索を行った。

L—LAS 精製法：(1)原料（A．I．=40%程度）50～100 g を水200m*l*に溶解。

(2)硫酸，苛性ソーダを用いpH 7 に調製。

(3)エタノール300m*l*を加え（約50%エタノール溶液となる）1 *l* 容分液ロートに移す。

(4)石油エーテル100～200m*l*で3回未反応油分を抽出。

(5)抽由後の水層にエタノールを加え85%以上のエタノール溶液とする。

(6)水浴槽で煮沸後ろ紙で2回ろ過する（無機塩類除去）。

(7)エバポレータで溶媒を留去する。

(8)残渣を減圧下で乾燥する。

(9)A．I．（有効成分）を測定する。

(10)デシケータ内に保存する。

実験結果

症状：LAS（L—，K—），ABS の間に顕著な症状の差は認められず，ラットにおける主症状は，ゼラチン様物質を混じたはげいし下痢と鎮静状態で，その他流涙，立毛等がみられた。マウスにおいては一般的には立毛と蹲居でラットにみられたようなはげしい下痢はなく軟便程度のものが散見された。その他，小数ではあるが跳躍，痙攣，体捻転，後肢麻痺等を示すものがあった。

LD_{50}：結果は Table Ⅰ（ラット）および Table Ⅱ

Table I. Acute Toxicity Study L-LAS. K-LAS and ABS in Rats

Materials	Animal				Dead Time (hrs)			Slope[b]	LD_{50} mg/kg. B.W. (p. o.)	Confidence limits at p=0.05 (mg/kg. B.W.)
	Strain	Age[a] (weeks)	Sex	Mean B.W. ±S.D.(g)	onset	peak	end	function		
L-LAS	Wistar SLC (SPF)	6	♂	125.6± 6.73	3	3～ 5	21	1.20	873	773～ 906
			♀	99.3± 3.53	3	3～ 5	21	1.21	760	675～ 855
		7	♂	151.9± 9.72	5	5～ 8	21	1.17	659	560～ 774
			♀	111.1± 3.28	5	5～ 7	45	1.69	670	584～ 769
		10	♂	235.7±15.86	7	7～ 8	20	1.18	404	359～ 454
			♀	145.5± 8.95	5	8～13	45[c]	1.19	409	362～ 462
	Wistar	8	♂	166.4± 7.88	5	7～12	17	1.39	1.525	1.317～1.766
			♀	123.6± 5.95	5	9～13	16	1.42	1.820	1.099～1.491
K-LAS	Wistar SLC (SPF)	7	♂	152.6± 6.73	5	5～ 8	21	1.37	640	580～ 707
			♀	112.2± 4.42	4	8～ 7	21	1.36	672	546～ 827
ABS	Wistar SLC (SPF)	5	♂	112.3± 5.05	3	4～ 6	21	1.20	700	631～ 775
			♀	96.5± 4.80	2	4～ 6	21	1.22	625	543～ 718
		5	♂	112.9± 8.14	5	5～ 6	45	1.31	760	672～ 858
			♀	97.5± 4.78	4	4～ 5	45	1.26	699	619～ 788
		6	♂	129.0± 5.03	3	4～ 5	21	1.38	652	587～ 724
			♀	101.6± 2.28	3	4～ 5	21	1.50	608	525～ 703
		9	♂	212.1± 9.75	5	5～ 6	21	1.31	471	399～ 555
			♀	138.5± 5.32	3	4～ 7	21	1.32	438	371～ 516

a) Male and female are same age. b) A factor of slope of dose-lethal rate curve c) refer to Fig 1.

Table II. Acute Toxticity Study of L-LAS, K-LAS and ABS in Mice

Materials	Animal				Dead Time (hrs)			Slope[b]	LD 50 mg/kg B.W. (P, O.)	Confidence limits
	Strain	Age (weeks)	Sex[a]	mean B.W. ±S.D.(g)	onset	peak	end	function		at p=0.05 mg/kg B.W.
L-LAS	ddY/S	7	♂	27.2±1.94	1	1～8	10	1.24	1,665	1,508～1,838
			♀	22.0±1.59	1	1～6	24	1.27	1,950	1,540～2,480
		7	♂	27.4±1.78	2	2～8	44	1.29	1,575	1,433～1,731
			♀	23.0±1.48	2	2～5	68[c]	1.30	1,850	1,674～2,044
K-LAS	ddY/S	7	♂	27.6±2.24	2	2～8	21	1.23	1,620	1,446～1,814
			♀	23.0±1.57	3	3～5	21	1.25	1,825	1,622～2,053
A B S	ddY/S	5	♂	22.7±1.39	—	—	—	1.22	1,880	1,664～2,124
			♀	18.7±1.37	—	—	—	1.24	2,090	1,870～2,336
		6	♂	25.4±1.76	2	2～4	44	1.20	1,610	1,437～1,803
			♀	20.0±1.19	2	2～4	22	1.23	1,940	1,740～2,163
		7	♂	28.0±2.00	2	2～5	21	1.28	1,700	1,535～1,882
			♀	21.7±1.42	2	2～5	160	1.23	2,000	1,822～2,195
		8	♂	30.3±2.62	1	2～4	28	1.64	1,330	1,064～1,663
			♀	24.0±1.95	1	2～5	27	1.08	1,670	1,601～1,742

a) Male and female are same age. b) A factor of slope of dose-lethal rate curve c) refer to Fig. 1.

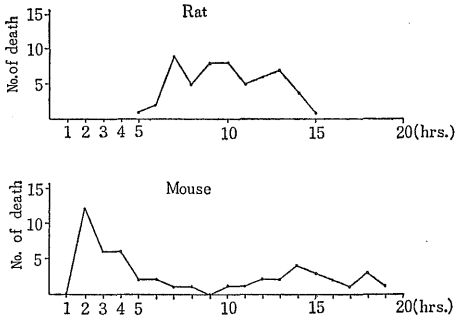


Fig. 1. Distribution of the Death after L-IAS Administration (p. o.) (male+female)

（マウス）に示す通りである。

死亡開始時間はLAS（L—，K—），ABSともにラットにおいては3～5時間であり，最多死亡時間（Peak）は3～13時間であった。マウスにおいては，ラットより早く1～3時間であり，最多死亡時間は1～8時間であったが，さらに12時間前後に小さいpeakが見られた（Fig. 1）．死亡例の大多数は，ラット，マウス，雌雄，LAS，ABSの別なく24時間以内に致死した。

LD_{50}は，LASおよびABSともにラットおよびマウスにおいて実験時体重（日令）の増加に従って減少した（毒性増大）。この関係を，体重を対数に転換するとFig. 2（ラット）およびFig. 3（マウス）のようになり，極めてよい相関が認められた。

L—LAS投与 Wistar 系ラットの LD_{50} は同一体重の Wistar SLC 系ラット（SPF）のそれの約2倍の値を示し，明らかに有意の差を認めた（$P<0.05$）．

LASおよびABSともに同一日令のラットおよびマウスの雌雄間の LD_{50} は体重に相違があるにかかわらず有意の差は認められなかった（$P>0.05$）。

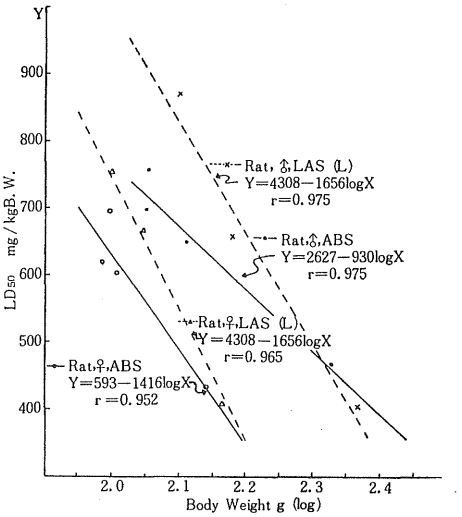


Fig. 2 Relationship between Body Weight and LD_{50} Values in Rats.

また，L—LAS，K—LAS，ならびにABSの LD_{50} の間には有意な差は認められなかった（$P>0.05$）。

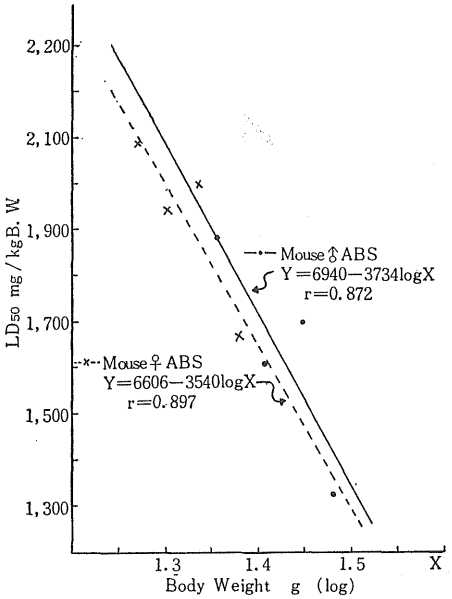


Fig. 2 Relationship between Body Weight and LD_{50} Values in Mie

剖検所見：LAS（L—，K—）ならびにABSまた，ラットおよびマウスにおける剖検所見には大差なく，大体以下の如くであった。

死亡例では肝，腎，胃（腺胃部）が暗赤色を呈し，腺胃部では一部に出血点を認めた。小腸は膨大し，やや管壁が薄くなっており透明感があった。また粘膜は稍々暗赤色をしていた，盲腸は外観から血管走行が顕著に見られ粘膜はところどころ赤色を呈していた。

生存例の一週間後の剖検では，胃（腺胃部）粘膜がやや肥厚している感じを受けた。小腸は膨大していなかったが全体的に弛緩しており菲弱化しているようであった。また，肝臓の表面が粗になっている例が多かった。

以上の変化は雌に比し，雄に顕著のようであった。

L—LAS 投与 Wistar 系ラットの体重の推移と臓器重量：結果は Fig. 4，Table Ⅲ，Ⅳ に示した通りで，体重は対照に較べ同等あるいは以上の増加を示した。また，臓器重量は絶対重量および体重比重量ともに有意な差は認められなかった。

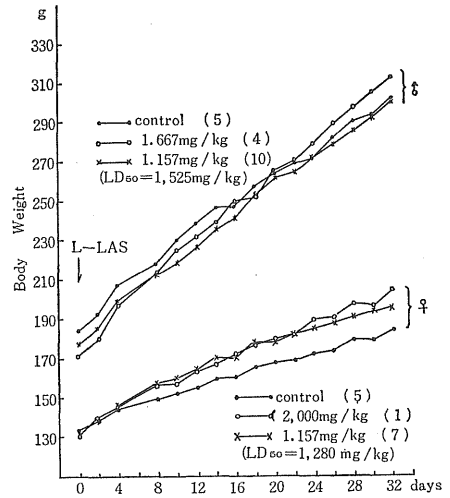


Fig. 4 Increasing of Body Weght of Survival Rats Adminitered with L-LAS

( ) no, of animals

Table III. Increasing Rate of Body Weigt for 32 days Survival Rats Adminisistered with L-LAS (Wistar starin)

SEX	Dose mg/Kg P.O.	No. of Animals	Initial Body Weight Mean ± S. E. (g)	Final Body Weight mean ± S. E. (g)	Increasing Rate mean ± S. E. (%)
♂	0	5	184.4 ± 4.78	302.4 ±12.05	163.8 ± 3.25
	1,667	4	171.3 ± 3.71	312.3 ± 8.38	182.9 ± 8.76
	1,157	10	176.6 ± 4.03	300.6 ± 6.32	170.6 ± 3.57
♀	0	5	133.8 ± 2.79	183.8 ± 5.77	137.3 ± 2.56
	2,000	1	130.0	205.0	157.7
	1,157	7	132.7 ± 3.69	196.1 ± 4.53	148.1 ± 2.89

病理組織学的所見：

解剖所見——LASならびにABSともに主として消化器系統に変化が見られ，胃は粘性をもち泡立つやや透明な液体で膨満し，腺胃部粘膜は暗赤色を呈していた，小腸はやや膨大し管壁は菲薄化，内腔は黄白色透明ゼリー状のもので満たされていた，大腸にもやや粘性を帯びた液がみられたが小腸に比し量は少なかった，肝臓が全体的に暗赤色を呈していた。

組織所見——LASおよびABSともに胃では粘膜下組織部の血管拡張，うっ血がみられたほか粘膜の表在上皮細胞の変性がみられた（Photo. 1）．小腸では絨毛先端部の上皮細胞が変性，融解の兆候をみせていた（Photo. 3）．大腸では粘膜上皮細胞の丈が低くなりうっ血もみられた（Photo. 5）．以上の消化器では粘膜細胞層の菲弱化が部位によっては中等度にみられた。肝臓は全体に軽度のうっ血を示し，類洞の拡張もみられた（Photo. 7）．その他の臓器では著変を認めなかった。

以上の所見は死亡例についてであるが屠殺した例でも，胃，小腸の粘膜上皮細胞の変化は軽度にあり，細胞層の菲薄化もみられ，うっ血も軽度にあった。肝臓ではうっ血が中等度にみられたが類洞の拡張はほとんどみられなかった。その他に著変はみられなかった。以上は死亡例に比し軽度の変化であった。

Table IV. Organ Weights after 32 days Administered With L-LAS (Wister strain)

SEX	Dose mg/kg P.O.	No. of Animals	Heart g/Rat / mg/100g	Liver g/Rat / g/100g	Kidney(l) mg/Rat / mg/100g	Spleen mg/Rat / mg/100g
♂	0	5	1,10±42[a] / 547±14	12.57±0.27 / 6.82±0.08	987±39 / 535±14	583±62 / 316±34
	1,667	4	1,005±30 / 587±21	12.05±0.57 / 7.07±0.49	1.008±43 / 589±24	567±24 / 297±38
	1,157	10	1,007±38 / 568±13	11.35±0.29 / 6.42±0.12	1,017±34 / 575±17	614±65 / 350±42
♀	0	5	659±36 / 491±19	7.67±0.36 / 5.72±0.16	652±20 / 487±8	373±41 / 278±27
	2,000	1	802 / 617	8.19 / 6.30		412 / 317
	1,157	7	697±24 / 525±8	7.68±0.32 / 5.78±0.11	639±18 / 482± 5	392±15 / 298±16

a) $S.E.=\sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{x})^2}{N(N-1)}}$

Photo. 1. Stomach of LAS and ABS H. E. ×100

Note ; Vasodilation and congestion in submucosa, degeneration in mucous epithelium.

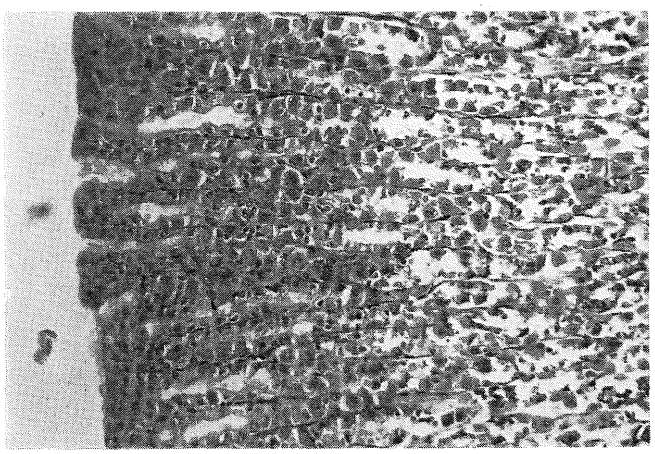


Photo. 2. Somach of control H. E. ×100

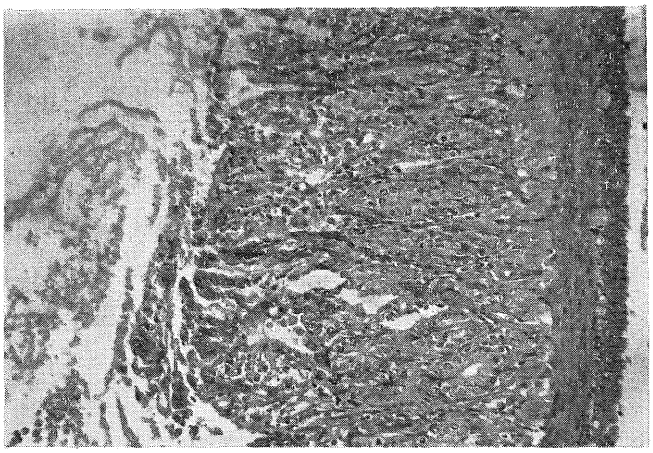


Photo. 3. Small intesinet of LAS and ABS H. E. ×100

Note ; Degeneration in mucous epithelium.

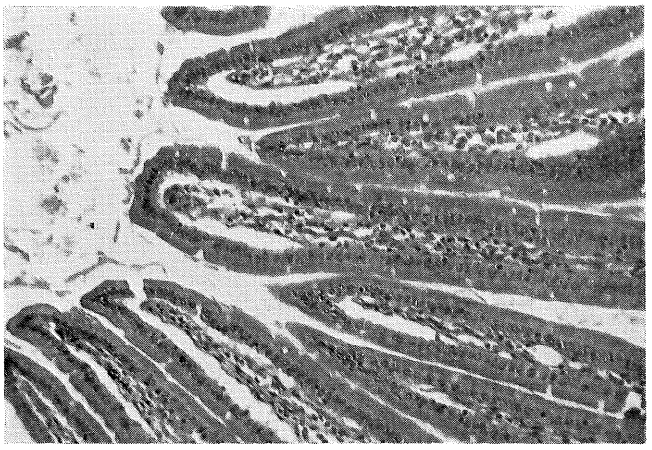


Photo. 4. Small intestine of control H. E. ×100

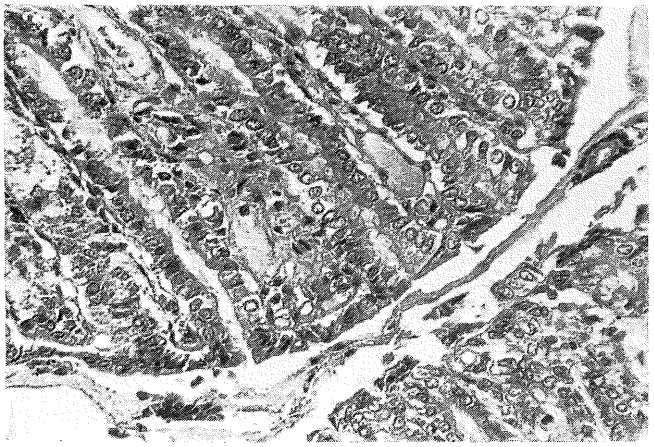


Photo. 5. Large intesine of LAS and ABS H. E. ×100

Note ; Decrease in cell height of mucous epithelium, and congestion.

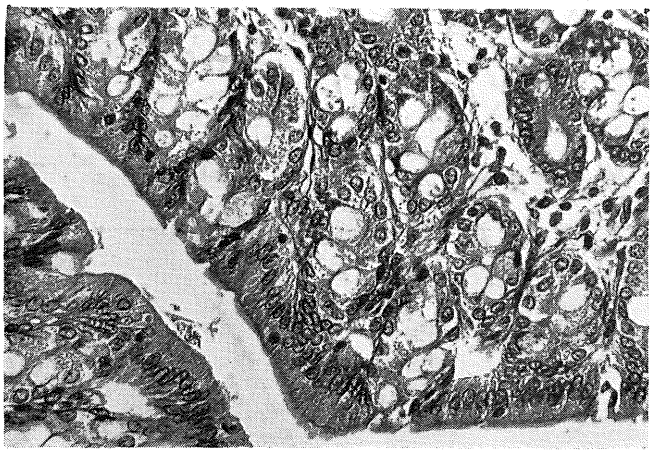


Photo. 6. Large intestine of control H. E. ×100

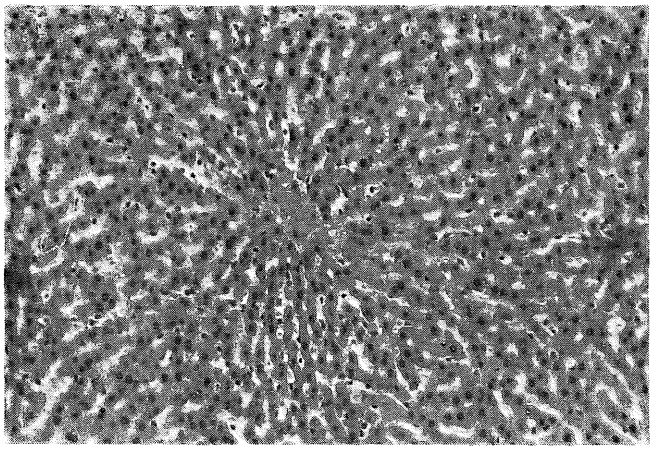


Photo. 7. Liver of LAS and ABS H. E. ×100

Note ; Dilatation in sinusoid and congestion.

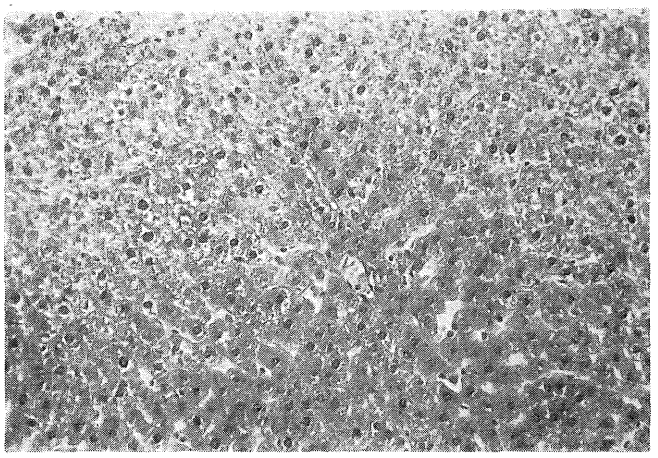


Photo. 8. Liver of control. H. E. ×100

考　　察

現在までに報告されたLASならびにABSの経口投与による LD_{50} 値の主なものは，次に示した通りで，

LAS, ABSのLD_{50}（経口）文献値

	動　物	LD_{50} 経口 mg/kg B.W.	研　究　者
LAS	ラット	1,500	Woodard (1945)[3]
	〃	1,260	Bornmann (1961)[4]
	〃	2,500	Cabejszek (1963)[5]
	〃	2,200	Drachev (1965)[6]
	〃	650	Oser (1965)[7]
	マウス	2,800	Woodard (1945)[3]
	〃	2,300	千　葉 (1972)[10]
ABS	ラット	1,220	Bornmann (1961)[4]
	〃	520	Oser (1965)[7]
	マウス	1,407	岡　原 (1963)[8]
	〃	2,320	伊　藤 (1965)[9]
	〃	♂ 2,150 ♀ 2,380	池　田 (1965)[9]

今回得た値と大体一致するものと考えられる。LD_{50}値は同種動物においても系統，性，飼育，環境，実験条件，その他多くの因子によりかなりの変動があることが知られており[2]，今回の実験においても，使用する動物の系統および使用時の体重により顕著な変動のあることが認められ，その変動幅は2～3倍になった。従って単一の LD_{50} 値をもって軽々に毒性の強度を判定することは極めて危険である。

LD_{50}の算定は，ヒトへの毒性を推定することが目的ではあるが，非常に困難で，多種の動物を使用する必要がある。多種の動物で大体同じオーダーの LD_{50} 値が得られた物質のヒトへの毒性は推定し易いが，それぞれ異なる場合は推定が困難となりヒトと近い代謝を示す動物を選ぶ等の特別の努力がなされなければならない[11]。本実験で用いた動物はラットとマウスのみで，今後イヌ等非ケツ歯類を用いた実験が必要であるが，今回ラットおよびマウスで得たLD_{50}値は本質的には差のないものと考えられる。

Hodgeら[12]は以下に示すように，ラットにおける経口毒性の程度をLD_{50}値より分類し，ヒトへの推定致死量を提出している。これに準拠して，今回得たLASおよびABSの毒性を判定すると中等度（Moderately toxic）ないし小（slightly toxic）ということが出来よう。

LASおよびABSの経口投与によるラットおよびマウスの死因は不明であるが症状は適用場所の消化管への局所作用と吸収（全身）作用にわけることができ，局所作用は刺激作用で下痢，胃腸管の充血，出血，粘膜の変性がみられた。吸収作用は，著明なものではないが中枢作用を思わせる鎮静と特にマウスで跳躍，痙攣，後肢麻痺が散見された。LAS，ABSの吸収作用は代謝，酵素への作用が考えられるので，この方面の研究の発展が期待される。

毒性の強さの分類（Hodge[12]らによる，一部改変）

毒性の程度	ラットLD50（経口）mg/kg B.W.	ヒト推定致死量
極　大 (Extrmely toxic)	＜ 1	ヒトロ，65mg
大 (Highly toxic)	1～50	茶匙一杯(4ml)
中　等　度 (Moderatelytoxic)	50～500	1 Ounce (30g)
小 (Slightly toxtc)	500～5,000	30～250g
極　小 (Practically non-toxic)	5,000～15,000	250～500g
ほとんど無害 (Pelatively harmless)	＞ 15,000	＞ 500g

LAS，ABSによるラットおよびマウスの死亡例の大多数の致死時間は20時間以内であり，用量致死率曲線の勾配も急峻であり，さらに生存例の発育も良好であることから蓄積性のないことがうかがわれ，このことは Michael (1968)[13] の，^{35}Sで標識された LAS，ABSのラットにおける代謝研究で，投与されたLAS，ABSは72時間以内に排泄されるとの報告によって裏付される。

体重増加に伴いLD_{50}値が減少したことは，用いる投与量は体重kg当りによるが，体重増加と受容体増加（metabolicall active weight）とが平行しないことによるものと考えられ，今後一層の検討を加えたい。

結　　論

直鎖形および分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LASおよびABS）の急性経口毒性（LD_{50}）をラットおよびマウスを用いて性別，体重別，系統別に検討した。結果は，LASとABSとの毒性の間には大差なく次のようであった。

1　LD_{50} は，LAS において Wistar SLC 系ラット（平均体重，雄 125.6～235.7g，雌 99.3～145.5g）で雄873～404mg/kg，雌760～409mg/kgであり，Wistar

系ラット（平均体重，雄166.4g，雌123.6g）で雄1,525mg/kg，雌1,280mg/kgであった。ddY/S系マウス（平均体重，雄27.2～27.4g，雌22.0～23.0g）で雄1,665～1,575mg/kg，雌1,950～1,850mg/kgであった。

ABSにおいてはWistar SLC系ラット（平均体重，雄112.3～212.1g，雌96.5～138.5g）で雄700～471mg/kg，雌625～438mg/kgであり，ddY/S系マウス（平均体重，雄22.7～30.3g，雌18.7～24.0g）で雄1,880～1,330mg/kg，雌2,090～1,670mg/kgであった。

2　LD_{50}に性差を認めなかった（同一日令について）。

3　LD_{50}は体重の増加とともに減少した。

4　LD_{50}にラットの系統差を認めた。

5　LASとABSとのLD_{50}間に有意な差は認めなかった。

6　症状はLASとABSとの間に大差なく，ラットでははげしい下痢と鎮静状態が，マウスでは一般には運動の不活発と軟便であったが，小数に跳躍，痙攣，体捻転，後肢麻痺がみられた。

7　肉眼的，組織学的変化は胃腸管系に強く，その他肝臓にうっ血等を認めた。

8　LASのLD_{50}付近量投与ラットの生存例は正常あるいはそれ以上の発育（体重増加）を示した。

9　以上結果にもとづき2，3の考察を行い，Hodgeらの分類に従いLASおよびABSの急性経口毒性の程度を小 "slightly toxic" ないし中等度 "moderately toxic" と考えた。

参考文献

1）Litchifield, J. T., JR and Wilcoxon F. : J. Pharmacol. Exptl. Therap., 96, 99 (1949).

2）Griffith, J. F. : Toxicol. Appl. Pharmacol., 6, 726 (1964).

3）Woodard, G. and Calvery H. O. : Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assn., 3, 1 (1945).

4）Bornmann, G. and hoeser A. : Fette. Seifen Anstichmittel. 63, 938 (1961).

5）Cabeiszek, I., Rybak M. and Styezynki B. ; Roczniki PZH, 14, 307 (1963).

6）Drachev, S. M., Bylinkina A. A. and Garshenin: V. F. Seientific Papers from Institute of Chemical Technology, Progue, 1964, Technology of Water, 8, (1), 161 (1964).

7）Oser, B. L. and Morgareidge K. Toxicol. Appl. Pharmacol., 7, 819 (1965).

8）田原国男，蔵行義雄，井関元八，谷口　繋，山田明男：食衛誌，4，15（1963）.

9）科学技術庁，中性洗剤特別研究報告（1965）.

10）千葉昭二：食衛誌，13，509（1972）.

11）Assn. Food and Drug Official of U. S. A., Appraisal of the Sofety of Chemical in Foods, Drugr and Cosmetics (1965).

12）Hodge, H. and Stener J. H. : Deichmann W. B. and Gerace, H. W. Toxicolgy of Drugs and Chemicals, Academic Press (1969).

13）Michael, W. R. : Toxicol. Appl. Pharmacol., 12, 473 (1968).

合成洗剤の毒性に関する研究（Ⅱ）
直鎖形および分岐鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウムの亜急性毒性について

米山允子* 藤井孝* 伊川三枝子*
柴英子* 坂本義光* 矢野範男*
小林博義* 市川久次* 平賀興吾*

STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETERGENTS (II) SUBACUTE TOXICITY OF LINEAR AND BRANCHED ALKYL BENZENE SULFONATES IN RATS

Masako YONEYAMA, Takashi FUJII, Mieko IKAWA, Hideko SHIBA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Norio YANO, Hiroyoshi KOBAYASHI, Hisatsugu ICHIKAWA and Kogo HIRAGA

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

Summary

1. A 6-month feeding study for subacute toxicity of the synthetic detergents has been completed in which the rats of a Wistar SLC strain were received 0.07, 0.2, 0.6 and 1.8% of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and branched alkylbenzene sulfonate (ABS) in the diet respectively,
2. In the rats received 1.8% of the LAS or ABS, such adverse effects were observed as a diarrhea, decrease in the body weight gain and the tissue damage in caecum liver and kidney. The damage in kidney was especialy remakable.
3. In the rats treated with 0.6% of the LAS or ABS, the adverse effects observed were a slight decrease of body weight, increase of caecum weight, increased activity of alkaline phosphatase, decrease of total protein in blood, and the tissue damage in kidney.
4. In the rats treated with 0.2% of the LAS or ABS, an increase of caecum weight and a slight damage of kidney were observed.
5. No adverse effects were produced in the rats treated with 0.07% of the LAS or ABS. An average intake of the drugs was approximately 40 mg/Kg body weight/day.

先に，直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）と分岐鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS）の急性毒性特に50%致死量を中心とした結果について報告したが[6]，今回は，ラット

*東京都立衛生研究所毒性部

を用い，26週間にわたって LAS および ABS を摂取させた亜急性毒性試験結果について報告する。

試験材料および試験方法

試料： 1)直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム (linear alkylbenzenesulfonic acid sodium salt 以下 LAS)。

花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60，Lot No. 127 を使用。

2) 分岐鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム(branched-chain alkylbenzene sulfonic acid sodium salt 以下 ABS)。

和光純薬工業株式会社製 Laurylbenzene sulfonic acid sodium salt Lot No. AL6526 を使用。

各試料のアルキル基の炭素数の分布および成分は次の通りであった。

	LAS	ABS
C_9	—	4.7%
C_{10}	10.6%	6.1%
C_{11}	34.1%	10.0%
C_{12}	27.7%	60.5%
C_{13}	19.0%	8.8%
C_{14}	8.7%	4.7%
C_{15}	—	4.4%
C_{16}	—	0.8%
有効成分	60±2%	95.5%
未反応油分	1.5%(以下)	1.6%
無機塩類	4.0%(以下)	2.9%
水　分	38 %	0.0%
pH（1%）	7.1	5.3
平均分子量	345.8	348.8

試験動物： ラット—静岡県実験動物農業協同組合において barrier system 下に生産された Wistar SLC 系雌雄（昭和47年5月1～2日生まれ）を使用した。動物は船橋農場製固型飼料 FII（水分6.6，粗蛋白質21.3，粗脂肪6.0，粗線維4.2，粗灰分6.0，可溶無窒素物55.9，ビタミンA950U，ビタミンD200U，ビタミンE 7.4mg/100g）および水道水を1週間自由摂取させ，発育経過良好な雄80-90g，雌65-80g のものを次の諸条件で試験に供した。

試験法：

試験試料——LAS, ABS ともに，その有効成分が1.8%，0.6%，0.2%，0.07%となるよう粉末F II 飼料に混合後固型化し水道水とともに自由摂取させた。なお，対照として F II 固型飼料を与えた。

飼育環境——室温 25±1°C，湿度55～65%，照明時間，午前6時～午後6時

飼育方法——各試料濃度段階でラット雌雄夫々10匹を用い，5匹ずつ同一ステンレス金網ケージで飼育した。試料投与期間は26週とし試料投与開始は昭和47年5月30日，終了は11月27日である。飼育期間中毎週体重，飼料および試料摂取量，飲水量を測定し，症状観察，ケージ交換を行なった。

試料摂取量は1匹当りの平均摂取量と体重 kg 当り摂取量を次の様に求めた。

（投与量－残量－コボシ量）×濃度/匹数ないし体重 kg,

試験終了時に次の諸項目について検索した。

①血液学検査：a ヘモグロビン（シアンメトヘモグロビン法)，b ヘマトクリット，c 赤血球数，d 白血球数，e 白血球分画，f 血小板数 (Fonio 法)，g 赤血球膜抵抗 (Parpart 法)，h 血液凝固時間 (Sahli-Fonio 法)

a から f は剖検の1週間前にラットを背位に固定し，わずかに大伏在静脈を露出後 1/3 注射針で軽く穿刺し湧出する血液を採取した。

g は剖検時断頭により放出する血液を 1.0% EDTA 塗布乾燥した時計皿に約 1 m*l* の血液をとり素早くガラス棒でかき混ぜ，各濃度食塩水中に 0.05m*l* を注入し法の如く測定した。測定結果は溶血曲線の0.35%から0.5%食塩水間の4点の溶血度の総和で表わした。h は g と同様放出する血液約1.0m*l* を時計皿にとると同時にストップウォッチを発動させ，15秒ごとに法に従って開始時間と完結時間を測定した。

②血清生化学検査：剖検時断頭により放出する血液を直接ポリエチレン製遠心管に採取し，30分室温放置後 2°C 冷却遠心機を用い 3,000rpm 15分遠心し，血清を分離採取後次の項目を検査した。

a 総蛋白量(エルマ蛋白計)，b GOT 活性(Retman-Frankel 法)，c ALP 活性(King-Armstreng 法)，d LAP 活性（竹中らの法)，e 尿素窒素量 (Urease-Indophenol 法)，f A/G 比（電気泳動法)，g ビリルビン量 (Evelyn-Malloy 法)。

③尿検査：剖検2週間前に，尿尿を分離採取した尿について次の項目を試験紙 Labstix, Ictostix, Urobilistix を用いて検査した。

a 蛋白，b グルコース，c ケトン体，d 潜血，e ビリルビン，f ウロビリノーゲン

④剖検：肉眼的所見観察

⑤臓器重量測定：脳，下垂体，甲状腺，胸腺，心，

肺，肝，腎，脾，副腎，前立腺，精巣，子宮，卵巣，盲腸の実重量と25週目の体重にもとづき 100g 体重あたりの重量を求めた。

⑥病理組織学検査：重量測定臓器以外の胃，大小腸，膵，精巣上体，皮膚，骨についても法の通り処理し，H.E. 染色の他 PAS 反応，鉄染色，脂肪染色等により鏡検した。

試験結果

① 体重，飼料摂取量，飲水量および一般症状の推移

結果は Table 1 および Fig 1～4 に示す通りで，体重増加は，LAS, ABS 各々1.8％群において雌雄とも著明な抑制がみられ，0.6％群においてはわずかではあるが有意な抑制ないし抑制傾向がみられた。これらの体重増加抑制は LAS 群より ABS 群の方に強くあらわれた。0.2％群，0.07％群においては対照群と比較して有意な差は認められなかった。

