図書室
収受
50. 1. 22

東京都立衛生研究所

研究年報

ANNUAL REPORT

OF

TOKYO METROPOLITAN RESEARCH

LABORATORY OF PUBLIC HEALTH

25

1974

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

序

研究年報第25号を発行することになりました．当衛生研究所は本年３月をもって満25年を迎えました．

衛生研究所が誕生した時は，戦争に敗れ，瓦礫の中から国民がようやく立ち上がりはじめた時でありました．物もなく，金もなく，生活に疲れはてていた頃であります．その頃に比べると，４半世紀を経た今日では内も外も事情は著しく好転しました．そして，衛生研究所は東京都民のひいては国民の生命と健康を守るために，衛生行政当局とともに誠心誠意努力しましたし，その成果は関係者の間でも高く評価されているものと信じております．ただひとつ残念なことは，試験検査に対する行政上の需要が極めて多いに拘らず，保健所検査室等の整備がおくれているために，衛生研究所は保健所検査室段階で処理すべき試験検査まで負担しなければなりません．そのために，今日といえどもエネルギーの多くを試験検査，特に行政的な試験検査にさかねばならない実情にあります．それにも拘らず，顕著な研究実績を挙げていることも事実でありましょう．

本研究年報は主として1973年に完了した研究成果を編集したものであります．この研究成果は全所員の旺盛な研究心，情熱，協力および実行力によってかち得たものと信じます．

本年報とは別に，本年３月衛生研究所の発足以来の調査研究の業績目録集を，25周年記念事業のひとつとして，発行致しました．御一覧いただければ幸甚に存じます．

なお，従来本研究年報の表紙には研究実施年度を掲げて参りましたが，しばしば，文献等に発行年と間違えて記載されている例がありますので，本号から発行年を示すことに致しました．御叱正御鞭撻をいただければ幸いであります．

1974年８月15日

東京都立衛生研究所長　辺野喜　正夫

目　　次

報　　文

1 *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis* のヒト，動物における分布とその抗体保有，ならびに食品汚染状況の検討について ……善養寺　浩　坂井　千三　丸山　務　柳川　義勢　1

2 ブドウ球菌エンテロトキシンEの精製および同定 ……寺山　武　山田　澄夫　五十嵐英夫　潮田　弘　善養寺　浩　9

3 本邦食品の糸状菌汚染に関する研究 ……一言　広　諸角　聖　東京における市販緑茶葉についての調査成績　和宇慶朝昭　坂井　千三　善養寺　浩　17

4 梅毒血球凝集反応におけるマイクロタイター法の検討 ……村田以和夫　堀　幹郎　宮沢　貞雄　加納　堯子　大久保暢夫　23

5 A群溶血レンサ球菌の簡易同定法としてのバシトラシン感受性試験の検討 ……柏木　義勝　柴田　実　徳江シゲ子　富永　洋子　大久保暢夫　飯村　達　29

6 1973年度猩紅熱患者由来溶連菌の薬剤感受性について ……柴田　実　柏木　義勝　徳江シゲ子　富永　洋子　大久保暢夫　35

7 腸内ウイルス感染症の実態は握に関する研究(第6報) 1973年1～12月における東京都内3下水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　41

8 1973年東京都民における風疹の血清疫学的研究 ……柳沢　靖子　藪内　清　坂井冨士子　伊藤　忠彦　岩崎　謙二　47

9 1973年度東京都における日本脳炎の疫学的研究 ……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　53

10 1973年9月より1974年4月に都内において発生した集団かぜの病因に関する研究 ……坂井冨士子　伊藤　忠彦　藪内　清　岩崎　謙二　根津　尚光　59

11 1973年流行時に分離したインフルエンザB型ウイルスの抗原分析に関する研究 ……坂井冨士子　伊藤　忠彦　藪内　清　岩崎　謙二　根津　尚光　65

12 東京地区におけるBKウイルス感染の血清疫学的研究 ……岩崎　謙二　矢野　一好　柳沢　靖子　山崎　清　田口　文章　69

13 1973年東京都におけるライノウイルス感染の血清疫学的研究 ……岩崎　謙二　矢野　一好　73

14 市販医療用医薬品の品質について(Ⅲ) コカルボキシラーゼ注射薬 ……田窪　栄一　重岡　捨身　宮武ノリエ　上原　真一　79

15 生薬の試験法に関する研究(V) ……西川 洋一 渡辺四男也 85
芇類生生薬精油のＴＬＣおよびＧＣによる考察 瀬戸 隆子

16 生薬の品質評価に関する研究(Ⅲ) ……西川 洋一 渡辺四男也 93
市販原料生薬の品質について 瀬戸 隆子

17 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(Ⅱ) ……吉原 武俊 奥本千代美 103
寺島 潔 長嶋真知子
市販婦人および乳幼児用肌着中のホルムアルデヒドについて(2) 遠山 逸雄 西川 洋一

18 有機ハロゲン化合物のケイ光反応に関する研究(第2報) ……植田 忠彦 鎌田 国広 111
Diphenylamineを用いるＰＣＢ各種単体のケイ光薄層デンシトメトリー 観 照雄 風間 成孔
戸谷 哲也

19 東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について(第2報) ……山野辺秀夫 天川 映子 119
食品中のＰＣＢ含有量について 鈴木 助治 小泉清太郎
戸谷 哲也

20 有害性元素に関する衛生化学的研究(第5報) ……雨宮 敬 伊藤 弘一 127
野菜などの重金属含有量について 山添 律子 原田 裕文
戸谷 哲也

21 有害性元素に関する衛生化学的研究(第6報) ……竹内 正博 江波戸挙秀 133
アルカリ分解による魚肉中のメチル水銀の定量法 伊藤 弘一 雨宮 敬
原田 裕文 戸谷 哲也

22 東京都における水銀汚染の実態について(第1報) ……伊藤 弘一 竹内 正博 141
魚介類および水産加工品中の水銀含有量について 江波戸挙秀 雨宮 敬
原田 裕文 戸谷 哲也

23 アルカリ分解――フロリジルカラムクリンアップ法を用いる油脂加工品中熱媒体のガスクロマトグラフィーによる定量法 ……観 照雄 鈴木 助治 153
植田 忠彦 山野辺秀夫
鎌田 国広 戸谷 哲也

24 アルキルベンゼンスルホン酸塩のガスクロマトグラフィーに関する研究 ……観 照雄 植田 忠彦 163
水石 和子 中村 義昭
風間 成孔 戸谷 哲也

25 化粧品カブレ等による事故検体の品質，性状について ……水石 和子 風間 成孔 175
中村 義昭 山添 律子
戸谷 哲也

26 生乳および牛乳の蛋白還元価について ……松本 昌雄 村上 文子 187
竹葉 和江 村上 一
春田三佐夫

27 畜肉を主原料とした調理冷凍食品の加工処理工程における細菌汚染要因の解析 ……小久保弥太郎 井草京子 191
梅木富士郎 春田三佐夫

28 有機塩素剤の使用禁止後における牛乳中の残留農薬の推移 ……山岸 達典 堀井 昭三 197
境野 米子 竹葉 和江
森本 キミ 春田三佐夫

29 食品中のマイコトキシンに関する研究(第5報) ……直井家寿太 風間 栄治 203
小麦粉の T-2 toxinとDiacetoxyscirpenol 試験法 斎藤 和夫 小川 仁志
志村 公子 木村 康夫

30 食品中の残留ＡＢＳについて ……西島 基弘 冠 政光 207
高橋 尚子 上村 尚
中里 光男 木村 康夫

31 かん詰食品中の重金属に関する研究(第3報) …… 西島 基弘 冠 政光 213
かん詰開かん時に発生する切り屑について 高橋 尚子 上村 尚
中里 光男 木村 康夫
小林 博義 篠原 楷
鯉沼 一夫

32 DDTC-MIBK 抽出を利用する重金属の原子吸光同 …… 西垣 進 田村 行弘 221
時分析法の検討(第Ⅱ報) 真木 俊夫 山田 洋
マンガンの分析について 嶋村 保洋 木村 康夫

33 生体試料中の総水銀の迅速分析法 …… 田村 行弘 真木 俊夫 227
山田 洋 嶋村 保洋
西垣 進 木村 康夫

34 魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究(第Ⅰ報) …… 西垣 進 田村 行弘 235
海水魚の筋肉中へのセレン蓄積と体重増加との相関および水銀蓄積との関連について 真木 俊夫 山田 洋
嶋村 保洋 落合 節子
木村 康夫

35 魚介中の微量元素の蓄積挙動の研究(第Ⅱ報) …… 西垣 進 田村 行弘 241
海水魚の肉中の銅および亜鉛含量と魚体重の関係 真木 俊夫 山田 洋
嶋村 保洋 木村 康夫

36 マグロ類およびその他の水産食品の水銀含有量調査第(第Ⅱ報) …… 西垣 進 田村 行弘 245
魚肉中への水銀蓄積と体重増加との関連について 真木 俊夫 山田 洋
嶋村 保洋 木村 康夫

37 フッ素イオン電極による食品中フッ素の定量 …… 友松 俊夫 鈴木 二郎 251
中沢久美子 木村 康夫

38 魚介類中の微量元素に関する基礎的研究(第1報) …… 上田 工 勝木 康隆 257
かつお体内の重金属分布について 安田 和男 木村 康夫

39 清涼飲料水中のカフェインの定性定量法について …… 伊東 昭子 関山 登 265
石井 晴代 木村 康夫

40 食品添加物中の多核芳香族炭化水素(3.4—ベンズピレン) …… 遠藤 英美 広門 雅子 271
(1)クエン酸 半田八十三 石井 和恵
宇佐美博幸 藤居 瑛

41 飲食器,野菜,果実用洗浄剤中の金属類について …… 安野 哲子 小野 綾子 279
荻野 周三 大畠 敏子
藤居 瑛

42 食器洗浄に使用される洗剤残留の実態 …… 渡辺 悠二 佐藤 憲一 283
諏訪世津子 吉田 令子
小野 綾子 藤居 瑛

43 ガラス製食器,特にプリントガラスコップの重金属溶出について …… 渡辺 悠二 佐藤 憲一 293
諏訪世津子 吉田 令子
佐藤弥代子 藤居 瑛

44 多摩川魚類中の PCB, PCT 及び農薬蓄積量 …… 深野 駿一 牛尾 房雄 297
道口 正雄

45 日常食事中の残留性有害物質含量 …… 牛尾 房雄 深野 駿一 307
西田 甲子 可児 利朗
道口 正雄

46 ポルフィリン体の生化学的研究(Ⅲ) …… 武士俣邦雄 霜田さと子 313
一時尿中の鉛とδ-アミノレブリン酸,コプロポルフィリン,ウロビリノーゲンの関係について 小笠原 公 野牛 弘

47 ポルフィリン体の生化学的研究(Ⅳ) …… 武士俣邦雄 霜田さと子 321
血中鉛と一時尿中の鉛，δ-アミノレブリン酸，コプロポルフィリン，ウロビリノーゲンの関係について 小笠原 公 野牛 弘

48 空気浄化に関する研究 …… 両角 清 狩野 文雄 331
空調機器による粉塵，ならびに重金属類の捕集率 青木 実 大城 賢吾

49 東京都内における大気中多環芳香族炭化水素の測定 …… 秋山 和幸 長嶋 親治 337
高橋利恵子 藤谷 和正
野牛 弘

50 血液と毛髪の総水銀量について …… 二島太一郎 池田 真悟 341
多田 宇宏 野牛 弘
長崎 護

51 大気中の有機化合物の分析(第1報) …… 太田 与洋 牧野 国義 347
塩素系有機溶剤について 溝口 勲

52 光化学スモッグによる眼刺激作用の実験的研究(第2報) …… 牧野 国義 溝口 勲 355
佐藤 泰仁 大沢 誠喜
福田 雅夫 野牛 弘

53 都内大気中の炭化水素及び塩素系有機溶剤について …… 溝口 勲 佐藤 泰仁 371
牧野 国義 野牛 弘

54 鉛のラット学習能力に及ぼす影響 …… 関 比呂伸 前田ヒロ子 381
大井 玄 野牛 弘

55 DDTのマウス液性免疫機構への影響 …… 瀬戸 博 大井 玄 385
湯目 邦雄 福田 雅夫
野牛 弘

56 河川及び井戸水中の有機物の分析法ならびにその含有量に関する研究 第Ⅱ報 …… 森田 昌敏 中村 弘 393
三村 秀一
GC—MS法による水道水中の有機物の測定

57 河川及び井戸水中の有機物の分析法ならびにその含有量に関する研究 第Ⅲ報 …… 森田 昌敏 中村 弘 399
三村 秀一
塩素化脂肪族炭化水素による環境汚染

58 水中の極微量水銀の除去に関する研究 …… 高橋 保雄 森田 昌敏 405
山崎 堅吉 三村 秀一

59 下水処理場における PCB, PCT の汚染調査 …… 小輪瀬 勉 土屋 悦輝 411
岡本 寛 山崎 堅吉
三村 秀一

60 シアンの分析における妨害物質とその妨害機構 …… 樋口 育子 会田 朋子 417
森田 昌敏 三村 秀一

61 水道の原水に関する調査研究(第一報) …… 中村 弘 山崎 洋子 427
小笠原の父島，母島における地下水および地表水の水質 松本 浩一

62 水の臭気に関する基礎的研究(Ⅰ) …… 土屋 悦輝 …… 445
三宅島，大路池の臭気成分について

63 三宅島湖沼の陸水学的研究(1) …… 松本 淳彦 …… 453
大路池および新澪の基礎調査

64 多摩川の水質汚濁に関する研究 …… 山崎 洋子 …… 473
Ⅰ．多摩川の細菌学的試験結果について
Ⅱ．多摩川の流下物について

65 東京都立衛生研究所毒性研究用小実験動物飼育施設とその細菌学的管理成績について …… 水尾 昭江 池田 虎雄 489
平賀 興吾 新関 治男

66 東京都立衛生研究所毒性研究用犬飼育施設と犬飼育成績について …… 林田 志信 福田 向江 497
平賀 興吾

67 東京都立衛生研究所毒性研究用サル飼育施設とサル飼育成績 …… 井口 重孝 福田 向江 505
平賀 興吾

68 都衛研—毒性試験システム …… 中川 好男 福田 向江 517
市川 久次 藤井 孝
中尾 順子 平賀 興吾

69 自家製造固型飼料とそのラット飼育効率について …… 池田 虎雄 水尾 昭江 527
久保 喜一 林田 志信
小林 博義 平賀 興吾

70 急性毒性に関する研究(第2報) 亜硝酸塩（Na, K）ならびに硝酸塩（Na, K）の急性毒性の比較検討 …… 市川 久次 小林 博義 535
矢野 範男 神谷 信行
吉田 誠二 平賀 興吾

71 メトヘモグロビンを指標とした亜硝酸塩，硝酸塩毒性の比較検討 …… 伊川三枝子 市川 久次 541
小林 博義 吉田 誠二
中尾 順子 平賀 興吾

72 クロムの毒性に関する研究 72ppm六価クロムの毒性について …… 藤井 孝 坂本 義光 547
中川 好男 福森 信隆
三栗谷久敏 福田 向江
阿部 幸恵 矢野 範男
湯沢 勝広 平賀 興吾

73 毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究 Ⅰ．生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に体重について …… 福森 信隆 水尾 昭江 557
市川 久次 小林 博義
平賀 興吾

74 毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究 Ⅱ．生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に臓器重量について …… 坂本 義光 三栗谷久敏 577
矢野 範男 吉田 誠二
平賀 興吾

75 毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究 Ⅲ．生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に血清生化学的検索と血液学的検索について …… 中川 好男 福田 向江 599
柴 英子 平賀 興吾

76 毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究 Ⅳ．生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に解剖組織学的変化について …… 藤井 孝 阿部 幸恵 609
湯沢 勝広 平賀 興吾

77 Butyl Hydroxy Toluene (BHT) と Linear Alkyl Benzene sulfonate (LAS) 併用飼料で飼育のラットにみられた出血傾向の確認 …… 平賀 興吾 柴 英子 631
藤井 孝 米山 允子
坂本 義光 伊川三枝子
市川 久次 矢野 範男

78 直鎖形アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムのトロンビン阻害作用について …… 高橋 省 柴 英子 637
中尾 順子 平賀 興吾

79 脂質の系統分析法の検討と肝臓脂質分析への応用 直鎖形アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ＬＡＳ）とジブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）を同時投与したラットの場合 …… 高橋 省 …… 647

80 アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム投与のラット ……米山 允子 伊川三枝子 655
血清アルカリフォスファターゼ上昇とその臓器由来について ……中尾 順子
1) ＳＤＳ—ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析

81 ラットにおける断頭時放出する血液の凝固能について ……柴 英子…… 659

82 高級アルコール系洗剤の毒性について(Ⅰ) ……小林 博義 吉田 誠二 663
ドデシル硫酸ナトリウム(ＳＤＳ)の急性毒性

83 高級アルコール系洗剤の毒性について(Ⅱ) ……大石 真之 高橋 省 669
ドデシル硫酸ナトリウム(ＳＤＳ)の亜急性毒性 益淵 正典 福田 向江
神谷 信行 吉田 誠二
三栗谷久敏 湯沢 勝広
平賀 興吾

84 培養細胞系を用いてのＡＦ２の毒性の検討 ……川野 澄江 中尾 順子 677
平賀 興吾

85 遺伝物質に対する微量毒性物質の作用並びにその障害回復 ……金西 信次 渡部 真 685
機構の解析
(１) 細胞性粘菌における毒性解析

86 有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用 ……矢ヶ崎しげ子 原 諭吉 691
Ⅰ．能動輸送 $Na^+ \cdot K^+$—ATPase の各種標品に対するメチ 中尾 順子
ル水銀の阻害作用

87 馬腎精製イオン輸送 ATPase に対する洗剤，有機塩素剤及び……厚井 麻里 長井二三子 697
抗酸化剤の作用 中尾 順子

88 フイチン添加カドミウム食がメスラットに及ぼす影響 ……大西 和夫 関 博麿 703
伊藤 元彦

89 フレームレス原子吸光法による微量金属の測定法に関す ……笹野 英雄 押田 裕子 709
る検討 栃本 博 黒田 静夫

他誌発表 …… 719

学会発表 …… 731

著 書 …… 737

東京都立衛生研究所研究年報の投稿について …… 739

CONTENTS

REPORTS

1 Surveys on Distributio *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Humans and Animals, on Presence of O-agglutinins against the Organisms in Them, and on Their Contamination in Foods……HIROSHI ZEN-YOJI, SENZO SAKAI, TSUTOMU MARUYAMA AND YOSHITOKI YANAGAWA …… 1

2 Purification of Staphylococcal Enterotoxin E…… TAKESHI TERAYAMA, SUMIO YAMADA, HIDEO IGARASHI, HIROSHI USHIODA AND HIROSHI ZEN-YOJI…… 9

3 Studies on Fungal Contamination of Foodstuffs in Japan : Fungal Flora and Incidence of Toxin-producing Fungi in Green Tea Leaves Marketing in Tokyo……

HIROSHI HITOKOTO, SATOSHI MOROZUMI, TOMOAKI WAUKE, SENZO SAKAI AND HIROSHI ZEN-YOJI…… 17

4 Evaluation of a Modified Micro-hemagglutination Assay for Treponema pallidum Antibodies……IWAO MURATA, MIKIO HORI, SADAO MIYAZAWA, TAKAKO KANOH AND NOBUO OHKUBO……23

5 Evaluation of Bacitracin-sensitivity test for the screening of group A streptcocci……
YOSHIKATSU KASHIWAGI, MINORU SHIBATA, SHIGEKO TOKUE, YOHKO TOMINAGA, NOBUO OHKUBO AND TATSU IIMURA ……29

6 Studies on Antibiotics Susceptibility of Streptococci Isolated from the Patients of Scarlet Fever in 1973 …… MINORU SHIBATA, YOSHIKATSU KASHIWAGI, SHIGEKO TOKUE, YOHKO TOMINAGA AND NOBUO OHKUBO ……35

7 Epidemiological Survey on Enterovirus Infection (VI) Virus Isolation Made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1973……KENJI IWASAKI, YASUKO YANAGISAWA, KAZUYOSHI YANO, KIYOSHI YAMAZAKI, FUJIKO SAKAI, KIYOSHI YABUUCHI AND NAOMITSU NEZU ……41

8 Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants of Tokyo in 1973…
YASUKO YANAGISAWA, KIYOSHI YABUUCHI, FUJIKO SAKAI, TADAHIKO ITO AND KENJI IWASAKI ……47

9 Ecological Survey of Japanese Encephalitis Virus in Tokyo in 1973 ……
KIYOSHI YABUUCHI, FUJIKO SAKAI, TADAHIKO ITO, KENJI IWASAKI, NAOMITSU NEZU, KENYA WATANABE, MASAHIKO KINOSHITA, SEIICHIRO NAGANO AND TAKAO KATO……53

10 Studies on Influenza in Tokyo, in the Period from September 1973 to April 1974……
FUJIKO SAKAI, TADAHIKO ITO, KIYOSHI YABUUCHI, KENJI IWASAKI AND NAOMITSU NEZU ……59

11 Antigenic Analysis of B Type Influenza Virus Isolated in 1973 ……FUJIKO SAKAI, TADAHIKO ITO, KIYOSHI YABUUCHI, KENJI IWASAKI AND NAOMITSU NEZU……65

12 Incidence of Antibody against BK Virus among Tokyoites and Animals in Tokyo…… KENJI IWASAKI, KAZUYOSHI YANO, YASUKO YANAGISAWA, KIYOSHI YAMAZAKI AND FUMIAKI TAGUCHI……69

13 Incidence of Antibodies against Rhino Viruses in Tokyoites in 1973…… KENJI IWASAKI AND KAZUYOSHI YANO……73

14 On the Quality of Medical Medicines (III) Co-Carboxylbase Injectiones…… EIICHI TAKUBO, SUTEMI SHIGEOKA, NORIE MIYATAKE AND SHIN-ICHI UEHARA……85

15 Studies on Examination of Crude Drugs (V) Consideration on Essential Oil of Crude Drug Zhu by TLC and GC…… YOICHI NISHIKAWA, YOHYA WATANABE AND TAKANO SETO……93

16 Studies on the Evaluation of Crude Drugs (III)
The Quality of Commercial Crude Drugs……YOICHI NISHIKAWA, YOHYA WATANABE AND TAKAKO SETO …… 103

17 Studies on Examination Method of Household-necessities Containing Poisonous Chemical Substances (II)
Determination of Formaldehyde in Commercial Underwears for Ladies and Infants (2) …… TAKETOSHI YOSHIHARA, CHIYOMI OKUMOTO, KIYOSHI TERASHIMA, MACHIKO NAGASHIMA, ITSUO TOYAMA AND YOICHI NISHIKAWA …… 111

18 Studies on Fluorescence Reaction for Organic Halogen Compounds (II)
Investigation on *in situ* Fluorimetry of Polychlorinated Biphenyls and Their Isomers on Thin-Layer Chromatograms Using Diphenylamine……TADAHIKO UETA, KUNIHIRO KAMATA, TERUO KAN, MASAYOSHI KAZAMA AND TETSUYA TOTANI…… 115

19 Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (II)
Polychlorinated Biphenyls Content of Foods ……HIDEO YAMANOBE, EIKO AMAKAWA, SUKEJI SUZUKI, SEITARO KOIZUMI AND TETSUYA TOTANI …… 119

20 Hygienic Chemical Studies on Harmful Elements (V)
Contents of Heavy Metals in Vegetables and Fruits ……TAKASHI AMEMIYA, KOICHI ITO, RITSUKO YAMAZOE, HIROFUMI HARADA AND TETSUYA TOTANI …… 127

21 Hygienic Chemical Studies on Harmful Elements (VI)
Determination Method of Methylmercury in Fish by Alkaline Digestion ……

MASAHIRO TAKEUCHI, KIYOHIDE EBATO, KOICHI ITO, TAKASHI AMEMIYA, HIROFUMI HARADA AND TETSUYA TOTANI..... 133

22 Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (I)
Mercury Content in Merline Fish, Shellfish and Marine Products .....
KOICHI ITO, MASAHIRO TAKEUCHI, KIYOHIDE EBATO, TAKASHI AMEMIYA, HIROFUMI HARADA AND TETSUYA TOTANI..... 141

23 Gas-Liquid Chromatographic Determination of Heat Transfer Mediumin Processed Fatty and Oily Foods by Means of Alkaline Decomposition-Florisil Column Cleanup Method .....TERUO KAN, SUKEJI SUZUKI, TADAHIKO UETA, HIDEO YAMANOBE, KUNIHIRO KAMATA AND TETSUYA TOTANI 153

24 Studies on Quantitative Determination of Alkylbenzenesulfonate by Gas Chromatography
TERUO KAN, TADAHIKO UETA, KAZUKO MIZUISHI, YOSHIAKI NAKAMURA, MASAYOSHI KAZAMA AND TETSUYA TOTANI..... 163

25 Investigation of Qualities and Properties of Cosmetics as Cause of mainly Damage to Human Skin.....KAZUKO MIZUISHI, MASAYOSHI KAZAKA, YOSHIAKI NAKAMURA, RITSUKO YAMAZOE AND TETSUYA TOTANI.....175

26 Studies on the Values of Protein-reducing Substance of Raw and Pasteurized whole Milk .....MASAO MATSUMOTO, FUMIKO MURAKAMI, KAZUE TAKEBA, HAJIME MURAKAMI AND MISAO HARUTA..... 187

27 Factors Affecting on the Bacterial Contamination on Cooked Frozen Food with Meat during Their Procession ..... YATARO KOKUBO, KYOKO IGUSA, FUJIKO UMEKI AND MISAO HARUTA..... 191

28 Residual Level of Chlorinated Hydrocarbon Insectide in Cows Milk, after the Prohibition of Their Use in Tokyo.....TATSUNORI YAMAGISHI, SYOZO HORII, KOMEKO SAKAINO, KAZUE TAKEBA, KIMI MORIMOTO AND MISAO HARUTA 197

29 Studies on Mycotoxin in Foods (5)
Analytical Procedure of T-2 Toxin and Diacetoxyscirpenol in Powdered wheat.....
YASUTA NAOI, EIJI KAZAMA, KAZUO SAITO, HITOSHI OGAWA, KIMIKO SHIMURA AND YASUO KIMURA..... 203

30 Studies on Residual ABS in Foods.....MOTOHIRO NISHIJIMA, MASAMITSU KANMURI, SHYOKO TAKAHASHI, HISASHI KAMIMURA, MITSUO NAKAZATO AND YASUO KIMURA 207

31 Studies on Heavy Metals disolved in Canned Foods (III)

Metals Fragment in Canned Foods……MOTOHIRO NISHIJIMA, MASAMITSU KANMURI, SHYOKO TAKAHASHI, HISASHI KAMIMURA MITSUO NAKAZATO, YASUO KIMURA, HIROYOSHI KOBAYASHI, TADASHI SHINOHARA AND KAZUO KOINUMA …… 213

32 DDTC-MIBK Extraction System for the Simultaneous Determination of Heavy Metals in Foods by Atomic Absorption Spectrophotometry (II)
Analysis of Manganese ……SUSUMU NISHIGAKI, YUKIHIRO TAMURA, TOSHIO MAKI, HIROSHI YAMADA, YASUHIRO SHIMAMURA AND YASUO KIMURA …… 221

33 A Rapid Method for the Determiantion of Mercury in Biological Samples …… YUKIHIRO TAMURA, TOSHIO MAKI, HIROSHI YAMADA, YASUHIRO SHIMAMURA, SUSUMU NISHIGAKI AND YASUO KIMURA …… 227

34 Studies on the Behavior of Accumulation of Trace Elements in Fishes (I)
Mercury-Selenium Correlations in Connection with Their Body Weight…… SUSUMU NISHIGAKI, YUKIHIRO TAMURA, TOSHIO MAKI, HIROSHI YAMADA, YASUHIRO SHIMAMURA, SETSUKO OCHIAI AND YASUO KIMURA …… 235

35 Studies on the Behavior of Accumulation of Trace Elements in Fishes (II)
Relation Between Body Weight and Coneentration of Copper and Zinc in Muscle of Seafishes …… SUSUMU NISHIGAKI, YUKIHIRO TAMURA, TOSHIO MAKI, HIROSHI YAMADA, YASUHIRO SHIMAMURA AND YASUO KIMURA …… 241

36 Investigation on Mercury Levels in Tuna, Marlin and Marine Products (II)
Relation Between Body Weight and Concentration of Mercury in Muscle Tissues… SUSUMU NISHIGAKI, YUKIHIRO TAMURA, TOSHIO MAKI HIROSHI YAMADA, YASUHIRO SHIMAMURA AND YASUO KIMURA …… 245

37 Determination of Fluorine Contents in Foods by means of Fluoride Electrode Method TOSHIO TOMOMATSU, JIRO SUZUKI, KUMIKO NAKAZAWA AND YASUO KIMURA …… 251

38 Studies on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (I)
Distribution of Heavy Metals in Bonito Tissue …… YASUTAKA KATSUKI, KAZUO YASUDA, KOU UEDA AND YASUO KIMURA …… 257

39 On the Detection and Determination of Caffeine in Softdrinks……AKIKO ITO NOBORU SEKIYAMA, HARUYO ISHII AND YASUO KIMURA…… 265

40 Survey of Polynulclear Aromatic Hydrocarbons (3, 4-Benzpyrene) in Food Additives
(1) Citric Acid……FUSAYOSHI ENDO, MASAKO HIROKADO, YASOMI