飼料摂取量は LAS, ABS 各1.8％群雌雄を除けば対照群に比べて，ほぼ変わりなかったが，1.8％群では少量の傾向がみられた。

飲水量は，やや LAS の高濃度群で少量，ABS の高濃度群で多量の傾向がみられた他は対照群とほとんど差は認められなかった。

Table I. Body Weight Gain, Food, Detergent, Water Intake and Feces Excreation

	Group	No. of Rats	Initial Body wt. (g) mean ± S. E.[1]	Final Body wt. (g) mean ± S. E.	Body weight Gain (%)[2] mean ± S. E.	Food (g) /rat /day	Detergent (mg) /rat /day	Detergent (mg) /kg /day	water (g) /rat /day	Feces (g) /rat /day
Male	Control	10	85.00±0.871	387.00±9.509	452.10± 9.841	14.17			16.90	2.31
	ABS- 1.8%	10	88.20±1.209	178.80±5.974	205.48± 7.594**	7.81	140.58	939.6	21.12	1.72
	ABS- 0.6%	10→9	85.30±1.229	351.55±6.587	414.98± 7.431**	12.27	73.62	297.7	17.31	2.29
	ABS- 0.2%	10	82.40±0.933	385.60±5.288	468.84±10.237	13.90	27.80	102.9	20.07	2.51
	ABS- 0.07%	10	85.10±1.417	393.10±6.309	462.80± 9.360	13.14	9.20	33.8	16.71	1.95
	LAS- 1.8%	10→9	85.20±0.553	290.00±5.206	341.09± 5.136**	9.84	177.12	814.8	13.29	1.78
	LAS- 0.6%	10	86.40±1.543	365.80±8.517	426.23± 8.893	13.84	83.04	322.3	16.28	2.23
	LAS- 0.2%	10	84.50±0.957	383.40±6.715	453.92± 7.603	13.70	27.40	101.5	18.18	2.28
	LAS- 0.07%	10	80.90±1.923	387.10±5.930	480.74±13.113	14.48	10.14	37.2	16.91	2.24
Female	Control	10	71.80±0.512	202.50±2.325	282.24± 4.422	9.35			17.48	1.53
	ABS- 1.8%	10	72.90±0.690	117.40±2.709	161.00± 3.219**	5.79	104.22	1001.9	19.37	1.14
	ABS- 0.6%	10	73.60±0.871	179.00±4.555	243.49± 6.687**	8.19	49.14	335.9	18.71	1.79
	ABS- 0.2%	10	70.30±0.816	190.10±4.583	270.15± 4.340	8.45	16.9	107.7	16.29	1.55
	ABS- 0.07%	10	71.20±1.142	202.40±4.445	284.43± 5.342	8.62	6.03	37.0	14.55	1.29
	LAS- 1.8%	10	74.30±0.943	158.80±3.411	214.02± 5.288**	7.01	126.18	913.0	12.14	1.23
	LAS- 0.6%	10	74.10±0.673	195.80±4.149	264.25± 5.207*	9.04	54.24	332.2	13.99	1.53
	LAS- 0.2%	10	74.30±1.116	201.10±3.334	271.05± 5.314	8.90	17.8	108.7	17.69	1.39
	LAS- 0.07%	10	76.00±2.683	203.20±7.172	269.35±10.255	9.35	6.55	39.4	19.56	1.63

[1] S. E. $=\sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{x})^2}{N(N-1)}}$ *P<0.05 **P<0.01 [2] (Final B. W/Initial B. W−1)×100

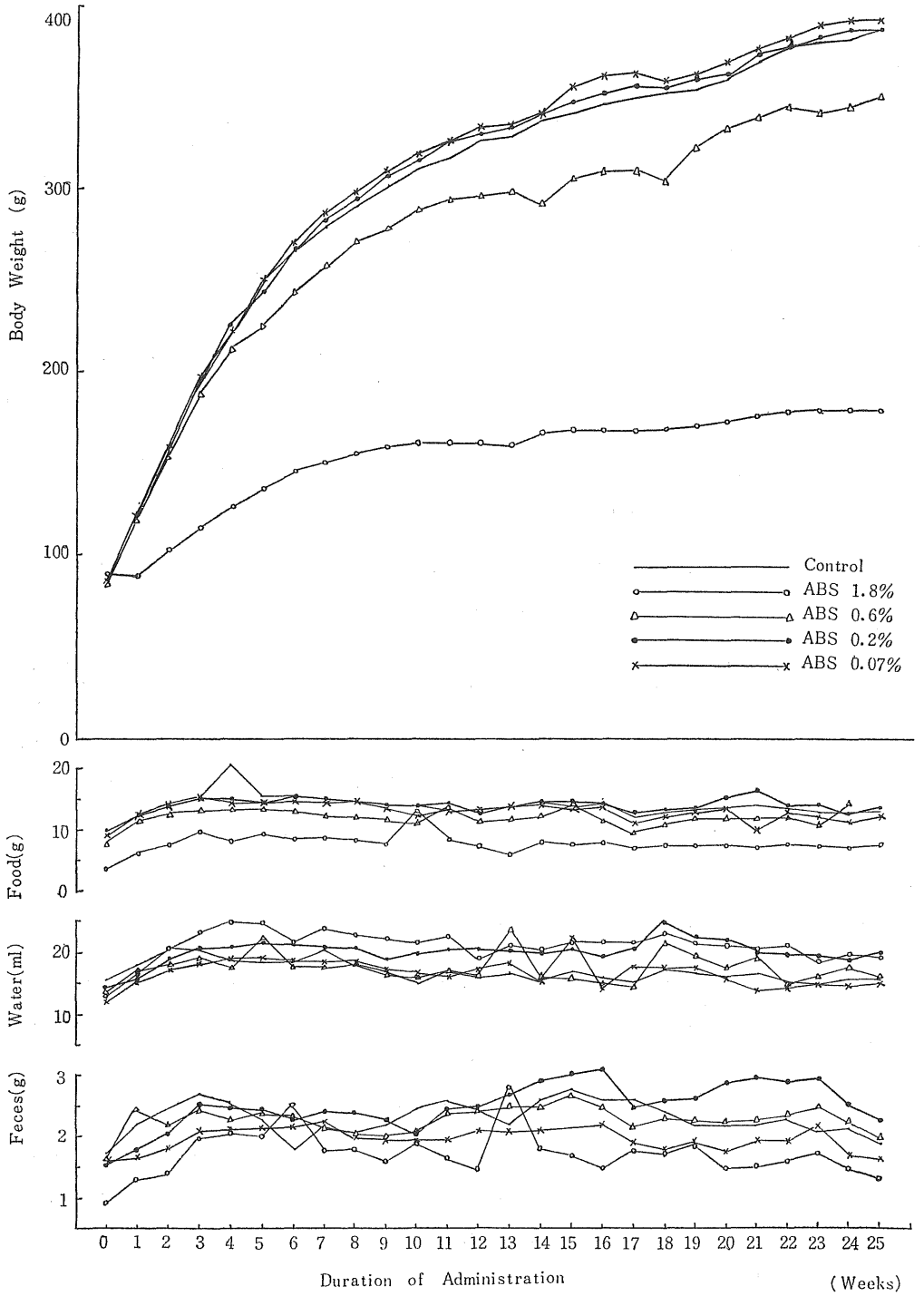


Fig 1. Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excreation ABS-Male

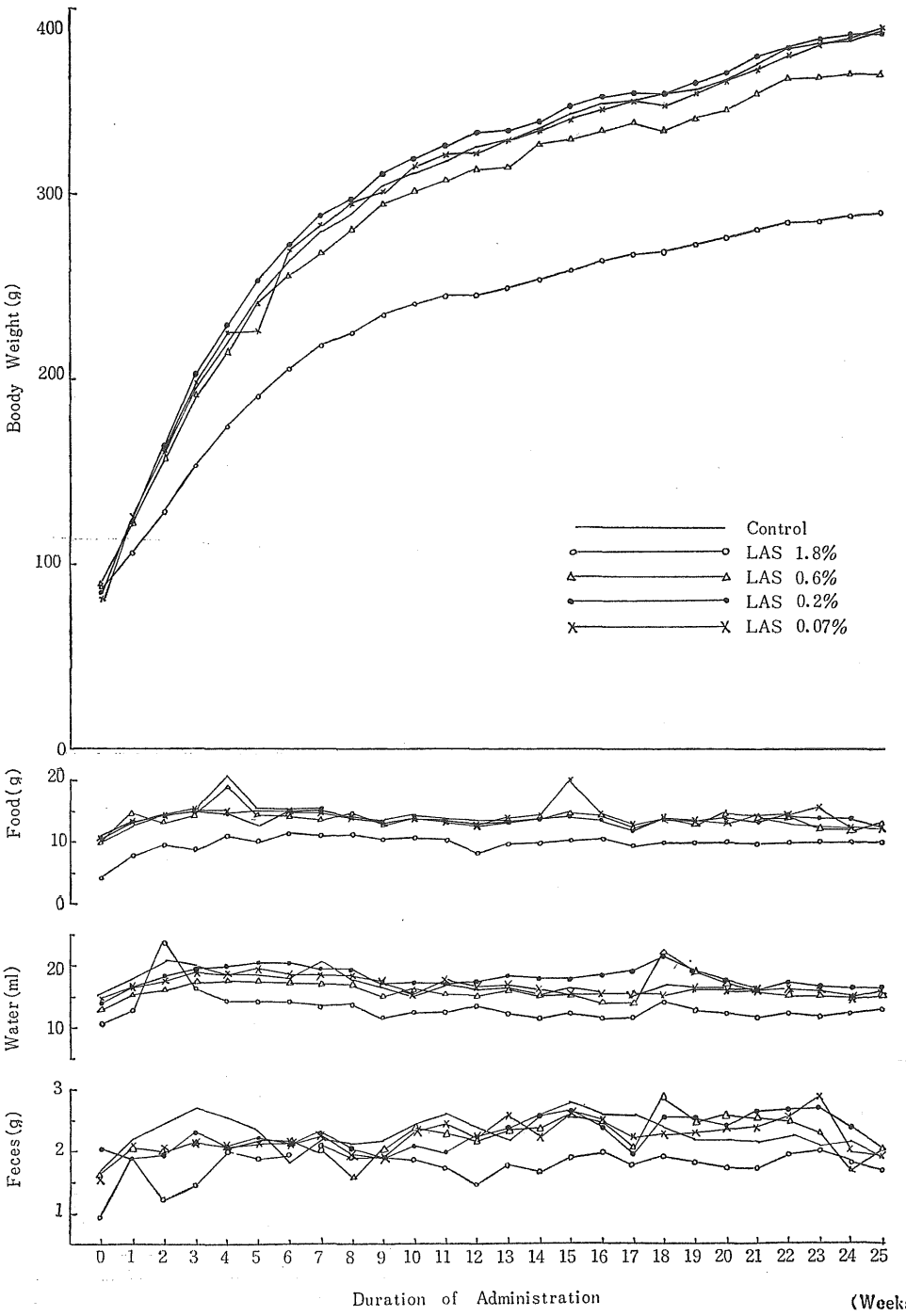


Fig 2. Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excreation LAS-Male

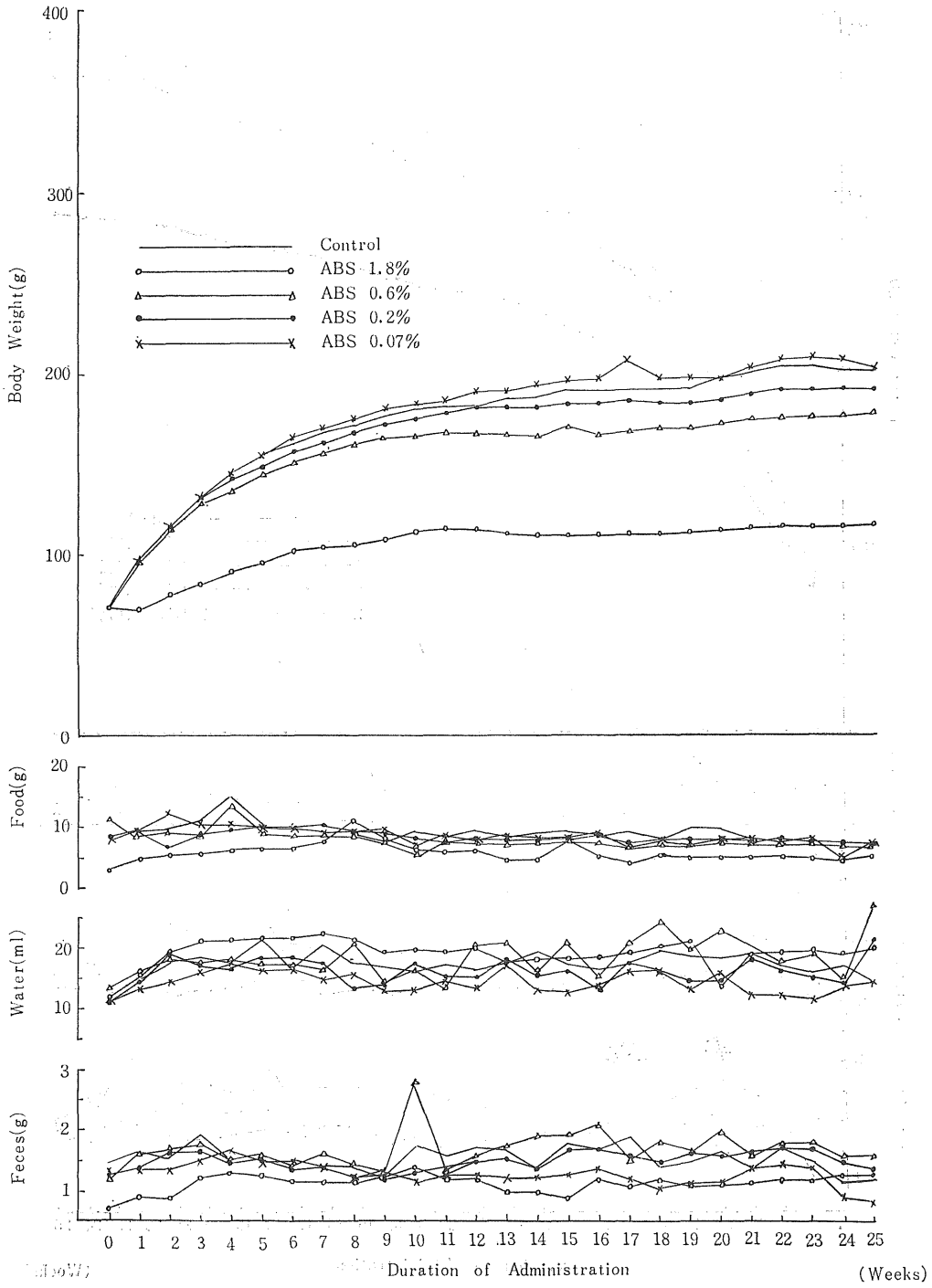


Fig 3. Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Extcreation ABS-Female

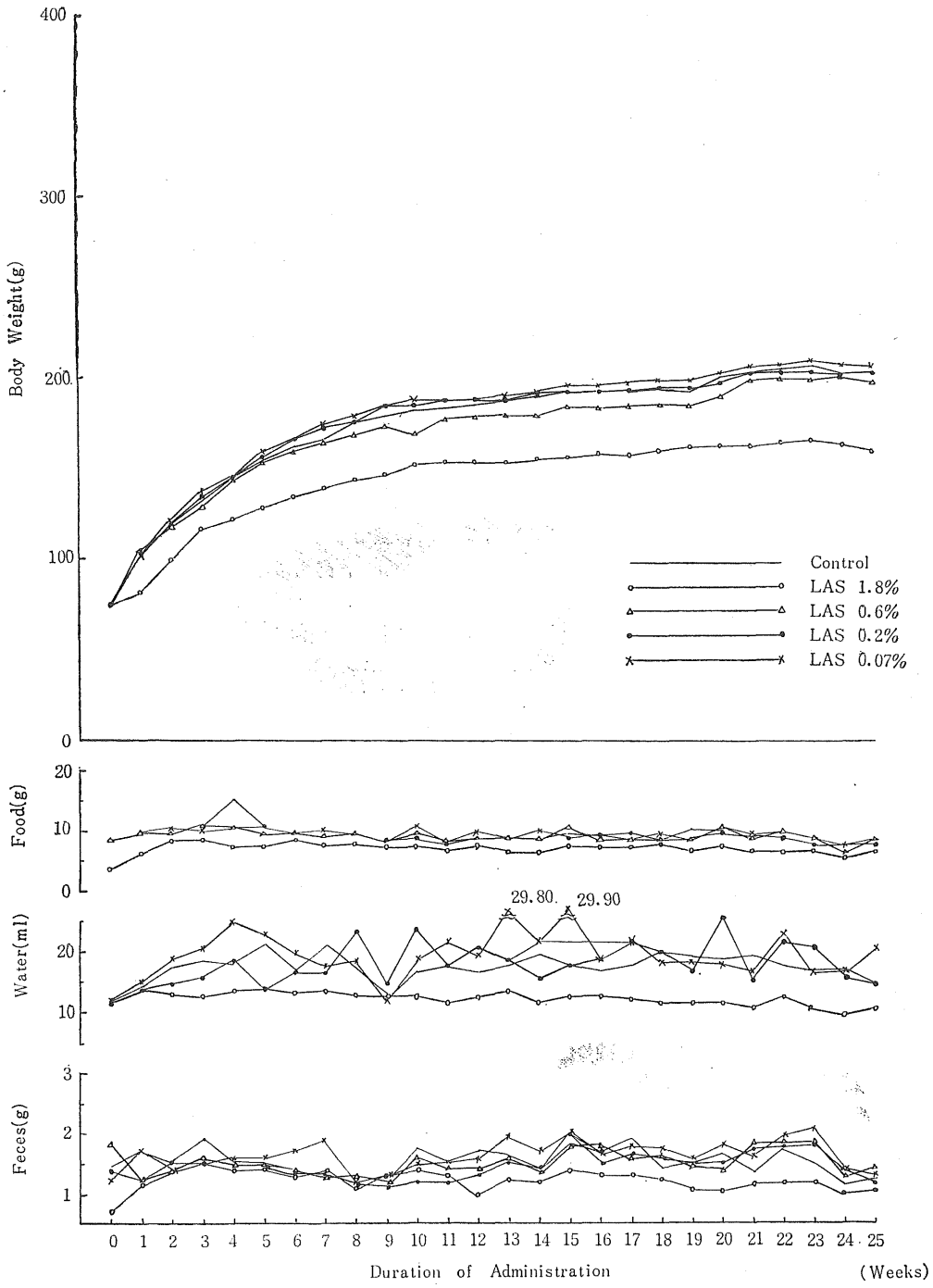


Fig 4. Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excreation LAS-Female

一般疾状は LAS, ABS 各高濃度群で試験開始直後より強度の下痢が起こり，1週間位で徐々に軽度の下痢となったが，試験最終日まで回復しなかった。動作は鈍く，下腹部が汚れていた。ABS 0.6%群では雌雄とも投与後軟便が生じたが直ぐに回復した。

ABS 1.8%雌雄において，試験開始後，雄では約4週間目より，雌では1週間から2週間目に後頭重に脱毛が生じ，雄では脱毛後2週間で，雌では4週間で再生した。LAS では脱毛しなかった。

飼育期間中18週目に ABS 0.6% 群雄1例，24週目に LAS 1.8%群雄1例が死亡した。

以上の他には異常所見を認めなかった。

③血液学検査 結果は Table Ⅱ，Ⅲに示すようで，赤血球関連では，LAS, ABS 各1.8%群雌のヘマトクリット，ヘモグロビンの有意な低下と赤血球膜抵抗において有意な増加がみられた。白血球関連では LAS, ABS 各高濃度群雌雄において白血球数の増加と分画百分率で好中球の増加，リンパ球の減少がみられた。これらの他には著変を認めなかった。

③血清生化学検査 結果は Table Ⅳ に示す通りで，諸検査項目中用量に伴う有意の変化を示したものは LAS, ABS 各群ともに ALP の増加と総蛋白量の低下であった。

④尿検査 結果は Table Ⅴ に示すようで，対照群に較べて特に差のあるものはなかった。

⑤臓器重量 結果は Table Ⅵ，Ⅸ に示す通りで，LAS, ABS 各1.8%群雌雄においては盲腸と ABS 雌における腎臓を除いて実重量は小さく，比重量は減少を示した心臓を除き，特に ABS 群において大きい値を示すものが多かった。盲腸は用量に伴う実重量と比重量の増大を示し，ABS 1.8%群雌の腎臓は雄と相異して実重量の増大が認められた。この他 ABS 群の肝臓比重量がやや用量に伴う増大傾向を示した。この他には注目する変動はなかった。

⑥ 剖検所見 LAS 群では著変がみられなかったが，1.8% 群雄2例，雌5例に通常の肝臓の色調よりも薄く，黄白色を混じたような感じを受けるものがあった。この他 0.2%群雌の1例に軽度の肺膿瘍がみられた。

ABS 群で変化のみられたものは1.8%群であり，特に雌では削痩，被毛粗剛が目立ち，内部所見では皮下・腹腔内ともに脂肪が少なく，また，腎臓は汚褐色を呈し，表面は全体的に小さな凹凸があり割を入れる際にキシキシとして堅い感じで，割面は皮質部が狭く，皮質から髄質にかけて粟粒大の嚢胞が散在していた。この他，腸管全体が少々弛緩した感じがした，雄でも雌と同様の変化がみられたが，出現例数も少なく程度も軽度であった。

試験途中死亡例の剖検——LAS 1.8%群雄の1例は腹部の膨満が顕著であった。これは胃，小腸の膨満によるもので，胃から空腸前半部までの内容は黒紫色の液体で，その後回腸にかけては半透明な粘性の強いゼラチン様物質で充填されていた。

ABS 0.6%群雄の1例は削痩，被毛粗剛化が目立ち，腎臓は黒褐色で小さかった。頭蓋側頭部内側附近に大豆大の腫瘤があり，これに側面と上面から圧迫された小脳右半分は容積を減じ変形していた。また，脳膜下腔内には液体が貯留し，下垂体は被膜を残し，融解していた。

⑦病理組織所見 主な変化所見は排泄器官の腎臓次いで代謝排泄器官の肝臓，試料適用・吸収排泄器官の腸管でみられ，その他臓器では著変を認めなかった。腎，肝，大腸の所見の程度と頻度を一括し Table Ⅹ，Ⅺに示した。

腎臓での組織所見は LAS, ABS，用量，雌雄間に変化の程度，発現頻度に差があったが，先ず主な所見をあげると，

①中等度の萎縮を示す糸球体がび慢性に出現していた（Photo. 2)。

②糸球体が血管腔の拡張，間質の膨化により全体として膨化していた（Photo. 3)。

③糸球体間質が軽度に，しかしび慢性に融解していた（Photo. 4)。

④近位尿細管上皮細胞の混濁腫脹・空胞変性がみられた（Photo. 6,7)。

⑤近位尿細管上皮細胞質に核と同大程度の黄褐色小塊がみられた（これはベルリン青法，Schmorl 反応，HuecK 法，Lilie 法などを用いて検索の結果，ほとんど lipofuscin で一部は melain も混じっているものであることを確認した）（Photo. 6,7,8)。

⑥ヘンレ係蹄部管腔中に H. E. 染色で青鉛色を呈し PAS 反応強陽性を示す物質が同心円状に層を形成したり，又は小片状で存在していた（Photo. 10,11)。

⑦遠位尿細管の管腔拡張と上皮細胞の扁平化がみられた（Photo. 12)。

⑧尿細管が崩壊していた（Photo. 13,14)。

⑨間質では税周囲結合織の膨化と浮腫がみられた（Photo. 13,14)。であり，

①の所見は対照群雌雄にも軽度に出現したが，LAS 1.8%群雌雄，ABS 1.8%群雄，LAS 0.6%群雌雄で

Table II. Hematology

			No. of Rats	RBC X10⁴/mm³	Ht (%)	Hb (g/dl)	MCH(rr)	MCV(μ³)	MCC (%)	Thrombocyte X10⁴	Osmotic Fragility	Whole blood clotting time (min.) beginning	Whole blood clotting time (min.) ending
Male	Control		10	910±13[1)]	53.1±0.4	19.8±0.3	21.8±0.4	58.4±1.0	37.4±0.6	70.5± 9.0(8)[2)]	213.6± 9.4(9)	1.06±0.13	2.12±0.26
	ABS-	1.8%	10	876±21	52.7±0.2	19.3±0.5	22.1±0.4	60.4±1.5	36.7±0.9	72.1± 5.7(9)	234.9± 6.8(8)	1.30±0.19	2.53±0.23
		0.6%	9	887±24	53.5±0.4	19.7±0.3	22.4±0.8	60.7±1.9	36.9±0.3	50.1± 4.3(8)	214.6± 7.2(9)	1.50±0.20	2.63±0.25
		0.2%	10	939±31	52.7±0.3	19.4±0.1	20.8±0.6	56.6±1.8	36.8±0.2	72.2± 6.4(8)	225.2± 5.4(8)	0.94±0.12	1.72±0.21
		0.07%	10	948±30	53.4±0.5	19.7±0.2	20.9±0.6	56.7±1.5	36.8±0.3	73.7± 7.8(9)	208.7± 5.6(9)	1.36±0.16	2.45±0.24
	LAS-	1.8%	9	924±27	54.6±0.4	20.6±0.5	22.4±0.8	59.3±1.3	37.7±0.8	70.2± 4.9(8)	199.9± 6.6(9)	1.14±0.11	2.32±0.27
		0.6%	10	890±14	54.0±0.4	19.8±0.1	22.3±0.3	60.7±0.9	36.7±0.1	71.6± 8.4	211.4± 7.9	1.42±0.23	2.71±0.29
		0.2%	10	914±25	53.3±0.3	19.5±0.1	21.5±0.6	58.6±1.6	36.7±0.2	64.4± 5.5(9)	228.1± 6.5(9)	1.34±0.19	2.50±0.35
		0.07%	10	925±20	53.3±0.4	19.6±0.1	21.2±0.5	57.8±1.2	36.7±0.2	80.1±13.2	225.1±10.5	1.40±0.19	2.52±0.33
Female	Control		10	838±22	52.1±0.5	19.9±0.5	23.9±0.9	62.5±1.6	38.2±1.0	52.0± 3.8(9)	240.4± 7.5(8)	1.29±0.29	2.95±0.30
	ABS-	1.8%	10	809±14	50.0±0.4**	18.3±0.2*	22.7±0.6	62.0±1.2	36.6±0.3	66.7± 6.1(8)	174.2±15.4(7)*	1.56±0.23	3.29±0.23
		0.6%	10	813±15	50.4±0.4*	18.9±0.1	23.2±0.3	62.2±1.0	37.3±0.2	69.4± 8.7(9)	229.3± 7.9(9)	1.16±0.16	2.65±0.23
		0.2%	10	823±20	49.7±1.7	19.1±0.1	23.3±0.5	60.5±2.5	39.1±1.9	64.4± 3.7(9)	227.1±15.0	1.25±0.22	2.97±0.32
		0.07%	10	829±95	51.2±0.3	19.0±0.1	22.9±0.3	61.8±1.0	37.1±0.2	69.1± 6.9(9)	230.4± 6.4(9)	0.99±0.14	2.50±0.20
	LAS-	1.8%	10	785±14	49.5±0.3**	18.0±0.1**	23.0±0.4	63.2±0.9	36.4±0.1	58.4± 4.5(9)	181.8± 6.5(8)*	1.37±0.14	2.57±0.19
		0.6%	10	795±17	50.9±0.3	19.0±0.1	24.0±0.5	64.2±1.1	37.4±0.2	54.8± 3.3(9)	226.0± 5.9(9)	1.24±0.17	2.81±0.22
		0.2%	10	778±16	51.1±0.2	19.1±0.1	24.7±0.4	65.9±1.3	37.5±0.2	59.8± 5.9(9)	245.4± 9.3(9)	1.26±0.19	2.92±0.22
		0.07%	10	806±18	50.6±0.4	18.9±0.1	23.6±0.6	63.0±1.5	37.4±0.3	63.3± 5.3(8)	248.4±10.2	1.22±0.21	3.30±0.41

[1)] mean ± S.E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ [2)] ( ) No, of rats

Table III-1 Percent Differential of Leucocytes

Group			No. of Rats	Neutro	Lympho	Mono	Eosino
Male	Control		10	9.8±0.876[1]	89.08±0.954	0.28±0.102	0.83±0.203
	ABS-	1.8%	10	17.18±0.948**	81.85±1.033**	0.31±0.093	0.64±0.181
		0.6%	9	12.80±0.783**	85.97±0.865*	0.43±0.071	0.77±0.197
		0.2%	10	10.91±0.879	87.86±1.090	0.50±0.143	0.71±0.129
		0.07%	10	10.45±1.143	88.37±1.247	0.52±0.105	0.64±0.157
	LAS-	1.8%	9	12.09±0.698*	87.22±0.624	0.09±0.061	0.58±0.164
		0.6%	10	10.77±1.017	87.82±0.860	0.26±0.094	0.60±0.158
		0.2%	10	10.34±0.521	88.22±0.625	0.40±0.102	0.62±0.128
		0.07%	10	9.41±1.074	89.35±0.998	0.50±0.088	0.73±0.125
Female	Control		10	8.24±0.56	90.85±0.685	0.18±0.073	0.72±0.150
	ABS-	1.8%	10	16.02±0.919**	82.83±0.988**	0.31±0.069	0.82±0.169
		0.6%	10	8.36±0.535	90.83±0.569	0.13±0.069	0.61±0.118
		0.2%	10	9.14±0.573	89.88±0.564	0.23±0.077	0.73±0.153
		0.07%	10	8.02±0.484	91.02±0.523	0.14±0.072	0.80±0.185
	LAS-	1.8%	10	8.67±0.747	90.61±0.762	0.28±0.076	0.42±0.108
		0.6%	10	10.21±1.054	88.49±1.065	0.32±0.071	0.96±0.143
		0.2%	10	8.75±0.754	90.15±0.781	0.38±0.096	0.70±0.146
		0.07%	10	8.65±0.752	90.39±0.771	0.40±0.099	0.54±0.108

[1] mean ± S.E. * $P<0.01$ ** $P<0.05$

Table III-2 Counts Differential of Leucocytes $\times 10^2/mm^3$

Group			No. of Rats	WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino
Male	Control		10	88.12±3.686[1]	8.49±0.678	78.65±3.779	0.24±0.087	0.67±0.148
	ABS-	1.8%	10	108.92±6.153**	18.76±1.617	89.10±5.043	0.37±0.116	0.68±0.197
		0.6%	9	94.97±4.945	12.06±0.723	74.45±9.473	0.41±0.068	0.73±0.187
		0.2%	10	93.22±4.578	9.50±1.274	81.86±4.077	0.48±0.124	0.66±0.115
		0.07%	10	91.30±3.697	10.40±1.058	89.71±4.066	0.52±0.105	0.65±0.169
	LAS-	1.8%	9	96.16±5.726	11.78±1.113	83.76±4.805	0.08±0.057	0.54±0.142
		0.6%	10	91.47±5.430	9.96±1.154	80.27±4.686	0.25±0.088	0.58±0.142
		0.2%	10	90.55±6.435	9.61±1.166	79.64±5.196	0.36±0.089	0.60±0.155
		0.07%	10	96.15±3.329	9.08±1.077	85.85±2.913	0.50±0.093	0.71±0.135
Female	Control		10	92.00±3.802	7.59±0.579	83.57±3.517	0.16±0.066	0.67±0.139
	ABS-	1.8%	10	138.60±7.863**	22.26±1.783**	114.72±6.503**	0.45±0.099*	1.16±0.243
		0.6%	10	101.70±7.059	8.58±1.021	92.33±6.271	0.13±0.069	0.60±0.126
		0.2%	10	93.50±4.995	8.64±0.821	83.99±4.455	0.19±0.065	0.66±0.135
		0.07%	10	92.60±3.730	7.36±0.431	84.34±3.574	0.12±0.062	0.76±0.182
	LAS-	1.8%	10	109.30±3.831**	9.34±0.664	95.03±7.208	0.31±0.085	0.47±0.120
		0.6%	10	87.90±3.631	8.87±0.847	77.89±3.679	0.26±0.058	0.85±0.133
		0.2%	10	83.15±4.350	7.38±0.637	76.67±5.063	0.32±0.078	0.61±0.138
		0.07%	10	94.40±5.110	8.36±1.176	85.13±4.180	0.37±0.091	0.51±0.101

[1] mean ± S.E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table IV. Serum Chemistry

	Group	No. of Rats	ALP K-A Unit/dl	LAP G-R Unit	GOT karmen Unit/ml	UN mg/dl	A/G Ratio	Total Protein g/dl	Bililubin (Indirect) mg/dl	Bililubin (Direct) mg/dl	Bililubin Total mg/dl
Male	Control	10	24.07±1.109 [1]	185.81± 9.586	132.75± 6.357	16.92±1.102	1.42±0.082	7.36±0.071	0.20±0.050	0.11±0.036	0.29±0.044
	ABS– 1.8%	10	48.07±4.245**	173.87± 5.327	155.85± 8.575*	18.33±1.104	1.83±0.086**	6.06±0.089**	0.13±0.054(6) [2]	0.16±0.051(6)	0.30±0.075(6)
	ABS– 0.6%	9	29.64±1.516**	178.78± 7.826	143.66±10.463	12.97±0.996*	1.68±0.114	7.00±0.066**	0.81±0.493	0.17±0.039	0.96±0.528(9)
	ABS– 0.2%	10	24.06±1.223	174.44± 6.937	137.40± 8.118	15.82±0.876	1.49±0.100	7.14±0.072*	0.09±0.044	0.11±0.031	0.16±0.061
	ABS– 0.07%	10	23.82±1.357	174.64±10.178	112.50± 7.596	13.81±0.929*	1.53±0.120	7.32±0.089	0.15±0.058	0.08±0.02	0.23±0.064
	LAS– 1.8%	8	44.96±4.017**	179.80± 9.747	139.12± 9.397	16.30±0.634	1.59±0.129	6.55±0.191**	0.40±0.250	0.12±0.027	0.48±0.268
	LAS– 0.6%	10	29.22±1.093**	180.54± 7.897	133.50± 5.559	15.76±0.611	1.46±0.096	7.20±0.084	0.30±0.201	0.32±0.211	0.56±0.415
	LAS– 0.2%	10	24.34±1.173	181.23± 9.637	140.25±14.732	13.04±1.224*	1.47±0.091	7.20±0.059	0.41±0.231	0.31±0.188	0.68±0.422
	LAS– 0.07%	10	25.48±0.816	178.99± 9.427	144.60±11.501	15.36±1.221	1.38±0.082	7.26±0.118	0.35±0.201	0.34±0.197	0.64±0.401
Female	Control	10	24.41±1.380	198.54± 8.899	156.30±12.716	17.52±1.733	1.53±0.062	7.80±0.122	0.12±0.050	0.14±0.054	0.23±0.054
	ABS– 1.8%	10	56.38±4.445**	224.27±15.799	153.75± 7.666	20.40±1.607	1.55±0.092	6.50±0.195**	0.17±0.057(6)	0.14±0.028(6)	0.31±0.062(6)
	ABS– 0.6%	10	35.35±2.679**	186.80±12.509	125.85± 5.213*	15.67±1.037	1.65±0.072	7.24±0.180*	0.13±0.036	0.12±0.036	0.25±0.068
	ABS– 0.2%	10	27.12±1.634	206.32±17.320	127.80± 3.980*	18.18±1.049	1.71±0.079	7.41±0.161	0.14±0.047(9)	0.09±0.031(9)	0.23±0.069(9)
	ABS– 0.07%	10	25.03±1.655	197.88±12.571	131.10± 5.715	16.51±1.214	1.79±0.080*	7.60±0.129	0.14±0.043	0.11±0.026	0.25±0.065
	LAS– 1.8%	10	61.41±6.124**	208.72± 9.097	154.60± 8.297	19.00±1.043	1.76±0.121	6.42±0.127**	0.12±0.025(9)	0.12±0.033(9)	0.25±0.054(9)
	LAS– 0.6%	10	31.80±1.599**	187.58±10.642	139.50± 3.024	17.15±2.020	1.70±0.097**	7.22±0.186*	0.14±0.036	0.12±0.038	0.27±0.062
	LAS– 0.2%	10	27.23±1.049	193.65± 7.686	146.55± 9.144	14.14±1.404	1.48±0.164	7.38±0.184	0.20±0.044(9)	0.11±0.023(9)	0.31±0.052(9)
	LAS– 0.04%	10	25.77±1.237	192.23± 8.056	128.25± 5.432	15.09±1.245	1.72±0.067	7.68±0.163	0.15±0.059(9)	0.10±0.018(9)	0.24±0.066(9)