HANDA, KAZUE ISHII, HIROYUKI USAMI AND TERU FUJII 271

41 Studies on Metals in Cleansing Agent for Tablewares, Vegetables and Fruits.....
TETSUKO YASUNO, AYAKO ONO, SHUZO OGINO, TOSHIKO OHATA AND TERU FUJII 279

42 Residual Level of Synthetic Detergent Found of Washed Tablewares .....
YUJI WATANABE, KENICHI SATO, SETSUKO SUWA, REIKO YOSHIDA, AYAKO ONO AND TERU FUJII 283

43 Detection of Eluted Heavy Metals from Glass-Wares (Printed Glass-Tumblers) .....
YUJI WATANABE, KENICHI SATO, SETSUKO SUWA, REIKO YOSHIDA, YAYOKO SATO AND TERU FUJII 293

44 PCB, PCT and Pesticides Residues in Fish Collected from the Tama River.....
SHUNICHI FUKANO, FUSAO USHIO AND MASAO DOGUCHI..... 297

45 Some Attempt to Estimate the Total Daily Intake of Pesticide and PCB Residues and Trace Heavy Metals.....FUSAO USHIO, SHUNICHI FUKANO, KOUKO NISHIDA, TOSHIRO KANI AND MASAO DOGUCHI..... 307

46 Biochemical Studies on the prophyrins (III)
Relations between Lead Contents and the Concentration of 5-Aminolevulinic Acid, Coproporphyrin and Urobilinogen, in a Temporary Urine ..... KUNIO BUSHIMATA, SATOKO SHIMODA, KIMI OGASAWARA AND HIROSHI YAGYU 313

47 Biochemical Studies on the Porphyrins (IV)
Relations on the Lead, 5-Aminolevulinic Acid, Coproporphyrin and Urobilinogen Values in a Temporary Urine Corresponds to the Bloody Lead Values.....
KUNIO BUSHIMATA, SATOKO SHIMODA, KIMI OGASAWARA AND HIROSHI YAGYU 321

48 Studies on Air Cleaning
Efficiency of Collecting Dusts and Heavy Metals with Air Conditioning Apparatus
KIYOSHI MOROZUMI, FUMIO KANOH, MINORU AOKI AND KENGO OHSHIRO 331

49 Gas Chromatographic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Particulates in Tokyo Air .....KAZUYUKI AKIYAMA, CHIKAHARU NAGASHIMA, RIEKO TAKAHASHI, KAZUMASA FUJITANI, HIROSHI YAGYU AND MAMORU NAGASAKI 337

50 Total Mercury Levels in Human Blood and Hair .....TAICHIRO NISHIMA, SHINGO IKEDA, TAKAHIRO TADA, HIROSHI YAGYU AND MAMORU NAGASAKI 341

51 Analysis of Organic Compounds in Air (I)

Analysis of Chlorinated Hydrocarbons ……TOMOHIRO OHTA, KUNIYOSHI MAKINO, AND ISAO MIZOGUCHI …… 347

52 Experimental Studies on Eye Irritations due to Photochemical Smog (2) KUNIYOSHI MAKINO, ISAO MIZUGUCHI, YASUHITO SATO MASANOBU OSAWA, MASAO FUKUDA AND HIROSHI YAGYU…… 355

53 On the Correlation between light and chlorinated Hydrocarbons and other pollutants in Tokyo Atmosphere……YASUHITO SATO, ISAO MIZOGUCHI, KUNIYOSHI MAKINO AND HIROSHI YAGYU…… 371

54 Effect of Lead Acetate on Learning and Memmory in Rats ……HIRONOBU SEKI, HIROKO MAEDA, GEN OHI AND HIROSHI YAGYU …… 381

55 Effect of DDT on Humoral Immune Responses in Mice …… HIROSHI SETO, GEN OHI, KUNIO YUNOME, MASAO FUKUDA AND HIROSHI YAGYU …… 385

56 An Investigation on Analytical Method and Evaluation of Organic Matters in River and Well Water (Part II) Identification of Organic Materials in Tap Water by Gaschromatography-Mass spectrometry ……MASATOSHI MORITA, HIROSHI NAKAMURA AND SHUICHI MIMURA …… 393

57 An Investigation on Analytical Method and Evaluation of Organic Matters in River and Well Water (Part III) Environmental Pollution by Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons …… MASATOSHI MORITA, HIROSHI NAKAMURA AND SHUICHI MIMURA …… 399

58 Studies on Removal Extremely Low Mercury in Water …… YASUO TAKAHASHI, MASATOSHI MORITA, KENKICHI YAMAZAKI AND SHUICHI MIMURA …… 405

59 Research on Pollution with Polychlorinated Terphenyls in Sewage Plants…… TSUTOMU KOWASE, YOSHITERU TSUCHIYA, YUTAKA OKAMOTO, KENKICHI YAMAZAKI AND SHUICHI MIMURA …… 411

60 Detailed Examination on the Interference during the Determination of Cyanide ion in Water …… YASUKO HIGUCHI, TOMOKO AIDA, MASATOSHI MORITA AND SHUICHI MIMURA …… 417

61 Studies on Raw Waters of Water Supplies (I) Chemical and Bacteriological Characterization of Surface and Subter anean Waters of the Ogasawara Islands……HIROSHI NAKAMURA, YOKO YAMAZAKI AND KOICHI MATSUMOTO …… 427

62 The Basic Research on the Causes of Odors in the Water (I) Studies on Odorous Materials in the Water of the Pond of Tairo at Miyakejima … YOSHITERU TSUCHIYA …… 445

63 Limological Studies on the Lake of Miyake Island (I)
Fundamental Investigation of Two Lakes, Tairo and Shinmyo ····· ATSUHIKO MATSUMOTO ····· 453

64 Studies on the Water Pollution of the Tama River
I On the Result of the Bacteriogical Examination of the Tama River
II On the Drift in the Tama River
YOKO YAMAZAKI ····· 473

65 New Housing Facilities for Laboratory Animals and Control of Bacterial Environment AKIE MIZUO, TORAO IKEDA, KOGO HIRAGA AND HARUO NIIZEKI ····· 489

66 New Housing Facilities for Dogs and the Management Results·····SHINOBU HAYASHIDA, HISAE FUKUDA AND KOGO HIRAGA ····· 497

67 New Housing Facilities for Monkeys and the Management Results ····· SHIGETAKA IGUCHI, HISAE FUKUDA AND KOGO HIRAGA····· 505

68 Computer System used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health·····YOSHIO NAKAGAWA, HISAE FUKUDA, HISATSUGU ICHIKAWA, TAKASHI FUJII, TOSHIKO NAKAO AND KOGO HIRAGA ····· 517

69 Effects of our Laboratory Made Pelleted Foods on Growth in Rats ····· TARO IKEDA, AKIE MIZUO, YOSHIKAZU KUBO, SHINOBU HAYASHIDA, HIROYOSHI KOBAYASHI AND KOGO HIRAGA····· 527

70 Studies on Acute Toxicities (II)
Comparison of Acute Toxicities of Nitrites (Na, K) and Nitrates (Na, K) ····· HISATSUGU ICHIKAWA,HIROYOSHI KOBAYASHI,NORIO YANO, NOBUYUKI KAMIYA, SEIJI YOSHIDA AND KOGO HIRAGA····· 535

71 Methemoglobin Formation and the Toxicity of Sodium Nitrite, Potassium Nitrite, Sodium Nitrate and Potassium Nitrate ····· MIEKO IKAWA, HISATSUGU ICHIKAWA, HIROYOSHI KOBAYASHI, SEIJI YOSHIDA, TOSHIKO NAKAO AND KOGO HIRAGA ····· 541

72 Toxicological Studies of Chromium
Toxicity Test of 72 ppm Chromiun (VI) Solution ····· TAKASHI FUJII, YOSHIMITSU SAKAMOTO, YOSHIO NAKAGAWA, NOBUTAKA FUKUMORI, HISATOSHI MIKURIYA, HISAE FUKUDA, YUKIE ABE, NORIO YANO, KATSUHIRO YUZAWA AND KOGO HIRAGA··· 547

73 Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches
I. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with

Special Reference to Body weight Changes ..... NOBUTAKA FUKUMORI, AKIE MIZUO, HISATSUGU ICHIKAWA HIROSHI KOBAYASHI AND KOGO HIRAGA 557

74 Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches
II. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Organ Weight Changes.....YOSHIMITSU SAKAMOTO, HISATOSHI MIKURIYA, NORIO YANO, SEIJI YOSHIDA AND KOGO HIRAGA 577

75 Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches
III. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Serum Biochemical and Hematological Examinations ..... YOSHIO NAKAGAWA, HISAE FUKUDA, HIDEKO SHIBA AND KOGO HIRAGA 577

76 Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches
IV. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Anatomical and Histological Changes ..... TAKASHI FUJII, YUKIE ABE, KATSUHIRO YUZAWA AND KOGO HIRAGA..... 609

77 Confirmation of Haemorrhagic Tendency in Rat fed Butyl Hydroxy Toluene and Linear Alkylbenzene Sulfonate in the Die t..... KOGO HIRAGA, HIDEKO SHIBA, TAKASHI FUJII, MASAKO YONEYAMA, YOSHIMITSU SAKAMOTO, MIEKO IKAWA, HISATSUGU ICHIKAWA AND NORIO YANO..... 631

78 Inhibition of Thrombin by Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS).....OSAMU TAKAHASHI, HIDEKO SHIBA, TOSHIO NAKAO AND KOGO HIRAGA..... 637

79 Studies on Systematic Analysis of Liver Lipids
Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and Butylated Hydroxy Toluene (BHT) on Hepatic Lipids in Rats ..... OSAMU TAKAHASHI..... 647

80 Origins of Increased Serum Alkaline Phosphatase in Rats fed on Alkylbenzene Sulfonates
1) Analysis by SDS-polyacrylamide-gel Electrophoresis ..... MASAKO YONEYAMA, MIEKO IKAWA AND TOSHIKO NAKAO..... 655

81 Coagulation Facility of Blood Collected by Beheading in Rats ..... HIDEKO SHIBA..... 659

82 On the Toxicity of the Higher Alcoholic Detergents (I)

Acute Toxicity of Sodum Dodecyl Sulfate ..... HIROYOSHI KOBAYASHI AND SEIJI YOSHIDA 663

83 On the Toxicity of the Higher Alcoholic Detergents (II)
Subacute Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate ..... SHINSHI OISHI, OSAMU TAKAHASHI, MASANORI MASUBUCHI, HISAE FUKUDA, NOBUYUKI KAMIYA, SEIJI YOSHIDA, HISATOSHI MIKURIYA, KATSUHIRO YUZAWA AND KOGO HIRAGA 669

84 Investigation of Cytotoxicity of AF-2 Using HeLa S 3 Cells in Culture ..... SUMIE KAWANO, TOSHIKO NAKAO AND KOGO HIRAGA 677

85 Analysis of Micro-toxicant Damages on Genetic Substances
(I) Analyses in Cellular Slime Mold ..... NOBUJI KANANISHI AND MAKOTO WATANABE 685

86 Effects of Organicmercury Compounds on Cell Membrans
I. Inhibition of Several Preparations of Active Cation Transport ATPase SHIGEKO YAGASAKI, YUKICHI HARA AND TOSHIKO NAKAO 691

87 Effects of Detergents, Chlorinated Hydrocarbons and Antioxidant on Purified Horse Kidney Active Cation Transport ATPase ..... MARI KOI, FUMIKO NAGAI AND TOSHIKO NAKAO 697

88 Effet of Administration Phytin and Cadmium on the Female Rats ..... KAZUO OHNISHI, HIROMARO SEKI AND MOTOHIKO ITO 703

89 Detecting a Trace of Metals by Atmic Absorption Spectrometry using a Graphite Furnace Atomizer ..... HIDEO SASANO HIROKO OSHIDA HIROSHI TOCHIMOTO AND SHIZUO KURODA 709

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS 719

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS 731

BOOKS 737

報　　文

REPORTS

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 1 — 7, 1974

Yersinia enterocolitica および *Yersinia pseudotuberculosis* のヒト，動物における分布とその抗体保有，ならびに食品汚染状況の検討について

善養寺 浩* 坂井千三* 丸山 務*
柳川義勢*

Surveys on Distribution of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Humans and Animals, on Presence of O-agglutinins against the Organisms in Them, and on Their Contamination in Foods

HIROSHI ZEN-YOJI*, SENZO SAKAI*, TSUTOMU MARUYAMA*
AND YOSHITOKI YANAGAWA*

Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* were made on a total of 65,165 specimens, consisting of 58,992 human feces, 2,609 intestinal contents of animals and fishes, 2,646 minced meat and shellfish, and 988 mesenteric lymphnodes of animals. In addition to this, 1.537 human and animal sera were studied for the presence of their specific agglutination antibodies.

Consequently, 6 (0.01%) out of 58,922 healthy human feces had harbored *Y. enterocolitica*, and 3 of the isolates were typed as O 6, 2 as O 7, and 1 as O 10 groups respectively.

It was also found that the bacterium was present in 220 (12.2%) of 1,796 ileocecal contents and 5 (0.5%) of 917 mesentric lyphnodes of swine. Predeminant O groups of the swine isolates were O 3, O 12 and O 5B. On the other hand, 41 strains (2.3%) of *Y. pseudotuberculosis* were isolated from 1,796 ileocaecal contents of swine and most of them were found to be type III organisms. Specific O-antibodies against *Y.enterocolitica* O 3, O 5 and O 9, most prevalent in humans as important causative serotypes, were not detected in a total of 1,573 serum specimens, consisting of 603 from humans, 790 from swine, 70 from cattle and 74 from rabbits, with exception of 3 positive humen cases, i. e. 1 : 40 in 2 cases and 1 : 160 in the remaining.

近年，諸外国で，*Yersinia enterocolitica*（以下Y. e）によるヒトの感染症例が数多く報告され，その病像も当初強調されていた虫垂炎，腸間膜リンパ節炎ばかりでなく，敗血症，下痢症，あるいは関節炎など多彩であることが，次第に明らかにされつつある[1]．

わが国では，1972年，Zen-Yoji & Maruyama[2]によって，わが国におけるはじめての本菌感染症例が明らかにされ，この中で，著者らは本菌が，虫垂炎，幼小児の下痢，腸炎の重要な起因菌であることを指摘した．この報告が契機となって，その後いくつかの散発例[3)4)]と，さらに，これに引き続いて食中毒様の集団発生例[5)6)]も相次いで確認されるにおよび，本菌は，臨床，公衆衛生の両分野にわたって注目されてきた．

しかし，本菌感染症の感染源および感染経路は，これまでに報告された4例の集団例でも明らかにされず，また，系統的な本菌の生態学的研究も十分行なわれていない．

私どもは，本菌感染症の感染予防の立場から，まず，健康人，各種動物，市販食品などにおける，保菌および汚染実態を明らかにすることを目的として，これらから本菌の分離を試みた．さらに本菌に対する血中抗体の保有状況を，健康人，ブタ，ウシおよび，ウサギについて実施した．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1 *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の菌検索および抗体価測定を実施した検体とその陽性数

調査対象	数	期間 (年, 月)	陽性数 Y.e(%)	陽性数 Y.ptb(%)
健康成人ふん便	58,254	1971,7～1972,7	0	0
健康新生児ふん便	402	1971, 8	0	0
と畜場従業者ふん便	266	1973,10	6(2.3)	0
ブタ回盲部内容物(A)	798	1972, 8	67(8.4)	14(1.8)
ブタ回盲部内容物(B)	998	1973, 2	153(15.3)	27(2.7)
ブタ腸間膜リンパ節	791	1972, 8	5(0.5)	0
幼豚ふん便	120	1973, 3	3(2.5)	0
ウシ回盲部内容物	200	1972, 9	0	0
ウシ腸間膜リンパ節	197	1972, 9	0	0
ネズミ回盲部内容物	165	1973, 3～6	58(35.2)	0
家兎ふん便	74	1973, 3～10	0	0
野兎ふん便	31	1974, 2	0	0
川魚腸管内容物	223	1972, 8～9	16(7.2)	0
市販食肉	532	1972,10～11	0	0
生カキ	2,114	1972,3～1973,3	0	0
計	65,165			
血清				
ヒト	603	1972, 3～8		
ブタ	790	1972, 8		
ウシ	70	1972, 9		
家兎	74	1973, 3～10		
計	1,537			

また，Y.eと共にヒトに対して同様の起病性をもつといわれる同属の *Y. pseudotuberculosis* (以下 Y.ptb) についても，同時に検討を行なった．

材料および方法

1) **被検材料：** Y.eおよび，Y.ptbの検索を行なった材料の種類と数，採取期間は，表1に示したとおりである．

ヒトふん便のうち，健康成人は，当研究所に赤痢菌およびサルモネラの保菌者検索用に搬入されたものである．新生児は，都立某病院で出生した健康者から直接採便したものである．と畜場従業者は都内4か所のと畜場に勤務する，と畜検査員，解体作業員，およびと畜納入業者を含めた健康成人で，いずれも既知腸管系病原菌が陰性のものである．

ブタの回盲部内容物および腸間膜リンパ節と，ウシの回盲部内容物および腸間膜リンパ節は，都内某と畜場に食用として搬入された動物の解体時に採取したものであり，ブタの回盲部内容物については，夏期と冬期の2回に分けて実施した．幼豚は，埼玉県下の6か所の養豚場で，いずれも出生後2か月以内のものについて直接採便した．

ネズミは，ブタ，ウシについて菌検索を行ったと畜場内で捕獲された，ドブネズミで，川魚は，多摩川中流で捕獲された，コイ，フナ，ハヤ，カジカなどである．

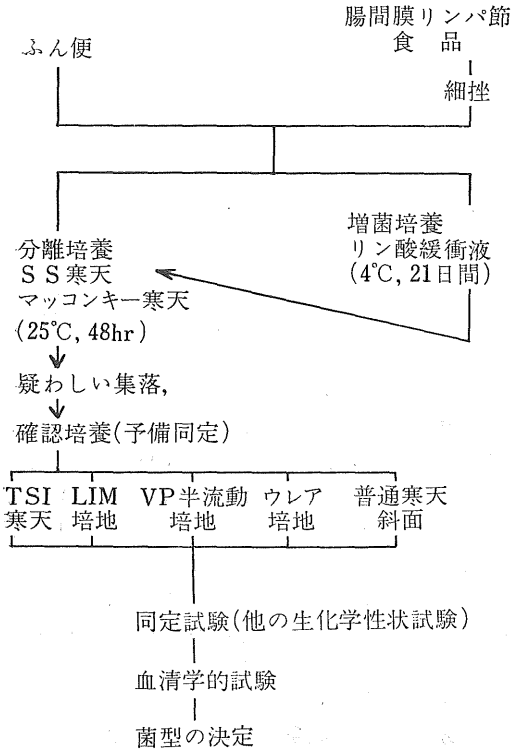
家兎は，当研究所に実験動物用として購入されたもので，購入直後に採取したもの，また，ノウサギは，富士山麓2合目附近一帯で，それぞれ異なった地点で採取したふん便である．

カキは，東京築地市場に入荷した，主に広島産のむきみカキで，カキの規格規準試験に供されたものの一部である．食肉は，都内の食肉販売店から収去されたブタひき肉250件，ウシひき肉75件，鶏ひき肉38件，ブタとウシのあいびき肉163件である．

血中抗体価の測定に用いた血清のうち，ヒトは，ワッセルマン試験用として当研究所に搬入された健康成人のものであり，ブタおよびウシは，菌検索のための回盲部内容物などと同時に採取されたものである．家兎は，菌検索を行なった同一個体の74件で，購入してから2日以内に採血した．

2) **各種材料からの Y. e と Y. ptb の分離同定方法：** Y.eおよびY. ptbの分離，同定は，図1に示す方法に従って行なった．直接塗抹培養には，SS寒天とマッコンキー寒天を併用した．多くの検体は，$^1/_{15}$M

図 1



リン酸緩衝液 (pH7.6) で4 °C, 21日間の増菌培養を行なつた.

両菌種の鑑別は, V-P 試験, オルニチン脱炭酸試験, 白糖, ラムノースおよび, メリビオース分解能試験によって行ない[7], それぞれの菌種を同定した. Y.e の生物型は Wauters の分類[8] に従った. Y.e の O抗原型は, O 1からO 34までの, また, Y.ptbの菌型は type Ⅰから Ⅵまでの, それぞれ自家調製した家兎免疫血清を用いて, スライド凝集反応によって決定した.

3) **薬剤感受性試験**: SM. CP. TC. KM. AB-PC の5剤について寒天平板定量希釈法により行ない, 最少発育阻止濃度 (MIC) によって表わした.

4) **血中抗体価の測定**: ヒト, ブタ, ウシおよび, ウサギの血清は, 血清分離後いずれも56° C 30分間非働化を行なった. Y.e は O 1から O 17まで, Y.ptb は type Ⅰから Ⅴまでの, それぞれ121° C 2時間半加熱死菌を抗原として, 試験管内定量凝集試験を行なった. 52° C の, 浴槽で1夜反応後, 明瞭な凝集塊が認められた最高希釈倍数をその凝集素価とした.

成　績

1) **Ye. および Y.ptb の検出と分離株の O 抗原型, 血清型**: 各種材料からの Y.e および, Y.ptb の検出率を表1に, また, 分離株のうち, Y.e の O抗原型および生物型と, Y.ptb の血清型を表2に示した.

Y.e は, と畜場従業者ふん便266件中, 6件(2.3%)から分離され, そのO抗原型は, それぞれ O 6が3件, O 7が2件, O 10が1件であった.

ブタ回盲部内容物における本菌の検出率は, 夏期で8.4%, 冬期で15.3%であった. これら分離株の O抗原型は O 3, O 5, O 6, O 7, O 12と, 既知O抗原型に該当しないUT株である. 最も高頻度に検出された型は, 夏期, 冬期ともO 3で, 次いでO 12, O 5の順であった.

幼豚は, 120件中3件(2.5%)陽性であり, そのO抗原型は O 3　1件, UT　2件であった.

ブタ腸間膜リンパ節からも本菌は分離され, 917件中陽性は5件(0.5%)であり, O 3が4件, O 5が1件であった.

ネズミ回盲部内容物では, Y.e の陽性数は, 165件中58件(35.2%)であった. 分離株は, 9O抗原型にわたっており, その内, 高頻度検出菌型は, O 6, O 7, O 5であった.

川魚の腸管内容物 223 件からは, 16件(7.2%) で, O 4が11件, 残り5件は, いずれも, O 1からO 34ま

表2　ヒト, 動物からの *Y.enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の分離と分離株の血清型, 生物型

調査対象	数	*Y.enterocolitica* Y.e 陽性 (陽性率)	O 群 生物型	3 4	4 1	5 1	5 2	6 1	7 1	7 3	9 1	10 1	12 2	14 1	16 1	25 1	UT 1	*Y. pseudotuberculosis* Y.ptb陽性 (陽性率)	血清型 Ⅰ	Ⅲ	UT
と畜場従業者ふん便	266	6(2.3)						3	2			1									
ブタ回盲部内容物(A)	798	67(8.4)		54			10	1									3	14(1.8)		14	
ブタ回盲部内容物(B)	998	153(15.3)		79		4	12	4	3				51				5	27(2.7)	2	24	1
ブタ腸間膜リンパ節	917	5(0.5)		4			1														
幼豚ふん便	120	3(2.5)		1													2				
ネズミ回盲部内容物	165	58(35.2)				10		25	16	1	1			3	2	5	13				
川魚腸管内容物	223	16(7.2)			11												5				

でに該当しない UT 株であった.

Y.ptb は，ブタの回盲部内容物のみから分離され，夏期で793件中14件(1.8%)，冬期で，998件中27件(2.3%)であった．分離株の菌型のほとんどが，type Ⅲ (92.7%)であり，type Ⅰが2件，既知抗原型に該当しない UT 株が1株あった.

表3 同一検体からの異なる菌種，O抗原型検出状況（ブタ）

	菌種，抗原型	例数
ブタ回盲部内容物(A)	Y.e O 3, Y.e O 5	1
	Y.e O 3, Y.ptb Ⅲ	5
ブタ回盲部内容物(B)	Y.e O 3, Y.e O 7	1
	Y.e O 3, Y.e O 12	1
	Y.e O 5, Y.e O 12	3
	Y.e O 3, Y.ptb Ⅲ	1
	Y.e O 12, Y.ptb Ⅲ	1

表4 同一検体から異なるO抗原の検出状況（ネズミ）

抗原型	例数
O 5, O 6, O 7	1
O 5, O 6, O 25	1
O 5, O 7, O 25	1
O 5, O 7, UT	1
O 5, O 6	1
O 5, O 7	1
O 5, UT	1
O 6, O 7	2
O 6, O 9	1
O 6, O 14	1
O 6, UT	2
O 16, UT	1
計	14

ブタ回盲部内容物の陽性検体のなかで，同一個体から2つの異なるO抗原，および，Ye. とY.ptb を同時に検出したものが合計13例あり(表3)，ネズミ回盲部内容物では，2菌型以上のY.e を検出したものが14例あった(表4).

健康成人ふん便，58,254件，健康新生児ふん便402件，ウシ回盲部内容物200件，ウシ腸間膜リンパ節197件，家兎ふん便74件，野兎ふん便31件，カキ2,114件，および生食肉，532件からは，Y.e, Y.ptb の両菌種とも分離されなかった.

2) **分離株の生物学的性状**：各種材料から分離されたY.eの生物型は表2に示した通り，O抗原型と密接な相関関係がみられた。ただ，ネズミ由来のO9は生物型1であり，O7のなかに生物型3のものが1株みられた．O5では，ネズミ由来株のすべてが5A型であったのに対し，ブタ由来株では27株中，23株が5B型であった．なお，ブタ由来株のO12は V-P反応陰性，白糖非分解，ラムノース分解のいわゆる *Y. paraenterocolitica*[9] の性状を示すものであった。

3) **分離株の薬剤感受性試験**： 無作為に抽出したブタ由来の Y.e および Y.ptb と，ネズミ由来のY.e各6株について薬剤感受性試験を行ない，その成績を表5に示した.