[1] mean ± S.E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ [2] ( ) No. of Rats

Table V. Urinalysis

Group		No. of Rats	pH				Protein					Glucose		Keton			Blood			Bilirubin		Urobilin	
			8	7	6	5	−	±	+	++	+++	−	+	−	±	+	−	±	+	−	+	0.1*	1
Male	Control	10	1	4	5				7	2	1	10		7	3		10			10		10	
	ABS- 1.8%	10	1		9		2	7	1			10		10			10			10		8	2
	ABS- 0.6%	9		4	5			2	5	2		9		4	5		9			9		8	1
	ABS- 0.2%	10	2	2	6		1	2	3	4		10		6	4		9	1		10		10	
	ABS- 0.07%	10			10			1	4	4	1	10		4	6		10			10		9	1
	LAS- 1.8%	9			9				2	3	4	9		2	7		9			9		9	
	LAS- 0.6%	10		5	5			2	5	2	1	10		5	5		10			10		10	
	LAS- 0.2%	10		2	8			4	3	3		10		6	4		10			10		10	
	LAS- 0.07%	10		4	6		1		6	1	2	10		8	2		10			10		10	
Female	Control	10	2	2	6		2	2	5	1		10		5	5		10			10		10	
	ABS- 1.8%	10		1	9		10					10		10			10			10		10	
	ABS- 0.6%	10	2	2	6		1	2	2			10		5	5		10			10		9	
	ABS- 0.2%	10	4	2	4		1	5	3	1		10		6	4		10			10		10	
	ABS- 0.07%	10	3	1	6		4	2	3	1		10		9	1		10			10		10	
	LAS- 1.8%	10	1		9		3	3	4			10		4	5		10			10		9	
	LAS- 0.6%	10		5	5		2	3	2	3		10		7	3		10			10		10	
	LAS- 0.2%	10		3	7		2	2	5	1		10		4	6		10			10		10	
	LAS- 0.07%	10		3	7		3	3	4			10		7	3		10			10		9	

* Ehrlich Units

顕著であった。また ABS 1.8％群雌は全例腎実質の大部分に高度な尿細管の崩壊による膿嚢化と間質結合織の増生が生じていた（Photo. 15)。残存部分での所見は以下割愛する。

②の所見は対照群雌雄でも軽度にみられたが LAS 0.2％，0.07％ 群雌雄，ABS 0.6％ 群雌雄では顕著であった。LAS 1.8％，0.6％ 群，ABS 1.8％ 群雌雄では左程顕著ではななかった。

③の所見は対照群にもみられたが LAS 1.8％，0.6％群雌雄，ABS 1.8％群雄，ABS 0.6％群雌雄に顕著であった。

④の所見は対照群にも軽度ながらみられたが，ABS 1.8％群雄，ABS 0.6％群雌雄に顕著で，LAS の各群でやや顕著にみられた。

⑤の所見は対照群にはなかった変化で，LAS 1.8％群雌雄，ABS 1.8％群雄，ABS 0.6％群雌雄で顕著にみられた。その他の群は極く軽度であった。

⑥の所見は雄にはほとんどみられないが，雌では対照群でも軽度にみられた変化で ABS 0.2％，0.07％群雌に著明であった。

⑦の所見は対照群雌ではみられず雄で極く軽度にみられたもので LAS 0.2％群雄，ABS 0.6％群雄で顕雄であった。この変化は雌より雄に強く表われる他は用量による差は，特に LAS 雄群で左程なかった。

⑧の所見は対照群および ABS 0.07％群雄にはなかったもので，LAS 1.8％ 群雌雄，ABS 0.6％ 群雌，ABS 0.2％群雌雄で顕著にみられた。その他の群でも軽度な変化を散見した。

⑨の所見は対照群雌雄でもみられたが，ABS 1.8％群雄，LAS 0.2％雄群，LAS 0.6％群雌雄に顕著にみられた。

肝臓の所見は，肝細胞中の好塩基性物質の消失と肝細胞のエオジン濃染化が（Photo. 17）ABS 1.8％群雌雄で稍々顕著にみられ，LAS 1.8％ 群雌雄でも軽度にはみられた。

腸管における所見は，大腸粘膜の表層部上皮細胞高の減少，杯細胞の空胞部分の消失（Phoro. 21）が ABS 1.8％群雌雄で顕著にみられ，LAS 1.8％，0.6％群雌でも軽度にみられた。

なお，肝細胞の好塩基性物質の消失と大腸粘膜上皮細胞の変化は対照群ではみられなかった。

総括ならびに考案

LAS（linear alkylbenzenesulfonate）および ABS（branched alkylbenzenesulfonate）を夫々1.8％，0.6％，0.2％，0,07％の割合で飼料に添加し，6カ月間にわたって Wistar SLC 系ラット（SPF）雌雄に摂取せしめ，亜急性毒性を検索した。

結果を総括してみると LAS より ABS の方が，また雄より雌の方に毒性がやや強くあらわれているようであるが，質的にはほとんど差を認めず，主な症状および所見は下痢，体重増加の抑制，盲腸重量の増加，ヘモグロビン量の低下および白血球数の増多（白血球百分率で好中球の増加，リンパ球の減少）傾向，血清のアルカリフォスファターゼ活性の上昇と総蛋白量の低下，大腸，肝特に腎の組織障害であった。1.8％群では下痢と著明な体重増加の抑制とこれに伴う臓器の体重比重量の増加が顕著であり，貧血と白血球数増加傾向，血清のアルカリフォスファターゼ活性増加，総蛋白量の低下がみられ，腎の組織障害が極めて高度であった。0,6％群では体重増加の軽度の抑制，盲腸重量の増加，血清のアルカリフォスファターゼ活性と総蛋白量の変動，腎の組織障害以外には注目する変化はなかった。

0.2％群では体重増加も良好であり，盲腸の重量増加と腎の一部の組織学的異常所見を除いては特に意味ありと考えられる変化はみられなかった。0.07％群は発育良好で，腎の軽度の組織学的所見を除いては変化を認めなかった。

腎は排泄器官であるため摂取された物質とその代謝物を排泄するための生理機能上の形態変化が起ると考えられるので障害作用としての形態的変化といかに区別するかが重要である。LAS 0.2％～0.07％群，ABS 0.07％群の腎における諸変化は，その程度と発現頻度は相異するが，対照群にもみられたものであり，尿細管の崩壊，膿嚢化など恒久的障碍にむすびつくと思われる変化ではなかった。

従来報告された LAS ないし ABS を添加した飼料でラットを長期間飼育を行なった実験，更に，その一部の動物を用い繁殖試験を行った結果[1)-5)]によると，飼料中添加濃度が 0.5％ 以下，即ち1日平均摂取量として約300mg/kg/day 以下では特に悪い影響はないとされている。

今回得た成績もこれらの報告と大差はないものと考えられるが，0.6％，0,2％添加量にもみられた血清のアルカリフォスファターゼ活性の上昇，盲腸重量増加，腎組織等の諸変化を毒性としていかに評価するかが問題で，今後の長期毒性試験のなかで検討を加えたい。

文　献

1) Tusing, T. W., Paynter, O. E. and Opdyke, D. L.: Toxicol. Appl. Pharmacol., *2*. 464 (1960)
2) 池田良雄，大森義仁，糸嶺篤一，武藤輝，吉本浜子：食衛誌，*3*. 399 (1662)
3) Oser, B. L. add Morgareidge, K.: Toxicol. Appl Pharmacol., *7*. 819 (1965)
4) Kay, J. H., F. E. Kohn, F. E. and Calandra, I. C.: Toxicol. Appl. Pharmacol., *7*. 812 (1965)
5) Buehler, E. V., Newmann, E. A. and King, E. A.: Toxical. Appl. Pharmacol. *18*: 83 (1971)
6) 小林義博，他：東京都立衛生研究所年報(1972) 印刷中

「謝辞」 本研究に多大の援助をいただいた毒性部諸氏に感謝の意を表します。

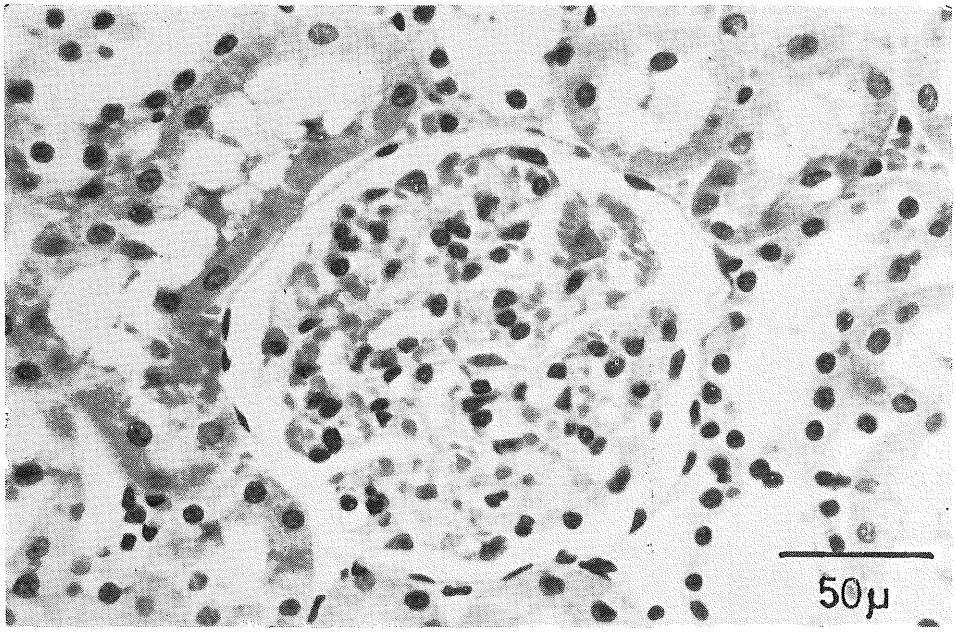


Photo 1. Glomerulus of control. H.E. ×400

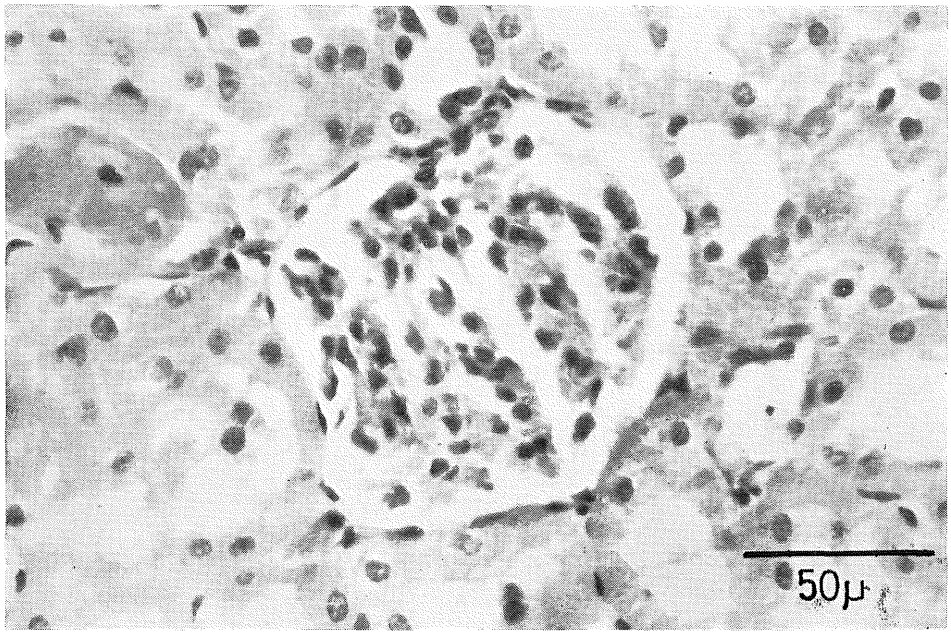


Photo 2. Atrophy in glomerulus. H.E. ×400

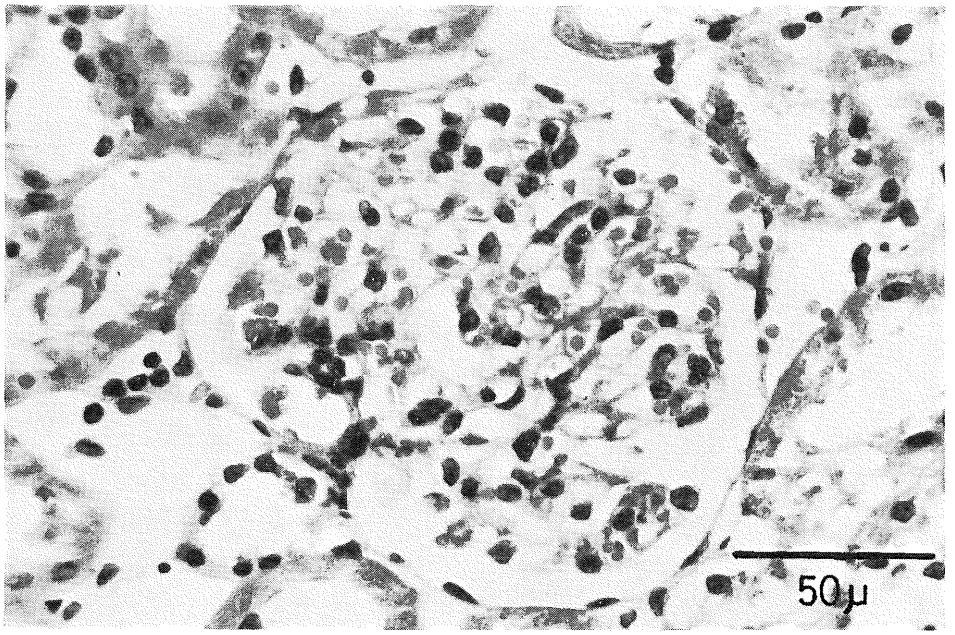


Photo 3. Swelling in glomerulus. H.E. ×400

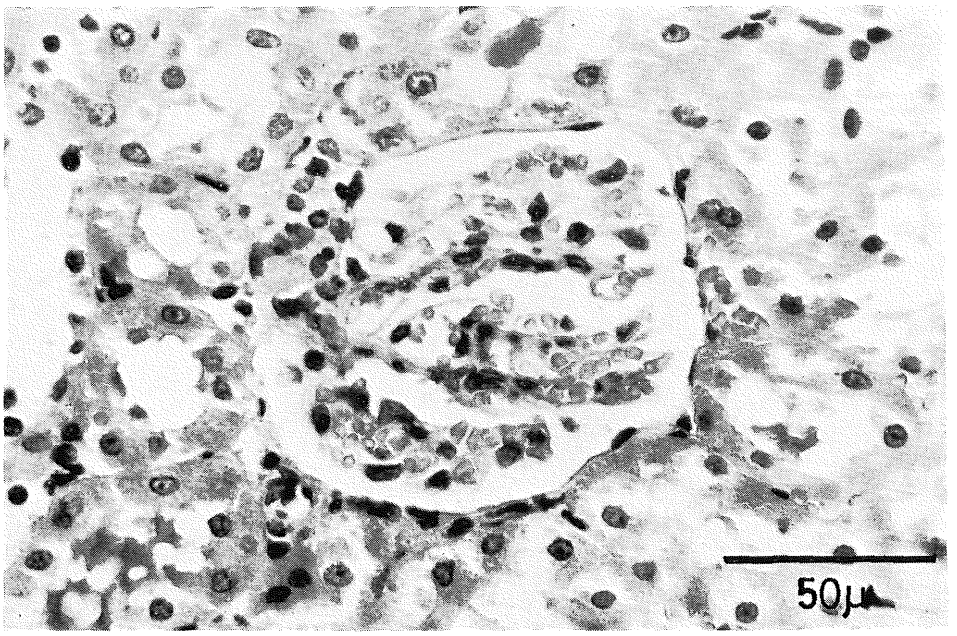


Photo 4. Histolysis in glomerulus. H.E. ×400

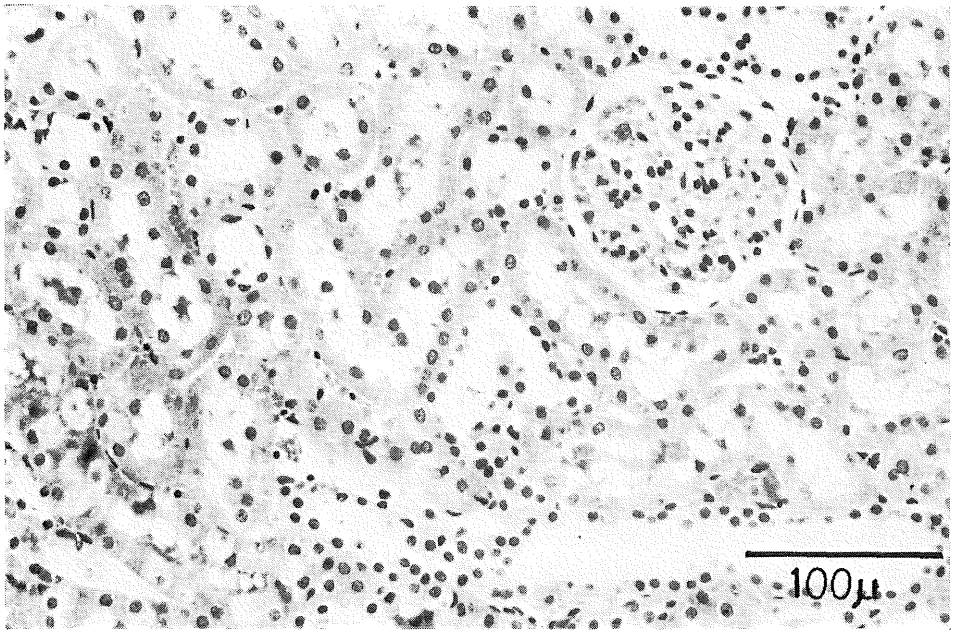


Photo 5. Proximal tubules of control. H.E. ×200

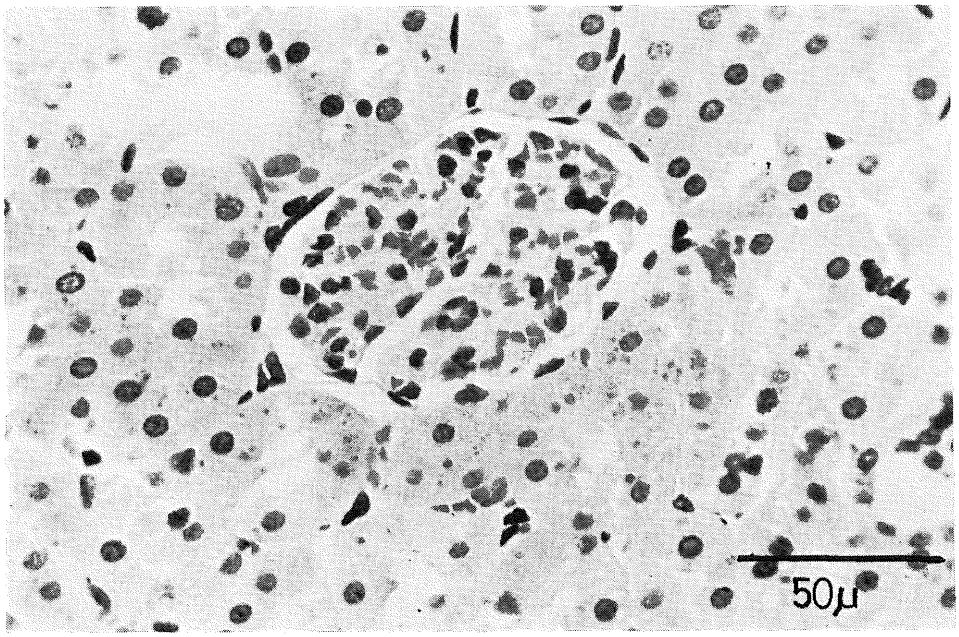


Photo 6. Cloudy swelling in epithelium of proximal tubules. H.E. ×400

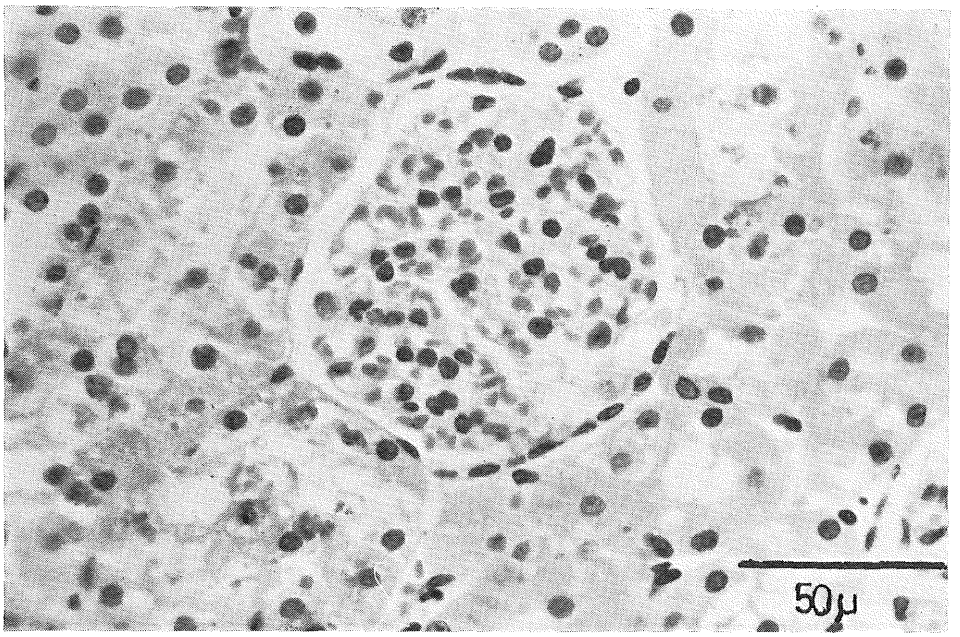


Photo 7. Vacuolation in epithelium of proximal tubules. H.E. ×400

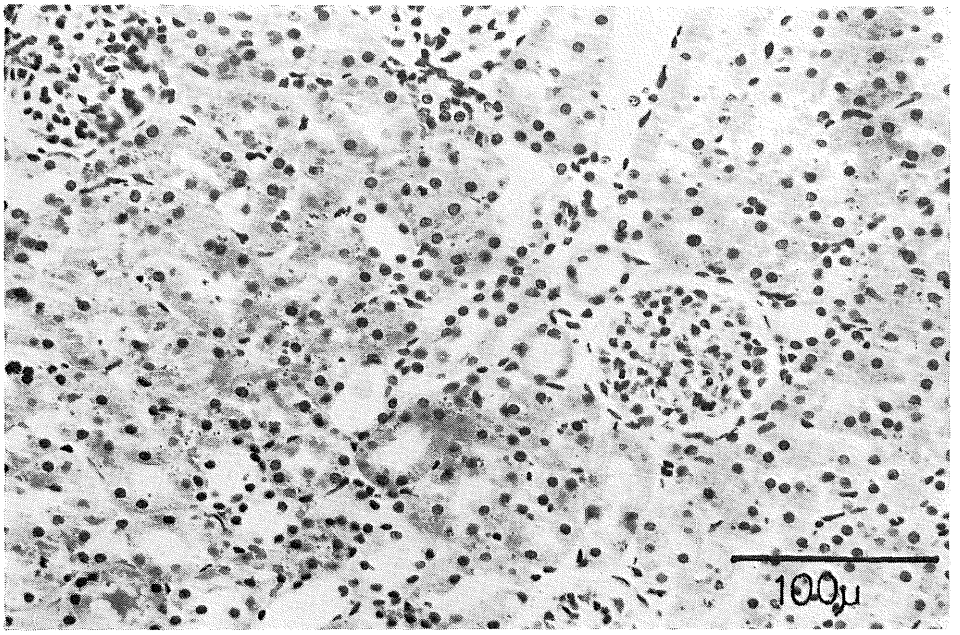


Photo 8. Lipofuscin in epithelium of proximal tubules. H.E. ×200

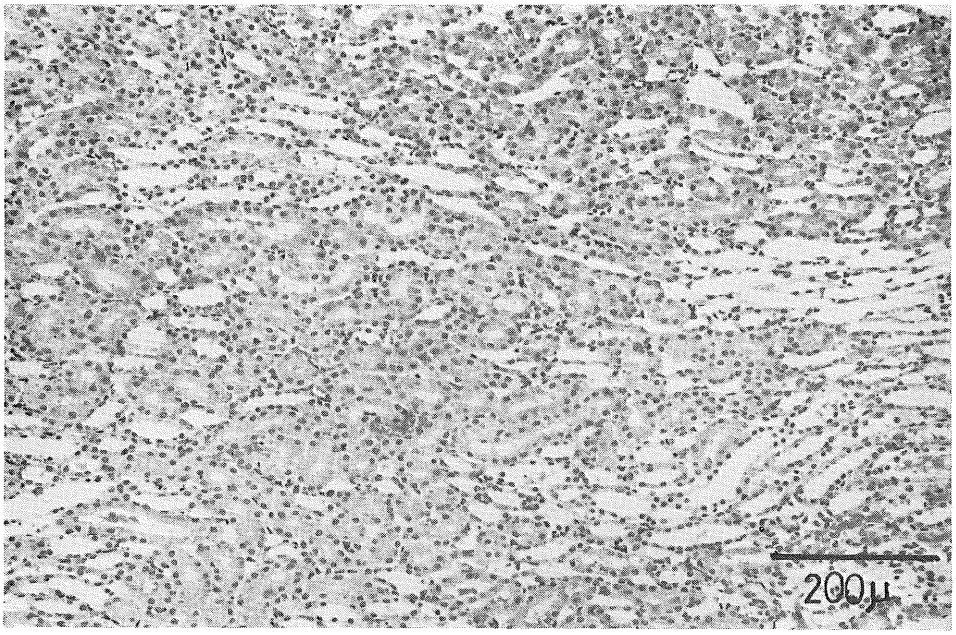


Photo 9. Distal tubules of control. H.E. ×100

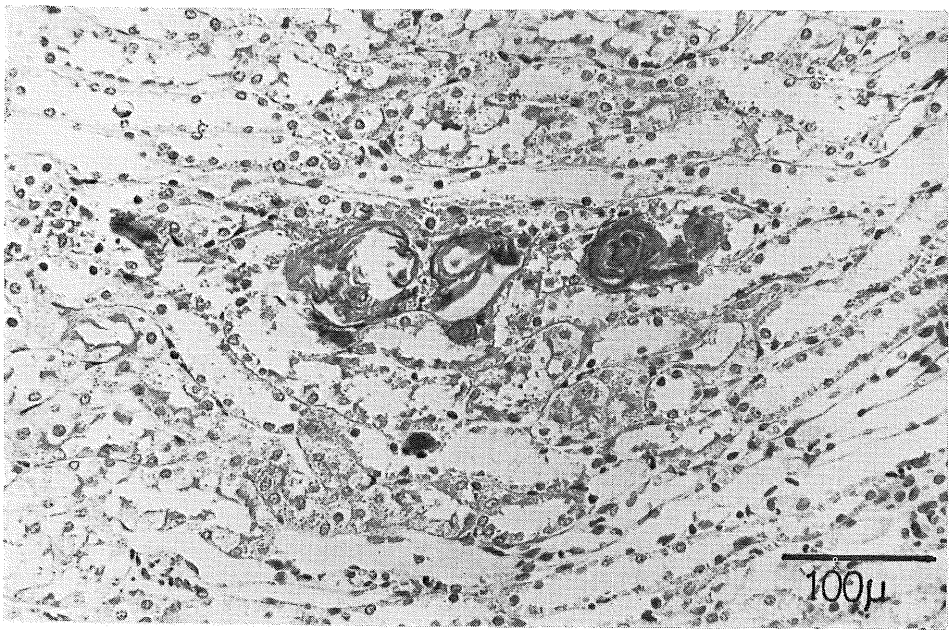


Photo 10. PAS-positive materies in loop of Henle. PAS. ×200

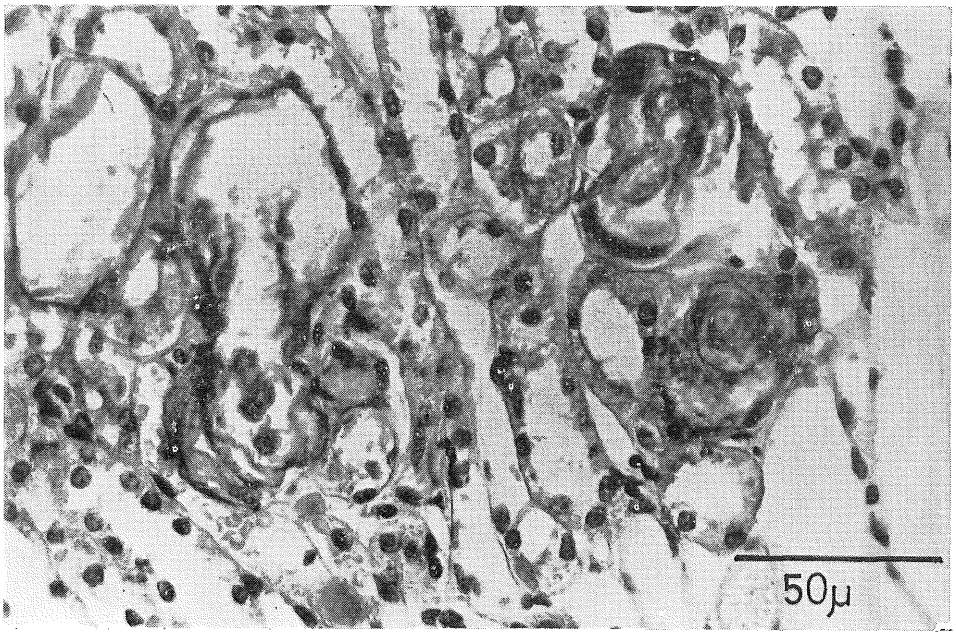


Photo 11. PAS-positive materies in loop of Henle. PAS. ×400

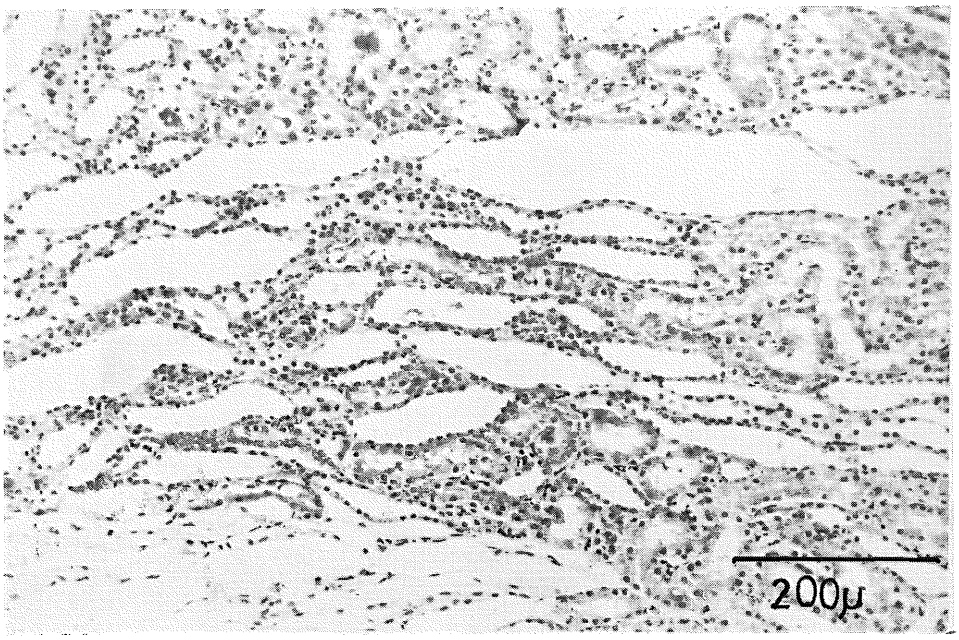


Photo 12. Dilatation in lumina of distal tubules. H.E. ×100

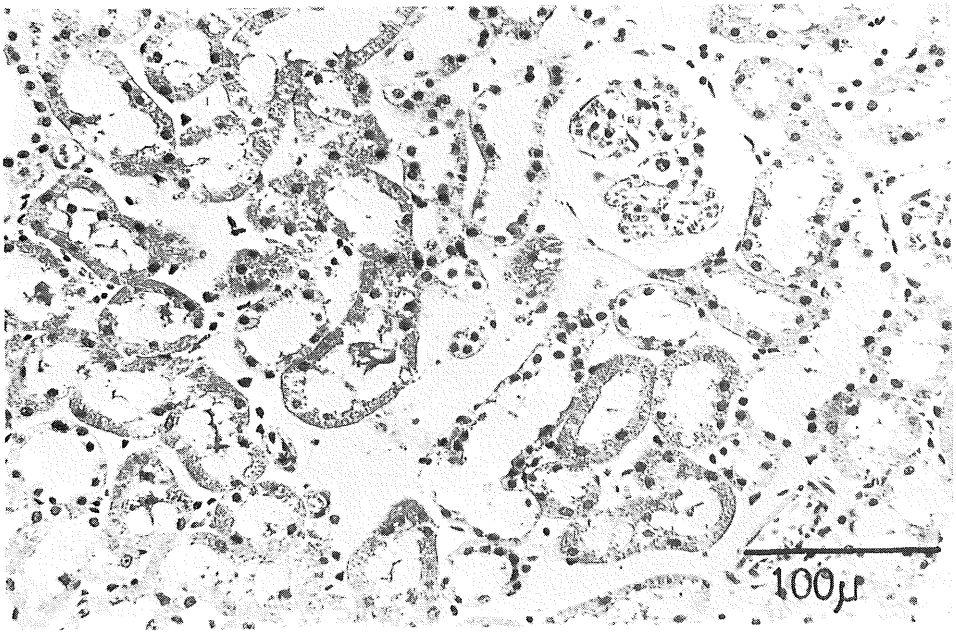


Photo 13. Destruction in urinary tubules and edema in stroma. H.E. ×200

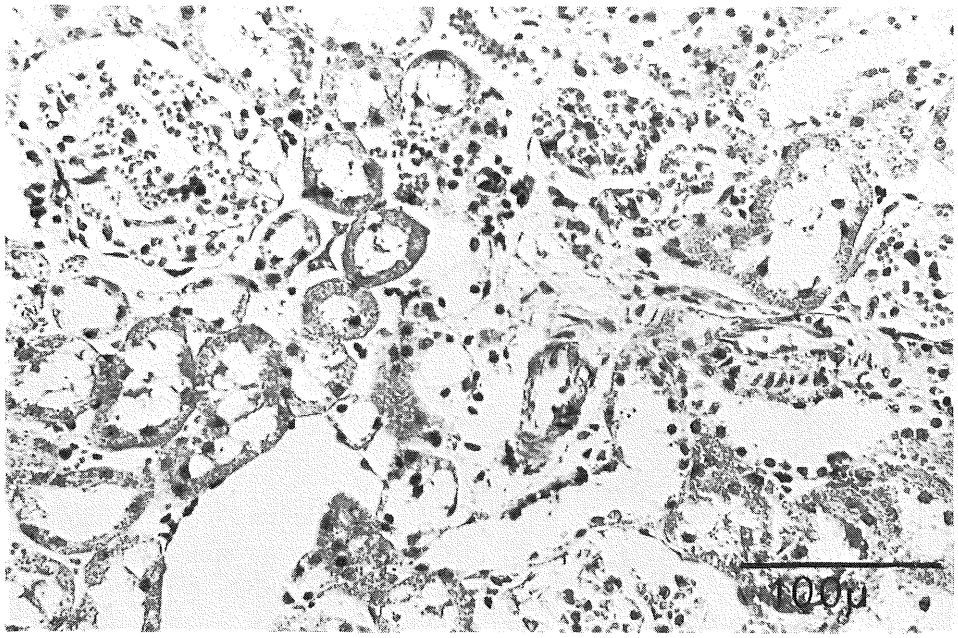


Photo 14. Proliferation in interstitial connective tissues and edema in stroma. H.E. ×200

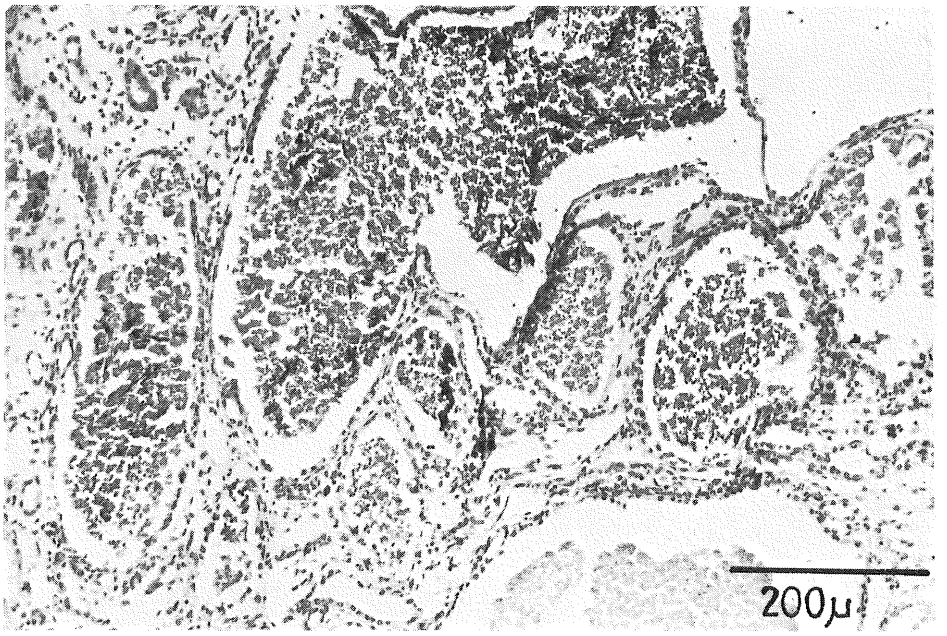
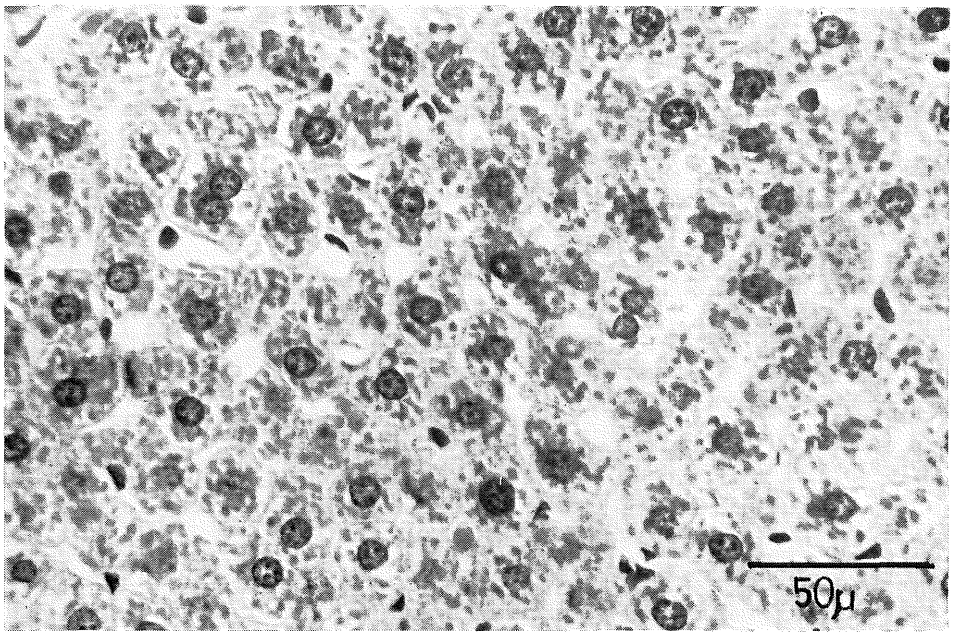


Photo 15. Severe destruction in urinary tubules. H.E. ×100



Phoho 16. Liver of control. H.E. ×400

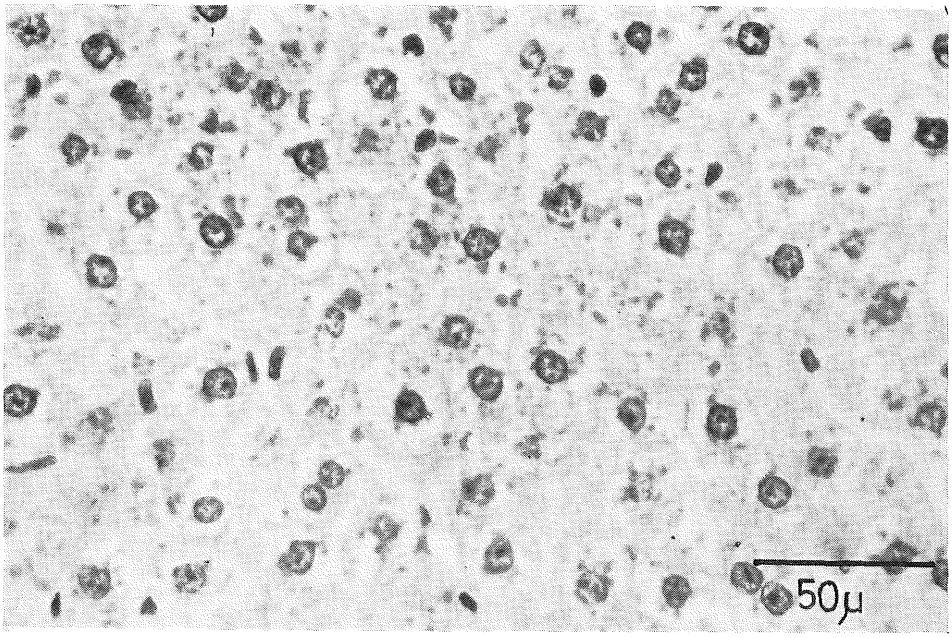


Photo 17 Decrease in basoplasm liver cells. H.E. ×400

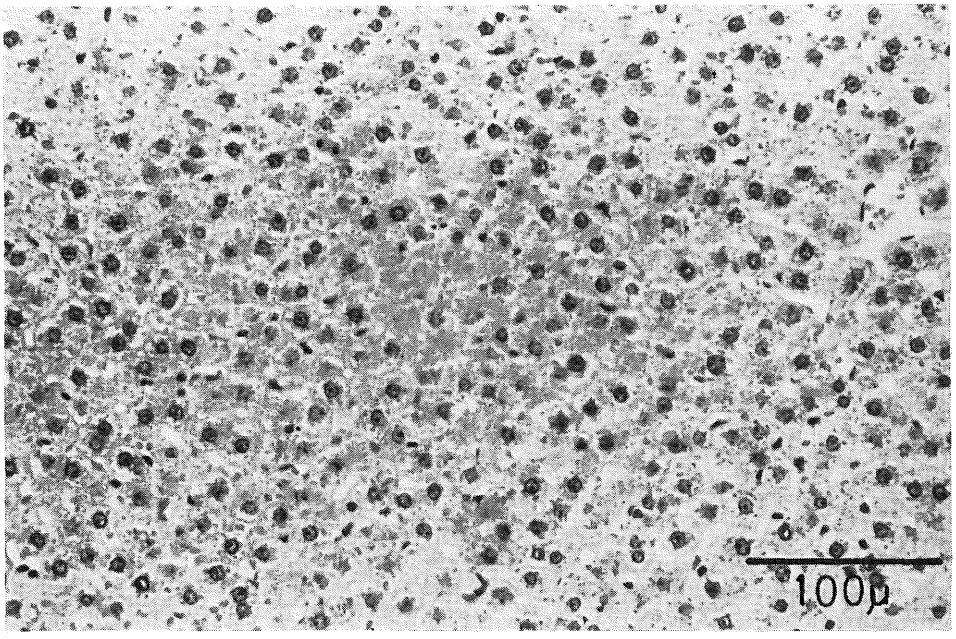


Photo 18. Liver of control. H.E. ×200

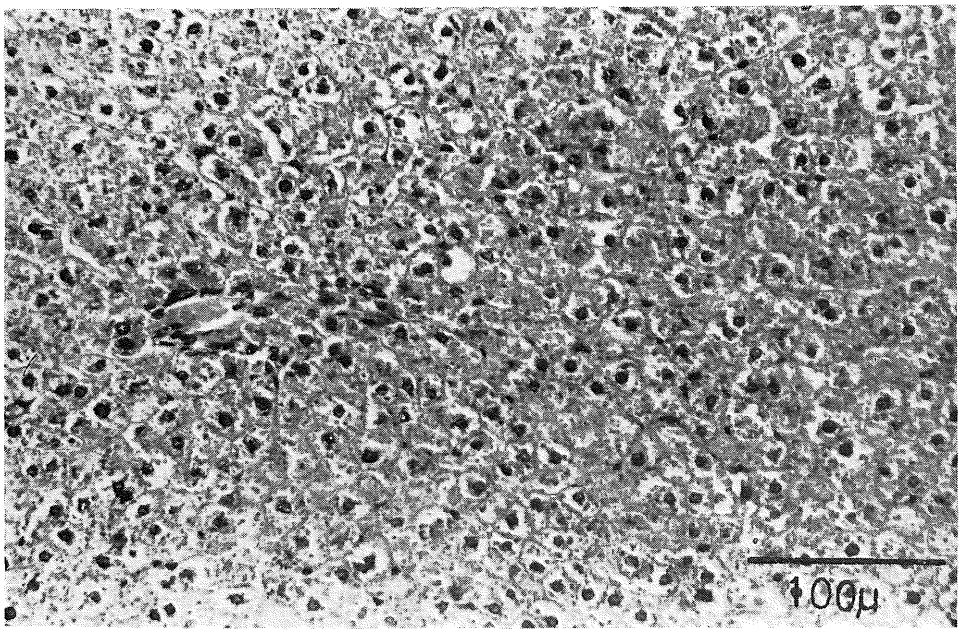


Photo 19. Swelling in liver cells. H.E. ×200

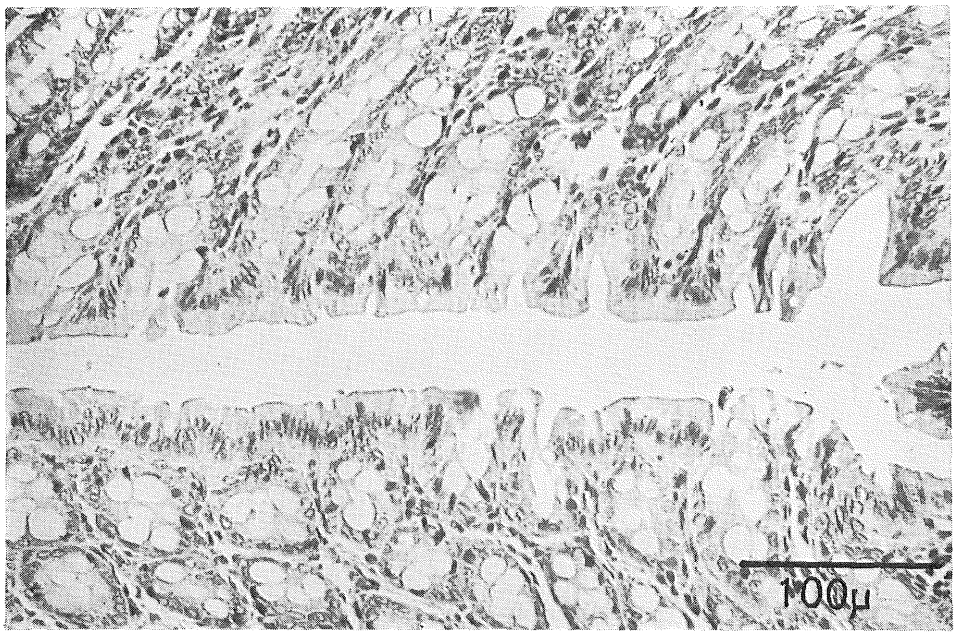


Photo 20. Large intestine of control. H.E. ×200

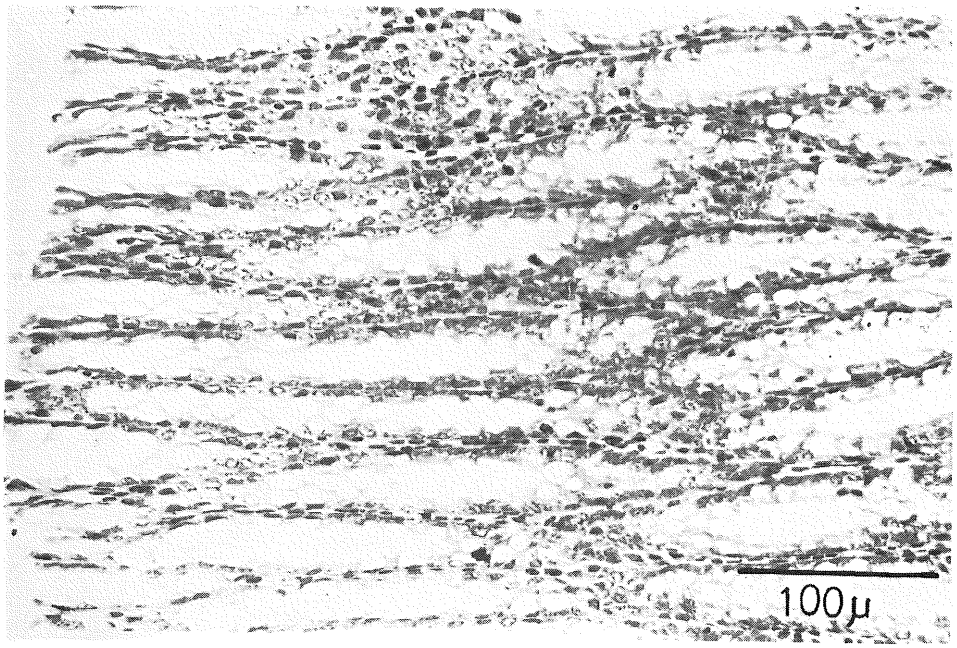


Photo 21. **Decrease in cell height of mucous epithelium in large intestine. H.E. ×200**

Table VI. Organ Weight (Male - 1)

		Heart mg mg/100g	Spleen mg mg/100g	Thymus mg mg/100g	Liver g g/100g	Lung mg mg/100g	Kidney (R) mg mg/100g	Kidney (L) mg mg/100g	Hypophysis mg mg/100g
Control		930±13[1] (10) 241± 3	614±14 (10) 158± 2	129±5.7 (10) 33±0.9	12.0±0.38(10) 3.1±0.04	1,211±44 (10) 314±13	1,105±33 (10) 285± 6	1,126±33 (10) 219± 6	10.0±0.73(10) 2.6±0.21
ABS-	1.8%	430±10** (10) 241± 4	325±12** (10) 182± 3**	53±3.7**(10) 29±1.5	7.5±0.28**(10) 4.2±0.07**	709±31** (10) 398±15**	605±11**(10) 340± 7**	621±13**(10) 350± 9**	7.2±0.46**(10) 4.0±0.32**
	0.6%	834±15** (9) 237± 3	530± 9** (9) 151± 2*	120±7.9 (9) 34±2.7	12.6±0.38 (9) 3.5±0.06**	1,303±65 (9) 373±24*	1,029±27 (9) 292± 4	1,042±34 (9) 296± 7	8.4±0.50 (10) 2.4±0.15
	0.2%	948±17 (10) 246± 3	634±10 (10) 164± 3	146±7.3 (10) 37±1.8*	13.1±0.30 (10) 3.3±0.05**	1,173±28 (10) 304± 6	1,159±27 (10) 300± 5	1,171±36 (10) 303± 6	9.5±0.26 (10) 2.4±0.07
	0.07%	951±20 (10) 242± 3	600±29 (10) 152± 7	147±5.5 (10) 37±1.3*	12.6±0.23 (10) 3.2±0.03	1,311±80 (10) 333±18	1,124±32 (10) 286± 6	1,157±28 (10) 294± 7	9.6±0.22 (10) 2.4±0.05
LAS-	1.8%	694±11** (9) 239± 3	460±11**(9) 158± 2	102±6.3**(9) 35±1.7	10.3±0.28**(9) 3.5±0.08**	971±35**(9) 324±13	836±19**(9) 288± 3	852±22**(9) 294± 5	8.8±0.42 (9) 3.0±0.15
	0.6%	878±18* (10) 235± 4	572±15 (10) 153± 4	122±8.8 (10) 32±2.3	12.0±0.31 (10) 3.2±0.07	1,080±21* (10) 289± 6	1,045±31 (10) 280± 9	1,049±34 (10) 281± 9	9.4±0.30 (10) 2.5±0.08
	0.2%	918±16 (10) 239± 2	644±27 (10) 168± 7	130±9.0 (10) 33±2.1	12.3±0.42 (10) 3.2±0.12	1253±63 (10) 326±14	1,083±34 (10) 282± 7	1,071±28 (10) 279± 4	8.9±0.48 (10) 2.3±0.13
	0.07%	932±16 (10) 240± 2	641±12 (10) 165± 2	129±10.8 (10) 33±2.5	12.0±0.31 (10) 3.1±0.05	1,285±47 (10) 332±12	1,074±25 (10) 277± 5	1,083±52 (10) 279±12	9.3±0.50 (10) 2.4±0.13

1) mean ± S.E. ( ) No. of Rats * $p<0.05$ ** $p<0.01$

Table VII Organ Weight (Male- 2)

		Thyroid glands mg / mg/100g	Suprarenal gland (R) mg / mg/100g	Supranal gland (L) mg / mg/100g	Testis (R) mg / mg/100g	Testis (L) mg / mg/100g	Prostate glands mg / mg/100g	Brain mg / mg/100g	Caecum mg / mg/100g
Control		14.4±0.42[1] (10) 3.7±0.16	18.0±0.61 (10) 4.6±0.18	19.3±0.44 (10) 5.0±0.17	1,592±20 (10) 412± 7	1,622±21 (10) 420± 6	252±16 (10) 65±4.8	1,983±12 (10) 515±11	837±34 (10) 216± 8
ABS-	1.8%	8.9±0.50** (10) 5.0±0.31**	12.1±0.34** (10) 6.8±0.21**	13.0±0.47** (10) 7.2±0.16**	1,238±62** (10) 691±27**	1,293±64** (10) 722±30**	115±15** (10) 63±7.3	1,836±32** (10) 1,034±29**	1,118±41** (10) 631±29**
	0.6%	12.4±1.00 (9) 3.5±0.30	16.5±0.62 (8) 4.7±0.11	17.3±0.32** (8) 4.8±0.09	1,561±24 (9) 444± 6**	1,600±25 (9) 456± 8**	253±27 (9) 72±8.3	1,962±25 (9) 559±11*	1,133±39** (9) 323±14**
	0.2%	13.6±0.80 (10) 3.5±0.19	18.1±0.48 (10) 4.6±0.10	19.5±0.58 (10) 5.0±0.13	1,617±18 (10) 419± 5	1,566±98 (10) 408±27	335±20** (10) 86±4.4**	2,010±21 (10) 521± 7	1,024±27** (10) 265± 6**
	0.07%	14.2±0.61 (8) 3.6±0.17	18.7±0.41 (8) 4.8±0.09	18.9±0.76 (10) 4.8±0.20	1,615±17 (10) 411± 7	1,657±23 (10) 422± 9	298±13 (10) 75±3.1	1,967±19 (10) 484±17	887±34 (10) 226± 9
LAS-	1.8%	11.5±0.76** (9) 3.9±0.24	15.5±0.44** (9) 5.3±0.17*	17.1±0.65* (9) 5.9±0.27*	1,513±23* (9) 522± 7**	1,501±36** (9) 518±13**	231±21 (9) 79±7.0	1,960±22 (9) 677±11**	1,484±30** (9) 512±12**
	0.6%	13.2±0.69 (10) 3.5±0.22	17.5±0.76 (10) 4.6±0.20	18.2±0.69 (10) 4.8±0.19	1,576±27 (10) 422±11	1,612±36 (10) 432±11	231±21 (10) 61±5.7	1,969±18* (10) 528±12	939±41 (10) 251±11*
	0.2%	13.3±0.57 (10) 3.4±0.11	17.3±0.61 (10) 4.5±0.17	18.6±0.84 (10) 4.8±0.23	1,564±22 (10) 408± 5	1,621±20 (10) 423± 4	298±21 (10) 78±5.9	2,020±11 (10) 528± 8	971±35* (10) 253± 7**
	0.07%	13.6±0.54 (10) 3.5±0.13	16.8±0·85 (10) 4.3±0.22	18.7±0.44 (10) 4.8±0.11	1,643±14 (10) 425± 6	1,676±15 (10) 434± 7	318±21* (10) 82±6.1	1,918±106 (10) 494±25	938±38 (10) 242± 9

1) mean ± S.E. ( ) No. of Rats * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table VIII. Organ Weight (Female- 1)

Group	Heart mg / mg/100g	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Lung mg / mg/100g	Kidney (R) mg / mg/100g	Kidney (L) mg / mg/100g	Hypophysis mg / mg/100g
Control	596±10[1] (10)	405± 5 (10)	134±7.7 (10)	6.5±0.12 (10)	822±19 (10)	720±22 (10)	738±18 (10)	13.9±0.76 (10)
	265± 6	200± 4	66±3.9	3.2±0.08	409±11	359±12	395±11	6.8±0.39
ABS- 1.8%	315± 8** (10)	263± 7** (10)	68±8.5** (10)	5.2±0.13** (10)	573±32** (10)	872±62* (10)	901±64* (10)	6.1±0.48** (10)
	268± 5**	224± 4**	58±6.9	4.4±0.09**	487±20**	746±54**	768±53**	5.2±0.31**
ABS- 0.9%	500±12** (10)	365±19 (10)	114±4.5* (10)	6.4±0.29 (10)	773±30 (10)	618±18** (10)	651±26* (10)	15.1±1.26 (10)
	280± 6	204± 9	63±2.4	3.6±0.12*	434±19	345± 8	364±12	8.5±0.69
ABS- 0.2%	537±14** (10)	400± 6 (10)	132±4.6 (10)	6.4±0.26 (10)	758±25 (10)	641±19* (10)	638±18** (10)	13.3±0.81 (10)
	282± 4	211± 4	69±2.6	3.3±0.07	399±11	337± 5	336± 6*	7.0±0.38
ABS- 0.07%	584± 8 (10)	418±10 (10)	126±4.2 (10)	6.4±0.14 (10)	803±13 (10)	685±18 (10)	705±20 (10)	15.0±0.59 (10)
	279±11	200±11	61±2.5	3.0±0.13	384±16	326± 9	335±11	7.2±0.46
LAS- 1.8%	426±11** (10)	294±10** (10)	102±6.8** (10)	6.3±0.24 (10)	673±20** (10)	546±16** (10)	563±24** (10)	12.3±1.08 (10)
	269± 7*	185± 6	64±4.1	3.9±0.12**	425±16	345±13	357±21	7.7±0.63
LAS- 0.9%	559±11* (10)	387± 7 (10)	125±5.8 (10)	6.5±0.22 (10)	793±14 (10)	664±16 (10)	715±32 (10)	16.2±0.94 (10)
	286± 5	198± 5	63±2.2	3.3±0.10	406± 8	340± 9	365±14	8.3±0.46*
LAS- 0.2%	574±13 (10)	405± 8 (10)	131±4.6 (10)	6.5±0.18 (10)	802±26 (10)	654±20* (10)	665±28* (10)	15.0±1.10 (10)
	258± 5	201± 4	65±2.6	3.2±0.07	398±10	325± 7	330±11*	7.4±0.53
LAS- 0.07%	596±16 (10)	408±13 (10)	132±2.8 (10)	6.7±0.30 (10)	801±19 (10)	717±23 (10)	738±33 (10)	16.3±0.94 (10)
	294± 3	201± 4	65±2.3	3.3±0.05	396±11	355±13	364±13	8.0±0.40

1) mean ± S.E ( ) No. of Rats * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table IX. Organ Weight (Female- 2)

Group	Thyroid glands mg / mg/100g	Suprarenal gland (R) mg / mg/100g	Suprarenal gland (L) mg / mg/100g	Ovary (R) mg / mg/100g	Ovary (L) mg / mg/100g	Uterus mg / mg/100g	Brain mg / mg/100g	Caecum mg / mg/100g
Control	11.2±0.32[1] (9) 5.5±0.17	21.9±0.99 (10) 10.8±0.64	23.2±1.24 (10) 11.4±0.94	23.3±1.0 (10) 11.5±0.5	24.4±1.1 (10) 12.0±0.5	638±27 (10) 315±13	1,832±16 (10) 906±14	681±18 (10) 337±11
ABS- 1.8%	8.1±0.31** (10) 6.8±0.20**	13.2±1.24** (10) 11.2±1.03	13.9±0.78** (10) 11.8±0.53	13.2±1.47** (10) 11.1±1.0	11.4±1.0** (9) 13.4±3.5	122± 6** (10) 104± 5**	1,678±16** (10) 1,434±22**	768±46 (10) 653±33**
ABS- 0.9%	10.3±0.61 (10) 5.7±0.28	19.3±0.73 (10) 10.8±0.37	21.0±0.73 (10) 11.7±0.40	19.8±1.6 (10) 11.1±0.9	20.9±1.3 (10) 11.7±0.7	448±48** (10) 255±31	1,846±19 (10) 1,037±25**	829±51* (10) 464±27**
ABS- 0.2%	13.2±1.10 (10) 6.9±0.49*	20.0±0.68 (10) 10.5±0.24	21.5±0.79 (10) 11.3±0.30	20.5±1.2 (10) 10.7±0.5	22.2±1.1 (10) 11.6±0.4	543±31 (10) 285±14	1,808±15 (10) 955±18	659±38 (10) 347±20
ABS- 0.07%	12.4±0.79 (10) 5.0±0.50	21.4±0.47 (10) 10.2±0.50	23.0±0.64 (10) 11.0±0.55	21.0±1.0 (10) 10.0±0.7	21.9±1.3 (10) 10.4±0.7	614±30 (10) 293±17	1,828±11 (10) 875±33	644±19 (10) 307±13
LAS- 1.8%	10.9±0.73 (10) 6.9±0.53*	15.6±0.81** (10) 9.8±0.52	16.8±0.84** (10) 10.6±0.55	17.6±1.4** (10) 11.1±0.9	18.2±1.8** (10) 11.5±1.1	292±18** (10) 185±12**	1,780±15* (10) 1,126±28**	929±26** (10) 586±14**
LAS- 0.6%	13.9±1.30 (10) 7.1±0.70	22.9±0.56 (10) 11.7±0.36	24.0±0.61 (10) 12.3±0.44	22.8±1.2 (10) 11.7±0.7	24.5±1.0 (10) 12.6±0.6	618±32 (10) 315±15	1,840±14 (10) 943±20	697±21 (10) 356± 7
LAS- 0.2%	12.2±0.96 (10) 6.0±0.46	21.7±1.11 (10) 10.7±0.49	22.2±0.92 (10) 11.0±0.43	23.6±1.0 (10) 11.7±0.4	23.3±1.2 (10) 11.5±0.5	594±31 (10) 296±17	1,837±18 (10) 915±13	688±26 (10) 343±14
LAS- 0.07%	12.9±0.93 (10) 6.4±0.55	22.6±0.95 (10) 11.1±0.35	24.1±0.98 (10) 11.8±0.33	23.0±1.9 (10) 11.2±0.6	24.6±1.5 (10) 12.0±0.5	592±18 (10) 292± 8	1,827±18 (10) 908±30	753±25* (10) 373±13

1) mean ± S.E ( ) No. of Rats * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table X. Summary of Microscopic Changes in kidney

Microscopic Findings	*	Male									Female								
		C	ABS				LAS				C	ABS				LAS			
			0.07%	0.2%	0.6%	1.8%	0.07%	0.2%	0.6%	1.8%		0.07%	0.2%	0.6%	1.8%	0.07%	0.2%	0.6%	1.8%
swelling in glomerulus	SE	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	2		1	1	0	0
	MO	2(10)	3(10)	4(10)	4(9)	4(10)	5(10)	6(10)	7(10)	5(9)	2(10)	3(10)	4(10)	5(10)	(10)	5(10)	5(10)	7(10)	5(10)
	SL	2	7	6	3	5	4	3	2	4	3	5	5	3		4	4	3	5
histolysis in glomerulus	SE	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1		0	0	1	1
	MO	2	2	3	5	3	7	5	5	5	3	4	4	5		5	9	6	5
	SL	2	1	5	3	6	2	4	4	3	1	2	5	4		5	4	3	4
atrophy in glomerulus	SE	0	0	0	0	3	0	1	2	3	0	0	0	0	10	0	0	1	4
	MO	1	1	3	5	5	5	6	7	6	1	3	5	4	0	4	6	7	5
	SL	1	5	6	4	2	5	2	1	0	1	3	2	5	0	5	3	2	1
cloudy swelling in epithelium of proximal tubules	SE	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	MO	0	0	2	6	6	1	6	8	7	0	0	0	4		0	3	3	4
	SL	4	6	8	2	3	5	2	2	2	3	3	4	5		4	3	3	5
vacuolation in epithelium of proximal tubules	SE	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0
	MO	0	0	3	4	8	6	3	4	5	1	6	5	6		7	6	7	7
	SL	4	5	6	3	1	4	7	6	4	5	3	5	2		3	4	3	3
lipofuscin in epithelium of proximal tubules	SE	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0		0	0	0	5
	MO	0	0	0	5	5	0	0	0	7	0	0	0	2		0	0	0	5
	SL	0	3	3	4	2	0	5	5	0	0	2	1	7		0	1	4	0
PAS-positive materies in loop of Henle	SE										0	1	3	2		0	0	0	0
	MO										0	5	2	3		3	3	3	0
	SL										4	4	5	5		7	6	6	3
dilatation in lumina of distal tubules	SE	0	0	0	1	0	0	3	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	MO	0	2	3	4	5	4	3	4	5	0	1	1	3		0	3	5	3
	SL	2	5	6	4	5	6	4	4	4	0	3	5	5		5	3	5	5
decrease in cell height of epithelium in distal tubules	SE	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	MO	0	0	0	3	5	0	3	3	4	0	0	0	0		0	0	3	3
	SL	1	5	6	4	5	6	5	4	5	0	1	3	5		3	5	5	5
destruction in urinary tubules	SE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	10	0	0	0	0
	MO	0	0	0	0	3	0	0	2	3	0	0	3	4	0	0	0	0	4
	SL	0	0	1	2	4	0	2	3	4	0	2	4	4	0	2	3	5	5
edema in stroma	SE	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0		1	1	1	0
	MO	1	1	2	3	6	5	6	3	4	1	3	3	4		4	5	6	2
	SL	2	5	7	6	3	4	3	5	5	1	3	5	5		5	4	3	7
swelling in perivascular connective tissues	SE	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1		0	0	0	0
	MO	1	1	3	3	5	4	3	5	3	1	1	4	4		4	5	7	1
	SL	1	4	6	6	4	4	6	5	4	1	6	5	4		5	5	3	6
proliferation in interstitial connective tissues	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
	MO	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	SL	1	1	5	3	5	5	5	4	6	2	1	3	4	0	2	5	6	6

* SE ; Severe, MO ; Moderate, SL ; Slight, ( ) No. of Rats.

Table XI Summary of Microscopic Changes in Liver and Large Intestine

Microscopic Findings	*	Male									Female								
		C	ABS				LAS				C	ABS				LAS			
			0.07%	0.2%	0.6%	1.8%	0.07%	0.2%	0.6%	1.8%		0.07%	0.2%	0.6%	1.8%	0.07%	0.2%	0.6%	1.8%
decrease in basoplasm in liver cells	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MO	0(10)	0(10)	0(10)	0(9)	4(10)	0(10)	0(10)	0(10)	0(9)	0(10)	0(10)	0(10)	0(10)	5(10)	0(10)	0(10)	0(10)	1(10)
	SL	0	0	0	1	5	0	1	1	6	0	1	1	5	2	0	0	3	6
increase in eosinophilia in liver cells	SE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	MO	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	2
	SL	1	1	2	1	5	0	0	0	6	1	1	1	3	3	0	0	2	7
swelling in liver cells	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MO	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	0	3	3	0	1	1	2
	SL	0	0	2	1	5	0	0	3	3	0	0	3	4	6	0	3	4	6
rarefaction in cytoplasm of liver cells	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	MO	0	0	0	2	3	0	1	1	1	0	1	1	3	5	0	1	1	1
	SL	3	5	7	6	7	8	6	6	6	2	5	5	6	5	6	7	7	7
decrease in cell height of epithelium in large intestine	SE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	MO	0	0	1	1	7	0	0	0	0	0	0	1	1	6	0	0	1	1
	SL	0	0	2	1	2	0	2	4	5	0	0	2	3	3	0	3	4	4

* SE ; Severe MO ; Moderate SL ; Slight ( ) No. of Rats

合成洗剤の毒性に関する研究(Ⅲ)

マウスの皮膚塗布による催奇形性試験

佐藤　薫*　安藤　弘*
湯沢勝廣*　平賀興吾*

STUDIES ON TOXICITY OF SYNTHETIC DETERGENTS (III) EXAMINATION OF TERATOGENIC EFFECTS OF ALKYL BENZENE SULFONATE SPREAD ON THE SKIN IN MICE

Kaoru SATO, Hiroshi ANDO, Katsuhiro YUZAWA and Kogo HIRAGA

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

summary

The pregnant mice of a ddY/S strain were treated with 0.5ml of a commercial dish washing detergent containing 17% of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and the other unknown compounds (diluted with the distilled water to 13%), the LAS (2.22% water solution) and the carboxymethylcellulose (CMC, 2.0% water solution) respectively once every day from day zero to day 13 of gestation by applying locally on their backs in a 4cm hair-shaved square. The effects of drug application on the mothers and the fetuses at term were investigated.

1. The rate of insemination were as follows : 6 out of 21 (28.6%) for the commercial dish washing detergent applied group of mice, 15 out of 16 (93.8%) for the LAS group and 14 out 17 (82.4%) for the CMC group, indicating that the local application of a commercial dish washing detergent to the pregnant mice resulted in a significant decrease of rate of insemination.

2. No significant difference in the numbers of implantation, resorbed fetuses and dead fetuses was observed among the 3 test groups.

3. Mean body weight of survived fetuses in the commercial dish wasing detergent group was slightly lower than those of the other 2 test groups.

4. The external forms of fetuses and their organs were found normal in all of the 3 test groups.

5. The degree of ossification in fetuses tended to be inhibited by the applications of a commercial dish washing detergent and LAS.