一般にネズミ由来の Y.e はブタ由来のそれに比較して抵抗性を示し，AB-PC にその傾向が著しかっ

表5 ブタ，ネズミ由来の *Y. enterocolitica* および，ブタ由来の *Y. pseudotuberculosis* の薬剤感受性試験

薬剤	菌種	由来	供試菌株数	MIC (μg/ml) >100	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	0.2	<0.2
SM	Y.e	ブタ	6						4	2					
	Y.e	ネズミ	6				4		2						
	Y.ptb	ブタ	6	4						2					
CP	Y.e	ブタ	6					3	3						
	Y.e	ネズミ	6				3	3							
	Y.ptb	ブタ	6							6					
TC	Y.e	ブタ	6						6						
	Y.e	ネズミ	6				2	4							
	Y.ptb	ブタ	6						1	5					
KM	Y.e	ブタ	6					2	4						
	Y.e	ネズミ	6				3	2	1						
	Y.ptb	ブタ	6							1	1	4			
AB-PC	Y.e	ブタ	6		2	3	1								
	Y.e	ネズミ	6	6											
	Y.ptb	ブタ	6												6

た．Y.ptb は，Y.e に比較して SM に対しては抵抗性であったが，AB-PC では全株がきわめて強い感受性であった．

4) ヒト，動物における Y.e および Yptb に対する抗体保有状況：　健康なヒト，ブタ，ウシおよび家兎における Y.e と Y.ptb の抗体保有状況を，1：40以

表6　ヒトおよび各種動物における *Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* の抗体保有状況

検体（調査年月）	検体数	O凝集素価＞1：40陽性数（%）	
		Y. enterocolitica	*Y. pseudotuberculosis*
ヒト(1972, 3～ 8)	603	4 (0.7)	3 (0.5)
ブタ(1972, 8～ 9)	790	26 (3.3)	3 (0.4)
ウシ(1972, 8～ 9)	70	0	0
ウサギ(1973, 3～10)	74	0	0

表7　ヒトにおける *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の抗体保有状況

O凝集素価	*Y.enterocolitica*						*Y.pseudotuberculosis*	
	O 1	O 2	O 3	O 14	O 15	O 16	I	IV
1： 40	1	1	2				1	
1： 80				1				
1：160			1		1	1		1
1：320							1	
1：640					1			
	1	1	3	1	2	1	2	1

表8　ブタにおける *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* の抗体保有状況

O凝集素価	*Y. enterocolitica*									*Y. pseudotuberculosis*	
	O 1	O 2	O 3	O 4	O 7	O 11	O 12	O 15	O 16	I	II
1： 40	1	1	1		1	1		8	1	1	1
1： 80			1			1	1	4			1
1：160			1	1				1			
1：320								1			
1：640				1			1	3			
	1	1	3	2	1	2	2	17	1	1	2

上のO凝集素価を陽性として，表6に表わした．さらに，それぞれの陽性検体は，定量試験を行ない，表7にヒト，表8にブタの成績を示した。

ヒトにおける Y.e に対する抗体保有は，603例中4例(0.7%)であり，O 3に対しては1：40が2例，1：160 が1例であった。しかしこの3例も含めて，陽性の4例はいずれも，2種以上のO抗原型に類属反応がみられた．

同様にブタにおける Y.e の抗体保有は790例中26例(3.3%) であったが，このうち4例は2種の O抗原型に類属反応がみられた。

考　察

Y. enterocolitica はこれまでにヒト，各種動物，河川水などから数多く分離されており，その由来とO抗原型，生物型との間には密接な相関々係のあることが知られている[8) 10)]。ヒトの患者材料から分離される株はそのほとんどがO抗原型3で，ほかに O 9，5，8など特定の型に限定されている．

Y.e の自然界における分布と本菌感染症の汚染源の追求を目的とした本研究は，その実態の一部を解明し得たものと思われる．

すなわち，ヒトにおける本菌の分布は，一般健康成人，新生児からは1例も検出されなかったこと，また，特殊な集団であると畜場従業者からは2.3%に本菌が検出されたが，そのO抗原型はいずれもヒト由来株のそれとは異なっていたことから，　Y.e の特に起病性の高い菌株の健康人における保菌はきわめて低いものと思われる．

一方，Y.e 感染症では血中抗体価の 著明な上昇とその長期間の持続がしばしばみられることが指摘されている[10)11)]が，今回の抗体価測定で，O 3 に対する40倍以上の値が数例にみられたことは，潜在患者の存在を示唆するものであろう．ただ，他のO抗原型に対する高い抗体価の保有，特に O 15 に対するそれは，

ヒト，ブタともに他の型への類属反応がみられ，Y.e O 15に対する特異的反応であるか否か明らかではなかった．この点は，本菌の血清学的特異性について今後さらに検討された後に解決されるべきものと思われる．

ブタにおける本菌の保菌率は高く，しかも分離株の主要O抗原型がO3，O 5Bであったことは，ヒト感染症との関連を強く示唆するものである．この成績は，季節，集団によって，また，成豚に比較して幼豚では検出率，検出菌型に多少の差異も認められるが，その分離株の主要O抗原型はヒト患者材料から最もしばしば分離されるO3であることが特徴である．ブタからの分離株の多くがO3であることは，すでにWinblad[9]によって報告され，またこの事実からブタとヒト感染症との関連を指摘する報告[12)13)14)15)]もすでにみられるように，Y.eの検出率よりも，検出菌型の特徴が重要である．今回の成績でもヒトに対する病原性と深い関連があるといわれるO3で生物型4のもの，およびO5Bで生物型2のものがブタからのみ高率に検出されたことは，ブタがヒトにおける本菌感染症の重要な汚染源であると結論されよう．

ただ，ブタについては，こうした高い保菌がみられる一方，本菌に対する血中抗体の保有率は低く，特にO3に対する高凝集素価は認められなかった．また腸管における高い保菌がみられるにもかかわらず，腸間膜リンパ節からの菌分離率は低く，さらにそれら腸間膜リンパ節および腸管には何ら異常を認めることはできなかった．したがって，ブタにおける本菌の保有は，一時通過菌として存在する可能性が高い。しかし，正常菌叢の一つとして存在している可能性も考慮されよう．

ネズミにおけるY.eの保菌は他の動物に比較してきわめて高率であり，検出菌型も極めて多彩であった．しかし分離株のO抗原型はヒト患者由来株のそれとは全く異なり，両者の間に関連性を見出すことはできない．このネズミにおける今回の知見は，と場内という限られた条件下での成績であるが，他に市街地域内[16)]あるいは最近著者らが行なった動物園内で補獲されたものについても，全く同様の傾向が得られている．

川魚については，ブタ，ネズミに比較してその検出率も低く，検出O抗原型に片寄りがみられた。

以上の成績に加えて，イヌ[17)]，サル[18)19)20)]，シカ[20)]ノウサギ[21)]その他の動物[22)]などから，あるいは河川水，井戸水[2)23)]などからも本菌分離の報告がある．したがって，本菌そのものは，自然界に広く分布しており，その動物あるいは環境固有の菌型を保有しているものと推察される．

ブタの高率保菌の成績から食肉への汚染を推定して行なった市販生食肉の成績は，今回は全例陰性であった．しかしながら，生ひき肉という細菌汚染度の高い食品，また河川水，下水など本菌種と栄養要求あるいは発育態度を同じくする類縁の菌に高度に汚染された材料からの本菌の分離は適当な撰択分離培地，増菌培地のない現在，きわめて困難である．これまで本菌感染症，特に集団発生に際してもその汚染源，感染経路を証明でき得なかったことは，こうした本菌分離のための技術的な不完全さが大きく影響していたものと思われる．Y.ptbも含めた両菌種の撰択増菌培地の開発が早急に望まれるところである．

ただ私共は，別の機会にブタひき肉からY.eO5Bをすでに分離しており，また同様に浅川ら[24)]の報告にみられるように，ブタでの保菌に引続いて食肉への汚染は確実である．この事実は本菌が4°C以下の低温でもよく発育，増殖すること[25)]を考えあわせるならば，長期間低温保存する生食肉の危険性は大きいといわねばならない．感染経路のなかで，このことは今後十分考慮する必要があろう．

わが国におけるY.ptb感染症はY.eのそれに比較して少なく，これまでに数例の報告があるに過ぎない[26)27)]．しかし，諸外国では数多くの報告例があり，[28)29)]，私どもも最近2例の下痢症を確認している（未発表）．本菌がブタ回盲部内容物のみから比較的高率に検出できたことはブタが汚染源として重要であり，Y.e同様今後注目しなければならないと思われる．

結　論

Y. enterocolitica および *Y. pseudotuberculosis* の自然界における分布と，ヒト感染症に関連のあの両菌種の汚染源を明らかにする目的で，健康人，各種動物，食品など計65,165件から両菌の分離を試み，また，ヒトおよび各種動物の血清1,537件について両菌種に対する抗体価の測定を行なった結果，下記の結論を得た．

Y. enterocolitica は新生児も含めた健康人ふん便58,922件中，6件（0.01%）から分離され，分離株のO抗原型は6，7および10であった．ブタ回盲部内容物では1,796件中220件（12.2%），ブタ腸間膜リンパ節では917件中5件（0.5%）でその高頻度検出O抗原型は3，12，5Bであった．ネズミおよび川魚での保菌率はそれぞれ35.2%，7.2%であったが，ヒト患者

由来株に一致する抗原型は1例も検出されなかった．ウシ，家兎，野兎および市販食品からは全く検出されなかった．

Y. pseudotuberculosis はブタ回盲部内容物のみから，2.3%に検出され，その主要菌型はtype Ⅲであった．

ヒト，動物における両菌種に対する抗体保有は，ヒトおよびブタのみに若干みられたが，本菌感染症を示唆する高い凝集素価ではなかった．

謝　辞

本研究にあたり，検体採取に御協力いただいた多摩食肉衛生検査所加藤孝雄所長，ならびに関係各位に心からの謝意を表します．

（「附記」本研究は，昭和48年度当研究所研究課題「*Yersinia enterocolitica* の細菌学的，疫学的研究」として実施したものである．）

文　献

1) Mollaret, H.H. : *Ann. Biol. Clin.*, 30, 1-6 (1972)
2) Zen-yoji, H. and Maruyama, T. : *Japan. J. Microbiol.*, 16, 493-500(1972)
3) 今川八束，吉田律子，丸山　務，善養寺浩，：感染症学雑誌，46，435-436(1972)
4) 池村謙吾，篠川　至：第48回日本伝染病学会総会，4月，(1974)，東京
5) Zen-yoji. H., Maruyama, T., Sakai S., Kimura, S., Mizuno, T. and Momose, T. : *Japan. J. Microbiol.*, 17, 220-222(1973)
6) Asakawa, Y., Akahane, S., Kagata, N., Noguchi, M., Sakazaki, R. and Tamura. K. : *J. Hyg. Camb.*, 71. 715-723(1973)
7) 丸山　務，：臨床検査，18，143—148(1974)
8) Warters. G. : *Contribution a l'étude de Yersinia enterocolitica, Univ. Cathol. de Louvain*, (1970), Vander, Louvain.
9) Winblad, S. : *Contribution to Microbiolgy and Immunology Vol. 2. Yersinia, Pasteurella and Francisella.*, 27-37(1973), Karger, Basel.
10) Ahvonen, P. : *Ann. Clin. Res.*, 4, 30-38(1972)
11) Niléhn B. and Sjöström, B. : *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 71, 612-628(1967)
12) Rabson, A. R. and Koornhof, H. J. : *S. A. Med. J.*, 46, 798-803(1972)
13) Tsubokura, M., Otsuki, K. and Itagaki, K. : *Jap. J. Vet. Sci.*, 35, 419-424(1973)
14) Esseveld, H. and Goudzwaard, C, : *Contribution to Microbiology and Immunology* vol. *2 Yersinia, Pasteurella and Francisella*, 99-101(1973), Karger, Basel.
15) Zen-yoji, H., Sakai, S., Maruyama, T. and Yanagawa, Y. : *Japan. J. Microbiol. 18*, 102-105(1974)
16) 小林一寛：私信(1974)
17) Becht, H. : *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 69, 626-627(1962)
18) Mollaret, H. H., Giorgi. W., Matera, A., Pestana de Castro, A. F. and Guillon, J. C. : *Rec. Méd. Vét.*, 146, 919-924(1970)
19) McClure, H. M., Weaver, R E. and Kaufmann, A. F. : *Lab. Anim. Sci.*, 21 376-382 (1971)
20) Otsuki, K., Tsubokura, M., Itagaki, K., Hirai, K., and Nigi, H. : *Jap. J. Vet. Sci.*, 35 447-448(1963)
21) Daniëls, J. J. H. M. : *Zbl. Vet. Med.*, 10 413-417(1963)
22) Dickinson, A. B. and Moquot, G. : *J. Appl. Bact.*, 24, 252-284(1961)
23) Lassen, J. : *Scand. J. Infect. Dis.*, 4. 125-127(1972)
24) 浅川　豊，赤羽荘資，利田直子：第30回日本細菌学会関東支部総会，11月，(1973)，東京
25) 丸山　務：日細誌，28，343—349(1973)
26) Tsubokura, M., Otsuki, K., Itagaki, K. and Matumoto, M. : *Japan. J. Microbiol.*, 17, 427-428(1973)
27) 金沢　裕，池村謙吾，篠川　至，重野直也，：第22回日本伝染病学会東日本地方会総会，10月，(1973)，東京
28) Knapp, W. : *New England. J. Med.*, 259, 776-778(1958)
29) Ahvonen, P. ; *Ann. Clin. Res.*, 4. 39-48(1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 9 — 15, 1974

ブドウ球菌エンテロトキシンEの精製および同定

寺山 武* 山田澄夫* 五十嵐英夫*
潮田 弘* 善養寺浩*

Purification of Staphylococcal Enterotoxin E

TAKESHI TERAYAMA*, SUMIO YAMADA*, HIDEO IGARASHI*,
HIROSHI USHIODA* AND HIROSHI ZEN-YOJI*

The results of purification of staphylococcal enterotoxin E reported by Bergdoll et al, indicated that the toxin E shared a part of common constituents to enterotoxin A. To examine this phenomenon, we attempted the purification of enterotoxin E.

In this experiment *Staphylococcus aureus* strain FRI 326 was grown in NZ Amine medium, and the culture filtrates were used for purification. The purification was accomplished by sequential steps of chromatography on columns of Amberlite CG-50, CM and DEAE celluloses, and gel filtration on Sephadex G-75. In immunodiffsion test, the toxin obtained gave only one line against antisera to both the crude and puritied toxins. It also gave no precipitin line against antisera to enterotoxin A, B, C, and D. When electrophorezed in polyacrylamide gel, the purified toxin gave only one clear band.

In monkey emesis test by *iv* injection, the action of the purified toxin was specificaly neutralized by antiserum against the purified one, but not by antisera to toxins A-D. From these results, it seems unlikely that enterotxoin E shares a common constituent to the molecule of the toxin A.

ブドウ球菌エンテロトキシン（以下Entと略）は本菌食中毒において，ヒトに嘔吐と下痢を起こす原因物質で，比較的熱抵抗性の単純な低分子タンパク（分子量28,000～30,000）である。現在，Entには免疫学的特異性の異なるA～Fの存在が確認されている。[1~6]

これまでに，Entの精製と型特異的抗血清の作製は多数の研究者によって試みられてきた。われわれも，すでにEnt A[8]，B[7]，C[7]，およびD[9]の精製を行ない，特異性の高いそれらの抗血清を作製してこれをブドウ球菌食中毒の疫学的，細菌学的調査に応用し，その実態解明につとめてきた。[10,11]

Ent Eは1972年にBergdoll[6,12]らによって，Ent A～Dとは異なる新らしい型のEntであるとして報告されたものであるが，その後，Ent Eを確認した報告は見られない。さらにBergdollらはEnt EがEnt Aと一部共通性を有し，相互に交差中和反応が生じると報告している。

今回，Ent Eの精製を行ない，その特異性を確認するとともに，Bergdollらによって指摘されたEnt EとEnt Aとの共通抗原の存在をより精細に検討を行なったのでその結果を報告する。

材料および方法

使用菌株

Ent E産生には，Bergdollらによって報告[6]されたEnt E産生標準株 *Staphylococcus aureus* FRI 326を用いた。この菌株はFDAのDr.Bennetより分与されたものである。

培地および培養方法

毒素産生にはKatoら[13]が報告したNZ-Amine培地を用いた。

NZ-Amine培地を1,000mlコルベンに500mlずつ分注し121C15分間高圧滅菌した。

あらかじめ，この培地にEnt E株の普通寒天培養菌の1白金耳を接種し，35C18時間培養した培養菌液を，

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第1研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japon

各コルベンに5mlずつ接種して35C24時間振盪（振巾7.2cm 110回/分）した。培養後，12,000rpm，2 l/hrの流速で連続遠心して得られた上清を出発材料とした。

Reference toxins とその抗血清

ゲル内沈降反応に用いた refrence Ent E とその抗血清はDr. Bennetより分与されたものを用いた。

reference toxins A～D とそれらの抗血清は，われわれが精製，作製したものである。

α溶血毒の測定

各精製過程における α溶血毒（以下HLと略）の力価は，各フラクションの2倍連続希釈液0.5mlに1%ウサギ血球液0.5mlを加え，37C 1時間反応後，完全溶血を示す最高希釈をもって表わした。

タンパクの測定と定量

Ent E の各精製過程におけるタンパクの測定は280 nm の紫外線吸収により，その定量は Lowry 法[14]によった。

ゲル内沈降反応

各精製過程におけるEnt Eの検出はreference抗Ent E血清を用いて Casmanのmicroslide ゲル内沈降反応[15]により行なった。

精製Ent Eの免疫学的特異性の検討は抗 Ent A～E 血清を用いてOuchterlony のゲル内沈降反応により行なった。

抗血清の調整

Ent E 精製過程の step 1 で得られた画分にホルマリンを0.1%の割合に加え，37C48時間反応後，Freund's complete adjuvant (Difco) の等量と混合し，その1 ml を1週間々隔で4回ウサギ筋肉に接種した。さらに追加免疫として，ホルマリン未処理のものを，同様に adjuvant と混合し，その 1mlを1週間々隔で4回ウサギに筋注し，最終接種の7日後に全採血して抗血清を得た。この抗血清を抗粗 Ent E 血清とした。

特異抗Ent E血清は，この精製における最終標品を Freund's complete adjvuant と等量混合し，その1 mlを1週間々隔で6回ウサギに筋注し，最終接種の7日後に全採血して得たものである。

ディスク電気泳動

Reisfield らの方法[11] により 7.5% ポリアクリルアミドゲル (pH4.3) を用いて行なった。

免疫電気泳動

0.05Mベロナール緩衝液(pH8.6，イオン強度0.05) 1%寒天 (Special agar Noble, Difco) を用いて行なった。

Ent E の催吐活性

精製Ent E 10mcgを含む毒素液 1.0ml をカニクイサル (*Macaca irus*, 体重2Kg) に静脈内接種し嘔吐発現の有無により催吐活性を判定した。

催吐活性の中和試験

精製Ent E10mcg/ml の 1.0ml と対応する抗血清および他の型の特異 Ent 抗血清の4倍希釈液 1.0ml を混合し，37C3 時間反応後，5Cに一晩放置したものをカニクイサルに静脈内接種し，嘔吐発現の有無により判定した。

実験成績

1 精製

Ent Eの精製は Schantz らの Ent A精製法[17]と五十嵐の Ent D 精製法[9] の組み合わせにより表1のごとく行なった。

Table 1 Purification procedure of entertoxin E

Culture supernatant (NZ Amine)
↓
Step Ⅰ Chromatography on Amberlite CG-50
↓
Step Ⅱ Chromatography on CM cellulose
↓
Step Ⅲ Chromatography on DEAE cellulose
↓
Step Ⅳ Rechromagotarphy on DEAE cellulose
↓
Step Ⅴ Gel filtration on Sephadex G-75

Step 1， 培養上清 20 l に精製水を80 l 加え，これをリン酸でpH5.6に修正する。この中に 0.005Mリン酸緩衝液（以下PBと略）pH5.6で平衡化した Amberlite C G 50 (2.5×45cmカラムの80%量）を加え，室温で2時間攪拌して Ent E をイオン交換体に吸着させる。Ent を吸着したイオン交換体を10倍量の精製水で3回洗滌後カラムに充てんし，クロマトグラフィーを行なうと，図1に示したごとく 0.5M NaCl 加0.5 MPB, pH6.2 で溶出する280nm 吸収の大きな画分が得られた。この画分にはゲル内沈降反応により Ent E の存在が確認された。しかし，そのほかにも HL やその他の多くの菌体由来の挟雑物が含まれていた。この画分を集めて精製水に透析し 限外沪過膜 UM10 Amicon Co.) で $^1/_{10}$ 量に濃縮後凍結乾燥した。

Step Ⅱ. step Ⅰの凍結乾燥試料を 0.01MPB, pH 5.6で溶解し，これを同一緩衝液に透析後 pH5.6 に修正した。この溶液を 0.01 MPB, pH5.6 で平衡化した CM セルロース (Carboxymethyl cellulose,Brown Co.) のカラムクロマトグラフィーにより精製した。

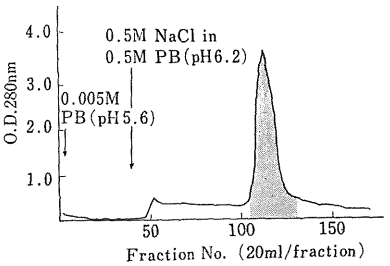


Fig. 1. Elution pattern of enterotoxin E from a column of Amberlite CG 50. Twenty liters of a staphylococcal culture supernatant was added with 80 litters of distiled water; 100 liters volum was adsorbed on Amberlite CG50 equilibrated with 0.005M phosphate buffer, pH 5.6, with starring for 2 hours. Following this, this lesin was paked in a column, 2.5 x 45 cm and chromatographed. Flow rate ; 100 ml per hr : solid line ; absorption at 280 nm : arrows ; eluant. Enterotoxin E tested by immunodiffusion test to refrence antiserum was presented in the hatched peak.

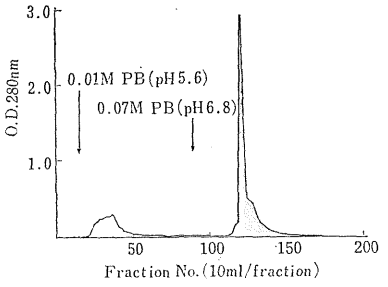


Fig. 2. Elution pattern of enterotoxin E from a column of CM cellulose. The fraction from purification step I was chromatographed on CM cellulose equilibrated with 0.01M phosphate buffer, pH 5.6 : column size ; 2.5×83 cm : flow rate ; 70 ml per hr : solid line ; absorption at 280 nm.

図2に示したごとく，大部分のタンパクは 0.07MPB pH6.8で溶出される。Ent E はこの画分に認められるが，HL もこの画分に共存しており，この step では Ent E とHLを分画することはできなかった。この画分を精製水に透析した後凍結乾燥した。

Step Ⅲ. Ent と HL を分画するためにわれわれが Ent A[8]，C[7] およびD[9] に使用したDEAEセルロース (diethylaminoethyl cellulese Brown Co.) カラムクロマトグラフィーによる精製法を Ent Eの精製に応用した。すなわち，step Ⅱの凍結乾燥試料を 0.05M グリシン緩衝液，pH9.5に溶解し，pH9.5に修正後同一緩衝液で平衡化したDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーを行なうと，図3に示したごとく2つの

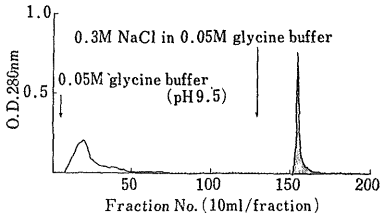


Fig. 3. Elution pattern of Enterotoxin E from a column of DEAE cellulose. The enterotoxin fraction of purification step II was chromatographed on DEAE cellulose equilibrated with 0.05 M glycine buffer, pH 9.5 : column size ; 2.5 ×90 cm : flow rate ; 70ml per hr : solid line ; absorption at 280 nm.

280nm吸収の画分に分画された。

Ent E は DEAE セルロースに吸着する画分に存在し，HL は素通りする画分に存在した。この Ent E 画分は抗粗血清に対するゲル内沈降反応で，なお3本の沈降線を形成した。

Step Ⅳ. step Ⅲの Ent E 画分を精製水に透析して脱塩後，さらに0.05Mグリシン緩衝液に透析して塩濃度を平衡にした。この溶液をpH9.5に修正したのち

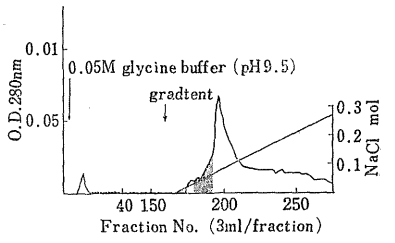


Fig. 4. Elution of enterotoxin E from rechromatography on DEAE cellulose. The entorotoxin E fraction of purification step III was chromatorgrphed on DEAE cellulose equilibrated with 0.05M glycine buffer, pH 9.5 : column size ; 1.5×30 cm : elution gradient ; from 0 to 0.3M NaCl linear gradient in 0.05M glycine buffer, pH 9.5 : flow rate ; 40 ml per hr : solid line ; absorption at 280 nm.

同一緩衝液で平衡化したDEAEセルロースにapplyし再クロストグラフィーを行なった。図4に示したごとく0Mと 0.3M NaCl 加グリシン緩衝液，pH9.5によるによる linear gradient elution により溶出すると，EntEは0.03M～0.15M NaCl 濃度で溶出する画分に認められた。この画分はゲル内沈降反応により抗粗Ent E 血清に対して1本の沈降線を形成した。この画分を集め，精製水に透析後凍結乾燥した。

Step Ⅴ. step Ⅳ の凍結乾燥試料を0.05MPB，pH 6.5に溶解し，Sephadex G-75 (Pharmacia Co.) カラムに apply しゲル沪過を行なった。その結果は図

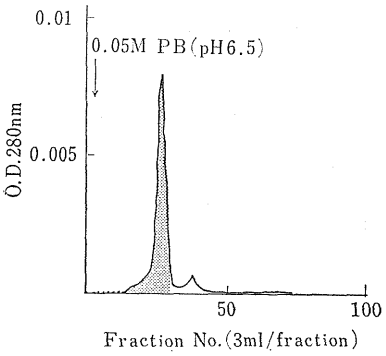


Fig. 5. Elution pattern of enterotoxin E from a column of Sephadex G 75. The enterotoxin E fraction of purification step IV was passed through a Sephadex G 75 column equilibrated with 0.05M phosphate buffer, pH 6.5 : column size ; 1.5×90 cm : gel filtration buffer ; same as the equilibrated buffer : flow rate ; 10 ml per hr : solid line ; absorption at 280 nm. Emetic activity by monkey test was presented in the hatched peak.

5に示したごとく，1つの大きなピークとそれに続く小さなピークをもつ2つの画分に分画された。Ent E は前の大きなピークに存在した。そこで，われわれはこの画分をEnt E の最終標品とした。

最終標品の催吐活性をカニクイサルへの静脈内接種により検討した結果，1mcg を投与したサルは1時間以内に典型的な嘔吐を示した。また，最終標品はこのものでウサギを免疫して得た抗血清とのゲル内沈降反応において，1 本の沈降線を形成した。さらにこの沈降線はreference Ent E とその抗血清との間に形成される沈降線と完全に融合した。これらのことから今回得た最終標品は免疫学的に単一な Ent E であることが確認された。

Ⅲ．各精製過程における免疫学的，物理学的検討

図6は各精製過程における画分と抗粗 Ent E 血清

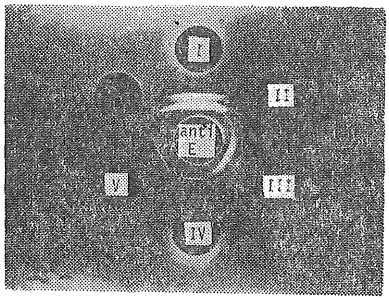


Fig. 6. Immunodiffusion test of enterotoxin E fraction of each purification step. Center well ; anti crude enterotoxin E serum. Peripheral wells I ; fraction of step I : II ; fraction of step II : III ; fraction of step III : IV; fraction of step IV : V ; fraction of step V. The plate was allowed to stand in a moist chamber at room temperature for 48 hr.

との Ouchterlony のゲル内沈降反応を行なった結果を示したものである。図から明らかなごとく，精製がすすむにつれ沈降線は漸次減少し，最終標品は1本の沈降線を形成した。さらに，各精製過程における Ent E画分を免疫電気泳動を行なうと図7に示したごとく Ouchterlony のゲル内沈降反応の場合と同様の結果が得られた。すなわち，最終標品は抗粗 Ent E 血清に対して単一な沈降線のみを形成するとともに，特異

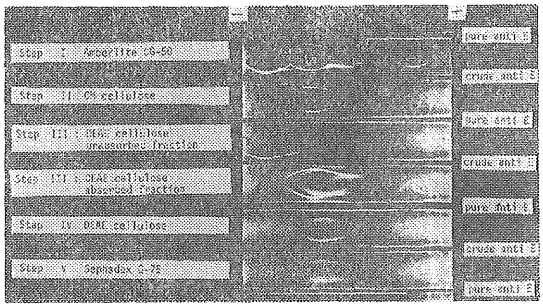


Fig. 7. Immunoelectrophoresis of enterotoxin E fraction of each purification step. Immunoelectrophresis was carried out with 1% agar in Veronal buffer (pH 8.6, ionic strength 0.05)· Samples were allowed to migrate for 2 hr with a potential drop of 5V per cm.

抗 Ent E 血清との反応においても1本の沈降線を形成した。さらに，step Ⅰ の粗毒素も特異抗 Ent E 血清との反応により1本の沈降線を形成した。

各精製過程の試料をディスク電気泳動を行なった結果を図8に示した。免疫学的検討の場合と同様に，バンド数は精製過程がすすむにしたがって減少し，最終標品は1本のバンドを形成した。

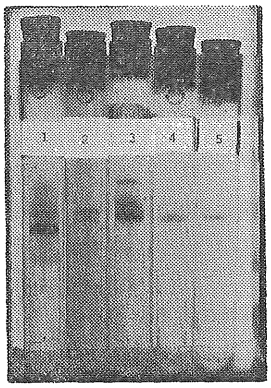


Fig. 8. Disc gel electrophoresis pattern of enterotoxin E of each purification step. The cathod for gel columns are at the bottom. Gel column 1 ; fraction of step I : 2 ; fraction of step II : 3 ; fraction of step III : 4 ; fraction of step IV : 5 ; fraction of step V. All the samples were applied to 7.5% polyaclylamid gel, pH 4.3.

以上の結果から，今回われわれが得た最終標品は免疫学的にも物理学的にも単一な高度に純化された Ent E であることが確認された。

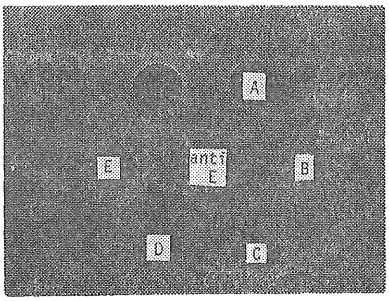


Fig. 9. Immunodiffusion test for distinction of antigenic types of enterotoxins, A-E.
As labeled,each of enterotoxin A, B, C, D, and E put in the peripheral wells at concentratoin of approximately 100 mcg/ml. A anti pure enterotoxin E serum was put in the central well. The plate was allowed to stand in a moist chamber at room temperature for 48 hr.