6. No difference in the variation of ossification was noticed among the 3 test groups.

*東京都立衛生研究所毒性部

現在広く使用されている家庭用洗剤の主成分であるアルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウムの催奇性あ

るいは次世代に及ぼす影響についてはいくつかの報告がある。Tusing ら[1] および Bornman ら[2] は分岐鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS）について，Buehler ら[3] は直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）について食餌や飲料水に添加してラットの長期飼育試験の中で行った繁殖試験で検討を加え，ABS 乃至 LASの食餌中濃度が0.5%，飲料水中濃度が0.01%以下の場合は2代にわたる妊娠，分娩，出産と仔の発育に好ましくない影響のないことを報告している。また，大森ら[4] はラットで妊娠成立とともに ABS 添加飼料を与えた場合，2.0 % 添加飼料のものでは胎仔の死亡の増加や発育障害が認められたが1.0% 以下の濃度の食餌投与では殆んど影響のないこと，またマウスに妊娠7日から13日まで毎日1回ABSを経口投与した場合，240mg/kg/day では胎仔の死亡率が大であったが，24mg/kg/day では対照との差のないことを報告している。田中[5] は胎仔に対する毒性を致死量により検討し，ABS の 50 %胎仔致死量（FLD_{50}）は，マウス妊娠7日目経口1回投与で130mg/kg であると述べており，また柳沢ら[6] も同様の成績を提出している。

この値は母体の50%致死量（LD_{50}）にくらべて極めて低いものであるが，先の大森ら[4] は，マウスの実験のなかで240mg/kg を7日間反覆投与しても総着床数の25%が吸収または浸軟状態にあることが認められたのみであると述べている。

三上ら[7][8] は，妊娠マウスに ABS を経口投与すると口蓋裂等の奇形の生ずることを報告して来たが，最近マウスの背側皮膚に，妊娠1日目から13日目にわたって約13mg の ABS を含む中性洗剤 0.5m*l* を毎日塗布し，妊娠17日目に胎仔を観察した結果，全身的な皮下出血，内臓出血，腹腔内出血などが，ほとんど100%にみられ，その他脊椎破裂，脊髄中心管の閉鎖，脱脳症，口蓋裂等の奇形が発生することを発表した。

この報告の重大性にかんがみ，とりあえず，市販台所洗剤1とその主成分である直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）と対照として被膜効果以外皮膚刺戟性，吸収，薬理作用を示さないと考えられるカルボオキシメチルセルローズ（CMC）をえらび，三上らの方法に準じ皮膚塗布によるマウスの母体および胎仔に及ぼす影響を検索した。

試験材料および試験方法

(1) 試　料：　1)台所洗剤――L社市販台所洗剤ソフトタイプ15m*l* を精製水100m*l* で稀釈した（以下洗剤と略す）。

2)　直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（以下 LAS と略す）――当研究所で精製した有効成分99.95%，末反応油分0.04%，無機塩類0.01%，水0.00%，pH（1%）6.1，平均分子量364.0 のものを精製水で2.22%溶液とした。

3)　カルボオキシメチルセルローズ（以下 CMC と略す）。――精製水で2.0%溶液とした。

(2)試験動物：　ddY/S 系マウスを静岡県実験動物農業協同組合より4週令で購入し，順調な発育を示した9～13週令（体重22.2～31.5g）未経産のものを用いた。

(3)飼育条件：　動物は全期間を通じ疾病管理され室温 25±1 °C，湿度 55～65 %に調整された動物飼育室で箱型アルマイト製ケージにて飼育した。予備飼育期間は1ケージ当り10匹づつ，交配後は1匹づつ分離飼育した。飼料は船橋農場製ラット・マウス用固型飼料FⅡを，水道水とともに自由に摂取させた。

(4)交配および妊娠の確認：　外部生殖器の所見により交配適期とみられる雌1匹又は2匹を同系統の雄1匹と一夜同居させ，翌朝膣栓の確認されたものを妊娠動物とし，その日を妊娠0日として起算した。

(5)試料適用方法および適用期間：　妊娠0日に背部被毛を電気バリカンにて 4cm 四方に刈りとり，試料溶液を体重に関係なく 0.5m*l* づつ妊娠 0 日目より13日目までの14日間毎日1回同時刻（午前11時）に胃ゾンデを利用して塗布した。

(6)母体の観察：　洗剤群には21匹，LAS 群には16匹，CMC 群には17匹の母獣を用い，妊娠0日より毎日体重を測定するとともに一般症状を観察した。妊娠18日目の帝王切開時には主要臓器の観察と重量の測定を行った。

(7)胎仔の観察：　妊娠18日目の母獣をエーテル麻酔下に開腹し，胎仔の着床状態を観察し，総着床数，生存胎仔数，死亡胎仔数および吸収胚数（胎盤遺残を含む）を調べた。

生存胎仔については肛門と外生殖器の間隔および内部生殖器の所見により雌雄を判別し，体重を測定した。その後，外形，口腔および胸部諸器官の形態異常の有無を検査，次いで内臓を除去し95%アルコールで固定し Dawson 法[9] によりアリザリンレッドS染色を施し実体顕微鏡下で骨異常の有無を観察した。

骨形成に関しては骨形成予定部位に点あるいはそれ以上の限局性の染色部分が確認されれば骨形成ありと判定した。しかし，指趾骨に関しては環状の染色部分が確認されたものを骨形成ありと判定した。椎骨は両

側対称的な肋骨を保持する胸椎より頭部を頸椎とし胸椎に続いて腰椎，仙椎，尾椎とした。なお，胎仔では仙椎と尾椎の区別がつかないため全胎仔について仙椎を4とし尾椎数を起算した。

試験結果

〔Ⅰ〕 母体に対する影響

(1)体重および一般症状の推移

体重は Fig. 1，2および Table Ⅰ に示すように妊娠の成立したものについてみると，洗剤，LAS，CMCの各群とも妊娠初期に多少の減少をみた。LAS 群および CMC 群では妊娠3日には0日の体重に回復したが洗剤群では妊娠5日まで回復しなかった。その後の体重は各群間に差なく順調に増加した。

一般症状は特に目立つものはなかったが，洗剤群では塗布による皮膚のよごれがみられ妊娠4～5日ごろまでガサガサした感じであった。その後は塗布をくりかえしてもよごれはほとんど目立たなくなった。

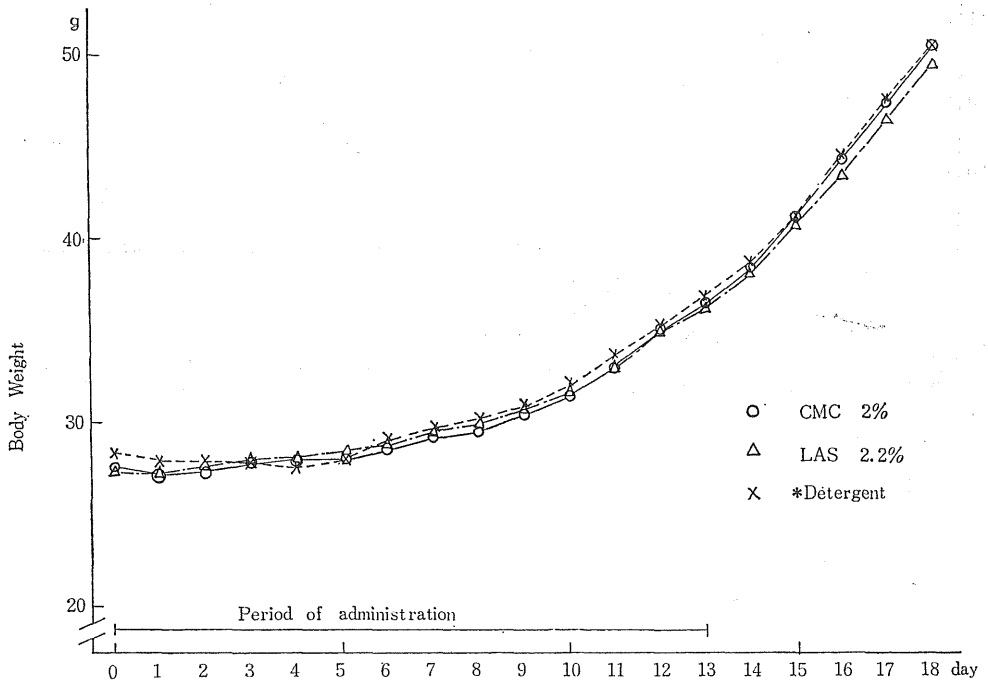


Fig. 1. Change in body weight of pregnant mother mice
*** Commercial dish washing detergent**

Table I Change in mean body weight of pregnant mother mice

Group	No. of mother mouse	Mean body weights		
		Zero day of gestation	13th day of gestation	18th day of gestation
CMC	14	[b] 27.62 ±0.54	36.53 ±0.54	50.46 ±0.80
LAS	15	27.50 ±0.65	36.22 ±0.71	49.46 ±1.07
[a] Detergent	6	28.26 ±0.56	36.91 ±0.54	50.56 ±1.19

a) Commercial dish washing detergent
b) Mean ± S.E.

(2)受胎率

結果は Table Ⅱ に示すように，腟栓が確認されたにもかかわらず受胎を確認できた母体は CMC 群が17匹中14匹，LAS 群が16匹中15匹，洗剤群が21匹中6匹で夫々82.4%，93.8%，28.6%の受胎率で，洗剤群において明らかな受胎率の低下が認められた。

(3)剖検所見および臓器重量

洗剤群の塗布皮下がやや充血していた以外には特記するような変化は見当らなかった。受胎を確認した母体の臓器重量は Table Ⅲ に示すように各群間に有意の差は認められなかった。

〔Ⅱ〕 胎仔に対する影響

(1)着床数，死亡仔数，吸収胚数，胎仔重量，性比

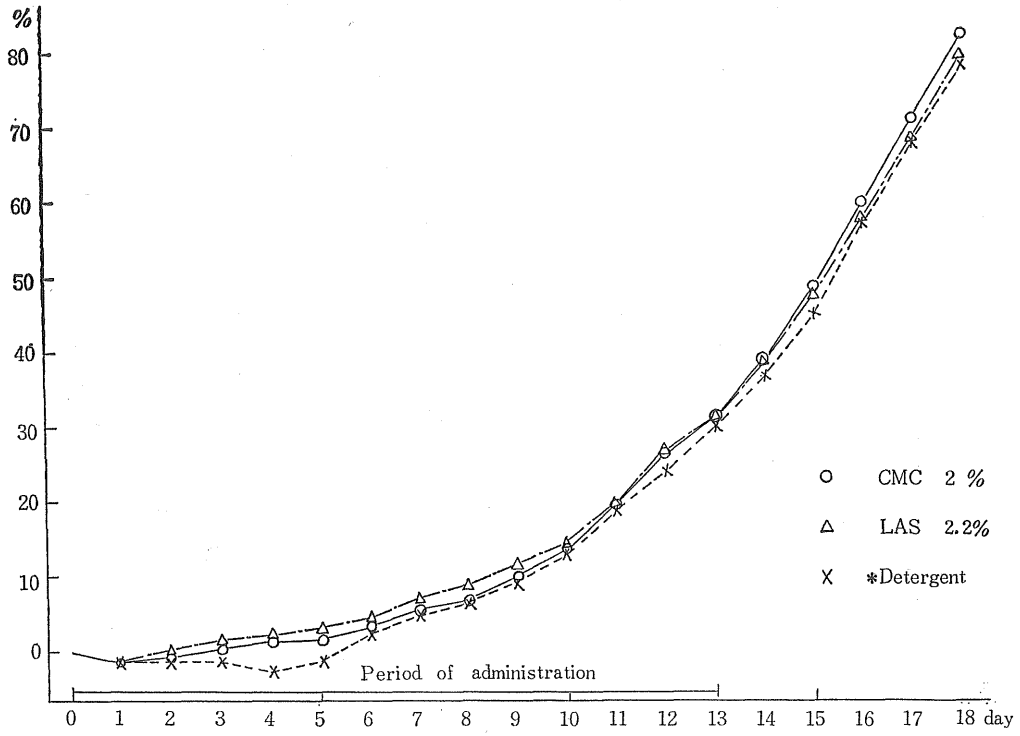


Fig. 2. Increasing rates of body weight in pregnant mother mice
*** Commercial dish washing detergent**

Table II Rates of insemination

Group	CMC	LAS	a) Detergent
No. of females with vaginal plug	17	16	21
No. of dams	14	15	6
Rates of insemination (%)	82.4	93.8	*** 28.6

a) Commercial dish washing detergent
*** $P<0.001$

結果は Table Ⅳ に示す通りで，洗剤群においては受胎率の低下がみられたが，しかし受胎したものの1腹当りの胎仔数は CMC 群 LAS 群と差なく10前後であった。また，生仔数，死仔数および吸収胚数にも各群間の差は認められなかった。

胎仔重量は洗剤群において，CMC 群と比較してやや小で，その差は有意（$P<0.05$）と認められた。

性比は LAS 群に雌が多く，洗剤群に雄が多かったが，有意とは認められなかった。

(2)外形および内臓異常

CMC 群の1例に曲尾がみられた以外には異常を認めなかった。

Table III Organ weight of pregnant mother mice

Group	CMC	LAS	a) Detergent
Liver g	b) 2.9± 0.07	2.9± 0.07	3.2± 0.17
g/100g	10.5± 0.24	10.5± 0.28	11.2± 0.43
Heart mg	126.6± 2.7	128.4± 2.6	137.2± 4.6
mg/100g	459.6±11.1	468.3± 8.7	485.2±12.9
Spleen mg	112.8± 6.9	114.0± 4.4	126.6± 4.5
mg/100g	408.9±24.0	417.3±18.4	448.1±15.7
Lung mg	170.1±10.0	170.9±11.7	190.4±20.6
mg/100g	616.2±35.1	626.5±42.7	671.4±65.1
Kidney(R)			
mg	214.3± 7.2	208.0± 6.4	230.1±11.2
mg/100g	775.6±20.1	756.7±16.8	813.1±31.2
Kidney(L)			
mg	205.3± 7.3	199.0± 6.6	220.1±12.5
mg/100g	742.5±19.8	722.8±14.5	776.4±33.8
Adrenal(R)			
mg	3.9± 0.23	3.7± 0.34	4.5± 0.29
mg/100g	14.2± 0.88	13.5± 1.17	16.0± 1.05
Adrenal(L)			
mg	4.1± 0.24	4.4± 0.41	4.8± 0.33
mg/100g	14.9± 0.88	16.1± 1.47	17.0± 1.19
Ovary(R)			
mg	10.2± 0.50	10.2± 0.89	11.1± 1.07
mg/100g	37.0± 1.82	36.6± 2.80	39.0± 3.30
Ovary(L)			
mg	9.6± 0.71	8.3± 0.54	10.6± 0.87
mg/100g	34.5± 2.35	30.1± 2.18	37.3± 2.89

a) Commercial dish washing detergent
b) Mean ± S. E.

Table IV Effect of commercial dish washing detergent & LAS upon mouse fetuses

Group	No. of mother mouse	Total No. of implantations (Mean±S.E.)	Total No. of survived fetuses (Mean±S.E.)	No. of dead fetuses & resorbed fetuses (%)	Mean body weight of survived fetuses (Mean±S.E.)	Sex M : F M/F
CMC	14	146 (10.4±0.42)	136 (9.7±0.27)	10 (all resorbed) (6.8)	1.28±0.008	62 : 74 0.84
LAS	15	148 (9.9±0.49)	137 (9.1±0.58)	11 (all resorbed) (7.4)	1.27±0.009	56 : 81 0.69
a) Detergent	6	61 (10.2±0.83)	57 (9.5±0.81)	4 (all resorbed) (6.6)	1.23*±0.017	34 : 23 1.48

a) Commercial dish washing detergent
* $P<0.05$

(3)骨異常

骨格異常は i) 化骨遅延（化骨核未癒合，未出現）
ii) 化骨変異（化骨核数過剰，不対称，癒合，未出現）
iii) 奇形（化骨変異の範囲を逸脱したもの）に大別して Table V に示した。

i) 化骨遅延

Table V Effect of commercial dish washing detergent & LAS on skeletal developments of mouse fetuses

		CMC		LAS		a) Detergent	
No. of mother mice		14		15		6	
No. of fetuses		136		137		57	
Degree of ossification							
Split of sphenoid		3(2.2)b)		1(0.7)		0	
Separation of sternebrae		8(5.9)		3(2.2)		3(5.3)	
No. of caudal vertebrae	4	0		0		4(7.0)	
	5	4(2.9)		23(16.8)		5(8.8)	
	6	32(23.5)		31(22.6)		14(24.6)	
	7	40(29.4)		21(15.3)		16(28.1)	
	8	21(15.4)		13(9.5)		9(15.8)	
	9	20(14.7)		20(14.6)		6(10.5)	
	10	10(7.4)		16(11.7)		2(3.5)	
	11	8(5.9)		12(8.8)		1(1.8)	
	12	1(0.7)		1(0.7)		0	
Fore paw		left	right	left	right	left	right
No. of proximal phalanges	4	136(100)	136(100)	137(100)	137(100)	57(100)	57(100)
No. of middle phalanges	2	0	0	0	0	1(1.8)	1(1.8)
	3	0	0	1(0.7)	1(0.7)	1(1.8)	1(1.8)
	4	136(100)	136(100)	136(99.3)	136(99.3)	55(96.5)	55(96.5)
No. of distal phalanges	0	1(0.7)	1(0.7)	2(1.5)	2(1.5)	5(8.8)	5(8.8)
	1	1(0.7)	0	2(1.5)	3(2.2)	1(1.8)	2(3.5)
	2	38(27.9)	39(28.7)	56(40.9)	55(40.1)	19(33.3)	18(31.6)
	3	72(52.9)	69(50.7)	71(51.8)	69(50.4)	29(50.9)	28(49.1)
	4	24(17.6)	27(19.9)	6(4.4)	8(5.8)	3(5.3)	4(7.0)

a) Commercial dish washing detergent
b) (%)

Table V Effect of commercial dish washing detergent & LAS on skeletal developments of mouse fetuses —— continue ——

		CMC		LAS		[a] Detergent	
Hind paw		left	right	left	right	left	right
No. of proximal phalanges	4	0	0	0	0	1(1.8)[b]	0
	5	136(100)	136(100)	137(100)	137(100)	56(98.2)	57(100)
No. of middle phalanges	0	0	0	2(1.5)	1(0.7)	2(3.5)	2(3.5)
	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	3(2.2)	3(2.2)	4(7.0)	4(7.0)
	4	12(8.8)	13(9.6)	25(18.2)	28(20.4)	8(14.0)	8(14.0)
	5	124(91.2)	123(90.4)	107(78.1)	105(76.6)	43(75.4)	43(75.4)
No. of distal phalanges	0	88(64.7)	87(64.0)	116(84.7)	117(85.4)	40(70.2)	41(71.9)
	1	17(12.5)	18(13.3)	9(6.6)	8(5.8)	6(10.5)	4(7.0)
	2	9(6.6)	8(5.9)	5(3.6)	5(3.6)	3(5.3)	3(5.3)
	3	22(16.2)	23(16.9)	7(5.1)	7(5.1)	7(12.3)	8(14.0)
	4	0	0	0	0	1(1.8)	1(1.8)
Delayed ossification							
of talus		39(28.7)	37(27.2)	58(42.3)	50(36.5)	34(59.6)	33(57.9)
of calcaneus		9(6.6)	7(5.1)	28(20.4)	24(17.5)	22(38.6)	19(33.3)
Retard of 13th rib		0		6(4.4)		0	
Variation							
Cervical rib		31(22.8)		26(19.0)		4(7.0)	
Split of atlas or axis		4(2.9)		8(5.8)		5(8.8)	
Absence of cervical bodies		1(0.7)		12(8.8)		7(12.3)	
No. of ribs	14	0		2(1.5)		4(7.0)	
No. of lumber vertebrae	5	4(2.9)		10(7.3)		2(3.5)	
Asymmetry of sternebrae		24(17.6)		16(11.7)		6(10.5)	
Anomalies		[c] 1(0.7)		0		0	

a) Commercial dish washing detergent
b) (%)
c) Fusion of ribs

化骨進行度の指標としては尾椎骨数，指趾骨の中節骨，末節骨および踵骨，距骨をとりあげ Table Ⅵ に指趾骨の中節骨，末節骨および尾椎骨の平均化骨数を示した。

指骨末節骨，趾骨中節骨は洗剤群，LAS 群ともに CMC 群に比し有意に骨化が遅れていた。趾骨末節骨は LAS 群において CMC 群に比し有意な骨化の遅れがみられた。

尾椎骨数は洗剤群において CMC 群に比して有意に少なかった。

距骨，踵骨とも洗剤群，LAS 群において CMC 群より未骨化胎仔数が多く化骨遅延の傾向がみられた。

ii) 化骨変異

頸肋骨，第1第2頸椎骨分岐，頸椎骨核体欠損，第14肋骨，腰椎数5，胸骨核不対称がみられた（頸肋骨とは肋骨を有する頸椎であり，第14肋骨とは肋骨を有する腰椎のことを示す。また，第1～6胸骨核のうち1つ以上左右の化骨核が上下に½以上偏位しているものを胸骨格不対称とした）。

頸肋骨は CMC 群で22.8%，LAS 群で19.0%，洗剤群で7%に認められた。頸肋骨は ddY 系マウスでは自然発生率が高くしばしば発現する変異である[10]。

頸椎核体欠損は洗剤群，LAS 群において CMC 群より多少多く認められ，化骨の遅延傾向と一致した。

第14肋骨は洗剤群に7%，LAS 群に1.5%認められた。

Table VI Effect of commercial dish washing detergent & LAS on average ossified number of fetuses

	CMC		LAS		[a] Detergent	
Fore paw	left	right	left	right	left	right
No. of middle phalanges	[b] 4.00±0.000	4.00±0.000	3.99±0.007	3.99±0.007	3.95±0.039	3.95±0.039
No. of distal phalanges	2.86±0.063	2.89±0.063	***2.56±0.058	***2.57±0.060	***2.42±0.127	***2.42±0.127
Hind paw						
No. of middle phalanges	4.91±0.024	4.90±0.025	***4.70±0.063	***4.72±0.054	***4.54±0.081	***4.54±0.081
No. of distal phalanges	0.74±0.098	0.76±0.099	***0.29±0.066	***0.28±0.065	0.65±0.183	0.67±0.157
No. of caudal vertebrae	7.64±0.135		7.56±0.169		***6.91±0.206	

a) Commercial dish washing detergent
b) Mean ± S.E.
*** $P<0.001$

第1第2頸椎弓分岐はCMC群2.9%，LAS群5.8%，洗剤群8.8%に，腰椎数5はCMC群2.9%，LAS群7.3%，洗剤群3.5%に，胸骨核不対称はCMC群17.6%，LAS群11.7%，洗剤群10.6%に認めた。

iii) 奇　形

CMC群に第7第8肋骨癒合が1例に認められたのみであった。

総括および考按

市販台所用洗剤とその主成分であるLAS（linear alkylbenzenesulfonate）と対照としてCMC（carboxymethylcellulose）とを妊娠マウスの皮膚に塗布して，母体および胎仔に及ぼす影響を検索した。

市販台所用洗剤はその15m*l*を100m*l*の水で稀釈したものを（一般使用規準の約100倍の濃度），LASは，台所洗剤中LAS濃度が17%であるとして，稀釈台所用洗剤中LAS濃度と同じになるよう2.22%水溶液としたものを，CMCは粘度等の検討により2%液のものを使用し，夫々の0.5m*l*を毎日1回マウスの4cm平方に剃毛した背部皮膚に妊娠0日より13日までの14日間塗布した。

妊娠が成立した母マウスは，いづれも塗布開始の初期に体重の軽度の減少がみられたが，特に洗剤群では妊娠4～5日目まで続いた。しかしその後はCMC群やLAS群と同様に順調な体重の増加を示した。また，妊娠18日目の剖検で，各群とも諸臓器組織に異常を認めなかった。

腟栓を確認して妊娠の成立したものはCMC群で17匹中14匹（82.4%），LAS群で16匹中15匹（93.8%），洗剤群で21匹中6匹（28.6%）であり，明らかに洗剤群において受胎率が低かった。

試料塗布は妊娠0日目より開始されたので子宮粘膜に胚が着床する以前の期間が含まれ，受胎率の著しい低下は着床の阻害を示唆する。しかし，妊娠が成立した母獣の一腹平均着床数，死亡仔数，吸収胚数はCMC群LAS群と比べて差はなく，また妊娠の成立しなかったものの子宮内には胎仔および附属物の痕跡はもちろん子宮壁に着床痕跡も認められなかった。このことから洗剤群の母獣においては，胚は，全部着床を阻害されるか，あるいは全部着床して妊娠が成立するかのいづれかであり，一度着床した胚に対する致死的な作用は，少なくともここで用いた洗剤濃度ではないと云えよう。

胎仔の外形，内臓異常については，CMC群の1例に曲尾がみられたのみであった。

生存胎仔の平均重量は，CMC群にくらべLAS群では差がなかったが，洗剤群では極めて僅少ではあるが有意に小であった。

胎仔の骨染色標本の観察では尾椎骨，指趾骨の中節骨末節骨および踵骨，距骨の化骨状態において，CMC群に比べてLAS群，洗剤群に遅延の傾向が認められた。その傾向は洗剤群の方が大で，洗剤群の胎仔重量がCMC群に比べ少なかったことと併せて考え胎仔の成長が遅れているようであった。

化骨変異も各群間に顕著な差はなく，LAS，洗剤の塗布に由来すると考えられるものはなかった[10) 11)]。

以上のように今回の試験では三上らの報告した胎仔異常は認めることが出来なかった。三上らは ICR/JCL 系マウスを使用したが，本試験では ddY/S 系のものを使ったため，感受性の相違も考えられるので，今後この点も考慮して一層の検討を加えたい。

また，洗剤塗布による受胎率の低下の原因については現在全く不明であるが，LAS 以外の成分の吸収作用か，LAS 以外の成分による LAS の吸収増大による LAS の作用か，あるいは洗剤の皮膚への何らかの作用を介した2次作用か等について吟味する必要があろう。

文　献

1) Tusing, T. W. , Pauynter, O. E. and Opdyke, D. L. : Toxicol. Appl. Pharmacol., 2, 464 (1960)
2) Bronman, G. and Loeser, A : Fette-Seifen Anstrichmittel, 65, 814 (1963)
3) Buehler, E. V. , Newmann, E.A. and King, W. R. : Toxicol. Appl. Pharmacol., 18, 83 (1971)
4) 大森義仁・桑村司・田中悟・川島邦夫・中浦慎介：食衛誌，9，473 (1968)
5) 田中領三：日公衛誌，13：230 (1966)
6) 柳沢文徳：食品衛生の考え方，日本放送出版協会 203頁より引用。
7) 三上美樹：坂井義雄：解剖誌，48，77 (1973)
8) 三上美樹・坂井義雄・宮本勇：第13回日本先天異常学会総会抄録集：44 (1973)（朝日新聞昭和48年3月26日号）
9) Dawson, A.B. : Stain Teoh, 1, 123 (1927)
10) 大島康夫・森田遙・菅野康則：先天異常，5，256 (1965)
11) 宮尾嶽雄：医学と生物学，64，161 (1962)

食品添加物の相乗毒性に関する研究(Ⅲ)
Dibuty hydroxy toluene と Alkyl benzene sulfonate との併用による亜急性毒性について

米山允子* 柴 英子* 藤井 孝*
伊川三枝子* 市川久次* 坂本義光*
矢野範男* 小林博義* 平賀興吾*

TOXICOLOGICAL POTENTIATION STUDIES ON FOOD ADDITIVES (Ⅲ) DIBUTYL HYDROXY TOLUENE AND ALKYL BENZENE SULFONATES

Masako YONEYAMA, Hideko SHIBA, Takashi FUJII, Mieko IKAWA, Hisatsugu ICHIKAWA, Yoshimitsu SAKAMOTO, Norio YANO, Hiroyoshi KOBAYASHI and Kogo HIRAGA

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

Summary

1. In order to investigate the integrated effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and branched alkylbenzene sulfonate (ABS) on the toxicity of dibutylhydroxy-toluene (BHT), a 6 month-feeding study has been completed in which both male and female rats of a Wister SLC strain (SPF) in a group of 10 animals were received respectively the BHT 0.8%, the LAS 0.2 and 0.07%, the ABS 0.2 and 0.07%, the BHT 0.8 % plus the LAS 0.2%, the BHT 0.8% plus the LAS 0.07%, the BHT 0.8 % plus the ABS 0.2%, and the BHT 0.8% plus the ABS 0.07% in the diet.

2. Spontaneous bleedings in testis, nasal cavity and abdominal cavity were noticed with a half of male rats received the BHT and the LAS simultaneously from approximately the 70th day of drug administration, and the same finding was noticed with a male rat received the BHT and the ABS simultaneously. Furthermore, they manifested an anemia and prolongation of blood coagulation time.

3. No potentiated or antagonistic effects were observed in the combination of the LAS or the ABS with the BHT, except that the combined treatment of male rats with the BHT and the LAS caused the spontaneous bleeding as described.

油脂類の酸化防止剤として使用されている BHT (dibutyl hydroxy toluene) の毒性に関する研究の一環としてBHTと他の食品添加物あるいは食品汚染物質との相互作用を知るため，これまでにBHTと同じく酸化防止剤であるBHA (butyl hydroxy anisol) との併用，またBHTと抗酸化性を有する発色剤である亜硝酸ナトリウムとの併用による毒性の変化について検討を加えて来た[1)2)]。今回はBHTと洗剤の主成分であるアルキベンゼンスルフォネートとを併用して行った亜急性毒性試験の結果について報告する。

* 東京都立衛生研究所毒性部

試験材料および試験方法

試料： 1) BHT(dibutyl hydroxy toluene)—和光純薬工業株式会社製，結晶性粉末，m.p69,5°C, Lot No, DG 1870。

2) 直鎖形アルキルベンゼンスルフォネート(linear alkylbenzene sulfonic acid sodium salt, 以下 LAS)—花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60, Lot No. 127。

3) 分岐鎖形アルキベンゼンスルフォネート (branched alkylbenzene sulfonic acid sodium salt, 以下 ABS) —和光純薬工業株式会社製 Laurylbenzene sulfonic acid sodium salt, Lot No. AL 6526。

LAS および ABS のアルキル基の炭素数の分布および成分は次の通りであった。

	LAS	ABS
C_9	—	4.7%
C_{10}	10.6%	6.1%
C_{11}	34,1%	10.0%
C_{12}	27,7%	60.5%
C_{13}	19.0%	8.8%
C_{14}	8.7%	4.7%
C_{15}	—	4.4%
C_{16}	—	0.8%
	LAS	ABS
有効成分	60±2%	95.5%
未反応油分	1.5%以下	1.6%
無機塩類	4.0%以下	2.9%
水　分	38%	0.0%
pH(1%)	7.1	5.3
平均分子量	345.8	348.8

各試料は次の割合で船橋農場製ラット，マウス用固型飼料 F II の原末に混合後固型化し，試験動物に水道水とともに26週間自由摂取させた。なお対照には F II 固型飼料を与えた。

BHT	0.8%		
LAS	0.2%		0.07%
ABS	0.2%		0.07%
BHT	0.8%	+ LAS	0.2%
BHT	0.8%	+ LAS	0.07%
BHT	0.8%	+ ABS	0.2%
BHT	0.8%	+ ABS	0.07%

試験動物： ラット—静岡県実験動物農業協同組合において barrier system 下に生産された Wistar SLC 系雌雄，生後4週のものを使用した。

飼育環境は，室温25±1°C，湿度55～65%，照明時間を午前6時から午後6時までとし，各試料につき雌雄夫々10匹を用い，5匹ずつ同一ステンレス金網ケージに収容飼育した。

試験中毎週1回体重，飼料および試料摂取量，飲水量を測定するとともにケージの交換を行なった。症状の観察は毎日行なった。試料摂取量は1匹当りの平均量と体重kg当りの量とを次の様にして求めた。

(投与量－残量－コボシ量)×濃度/匹数又は/体重kg

検査： 26週間の試料投与終了時に次の諸項目について検索した。

1. 血液学検査： a）赤血球数 b）ヘモグロビン（シアンメトヘモグロビン法), c）ヘマトクリット d）赤血球膜抵抗 (Parpart 法) e）血液凝固時間(Sahli-Fonio 法) f）白血球数 g）白血球分画 h）血小板(Fonio 法)

a)～c) および f)～h)は剖検の1週間前にラットを背位に固定し，わずかに大伏左静脈を露出後 1/3 注射針で軽く穿刺し湧出する血液を採取し検査した。b）は剖検時断頭により放出する血液を 1.0% EDTA 塗布乾燥した時計皿に約1 m*l*の血液をとり素早くガラス棒でかき混ぜ各濃度食塩水中に 0.05ml を注入し法の如く測定した。測定結果は溶血曲線の0.35%から0.5%食塩水間の4点の溶血度の総和で表わした。e）はd）と同様に放出する血液約1.0mlを時計皿にとると同時にストップウォッチを発動させ，15秒ごとに法にしたがって開始時間と完結時間を測定した。。

2. 血清生化学検査： 剖検時断頭により放出する血液を直接ポリエチレン製遠心管に採取し30分室温に放置後 2°C冷却遠心機を用い 3,000 rpm 15分遠心し，血清を分離採取後次の項目を検査した。

a）総蛋白量(エルマ蛋白計)，b)GO活性(Retman-Frankel 法)，c)ALP 活性(Kind-Armstrong 法)，d）LAP 竹中らの法)，e)尿素窒素量(Urease-Indophenol 法)，f)A/G 比 (電気泳動法)， g)ビリルビン量 (Evelyn-Malloy 法)。

3. 尿検査：剖検2週間前に尿尿を分離採取した尿について次の項目を試験紙 Labstix, Ictostix, Urobilistix を用いて検査した。

a)蛋白，b)グルコース，c)ケトン体，d)潜血 e)ビリルビン，f)ウロビリノーゲン

4. 剖検：肉眼的所見観察

5. 臓器重量測定：脳，下垂体，甲状腺，胸腺，心肺，肝，腎，脾，副腎，前立腺，精巣，子宮，卵巣，盲腸の実重量と25週目の体重にもとづき100g体重当り

の重量を求めた。

6. 病理組織学検査：重量測定臓器以外の胃，大・小腸，膵，精巣上体，皮膚，骨についても法の通り処理し，H. E. 染色の他 PAS 反応，鉄染色，脂肪染色等により鏡検した。

試験結果と考案

Ⅰ 体重，飼料摂取量，飲水量および一般症状の推移。

体重増加，飼料平均摂取量，試料平均摂取量，平均飲水量平均糞量は Table Ⅰおよび Fgi 1～2に示す通りである。

ABS および LAS の0.2%群，0.07%群ともに対照群と比較して意味ありと考えられる変動を認めなかった。また，特異な症状も示さなかった。

BHT 0.8%群は前報[1) 2)] の場合の同様初期より体重増加の抑制がみられ，また，尿が，排尿後赤変し，下腹部，尾等を汚染したが，多飲傾向や，外見上の削痩感，歩行異常や緩慢等はみられなかった。

BHT にABS ないし LAS 併用の各群では体重増加，飼料摂取量，飲水量等いずれも BHT 0.8% 群と大差なかった。しかし，BHT0.8%＋LAS 0.07 %群雄の５匹，BHT0.8%＋LAS0.2%群雄の４匹，BHT0.8%＋ABS0.2%群雄の１匹（各10匹中）が陰嚢内出血（陰嚢が青色に見えるもの），鼻出血，眼球の貧血状態（赤色の消褪）等が行動の緩慢とともにみられた。これら自然出血をおこしたもの以外のラットでは BHT 0.8 %群の症状と差を認めなかった(Table Ⅰ Fig. 1～2参照)。

自然出血は突発的に起り初めて認めたのは試料投与開始後70日目で以降試験終了時まで散発した。

発症したものはすべて雄であり，またABSより LAS 併用群に圧倒的に多かった。

自然出血を認めたものはその時に出来る血液学検査と剖検を行なった結果，血液学的には Table Ⅱに示すように著明な貧血と凝固時間の延長がみられた。剖検では陰嚢内出血，精巣・精巣上体内出血，腹腔内出血，腸管膜出血，腎周囲脂肪組織内出血，鼻腔内出血，等を認め，肝臓の黄褐色化を示すものもあった。(Table Ⅱ参照)

Ⅱ 血液学検査

結果は Table Ⅲ～Ⅳに示す通りで，ABS および LAS の0.2%0.07%の各群では認むべき変動はなかった。BHT 0.8% 群では前報の場合と同様にヘモグロビン量の低下と凝固時間の延長の傾向がみられた。BHT と ABS 併用のものは BHT 単独のものと大体同じ傾向を示した。BHT と LAS 併用のもの（自然出血を起した以外のもの）も大体 BHT 単独のものと同様であったが，雄では明らかな凝固時間の延長が認められた。

なお，全群の雌の血小板数の増加がみられたが，これはむしろ対照群の血小板数が少なく検出されたのではないかと考えている。

また，白血球数および白血球分画において推計学的に有意な変動と認められるものが散見されたが，意味するところについては今後の検討にまちたい(Table Ⅲ，Ⅳ-1，Ⅳ-2参照)。

Ⅲ 血清生化学検査

結果は Table Ⅴ に示すとおりで，ABS, LAS の単独の各群では特に意味ありと考えられる変動はみられなかった。BHT 単独では雌の GOT 活性の有意な低下が前報[2)] と同様にみられた以外は変動を示さなかった。BHT と ABS または LAS 併用群では ALP 活性の増加が(BHT＋LAS群雄では検査しなかった)みられ，また BHT＋LAS 群雄では直接ビリルビンの増加が認められた。別報[3)] で報告したように ABS および LAS は ALP 活性を上昇させる傾向を有しているので BHT との協力作用による増強と考えられる。また，直接ビリルビンは，変動が比較的大であるので明らかなことはいえないが，LAS 0.2 %群雄でも増加傾向があるので，BHT ＋ LAS 群雄における直接ビリルビン量の有意な増加は，同様 BHT と LAS の協力作用によるものと考えられる(Table Ⅴ参照)。

Ⅳ 尿検査

結果は Table Ⅵ に示す通りで，全群とも対照群と比較して特に差があるとは考えられない変動であった(Table Ⅵ参照)。

Ⅴ 臓器重量

結果は Table Ⅶ～Ⅹに示す通りであるが，BHT＋LAS 群雄については測定しなかった。

絶対重量と体重比重量の関係，用量と反応の関係，以前[1) 2) 3)] の試験結果との関係等より考え意味ある重量の変化と思われるものは ABS および LAS 単独群雄の盲腸，BHT単独群雌雄の肝臓と盲腸の増加であり，BHTと ABS あるいは LAS 併用群では大体 BHT 単独群と同じ変動を示し，協力効果と考えられるものはなかった（Table Ⅶ，Ⅷ，Ⅸ，Ⅹ参照)。

Ⅵ 剖検所見

前述の自然出血を来たしたもの以外には特記するような所見は，いずれの群にもみられなかった。

Ⅶ 病理組織所見

ABS, LAS および BHT 単独投与の諸臓器の組織所

見の主なものは腎臓と肝臓であったが，これらの所見はこれまでの試験で報告したとおりであった[2)3)]。BHT と ABS あるいは LAS 併用群での所見は BHT 単独の場合と大差なく，協力作用と思われる所見はなかった。

摘　　要

BHT0.8%に LAS ないし ABS を夫々0.2%および0.07%の割合に併用添加した飼料でラットを26週間飼育した亜急性毒性試験で BHT の毒性に及ぼす LAS および ABS の影響を検討した。

BHT・LAS 併用飼育雄ラットに飼育開始後70日目より陰嚢や鼻腔等に自然出血を来たすものが約50%にみられた。これらのラットではヘモグロビン量の低下と血液凝固時間の著明な延長が認められた。また，同群の試験終了時まで生存したものにおいても血液凝固時間の延長がみられた。BHT・ABS 併用飼育ラットにおいては雄の1例にのみ同様の自然出血を来たしたが試験終了時生存のものでは有意な血液凝固時間の延長は認められなかった。

雌ラットにおいては自然出血を来たしたものはなく明らかな性差を示した。

自然出血のほかは，併用による相乗効果と考えられる所見はほとんどなく BHT 単独のものと大差なかった。

BHT・LAS併用雄ラットの自然出血の所見はジクマロール適用の場合の出血と近似しており，飼料中への血液凝固阻止物質の混入も考えられるので，新たな飼料を用意し追試と発現機序に関する研究を現在施行中である。

文　　献

1) 平賀興吾,他：東京都立衛生研究所年報，22：231（1970）
2) 市川久次,他：東京都立衛生研究所年報，23：345（1971）
3) 米山允子,他：東京都立衛生研究所年報，印刷中

「謝辞」　本研究に多大の援助をいただいた毒性部諸氏に感謝の意を表します。

Table I　Body Weight Gain, Food, Sample, Water Intake and Feces Excreation

Group		No. of Rats	Initial Body wt (g) mean±S.E. [1]	Final Bady wt (g) mean±S.E.	Bodyweight Increase (%) [2] mean±S.E.	Food (g) /rat/dag	Sample (mg) /rat/day	Sample (mg) /kg/day	Water (g) /rat/day	Feces (g) /rat/day
Male	Control	10	85.00±0.871	387.00±9.509	452.10±9.841	14.17	—	—	16.90	2.31
	ABS− 0.2%	10	82.40±0.933	385.60±5.288	468.84±10.237	13.90	27.80	102.9	20.07	2.51
	ABS− 0.07%	10	85.10±1.417	393.10±6.309	462.80± 9.360	13.14	9.20	33.8	16.71	1.95
	LAS− 0.2%	10	84.50±0.957	383.40±6.715	453.92± 7.603	13.70	27.40	101.5	18.18	2.28
	LAS− 0.07%	10	80.90±1.923	387.10±5.930	480.74±13.113	14.48	10.14	37.2	16.91	2.24
	BHT−0.8%	10	83.50±1.447	310.30±9.607	375.03± 9.105**	12.62	100.96	452.6	17.66	2.66
	ABS 0.2%+BHT 0.8%	10→ 9	84.40±0.635	318.40±4.609	377.26± 4.778**	12.69	126. 9	550.8	17.66	2.87
	ABS 0.7%+BHT 0.8%	10	86.60±1.107	322.80±5.836	373.31± 8.314**	12.51	108.84	478.5	18.39	2.91
	LAS 0.2%+BHT 0.8%	10→ 6	84.30±0.955	311.85±8.103	373.90± 9.271**	12.15	121.51	539.94	18.34	2.77
	LAS 0.7%+BHT 0.8%	10→ 5	84.60±1.564	306.40±5.094	366.63±11.142**	13.09	13.88	489.3	19.52	3.00
Female	Control	10	71.80±0.512	202.50±2.325	282.24± 4.422	9.35	—	—	17.48	1.53
	ABS− 0. 2%	10	70.30±0.816	190.10±4.583	270.15± 4.340	8.45	16. 9	107.7	16.29	1.55
	ABS− 0.07%	10	71.20±1.142	202.40±4.445	284.43± 5.342	8.62	6.03	37.0	14.55	1.29
	LAS− 0. 2%	10	74.30±1.116	201.10±3.334	271.05± 5.314	8.90	17. 8	108.7	17.69	1.39
	LAS− 0.07%	10	76.00±2.683	203.20±7.172	269.35±10.255	9.35	6.55	39.4	19.56	1.63
	BHT−0.8%	10	70.60±0.884	169.60±2.409	240.68± 5.065**	8.20	65.6	459.2	16.56	1.54
	ABS 0.2%+BHT 0.8%	10	71.70±0.856	170.00±4.096	237.12± 5.139**	8.15	81.56	569.8	15.42	1.64
	ABS 0.7%+BHT 0.8%	10	75.50±0.921	169.90±5.528	225.76± 8.672**	7.93	8.99	478.2	14.55	1.64
	LAS 0.2%+BHT 0.8%	10	71.10±1.168	166.70±5.073	235.45± 9.188**	7.79	77.9	545.7	15.05	1.72
	ABS 0.7%+BHT 0.8%	10	76.80±1.113	177.30±1.880	231.05± 2.283**	9.05	8.74	529.1	15.64	1.77

1) $S.E.=\sqrt{\frac{\Sigma(X-\bar{x})^2}{N(N-1)}}$　　2) (Final B. W)/Initial B. W−1×100　　* P<0.05　　* * P<0.01

Table II Hematological findings in spontaneous bleeeding rat fed BHT plus ABS or LAS in the diet.

Group	*	Sex	Hb (g/dl)	Ht(%)	WBC × 10^2/mm^3	RBC × 10^4 /mm^3	MCH(rr)	MCV(μ^3)	MCC(%)	Total Protein (g/dl)	Whol Blood Clotting Time	
											beginning (min)	ending (min)
ABS0.2%+BHT0.8%	180	♀	6.4	18.0	46.5	240	26.7	75.0	35.6	—	10.3	14.5
LAS0.7%+BHT0.8%	70	♀	6.1	16.5	266.5	506	12.1	32.6	36.9	—	—	—
	98	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	100	♀	—	—	40.5	975	—	—	—	7.2	3.6	4.1
	119	♀	9.6	26.5	36.5	499	19.2	53.1	36.2	7.0	3.4	4.3
	128	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LAS0.2%+BHT0.8%	105	♀	13.4	40.0	92.0	747	17.9	53.5	33.5	8.8	34.7	no clotting
	112	♀	12.5	36.5	20.5	616	20.3	59.3	34.2	6.2	2.4	3.2
	158	♀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	159	♀	9.4	26.5	68.7	487	19.3	54.4	35.4	6.4	4.3	12.5

* Duration of Admisnitration

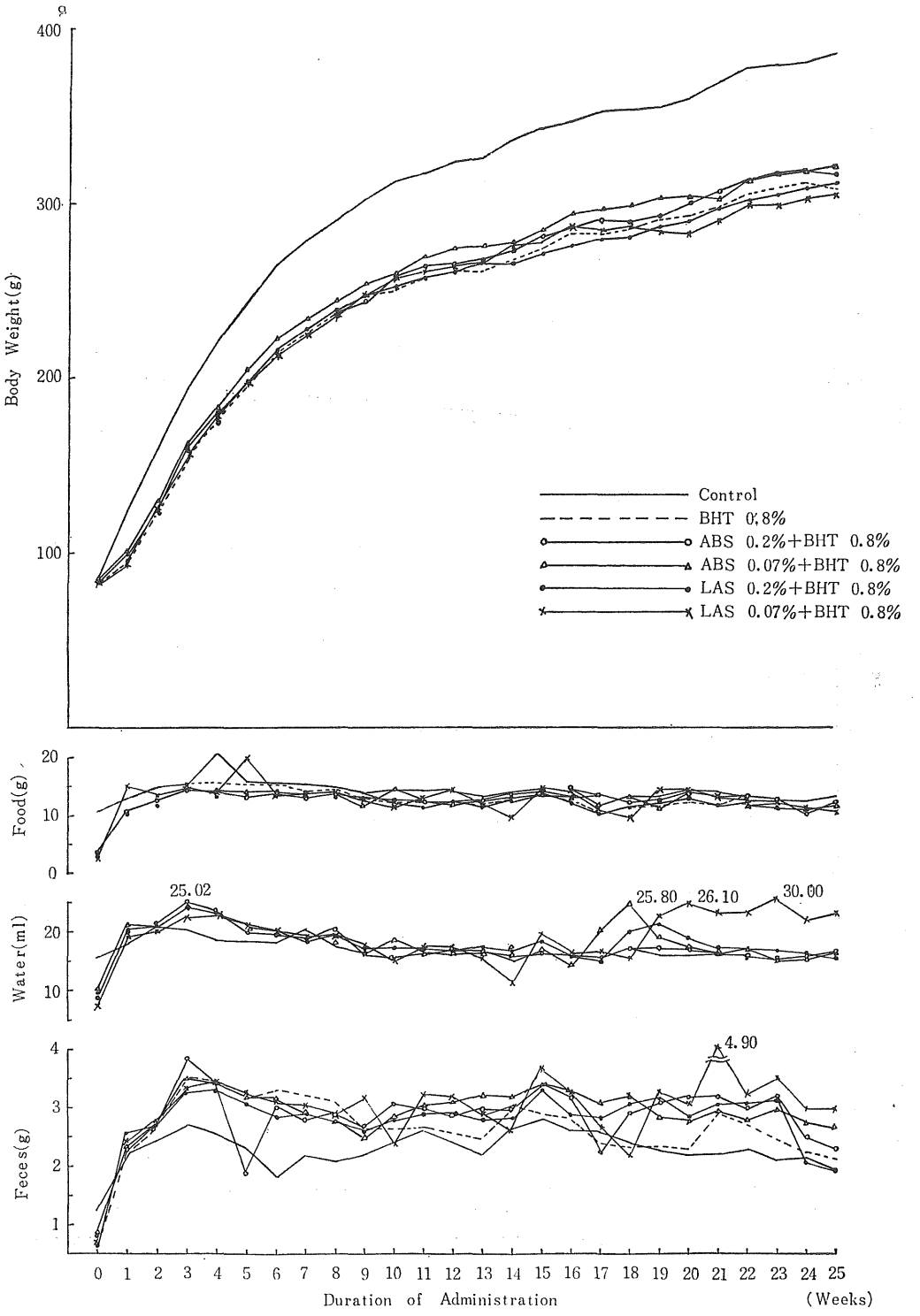


Fig. 1 Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excreation (Male)

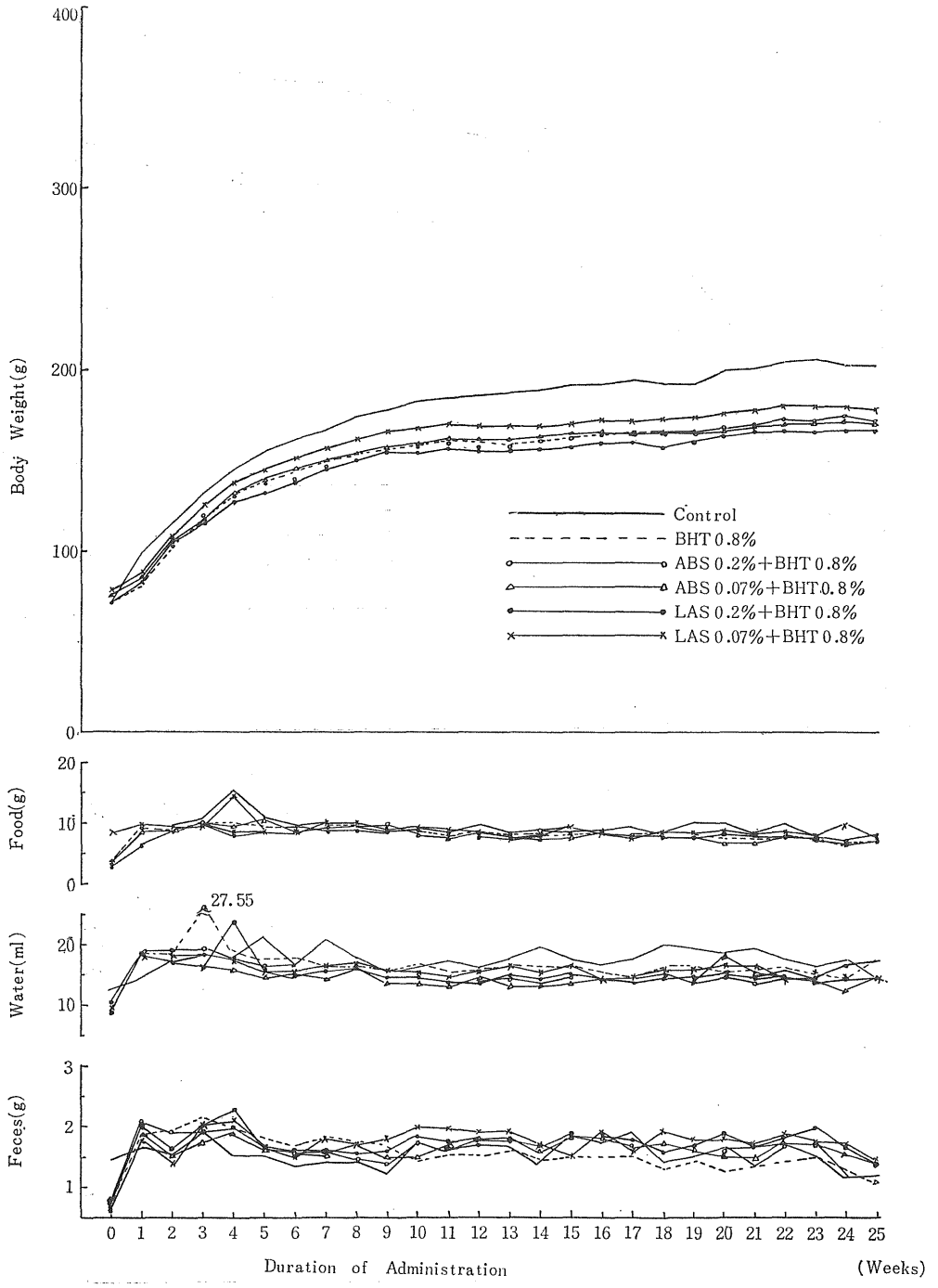


Fig. 2 Mean Weekly Body Weight, Food Intake, Water Intake and Feces Excreation (Female)

Table III Hematology

	Group	No. of Rats	RBC × 10^4/mm^3	Ht (%)	Hb (g/dl	MCH (rr)	MCV (μ^3)	MCC (%)	Thrombocyte × 10^4	Osmotic Fragility	Whole blood clotting time (min) beginning	Whole blood clotting time (min) ending
Male	Control	10	910±13 1)	53.1±0.4	19.8±0.3	21.8±0.4	58.4±1.0	37.4±0.6	70.5±9.0 (9) 2)	213.6±9.4 (9)	1.06±0.13	2.12±0.26
	ABS- 0.2%	10	939±31	52.7±0.3	19.4±0.1	20.8±0.6	56.6±1.8	36.8±0.2	72.2±6.4 (8)	225.2±5.4 (8)	0.94±0.12	1.72±0.21
	ABS- 0.07%	10	948±30	53.4±0.5	19.7±0.2	20.9±0.6	56.7±1.5	36.8±0.3	73.7±7.8 (9)	208.7±5.6 (9)	1.36±0.16	2.45±0.24
	LAS- 0.2%	10	914±25	53.3±0.3	19.5±0.1	21.5±0.6	58.6±1.6	36.7±0.2	64.4±5.5 (9)	228.1±6.5 (9)	1.34±0.19	2.50±0.35
	LAS- 0.07%	10	925±20	53.3±0.4	19.6±0.1	21.2±0.5	57.8±1.2	36.7±0.2	80.1±13.2	225.1±10.5	1.40±0.19	2.52±0.34
	BHT 0.8%	10	889±17	53.0±0.3	18.2±0.1**	20.5±0.4	59.8±1.4	34.3±0.1**	68.3±9. 1(9)	201.4±9.1	3.35±1.11	6.95±2.14
	ABS 0.2% + BHT 0.8%	9	927±23	53.1±0.4	18.8±0.1	20.4±0.5	57.5±1.5	35.4±0.3	70.7±8.8 (8)	215.7±10.7(9)	1.93±0.24	4.01±0.47
	ABS 0.7% + BHT 0.8%	10	897±18	53.1±0.4	19.3±0.1	21.6±0.5	59.3±1.3	36.4±0.2	71.7±9.1 (9)	212.0±5.2	1.50±0.13**	3.15±0.23
	LAS 0.2% + BHT 0.8%	6		52.0±0.5	18.5±0.1*	20.2±1.0	56.8±2.9	35.5±0.1*	60.1±6.6 (6)		2.66±0.21**	4.66±0.42**
	LAS 0.07% + BHT 0.8%	5		50.8±0.6**	18.0±0.2**	21.2±0.8	59.8±2.4	35.5±0.2	75.6±12.8(3)		2.00±0.76(3)	17.75±4.20**(3)
Female	Control	10	838±22	52.1±0.5	19.9±0.5	23.9±0.9	62.5±1.6	38.2±1.0	52.0±3.8 (9)	240.4±7.5 (8)	1.29±0.29	2.95±0.30
	ABS- 0.2%	10	823±20	49.7±1.7	19.1±0.1	23.3±0.5	60.5±2.5	39.1±1.9	64.4±3.7* (9)	227.1±15.0	1.25±0.22	2.97±0.32
	ABS- 0.07%	10	829±9	51.2±0.3	19.0±0.1	22.9±0.3	61.8±1.0	37.1±0.2	69.1±6.9* (8)	230.4±6.4 (9)	0.99±0.14	2.50±0.20
	LAS- 0.2%	10	778±16	51.1±0.2	19.1±0.1	24.7±0.4	65.9±1.3	37.5±0.2	59.8±5.9 (9)	245.4±9.3 (9)	1.26±0.19	2.92±0.22
	LAS- 0.07%	10	806±18	50.6±0.4*	18.9±0.1	23.6±0.6	63.0±1.5	37.4±0.3	63.3±5.3 (9)	248.4±10.2	1.22±0.21	3.30±0.41
	BHT 0.8%	10	837±22	50.6±0.5	18.4±0.2*	22.1±0.7	60.9±2.0	36.3±0.4	67.2±5.4* (9)	233.7±7.6 (9)	1.50±0.20	3.54±0.26
	ABS 0.2% + BHT 0.8%	10	805±18	50.6±0.6	18.3±0.1*	22.9±0.6	63.1±1.8	36.3±0.2**	69.7±5.7*	244.8±6.1 (8)	1.37±0.14	3.28±0.17
	ABS 0.7% + BHT 0.8%	10	808±21	51.8±0.4	19.0±0.1	23.6±0.5	64.4±1.5	36.7±0.1	66.5±4.9* (9)	250.1±6.2	1.32±0.19	3.05±0.20
	LAS 0.2% + BHT 0.8%	10	837±16	51.4±0.4	18.3±0.1*	21.9±0.4	61.5±1.2	35.7±0.1*	66.7±4.7* (9)	239.4±2.8	2.08±0.29	3.60±0.37
	LAS 0.07% + BHT 0.8%	10	823±13	49.9±0.4**	18.2±0.1*	22.2±0.3	60.7±0.7	36.5±0.3	75.1±5.4** (9)	236.6±11.0	1.94±0.29	3.72±0.38

1) mean±SE 2) ( ) No. of rats * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table IV-1 Percent Differential of Leucocytes

	Group	No. of Rats	Neutro	Lympho	Mono	Eosino
Male	Control	10	9.80±0.876[1)]	89.08±0.954	0.28±0.102	0.83±0.203
	ABS- 0.2%	10	10.91±0.879	87.86±1.090	0.50±0.143	0.71±0.129
	ABS- 0.07%	10	10.45±1.143	88.37±1.247	0.52±0.105	0.64±0.157
	LAS- 0.2%	10	10.34±0.521	88.22±0.625	0.40±0.102	0.62±0.128
	LAS- 0.07%	10	9.41±1.074	89.35±0.998	0.50±0.088	0.73±0.125
	BHT 0.8%	10	12.23±0.660*	86.74±0.649	0.22±0.074	0.80±0.187
	ABS0.2%+BHT0.8%	9	8.95±0.731	90.26±0.746	0.26±0.082	0.52±0.153
	ABS0.07%+BHT0.8%	10	10.86±0.876	88.03±1.055	0.44±0.155	0.66±0.145
	LAS0.2%+BHT0.8%	6	9.95±0.951	88.88±1.085	0.38±0.142	0.77±0.388
	LAS0.07%+BHT0.8%	5	10.18±1.286	88.93±1.207	0.26±0.174	0.52±0.159
Female	Control	10	8.24±0.56	90.85±0.685	0.18±0.073	0.72±0.150
	ABS- 0.2%	10	9.14±0.573	89.88±0.564	0.23±0.077	0.73±0.153
	ABS- 0.07%	10	8.02±0.484	91.02±0.523	0.14±0.072	0.80±0.185
	LAS- 0.2%	10	8.75±0.754	90.15±0.781	0.38±0.096	0.70±0.146
	LAS- 0.07%	10	8.65±0.752	90.39±0.771	0.47±0.099	0.54±0.108
	BHT 0.8%	10	10.15±1.012	89.03±0.957	0.47±0.101*	0.33±0.072*
	ABS0.2%+BHT0.8%	10	8.79±0.655	90.12±0.787	0.27±0.075	0.79±0.203
	ABS0.07%+BHT0.8%	10	8.00±0.662	90.91±0.698	0.35±0.087	0.72±0.152
	LAS0.2%+BHT0.8%	10	8.85±0.694	90.58±0.66	0.18±0.075	0.37±0.117
	LAS0.07%+BHT0.8%	10	8.91±0.679	90.32±0.695	0.17±0.071	0.58±0.230

1) mean±S.E. * $P<0.01$ ** $P<0.05$

Table IV-2 Counts Differential of Leucoctyes

$\times 10^2/mm^3$

	Group	No. of Rats	WBC	Neutro	Lympho	Mono	Eosino
Male	Control	10	88.12±3.686[1)]	8.49±0.678	78.65±3.779	0.24±0.087	0.67±0.148
	ABS- 0.2%	10	93.22±4.578	9.50±1.274	81.86±4.077	0.48±0.124	0.66±0.115
	ABS- 0.07%	10	101.30±3.697*	10.40±1.058	89.71±4.066	0.52±0.105	0.65±0.169
	LAS- 0.2%	10	90.55±6.435	9,61±1.166	79.64±5.196	0.36±0.089	0.60±0.155
	LAS- 0.07%	10	96.15±3.329	9.08±1.077	85.85±2.913	0.50±0.093	0.71±0.135
	BHT 0.8%	10	85.07±5.892	10.48±0.993	73.77±5.110	0.16±0.058	0.65±0.151
	ABS0.2%+BHT0.8%	9	92.47±4.827	8.31±0.874	83.46±4.422	0.24±0.078	0.44±0.120
	ABS0.7%+BHT0.8%	10	86.57±5.045	9.47±1.03	76.13±4.375	0.40±0.154	0.057±0.121
	LAS0.2%+BHT0.8%	6	85.95±3.446	8.63±1.068	76.28±2.544	0.32±0.115	0.72±0.368
	LBS0.07%+BHT0.8%	5	90.75±6.261	9.18±1.135	80.76±5.855	0.26±0.162	0.45±0.137
Female	Control	10	92.00±3.802	7.59±0.579	83.57±3.517	0.16±0.066	0.67±0.139
	ABS- 0.2%	10	93.50±4.995	8.64±0.821	83.99±4.455	0.19±0.065	0.66±0.135
	ABS- 0.07%	10	92.60±3.730	7.36±0.431	84.34±3.574	0.12±0.062	0.76±0.182
	LAS- 0.2%	10	83.15±4.350	7.38±0.637	76.67±5.063	0.32±0.078	0.61±0.138
	LAS- 0.07%	10	94.40±5.110	8.36±1.176	85.13±4.180	0.37±0.091	0.51±0.101
	BHT 0.8%	10	90.20±5.086	9.18±1.118	80.27±4.498	0.42±0.096*	0.30±0.069*
	ABS0.2%+BHT0.8%	10	93.85±5.765	8.48±0.886	86.09±4.648	0.28±0.079	0.74±0.199
	ABS0.07%+BHT0.8%	10	100.00±5.567	7.81±0.568	91.05±5.337	0.37±0.088	0.75±0.166
	LAS0.2%+BHT0.8%	10	94.85±4.456	8.37±0.711	85.95±4.214	0.18±0.077	0.33±0.106
	LAS0.07%+BHT0.8%	10	94.75±4.637	8.36±0.625	85.66±4.412	0.16±0.067	0.56±0.197

1) mean±S. E. * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table V Serum Chemistry

	Group	No. of Rats	ALP K-A Unit/dl	LAP G-R Unit	GOT Karmen Unit/ml	UN mg/dl	A/G Ratio	Total Protein g/dl	Bililubin		
									Indirect mg/dl	Direct mg/dl	Total mg/dl
Male	Control	10	24.07±1.109[1)]	185.81±9.586	132.75±6.357	17.52±1.733	1.42±0.082	7.36±0.071	0.20±0.050	0.11±0.036	0.29±0.044
	ABS- 0.2%	10	24.06±1.223	174.44±6.937	137.40±8.118	15.82±0.876	1.49±0.100	7.14±0.072	0.09±0.044	0.11±0.031	0.16±0.061
	ABS- 0.07%	10	23.82±1.357	124.64±10.178	112.50±7.596	13.81±0.929*	1.53±0.120	7.32±0.089	0.15±0.058	0.08±0.002	0.23±0.064
	LAS- 0.2%	10	24.34±1.173	181.23±9.637	140.25±14.732	13.04±1.224*	1.47±0.091	7.20±0.059	0.41±0.231	0.31±0.188	0.68±0.422
	LAS- 0.07%	10	24.48±0.816	178.99±9.427	144.60±11.501	15.36±1.221	1.38±0.082	7.26±0.49	0.35±0.201	0.34±0.197	0.64±0.401
	BHT 0.8%	10	25.84±2.507	170.30±12.068	120.15±7.923	14.97±1.230	1.21±0.106	7.78±0.144	0.17±0.055	0.18±0.098	0.30±0.066
	ABS0.2%+BHT0.8%	9	33.37±2.079**	166.20±15.869	114.66±5.995	16.66±1.162	1.39±0.082	7.55±0.102	0.44±0.193	0.35±0.246	0.77±0.435
	ABS0.07%+BHT0.8%	10	28.57±1.055**	172.54±9.964	119.30±8.849	16.28±0.646	1.44±0.099	7.80±0.102	0.46±0.175	0.33±0.232	0.78±0.396
	LAS0.2%+BHT0.8%	6							0.21±0.115	0.43±0.102**	0.65±0.140**
	LAS0.07%±BHT0.8%	3							0.07±0.072	0.44±0.062**	0.44±0.126
Female	Control	10	24.41±1.380	198.53±8.899	156.30±12.716	17.52±1.733	1.53±0.062	7.80±0.122	0.12±0.050	0.14±0.054	0.23±0.054
	ABS- 0.2%	10	27.23±1.634	206.32±17.320	127.80±3.980*	18.18±1.049	1.71±0.079	7.41±0.161	0.14±0.047(9)[2)]	0.09±0.031(9)	0.23±0.069(9)
	ABS- 0.07%	10	25.03±1.655	197.88±12.571	131.10±5.715	16.51±1.214	1.79±0.080*	7.60±0.129	0.14±0.043	0.11±0.026	0.25±0.065(9)
	LAS- 0.2%	10	27.23±1.049	193.65±7.686	146.55±9.144	14.14±1.404	1.48±0.164	7.38±0.184	0.20±0.044(9)	0.11±0.023(9)	0.31±0.052(9)
	LAS- 0.07%	10	25.77±1.237	192.23±8.056	128.25±5.432	15.09±1.245	1.72±0.067	7.68±0.163	0.15±0.059(9)	0.10±0.018(9)	0.24±0.066(9)
	BHT 0.8%	10	28.78±1.950	195.70±12.102	117.30±9.268**	17.79±1.285	1.37±0.072	8.10±0.119	0.21±0.058	0.19±0.026	0.40±0.070
	ABS0.2%+BHT0.8%	10	23.67±1.758**	202.00±22.442	112.50±5.504**	14.00±1.406	1.45±0.053	7.84±0.088	0.16±0.048(9)	0.09±0.021(9)	0.21±0.057(9)
	ABS0.07%+BHT0.8%	10	25.99±1.215	207.01±8.361	122.55±8.738*	15.01±1.689	1.36±0.050	7.58±0.095	0.14±0.048(9)	0.12±0.025(9)	0.26±0.049(9)
	LAS0.2%+BHT0.8%	10	34.92±1.978**	216.37±10.137	137.70±8.541	17.00±1.359	1.48±0.031	7.76±0.101	0.13±0.047(9)	0.15±0.027(9)	0.26±0.054(9)
	LAS0.07%+BHT0.8%	10	28.66±1.926	203.66±9.346	117.75±5.658*	20.14±1.043	1.42±0.053	8.08±0.168	0.35±0.258	0.15±0.026	0.50±0.274

1) mean ±S.E. 2) ( )No. of Rats * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Table VI Urinalysis

	Group	No. of Rats	pH				Protein					Glucose		Keton			Blood			Bilirubin		Urobilin	
			8	7	6	5	−	±	+	++	+++	−	+	−	±	+	−	±	+	−	+	0.1*	1
Male	Control	10	1	4	5				7	2	1	10		7	3					10		10	
	ABS– 0.2%	10	2	2	6		1	2	3	4		10		6	4		9	1		10		10	
	ABS– 0.07%	10			10			1	4	4	1	10		4	6		10			10		9	1
	LAS– 0.2%	10		2	8		1	4	3	3		10		6	4		9		1	10		10	
	LAS– 0.07%	10		3	7				6	1	2	10		8	2		10			10		10	
	BHT 0.8%	10	1		9				6	2	2	10		4	6		10			10		10	
	AT– 1 a)	10	1		9				4	5	1	10		2	8		10			9	1	10	
	AT– 2	10			10			1	4	4	1	10		1	9		10			10		9	1
	LT– 1b)	6	2		4		1	1	2	2		6		5	1		5		1	6		6	
	LT– 2	5		2	3				3	1	1	5		2	3		5			5		5	
Female	Control	10	2	2	6		2	2	5	1		10		5	5		10			10		10	
	ABS– 0.2%	10	4	2	4		1	5	3	1		10		6	4		10			10		10	
	ABS– 0.07%	10	3	1	6		4	2	3	1		10		9	1		10			10		10	
	LAS– 0.2%	10		3	7		2	2	5	1		10		5	5		10			10		10	
	LAS– 0.07%	10		3	7		3	3	4			10		7	3		10			10		9	1
	BHT 0.8%	10		2	7	1	3	6	1			10		5	5		10			10		10	
	AT– 1 a)	10	1		9		6	3	1			10		7	3		10			10		10	
	AT– 2	10	2		8		1	7	2			10		4	6		10			9	1	10	
	LT– 1b)	10	2	1	7		7	3				10		6	4		10			9	1	10	
	LT– 2	10		3	7		2	7	1			10		4	6		10			10		9	1

* Ehrlich Units

a) AT 1 ……ABS 0.2% + BHT 0.8%
AT 2 ……ABS 0.07% + BHT 0.8%

b) LT 1 ……LAS 0.2% + BHT 0.8%
LT 2 ……LAS 0.07% + BHT 0.8%

Table VII Organ Weight (Male-1)

	Heart mg mg/100g	Speen mg mg/100g	Thymus mg mg/100g	Liver g g/100g	Lung mg mg/100g	Kidney(R) mg mg/100g	Kidney(L) mg mg/100g	Hypophysis mg mg/100g
Control	930±13[1] (10) 241±4	614±14 (10) 158±2	129±5.7(10) 33±0.9	12.0±0.38(10) 3.1±0.04	1211±44(10) 314±13	1105±33(10) 285±6	1126±33(10) 291±6	10.0±0.73(10) 2.6±0.21
ABS- 0.2 %	948±17 (10) 246±3	634±10 (10) 164±3	146±7.3(10) 37±1.8*	13.1±0.30(10) 3.3±0.05**	1173±28(10) 304±6	119±27(10) 300±5	1171±36(10) 303±6	9.5±0.26(10) 2.4±0.07
ABS- 0.07%	951±20 (10) 242±3	600±29 (10) 152±7	147±5.5(10) 37±1.3*	12.6±0.23(10) 3.2±0.03	1311±80(10) 333±18	1124±32(10) 286±6	1157±28(10) 294±7	9.6±0.22(10) 2.4±0.05
LAS- 0.2 %	918±16 (10) 239±2	644±27 (10) 168±7	130±9.0 (10) 33±2.1	12.3±0.42(10) 3.2±0.12	1253±63(10) 326±14	1083±34(10) 282±7	1071±28(10) 279±4	8.9±0.48(10) 2.3±0.13
LAS- 0.07%	932±16 (10) 240±2	641±12 (10) 165±2	129±10.8(10) 33±2.5	12.0±0.31(10) 3.1±0.05	1285±47(10) 332±12	1074±25(10) 277±5	1083±52(10) 279±12	9.3±0.50(10) 2.4±0.13
BHT- 0.8 %	758±53 (10) 246±17	505±12**(10) 163±1	115±5.7(10) 37±1.4	15.2±0.85**(10) 4.9±0.17**	1013±32(10) 327± 7	1017±44(10) 327±8**	1031±50(10) 331±8**	13.2±0.59**(10) 4.2±0.16**
ABS- 0.2 % +BHT-0.8 %	815±17** (9) 258±5*	551±18* (9) 175±7	122±7.7 (9) 38±2.3*	16.0±0.29**(9) 5.0±0.07**	979±22**(9) 309±6	1052±27 (9) 332±7**	1029±35 (9) 325±10*	13.7±0.57**(9) 4.3±0.17**
ABS- 0.07% +BHT-0.8 %	820±17**(10) 254±3*	533±15**(10) 165±3	105±7.2*(10) 32±1.8	14.1±0.42**(10) 4.3±0.09	1068±44 (10) 330±9	1015±36(10) 314±10*	1036±36(10) 321±9**	12.3±0.94(10) 3.7±0.27**
LAS- 0.2 % +BHS-0.8 %								
LAS- 0.07% +BHT-0.8 %								

[1] mean ± S. E. ( ) No. of Rats *P<0.05 **P<0.01

Table VIII Organ Weight (Male-2)