Ⅲ. Ent E の特異性

精製 Ent E の免疫学的特異性を検討するために，すでにわれわれが精製を行なった Ent A～D とその特異抗血清および精製 Ent E とその特異抗血清を用いて Ouchterlonyのゲル内沈降反応を行なった。その結果，図9に示したごとく精製 Ent E は抗 Ent E血清とのみ沈降線を形成し，他の既知の抗血清とは沈降線を形成しなかった。

一方，精製 Ent E の催吐活性が各型の抗 Ent血清によって中和されるかいなかを，サルへの投与実験により検討した。精製 Ent E (10mcg/ml) と既知の抗 Ent A～D 血清および今回作製した抗 Ent E 血清のおのおのと反応後，サルに静派内接種した。その結果は表Ⅱに示したように，精製 Ent E は抗 Ent E 血清によってのみ完全に中和され，供試した2頭のサルは嘔吐を示さなかった。これに対して既知の抗血清と反応した毒素を投与されたサルは，対照の無処理毒素を投与されたサルと同様に全て嘔吐を生じた。

Table Ⅱ Neurtalization of enterotxin E

Enterotoxin E (mcg/ml)	Antiserum	Emesis in monkeys
10	None	2／2
10	E	0／2
10	A	1／1
10	B	1／1
10	C	1／1
10	D	1／1

Monkeys vomitting/monkeys challenged (intravenous injection)

以上の結果から，今回われわれが得た精製標品はゲル内沈降反応および生物活性の面から単一な Ent E であることが確認された。

考　察

ブ菌 Ent の産生は型によって異なり，Ent B がもっとも産生量が多く，至適産生条件下では500mcg/ml もの毒素が産生される[13]。ついで Ent C が 30mg/ml Ent A や D は 5mcg/ml もしくはそれ以下の量しか

産生されない[18,9]。したがってEntの精製は大量に産生されるEnt Bではもっとも容易であり，この毒素についてはすでにアミノ酸配列まで明らかにされている[18]。

これに反して，産生量の少ないEnt AやDでは精製が非常に困難であり，しかも精製過程における損失も大きく，純品を大量に得ることが困難であるため，特にEnt Dにいたってはその物理化学的性状すらいまだに明らかにされていない。

Ent A, CおよびDの精製においてもっとも障害となるものは，これらのEntの産生条件において多量のHLが産生され，これまでにBergdoll一門の研究者によって報告されてきたEntの精製法では，EntとHLとを完全に分離することはできないことが五十嵐[9]によって報告されている。

今回，Ent Eの精製をBergdollら[12]の方法によって行なったが，すでにわれわれがEnt A, CおよびDで経験してきたごとく，本毒素においてもHLを分離することはできなかった。そこで，DEAEセルロースクロマトをEnt Eの精製にも応用した。その結果，このクロマトによってEntとHLを完全に分画することができた。Ent Eの精製においても障害となっているHLの分画には，DEAEセルロースクロマトが有用な方法であることを確認した。

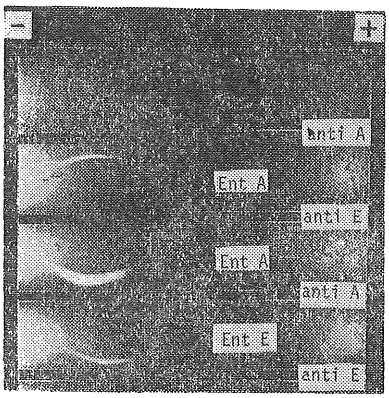


Fig. 10. Immunoelectrophoresls of purified enterotoxin E and A.

Immunoelectrophoresis was carried out 1% agar in Veronal buffer for examination of a common antigenic constituent in enterotoxin E and A. Samples were allowed to migrate for 2 hr with a potential drop of 5V per cm. The slide was stood in a moist chamber at room temperature for 48 hr.

本実験で得たEnt Eの最終標品は，免疫学的にも物理学的にも単一であり，既知の抗血清とのゲル内沈降反応およびサルの催吐活性の中和試験のいずれにおいてもその型特異性が確認された。一方，Bergdollらの報告[6]によれば，Ent Eは抗Ent A血清によってサルに対する催吐活性が中和され，ゲル内沈降反応においても一部共通性を有するとされている。さらに，Ent EとEnt Aのアミノ酸組成は非常によく類似しているので，この両者は抗原的にも近縁の関係にあることを指摘している。そこで，われわれは今回得た精製Ent Eとその特異抗血清を用いて両Ent間の共通性を検討したが，図10で示したごとく免疫電気泳動においてもその共通性は確認できなかった。

また，Ent A (10mcg/ml) を抗Ent E血清を用いて中和し，サルに静脈内接種した結果，表Ⅲに示したごとく中和は成立しなかった。当然のことながら，抗Ent A血清ではその催吐活性は完全に中和された。

Table Ⅲ Neutralization of enterotoxin A

Enterotoxin A (mcg/ml)	Antiserum	Emesis in monkey
10	None	+
10	A	−
10	E	+

われわれはいままでにEnt A～Dの精製を行ないその特異抗血清を作製し，これらを用いてブドウ球菌食中毒の実態と自然環境でのEnt産生性ブドウ球菌の分布について検討してきた。今回得た精製Ent Eとその特異抗血清を用いてその検討を行なうことにより，Ent産生性ブドウ球菌の生態学的態度がより一層明らかとなり，ブドウ球菌食中毒の実態解明と予防につながるものと思われる。

結　論

ブ菌Ent E産生標準株 *Staphylococcus aureus* FRI 326を用いて，そのNZ-Amine培養上清を出発材料としてAmberlite CG 50, CMセルロース，DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィーとSephadex G-75ゲル沪過の組み合わせによってEnt Eの精製を試み，免疫学的および物理学的に単一な標品を得ることができた。

精製 Ent のサルに対する催吐活性は対応する抗血清によってのみ特異的に中和され，抗 Ent A,B,C およびD血清のいずれにも中和されず，本標品の免疫学的特異性が確認された。

Ent E と Ent A の共通性は，本実験の精製標品において確認することができなかった。したがって，われわれの精製標品はより高度に純化された Ent E であると結論される。

附　記

（本研究の概要は日本細菌学会第47回総会昭和49年4月2日に発表した）。

文　献

1) Chu, F. S., Thadhani, K., Schantz, E. J. and Bergdoll, M.S.: Biochem., 5, 3281—3289 (1966)
2) Schantz, E. J., Roessler, W. G., Wagman, J., Spero, L., Dunnery, D.A. and Bergdoll, M.S. : *Biochem.*, 4, 1011—1016 (1965)
3) Avena, R.M. and Bergdoll, M.S.: *Biochem.*, 6, 1474—1483 (1967)
4) Borja, C.R. and Bergdoll, M.S. : *Bicohem.*, 6, 1467—1473 (1967)
5) Casman, E.P., Bennet, R,W., Dorsey, A. E. and Issa, J. A. : *J. Bacteriol.*, 94, 1875—1882 (1967)
6) Bergdoll, M.S., Borja, C.R., Robbins, R. N. and Weiss, K. F. : *Infect. Immun.*, 4, 593—595 (1971)
7) 寺山武，五十嵐英夫，潮田弘，坂井真紀，善養寺浩：日本細菌学雑誌，25, 200—201(1970)
8) 寺山武，五十嵐英夫，潮田弘，善養寺浩：日本細菌学雑誌，28, 276 (1973)
9) Igarashi, H. : *Jap.J. Microbiol.*, 16, 483—491 (1972)
10) 寺山武，五十嵐英夫，潮田弘，善養寺浩：食衛誌，13, 549—554 (1973)
11) 寺山武，五十嵐英夫，潮田弘，斎藤香彦，稲葉美佐子，善養寺浩：都衛研年報，24, 1—5 (1973)
12) Borja, C.R., Fanning, E., Huang, I-Y. and Bergdoll, M.S. : *J. Biol. Chem.*, 247, 2456—2463 (1972)
13) Kato, E., Khan, M., Kuvovich, L. and Bergdoll, M.S. : *Appl. Microbiol.*, 14, 966—971 (1969)
14) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randoll, R.S. : *J.Biol.* 193, 265—275 (1951)
15) Casman, E.P., and Bennet, R.W. : *J. Bacteriol.*, 86, 18—23 (1963)
16) Reisfield, R.A., Lewis, V.J. and Williams, D.E. : *Nature*, 195, 281 (1962)
17) Schantz, E.J., Roessler, E.G., Woodburnm, J., Lynch, J.M., Jacoby, H.M., Silverman, S.J. Gorman, J.C. and Spero, L.: *Biochem.*, 11, 360—366 (1972)
18) Huang, I-Y. and Bergdoll, M.S. : *J. Biol. Chem.*, 245, 3492—3525 (1970)
19) Bergdoll, M. S., and Robbins. R. N. : *J. milk food Technol.*, 36, 610—612 (1973)
20) Bergdoll, M.S. Huang, I-Y. and Schantz, E.J. : *J. Agr. food chem.*, 22, 9—13(1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 17 — 21, 1974

本邦食品の糸状菌汚染に関する研究

東京における市販緑茶葉についての調査成績

一言 広* 諸角 聖* 和宇慶朝昭*
坂井千三* 善養寺 浩*

Studies on Fungal Contamination of Foodsuffs in Japan: Fungal Flora and Incidence of Toxin-producing Fungi in Green Tea Leaves Marketing in Tokyo

HIROSHI HITOKOTO*, SATOSHI MOROZUMI*, TOMOAKI WAUKE*, SENZO SAKAI* AND HIROSHI ZEN-YOJI*

From 59 batches of green tea leaves on the market in Tokyo, 9,362 strains of filamentous fungi were isolated, of which fungal count per gram ranged between 3 and 799 (average, 164). A predominat fungal species in these isolates was *Aspergillus awamori* which was numerated 2,595 isolates (27.9). Results of mycotoxin bioproduction test demonstrated that 259 of *A. versicolor* isolated from 19 samples produced sterigmatocystin when cultured in YES medium.

On the other hand, the samples in different stages in manufacturing process for the preparation of green tea leaves were examined in relation whith the serch of source of fungal contamination in the marketed leaves. *A. awamori* was also found to has contaminated the manufactural samples. To the contrary, most of other genera of contaminants frequently found on the commercial leaves were little detected, and these counts were also only a few from the manufactural samples. It was seemes that aboundant fungal contamination in the marketed leaves was took place during the various treatments, i.e. selection, arrangement and packing, of the final manufactural products.

1 緒言

著者らは，これまでに，わが国の市販食品における糸状菌汚染，ことに発がん性毒素産生性の糸状菌による汚染の実態を明らかにする目的で，比較的喫食頻度が高くかつ長期保存に耐えうる食品について有毒糸状菌の汚染を調査し報告してきた[1-5]。

一方，これまで製品として茶葉類（日本茶および紅茶）の糸状菌汚染に関する報告は全くなく，もっとも一般的に飲用されている煎茶いわゆる緑茶葉における汚染の実態は全く不明である。

そこで，今回は市販緑茶葉をとり上げ，その糸状菌汚染状況，分離菌の毒素産生能および毒素産生菌の緑茶葉における毒素産生性について検討したのでその成績を報告する。

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第1研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24— 1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku
Tokyo, 160 Japan

2 実験方法

1）試料

供試した緑茶葉は1973年4月より7月までの間に主として都内の食料品店で購入した59検体である。これらの試料の産地，品種および等級等の区分は不明である。

製品緑茶葉の製造過程における糸状菌の汚染調査は1973年7月静岡県下の設備，労働条件等の異なる2つの製茶工場について加工々程に従って各段階での試料を採取して行なった。なお，これらの試料はいずれも藪北種の2番茶のものであった。

2）糸状菌の分離

糸状菌の分離には，Chloramphenicol 100μg/ml 添

加 Potato Dexsrose Agar(以下**PDA**と略す), ブドウ糖20%添加 **PDA**および5% **NaCl** 添加 Czapec-solution Agar の計3種の平板培地を使用した。

分離培養は，検体5 gに滅菌希釈液 (0.05%寒天液45m*l* を加えブレンダー(日本精機K.K.製・東京)にかけ，4,000rpm，3分間破砕攪はんし，さらに適当に希釈したのち，その 1 m*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°，7～10日培養した。その間，連日観察して発育してきた集落を**PDA**斜面培地に移植し，25°，10日間培養したのち，これを以後の同定操作に供した。

菌種の同定法は前報[1]の記載に従った。

3）その他

対照用標準マイコトキシン，試料中の含有水分測定法，マイコトキシン産生用培地，マイコトキシン産生用参考株，マイコトキシン検出法，Cleen up 法および**TLC**法等については，いずれも前報の記載[1]に従った。

3 実験成績

1）緑茶葉における汚染糸状菌数

市販の緑茶葉59検体における検出糸状菌数を Table 1に示した。すなわち，糸状菌の全く検出されなかった検体が1例認められたほかはいずれも1 g当りの検出糸状菌数は3～799 個で平均164個/gという，よく乾燥された試料にしては比較的多い汚染菌量であった。また，これらの試料の水分含量は3.2～7.4%(平均5.4%)であった。

2）汚染糸状菌の菌種分布

分離した糸状菌の菌属ごとの分布状況を Table 2に示した。すなわち，最も多く検出された菌属は *Aspergillus* で全検出菌の 43.2% を占め，次いで *Penicillum*属が42.5%認められ，この両属で全体の85%以上を占めていた。そのほかに *Cladosporium* 属が8.9%，*Mucor* 属が1%の検出率で，そのほかの菌属はいずれも1%以下であった。

緑茶葉から検出された *Aspergillus* 属のうちで検出頻度の高い菌種は *A. awamori* (*A. niger* group)，*A. repens* (*A. glaucus* group)，*A. versicolor* および *A. sydwi* (*A. versicolor* group) などであった。一方，*Penicillium* 属の中では，*P. stekii* (*P. citrinum* series)，*P. crustosum* (*P. expansum* series) および *P. frequentans* (*P. frequentans* series) などの菌種が高頻度に認められた。

Table 1.
Fungal Counts Made on Commercial Green Tea Leaves

Number of samples tested	Number of fungi estimated		Moisture %
	Range	Average	
59	3-799/gram	164/gram	5.4

Table 2.
Incidence of Fungi in Commercial Green Tea Leaves

Fungs		Fungal Count(%)	
Genus *Aspergillus*		4049	(43.2)
A. niger	group	2598	(27.4)
A. glaucus	〃	738	(7.8)
A. versicolor	〃	631	(6.7)
A. ochraceus	〃	22	(0.2)
A. fumigatus	〃	12	(0.1)
A. flavus	〃	3	(0.03)
Other group		45	(0.4)
Genus *Penicillum*		3963	(42.5)
P. citrinum	series	932	(10.0)
P. expansum	〃	103	(1.1)
P. frequentans	〃	63	(0.7)
Ramigena	〃	50	(0.5)
P. funiculosum	〃	27	(0.3)
P. brevi-compactum	〃	23	(0.3)
P. roqueforti	〃	17	(0.2)
Other series		2748	(29.4)
Genus *Cladosporium*		798	(8.9)
〃 *Mucor*		102	(1.0)
〃 *Aureobasidium*		59	(0.6)
〃 *Phoma*		42	(0.5)
〃 *Wallemia*		40	(0.4)
〃 *Alternaria*		38	(0.4)
〃 *Paecilomyces*		26	(0.3)
〃 *Rhizopus*		25	(0.3)
Other fungi		201	(2.2)
Total		9362	(100)

3）分離菌株のマイコトキシン産生能の検討

Table 3 に示した既知マイコトキシン産生能を有すると思われる菌種について，その産生能を**SL**および**YES**培地を用いて検討した。

すなわち，*A. flavus* および *Rhizopus sp.* については aflatoxin の，また *A. versicolor* および *A. sydowi* については sterigmatocystin の，さらに*A.*

ochraceus については ochratoxin の産生能を検討した。

その結果19検体より検出された *A. versicolor* に Sterigmatocystin 産生能を認めた。しかし，その他の菌株にはいずれもマイコトキシン産生能は認められなかった。

Table. 3.
Mycotoxin Producing Ability of Isolates from Commercial Green Tea Leaves

Fungus	No. of isolate	No. of toxin produced strain		Produced toxin
A. versicolor	438	259	(2.8)	serigma-tocystin
A. sydowi	193	0		(−)
Rhizopus sp.	24	0		(−)
A. ochraceus	22	0		(−)
A. flavus	3	0		(−)
Total	680	259	(2.8)	

( ) : percentage per all isolates

4）緑茶葉の加工々程における糸状菌汚染

市販の緑茶葉の糸状菌汚染を検討すると同時に，これら製品の加工々程における糸状菌汚染の実態を明確にする目的で，設備，労働条件等の異なるA，B，2つの製茶工場を対象にし，それぞれの加工々程における試料の採取を行い，各試料についての糸状菌汚染を前記同様の方法で検討した。その成績を Table 4 に示した。

加工原料である生葉についてみると，その汚染菌数は1 g当り18,387個（A工場）および11,703個（B工場）といずれも極めて高い汚染が認められた。また，その際検出された菌属は，*Alternaria*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Fusarium* および *Penicillum* 等であった。

Table 4. Distribution of Fungi in the Green Tea leaves in Manufacturing Processes

Factory	Fungus	Fresh leaf	Steam heating	Rubbing				Dryng
				1 st	2 nd	3 rd	4 th	
A	*Aspergillus*		67	607	827	220	163	3
	Penicillium	27		60	93	100	10	3
	Cladosporium	53				3		10
	Fusarium	107						
	Wallemia							3
	Phoma	600						
	Mucor					3		
	Other fungi	17,600						
	Total	18,387	67	667	920	326	173	19
B	*Aspergillus*					417	6	17
	Penicillium	7	13		7	17	6	13
	Cladosporium	167	13				3	13
	Alternaria	4,133	10				7	
	Fusarium	3						
	Arthrinium				7			
	Other fungi	7,393				3	3	3
	Total	11,703	36	0	14	437	21	46
Moisture (average)		77.6	77.2	66.7	44.5	32.0	11.3	3.3

第1工程として生葉を90°の蒸気中を通過させると，生葉で認められた汚染菌の99%以上は殺菌されてしまう。その結果，汚染菌数は1 gあたり67個（A工場）および36個（B工場）と極めて少数検出されたにすぎなかった。また，A工場の試料ではこの段階で新たな汚染菌として *A. awamori* が認められたのに対し，B工場の試料では *Penicillium*, *Cladosporium* および *Alternaria* などがわずかづつ生残していた以外には新たな汚染菌は認められなかった。

次に，前述の蒸気通過後の試料は熱風乾燥されながら種々の揉ねん操作が行なわれる。A工場においては，揉ねん操作の第1段階である粗揉機処理後の試料

1 gあたりの汚染菌数は667個，第2段階の揉ねん機処理後では920個，第3段階の中揉機処理後では326個で，最終段階の精揉機処理後では173個であった。A工場と同様の加工操作によるB工場の場合では第1段階から第4段階までの試料1 g当りの汚染糸状菌数は，0，14，437および21個であった。また，この時の菌種分布についてみると両工場の試料に共通して *A. awamori* が高率に認められ，全検出菌の約90%を占めていた。このほかにA工場では，*Penicillium*, *Cladosporium* および *Alternaria* 等の菌属が認められた。揉ねん操作工程における汚染菌数の増加は明らかに工場内のじんあいないしは加工機械からの汚染に起因するものと考えられる。

揉ねん操作終了後の乾燥工程における両工場の試料はいずれも *A. awamori* の著減と共に汚染菌数もそれぞれ1 g当り19および3個と著るしい減少が認められた。この操作を終えた試料は乾燥粗製茶として次の選別・配合等の操作を経て完成品となり市場に出される。しかし，今回の調査ではこの乾燥粗製茶以後の選別・配合等の行程における試料については検討できなかった。

なお，加工々程における採取試料の汚染菌のうち既知マイコトキシン産生能を有すると思われる糸状菌としては *Fusarium* 属以外は認められなかった。

5）緑茶葉における毒素産生の検討

緑茶葉が sterigmatocystin 産生性 *A. versicolor* による汚染をうけていたという事実に基ずき，果して，緑茶葉が毒素性産生株の毒素産生用基質となり得るか否か，検討した。その方法は乾燥緑茶葉各10 gを1時間精製水中に浸漬したのち，よく水切りをしてから121°，15分間高圧滅菌をしたものに，今回の分離株である sterigmatocystin 産生性 *A. versicolor* **T**-1-b および aflatoxin 産生用参考株 *A. parasiticus* **NRRL** 3000 の**PDA**斜面 25°，10日間培養菌の各1白金耳量を接種した。これを 25°，10日間培養ののち，その毒素産生の有無を常法により検討した。その結果，これらの緑茶葉中には sterigmatocystin および aflatoxin の産生・蓄積は認められなかった。

4 考 察

わが国の緑茶葉は，他の食品の場合と同様に国内産の原料のみならず台湾，韓国および中国等の近隣諸国からの輸入品と配合されたものが多い。しかし，これらの配合の程度は全く不明であった。ただし，一般的には市販の販売価格の高い製品ほど国内産茶葉の配合比が高いといわれている。

茶葉類は吸湿により敏感に風味が変り，吸湿の程度が増すにしたがって品質の低下を来たすと考えられている。ちなみに，著者らの調査した市販品の水分含有量は3.2～7.4%で平均5.4%であった。

緑茶葉は，その加工々程で火入れという加熱処理が行なわれることから，穀粒ないし穀粉等と異なり，その汚染糸状菌数も極めて少ないものと考えられた。しかし，調査の結果，その菌数は予想に反して1 g当り3～799，平均164個という高い値を示した。そこで，これら汚染菌の大部分は二次汚染によるものと考え，静岡県下の2つの製茶工場を対象に各工程毎に採取した試料について糸状菌汚染を検討した。その結果，生葉由来菌の99%以上は最初の加熱処理工程で死滅することが判明した。しかし，加工々程中の各段階で工場施設を介して二次汚染菌あるいは一次汚染菌のうちの一部が二次的に加工々程中の緑茶葉を汚染したとみられる結果が認められた。

ところで，生葉から検出された汚染菌は *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma* および *Alternaria* などの各菌属で，そのうち本来茶樹の病害菌とみられる菌属は*Fusarium*[6,7,8,]，*Alternaria*[6]および *Phoma*[6,9,10]の各菌属であり，外国における例としては，さらに *Cladosporium*[10] があげられている。しかし，今回採取した生葉試料は藪北種2番茶で，いずれも極めて良質のものであり，前述の病害菌による病害をうけた茶葉は全くなかったものと推察された。

つぎに，市販緑茶葉と工場における各製造段階の試料との間に検出菌種の一部相関性が認められた。しかし，市販緑茶葉にみられた大部分の汚染菌は乾燥粗製茶から市販品に至る間に行なう選別・配合等の操作中における新たな二次汚染に起因するものと推察されたが，今回の調査では，この選別・配合等の段階の試料は採取できなかった。

緑茶葉の多数の汚染糸状菌の中には発がん性マイコトキシン産生株の存在が疑がわれ，事実今回の成績で市販品59検体のうち19検体より分離した259株の *A. versicolor* に sterigmatocystin 産生性を認めた。

前述のごとく緑茶葉は発がん性毒素を産生する糸状菌により高度に汚染されていることが判明したので，つぎに著者らは緑茶葉が aflatoxin および sterigmatocystin 産生用基質となり得るか否か検討した。現在までに得られた成績ではそれらのマイコトキシンの産生は否定的であったが，この点については今後さらに詳細な検討が必要であろう。また，市販緑茶葉に

おける水分含有量は3.2～7.4%，平均5.4% という低い値であり，一般にこのような低い水分含量においては糸状菌は全く発育することができないと言われている[11-14]。したがって，緑茶葉汚染糸状菌の産生代謝物に起因するヒトの発がんについての危険性は少ないものと考えられる。

一方，大量の糸状菌により汚染された市販緑茶葉は吸湿等により糸状菌の急激な増殖を許し，ひいては茶葉の変敗ならびに種々の代謝産物の産生・蓄積の危険性をも伴なうであろう。また，糸状菌の胞子はアレルゲンとしてヒトのアレルギー性疾患の発生に重要な役割を演じているといわれている[15-20]。したがって，糸状菌汚染の著るしい緑茶製品を喫飲した場合は人体に対し何らかの障害をもたらす恐れがあるものと考えられる。さらに，市販緑茶葉の高度の糸状菌汚染は家庭における他の食品えの糸状菌の汚染源となる危険も大きい。

このような点から，緑茶葉においても二次汚染防止および品質管理について緊急に適切な処置を講ずる必要があると考える。

5 結　論

市販の緑茶葉および緑茶葉製造工程における各試料の糸状菌汚染を検討した結果，以下の結論を得た。

1）市販緑茶葉59検体のうち58件（98.2%）から糸状菌が検出され，1 g当りの汚染菌数は3～799，平均164個で極めて水分含量の低い（3.2～7.4%，平均5.4%）食品にしては多い汚染菌量であった。

2）汚染糸状菌のうち優生菌とみられる菌種は *A. awamori* で，47検体より2,598株（全検出菌数の27.9%）検出された。また，このほかに比較的高率に検出された菌は *Cladosporium sphaerospermum*（7.8%），*A. versicolor*（4.7%），*A. repens*（3.5%）. *A. sydowi*（2.1%）および *Mucor spp.*（1.0%）などであった。

3）これらの汚染菌のうちマイコトキシン産生能を有する菌種として，19検体より検出された259株の *A. versicolor* に sterigmatocystin 産生能を認めた。

4）市販緑茶葉に上記検出菌の1株である *A. versicolor* **T**-1-b および aflatoxin 産生用参考株 *A. parasiticus* **NRRL**3000 を接種し，マイコトキシンの産生能を検討した結果，sterigmatocystin および aflatoxin の産生・蓄積は認められなかった。

5）緑茶葉製造加工々程における各段階の試料について糸状菌汚染を調査した結果，市販品の汚染菌の大部分は加工処理工程よりもむしろその後に行なわれる選別・配合等の処理段階における汚染に起因すると推察された。

6 謝　辞

本調査にあたり，検体の収集および文献の照会に多大の御尽力を賜わった農林省茶業試験所・高屋茂技官に心から謝意を表します。

〔附　記〕

（本研究は昭和48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，和字慶朝昭，善養寺　浩，倉田　浩，一戸正勝：食衛誌，14，364（1973）

2）一言　広，諸角　聖，和字慶朝昭，善養寺　浩：都衛生研究所年報，24，41（1972）

3）倉田　浩，田辺弘也，栗飯原景昭，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）一言　広，諸角　聖，和字慶朝昭，善養寺　浩：食品衛生学会第25回学術講演会口演，14，326（1973）

5）諸角　聖，一言　広，和字慶朝昭，善養寺　浩：食品衛生学会第26回学術講演会口演，14，665（1973）

6）原　摂祐：茶樹の病害，日本菌類学会（1931）

7）広川　敢，高屋茂雄：茶業技術研究，29，9（1964）

8）広川　敢，高屋茂雄：茶業技術研究，37，11（1969）

9）樋浦　誠：植物病原菌類解説，養賢堂（1964）

10) Petch, T.: *The Diseases of the Tea Bush*, Macmillan and Co., London (1923)

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

12) Christensen, C.M.: *Mycotoxin in Foodstuffs*, The M.I.T. Press, Massachusetts (1964)

13) Lopez, L.C. and Christensen, C.M.: *phytopathol.*, 57, 588 (1967)

14) Diener, U.L. and Davis, N.D.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 47, 347 (1970)

15) 太藤重夫，宗　義朗，織田信一，細江隆人：皮フ科紀要，56，5（1962）

16) 太藤重夫，松尾隆男，野村　宏，宗　義朗：皮膚科紀要，56，205（1962）

17) Liebeskind, A.: *Ann. Allergy*, 23, 158 (1965)

18) 中山真弘：真菌と真菌症，7，156，（1966）

19) Herxheimer, H., Hyde, H. A. and Williams, D.A.: *Lancet*, 12, 572 (1966)

20) Flankland, A.W. and Gregory, P.H.: *Nature*, 245, 336 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 23 — 27, 1974

梅毒TP感作血球凝集反応におけるマイクロタイター法の検討

村田以和夫* 堀 幹郎* 宮沢貞雄*
加納堯子* 大久保暢夫*

Evaluation of a Modified Micro-hemagglutination Assay for Treponema Pallidum Antibodies.

IWAO MURATA*, MIKIO HORI* SADAO MIYAZAWA*
TAKAKO KANOH* AND NOBUO OHKUBO*

The World Health Organization (WHO) has evaluated the Treponema pallidum Hemagglutination Assay (TPHA) micro-method on the basis of quite a few reports made, for example, by the Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), and has found it useful, so it is strongly recommending the adoption of WHO's micro-method in place of the conventional standard TPHA-method.

Responding to this recommendation, we, therefore, performed a series of comparative tests between WHO's micro-method and the conventional standard TPHA-method, and devised a modified micro-method.

The materials used were a total of 314 sera, 248 of which were TPHA positive and 66 were negative. Below are results of our tests.

Specificity and sensistivity were all too good in both WHO's micro-method and the conventional TPHA-method : 100% for the specificity and 94.4% for the sensitivity. On the other hand, the rate of agreement of antibody titer between the two methods was as low as 19.4%, and especially for the case of high titer dilution (>1 : 1280) the WHO's micro-method exhibited a considerable number of low antibody titers.

Our modified micro-method resulted in even higher sensitivity (98.1%) than did the WHO's method, with the degree of specificity (100%) remaining unchanged. In addition to that, the rate of agreement of antibody titer increased remarkably to 45.2%. The advantage of our modified micro-method was also confirmed by the reduced number of cases in which antibody titers lowered at high titer dilutions.

As compared with the use of U cup-trays when V cup- trays were used in our modified micro-method, every antibody titer, with only the exception of 2.9% of the sera tested, agreed with that measured by the conventional standard TPHA-method, inclusive of those values which were not in exact agreement but within the range permissible for the test of serum. In particular, the merit of our modified micro-method with the use of V cup-trays was all the more apparent because said method for the first time exhibited antibody titers which were higher than those obtained by the conventional TPHA method and yet were within the above mentioned permissible range.

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

緒 言

梅毒血清反応における *Treponema Pallidum* Hemagglutination Test (TPHA) の有用性は，この反応が特異性，鋭敏度共に優れ，検査手技の迅速，簡便性等，その実用性も含めて，日常検査法として高く評価[1,2,3]されている。Cox, P.M., L.C. Logan and L.

C. Norins[4] 等は，この TPHA の特異性，鋭敏度をそのままに，血清材料，試薬の減量をはかり，より経済性を考慮した検査法 Automated Quantitative Micro-hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* Antibodies. (AMHA-TP) を報告した。この検査法は，多くの研究者により他の検査法 (FTA-ABS, TPI 及び V.D.R.L-Slide test 等) と比較検討され，その優れた成績から有用性が強調されている[7,6,8,,10].

一方，World Health Organization (W.H.O.) は米国の Venereal Disease Research Laboratry (V.D.R.L.) が発表した Micro-hemagglutination Assay for *Treponema pallidum* Antibodies (MHA-TP) 法と上記の AMHA-TP[4] 法とを TPHA-Micro 法の標準法 (WHO Method) として採用し，従来の TPHA-標準法[5] に替って，これら検査法の導入を強く推奨し普及に努めている[11].