	Thyroid glands mg / mg/100g	Suprarenal gland (R) mg / mg/100g	Suprrarenal gland (L) mg / mg/100g	Testis (R) mg / mg/100g	Testis (L) mg / mg/100g	Prostate glands mg / mg/100g	Brain mg / mg/100g	Caecum mg / mg/100g
Control	14.4±0.42[1] (10) 3.7±0.16	18.0±0.61(10) 4.6±0.18	19.3±0.44(10) 5.0±0.17	1592±20(10) 412±7	1622±21(10) 420±6	252±16 (10) 65±4.8	1983±12(10) 515±11	837±34 (10) 216±8
ABS- 0.2 %	13.6±0.80(10) 3.5±0.19	18.1±0.48(10) 4.6±0.10	19.5±0.58(10) 5.0±0.13	1617±18(10) 419±5	1566±98(10) 408±27	335±20**(10) 86±44**	2010±21(10) 521±7	1024±27**(10) 265±6**
ABS- 0.07%	14.2±0.61 (8) 3.6±0.17	18.7±0.41 (8) 4.8±0.09	18.9±0.76(10) 4.8±0.20	1615±17(10) 411±7	1657±23(10) 422±9	298±13 (10) 75±3.1	1967±19(10) 484±17	887±34 (10) 226±9
LAS- 0.2 %	13.3±0.57(10) 3.4±0.11	17.3±0.61(10) 4.5±0.17	18.6±0.84(10) 4.8±0.23	1564±22(10) 408±5	1621±20(10) 423±4	298±21 (10) 78±5.9	2020±11*(10) 528±8	971±35*(10) 253±7**
LAS- 0.07%	13.6±0.54(10) 3.5±0.13	16.8±0.85(10) 4.3±0.22	18.7±0.44(10) 4.8±0.11	1643±14(10) 425±6	1676±15(10) 434±7	318±21*(10) 82±6.1	1918±106(10) 494±25	938±38 (10) 242±9
BHT- 0.8 %	8.2±0.27**(9) 2.6±0.08**	16.7±1.15(9) 5.4±0.38	19.6±0.74(10) 6.3±0.28**	1502±52(10) 486±16**	1614±23(10) 523±13**	203±22 (10) 66±7.9	1944±13*(10) 631±18**	1216±52**(10) 393±15**
ABS- 0.2 % +BHT-0.8 %	8.5±0.37**(9) 2.7±0.13**	17.3±0.62 (9) 5.4±0.23*	16.0±0.52 (9) 6.0±0.22**	1553±12 (9) 491±5**	1616±17 (9) 511±6**	290±26 (9) 92±9.2*	1964±11 (9) 622±6**	1339±36**(9) 423±7**
ABS- 0.07% +BHT-0.8 %	9.3±0.49 (10) 2.8±0.17**	16.9±0.62(10) 5.2±0.19*	18.9±0.62(10) 5.8±0.22**	1581±28(10) 490±7**	1618±25(10) 502±8**	272±29 (10) 84±8.5	1956±22(10) 607±10**	1177±34**(10) 364±9**
LAS- 0.2 % +BHT-0.8 %								
LAS- 0.07% +BHT-0.8 %								

[1] mean ± S.E ( ) No. of Rats *P<0.05 **P<0.01

Table IX Organ Weight (Female-1)

Group	Heart mg / mg/100g	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Lung mg / mg/100g	Kidney (R) mg / mg/100g	Kidney (L) mg / mg/100g	Hypophysis mg / mg/100g
Control	596±10[1] (10) 295±6	405±5 (10) 200±4	134±7.7(10) 66±3.9	6.5±0.12(10) 3.2±0.07	882±19 (10) 406±10	720±22 (10) 356±12	738±18 (10) 365±11	13.9±0.76(10) 6.8±0.39
ABS- 0.2 %	537±14 (10) 282±3	366±6 (10) 211±4	132±4.5(10) 69±2.9	6.4±0.26(10) 3.3±0.07	758±25 (10) 399±11	640±19*(10) 336±5	938±17**(10) 336±6*	13.3±0.81(10) 6.9±0.38
ABS- 0.07%	584±8 (10) 279±11	418±10 (10) 200±10	129±4.2(10) 61±2.5	6.4±0.14(10) 3.0±0.13	803±13 (10) 384±16	685±17 (10) 326±9	704±20 (10) 335±11	15.0±0.59(10) 7.2±0.46
LAS- 0.2 %	574±13 (10) 285±5	405±8 (10) 201±4	131±4.5(10) 65±2.9	6.5±0.18(10) 3.2±0.07	802±26 (10) 398±10	654±20*(10) 325±7	665±27*(10) 330±11*	15.0±1.10(10) 7.4±0.53
LAS- 0.07%	596±16 (10) 294±3	408±13 (10) 201±4	131±2.8(10) 65±2.2	6.7±0.29(10) 3.3±0.05	801±19 (10) 396±11	717±23 (10) 355±13	738±33 (10) 364±13	16.3±0.94 (9) 8.0±0.40
BHT- 0.8 %	521±9**(10) 307±2	350±8**(10) 206±3	126±6.0(10) 74±2.9	8.5±0.20**(10) 5.0±0.10**	773±14 (10) 456±11**	609±19**(10) 359±11	624±32**(10) 367±17	15.2±1.35(10) 8.9±0.78
ABS- 0.2 % +BHT-0.8 %	503±10**(10) 296±4	347±9** (10) 205±5	119±7.6(10) 69±3.7	8.4±0.17**(10) 5.0±0.11**	776±23 (10) 458±15*	618±19**(10) 364±9	611±20** 359±8	15.7±0.93(10) 9.1±0.37**
ABS- 0.07% +BHT-0.8 %	515±14**(10) 304±5	342±15**(10) 201±6	113±6.2(10) 67±3.2	6.7±0.27(10) 3.9±0.07**	751±20*(10) 444±12*	620±17**(10) 366±9	611±22**(10) 361±11	14.2±0.78(10) 8.3±0.39*
LAS- 0.2 % +BHT-0.8 %	505±12**(10) 304±5	343±12**(10) 206±3	118±6.4(10) 70±2.7	8.0±0.34**(10) 4.8±0.12**	719±23**(10) 434±16	641±40 (10) 385±21	601±25**(10) 362±15	14.5±1.50(10) 8.6±0.82
LAS- 0.07% +BHT 0.8 %	543±11**(10) 306±4	350±7** (10) 197±3	129±5.1(10) 73±2.6	8.6±0.18 (10) 5.0±0.08**	756±14* (10) 427±8	643±20*(10) 363±11	634±24**(10) 357±12	13.8±1.42(10) 7.7±0.76

[1] mean ± S.E ( ) No. of Rats **P<0.05 **P<0.01

Table X Organ Weihgt (Female-2)

Group	Thyroid glands mg / mg/100g	Suprarenal gland (R) mg / mg/100g	Suprarenal gland (L) mg / mg/100g	Ovry (R) mg / mg/100g	Ovry (L) mg / mg/100g	Uterus mg / mg/100g	Brain mg / mg/100g	Caecum mg / mg/100g
Control	112±0.32[1] (9) 5.5±0.17	21.9±0.99(10) 10.8±0.49	23.2±1.24(10) 11.4±0.64	23.3±1.0(10) 11.5±0.5	24.4±1.1(10) 12.0±0.5	638±27 (10) 315±13	1832±16(10) 906±14	681±18 (10) 337±11
ABS- 0.2 %	13.2±1.10(10) 6.9±0.49*	20.0±0.68(10) 10.5±0.24	21.5±0.79(10) 11.3±0.30	20.5±1.2(10) 10.7±0.5	22.2±1.1(10) 11.6±0.4	543±31*(10) 285±14	1808±15(10) 955±18	659±38 (10) 347±20
ABS- 0.07%	12.4±0.79(10) 5.9±0.50	21.4±0.47(10) 10.2±0.50	23.0±0.64(10) 11.0±0.55	21.0±1.0(10) 10.0±0.7	21.9±1.3(10) 10.4±0.7	614±30 (10) 293±17	1828±11(10) 875±33	644±19 (10) 307±13
LAS- 0.2 %	12.2±0.96(10) 6.0±0.46	21.7±1.11(10) 10.7±0.49	22.2±0.92(10) 11.0±0.43	23.6±1.0(10) 11.7±0.4	23.3±1.2(10) 11.5±0.5	594±31 (10) 296±17	1837±18(10) 915±13	688±26 (10) 343±14
LAS- 0.07%	12.9±0.93(10) 6.4±0.55	22.6±0.95(10) 11.1±0.35	24.1±0.98(10) 11.8±0.33	23.0±1.9(10) 11.2±0.6	24.6±1.5(10) 12.0±0.5	592±18 (10) 292±8	1827±18(10) 908±30	753±25*(10) 373±13
BHT- 0.8 %	13.0±1.03(10) 7.6±0.61**	19.7±0.61 (9) 11.7±0.47	21.0±0.68 (9) 12.4±0.54	21.6±0.9(10) 12.7±0.5	24.9±1.5(10) 14.7±0.8*	436±23**(10) 256±12**	1802±17(10) 1064±15**	810±26**(10) 477±12**
ABS- 0.2 % +BHT-0.8 %	13.2±0.69*(10) 7.7±0.31**	20.3±0.44(10) 11.9±0.26	21.4±0.42(10) 12.6±0.32	21.8±1.3(10) 12.8±0.8	22.5±0.8(10) 13.2±0.5	469±23**(10) 276±11*	1799±23(10) 1062±18**	893±41**(10) 527±24**
ABS- 0.07% +BHT-0.8 %	11.7±0.57(10) 9.9±0.32**	19.9±0.50(10) 11.8±0.50	20.4±0.39(10) 12.1±0.50	18.6±0.6**(10) 11.0±0.5	20.4±1.0*(10) 12.2±0.9	436±38**(10) 255±19*	1813±20(10) 1074±34**	748±33 (10) 439±11**
LAS- 0.2 % +BHF 0.8 %	13.6±0.85(10) 8.2±0.51**	20.1±0.91(10) 12.1±0.69	22.0±0.98(10) 13.4±0.94	19.9±1.5(10) 12.0±0.9	21.5±1.8(10) 12.9±1.1	363±40**(10) 215±22**	1821±26(10) 1101±34**	786±30**(10) 472±12**
LAS- 0.07% +BHT- 0.8 %	12.6±0.93(10) 7.1±0.57*	19.7±0.97(10) 11.1±0.54	21.6±1.02(10) 12.1±0.54	21.9±0.9(10) 12.3±0.4	23.3±1.1(10) 13.1±0.5	456±38(10) 257±20*	1819±14(10) 1026±8**	892±32**(10) 503±19**

[1] mean ± S. E ( ) No. of Rats *P<0.05 **P<0.01

他誌に発表した論文の要旨

SUMMARIES OF PAPERS PUBLISHED ELSEWHERE IN 1972

The First Successful Isolations and Identification of *Yersinia enterocolitica* from Human Cases in Japan

Hiroshi Zen-Yoji and Tsutomu MARUYAMA

Japanese Journal of Microbiology 16, 493～500 (1972)

From March 1971 through February 1972 isolation attempts of *Yersinia enterocolitica* were made on 442 specimens, consisting of 292 feces from patients hospitalized with symptoms of suggestive dysentery, 22 from sporadic cases of diarrhea in children, 43 specimens of ileum resected from autopsy cases which exhibited pathological changes in their intestine, and 85 appendix vermiformis which had been excised. A simultaneous survey on the normal distribution of the bacterium in healthy persons was conducted on 30,587 fecal samples from adults and 402 specimens from newborns. As a result of the survey, 12 strains of *Y. enterocolitica* were isolated; two strains from the ileum of two autopsy cases, five from excised appendix vermiformis, two from feces of hospitalized patients suspected of dysentery, and three from feces of sporadic cases of diarrhca in children. No strains of this bacterium were isolated from healthy adults and newborns. Major pathological findings of autopsy cases were conspicuous hemorrhagic necrosis and edema of the small intestine, limited to within 1 meter of the ileocecum. Biotype and serotype of 12 isolates were as follows; one isolate from an excised appendix vermiformis was biotype 2 and serotype 5B, while all of the remaining 11 were biotype 4 and serotype 3. These results suggested that strains of a specific biotype and serotype were likely to be playing a very important role in the development of this illness in man.

COMPARATIVE STUDIES ON THE TOXIGENICITY OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND RELATED MARINE VIBRIOS BY THE MOUSE FOOT EDEMA TEST

Hiroshi ZEN-YOJI, Yasuo KUDOH and Kenji OHTA

Annual Report of Chorela Study, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel (1971)

In this experiment, comparative studies were performed on various preparations both *Vibrio parahaemolyticus* strains and related marine vibrios for evaluating their toxigenicity by means of the mouse foot edema test. Live cells of *V. parahaemolyticus,* both Kanagawa phenomenon positive and negative strains were found to produce remarkable edema in the inoculated paws, which was sustained for over 72 hr. The mean value of the paws inoculated in weight relative to the control was 2.1, while in the mice inoculated with heat-killed cells, the value was 1.18. The values exhibited by cultures of *V. alginolyticus* and other related vibrios were 1.5 and 1.2 respectively. When one of the cell lysate of *V. parahaemolyticus* strain was tested for its ability to produce mouse foot edema, it caused only a slight edema accompanied with clear induration, which was not typical. Contrarily, in a preliminary test, evidenced that a culture filtrate of this bacterium produced the foot

edema with clear hemorrhage, and mean weight ratio of the paws was about 1.70. The fact suggested that a component responsible for the edema contained in the culture filtrate.

わが国における *Yersinia enterocolitica* の最初の分離例と分離菌の性状について

善養寺　浩，丸山　　務

メディヤサークル，17，365～379（1972）

1971年3月から1972年2月の1年間に，赤痢診定患者403件，剖検例腸管切除片43件，虫垂炎切除虫垂内容85件，小児下痢症患者便221件および健康成人ふん便30,587件を対象として Y. enterocolitica の分離を試み，16件の陽性例を得た。これはわが国で初めての分離例であろうと思われるので，その詳細な症例と分離株の血清型別を行なった。さらに，最近の私共の本菌の研究動向について紹介した。

腸炎ビブリオの神奈川現象のしらべ方

善養寺　浩

感染症学雑誌，*46*，113～115（1972）

腸炎ビブリオにおいて神奈川現象と呼ばれているある特殊な条件のもとでの溶血因子産生能試験は，本菌の病原性と密接な関係から重要な性状試験の一つとされている。

ここでは，この溶血因子産生能試験方法の実験手技について詳しく紹介した。

STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN D IMMUNOLOGICAL IDENTIFICATION WITH PURIFIED TOXIN

Hideo IGARASHI

Japanese Journal of Microbiology, 16, 483～491(1972)

Purification of enterotoxin D from *Staphylococcus aureus* 494 was attempted by utilizing the following techniques : Concentration of bacterial culture supernatant with polyethylene glycol 20,000, CM-cellulose column chromatography, Sephadex G-100 gel-filtration, chromatography on a DEAE-cellulose column with concave gradient elution and gel-filtration with Sephadex G-50. The final preparation obtained gave a single precipitin line with anti-crude enterotoxin D serum and no precipitation with anti-enterotoxin A, B, or C when it was tested by Ouchterlony's technique. It was capable of producing 100% emesis in monkeys at about 1.25 mcg of protein per kg body weight. Antiserum prepared by injecting rabbits with the purified preparation gave a single precipitin line with concentrated crude toxin, and it also gave a singl arc when tested in immunoelectrophoresis with concentrated crude toxin. A type-specific neutralization effect in monkeys was obtained. Thus, enterotoxin D has been identified with a purified preparation.

Sulfamylon acetateの 各種細菌に対する in vitro での抗菌性について

善養寺　浩，寺山　　武，五十嵐英夫
潮田　　弘，小野川　尊

CHEMOTHERAPY, 20, 781～786（1972）

近年，火傷における細菌感染の予防および治療剤として注目されてきたサルファ剤，Sulfamylon acetate の各種細菌に対する抗菌性を最近の分離株，各々30株について検討した。

Sulfamylon acetate は各種腸内細菌に対しては抗菌性が弱いにもかかわらず，同じグラム陰性桿菌である Pseudomonas aeruginosa に対しては特異的に強い抗菌性を示した。

他の Sulfamine 剤と異なり，Sulfamylon acetate の各種細菌に対する MIC の菌株差は少なかった。このことは菌株によって耐性を示すものが少ないことを意味し，本剤が臨床的にも有効であることをうらづけたものといえよう。

ブドウ球菌食中毒に関する研究（第3報）

食中毒，健康人および市販食品由来黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産性能とそのコアグラーゼ型について

寺山　　武，五十嵐英夫，潮田　　弘
善養寺　浩

食品衛生学雑誌，13，549～554（1972）

ブドウ球菌食中毒34事例34起因株の Ent 型は A・D型14株（41.2%），A型8株（23.5%），C型7株（20.5%），D型3株，B型1株および不明1株であり，A型関連株が65%を占めた。つぎに健康人の鼻前庭，ふん便，手指および市販食品各100検体由来の400株の90.5%が Ent を産生し，黄色ブ菌のほとんどが Ent 産生能を有することが明らかにされた。また，上記全菌株の成績では菌株のコ型と産生 Ent 型との間

に相関性は認められなかった。

細菌性赤痢とその類似疾患およびチフス性疾患に対する ST 合剤の治療成績

善養寺　浩，寺山　　武，潮田　　弘，他

感染症学雑誌，46，152～165（1972）

Sulfamine 剤と Trimethoprim（TMP）との合剤が特異的に強い相乗効果を示すことが知られている。われわれはスルファメソキサゾールと TMP との合剤である ST 合剤の腸管感染症に対する臨床効果と，分離菌に対する in vitro での抗菌性を検討した。本合剤は in vitro 抗菌性試験において強い相乗効果を示すとともに，臨床的にも常用抗生剤と同程度の効果を示した。

食品中の汚染有害真菌に関する研究

そば粉および乾麺について

一言　　広，諸角　　聖，和宇慶朝昭

善養寺　浩

東京都衛生局学会誌（48），44～45（1971）

そばおよびその加工品について mycoflora を検討した。その結果，平均汚染糸状菌数は，そば粒では37/ｇ，そば粉では11,290/ｇ，また乾そばでは1,300/ｇという極めて高い値が得られた。またこれらの検出菌を *Aspergillus* 属，*Penicillium* 属およびその他の不完全菌属に大別した場合，検体の種類別にその汚染傾向をみると，そば粒では *Aspergillus, Penicillium* 以外のその他の不完全菌属による汚染が主体をなし，そば粉では *Aspergillus, Penicillium* およびその他の不完全菌群の各菌属による幅広い汚染が認められ，また乾そばでは *Penicillium* 属の菌が主な汚染菌として認められた。このような点から，汚染糸状菌の優先菌種は収獲から製品化までの加工過程につれて変化することが認められた。

生態系におけるサルモネラ

善養寺　浩

バイオテク，13，117～122（1972）

サルモネラ感染症が急増している背景には本菌の環境汚染が重大な要因になっているものと考えられる。

ここでは，サルモネラ症の深刻な病像を紹介し，つぎに下水，河川，家畜，愛がん動物，は虫類およびそ族昆虫などにおけるサルモネラ汚染実態を明らかにし，これらの自然界のサルモネラ生態サイクルがヒトの生活環と交錯するところから病原菌としてヒトあるいは一部の家禽・家畜に脅威を与えていることを論じた。

過去４年間のA群レンサ球菌の薬剤感受性について（特に TC 耐性を中心にして）

大久保暢夫，柏木　義勝，柴田　　実

日本感染症学会誌，46，(12)，472（1972）

1967～1970年度に６大都市伝染病院で分離された，A群レンサ球菌1,372株について Penicillin-G, Chloromphenical, Oleandomycin, Erythromycin, Tetracycline に対する感受性を検討した。

その結果，最低発育阻止濃度（MIC）は Pc-G では安定した感受性値を示し，耐性化は認められなかった。CP, TC ともに MIC は，大きな変動ではないが，明らかに耐性化の傾向が認められた。

マクロライド系抗生物質である OL, EM は年々高度耐性株が認められるようになり，1970年度では，100mcg/ml 以上の耐性株が8.5％も存在し，この傾向は今後も増加し，耐性獲得は意外に早くやって来るものと考えられた。

又，TC 耐性株の年度別推移，菌型との関係については異論があり，未だ検討を要する所であった。

皮膚疾患に見られる好塩基斑点赤血球の出現について

加納　堯子，大久保暢夫，鳥山　　悌

臨床病理学会誌，Vol. 20．補冊265（1972）

目的

当所における好塩基斑点赤血球（以下 Baso）の検査は，鉛公害の検診時に端緒をもった。その結果，鉛中毒でないと判定された住民の中に，Baso 測定値の高値を示す者が見出され，他疾患による影響等の出現要因を検討する必要が生じた。

最近，湿疹患者の血液塗抹標本には，高率に Baso が観察出来るとの報告を受け，皮膚疾患における Baso 出現傾向の調査を試み，出現要因をこの様な側面より検討してみたので，その結果を報告した。

方法

調査日時―昭和46年６月～昭和47年６月

対　　象―都立荏原病院皮膚科外来患者163例

検査項目―問診，血液検査，尿検査，計27種目

―Baso 標本，小机等の方法に従い，螢光顕微鏡観察

結果

表Ⅰ，Ⅱ，に示される様に，皮膚疾患患者のBasoの出現数平均値は，31.6±40.9，住民検診時の平均値，3.1±5.6と比較すると，約10倍という高率出現の結果

を得た。

又，観察された Baso の形態は，住民検診時のそれと差異を認め難く，血球内に平均に分布する大きさの揃った微顆粒を保持していた。

臨床検査成績の各検査成績と Baso 出現傾向との間には，特筆すべき変動は与えられず，やや Eosino の増加が示されるのみで，他は，正常値範囲内に留った。

原因別疾患の分類においては，一般に，非伝染性疾患が多発傾向を見せたが，伝染性では，ウイルスによる帯状包疹が著明であった。

なお，特に，高い出現値を与えた皮疹患者標本，住民検診標本は共に，性差が認められ，

皮膚疾患標本　20例（♂2，♀18）

住民検診標本　13例（♂3，♀10）を報告した。

考察

他報告者に見られると同様に，皮膚疾患患者の Baso の出現傾向は高く，この得られた値に，鉛中毒特殊検診の該当者の基準値が適用されると，患者の 1/4 は，要精密検診の該当者となりうる。

一般に，アレルギー機序による皮疹，全身的に異常の見られる疾患，急性より慢性化した疾患に，Baso の出現頻度が高く観察されたが，しかし全身発疹を見せるジベル氏バラ色粃糖疹や，同じくアレルギー機序で発疹すると思われる薬疹等に，高値が少ない結果等から考察すると，これは単なるアレルギー反応に起因する現象でなく，この反応に基づく，何らか，他の因子の影響も加味されるものと推察した。

表1　疾患別による Baso の出現度

	疾患名	赤血球1万ケ中の好塩性斑点赤血球数(ケ) 0—20	21—40	41—60	61—80	81—100	101以上	例数	40ケ以上の出現例 %
伝染性	糸状菌	4	1				1	6	16.7
	化膿性疾患	5	4	1				10	10.0
	ウイルス	1	4	1	2			8	37.5
	梅毒	3	3		1	1		8	25.0
非伝染	湿疹	18	5	3	3	1	1	31	25.8
	尋麻疹	13	4	3	1	1	1	23	26.0
	紅斑症	3	1	1				5	20.0
	紫斑症		2					2	—
	薬疹	7	1				1	9	11.1
	中毒疹	5	1			1		7	16.7
性疾患	光線過敏症	3	1	3				7	42.9
	色素異常症	2	2		1			5	20.0
	角化症	12	3		1			14	71
	分泌異常症	1	1					2	—
	紅皮症	1						1	—
	毛髪疾患	6	4	3	2	1		16	37.5
	膠原病	3				1	1	5	40.0
	水疱症	1					1	2	50.0
	腫瘍	3						3	—
	合計	89	36	15	11	6	6	163	
	%	54.6	22.1	9.2	6.7	3.7	3.7	100	

表2　疾患経過　と Baso 出現数（Ret 網状赤血球）

疾患名（性別・年令）	検査月日	Baso	Ret	所見
水疱性類天疱瘡（♀68）	S. 46 9.20	92	13	症状著明 W・B・C 15200 Hb 12.6 Ht 38.8
	S. 47 1.19	7	152	寛解期 WBC 5500 Hb 13.8 Ht 42.5
慢性尋麻疹（♀57）	S. 47 4. 7	136	96	初診時著明
	S. 47 4.28	57	113	消失時
多発性滲出性紅斑（♂29）	S. 47 2.18	7	168	初診時全身に紅斑
	S. 47 4. 8	127	63	皮疹消失
	S. 47 5. 8	79	38	再発，全身に紅斑
晩期潜伏梅毒（♀31）	S. 46 9.28	89	42	初診時，進行性指掌角皮症併発
	S. 47 3.31	38	56	治療開始後3カ月
薬疹（♂26）	S. 47 4.24	15	50	抗生物質使用 全身に紅斑
	S. 47 5.12	9	54	消失
急性湿疹（♂19）	S. 47 4. 5	27	39	初診時顔全体紅斑
	S. 47 4.27	72	135	ほとんど治癒

小児の急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群（MCLS）の病因について（パネルディスカッション）

根津　尚光

日本小児科学会雑誌，76，11（1972）

MCLS の病因については，現在のところ全く不明である。従って各種の検索を行なった。患者からのウイルス分離，血清反応等が先ず行なわれたが，病原と考えられる程のものは得られなかった。

水銀汚染国である関係で，一応患者の毛髪と尿について総水銀の定量を行なったが，意義を認めるだけの数値は得られなかった。

患者咽頭スワブから，溶連菌の検索を行なったが，溶連菌はほとんど陰性であった。Viridans 群が得られ，Str. milleri と同定された。

患者血清について，溶連菌A，B，C，D，G群及び Str. milleri の菌体抽出抗原による PHA（Passive hemagglutination）を行なった結果，好発年令 0～4 歳までの対照に比して患者血清は高い抗体価を保有していた。

血清中のインフルエンザ抗体検出の自動化に関する研究

根津　尚光

1971年テクニコン国際シンポジウム（東京）Technicon International Symposia（1971，Tokyo），135～140（1971）

インフルエンザの抗体測定法として汎用されている Hemagglutination Inhibition Test（HI）の他，Passive Hemagglutination Inhibition Test（PHI）及び Passive Hemolysis Test 等を考案し，AutoAnalyzer を使用して自動化の可能性について検討した。

急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群死亡例検討会

根津　尚光，他

小児科臨床，24，7，15～29（1971）

MCLS の死亡例は，従来ほとんど無いと考えられていたが，全国アンケートの結果から30例に及ぶ死亡例が報告され，そのほとんどが冠状動脈の血栓による突然死であった。以上の症例について病理解剖，病理組織，病因について検討を行なった。

螢光抗体法によるインフルエンザの診断

佐々木路子，伊藤　忠彦，安藤　泰正

藪内　　清，坂井冨士子，根津　尚光

東京都衛生局学会誌，（49），40～41（1972）

近年螢光抗体法（FAT）技術が急速に進歩したのにともない，インフルエンザの早期診断法として本法の応用が実用化されつつある。

われわれは，1971年10月から翌年３月にかけて都内に発生したインフルエンザ様患者60名について，従来おこなっていたウイルス分離試験および血清学的試験に加えて FAT をおこなってその成績を比較検討した。

全体的な陽性率からみると，ウイルス分離試験あるいは血清学的試験にかなりおとる結果となったが，標本材料採取技術の向上により，インフルエンザの早期診断に有力な方法であることがわかった。

1971年の東京都内における腸内ウイルス流行は握に関する研究

柳沢　靖子，岩崎　謙二，矢野　一好

山田　澄夫，根津　尚光

東京都衛生局学会誌，（50）84～85（1972）

原因不明熱性疾患患者，健康学童および未処理下水検体からのウイルス検索を行ない，その逐月成績から，1971年の都内における腸内ウイルス感染流行の主体ウイルスは，エコー11型，流行期間は５～８月，流行ピークは６～７月であったことを明らかにした。なおエコー11型の流行のほか，エコー７型，コクサッキーB２，３，４の各型ウイルスの散発的感染が混在していたことも明らかになった。

市販ガソリン中の四アルキル鉛および芳香族炭化水素について

吉原　武俊，渡辺四男也，奥本千代美

福士真知子，遠山　逸雄，松本　　茂

東京都衛生局学会誌，（50），48～49（1972）

最近，急激なモータリゼーションにより，ガソリンが大量に消費され，特に自動車から排出されるガス中の一酸化炭素，窒素酸化物炭化水素，鉛化合物などの有害成分が大気汚染問題を引き起こしている。このうち鉛は高オクタン価の要求によるアンチノック剤として使用されている四アルキル鉛が源である。

そこで，我々は最近３年間の市販ガソリン中の鉛量の推移と四アルキル鉛の代替品として年々増加の傾向にあるといわれている芳香族炭化水素のうち，ベンゼン，トルエン，キシレンを市販ガソリンについて定量した。

その結果，プレミアムガソリン，レギュラーガソリン中の四アルキル鉛は45年６月には平均四エチル鉛と

してそれぞれ0.39cm³/l，0.17cm³/lであったのが47年6月にはそれぞれ0.16cm³/l，0.10cm³/lへと減少した。又47年6月の芳香族炭化水素はプレミアムガソリン，レギュラーガソリン中，それぞれベンゼン1.3%，1.4%，トルエン9.3%，6.7%，キシレン13.9%，9.4%であった。

注射剤のパイロジェン除去に関する研究

下平　彰男

日本薬学会第92年会，講演要旨集Ⅳ，38（1972）

注射剤中の完全なパイロジェン除去法については困難な問題とされている。今回，古くから使われている各種沪過吸着法によって，生理食塩中のパイロジェンがどの程度除去し得るか否かを検討し，あわせて沪液のpH値，微粒子，鉄およびマンガン量などの変質を測定した。その結果，活性炭を焼きつけたシャンベラン・カートリッジによる沪過吸着法がもっともすぐれた好成績を得た。

注射剤のパイロジェン除去（Ⅰ）
各種フィルタ・メディアの検討

下平　彰男

薬剤学，32(4)，175～181（1972）

生理食塩液中のパイロジェン除去を，シャンベラン25C，ザイツEKS-Ⅰおよび活性炭シャンベランによる沪過法によって行なった。生理食塩液は一定濃度のパイロジェンを含有するように調製した。実験は一定時間ごとに，および一定量ごとに沪液を採取し，パイロジェンテストに加えて，微粒子数，pH値，鉄マンガン量および蒸発残査量を測定した。

その結果は：

1）沪過が2.0lに至らないうちにシャンベランではパイロジェンテスト陽性を示し，ザイツでは陰性であった。そこでザイツの沪過面積を1/10として沪過を行なうと，パイロジェン除去の限界は2.5lであった。

2）活性炭シャンベランでは予想外にパイロジェン吸着力があり，シャンベランと同一面積に換算すれば，2,160lまでパイロジェンテスト陰性であった。

3）パイロジェンテスト以外の上記の試験結果は特に著明な相違は認められなかった。

環境汚染からみた食品衛生の諸問題（シンポジウム）
PCBならびに塩素系農薬—特にその分析上の留意点と分析結果

戸谷　哲也

東京都衛生局学会誌（49），3～5（1972）

PCBの分析上，塩素数を異にするカネクロール200～600までのいずれの標準品を選択するかによって分析結果が大きく左右される，したがってAnalabs社の単一標準品等を用いてガスクロマトグラムの代表的ピークと塩素数との関係をある程度明らかにすることは標準品選択の一助となり得る。

また定量誤差の要因として正の誤差となる場合は試薬器具等のPCBによる二次汚染とみられる例，分析環境の重要性について述べ，負の誤差となる場合はPCB試験溶液の調製に際して，加熱濃縮時におけるPCBの揮散性に起因することをあげ，SE-30等の添加が揮散防止に役立つことを述べた。

塩素系農薬の分析上特に留意すべき点としては，塩素系農薬のクロマトグラムがPCBのクロマトグラムに影響される場合があり，特にドリン系等にその傾向の大きいことが認められた。

PCBと塩素系農薬の残留量に関しては，魚類，乳肉製品を中心とし，最近の傾向について述べた。

環境汚染と食品衛生

辺野喜正夫，戸谷　哲也

食品衛生研究，22，638～669（1972）

近年重金属，農薬等による環境汚染は食品衛生上からも極めて深刻な問題を内在している。本稿は化学的汚染物質のみならず，最近わが国で問題になりつつあるサルモネラ（Salmonella）による微生物学的汚染にもふれ，われわれのところで行なった調査成績などを中心にして総説とした。

すなわち有害性金属が動植物体に対し本来の毒性を示す機序としては，溶解性，吸収性，貯留性と排泄のパターンとしてとらえ，ひいては濃縮率が食物連鎖に関連すること，また金属代謝の機序に関しては水銀ならびにヒ素のメチル化等にも言及した。

金属の分析成績としてはヒ素，鉛，銅，カドミウムの食品中の分析量に関して述べ，またセレンについては，その強い有毒性を有するため諸外国では水質基準等が設けられているがわが国には無く，一方，工業的には多方面に使われているため，新たな環境汚染物質となり得るおそれも否定できない。しかしこの種の試験法にはPPT単位の超微量分析法も要求されるために，2,3-ジアミノナフタレンを用いるけい光分光光度法を確立し，良好な結果が認められた。本法によって水，底質，各種食品中の含有量について調査した結果，

水等は数10 PPT 程度の低値であったが，魚介類からは1～4ppmにもおよぶものが魚介類中50％以上に認められた。

PCBは公害の元凶として世論の注目するところであるが，性状，銘柄，用途，有害性，カネミ油症事件について述べ，食品，ノーカーボン紙等の紙類333検体につき調査した結果を詳記し，いわゆる PCB 代替品についてもふれた。

塩素系農薬に関しては乳肉類とその加工品また母乳についての調査結果をまとめた。

またタバコは食品ではなく，嗜好品に属するものであるが，その栽培にあたっては品質保持のうえから病害虫の防去のために農薬の乱用の可能性も憂慮された。したがってタバコそのものから農薬が検出されることは一応推測されるところであったが，喫煙時の高温条件下では，農薬の大部分は分解消失してしまうものと考えられた。しかしながら実測した結果，煙中からかなりの量の DDT，BHC 類が定量され，喫煙による健康障害を誘発する一因子として意義を有するとともに，タバコは農薬等，今後の汚染指標として至適 Sample になり得ることが考えられた。

一方病原微生物による環境汚染と食品衛生の問題はサルモネラを例とした場合，従来からの急性伝染病とは様相を異にし，多くは慢性型の経移を示す。本菌は元来動物の腸管に寄生する常在細菌の一つであり，その菌型は970種にものぼり，その一部はヒトに病原性を発揮する。わが国では現在年間約1,300件の食中毒事件と約36,000人の食中毒患者が発生しているが，年々増加の傾向にあり，その80％は細菌性のものと推定され，特にサルモネラによるとおもわれるものの比重は高い。

1965～1968年における市販肉について調査したところ，一般的なものを対象とした場合，トリ肉から輸入品で，11件中4件（36％）また国産品では200件中39件（20％）が高い陽性率を示した。

これらの結果から，肉屋における各種作業材料のほか都内55カ所の下水について調査したところ，38カ所（60％）からサルモネラが検出された。すなわち本例から，サルモネラ一つをとりあげても，食品生活環境の汚染は否定し得ない事実と考えられる。

母体血液，臍帯血液ならびに母乳中の残留有機塩素系農薬について

山岸　達典，竹葉　和江，藤本　千鶴
吉岡　政雄，森本　キミ，春田三佐夫

臨床栄養，41（2），209～215（1972）

人体に蓄積した有機塩素系農薬が生体，とくに妊娠中の母体とその胎児にどのような影響をおよぼすかを検討してゆくにあたり，1次調査では産婦25名の初期母乳とその新生児の胎便中の有機塩素系農薬レベルについて検索した。ついで，本報では第2次調査として母体血液，臍帯血液ならびに母乳中の残留農薬レベルについて調査した。対象は昭和46年6～10月の間で，前回と同様に都内の産院で分娩した産婦30名について，その母体血液，臍帯血液および初期母乳について分析した。その結果，臍帯血液中の残留農薬レベルは母体血液のそれよりも全般的に低い値を示した。なお総 BHC については両者の間に5％の有意水準で相関性が認められた。全残留農薬量に対する BHC，DDT ディルドリンの比率ならびに BHC，DDT 中に占める各異性体，代謝産物などの割合は，母体血液と臍帯血液，あるいは母乳と胎便にそれぞれ類似したパターンを示した。

母乳および胎便中の残留有機塩素系農薬について

山岸　達典，藤本　千鶴，竹葉　和江
吉岡　政雄，春田三佐夫

臨床栄養，40（7），929～934（1972）

農薬の体内蓄積による人体への影響は，生体内の酵素の変動やホルモンの代謝異常，あるいは催奇および発癌などの危険性が指摘されながらも，不明な点が多く残されている。農薬の人体への蓄積，とくにその中でも母体の農薬汚染は胎児におよぼす影響が重要な課題と思われる。そこで，はじめに母乳と新生児の胎便中の残留有機塩素系農薬のレベルを調べた。対象の母乳と胎便は昭和46年3～6月の間に都内の産院で分娩した母親25名の初期母乳と，その新生児が24時間以内に排泄した胎便で，母乳は約30g，胎便は約10gをそれぞれ採取して有機塩素系農薬分析を行なった。その結果，胎便中の残留農薬レベルは母乳とほぼ同じレベルで検出され，また総 BHC 中に占める β-BHC の割合は母乳と同様のパターンを示して約80％であった。

1年間の母乳，牛乳中の残留有機塩素系農薬の推移について

山岸　達典，藤本　千鶴，竹葉　和江
森本　キミ，春田三佐夫，海沼　勝

臨床栄養，41（4），471～475（1972）

有機塩素系農薬の母体への汚染問題について，すで

に著者らは母乳，胎便，母体血液および臍帯血液中の残留レベルなどの実態調査を行なった。本報では，有機塩素系農薬の使用禁止後の母体の農薬汚染の消長をみるために，母乳および牛乳について，1年間をとおして残留有機塩素系農薬量を測定した。母乳は都内の産院で昭和46年3月～47年2月の間に出産した産婦の初期母乳69例，牛乳は同じ期間に都内へ出荷している東京近県の牛乳工場から毎月5検体ずつ直接当所に搬入された牛乳および生乳54例について分析した。その結果，1年間通して母乳中の残留農薬レベルの推移は一定の傾向を認められなかった。これに対し牛乳中の残留農薬レベルは，昭和46年3月をピークとして次第に減少してゆく傾向を示しており，これは農薬の使用禁止による効果が現われたものと思われる。

β-BHCのマウス胎仔におよぼす影響について

山岸　達典，竹葉　和江，藤本　千鶴
森本　キミ，春田三佐夫

臨床栄養，41（5），599～604（1972）

わが国の人体脂肪中の残留有機塩素系農薬量を諸外国の報告と比較してみると，β-BHC 濃度が特徴的に高く，約10～30倍にも達している。また母体の有機塩素剤は胎盤を介して胎児へ移行し，その各臓器中に蓄積する事実からみて，胎児の β-BHC レベルは当然高いと考えられる。そこで有機塩素剤の胎児におよぼす影響を検討してゆく一環として，本報では実験動物を用いて，β-BHC のマウス胎仔の発育におよぼす影響を2段階にわけて実験を行なった。その第1段階の実験では，妊娠初期ならびに中期の親マウスに β-BHC を5日間連続して皮下注射することによって，胎仔の発育が妊娠期間中のどの時期に阻害されやすいか，またその時期と β-BHC の濃度の異いによって差異があるかを観察した。第2段階では，妊娠1カ月前から胎仔観察日まで β-BHC を添加した飼料を与え，かつ受胎後第6，7日目の2日間 β-BHC をさらに経口投与して，母体に蓄積した β-BHC の胎仔への影響を観察した。その結果，第1実験の妊娠初期における皮下注射では β-BHC の投与濃度が高い程，未熟仔や死亡仔の出現率が高くなる傾向がみられ，また妊娠中期では低濃度の投与群にそれらの出現率が高く観察された。第2実験の β-BHC の蓄積している母体に更に経口投与した場合は，高濃度の投与群に異常仔が多く観察された。

牛乳衛生における最近の問題点

春田佐三夫

モダンメディア，18（4），169～183（1972）

ここ数年間に社会問題にまで発展し，今日漸く好ましい方向に向いつつある牛乳衛生上の問題点，特に原料乳の細菌学的な面での乳質改善（Betterment of Milk-Quality），残留抗生物質，残留農薬など，2，3の問題をとりあげ，それらの発端，経緯，将来などについて論説した。

食品中の残留農薬分析に関する研究（第8報）
授乳婦の血液中の残留有機塩素農薬

厚生省母乳農薬汚染研究班（田辺　弘也，春田三佐夫，他）

食品衛生学雑誌，13（5），438～450（1972）

さきに昭和46年1月から3月にかけて，厚生省は全国都道府県の衛生研究所に依頼して，産後1か月以上経過した授乳中の母親を対象に，母乳中の残留有機塩素農薬に関する実態調査を実施した。これについてはすでに報告した。本報においてはこの調査と平行して，その母乳の提供者より同時に血液を採血し，血液中の残留有機塩素農薬の実態調査を行なった。以下，その調査成績の要旨について述べる。

血液中の残留総 BHC を全国的に比較すると，西日本地区が東日本地区と比べて若干高い傾向にあった。その残留量の多い地方としては愛知県（非農夫0.030 ppm），京都府（0.030ppm），兵庫県（0.033ppm），広島県（0.032ppm），香川県（0.024 ppm）および宮崎県（0.030ppm）の府県が挙げられる。また，β-BHC の残留量では大阪府（非農婦，0.050 ppm），愛知県（0.022ppm），兵庫県（0.030 ppm）および広島県（0.032ppm）に高いβ-BHCが検出された。

血液中の残留総DDTは福井県（非農婦，0.045ppm），京都府（0.045ppm），大阪府（0.049ppm）および広島県（0.078ppm）にかなり高い残留値を示した。その他の県においては全国的に平均して総 DDT が検出された。またP,P'-DDTでは広島県（0.067ppm）および大阪府（0.021ppm）が非常に高い残留値であった。なお，今回の対象となったドリン系農薬のうち，アルドリンおよびエンドリンはいずれの検体からも検出されなかった。

食品中の残留農薬分析に関する研究（第7報）
母乳中の残留有機塩素農薬

厚生省母乳農薬汚染研究班（田辺　弘也，

春田三佐夫，他）
食品衛生学雑誌，13（5），422～437（1972）

昭和45年に日本農村医学会総会において母乳の有機塩素農薬の汚染が報告されて以来，母乳の農薬汚染は母子の保健衛生上由々しき問題となった。この事態を重視して厚生省は母乳の農薬汚染の現状を早急に把握する目的で全国24都道府県衛生研究所の協力のもとに母乳の有機塩素農薬の汚染に関する調査研究を実施した。以下その調査成績の要旨について述べる。

母乳中の残留有機塩素農薬：昭和46年1月から3月までの3か月間に，産後1か月以上を経過した授乳中の母親より母乳を採取し，母乳中の残留有機塩素農薬を分析した結果，母乳検体総数454例中のBHC残留量の平均値は総BHC量が0.16PPmであり，その異性体のα-，β-，γ-，およびδ-BHCではそれぞれ0.003PPm，0.12PPm，0,003PPmおよび0.001PPmであった。これらのBHC 4異性体の比率はおおむね2.5：95：2：0.5であった。その汚染状況は東日本地区に低く，西日本地区に高い傾向であった。一方，P,P'-DDTおよびその近縁化合物の残留では西日本地区と東日本地区を比較すると，若干残留量が高い傾向にあったが，全国的に平均して母乳中から検出されたのが特徴的であった。なお，ドリン系農薬ではアルドリンが2例のみ検出されたが，ディルドリンが母乳から79%も検出された。

母乳中の残留有機塩素農薬量と母親の食餌との関係：人間が食物連鎖の最終的摂取者であることを考慮すれば，母乳中の有機塩素農薬は食餌に由来することが十分に考えられる。そこで母乳提供者に対して食餌関にする質問を行なって調査した。その結果，β-BHCに関しては，牛肉を選んで多く摂取している母親の群と牛肉以外の食肉（豚肉，鶏肉，魚）を摂取している群と比較すると，牛肉を多く摂取している母乳の方が残留β-HBC量が高く，他の群との間に明らかな有意の差が認められた。なお，残留P,P'-DDTおよびディルドリンにおいても両群の間に若干の差が見出された。

食品等の簡易検査法（その1）
木村　康夫，林　　敏夫，斉藤　裕子
岡田　太郎
ジャパンフードサイエンス，12，71（1972）

食品の衛生学的検査法をとりあげ，表題のとおり，あくまでも現場に適する簡易的な検査法で，設備の不充分な保健所あるいはテストカーで，スクリーングテストとして行なうという考え方に立って述べたものである。したがって比較的短時間でしかも手軽に行なえるものを試験項目として選んだ。本号に記載した項目はメチルアルコール，ホルムアルデヒド，ホウ酸，シアン化合物，異物，腐敗度化学的試験（魚貝類），食用油脂の変敗試験などである。なお本検査法は昭和46年度厚生科学研究「食品等の現物検査に適用し得る試験検査法に関する研究」によったものである。

熱硬化性樹脂の衛生問題
藤居　　瑛

飲食用器具として用いられる熱硬化性樹脂について，食品衛生上のわが国の規制，規格試験法の推移および諸外国の規制の現状，また成型条件による製品のバラツキ，各種浸出条件によるホルムアルデヒドの溶出試験成績を示した。また，会津漆器等塗装製品について，素地の成型不十分や合成樹脂塗料の乾燥条件によるホルムアルデヒドの溶出について述べた。

食用混合色素の二波長分光測定法による分別定量（第1報）
二成分混合物について（その1）
神蔵美枝子（国立衛試），遠藤　英美（都立衛研）
佐々木英人（鳥取大）
食品衛生学雑誌，13（6），555～565（1972）

食用色素の2種混合色素製剤を分離することなく，二波長分光々度計を用いて，二成分中の一成分の吸光度の等しいλ_1，λ_2の波長を求めて，他の混合成分をそのまま定量する方法により，現在食品衛生法で許可されている12種の食用色素および許可外色素5種の組合せについて，λ_1，λ_2を選定し定量法を作り，色素製剤の定量法を確立した。

果実，野菜中の残留農薬のGC分析
主として有機塩素系農薬について
半田八十三，川村　正孝，三島　義人
田中久四郎
東京都衛生局学会誌，(48)，32（1971）

^{3}H（Tritium）を放射線源としたガスクロマトグラフによる分析例および，γ-BHC，p・p'-DDTの最小検出量の95%信頼限界について実験した結果，信頼95%の信頼限界はS/N＝2でγ-BHC 0.095≧m≧0.065pg，p・p'-DDT 0.432≧m≧0.31pgである。

食品汚染とその計測法

半田八十三

電子展望，7(12)，110～115（1970）

「注目を浴びる公害計測技術」特集号において残留農薬，サイクラミン酸ナトリウムおよびニトロソアミンのガスクロマトグラフ分析法について解説した。

東京都における母乳中の残留有機塩素系農薬量

道口　正雄，山岸　達典，牛尾　房雄，藤本　千鶴
竹葉　和江，可児　利朗，春田三佐夫，安原　克
窪田　英夫

日本公衆衛生雑誌，19（10），541～544（1972）

1971年1月から3月中に都内病院および産院にて出産した産婦30名を対象として，出産後1週間，2週間，1か月および3か月の4回採乳し，母乳中の残留有機塩素系農薬の経時的レベルの変化を検討した。また，そのうちの5名については8月後まで追跡調査を行なった。さらに全産婦について，産後1週間目に採血し，血液中の残留有機塩素系農薬量もあわせて分析した。

その結果，母乳中の残留農薬レベル（Fatbase）の平均値には，産後1週間から3か月にわたって，統計学的に変化は認められず，母乳中の総BHC量（Fatbase）は平均して約2.5ppmであり，総DDTおよびディルドリンはそれぞれ約2.0ppmと約0.15ppmであった。なお，8か月の長期追跡調査の結果からは例数が少ないため明確な結論を得るに至らなかった。一方，血液中の残留農薬レベルの平均値は総BHC 0.0090ppm，総DDT 0.0044ppmおよびディルドリン0.0024ppmであったが，血液と母乳中の残留農薬量との間に明らかな相関関係は認められなかった。

市販牛乳の物理恒数およびナトリウム含有量に関する研究

可児　利朗，友成　正臣，塚越　ヤス
古内　正孝，武士俣邦雄

東京都衛生局学会誌，(50) 126 (1972)

牛乳（10銘柄・58例）の分析値

	粘　度	Na mg %	固形分%
最大値	2.084	61.1	11.73
最小値	1.794	43.1	11.04
平均値	1.9448	51.93	11.325
標準偏差	0.062	3.12	0.163
変動係数	0.032	0.06	0.014

目　的

品質チエックの物理的測定法の意義および中和剤添加の有無の検討

考　察

季節変動について：

粘度　12･2月値（n=20，平均1.9855）>
6･8月値（n=18，平均1.8807）危険率0.1%

na値　12･2月値（n=20，平均50.22）>
6･8月値（n=18，平均53.63）危険率0.1%

固形分値 12･2月値（n=20，平均11.341）>
6･8月値（n=18，平均11.251）危険率5.0%

粘度と固形分値との相関

$\gamma=0.5$，固形分値＝（粘度＋0.241）／0.1930

密度(58例)　最頻値（34）1.027，最小値(2) 1.026，最大値（5）1.029（20°C・g/m*l*）

中和剤添加の検討

6・8月の夏季乳のNa値は，既報（今村52mg%，可児56.8mg%）より高くない。冬季乳より高いNa値をNa添加によるものと証明あるいは推定するには，Na含有量測定ばかりでなく乳酸塩測定などによらなければならない。

原子吸光法による二三の血中鉛定量法の比較検討

秋山　和幸，高橋利恵子，長嶋　親治
藤谷　和正，関　比呂伸，野牛　弘

日衛誌，27，129（1972）

Hesselによる TritonX-100，APDC-MIBK 抽出，血中鉛簡易法と標準的な湿式灰化，Dithizone 抽出法の比較検討を行ない，2つの方法間の相関性が高くよく一致することを認め，簡易法は実用的であり，また湿式法は再現性が優れていることを報告した。

REACTIONS OF PHENOLIC STEROIDS WITH CONCENTRATED SULPHURIC ACID

Michiya KIMURA[1], Kazuyuki AKIYAMA[2] and Toshiaki MIURA[1]

Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 20, 2511-2513 (1972)

The behaviour of some phenolic steroids in concentrated sulphuric acid was reported, concerning with the mechanism of the Kober colour reaction.

Hydroxysteroids or steroidal olefins are first protonated with/without subsequent dehydration to give

the corresponding carbonium ions. These ions are further transformed into the characteristic chromophores, and subsequently to the highly dehydrogenated final products such as cyclopentenophenanthrenes.

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
2) Department of Environmental Health Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Pnblic Health

原子吸光法による二三の血中尿中鉛測定法の比較検討

秋山　和幸，二島太一郎，高橋利恵子
長嶋　親治，藤谷　和正，多田　宇宏
野牛　　弘

第9回全国衛生化学技術協議会総会講演要旨集，73（1972）

血中鉛測定法として標準的な湿式灰化—Dithizone—MIBK 抽出法(A)，簡易法である Hessel 法（B）および三塩化酢酸除蛋白法（C）の比較検討を行ない，それぞれ相関性も高くスクリーニングの目的には簡易法を採用し得ることを報告した。通常血液の場合，精度には有意差は認められなかった。

A：B　r=0.995，A=0.993 B-4.49，　n= 9
（高鉛家兎血液　Pb，30.1～115.8 μg/100g）
　　r=0.919，A=0.966 B-0.99，　n=20
（通常血液　Pb，5.6～17.5 μg/100g）
B：C　r=0.810，B=1.130 C+0.16，　n=26
（通常血液　Pb，5.3～16.2 μg/100g）

尿の場合は灰化処理を省略すると液の分離が悪くまたバラツキが高い傾向が認められた。

地下水の水質調査（6）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（2），22～27（1972）

群馬県下の井水 107件，栃木県下の井水 137件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

地下水の水質調査（7）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（3），20～24（1972）

愛知県下の井水 148件，岐阜県下の井水 150件，三重県下の井水 310件，和歌山県下の井水 78件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

地下水の水質調査（8）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（4），13～17（1972）

滋賀県下の井水 220件，福井県下の井水 230件，石川県下の井水 93件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

地下水の水質調査（9）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（5），14～20（1972）

鳥取県下の井水 108件，島根県下の井水 293件，山口県下の井水 66件，岡山県下の井水 530件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

地下水の水質調査（10）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（6），14～17（1972）

高知県下の井水 300件，徳島県下の井水 300件，熊本県下の井水 238件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

地下水の水質調査（11）
地下水と井戸とポンプ
三村　秀一
14（7），29～33（1972）

鹿児島県下の井水 268件，長崎県下の井水 381件の水質について統計処理を行ない，各地域別と化学成分との関連および特性について考察した。

都区内および三多摩地区における井戸水の水質

中村　　弘，樋口　育子，会田　朋子

水道協会雑誌，(456)，4～13（1972）

昭和46年度に行なった都区内の未給水地区を中心とした井戸水約2万の試験結果について，地区別に検討

を加えて報告した。

地下水の生物〔9〕
松本　浩一
用水と廃水，12（2），135～140（1970）

地下水産の吸虫類と条虫類および組虫類につきのべた。吸虫類，条虫類は本邦の地下水からは未報告である。筆者が東京狛江の井戸から採集したマミズヒモムシは地下水種であり，世界でもきわめて数少ない報告のひとつである。

地下水の生物〔10〕
松本　浩一
用水と廃水，12（4），294～306（1970）

地下水産のワムシ類，イタチムシ類につきのべた。本邦の地下水からはこれらの類の報告は少なく，真地下水種は未知である。

地下水の生物〔11〕
松本　浩一
用水と廃水，12（5），391～401（1970）

地下水からは比較的多数の線虫類が報告されているが，本邦の地下水産の線虫類の研究は未済である。

地下水の生物〔12〕
松本　浩一
用水と廃水，12（6），479～485（1970）

地下水産の多毛類，原始環虫類の報告はきわめて少ない。姫路，京都，旭川，対島などの井戸および秋芳洞，安家洞などから採集されたホラアナゴカイ類は世界的にもめずらしい貴重な例である。

地下水の生物〔13〕
松本　浩一
用水と廃水，12（9），791～801（1970）

地下水産ミミズ類の紹介に先立ち，貧毛類の形態・分類について，平易な説明を行なった。

地下水の生物〔14〕
松本　浩一
用水と廃水，12（10），111～118（1970）

既知の地下水産の貧毛類のリストをあげ，本邦産既知種を紹介した。地下水からはしばしば貧毛類が検出されるが，これらの中には，地表水種と真地下水種があり，その区別は水質汚濁有無の判定上きわめて有意義である。

地下水の生物〔15〕
松本　浩一
用水と廃水，12（11），81～87（1970）

ヒル類につき説明し，地下水産のヒル類のリストをあげた。真地下水性のヒルはきわめてまれで，本邦からは1種が報告されているのみである。しかるに，地表水性のヒル類は地下水中に迷入し，しばしば井水から検出されることがある。これらは，ミミズ類と同様に，井水汚濁の重要な指標生物となる。

地下水の生物〔16〕
松本　浩一
用水と廃水，13（4），89～98（1971）

地下水産のクマムシ類，コケムシ類のリストを示した。クマムシ類は本邦の井戸と温泉から4種が知られているが，コケムシ類は本邦の地下水からは未知である。

ISOPOD CRUSTACEANS FOUND IN THE SUBTERRANEAN WATERS OF THE ISLANDS OF TSUSHIMA
松本　浩一
Bull. Nat. Sci. Mus., 13(2), 231～239（1970）

対馬の井水から得られた等脚類4種につきのべた。この中，3種は Mackinia 属の地下水性種で，日本列島と朝鮮半島，沿海州などの地下水動物の分布関係を示す興味ある種である。

水中生物と人間との関係
松本　浩一
ファルマシア，6（8），596～600（1970）

人間生活に関係のある水中微生物を有害，有用の面から簡単に紹介した。

多摩川の水質汚濁に関する生物学的研究
松本　浩一，松本　昌雄
東京都公害研究所年報，1（2），水質編，59～65（1970）

1959年から1965年の間に行なった多摩川水系の調査結果のうち，底生動物相の経年変化の面から，多摩川汚濁の様相についてのべた。

1969年夏季における多摩川の調査結果――

汚濁の生物指数（Biotic Index）について

松本　浩一，松本　淳彦，松本　昌雄

東京都公害研究所年報，2，134～139（1971）

1969年7～8月に多摩川水系64地点について行なった，水質調査の結果で，通常の理化学および細菌学的試験結果のほかに，底生生物による汚濁の生物指数を付記してある。

湯の湖の生物群集の生産力に関する研究，湯の湖の Asellus について（予報）調和型湖沼の生物群集の生産力に関する研究，昭和46年度報告

松本　浩一

JIBP-PF，湯の湖研究グループ，56～57（1972）

湯の湖産アセラスの分類学的位置および，成分分析結果についてのべた。

動物性プランクトンおよび硫酸塩還元菌

松本　浩一，松本　淳彦

東京湾の生物相調査報告，神奈川県，16～30（1972）

東京湾全水域にわたる672地点中神奈川県分24地点の1971年度調査成績である。

底生生物による汚濁判定調査成績（多摩川）

松本　浩一，松本　淳彦

環境汚染と生物相の生態学的研究，昭和46年度環境庁委託公害調査研究成績，日本環境衛生センター，23～41（1972）

1971年に行なった多摩川水系25地点の生物学的調査結果である。

水中の生物

松本　浩一

科学の実験，22（13），1135～1143（1972）

水中生物主として底生動物による生物学的水質判定法を平易に説明した。

生物による水質汚濁測定

松本　浩一

Mol，臨時増刊，1972年11月，175～181（1972）

肉眼的な大型底生動物による水質汚濁判定法を平易に説明した。

細菌試験の実務

松本　浩一

Mol，臨時増刊，1972年11月，138～143（1972）

工場管理者のために細菌学的水質試験方法を平易簡単にのべた。

多摩川の現状――6．底生生物

松本　浩一

Urban Kubota，（7），Nov. 1972，14～17（1972）

多摩川の Benthos につき，経年変化，地域的変化をのべ，汚濁の現状につき生物学的に検討した。

著　　書

BOOKS PUBLISHED IN 1972

1　新編・食品衛生学

豊川　行平（東大教授），宮木　高明（千葉大教授），辺野喜正夫（都立衛研所長）編集

朝倉書店，1972年5月30日発行

食品衛生学は飲食物による健康障害を防止し，その安全性を確保するための原理と技術であるとの理念にもとづき，食品衛生全般に亘り，微生物学的，化学的および環境衛生学的面から最近の研究成果をとり入れて詳細に記述し，研究者のみならず，行政等の実務に携わる者にも役立つように編集したものである。346頁。

1972年に行なった学会発表演題

THEMES PRESENTED AT SCIENTIFIC MEETINGS IN 1972

1．寺山　武，坂井　千三，他：　赤痢菌およびサルモネラ保菌率の年次別推移。
第30回日本公衆衛生学会，札幌，1972年10月26日

2．善養寺　浩，寺山　武，潮田　弘，五十嵐　英夫，池島　伸至，斉藤　香彦：　食肉店，中華料理店の調理環境およびトリ処理場の環境におけるサルモネラの汚染調査成績。
第24回日本食品衛生学会，秋田，1972年10月12日

3．寺山　武，五十嵐　英夫，潮田　弘，善養寺　浩：　ブドウ球菌エンテロトキシンDの精製およびその性状について。
第19回毒素シンポジウム，赤城，1972年7月8日

4．寺山　武，五十嵐　英夫，潮田　弘，善養寺　浩：　ブドウ球菌エンテロトキシンAおよびDの精製と免疫学的特異性。
第28回日本細菌学会関東支部総会，東京，1972年10月30日

5．善養寺　浩，工藤　泰雄，太田　建爾：　腸炎ビブリオのマウス Foot edema model による病原性の検討。
第45回日本細菌学会総会，仙台，1972年5月18日

6．諸角　聖，一言　広，和宇慶　朝昭，善養寺　浩（都立衛生研究所），倉田　浩，熊田　広子，田辺　弘，他（国立衛生試験所）：　そば粉の真菌汚染に関する研究。
第24回日本食品衛生学会，秋田，1972年10月12日

7．丸山　務：　*Yersinia enterocolitica* の菌学，生態および分離成績。
第21回日本伝染病学会東日本地方会，仙台，1972年11月11日

8．善養寺　浩：　*Yersinia* 属
第21回日本伝染病学会東日本地方会，仙台，1972年11月11日

9．丸山　務，柳川　義勢，善養寺　浩：　*Yersinia enterocolitica* の生物学的，生化学的性状に関する研究(2)，pH，NaCl，胆汁酸塩の発育に及ぼす影響。
第28回日本細菌学会関東支部総会，東京，1972年10月30日

10．木村　貞夫，水野　孝重，百瀬　隆子，渡辺　恒明（栃木県衛研），善養寺　浩，丸山　務，坂井　千三：　栃木県における *Y. enterocolitica* による集団発生例について。
第28回日本細菌学会関東支部総会，東京，1972年10月30日

11．善養寺　浩，丸山　務：　わが国における *Yersinia enterocolitica* の分離例と分離菌の性状について。
第45回日本細菌学会総会，仙台，1972年5月18日

12．今川　八束，吉田　律子（墨東病院），丸山　務，善養寺　浩：　*Yersinia enterocolitica* による下痢症の2例。
第46回日本伝染病学会総会，名古屋，1972年4月4日

13．坂井　千三，伊藤　武，丸山　務，津野　正朗，岡沢　久美子，善養寺　浩：　*Salmonella bovismorbificans* による集団発生の2事例について。
第24回日本食品衛生学会，秋田，1972年10月12日

14．中村　義，坂井　千三，伊藤　武，津野　正朗，嬉野　ふみ子：　サルモネラ食中毒に関する研究，特にカメのサルモネラ保菌状況。
第30回日本公衆衛生学会，札幌，1972年10月26日

15．扇　和子，吉田　洋子，中谷　林太郎（公衆衛生院），坂井　千三，善養寺　浩（都立衛研）：　サルモネラ（東京都1971年）のR因子とニトロフラン系薬剤に対する感受性値。
第28回日本細菌学会関東支部総会，東京，1972年10月

16．善養寺　浩：　サルモネラの生態と環境汚染。主として屠場廃水の汚染をめぐって。
第46回日本伝染病学会総会，名古屋，1972年4月4日

17．小久保　弥太郎，梅木　富士郎，春田　三佐夫：凍結豚肉の細菌汚染状況と分離菌株の生物活性について。

第24回日本食品衛生学会，秋田，1972年10月12日

18. 梅木　富士郎，小久保　弥太郎，春日　三佐夫，四宮　栄：　市販ひき肉の細菌汚染の実態。
第139回日本獣医公衆衛生学会，千葉市，1972年9月20日

19. 西條　頼廣，嵯峨　晴世：　肉種鑑別に用いる寒天ゲル内沈降反応（Ouchterlony 法）条件の検討。
第23回日本食品衛生学会，東京，1972年5月11日

20. 佐々木　路子，伊藤　忠彦，安藤　泰正，藪内　清，坂井　冨士子，根津　尚光：　螢光抗体法によるインフルエンザの診断。
第49回東京都衛生局学会，東京，1972年7月13～15日

21. 一言　広，諸角　聖，和宇慶　朝昭，善養寺　浩：　食品中の汚染有害真菌に関する研究，そば粉および乾麺について。
第49回東京都衛生局学会，東京，1972年7月13～15日

22. 柳沢　靖子，岩崎　謙二，矢野　一好，山田　澄夫，根津　尚光：　1971年の東京都内における腸内ウイルス流行は握に関する研究。
第50回東京都衛生局学会，東京，1972年11月15～17日

23. 西川　洋一，勝田　隆子，上原　真一：　朮類生薬の簡易識別法について。
生薬学会長崎大会，長崎，1972年11月2日

24. 楠　淳（都立衛研），山岸　由美子（立川保健所）：　アイスクリーム類のカルシウム含量について。
第19回日本栄養改善学会総会，静岡，1971年10月

25. 春日　三佐夫：　食品の加熱殺菌
第20回食品技術研究会セミナー（食品の殺菌に関する技術の進歩と展望）東京，1972年12月21日

26. 遠藤　英美，神蔵　美枝子，佐々木　英人：　食品中の着色料の分析に関する研究，二波長分光測定法による混合色素の定量について。
日本栄養学会第92年会，大阪，1972年4月5日

27. 遠藤　英美，神蔵　美枝子，加藤　三郎：　二波長分光測定法の食品添加物分析への応用。
第9回全国衛生化学技術協議会，水上，1972年10月5日

28. 直井　家寿太，斉藤　和夫，風間　栄治，小川　仁志，木村　康夫：　食品中のマイコトキシンに関する研究（第3報）。米，押麦，小麦粉の Fusarenon—X試験法。
第24回日本食品衛生学会，秋田市，1972年10月12日

29. 直井　家寿太，小川　仁志，斉藤　和夫，風間　栄治，志村　公子，木村　康夫：　食品中のマイコトキシンに関する研究（第4報）。醸造食品中のステリグマトシスチン試験法の検討。
第24回日本食品衛生学会，秋田市，1972年10月12日

30. 上田　工，西島　基弘，大西　操，高橋　尚子，上村　尚，中里　光男，木村　康夫：　天然由来による食品中の安息香酸。特にうめ，あんずについて。
全国衛生化学技術協議会，水上市，1972年10月4日

31. 西島　基弘，木村　康夫，上田　工，真木　俊夫，大西　操，高橋　尚子，山田　隆昭，中島　欽一郎，福田　忠夫：　かん詰食品中重金属に関する研究。
第23回日本食品衛生学会，東京，1972年5月11日

32. 上田　工，西島　基弘，大西　操，高橋　尚子，真木　俊夫，木村　康夫：　食品中の二酸化イオウの定量法について。
第23回日本食品衛生学会，東京，1972年5月11日

33. 鈴木　二郎，友松　俊夫，冠　政光，押田　久美子，片倉　栄一，木村　康夫：　薄層クロマトグラフィーによるかんきつ，果実中のジフェニールの定量について。
第24回日本食品衛生学会，秋田市，1972年10月12日

34. 勝木　康隆，佐藤　彌代子，安田　和男，木村　康夫：　ポリ袋詰漬物類のソルビン酸の浸透性について。
日本公衆衛生学会第31回総会，札幌市，1972年10

月25日

35. 西垣　進，田村　行弘，山田　洋，鳥羽　啓子，嶋村　保洋，木村　康夫：　L—グルタミン酸の多量摂取に対する衛生化学的検討（第1報）。その苦情例および市場調査。
第24回日本食品衛生学会，秋田市，1972年10月12日

36. 西垣　進，田村　行弘，真木　俊夫，山田　洋，鳥羽　啓子，嶋村　保洋，木村　廉夫：　L—グルタミン酸の多量摂取に対する衛生化学的検討（第2報）。L—グルタミン酸ナトリウム投与におけるヒトの体質と感受性についての調査。
第24回日本食品衛生学会，秋田市，1972年10月12日

37. 松本　淳彦：　三宅島大路池のプランクトンと水質。
日本陸水学会(第37回)，札幌市，1972年9月15～17日

38. 松本　浩一：　多摩川の底生生物による Biotic index の経年変化。
日本陸水学会(第37回)，札幌市，1972年9月15～17日

39. 土屋　悦輝，山崎　堅吉，三村　秀一：　油脂含有試料中のポリ塩化ビフェニル（PCB）の迅速定量法。
日本薬学会第92年会，大阪市，1972年4月6～7日

40. 小笠原　公，武士俣　邦雄，霜田　さと子，可児　利朗，野牛　弘：　東京都民の尿成分検査成績。
第49回東京都衛生局学会，東京，1972年7月13～15日

41. 山岸　達典，竹葉　和江，藤本　千鶴，森本　キミ，春田　三佐夫：　母体および胎児における残留有機塩素系農薬について。
第50回東京都衛生局学会，東京，1972年11月15～17日

42. 山岸　達典，藤本　千鶴，竹葉　和江，森本　キミ，春田　三佐夫：　β-BHCのマウス胎仔に及ぼす影響について。
第50回東京都衛生局学会，東京，1972年11月15～17日

43. 可児　利朗，友成　正臣，塚越　ヤス，古内　正孝，武士俣　邦雄：　市販牛乳の物理恒数およびナトリウム含有量に関する研究。
第50回東京都衛生局学会，東京，1972年11月15～17日

44. 可児利朗：　乳および乳製品など試験法
日本薬学会第92年会，公衆衛生協議会，大阪市，1972年4月5～7日

45. 道口　正雄，牛尾　房雄，阿部　学：　東京湾の塩化ジフェニル汚染，鳥類および魚類中の PCB 蓄積量。
日本農芸化学会昭和47年度大会，仙台市，1972年4月1～4日

46. 道口　正雄：　魚類，鳥類中の PCB の分析。
日本分析化学会，第6回公害と分析化学に関するパネル討論会，東京，1972年10月2日

47. 風間　成孔，水石　和子，観　照雄，伊藤　弘一，原田　裕文，戸谷　哲也：　有機ハロゲン化合物に関する衛生学的研究（第1報）ポリクロロベンゼン投与時における鶏卵への移行パターン。
日本薬学会，大阪市，1972年4月6日

48. 鈴木　助治，山添　律子，小泉　清太郎，戸谷　哲也：　有害性元素に関する衛生化学的研究（第3報）毛髪中のセレン含有量について。
日本薬学会，大阪市，1972年4月7日

49. 戸谷　哲也：　シンポジウム「環境汚染からみた食品衛生の諸問題」PCB ならびに塩素系農薬，特にその分析上の留意点と分析結果。
東京都衛生局学会，東京，1972年6月20日

50. 吉原　武俊，渡辺　四男也，奥本　千代美，福士　真知子，遠山　逸雄，松本　茂：　市販ガソリン中の四アルキル鉛および芳香族炭化水素について。
東京都衛生局学会，東京，1972年11月15日

51. 松本　茂，奥本　千代美，加賀　あき子，富永　温子，宮武　ノリエ：　リノール酸メチルの通気酸化における α-トコフェロールの影響について（リノール酸メチルの通気酸化と酸化防止剤の影響―Ⅵ）。
日本薬学会第92年会，大阪市，1972年4月7日

52. 下平　彰男：　注射剤のパイロジェン除去に関する研究。
日本薬学会第92年会，大阪市，1972年4月7日

53. 武士俣　邦雄，霜田　さと子，小笠原　公：　ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅰ）ポルフィリン体の定量法と周辺について。
第21回日本衛生検査学会総会，大分市，1972年4月22日

54. 武士俣　邦雄，霜田　さと子，小笠原　公，野牛　弘：　ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅱ）一時尿の δ-ALA，Cp，Ug 等の関係について。
第9回関東甲信衛生検査学会，甲府市，1972年10月7日

55. 野牛　弘，二島　太一郎，多田　宇宏，長崎　護：　東京都民の毛髪中水銀，鉛及びカルシウム量について
日本衛生学会，広島市，1972年4月4日

56. 秋山　和幸，高橋　利惠子，長嶋　親治，藤谷　和正，関　比呂伸，野牛　弘：　原子吸光法による2，3の血中鉛定量法の検討。
日本衛生学会，広島市，1972年4月4日

57. 溝口　勲，牧野　国義，佐藤　泰仁，大沢　誠喜，千種　翠，野牛　弘：　光化学スモッグにおける眼刺激作用の実験的研究。
日本公衆衛生学会，札幌市，1972年10月26日

58. 大井　玄，関　比呂伸，前田　ヒロ子，福田　雅夫，秋山　和幸，野牛　弘：　鳩に現われた鉛地域汚染の経路。
日本公衆衛生学会，札幌市，1972年10月26日

59. 溝口　勲，牧野　国義，佐藤　泰仁，野牛　弘，大沢　誠喜，千種　翠（都立衛研），中川　喜幹，長崎　護，有働　亮二，須貝　達雄：　学校（校舎，校庭等）のオキシダント値の変動について。
全国大気汚染研究協議会大会，大分市，1972年11月8～9日

60. 溝口　勲，大沢　誠喜，佐藤　泰仁，牧野　国義，千種　翠，野牛　弘：　東京都における降下煤塵中の重金属の分布について。
全国大気汚染研究協議会大会，大分市，1972年11月8～9日

61. 溝口　勲，牧野　国義，佐藤　泰仁，大沢　誠喜，千種　翠，野牛　弘：　光化学スモッグにおける眼刺激作用の因子について。
全国大気汚染研究協議会大会，大分市，1972年11月8～9日

62. 狩野　文雄：　粘菌の生理機能に及ぼすオキシダントの影響。
全国大気汚染研究協議会大会，大分市，1972年11月8～9日

63. 池田　真悟：　おりぼりの細菌試験。
衛生検査技師学会，大分市，1972年4月22日

64. 秋山　和幸，二島　太一郎，高橋　利惠子，長嶋　親治，藤谷　和正，多田　宇宏，野牛　弘：　原子吸光法による2，3の血中尿中鉛測定法の比較検討。
全国衛生化学技術協議会総会，前橋市，1972年10月5日

昭和48年12月15日　発行
December, 1973

規格表第2類
印刷番号(48)1575
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報24

編集発行：東京都立衛生研究所

所在地　〒160 東京都新宿区百人町3の24の1
電話　363—3231(代)

24-1, 3-CHOME, HYAKUNIN-CHO,
SHINJUKU-KU, TOKYO JAPAN
TELEPHONE (03) (363) 3231

印刷所　佐竹印刷株式会社
東京都墨田区向島3—34—1
電話　(625) 7481(代)