しかしながら，現在までＷＨＯ法とＴＰＨＡ-標準法の比較試験は全く未検討であって，ＷＨＯ法導入に際し参照とする報告も見られない。そこで吾々は，我国において広く利用されているＴＰＨＡ-標準法[5] にかわり，ＷＨＯ法の適応性の可否を検討する必要性を考慮し，先づ，ハンドリングによるＭＨＡ-ＴＰ法(ＷＨＯ法) とＴＰＨＡ標準法との比較試験を実施し，つづいて，この結果に基づいた改良法の考案を試みて梅毒血清診断における Micro TPHA 法の標準化のための検討を行った.

材料および方法

A　材料—梅毒血清診断の目的で当所に送付された血清のうち，TPHA-標準法陽性血清248，同じく陰性血清66，計314例を選び被検体とした.

B　方法—イ)　ＷＨＯ法とＴＰＨＡ-標準法とを比較検討するに当って，ＷＨＯ法は血清希釈操作が２倍希釈法，ＴＰＨＡ-標準法は４倍希釈法という希釈法に相違が存在するため，ＴＰＨＡ-標準法をＷＨＯ法に合せ，２倍希釈法で抗体価を測定した。なお，ＷＨＯ法は，１：20に希釈した血清を原液とするが，これに替えて直接，血清を原液とする血清希釈方式を採用，他は全てＷＨＯ法に従った．使用トレイはＵ型である.

方法—ロ) 改良法

改良法を試みるに当っては，ＴＰＨＡ-標準法に合せてＷＨＯ法を４倍希釈法で実施，更に抗体価の表示も，終末濃度比を改め，ＴＰＨＡ-標準法と同様に，血清希釈度を抗体価として表示した。又，使用する血球量もＴＰＨＡ標準法に合せ，希釈血清量の1/10量となる様努めながら次の要領で抗体価を測定した.

Table Ⅰ　Procedure for Dilution of Reagent, Antigen and Absovent in Our Modified Program (in 4-fold dilution.)

Gup No.	Test Serum + ml	Absorbing diluent ml	Serum Dilution	Diluted Unsensitized Cells. ml	Diluted Sensitized Cells. ml
1	0.025	0.1	1:5		
2	0.025	0.075	1:20		
3	0.025	0.075	1:80	0.0075	
4	0.025	0.075	1:20		0.0075
5	0.025	0.075	1:80		0.0075
6	0.025	0.075	1:320		0.0075
7	0.025	0,075	1:1280		0.0075
8	0.025	0.075	1:5120		00.075

１）マイクロタイター法のＵ型およびＶ型 Rigid プラスチックトレイ*** に 0.025m*l* 及び 0.05m*l* のマイクロドロッパー*** を使用して，改良プログラム Table Ⅰ)通り，吸収希釈液を分注する．２）0.025m*l* のマイクロダイリューターで被検血清をとり，No. 1 の Cup に入れ回転混釈を行った後，No. 2，No. 3 の Cup をとばし No. 4 の Cup に移す.

３）同様の操作を No. 8 の Cup までくり返して１：80～１：5120までの血清希釈列を作り，最後の希釈血清は沪紙に吸い取らせる。４）ダイリューターを精製水で洗い火炎を通して冷却を待つ．５）ダイリューターの先端を Phosphate Buffered Saline (PBS) につけて検量紙***でチェックした後，再びNo. 1 の Cup に移す。６）同操作をNo. 3 のCup までくり返し，最

後の希釈液は沪紙に吸い取らせる。この結果No. 3のCupが1：80の対照，No. 5以下のCupが各々1：80～1：5120の血清希釈列となる．7）室温で30分間放置して充分な吸収を行なう．8）感作血球に3m*l*の精製水を加え（通常は2.5m*l*）均等な浮遊液とし，未感作血球に1.8m*l*の精製水を加えて浮遊液とする（通常は1.5m*l*）．9）ディスポーザブル注射針（25G）をつけたツベルクリン用の注射筒にゴムキャップをつけ，感作血球浮遊液を吸入する。10）トレイをマイクロミキサー*** にセットし，弱振しながら，No. 5～No. 8までの全てのCupに1滴づつ感作血球液を滴下する（1滴は約8 $\mu l \pm 0.3 \mu l$）．11）未感作血球浮遊液は，対照のNo. 3 Cupに同操作で滴下する．12）マイクロミキサーを強振して充分混和させた後，トレイをはずし室温で1夜静置する。13）翌朝，テストリーディングミラー*** を使用して凝集の程度により(－)～4(＋)まで判定する。

*** Cooke Engineering company 製

C　試薬　富士臓器製薬株式会社製
　　TPHA試薬キット

実験成績

A　WHO法

Fig. 1は WHO 法とTPHA-標準法との比較を示している。定性的な判定比較を行うと，陰性血清33例は，両法で全て陰性と判定され，陽性血清 144 例中 8 例（5.6%）が WHO 法で陰性と判定された。この結果は，両法共に同等の特異性を示すが，鋭敏性の面でややWHO法が低下する事を表わしている．定量的な判

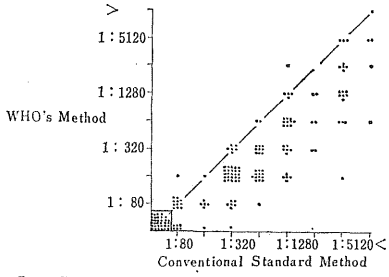


Fig. Ⅰ　Comparison between Conventional TPHA Method and WHO's on Specificity, Sensitivity.
(in 2-fold dilution with U-shaped cups)
* A total of 177 sera was tested ; Negative sera (in square) were counted 33 ; Positive sera were 144.

定比較では，先づ抗体価一致数，144例中28例（19.4%），TPHA-標準法の抗体価に比較してWHO法の抗体価が低下したもの－1段階低下64例(44.4%)，2段階低下36例(25.0%)，3段階低下12例（8.3%)－が認められ，特に1：1280以上の高希釈列では4段階以上低下したもの2例が示されて，総じてWHO法は抗体価の低下とバラツキが顕著である．

B）改良法

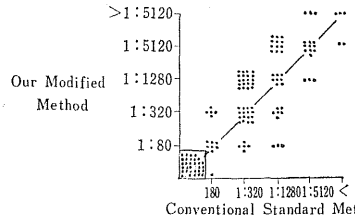


Fig. Ⅱ　Comparison between Conventional TPHA Method and Our Modified Method on Specificity, Sensitivity.　(in 4-fold dilution with U-shaped cups)
* A total of 137 sere was tested ; Negative sera (in square) were counted 33 ; Positive sera were 104.

Fig. ⅡはU型トレイを使用して4倍希釈法を実施した改良法とTPHA標準法との比較を示している。前述の様に定性的な判定比較を行なうと，陰性血清33例は全て陰性と判定され，特異性の点では，前法と差異が認められなかったが，陽性血清104例中2例（1.9%）のみが陰性と判定され，WHO法に比較して，改良法に鋭敏性の向上が見られる。定量的な判定比較では，抗体価一致数，104例中47例，（45.2%），改良法抗体価一段階低下数42例（40.4%），二段階低下数14例（13.5%）であって，特に，抗体価一致数の上昇（25.8%）と1：1280以上の高希釈倍数の例において大きなバラツキが認められなかった．この成績は，改良法の良好な改良効果と思われる．

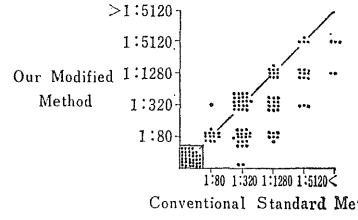


Fig. Ⅲ　Comparison between Conventional TPHA Method and Our Modified Method on Specificity, Sesitivity.
(in 4-fold dilution with V-shaped cups)
* A total of 137 sera was tested ; Negative sera (in square) were counted 33 ; positive sera were 104.

Fig·Ⅲは，V型トレイを用いた改良法とTPHA標準法との比較を示している。前述の2法による成績と同様，特異性の面では，TPHA-標準法と差異がなく，鋭敏性の面でも更に良好な成績（99.0%）を与えた。抗体価一致数は，104例中44例（42.3%）とU型トレイ使用の場合よりやや低下が認められたが，TPHA標準法より抗体価の一段階上昇数40例（38.5%）が出現した事，1～2段階低下数40例（19.2%）と少数で占められた事など，V型トレイ使用は，卓越した改良効果を示している。

考　察

1　WHO法は，特異性の点でTPHA標準法と全く差異のない事が判明したが，鋭敏性の面で若干の問題点が指摘された。特に，抗体価の一致数が低く，総じて抗体価が1～2段階低下すること，更に希釈倍数が増加するに従い，大きなバラツキが見られる事は，定量試験の際には考慮せねばならない。

一般にダィリューター（ループ）による希釈操作のMicro-methodは，WHO法に限らず，ウイルス，及び他の血清検査において，抗体価低下が広く経験されているが，これは，ダィリューター特有の欠点の1つと理解されている。しかし，抗体価の消長が，病気の活動性の指標となる様な検査法においては，診断を誤まらせないために誤差範囲を1段階に留める様，精度管理が導入されている。そこで今回少くなくともTPHA標準法と1段階の誤差範囲内に抗体価を留め得られる様，次の点を配慮して改良血清希釈プログラムを考案した。

・WHO法の2倍血清希釈法を改め4倍希釈法の採用.

・WHO法の終末濃度比による抗体価表示を改めTPHA標準法と同様に血清希釈比を抗体価とする.

・滴下血球量も希釈血清量の1/10量となる様に努めながら，最適血球濃度を求める。

2　改良プログラムに従った改良法は，U型トレイを用いた場合，鋭敏性がWHO法より向上し，抗体価一致数が25.8%も上昇した。更に1：1280以上の高希釈列においてもバラツキが少なく，改良効果が認められた。しかしながら，総じて抗体価がTPHA-標準法と比べ1段階程度低下しており改良の余地が残されている。V型トレイを用いた改良法では，鋭敏性がU型トレイを用いた場合より更に向上したが，抗体価一致数で若干下まわった。しかし，抗体価がTPHAA-標準法より1段階程度上昇する傾向（38.5%）が認められた事は，今後の改良方式の方針を示唆しているものとして注目される。以上のことから，4倍希釈法の採用はループによる希釈操作回数を少なくし，誤差×回数によって広がるバラツキを狭める効果をはたしたものと推察される。又，V型トレイ使用の改良法で，U型の場合より抗体価が上昇する傾向を示したことについては，トレイカップの内径の相違（最大径6.9mm-V型，6.0mm-U型）が指摘されよう。加えて，他の検査に使用される各種の希釈液と比較してTPHAに用いる希釈液は，吸収成分，血球の沈降速度を調節する成分(アラビアゴム末)，及び界面活性剤等が混在しているために，かなりの粘調性を保持している。従って，カップの内径とループの直径との差が小さいU型トレイの場合，物理化学的な力が働いて，ループの血清つり上げ量を左右したものと理解される。一方，マイクロタイターハンドブック[13]に記載されている〝プラスチックトレイの静電気的荷電〟の問題も一考されるべきであろう。今回の実験成績から明らかとなったマイクロ法のかかえる問題点は，各種の抗原抗体反応による検査法にマイクロ法を応用する場合の共通課題と考えられる。従って，あらゆる血清反応に2倍希釈法を採用し，むやみに高い抗体価を求めようとするのは得策でない。むしろ，基礎ダイリューションを厳密に行なって，病気の診断ないしは，その消長に必要な抗体価を中心に，最大5管程度にしぼって希釈操作を行うべきであろう。

3　今後の改良方式考案の方針としては，a）オートダイリューターを用いて機械的希釈操作を試み，ループとトレイ cup 壁との接触を避け，つり上げ血清量の誤差を最少限にとどめること。b）0.0075m*l* を正確に滴下するマイクロドロッパーを作成すること。c）鋭敏性，抗体価一致数の向上，および，良好な再現性が得られる術式の考案などに集約されよう。更に，従来使用されていたU型トレイに比べ判定のし易いV型トレイを用いた判定基準の設定にも力を入れ，マイクロ法標準化のための検討を重ねてゆく事が今後の課題であると考えられる。

結　語

1）WHO採用のマイクロTPHA（MHA-TP）法について検討し，MHA-TP法(WHO法)はTPHA-標準法と比べ，特異性の面で同等な成績を示したが，鋭敏性，抗体価一致数，及び分散の点でかなりの問題点があることが明らかとなった。

2）これらの結果にもとづいてTPHAマイクロタイター法の改良を試み，4倍希釈法の採用とV型トレイの使用によってWHO's micro-methodより良好な

成績が得られた。

文 献

1) Uete, T., Fukuzawa, S., Ogi, K. and Takeuchi Y. : *Brit. J. Vener. Dis.*, 47, 73—76, (1971)

2) Luger, A., and Spendlingwimmer., I. : WHO/VDT/RES/72. 284

3) Lesinski, J., and Krach-Kaczmarczyk J. : WHO/VDT/RES/73. 297

4) Cox, P.M., L. C. Logan, and L. C. Norins. : *Appl. Microbilol.*, sept. (1969)
(Also WHO Document, WHO/VDT/RES/69. 174)

5) 厚生省監修
：梅毒血清反応検査指針 (1967)

6) Logan, L.C. and Cox, P.M.
: *Amer. J. Clin. Path.* 53, 163—166, (1970)

7) Cox, P.M., Logan, L.C., Geneviev, W. and Stout M.A.
: *The Public Health Laboratry*, 29, 2, 4350 (1971)

8) Garner, M.F., Backhouse, J.L., Daskalopoulos, G. and Walsh, J.L.
: *Brit. J. Vener. Dis.* 48 470-473 (1972)

9) Buist, D.G.P., Pertile, R. and Morris, G.J.
: *Pathology*, 5, 249-252 (1973)

10) Anzimilt, E. J.M : *N.Z.J. med. Lab. Technol.*, 26, 3, 102-105 (1972)

11) Venereal Disease Resarch Laboratory. U.S.A.
: MHA-TP. Provisional Technique, (1971)

12) Johnston, N.A.
: *Brit. J. Vener. Dis.* 48, 474-478 (1972)

13) Conrath, T.B.
: *Handbook of Microtiter Procedures*. 3, (1972) Dynatech Co. Cambridge, Mass.

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 29 — 33, 1974

A群溶血レンサ球菌の簡易同定法としてのバシトラシン感受性試験の検討

柏木義勝* 柴田 実* 徳江シゲ子* 冨永洋子*
大久保暢夫* 飯村 達**

Evaluation of Bacitracin-sensitivity test for the screening of group A streptococci

YOSHIKATSU KASHIWAGI*, MINORU SHIBATA*, SHIGEKO TOKUE*, YOHKO TOMINAGA*, NOBUO OHKUBO* AND TATSU IIMURA**

A total of 278 laboratory stok strains of streptococci, consisting of 169 of A, 32 of B, 47 of C and 30 of G, which originally isolated from human patients, was used in this investigation. Different sensitivity of the organisms against Bacitracin was observed according to their groups and groups A and C were easilly discriminated from other two types, when organisms were tested by plate dilution method of Bacitracin. However, when applicability of the 3 different commercial Bacitracin disks were tested by the use of the same organisms, it was found that the results obtained varied depending on the soft of pulp disk or different experimental conditions such as the adoption of pre-diffusion or direct application of disks.

1. 緒 言

溶血レンサ球菌（溶連菌）は，菌体の多糖類であるC物質の血清学的性状によって，A群よりQ群までの15群（途中I，Jを除く）に分けられる[1]．

このように多くの群が存在するなかで，人体からは，A, B, C, D およびG群などが分離されるが，疾患と関係あるのは，ほとんどがA群菌であり，特に猩紅熱，リウマチ熱，急性腎炎においては，A群菌によるものであるかを確認する必要がある．

Lancefield の分類[2]の優秀性は，現在一般に認められているところであるが，実施する上で，血清型別用免疫血清を作ることに困難な面がある．そのために近年，血清学的群別・型別を行ないうる研究機関が，次第に増加しているはいえ，未だ一般化されているとは言えず，我国では，A群菌同定のためのスクリーニング法として，Maxted[3] のバシトラシン試験および小林分類[4]の2法が，広く用いられているのが現状であろう．

今回，我々は特にヒトの咽頭部より分離されたA，B，CよおよびG群の各溶連菌について，バシトラシン感受性試験（以下 BA-Test と略す）を行なって，そのスクリーニング法としての価値に再検討を加えた．以下は，その概要である．

2. 実験材料

1）供試菌株

① **A群溶連菌** 1971～1972年度に全国各地の伝染病院で，猩紅熱患者より分離され，当研究所に送付されたもののうち，特に群・型別の判明している169株を供試した．

なお，群別・型別は国立予防衛生研究所あるいは神奈川県衛生研究所において行なった．

② **B, C およびG群溶連菌** 本実験のため，神奈川県衛生研究所より分与されたB群32株，C群47株，G群30株をそれぞれ供試した．なおB群は，生化学的試験により，またCおよびG群は，血清学的に群別されたものである．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 160 Japan
** 東京都立豊島病院伝染科

これらの菌株は，常時1.5%ウマ脱繊維血液加0.1%精製寒天加 heart infusion broth に接種し，培養後，−20°C に凍結保存した．供試する際には，血液寒天平板に再分離し，集落選別を行なった．

2）供試薬剤

① バシトラシン末……SIGMA 製，65,000 u/g
② バシトラシンディスクX……X社製 0.04 u/disk
③ バシトラシンディスクY……Y社製 0.2 u/disk
④ バシトラシンディスクZ……Z社製 2 u/disk

以上挙げたX，Y，Zの各3社のバシトラシンディスクは我国で市販されているものである．

3. 実験方法

1）平板希釈法

菌集落選別後，tryptosoy broth に増菌し，tryptosoy agar にて，化学療法学会標準法[5]にしたがい，感受性を測定した．

2）ディスク法

菌集落を選別し，5% ウマ血液加 tryptosoy agar 上に塗沫接種した後，各社ディスクを軽く押えて置き，直ちに 37°C にて約20時間培養を行なって，発育阻止帯の直径を測定し，各社指定の判定基準にしたがって判定した．

4. 成績と考察

BA-Test のうち，平板希釈法により，A, B, CおよびG群の感受性値を求め，その成績を Table 1 に示す．

Table 1. Different sensitivity of streptococci against Bacitracin(plate dilution method)

MIC units/ml	Serological groups			
	A	B	C	G
10	0	9(28.1)	0	0
5	0	6(18.8)	0	0
2.5	0	14(43.8)	2(4.3)	4(13.3)
1.25	0	3(9.4)	7(14.9)	16(53.3)
0.63	0	0	2(4.3)	10(33.3)
0.31	0	0	5(10.6)	0
0.16	1(0.6)	0	7(14.9)	0
0.08	19(11.2)	0	20(42.6)	0
0.04	53(31.4)	0	3(6.4)	0
0.02	74(43.8)	0	1(2.1)	0
0.01	22(13.0)	0	0	0
No. of strains tested	169	32	47	30

Note : Figures in the Table indicate the number of strain, and parenthesis indicate per cent occupied.
MIC=minimum inhibitory concentration

A群169株の感受性値は，0.16～0.01 u/ml の範囲にあり，さらにその約75%が，0.04および 0.02 u/ml の最低発育阻止濃度（MIC）を示した．

B群の感受性は，他の3群に比較して，最も低く，10～1.25 u/ml の MIC にあった．

次いで低いのはG群で，その MIC の範囲は，2.5～0.63 u/ml であった．

C群は，他の3群に比較して，その MIC が広範囲に分布し，2.5～0.02 u/ml の範囲であった．

以上のことから，A群の感受性値とB群およびG群の感受性値とは，全く交錯しないので，BA-Test（平板希釈法）によって，BおよびG群を除去することは可能と思われる．しかしC群においては，A群とその感受性値が交錯する株が31株（66.0%）が株存在し，逆にA群側からみた場合，147株（87.0%）が，その感受性を共通するので BA-Test のみでは，A群とC群の鑑別は，ほとんど不可能であると言える．

滝沢ら[6]の行なった平板希釈法の成績によると，B群3株中2株（66.7%），C群33株中21株（63.6%），G群16株中5株（31.2%）が，A群と鑑別出来ないと報告しており，C群に関しては，我々の成績とほぼ同様の成績であったが，BおよびG群に関しては，一致をみなかった．

また平原[7]も同様の方法で行なっているが，それによると，A群の感受性値は 0.01～0.005 u/ml の範囲に全て存在しており，C群17株中10株（58.8%），G群13株中3株（23.1%）が，A群の感受性値と共通の値をとっていると，報告している．平原[7]の行なった成績は，我々の行なった成績と比較すると，各群ともMIC が全般的に低く，このことは，培養条件等の違いによるものと思われる．

今回，我々は，L群に関しては，検討し得なかったが，滝沢ら[6]は，L群の MIC は 0.08～0.04 u/ml の範囲にあると報告しており，A群との鑑別には，C群と共に考慮すべきものと思われる．

次に，我国で市販されている3社のバシトラシン感受性ディスクを用いて，BA-Test を行なった．なお供試菌株は，平板希釈法に用いた株と同一のものである．

現在，スクリーニング用ディスクとして，バシトラシン含有量の明確な規定がないため，各社独自に濃度を設定し，市販している．Table 2 にそれらの薬剤含有量および判定基準を示した．

Table 3～6 に A, B, C およびG群のディスク法による成績を示した．

また，Table 7～9には，先に，猩紅熱研究会として

Table 2. Standards recomended for the identification of group A streptococci

Sort of disk	Diameter of disk	content/ disk	Standard recomended (Diameter of inhibition zone)
X	6.5 mm	0.04 u	10～18 mm
Y	6.5 mm	0.2 u	>13 mm (less than 12 mm is other than A group)
Z	8.0 mm	2 u	>18 mm (less than 14 mm is other than A group)

Table 3. Results of sensitivity test of group A streptococci to Bacitracin pulp disks (169 strains)

Results / Sort of disk	H* (%)	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	12(7.1)	156(92.3)		1(0.6)
Y		158(93.5)	5(3.0)	6(3.6)
Z		169(100)	0	0

Table 4. Results of sensitivity test of group B streptococci to Bacitracin pulp disks (32 strains)

Results / Sort of disk	H*	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	0	1(3.1)		31(96.9)
Y		1(3.1)	0	31(96.9)
Z		1(3.1)	6(18.8)	25(78.1)

Table 5. Results of sensitivity test of group C streptococci to Bacitracin pulp disks (47 strains)

Results / Sort of disk	H*	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	0	30(63.8)		17(36.2)
Y		20(42.6)	8(17.0)	19(40.4)
Z		30(63.8)	8(17.0)	9(19.1)

Table 6. Results of sensitivity test of group G streptococci to Bacitracin pulp disks (30 strains)

Results / Sort of disk	H*	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	0	0		30(100)
Y		0	0	30(100)
Z		0	23(76.7)	7(23.3)

Table 7. Results of sensitivity test of group A steeptococci to Bacitracin pulp disk (121 strains)

Results / Sort of disk	H* (%)	A** (%)	M*** (%)	L****
X	97(80.2)	24(19.8)		0
Y		121(100)	0	0
Z		120(99.2)	1(0.8)	0

Tabie 8. Results of sensitivity test of group C streptococci to Bacitracin pulp disk (47 strains)

Results / Sort of disk	H*	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	0	33(70.2)		14(29.8)
Y		33(70.2)	0	14(29.8)
Z		41(87.2)	5(10.6)	1(2.1)

Table 9. Results of sensitivity test of gruop G streptococci to Bacitracin pulp disk (30 strains)

Results / Sort of disk	H*	A** (%)	M*** (%)	L**** (%)
X	0	0		30(100)
Y		0	0	30(100)
Z		26(86.7)	4(13.3)	0

* H=Diameter of inhibition zone greater than the standard for group A.

** A=Diameter of inhibition zone within the standard for group A.

*** M=Diameter of inhibition zone less than the standard for group A and decided as questionable one.

**** L=Diameter of inhibition zone less than the standard for group A and decided as other than group A.

報告[8]した成績を示した．この方法は，菌集落選別後，Todd Hewitt broth 2 ml に増菌し，その1白金耳量を，5％ウマ血清加 blood agar base No. 2 寒天（Oxoid 製）上に塗沫接種しバシトラシンディスク3種を載せ，3～4時間氷室内に放置した後，約20時間培養を行なってその発育阻止帯を測定し，成績に表わしたものである．すなわち，今回我々の行なった方法は薬剤の拡散を特に図らないものであり，猩紅熱研究会として行なった方法は，薬剤の拡散を氷室内で，充分に行なった後，培養したものである． なお．Table 5 と Table 8 に示したC群，Table 6 と Table 9のG群は，共に同一菌株であるが，Table 7 に示してある菌株は，都立豊島病院にて分離した猩紅熱患者由来の121株である．

Table 3 の成績から判断すると．A群は最も高濃度（2 u/disk）のZ社のディスクを使用した場合が，安定した良い成績が得られるようであり，XおよびY社のディスクを使用した場合は，その約7％がA群の判定基準より外れてしまう．

薬剤の拡散を図った場合（Table 7）では，Y社のものが，最も良く，121株全てが基準内にあり，Z社のものは，1株のみが基準以下であるが，X社に至っては，その97株（80.2％）が，判定基準を越えており，むしろ，氷室内拡散を行なわない方が良い結果が得られるのではないかと思われる．

Table 4 に示したB群32株については，各社のディスク共に同一菌の1株のみが，A群と判定する基準内に入ったが，XおよびY社のものが，全体としてZ社のものより良い傾向を示した．

C群は，Table 5 および Table 8 に示した如く，他の群に比較して，A群の判定基準内に入ってしまう株が多く，平板希釈法と同様に，ディスク法も，C群の鑑別には役立たないことが明らかになった．

G群は，Table 6 および Table 9 に示した如く，Z社のものを除けば，XおよびY社のディスクで，そのスクリーニングは可能と思われる．

また今回のディスク法の判定の際に，肉眼的に判明した事であるが，A群とB群においては，発育阻止帯と溶血阻止帯との差は，ほとんど見分けがつかなかったが，CおよびG群に関しては，平原[7]が報告している如く，両阻止帯の間に，明らかな差が見られ，発育阻止帯の内側，約 2～4 mm の個所に溶血阻止帯がみられた．この現象に留意して判定を行なえば，鑑別に役立つものと思われる．

以上述べたことから推察すると，ただ1社のディスクのみでは，これら4群を鑑別することは不可能であり，また，平板希釈法による成績から，その薬剤含有濃度を再検討してみても，充分その用に価するディスクを作成出来る可能性もないように思われる．しかし今回の実験により，BおよびG群を除去することは，BA-Test により，或る程度は可能であり，BA-Test で除去出来ないC群に関しては，溶血阻止帯と発育阻止帯との差をみることにより，除去することが可能であると考える．今回供試した菌株数のみで，決定的なことは言えないが，今後更に検討を要することと思われる．

5. 結　論

今回，我々は，特にヒトの咽頭部より分離されたA，B，CおよびG群の各溶連菌を用いて，平板希釈法およびディスク法により BA-Test を行なって，そのスクリーニング法としての価値に再検討を加えた．

得られた成績を要約すること，次の通りである．

1） 平板希釈法によると，A群の感受性値とBおよびG群の感受性値とは，全く交錯しなかったが，A群とC群は，その大部分が交錯した．すなわち，平板希釈法により，BおよびG群を除去することは可能であるが，C群を除去することは，ほとんど不可能であることが判った．

2） ディスク法において，薬剤の拡散を図らない場合は，3社のディスクのうち，Z社のものが，A群を拾う意味においては最も良く，また，CおよびG群を捨てる意味においては，XおよびY社のものが勝れており，ほぼ100％除去することが可能であった．

3） ディスク法において，薬剤の拡散を図った場合は，Y社のものが良く，A群を100％拾うことが可能であった．B群については検討しなかったが，G群については，XおよびY社のディスクにより，100％取り除くことが出来た．

4） 肉眼的所見として，ディスク法の際に，CおよびG群においては，発育阻止帯と溶血阻止帯の間に明らかな差が見られたが，AおよびB群においては，両阻止帯間には，ほとんど差が見られなかった．

文　献

1） 厚生省監修，微生物検査必携，第3版，43（1969），日本公衆衛生協会

2） Lancefield, R. C.: *J. Exp. Med.*, 57, 571～595（1933）

3） Maxted, W. R.: *J. Clin. Patho.*, 6, 224～226（1953）

4) 小林六造：日本医事新報，905，217～219 (1937)
5) 石山俊次，他：CHEMOTHERAPY，16(1)，98～99 (1968)
6) 滝沢金次郎，他：第27回日本公衆衛生学会（岡山），(1969)
7) 平原定志：感染症誌，45 (7)，276～284(1971)
8) 柏木義勝，他：第48回日本伝染病学会（東京），(1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 35 — 39, 1974

1973年度猩紅熱患者由来溶血レンサ球菌の薬剤感受性について

柴田 実* 柏木義勝* 徳江シゲ子*
富永洋子* 大久保暢夫*

Studies on Antibiotics Susceptibility of Streptococci Isolated from the Patients of Scarlet Fever in 1673

MINORU SHIBATA*, YOSHIKATSU KASHIWAGI*, SHIGEKO TOKUE*, YOHKO TOMINAGA* AND NOBUO OHKUBO*

緒　言

1965年以降，我々は猩紅熱研究会の分担研究の一部として，A群溶血レンサ球菌(溶連菌)の各種抗生物質に対する感受性を測定し，その年次的動向を報告し，考察を加えてきた．今回1973年度分離菌株について同様の測定をおこなったので過去の成績と比較しながら報告する．

材料と方法

1) 供試菌株

猩紅熱患者由来A群溶連菌として伝染病院から当研究所に送付された菌株は，1973年度は1,542株で，その内訳は，北海道地区が820株，都内が722株である．なおこれらの一部の菌株について，国立予防衛生研究所，神奈川県衛生研究所において，血清型別を行った．

2) 供試薬剤

1973年度の分離菌株に供試した薬剤は penicillin-G (PC—G) chloramphenico (CP), tetracycline(TC), oleandomycin (OL), erythromycin (EM), 等例年の5剤のほかに aminobenzyl penicillin (AB—PC), josamycin (JM), minocycline (MINO), の3剤について検討を加えた．これのら薬剤はすべて重量単位で供試した．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第2研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunin-cho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

3) 感受性の測定法

ウマ血液加トリプトソイ寒天で集落選別をおこなった後，日本化学療法学会標準法[1]に従い，トリプトソイ寒天培地を用いてその最低発育阻止濃度（以下MICと略す）を求めた．

成　績

Table 1. は1972年と1973年度に分離された菌株について，例年供試している5剤について MIC を求めたものである．PC—G は毎年0.2 mcg/ml 以下の MIC でその発育を阻止しており，1973年度も同様に0.05 mcg/ml 以下であった，そしてその大部分の菌株の MIC は0.0063 mcg/ml にあって，依然として耐性化の傾向は認められなかった．CPは数年前より25 mcg/ml と 1.56 mcg/ml 前後に集中した2峰性の MIC を形成していたが，1973年は MIC 50 mcg/ml に70%ちがい菌数が集まり，著しい耐性化の傾向が認められた．TC は1967年，1968年に耐性菌の減少がみられたが，1970年度からふたたび耐性化の傾向が認められ，1973年には CP と同様に80%ちかくの菌株が 25 mcg/ml 以上の MIC を示した．次に Macrolide 系抗生物質である OL, EM はほぼ同様な成績を示し，200 mcg/ml 以上の耐性株が67.8%も認められた．

Fig 1. の折線グラフに示す様に 200 mcg/ml 以上の EM 高度耐性株が1971年前半の分離では 8.5%，後半では12%，1972年は20%，そして，1973年前半で23%後半で75%近く出現し，急激に耐性株の増加が認められた．又これらの高度耐性株を，任意に30株選んで，さらに高濃度で MIC を検討すると2,000 mcg/ml の

Table 1 MIC of 5 Antibiotics to Group A hemolytic streptococci isolated during 1972～1973

Anti-biotics \ years / No. of Strains / MIC	1972 1317(100%)	1973 1542(100%)
PC—G mcg/m*l*	1.56	0	0
	0.78	0	0
	0.39	0	0
	0.20	0	0
	0.10	0	0
	0.05	0	2(0.1)
	0.025	4(0.3)	20(1.3)
	0.0125	52(3.9)	397(25.8)
	0.0063	887(67.4)	964(62.5)
	≦0.0031	374(28.4)	159(10.3)
CP mcg/m*l*	200	0	1(0.1)
	100	7(0.5)	8(0.5)
	50	97(7.4)	444(28.8)
	25	234(17.8)	669(43.3)
	12.5	84(6.4)	106(6.9)
	6.25	48(3.6)	29(1.9)
	3.12	405(30.8)	158(10.2)
	1.56	430(32.6)	126(8.2)
	0.78	10(0.8)	1(0.1)
	0.39	2(0.2)	0
TC mcg/m*l*	>100	4(0.3)	0
	100	0	8(0.5)
	50	361(27.4)	864(56.0)
	25	270(20.5)	421(27.3)
	12.5	168(12.7)	54(3.5)
	6.25	58(4.4)	37(2.4)
	3.12	38(2.9)	11(0.7)
	1.56	51(3.8)	49(3.2)
	0.78	320(24.4)	98(6.4)
	0.39	42(3.2)	0
	0.20	5(0.4)	0
EM mcg/m*l*	>200	241(18.3)	1047(67.8)
	200	0	0
	100	1(0.1)	0
	50	5(0.4)	0
	25	0	0
	12.5	0	0
	6.25	0	0
	3.12	2(0.2)	0
	1.56	8(0.6)	0
	0.78	7(0.5)	4(0.3)
	0.39	14(1.1)	2(0.1)
	0.20	29(2.2)	12(0.8)
	0.10	402(30.5)	209(13.6)
	0.05	608(46.2)	267(17.3)
	≦0.025	———	1(0.1)
OL mcg/m*l*	<200	———	1045(67.8)
	200	266(20.2)	2(0.1)
	100	4(0.3)	0
	50	7(0.5)	1(0.1)
	25	9(0.7)	0
	12.5	2(0.2)	2(0.1)
	6.25	46(3.5)	26(1.7)
	3.12	548(41.6)	212(13.7)
	1.56	410(31.1)	253(16.4)
	0.78	24(1.8)	1(0.1)
	0.39	0	0
	0.20	1(0.1)	0

MIC を示したものが1株，1,000 mcg/m*l* が23株認められた．

Table 2 は過去数年の25 mcg/m*l* 以上の TC 耐性株と菌型との関係を示したものである．分離菌型は12型が多く，1973年の流行菌型もまた12型で全体の82%を占めている．

Table 3～4 は1973年度に分離された菌株について，例年の5剤以外の抗生物質に対する感受性値を検討したもので，AB—PC は0.0125 mcg/m*l* に MIC が偏在し耐性菌は認められず，JM は前述の如く他の Macrolide の系抗生物質と同様高濃度耐性が多く，さらに交叉耐性を示す事が明らかになった．TC 耐性株は TC 系の半合成抗生物質である MINO に対して感受性があると言われているが，菌株個々のパターンを検討した成績では TC より2～3段階程度低い MIC を示したのにすぎず，TC 耐性菌が MINO にきわめて良い感受性を示した例は認められなかった．

Table 3 MIC of 2 Antibiotics to Group A hemolytic stretococci isolated in 1973

Antibiotics	M I C	No. of Strains 154 (100%)	Antibiotics	M I C	No. of Strains 154 (100%)
	<1.56	0		<200	134 (87.1)
	1.56	0		200	1 (0.6)
	0.79	0		100	0
	0.39	0		50	0
	0.20	0		25	0
AB—PC	0.10	5 (3.2)	J M	12.5	0
mcg/ml	0.05	4 (2.6)	mcg/ml	6.24	1 (0.6)
	0.025	31 (20.1)		3.12	3 (1.9)
	0.0125	104 (67.6)		1.56	1 (0.6)
	0.0063	10 (6.5)		0.78	2 (1.3)
	0.0031	0		≦0.39	12 (7.9)

Table 4 MIC of 2 Antibiotics to Group A hemdytic streptococci isslated in 1973

Antibiotics	M I C	No. of Strins 487 (100%)	Antibiotics	M I C	No. of Strains 487 (100%)
	100	0		100	0
	50	12 (2.5)		50	292 (60.0)
	25	66 (13.6)		25	80 (16.4)
	12.5	210 (43.1)		12.5	13 (2.7)
M I NO	6.25	90 (18.5)	T C	6.25	25 (5.1)
mcg/ml	3.12	27 (5.5)	mcg/ml	3.12	9 (1.8)
	1.56	8 (1.6)		1.56	47 (9.7)
	0.78	43 (8.8)		0.78	21 (4.3)
	0.39	31 (6.4)		0.39	0
	0.20	0		0.20	0

なわち小栗等[4~5]は薬剤の使用頻度の高い医療施設の発達した地域ほど耐性菌の出現率が高いと述べている．さらに1973年度に我々がおこなった都内と島嶼部の健康学童の咽頭溶連菌の調査成績[6]でもこの点は明らかにされている．又菌側の立場から，A群溶連菌以外の溶連菌の耐性の伝達は形質転換による事が明らかにされている今日，A群溶連菌についても，耐性菌の出現が突然変異によるものか，共存する他の耐性菌からの耐性遺伝子の伝達によるものか，或るいはその他の未知の原因によるものか興味ある問題である．

溶連菌感染症の研究において猩紅熱研究会の一人飯村[7]は治療における薬剤投与量の不足にも問題があると述べている．咽頭組織内に入りこんだ菌が菌塊を作り，薬剤との接触を妨げ，あるいは組織内で薬剤が容易に不活化される結果，薬剤投与にもかかわらず，しばしば菌が再分離されるという事もいわれている．さらに入院時の菌型と入院中に再分離された菌型の違いがしばしば指適されているところから，小児の隔離病室という特殊環境での耐性菌の再感染も十分に考慮される必要があるものと考えられる．さらに溶連菌感染症は，種々の合併症を伴ないやすく，腎炎，リウマチ熱等の続発症の原因と考えると，早期に的確な治療を行う必要があり，Macrolide 系抗生物質の第一次選択薬剤としての価値は，現在でははなはだ薄いものと考えられる[8]．しかしながら PC 剤において，過敏症の問題，あるいは Penicillinase 産生菌との混合感染による PC の殺菌効果の抑制等のマイナスの面が指摘されてはいるが，PC の経口投与が可能になり，過敏症に対する不安も減少し，さらに治療効果の良い Penicillinase 抵抗性 penicillin が開始されている今日[9~10]，

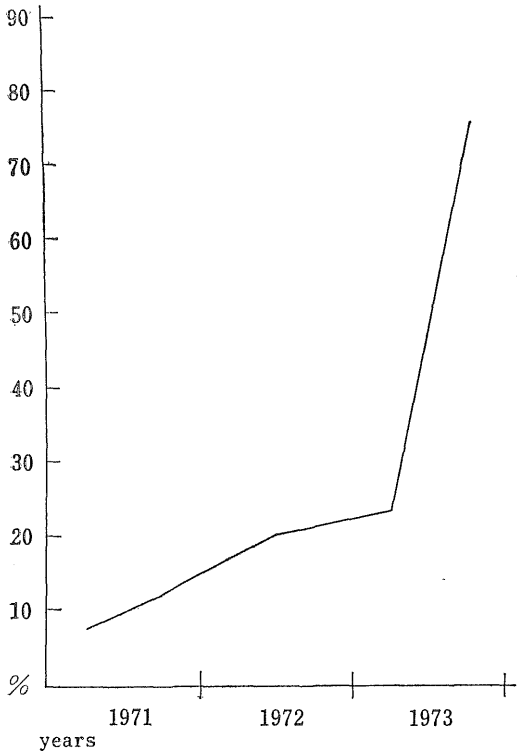


Fig 1 3年間に分離された200 mcg/ml 以上のEM高度耐性株の分離率

考 察

PC-G においては，依然として耐性化の傾向は認められず，我々がこの研究を始めてから6,000 株近くPC-G に対する感受性を測定したが，まだ一株も PC 耐性株を分離しておらず，このことは，実験的に in vitro で PC 耐性を獲得させると，溶連菌は動物に対する病原性を失い，PC 耐性溶連菌が患者から分離される可能性がないという Gezon 等[2]の報告を裏づけているものと思われる．一方，近緑菌群である Enterococcus group では PC 耐性株が多く，Viridans groupでは，PC 治療患者から耐性菌の分離報告[3]があり，PC 剤の耐性機構に関しては，まだ多くの興味ある問題があるように思われる．

TC と CP は1968年頃より2峰性となり，年々その山は，MIC の高い方に集中し，著しい耐性化を示している．これは耐性を獲得しやすい薬剤の作用機構もあり，さらにに両薬剤間の不完全交叉耐性が相互に耐性を誘導しているものと考えられる．

Macrolide 系抗生物質である OL，EM の耐性化，1970年頃より認められ，年々上昇し，1973年の前半と後半では急激な耐性化を示している．Macrolice 系抗生物質には，OL，EM に代表される14員環群とロイコマイシ，スピラマイシンに代表される16員環群とに大別され，前者と後者との間には不完全交叉耐性が成立する．従って Table 1. に示す様に OL，EM はほぼ同様の MIC を示し，なをかつ Table 3. に示す様に，一部の菌株について検討した非誘導型の JM にも交叉耐性を示したのは当然といえる．

以上の様に，PC 以外の薬剤に対する急激な耐性の獲得は薬剤の使用頻度にも関係があるようである．す

Table 2. Relationship between Serotype and Tetracycline resistance (1967～1970・1972～1973)

TC. 25 mcg/ml 以上

Serotype / years	1	2	3	4	6	12	18	22	non-typable	Average
1967	4/4 (100%)			14/14 (100)	21/27 (77.8)	11/11 (100)	1/2 (50)	1/1 (100)	14/15 (93.3)	66/74 (89.2)
1968	1/4 (25)	1/11 (9.1)	0/2 (0)	4/18 (22.2)	2/26 (8.0)	23/44 (52.3)	0/6 (0)	9/26 (34.6)	3/17 (17.6)	43/154 (27.9)
1969		0/2 (0)	0/20 (0)	18/48 (37.5)	1/8 (12.5)	5/15 (33.3)	0/24 (0)	0/15 (0)	4/109 (3.7)	28/241 (11.6)
1970	0/4 (0)		0/11 (0)	8/24 (33.3)	1/4 (25.0)	40/76 (52.6)	0/3 (0)	1/14 (7.1)	549/767 (71.6)	599/903 (66.3)
1972	6/25 (24.0)		0/2 (0)	8/30 (30.0)	0/1 (0)	20/68 (29.4)	0/2 (0)	0/1 (0)	5/9 (55.6)	49/138 (35.5)
1973	3/6 (50.0)		6/9 (66.6)	55/58 (94.8)	3/17 (17.6)	455/491 (92.7)	1/6 (16.7)	1/5 (20.0)	4/7 (57.1)	528/599 (88.1)
Average	14/43 (32.6)	1/13) (7.7)	6/44 (13.6)	107/192 (55.7)	28/83 (33.7)	554/705 (78.6)	2/43 (4.7)	12/62 (19.4)	579/923 (62.7)	1313/2109 (62.3)

PC 系薬剤は今後も常に，A群溶連菌感染症に対する最もすぐれた薬剤であるといえる．

菌型と耐性との関係については，常に問題となり，1973年度は12型の中で25 mcg/ml 以上の TC 耐性株が92.7%も認められた．数年前より分離菌型は12型が多く，1973年の流行菌型もまた12型で全体の82%を占めている．地域別に検討すると，北海道と東京は変りなく，宮本等[12]は関西地方も12型であり，裏日本における菌型は関東，北海道とは可成り異なった菌型分布を示すものの，その主要菌型は12型であったと報告している．この様に現在我国においては12型の分離頻度が高いので，一見25 mcg/ml 以上の TC 耐性を示す割合が高い様に考えられる．12型は特に腎炎に移行しやすいと言われている[13]．事実数年前より我国の流行菌型は12型となり，それに伴なって1971年頃より腎炎が増加しているという報告があるが猩紅熱患者の絶対数の増加にもより，これらの事実を考え合わせると，まだ耐性と菌型さらに腎炎等続発症の相関を認めるにはいったていない．

結　論

1973年度に分離された猩紅熱由来A群溶連菌 1,542株について，猩紅熱研究会の分担研究の一部として，種々の抗生物質に対する感受性，菌型等について調査し，次の結論を得た．

1. PC—G に対してはすべての菌株が0.05 mcg/ml 以下で発育を阻止され，過去数年の成績と同様に耐性菌株は分離されなかった．

2. PC—G 以外の TC, CP, OL, EM に対しては急激な耐性菌株の増加（約60～80%）を認め多剤耐性の傾向を示した．特に EM は1,000 mcg/ml 以上の高度耐性株が高率に分離され，今後治療面における薬剤の選択に十分な考慮が必要であると考えられた．

3, 1973年の流行菌型は12型であり，菌型と耐性と続発症の3者における因果関係は特に明らかにされなかった．

（本研究の概要は日本伝染病学会第48回総会49年4月5日で発表した）．

文　献

1) 日本化学療法学会雑誌，16(1)：98～99，Jan (1968)

2) Gezon, H. M.：*Proc. Soc. Expti. Biol. Med.*, 67, 208 (1948)

3) Steigbigel, N. H.：Reed, C. Wand.：*Am. J. Med. Sci* 255(3)：179～195, Mar (1968)

4) 小栗豊子，設楽政次，小酒井望：Jap. Antibi. tics 26(3)：215～220, June (1973)

5) 小栗豊子，設楽政次，小酒井望，只野寿太郎：Jap. J. Antibiotics 27(1)：1～6, February (1974)

6) 柴田実，柏木義勝，徳江シゲ子，大久保暢夫 感染症学会雑誌掲載予定，未発表成績

7) 第48回日本伝染病学会総会，追加討論

8) 御簾納考次郎：感染症学会雑誌，46，80 (1972)

9) Markowitz, M.：Kramer, I.：Goldstein, E.：Perlman, A.：Klein, D.：Krameh, R and Blue, M.L.：*Pediatric Pharm & Therapeutics*, 71(1)：132～137 (1967)

10) Torres, R. T.：*Unpublished paper presented at Sao Paudo Symposium* (1967)

11) Stewart, G. T.：Elseviev *Publishing Compauy*, 174 (1965)

12) 猩紅熱研究会：感染症学会雑誌47(12). 496～539,(1973)

13) 河北成一，岩本肇，渡辺毅敏，下瀬洋一.：感染症学会雑誌 47(1) 12～17,(1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 41 — 46, 1974

腸内ウイルス感染症の実態は握に関する研究（第6報）

——1973年1～12月における東京都内3下水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 (VI)
Virus Isolation Made at Three Sewage Treatment Plants in Tokyo in 1973

KENJI IWASAKI*, YASUKO YANAGISAWA*, KAZUYOSHI YANO*, KIYOSHI YAMAZAKI*
FUJIKO SAKAI*, KIYOSHI* YABUUCHI AND NAOMITSU NEZU*

緒　言

都内における腸管系ウイルスの浸淫状態および流行推移状況を間接的には握するために，都内3下水処理場から下水を採取し，検出されるウイルスの種類・型別さらにそれらの出現消長について検討した．

本報においては，1973年1～12月の下水検体からのウイルス検出成績と高頻度検出ウイルスに対する血清疫学的調査結果を報告する．

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[1,5]と同様である．

ウイルス分離・同定：培養細胞として，FL・HeLaS_3・Hep 2・Vero 518・Vero ♯462の各継代細胞とサル腎細胞の初代培養を使用した．分離ウイルス株中，腸内ウイルスおよびレオウイルスはSchmidtのプール血清を用い中和試験によって同定した．アデノウイルスはまず補体結合試験により，アデノウイルス群に属することを確認した後，HI試験および対応特異の免疫血清を用い中和試験によって型を同定した．

都民血清のコクサッキーB群ウイルスに対する中和試験（マイクロタイター法）：1972年9月，1973年9月，1974年1～3月に採取した都民血清277例について中和試験を行なった．又1972年12月および1973年12月に採取した都内飼育豚血清についてコクサッキーB5型ウイルスの中和抗体価も調べた．被検血清は−20°Cに凍結保存した．

被検ヒト血清を1：8に，ブタ血清を1：4に希釈した後，56°C30分加温により非働化した。これら血清にコクサッキーB群3・4・5型のPrototype各株を混和し，37°C CO_2 フラン器内に3時間静置した後，室温に一夜おき，HeLa S_3 細胞培養トレイに接種して，37°C CO_2 フラン器内で培養する．CPEの出現有無によって中和抗体の有無を判定した．

実験成績および考察

1) 下水検体からのウイルス検出

1973年1～12月まで毎月定期的に採取した落合処理場の下水検体60件，砂町処理場の下水検体120件からのウイルス分離試験成績を表1に示した．

城西地区の排水をあつめている落合処理場では，生下水36件中36件（100%），102株のウイルスを，沈澱汚泥12件中12件（100%），33株のウイルスを，また城東地区の排水をあつめている砂町処理場では，生下水36件中22件（61%），40株のウイルスを，沈澱汚泥48件中30件（63%），41株のウイルスを，三河島処理場・沈澱汚泥12件中7件（58%），18株のウイルスを検出した．

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1 1973年東京都内で採取した下水検体からの腸内ウイルス・アデノウイルス・レオウイルスの検出状況

採取場	検体種類	下水検体採取時期 1月	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
落合処理場	生下水	AD3, Reo1	AD, Reo1	AD2, Reo1	AD	AD,P2,Reo1 CB4·5	AD, Reo1 CB4·5	CB5, Reo1	5AD3, CB5 Reo1	AD, CB3	CB3·5	P2, CB5	AD, CB5
		AD, Re1	AD5, Reo1	AD5·6 Reo1	AD2, Reo1	AD, P2	P2, Reo1 CB3·5	(+)	(+)	(+)	CB3·5	P1, AD	CB5
		AD3, Reo1	AD5·6 Reo1	AD6, Reo1 CB5	AD2, Reo1	AD, CB4	AD3, Reo1 CB3·5	AD, Reo1 CB5	AD, Reo1	CB5	CB3·5	AD, CB5	CB5
	沈澱汚泥	AD6, Reo1	AD, Reo1	AD, Reo1	CB4, Reo1	AD, CB4 Reo1	AD, P2 CB4·5	AD, Reo1 CB5	CB5, Reo1	CB5	CB3·5	CB5	P2, CB5
	処理下水	—	AD6, Reo1	—	AD, Reo1	—	—	Reo1	—	—	—	CB5	—
砂町処理場	生下水	AD6, Reo1 CB5	AD5	AD	CB5, Reo1	CB4	CB4	—	AD	CB5	CB5	CB5	CB5
		AD, Reo1	AD	—	Reo1	CB4	CB3·4	—	—	—	P2, CB5	—	—
		—	—	—	P2	P2, CB4	AD	CB5	—	—	CB5	—	—
	沈澱汚泥	Reo1	—	—	—	CB4	CB4	CB3·5	CB5	—	CB5	—	CB5
		Reo1	—	—	CB4	—	P2	CB5	AD	—	CB5	CB5	CB5
		—	—	—	—	CB4	CB5	CB4	—	CB5	CB5	P2, CB5	CB5
		—	AD	CB4	P2	CB4	—	CB5	—	CB5	—	P2, CB5	P2
	処理下水	—	Reo1	P2, CB5	CB5	—	P2	—	—	CB5	—	CB5	CB5
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	CB4	—	—	—	—	—	—	—
三河島処理場	沈澱汚泥	AD, Reo1	AD5, Reo1 CB3	AD, Reo1	Reo1	—	AD, CB4	—	—	—	—	CB5	P2·3, AD5 CB5

(注) P1(2・3)=ポリオ1型(2・3型)ウイルス, CB3(4・5)=コクサッキーB群3型(4・5型)ウイルス, AD2(3・5・6)=アデノ2型(3・5・6型)ウイルス, AD=アデノ型未定ウイルス, Reo1=レオ1型ウイルス, (+)=未同定ウイルス

表2 東京都内3下水処理場の下水検体からの検出ウイルス株数

ウイルス＼下水処理場	落合	砂町	三河島
P1	1	0	0
P2	6	10	1
P3	0	0	1
Cox B3	8	2	1
Cox B4	6	13	1
Cox B5	25	30	2
AD 2	3	0	0
AD 3	4	0	0
AD 5	3	1	2
AD 6	5	1	0
AD	28	8	2
Reo 1	29	7	5
未同定	24	22	3
計	142	94	18

* P1(2・3)=ポリオ1型(2・3型)ウイルス
* Cox B3(4・5)=コクサッキ-B群3型(4・5型)ウイルス
* AD2(3・5・6)=アデノ2型(3・5・6型)ウイルス
* AD=アデノ型未定ウイルス
* Reo 1=レオ1型ウイルス

検出ウイルスを種別にみると，表2のようになった．

1973年高率に検出されたコクサッキーB群3・4・5型ウイルスおよびアデノウイルスについて，月別に下水検体からの検出状況を，表3に示した．

まず3型以外のアデノウイルスは，毎月平均して分離され，季節的変動にかかわりなく絶えずある程度の浸淫をくり返しているものと推測される．しかし3型ウイルスは下水検体より1・6・8月にのみ検出され，同時期には都内学童間に集団発生があり，患者材料から同ウイルスを検出した．

次にコクサッキーB群ウイルスについてみると，3月頃から3・4・5型ウイルスが入りみだれて検出され，このようなことは例年にはみられなかったことである．特に3～6月にかけて4型，6～10月には3型，7～12月には5型ウイルスが検出された．なかでも5型ウイルスは長い期間，多くの検体採取地点から検出され，都内の浸淫はかなり広域的でかつ流行規模が大きかったものと思われた．しかし同3・4型ウイルスは5型に比較すると流行範囲は小さいながらもある程度都内において流行していたと思われた．

ポリオウイルスの検出時期は生ワクチン一斉投与時期に対応して検出され，例年と同一傾向を示していた．

表3　1973年における高頻度検出ウイルスの月別消長

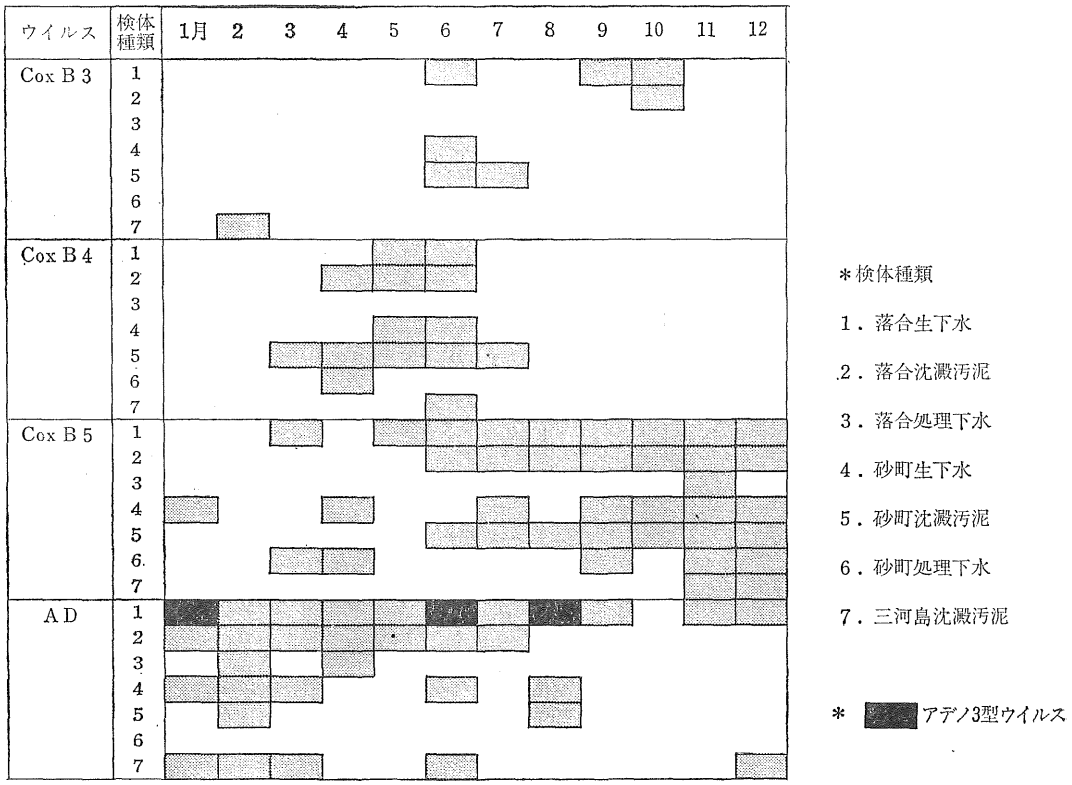


表4　培養細胞種別によるウイルス検出成績

ウイルス	継代細胞				
	FL	HeLa S_3	Hep 2	Vero 518	Vero#462
P 1	0	0	1	0	
P 2	6	8	3	5	
P 3	0	0	1	0	
Cox B 3	2	4	1	4	
Cox B 4	7	17	0	6	
Cox B 5	36	35	19	12	
Cox B	2	1	1	0	
AD 2	2	1	0	1	
AD 3	2	0	2	1	
AD 5	2	4	0	0	
AD 6	5	1	0	0	
AD	20	19	0	4	
Reo 1	0	0	0	0	40
未同定	8	9	1	10	27
計	92	99	29	43	67

（注）表2の脚注に同じ

下水検体からのウイルス検索にあたって，FL・HeLa S_3・Hep 2・Vero 518・Vero#462 の5系継代培養細胞とサル腎細胞の初代培養を使用した．下水検体検索結果を培養細胞別に整理すると，表4のようになる．

今回の調査では，サル腎細胞での検出率が最も低率であった．検出率が不安定であるのは，サルの個体差およびサル自身のウイルス感染のためであると思われる．

検出ウイルスを細胞種別にみるとコクサッキーB群ウイルスおよびアデノウイルスは，HeLa S_3・FL細胞での検出率が高かった．

またレオ1型ウイルスについては，Vero#462 細胞に感受性が高かった．

2）健康都民のコクサッキーB群3・4・5型ウイルスに対する中和抗体保有状況

1973年3月頃から下水検体よりかなりの高頻度で検出されたコクサッキーB群3・4・5型ウイルスの都内流行浸淫度を血清疫学的に調査した．

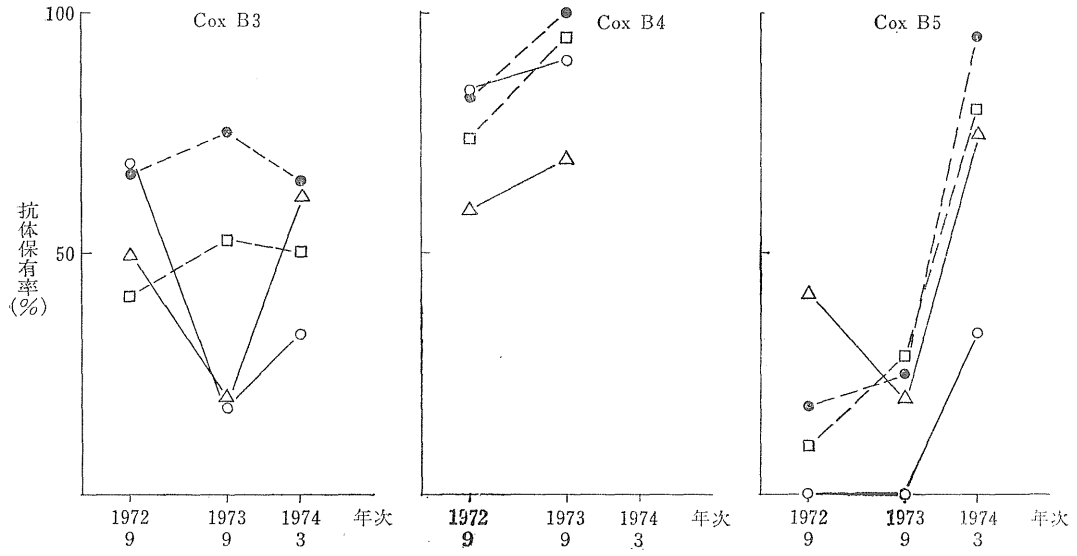


図 1 健康都民のコクサッキーB群3・4・5型ウイルスに対する中和抗体（≧1：8）保有状況
○——○ 0～5才，△——△ 6～10才，□……□ 11～15才，●……● 16～24才

流行前の1972年9月，流行後の1973年9月，1974年1～3月に採血した2～24才までの都民血清277例について中和抗体価を測定した．

抗体保有率（≧1：8）の年令別における逐時変せん様相は図1に示した．

1973年9月の血清抗体価について保有率の平均値についてみると，コクサッキーB群3型ウイルス抗体保有は39.9%，同5型については20.6%，同4型については87.3%を示した．流行が終結したと思われる1974年1～3月には，同3型60%，同5型86.7%の抗体保有率を示し，保有率の上昇がみられた．

また図1にも示したとおり，通常腸内ウイルスの感染対象者が主に5才以下の小児であると考えられているが，今回の調査では，11～15才，16～18才の年令層においても著明に抗体保有率の上昇がみられ，その流行が青年層にまで及んでいたことが判明した．

3) ブタのコクサッキ-B群5型ウイルスに対する中和抗体保有状況

1973年10月にブタの法定伝染病である水疱病が茨城県に発生し，この病原体が人のコクサッキーB群5型ウイルスと同じか又は似ているとの報告[6)~7)]があった．今回下水検体よりのコクサッキーB群5型ウイルスの高頻度の検出との関連性をみるために，ブタの同5型に対する中和抗体価を測定した．

1972年12月および1973年12月に採血した都内飼育豚の血清について抗体保有率（≧1：4）を調査した．1972年は9.8%の保有率で，1件64倍という価を示したものがあったが，あとは4倍の抗体価であり，流行後の保有率は7.0%で低く，東京都内において下水検体より高頻度に検出されれたコクサッキーB5型ウイルスは，人由来のウイルスであると推定できよう．

4) 年次別下水検体からの高頻度検出ウイルス

1967年6月以来，下水検体から検出頻度の高かったウイルス型を表5に示した．

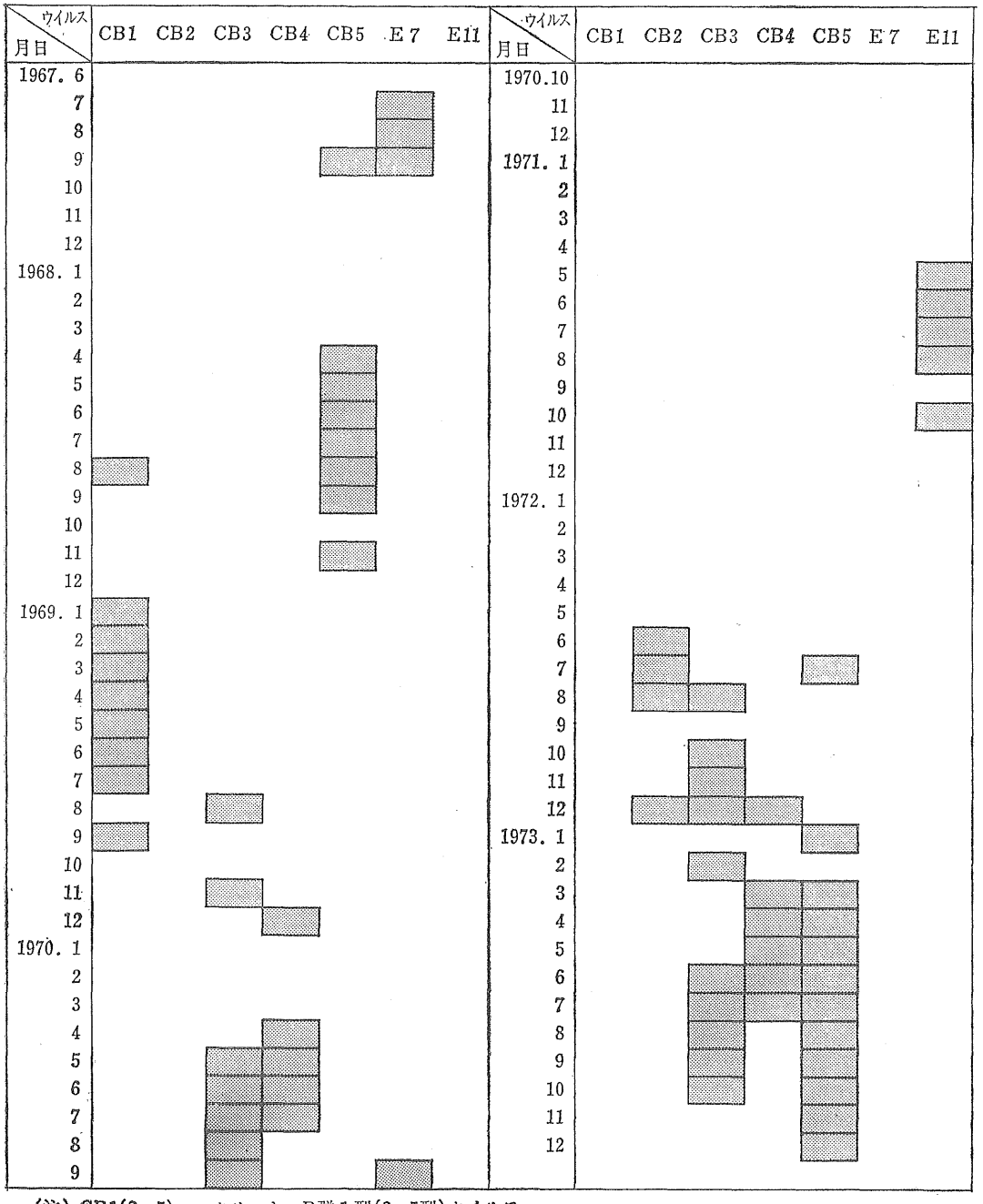
過去7年間のこれら下水検体からのウイルス検索結果から，今回特に都内浸淫の主流をなしたコクサッキーB群5型は，1968年以来5年ぶり，さらに同4型は1970年以来3年ぶりであった．これら調査結果からコクサッキーB群ウイルスの流行周期は3～5年であると考えられる．下水検体からウイルス分離を続けることにより腸内ウイルス感染および流行のウイルス種類の変せん様相が間接的には握できる．

コクサッキーB群ウイルスは，突発的に検出された時期からある程度の潜伏期をおいて，それらウイルスの流行がみられると推測できる．このことは同じ腸内ウイルスのエコー7・11型にはみられなかったことである．

結　論

1973年1～12月の都内における腸内・アデノ・レオ各ウイルスの汚染状況をは握するために，毎月定期的

表5　1967～1973年における高頻度検出下水ウイルスの消長



(注) CB1(2～5)＝コクサッキーB群1型(2～5型)ウイルス、
E7 (〃)＝エコー7型(11型)ウイルス、

に都内3下水処理場から下水検体を採取し，ウイルス分離を行なった．

更に血清疫学的に都民の抗体保有状況を調査し，腸内ウイルス感染実態を検討した．

1) 落合処理場において，生下水36件中36件から102株の，沈澱汚泥12件中12件から33株の，処理下水12件中4件から6株のウイルスを検出した．砂町処理場においては，生下水36件中22件40株の，沈澱汚泥48件中30件41株の，処理下水36件中8件9株のウイルスを検出した．三河島処理場・沈澱汚泥12件中7件から15株のウイルスを検出した．

2) 192件の下水検体からのウイルス検索の結果，254株のウイルスを検出した．その内訳は，ポリオウイルス19株（7.5%），コクサッキーB群ウイルス88株（34.6%），アデノウイルス56株（22.0%），レオウイルス41株（16.1%）であった．

中でもコクサッキーB群5型ウイルスが57株（22.4%）で最も高頻度に検出された．

3) 培養細胞種別のウイルス検出率をみると $HeLaS_3$・FL 細胞が高率であった．

4) 血清疫学的検索からも，1973年の都内における腸内ウイルスの流行の主体はコクサッキーB群ウイルスで，特に5型ウイルスであった．また3・4型も5型にくらべて流行規模は小さいながらも流行がみられた．

5) アデノ3型ウイルスが下水検体から検出された1・6・8月に，集団発生があり，患者材料からも同ウイルスを検出した．

6) 病原がコクサッキーB群5型ウイルスとの関連で問題視されているブタの水疱病流行時に際して，都内飼育豚においては，同5型ウイルス抗体保有率が低く，感染には関与していないものと思われた．

7) 今回都内浸淫の主流をなしたコクサッキーB群5型ウイルスは，1968年以来5年ぶりのことであった．

謝辞

本研究に御援助下さいまし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，柏木義勝，坂井冨士子，藪内清，村上一，大豆生田歌次，根津尚光，辺野喜正夫，小沢勇太郎，大里一夫，宮崎友治郎：都立衛生研究所年報，20，35—38（1968）

2) 岩崎謙二，柏木義勝，山田澄夫，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光，大里一夫，宮崎友治郎：都立衛生研究所年報，21，9—14（1969）

3) 岩崎謙二，山田澄夫，柳沢靖子，佐々木憲子：都立衛生研究所年報，22，35—40（1970）

4) 岩崎謙二，山田澄夫，柳沢靖子，矢野一好，坂井冨士子，藪内　清，根津尚光：都立衛生研究所年報，23，49—53（1971）

5) 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：都立衛生研究所年報，24，53—59（1972）

6) Graves, J. H.: *Nature*, 245, 314—315(1973)

7) Brown, F., Talbot, P. and Burrows, R.: *Nature*, 245, 315—316 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 47 — 51, 1974

1973年東京都民における風疹の血清疫学的研究

柳沢靖子* 藪内 清* 坂井富士子*
伊藤忠彦* 岩崎謙二*

Incidence of HI Antibody against Rubella Virus among Inhabitants of Tokyo in 1973

YASUKO YANAGISAWA*, KIYOSHI YABUUCHI*, FUJIKO SAKAI*,
TADAHIKO ITO* AND KENJI IWASAKI*

緒言

風疹は，俗に「3日はしか」といわれ，ほとんどすべての小児が罹患する軽症の感染症として，従来あまり重要視されていなかった．しかし1965年沖縄での流行で先天性奇形との関係があきらかにされて以来，疫学的に重要な疾患とみられるようになった．

われわれは東京都民の風疹に対する抗体保有状況を把握するために，1969～1970年の2ケ年にわたって健康都民血清について，風疹抗体保有状況を，地域別，年令階層別に解析検討し，その成績についてはすでに報告[1,2]した．

今回われわれは，都内小学校における風疹流行例に遭遇した．すなわち1974年2月小岩保健所管内において，発疹を伴なう熱性疾患が多発し学級閉鎖があいついだ．

そこでこれらの患児血清について風疹ウイルスに対するHI試験を試みて，その病因究明を行なうと共に，新たに健康都民の風疹HI抗体保有状況を再調査し，血清疫学的な面から都内における本症の実態を分析検討したので報告する．

実験材料および方法

被検血清：1974年2・3月に小岩保健所管内で発生した発疹性疾患々者の急性期・回復期のペア血清15件，1973年10～12月に多摩地区内の小金井・武蔵野・東村山・府中保健所管内の健康都民から採取した血清300件と，1973年10月・1974年2月に採取した新宿・雪ケ谷保健所管内の健康都民血清176件について試験を行なった．

HI試験・昭和44年厚生科学研究費・風疹の疫学研究班の検査術式にしたがって，被検血清はカオリン処理を行ない，マイクロタイター法によって実施した．

抗体価8倍以上を陽性とした．

実験成績および考察

1) 発疹性疾患々者の血清診断

1974年3月に発生した小岩保健所管内の発疹性疾患々者は，額・腹部・胸・顔等全身に発疹がみられ，クラスの3分の1が罹患し，3日間学級閉鎖になった．

これら患者の抗体価は表1のようになった．

1974年2月に持ち込まれた患者6名のペア血清は，全例において風疹ウイルスに対する抗体価が著明に上昇し，また3月に採取した患者8名のペア血清では，5名に抗体の有意上昇をみた．残り3名は第1回の採血時期が遅すぎたため有意上昇はみられなかった．

2) 地区別・年令階層別抗体保有状況について

HI価を測定した都民血清476件について，地区別および年令階層別に，抗体価別の累積抗体保有率（陽性）率を整理すると，表2のようになる．

表2より陽性率は，両地区とも年令が高くなるにしたがって高率になっている．すなわち0～4才で52.9%で，25～29才以上（都区内），20～24才以上（多摩地区）では100%の陽性率を示している．

表2の成績から年令別階層別に2地区の抗体保有率

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japon

表1 発疹性疾患々者における風疹HI試験成績

月 日	保健所	名前	年令	性別	急性期	回復期
1974		H・I	13	男	8	256
2.7		H・A	14	男	＜8	256
		K・S	14	男	8	1048
		Y・O	14	男	32	≧2048
		K・M	14	男	＜8	1024
		R・O	14	女	＜8	256
1974	小岩	M・I	12	男	64	256
3.14		M・O	12	男	64	256
		S・M	12	男	256	256
		K・Y	12	男	256	256
		M・S	12	男	128	256
		Y・T	12	女	64	1024
		S・W	12	男	32	128
		S・K	12	男	256	1024

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

地区別	年令区分	検査例数	抗体価別陽性率						
			1：8	1：16	1：32	1：64	1：128	1：256	≧512
都区内	0～4	17	52.9%	52.9%	47.0%	35.3%	29.4%	23.5%	0.0%
	5～9	51	72.5	68.6	68.6	62.7	45.1	15.7	3.9
	10～14	32	87.5	84.4	75.0	59.4	25.0	6.3	3.1
	15～19	52	88.5	88.5	88.5	86.5	65.4	48.1	28.9
	20～24	16	93.8	93.8	93.8	68.8	50.0	25.0	6.3
	25～29	4	100.0	100.0	25.0	25.0	25.0	0.0	0.0
	30～34	3	100.0	66.7	66.7	33.3	33.3	33.3	0.0
	35～39	1							
多摩地区	0～4	1	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5～9	24	41.7	41.7	37.5	25.0	12.5	4.2	4.2
	10～14	15	33.3	33.3	26.7	26.7	6.8	0.0	0.0
	15～19	26	76.9	76.9	69.2	61.5	53.8	34.6	7.7
	20～24	60	100.0	100.0	100.0	93.3	71.7	50.0	25.0
	25～29	59	100.0	100.0	100.0	93.3	76.3	55.9	42.4
	30～34	55	100.0	100.0	100.0	96.4	72.7	54.6	30.9
	35～39	60	100.0	100.0	100.0	96.7	78.3	61.7	46.7

を正規確率紙上にプロットすると図1のようになる．

都区内健康人における陽性率は各年令層においてあまり差はなかったが，多摩地区においては，19才以下のグループと20才以上のグループの2つに大別された．

高年令層のグループの方が陽性例中高い抗体価を示した例数のしめる比率が高く，これにくらべて19才以下の各群ではその比率が，低率であった．

これは過去のデータとは，まったく逆の結果である．

3) 風疹 HI 抗体価の年次推移

抗体価（≧1：8）の年令層別抗体保有率を，年次別に，グラフ紙上にプロットして，年次抗体保有率の

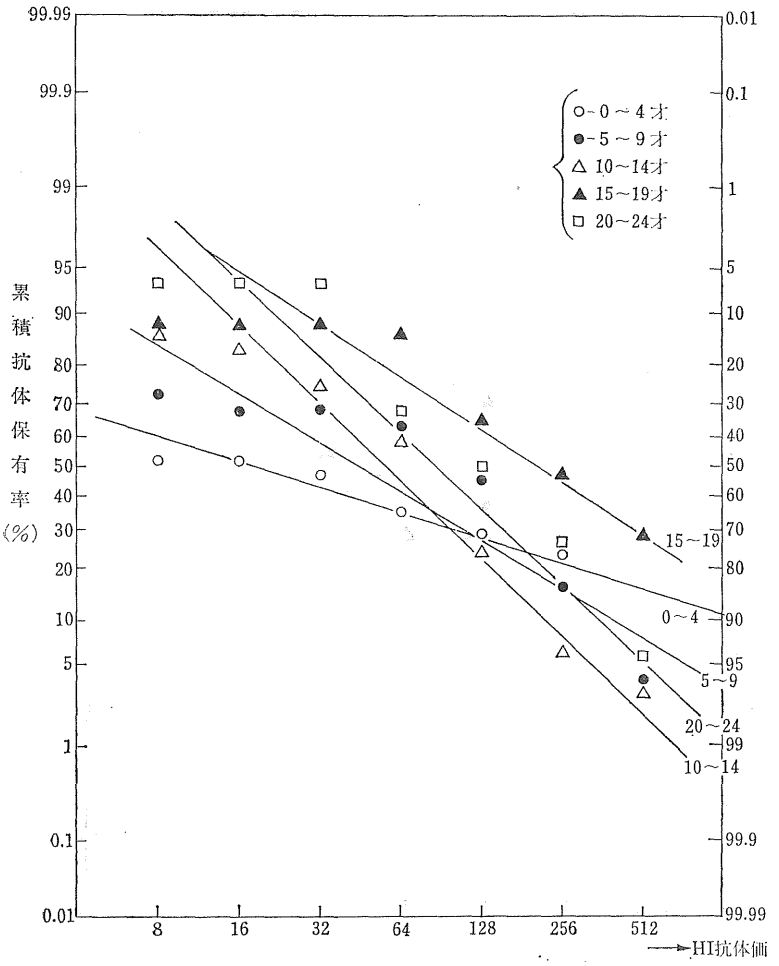


図1—a 年令階層別にみた都民（都区内）の風疹HI抗体保有状況

動向を図2に示した．

都区内では，1969年には2峰性，1970年には1峰性，更に1974年には3峰性と変化している．

多摩地区では，1969年には2峰性，1970・1974年とも1峰性であった．

1969・1970年における成績と今回の測定結果を比較してみると，各年令層とも抗体保有率（≧1：8）は高い．しかし多摩地区においては，13～15才において保有率が若干低下している．

最も特徴を示しているのは，4～6才の年令層において過去の抗体保有率より，はるかに上昇していることである．

結　論

1974年2月に入って都内小岩保健所から，額・頬・胸部等に発疹を伴なう患者のペア血清が持ち込まれ，これら被検血清の風疹ウイルスに対するHI試験を試みて病因の解析をするとともに，1973年10～12月，1974年2月に採取した健康都民血清476件についてHI抗体価を測定し，血清疫学的な角度から，都内における風疹の流行実態解明への再調査を試みた．

1) 1974年2・3月に持ち込まれた，12～14才の被検ペア血清について，風疹HI試験を試みたところ，2月に持ち込まれた6名は，全例においてHI抗体価の上昇がみられ，明らかに風疹に罹患したものと判定

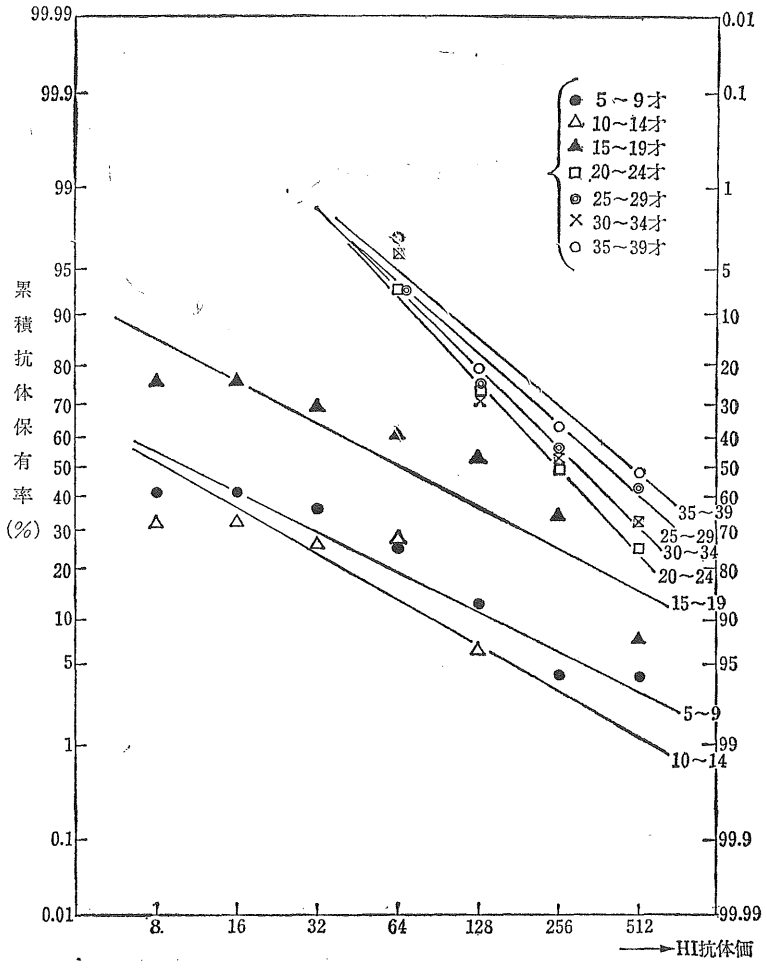


図1—b 年令階層別にみた都民（多摩地区）の風疹HI抗体保有状況

できた.

3月に持ち込まれた8名のうち5名は抗体の有意上昇を示したが，3名は第1回の採血時期が遅れたため有意上昇はみとめられなかったが，高い抗体価を示していた.

2) 年令層別抗体保有状況は，都区内健康人については，各年令層において陽性率の差はみられなかった．多摩地区においては，19才以下のグループと20才以上のグループの2つに大別でき，高年令層のグループの方が陽性例中高い抗体価を示した例数のしめる比率が高かった.

3) 抗体価（≧1：8）の年令別抗体保有傾向線を描くと，区部では3峰性，多摩地区では1峰性であった.

4) 抗体保有率の年次推移は，1974年は各年令層において，1969・1970年の成績より抗体保有率は高い．しかし多摩地区の13～15才の年令層において若干低下している.

低年令層においては，抗体保有率が上昇した.

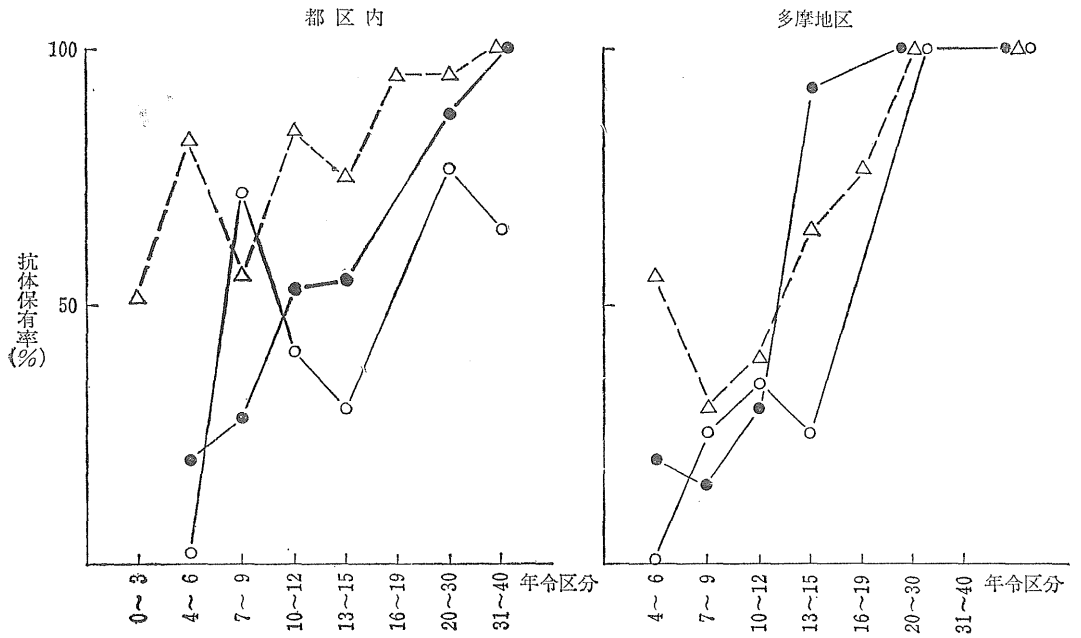


図2　地区別，年令区分別にみた都民の風疹HI抗体保有率（≧1：8）の年次推移

○—○ 1969年　　●—● 1970年　　△--△ 1973年

文　献

1) 岩崎謙二，坂井冨士子，藪内　清，山田澄夫，柳沢靖子，佐々木憲子，伊藤忠彦，佐々木路子，根津尚光：都立衛生研究所年報，21，31—34 (1969)

2) 山田澄夫，岩崎謙二，柳沢靖子，佐々木憲子：都立衛生研究所年報，22，47—50 (1970)

3) 厚生科学研究費風疹の疫学班：風疹ＨＩ試験の術式 (1969)

4) 植田浩司：医事新報，2616，29—31 (1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 53 — 58, 1974

1973年度東京都における日本脳炎の疫学的研究

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 in Tokyo in 1973

KIYOSHI YABUUCHI*, FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KENJI IWASAKI*, NAOMITSU NEZU*, KENYA WATANABE**, MASAHIKO KINOSHITA**, SEIICHIRO NAGANO** AND TAKAO KATO**

緒　言

ヒトにおける日本脳炎（以下日脳と略す）は，高い致命率と重度な後遺症を残す重要な伝染病であり，かつては本都においても多数の患者が発生したが，長期にわたる全国的規模での強力な防疫対策推進の結果，1967年に43名の真性患者の発生をみたのを最後に，以後都内での感染を疑う患者はみられないようになった．しかし，このように本症が急激に減少した真の理由については未解決の点が多く，今後の研究にまつところが多い．

われわれは，1963年以来本都における本症の疫学的研究を続け，その結果については既に報告[1~2]した．

本報は1973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

本年10月，都立伝染病院に疑似日脳として送院収容された2名の患者血清（1名は9月29日発病，他の1名は10月5日発病）で，計10検体を検査対象とした．血清は分離後直ちに−20°Cに凍結保存した．

2) 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ヵ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．

3) 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，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13抗原，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）の2抗原をそれぞれ使用した．

4) CF 反応および HI 反応

CF 反応は Kolmer の少量法[3]に準じたが，反応に関与する因子の量をさらに1/2に減量し，CF トレイを用いておこなった．

HI反応は，日脳については大谷の方法[3]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[4]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[4]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

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Publc Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都多摩食肉衛生検査所

表1 1973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

病院	衛研受付No.(1973)	患者氏名	年齢	性	採血月/日	病日	日本脳炎 HI 中山	日本脳炎 HI JaGAr 01	日本脳炎 CF 中山	CF ポリオ 1	ポリオ 2	ポリオ 3	コクサッキーB群 1	コクサッキーB群 2	コクサッキーB群 3	コクサッキーB群 4	コクサッキーB群 5	CF ムンプス	CF アデノ	CF エコー6	CF ヘルペス
墨東	※	石○とも○	0.2	♀	X/3	5	<10	<10	<4												
	※	〃	〃	〃	X/24	26	<10	20	8												
	844	〃	〃	〃	XI/14	47	80	320	8												
	850	〃	〃	〃	XII/1	64	80	640	8												
豊島	620	荒○智○	37	♀	X/17	13	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	8
	644	〃	〃	〃	X/30	26	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64
	851	〃	〃	〃	XI/5	62	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64
	876	〃	〃	〃	XII/6	63	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64
	909	〃	〃	〃	XI/24	81	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64
	970	〃	〃	〃	I/21	139	<10	<10	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	≧64

※東京スペシアル・レファレンス・ラボラトリーにて検査

さ.

5) コガタアカイエカの採集およびおとり動物

すべて前報[1]に準じた.

6) 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[5]の方法に準じておこなった.

特にブタ血清の場合は，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．このうち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

検索成績は表1にしめす通りである．この成績から，被検査者2名中1名は真性日脳，他の1名はヘルペス脳炎とそれぞれ血清学的に診断された，

真性日脳と診断された「石○」例は，埼玉県草加市在住の生後2ヵ月の女児であった.

2) と場ブタの HI 抗体保有状況

1973年度立川と場において採血した都内産のブタの経日的日脳HI抗体保有状況は表2の通りである.

すなわち，本年は9月10日採血分から，はじめてHI抗体陽性でかつ2ME感受性抗体保有個体が検出されたが，これは過去のわれわれの経験中最も遅いものであり，毎年ブタ社会での日脳ウイルス散布が希薄になってゆく傾向を，本年も更に深めながら踏襲するであろうことが予測された.

一方，ブタ血清からのウイルス分離試験では，9月10日採血分から1株 (JaTan 173, SW 16808) の日脳ウイルスを分離同定し，本都における日脳ウイルスの存在を証明した.

次に，と場ブタのHI抗体保有状況の年次別推移から，本都における日脳ウイルスの汚染状況を推察するため，JaGAr 01株に対するHI価≧1：10 の陽性率について図示すると，図1のようになる.

すでに前報[1]において，1963年から1972年に至る各年のHI抗体保有状況は，三つのパターンに大別できることを述べたが，これに本年の成績を加え，更に表3にしめす真性日脳患者発生数とを対比させて，改めて考察を加えたい.

すなわち，図1（A）にしめすように，1963年から1967年にかけては，7月中旬から8月下旬の間に急激な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月頃まで維持している．この型をとった年は，東京都ばかりではなく東日本ではいずれも多数の真性患者が発生し，しかも抗体保有率の上昇時期が早い年程患者数が多く，上昇時期の遅速が患者数の多寡(表3)と完全に一致している.

表2　1973年度東京都におけると場ブタの日本脳炎HI抗体保有状況（立川と場）

採血月日	JaGAr 01												2ME・S抗体保有率（%）		※※ウイルス分離試験
	< 10	10	20	40	80	160	320	640	1,280	≧ 2,560	計	陽性率 %（≧1:10）	直接法	透析法	
1.22	28					1		1	3	8	41	32	0		0／28
2.26	43					1	1	2	2		49	12	0		0／43
3.19	45							1	2	2	50	10	0		0／45
4.23	47						1				48	2	0		0／47
5.28	48			1						1	50	4	0		0／48
6.25	51										51	0	0		0／51
7. 2	51										51	0	0		0／51
9	47									1	48	2	0		0／47
16	50						1				51	2	0		0／50
23	49										49	0	0		0／49
30	51										51	0	0		0／51
8. 6	50										50	0	0		0／50
13	51										51	0	0		0／51
20	50										50	0	0		0／50
27	50										50	0	0		0／50
9. 3	49									1	50	2	0		0／49
10	45								1	5	51	12	66		※ 1／45
17	50					1					51	2	100		0／50
27	45									5	50	10	60		0／45
10. 1	35								2	12	49	29	21	21	0／35
8	39								1	12	52	25	0		0／39
15	45						1		1	2	49	8	0		0／45
22	43								2	5	50	14	29	14	0／43
29	47						1		1	1	50	6	67	0	0／47
11. 5	45			1					1	4	51	12	0		0／45
12. 3	45			1			1		1	2	50	10	0		0／45

※　JaTan 173 (SW 16808)

※※　ウイルス分離試験はHI抗体価＜1：10のものについて，ちのみマウスを用いておこなった．（陽性数／検査数）

1968年および1969年は，図1（B）のごとく，両年共HI抗体保有率の上昇時期が遅く，9月に入ってからであり，その上昇程度もゆるやかでかつ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希薄になった結果と解される．

1970年以降は図1（C）にしめすごとく，（B）の傾向が進行したものと考えられ，HI抗体保有率の上昇時期も遅く，その程度も50%前後にしかなっていない．

更に本1973年は，図1（D）のごとく最高HI抗体保有率が実に29%，かつその値が10月1日という非常に遅い時期にでている．

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は年を追うごとに低くなっているといえる．また，この過去11年間に集積された調査成績から，と場ブタ血清のHI抗体保有状況が，当該地区における日脳ウイルス汚染の指標となりうることの妥当性が明らかになった．

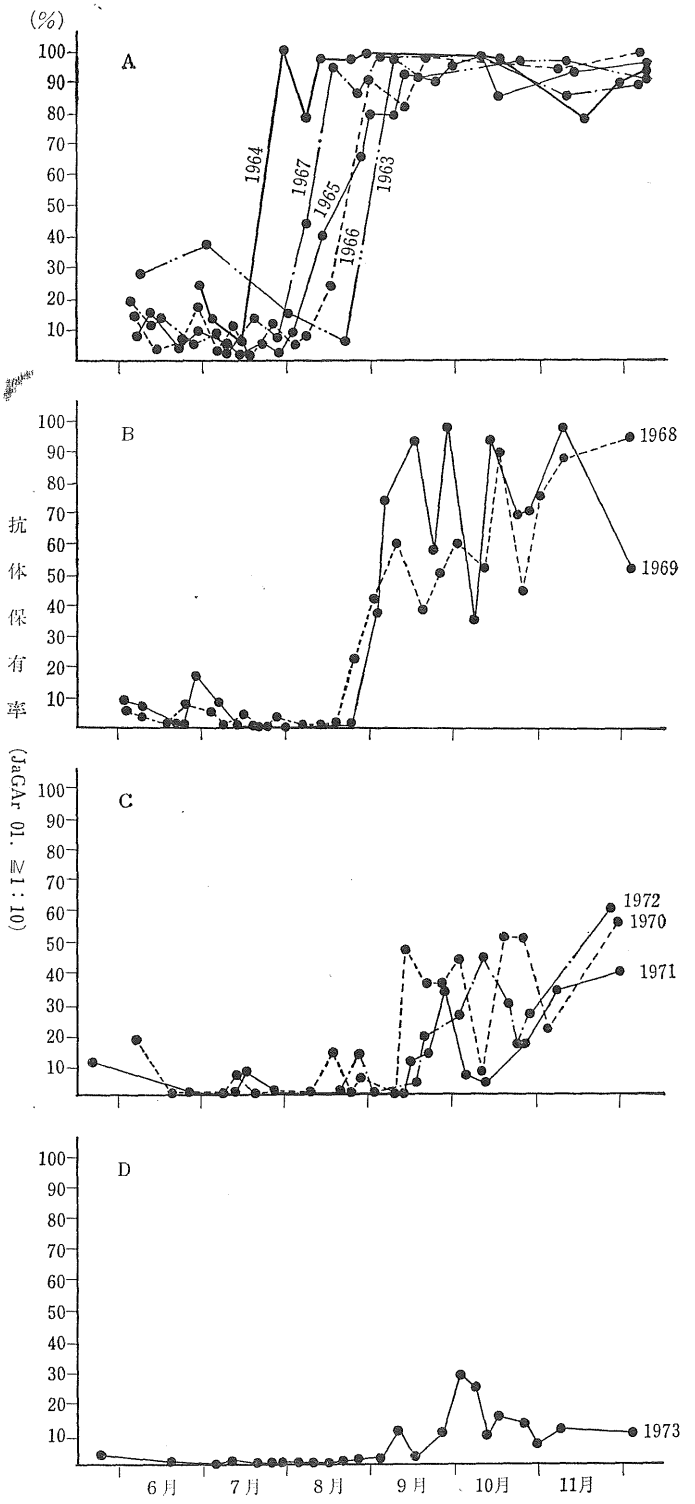


図1．東京都における場ブタの日本脳炎ＨＩ抗体保有状況の年次別比較

表3　東京都における日本脳炎患者発生状況
（東京都衛生局防疫課）

年度＼事項	患者数（人）	罹患率（%）	死者数（人）	致命率（%）
1963 (昭38)	16	0.2	8	50.0
1964 (〃39)	64	0.6	28	43.8
1965 (〃40)	31	0.3	8	25.8
1966 (〃41)	35	0.3	8	22.9
1967 (〃42)	43	0.4	14	32.6
1968 (〃43)	1*	0.0	0	0.0
1969 (〃44)	1**	0.0	0	0.0
1970 (〃45)	0	0.0	0	0.0
1971 (〃46)	1***	0.0	0	0.0
1972 (〃47)	0	0.0	0	0.0
1973 (〃48)	1****	0.0	0	0.0

罹患率は人口10万人対
推定感染地　　* 愛知県
** 岐阜県
*** 山口県
**** 埼玉県

3) コガタアカイエカの消長およびおとり動物の調査

当研究所鶏舎および上野動物園内の3ヵ所（ウマ舎，シカ舎，バーバリーシープ舎）にライトトラップを設置して蚊を採集し，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（表4），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

1973年度東京都における日本脳炎の疫学的研究をおこない，次の結論を得た．

1) 疑似日脳患者として送院された2名について，血清学的検査を実施したところ，1名は真性日脳，他の1名はヘルペス脳炎と診断された．この真性日脳患者は，埼玉県草加市在住の生後2ヵ月の女児であった．

2) と場ブタ血清の日脳HI抗体保有状況調査で

表4　1973年度東京都におけるコガタアカイエカの消長とウイルス分離試験成績

採集月日	上野動物園									都立衛生研究所		
	こども動物園									西園			鶏舎		
	ウマ舎①			ウマ舎②			シカ舎			バーバリーシープ山					
	♂	♀	ウイルス分離	♂	♀	ウイルス分離	♂	♀	ウイルス分離	♂	♀	ウイルス分離	♂	♀	ウイルス分離
6.26	—	—		—	—		—	—		8	4	(−)	1	6	(−)
7. 3	0	8	(−)	0	3	(−)	0	0		0	8	(−)	0	5	(−)
10	0	1	(−)	0	2	(−)	0	0		0	0		0	2	(−)
17	—	—		—	—		0	1	(−)	0	2	(−)	0	0	
20	—	—		—	—		—	—		0	1	(−)	0	3	(−)
24	0	14	(−)	0	15	(−)	—	—		0	3	(−)	0	9	(−)
27	3	31	(−)	3	11	(−)	0	0		—	—		4	11	(−)
31	—	—		—	—		0	0		0	0		0	5	(−)
8. 3	8	26	(−)	0	24	(−)	0	3	(−)	0	27	(−)	10	6	(−)
7	2	63	(−)	7	28	(−)	1	4	(−)	12	6	(−)	0	3	(−)
10	1	9	(−)	2	6	(−)	5	0		9	12	(−)	2	3	(−)
14	4	74	(−)	8	32	(−)	3	6	(−)	3	6	(−)	0	14	(−)
17	12	32	(−)	6	26	(−)	—	—		5	1	(−)	5	4	(−)
21	1	49	(−)	1	8	(−)	6	2	(−)	3	0		0	0	
24	0	8	(−)	0	8	(−)	4	1	(−)	9	0		2	4	(−)
28	3	15	(−)	1	7	(−)	0	0		1	1	(−)	0	6	(−)
31	1	31	(−)	2	13	(−)	0	0		1	1	(−)	3	1	(−)
9. 4	2	12	(−)	1	10	(−)	0	0		0	2	(−)	0	4	(−)
19	0	11	(−)	0	4	(−)	2	0		0	0		1	2	(−)
10. 2	0	1	(−)	0	1	(−)	—	—		16	1	(−)	7	2	(−)

——＝採集せず．
ウイルス分離試験はコガタアカイエカの♀について，ちのみマウスを用いておこなった．

は，9月10日採血分からはじめて2ME感受性抗体保有個体がみいだされた．これは，過去の経験中最も遅いものであった．また，最高HI抗体保有率も29%にとどまった．

3) 9月10日採血分のと場ブタ血清から，1株の日脳ウイルスを分離同定した．

4) おとりウサギについては，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日脳ウイルスは分離されなかった．

5) 以上の研究結果から推測すると，本都には，日脳ウイルス汚染そのものは依然として存在しているので，真性患者発生数の多寡にかかわらず今後もこの様な疫学的調査を続ける必要がある．

謝辞：本研究を実施するに当り，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) 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：都衛研研究年報，24，75～80 (1972)

2) 岩崎謙二，藪内 清，柳沢靖子，矢野一好，根津尚光：都衛研研究年報，24，61～67 (1972)

3) 大谷 明：微生物検査必携，451～474 (1966)，日本公衆衛生協会

4) 国立予防衛生研究所ウイルス第4室編：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)

5) 大谷 明，奥野 剛：ウイルス実験学各論，124～162 (1967)，丸善書店

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 59 — 64, 1974

1973年9月より1974年4月に都内において発生した集団かぜの病因に関する研究

坂井冨士子*,伊藤忠彦*,藪内清*,
岩崎謙二*,根津尚光*

Studies on Influenza in Tokyo, in the Period from September 1973 to April 1974

FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YABUUCHI*,
KENJI IWASAKI* AND NAOMITSU NEZU*

緒　言

東京都におけるいわゆる集団かぜの発生に際し，著者らはそのつど学級閉鎖等の措置のとられた小中学校児童生徒の患者材料より，ウイルス学的，血清学的検索を行ない病因を明らかにしてきた．1973年は初頭よりAホンコン型インフルエンザ（以下「イ」と略す）が発生し，大規模な流行とならず3月に一応終熄したが，その後4月下旬より再び集団かぜが多発し，検索の結果，これまでにない極端な抗原変異をしたB型「イ」ウイルスによるものであることが判明した．この流行は一応7月中旬まで続き，学校が夏休みにはいるとともに表面上は一時流行が中断したかにみえた．1973年7月までの検索成績は前報[1]ですでに報告したので，本報では学校の夏休みが終り，再び集団かぜが発生した9月以降の検索成績について報告する．

検査材料および方法

患者血清および患者のうがい水は1973年9月より1974年4月までに都内において発生した「イ」様患者由来のもので，検体処理法，ウイルス分離同定試験法，血清学的検査法およびその診断基準はすべて前報[1]のとおりである．

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

成績および考察

1, ウイルス分離状況

1973年9月より翌年（1974年）4月までに42集団，計201例についてウイルス学的，血清学的検索を行なった．検索の総括成績を表1に示した．都民の抗体保有状況調査の結果から，いわゆるB/73型ウイルスによる第2波の流行が学校の夏休み開け以降に発生するであろうと予想していた．9月中に当所に送付された3集団のかぜ患者からはB型ウイルスは分離されず，アデノウイルスが1集団（5名）より3株検出した．その後10月初旬発生した集団かぜ患者より，7月以降はじめてのB型ウイルスを分離し，以後11月から翌年（1974年）1月下旬にかけ，合計14集団（66名）より23株のB型ウイルスを分離した．なお流行は患者ペア血清のCF抗体価有意上昇により，2月中旬までつづいていたことを確認した．またこのB型「イ」流行中，10月，11月にAホンコン型「イ」ウイルスを3集団（15名）より5株分離した．これら集団はいずれも練馬区内の小，中学校で発生した集団かぜである．A型ウイルスがひきつづいて検出されたのは1974年2月下旬からで，その後B型ウイルスは分離されず，4月中旬までに5集団（23名）から17株のA型ウイルスを分離した．アデノウイルスは1973年9月の1集団をはじめとし，10月，11月，12月に分離され，病院小児科外来患者を含めると6集団（31名）から18株を検出した．なお今回の検索でA型ウイルス感染者の集団にB型ウイルス感染者が混在していた例を認めた（表2）

表1　1973年9月以降1974年4月までに発生した集団かぜ患者の検索成績

No.	受付月日 1973～1974	所轄保健所	集団名	ウイルス分離試験 検体数	インフルエンザA	インフルエンザB	アデノ	血清学的検査 CF(S) 検体数	インフルエンザA	インフルエンザB	アデノ	診断
1	9 13	武蔵調布	野川小	5	0	0	3	3	0	0	2	アデノ
2	19	小平	小平13小	5	0	0	0	4	0	0	0	不明
3	21	世田谷	駒留中	6	0	0	0	0				〃
4	10 4	立川	中神中	4	0	0	0	3	0	1	0	「イ」B
5	8	五日市	東秋留中	4	0	1	0	4	0	3	0	「イ」B
6	20	田無	西原小	5	0	0	0	0				不明
7	〃	高井戸	高井戸2小	4	0	0	4	4	0	0	3	アデノ
8	24	練馬	練馬中	5	2	0	0	4	4	0	0	「イ」A
9	11 2	府中	府中3小	4	0	0	0	2	0	2	0	「イ」B
10	6	練馬	練馬2小	5	1	0	0	5	1	0	0	「イ」A
11	〃	王子	豊島中	5	0	2	0	5	0	5	0	「イ」B
12	7	新宿	落合1幼	5	0	0	0	4	0	0	0	不明
13	8	小金井	国分寺5小	4	0	0	0	4	0	2	0	「イ」B
14	〃	糀谷	糀谷小	5	0	1	0	5	0	2	0	「イ」B
15	9	武蔵野	大野田小	3	0	0	0	0				不明
16	12	砧	山野小	5	0	0	0	5	0	0	0	〃
17	13	葛飾	東堀切小	5	0	0	4	4	0	0	3	アデノ
18	14	杉並西	杉並2小	5	0	0	0	5	0	3	0	「イ」B
19	〃	石神井	下石神井小	5	2	0	0	5	3	0	0	「イ」A
20	〃	町田	本町田東小	5	0	3	0	4	0	4	0	「イ」B
21	〃	杉並東	堀ノ内小	5	0	0	5	5	0	0	5	アデノ
22	〃	武蔵調布	狛江6小	5	0	0	0	5	0	4	0	「イ」B
23	15	芝	鞆絵小	5	0	3	0	5	0	4	0	「イ」B
24	〃	江戸川	平井南小	5	0	3	0	4	0	3	0	「イ」B
25	16	滝野川	滝野川5小	4	0	1	0	4	0	2	0	「イ」B
26	20	神田	錦華小	5	0	2	0	5	0	4	0	「イ」B
27	27	豊島長崎	高松小	5	0	0	0	5	0	3	0	「イ」B
28	12 6	荏原病院	小児科外来	4	0	1	0	0				「イ」B
29	12 6	高井戸	高井戸東小	4	0	1	0	4	0	3	0	「イ」B
30	7	雪谷	雪谷中	5	0	2	0	5	0	3	0	「イ」B
31	12	荏原病院	小児科外来	5	0	1	1	0				「イ」B アデノ
32	19	〃	〃	7	0	0	1	0				アデノ
33	26	小平	小平4小	5	0	1	0	5	0	0	0	「イ」B
34	1 17	石神井	石神井南中	5	0	0	0	0				不明
35	28	下谷	谷中小	5	0	1	0	5	0	0	0	「イ」B
36	2 13	石神井	南田中小	5	0	0	0	5	0	3	0	「イ」B
37	21	中野	桃園3小	5	4	0	0	5	4	1	0	「イ」A 「イ」B
38	22	小金井	国分寺9小	4	3	0	0	3	3	0	0	「イ」A
39	〃	牛込	愛日小	5	5	0	0	5	5	0	0	「イ」A
40	3 13	滝野川	滝野川2小	5	4	0	0	4	3	0	0	「イ」A
41	15	新宿	西戸山2中	5	0	0	0	5	0	0	0	不明
42	4 16	町田	鶴川1小	4	2	0	0	4	2	0	0	「イ」A
計				201	22	23	18	153	25	52	13	

表2 中野保健所管内桃園小学校における集団かぜの検索成績

患者	受付 No. (1973)	採血 年月日	HI A/東京 452/73	HI A/東京 368F/73	HI B/大阪 2/70	HI B/東京 69/73	CF A (S)	CF B (S)	ウイルス分離
A	956	74・2・21	256	128	512		8	8	A
	980	3・5	1,024	1,024	512		16	8	
B	957	2・21	128	64	128		<8	<8	(−)
	981	3・5	2,048	2,048	128		64	<8	
C	958	2・21	256	128	128	<32	<8	16	(−)
	982	3・5	256	128	512	64	<8	32	
D	959	2・21	64	32	256		8	8	A
	983	3・5	256	256	128		32	8	
E	960	2・21	128	64	1,024		<8	8	A
	984	3・5	4,096	2,048	1,024		32	8	

2. B型「イ」の検索成績

分離した23株のB型「イ」ウイルスはすべてニワトリ免疫血清を用いた赤血球凝集抑制（以下HIと略す）試験により同定された．表3はその成績である．

表3 分離株のニワトリ免疫血清による同定試験

ニワトリ免疫血清 \ 抗原	B/大阪2/70	B/東京63/73	B/東京53/73	B/東京69/73	東京351/73	東京598/73	A/東京452/73
204 B/大阪2/70	4096	2048	256	128	128	64	<32
224 B/東京63/73	4096	2048	64	64	128	128	<32
221 B/東京53/73	32	<32	1024	512	1024	1024	<32
229 B/東京69/73	32	<32	1024	4096	2048	4096	<32
217 A/東京452/73	<32	<32	<32	<32	<32	<32	512

1973年4月より7月までのB型「イ」の流行に際し，分離したB型ウイルスは，1株が従来のB型株に近いウイルス（B／東京63／73株）で，その他はすべて新型ウイルス（B／東京53／73株とB／東京69／73株で代表される）であったことはすでに前報[1]で報告したが，今回分離したB型ウイルスはすべてB／東京53／73株，B／東京69／73株のニワトリ免疫血清によく抑制される新型ウイルスであり，従来のB型株に近いウイルスは認められなかった（表4）．なお詳細な抗原分析については別に報告[2]する．

3. A型「イ」の検索成績

分離した22株のウイルスはすべてニワトリ免疫血清を用いたHI試験でAホンコン型と同定された．Aホンコン型ウイルスは1968年にわが国に浸入以来，毎年若干の抗原変異をとげているが，今回の1973年秋に分離した株は同定試験の結果，1973年春に分離した株

表4 ニワトリ免疫血清による交叉HI試験

ニワトリ免疫血清 \ 抗原	B/東京63/73	B/東京53/73	B/東京69/73	B/東京650/73	B/東京717/74
223 B/東京63/73	512	<64	<64	<64	<64
221 B/東京53/73	64	1024	512	256	256
230 B/東京69/73	128	4096	8192	4096	2048
242 B/東京650/73	<64	512	256	512	256
244 B/東京717/74	<64	256	64	128	512

表5 分離株のニワトリ免疫血清による同定試験

ニワトリ免疫血清 \ 抗原	A/愛知2/68	A/熊本1/72	A/東京452/73	東京/364F/73	東京/368F/73	B/大阪2/70
161 A/愛知2/68	4096	512	512	256	512	<32
233 A/熊本1/72	1024	4096	2048	2048	2048	<32
217 A/東京452/73	128	64	1024	512	512	<32
204 B/大阪2/70	<32	<32	<32	<32	<32	4096

(A／東京452／73株) のニワトリ免疫血清によく抑制され，この株に近いものと思われた．その成績を表5に示した．この秋の分離株の一つ(A／東京368F／73株) でニワトリ免疫血清を作成し，交叉HI試験を行なって抗原性を検討したところA／東京452／73株の免疫血清と異なり，古い年代のホンコン型の抗原にも高いHI価を示し，A／東京368F／73株は抗原域の広いウイルスであることがうかがわれた．また1974年2月以降に分離したウイルス株はA／東京368F／73株の免疫血清を含めた各年代のホンコン株のニワトリ免疫血清を用いたHI試験で同定されたものであり，各免疫血清に対する態度はA／東京368F／73株，A／東京364F／73株の抗原に近いものであった．A／東京368F／73株の交叉HI試験，およびA／東京742／74株の同定試験の成績を表6に示した．1974年2月以降の分離株のうちA／東京742／74株とA／東京3／74株で免疫血清を作成し，行なった交叉HI試験の成績を表7に示した．この二つの免疫血清ではA／東京368F／73株の免疫血清ほどの古い年代のホンコン株に対して顕著な抑制を示さなかった．しかし免疫血清のホモのHI価に対する比率から見れば，ほぼ同じ傾向を示した．

1973年秋の分離株の免疫血清はA／東京368F／73株1株しか作成していないので抗原分析については今後十分検討しなければならないが，以上の免疫血清の成績から1973年秋の分離株と1974年2月以降の分離株の間に抗原的差異はほとんどないであろうと考える．1973年秋以降の都内におけるA型「イ」の流行はまず局地的な規模で発生し，1974年に入り全都的な流行に発展した．1973年の秋にA型「イ」流行が大規模とならなかったのは①同時期はB型の流行最盛期であった．②都民の間には1973年春のA型流行によって産生

表6　ニワトリ免疫血清による交叉HI試験

ニワトリ免疫血清 ＼ 抗原	A／愛知2／68	A／熊本1／72	A／東京452／73	A／東京368F／73	A／東京364F／73	A／東京742／74
161 A/愛知2/68	2048	512	512	256	256	128
233 A/熊本1/72	512	4096	2048	2048	2048	2048
217 A/東京452/73	64	64	1024	512	512	256
235 A/東京368F/73	2048	4096	4096	4096	4096	4096

表7　ニワトリ免疫血清による交叉HI試験

ニワトリ免疫血清 ＼ 抗原	A／愛知2／68	A／福岡1／70	A／東京494／72	A／熊本1／72	A／東京452／73	A／東京364F／73	A／東京368F／73	A／東京742／74	A／東京749／74	A／東京3／74
162 A/愛知2/68	4095	4096	4096	1024	512	256	128	256	512	128
201 A/福岡1/70	8192	4096	2048	512	1024	256	256	256	256	256
213 A/東京94/72	8192	8192	8192	1024	1024	512	256	512	512	128
233 A/熊本1/72	1024	1024	1024	8192	2048	2048	1024	2048	2048	1024
217 A/東京452/73	64	128	64	<64	1024	128	128	128	1024	1024
235 A/東京368F/73	4096	4096	4096	16384	8192	16384	8192	16384	8192	8192
237 A/東京742/74	512	512	256	1024	4096	4096	2048	4096	4096	2048
239 A/東京3/74	256	256	256	512	2048	1024	1024	1024	1024	1024

された免疫が残っていたため，などが考えられる．

4. 都民血清の抗体保有状況

都内居住成人の「イ」B型ウイルスに対する血中HI抗体保有状況の変動を経時的に見ることにより都内の流行の実態を明らかにしようとの意図でワッセルマン反応検査のため集められた血清中から経時的に検体を採取してHI試験を行なった．成績は表8に示した．成人の血清では予想に反し，新型株の抗体保有率をHI価1：16以上で見ると流行前である3月に採取した血清でも半数以上のものが保有しており，以後9月まで抗体は全体としてはあまり大きな変動は見られなかったが，HI価1：64以上でみると1973年9月の抗体保有率は3月の2倍以上になっていた．旧型ウイルスに対する抗体保有率はHI価1：16以上では新型ウイルスの場合と同様であったが，HI価1：64以上の場合は新型の場合ほど明らかな上昇を示さなかった．この成績から考えると成人での流行蔓延はそれほど大きくなかったのではないかと思われた．また前述の抗体保有状況から1973年3月以前にすでに新型ウイルスが出現していたのではないだろうかとも考えられたので，それ以前の血清について検査を行なって新型ウイルスに対する抗体保有率を調査した．この結果は表8に示したごとくで，かなりの抗体保有率を示した．1965年12月，1957年12月に採取した成人血清の抗体保有率は1972年4月採血の血清の保有率を上廻り今回の流行中に得られた保有率に近かった．これとは逆に旧型株に対する抗体保有率では1972年，1965年，1957年と順次低下していった．以上の新型株に対するHI抗体の保有率の10数年来の推移はかなり興味ある成績である．事実の解明については今後検討したい．

小児の血清を経時的に多数採取することは困難であるので，都内4ヵ所の病院小児科に依頼し，7月より8月にかけ小児血清を採取HI試験を行なった．表9にその成績を示した．4病院とも新型ウイルスに対する血中抗体保有率は旧型に比べて明らかに低率であり，同時期の成人血清ではほとんど差がなかったのと対照的であった．また抗体保有率は地区によって大きな差が見られた．このことは地区によっては9月以降

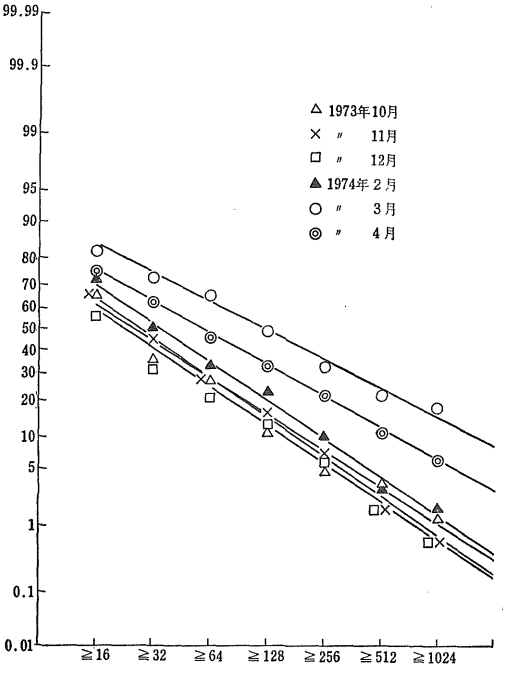
表8　都民成人血清のHI抗体保有率

年　月	件数	B/東京69/73 ≧16	≧32	≧64	B/東京63/73 ≧16	≧32	≧64
		%					
1973　3	168	52.4	31.0	16.7	51.2	36.9	23.2
1973　6	168	46.5	31.6	18.5	48.8	37.5	20.9
1973　8	168	66.1	43.5	28.6	57.8	44.7	29.2
1973　9	84	65.5	48.8	35.7	65.5	52.4	35.7
1972　4	108	36.7	24.6	12.5	40.0	30.7	17.9
1965　12	138	65.2	47.8	35.5	22.5	12.3	6.5
1957　12	107	57.0	35.5	27.1	14.0	10.3	4.7

表9　1973年7月～8月にかけて集められた小児血清のHI抗体保有率

病院名	検査数	B/東京69/73 ≧16	≧32	≧64	B/東京63/73 ≧16	≧32	≧64
		%					
E病院	50	20.0	16.0	10.0	36.0	34.0	30.0
T病院	140	24.0	17.4	6.6	48.3	43.8	35.5
H病院	47	49.6	30.7	27.8	83.2	77.9	58.7
S病院	62	27.3	12.8	7.9	45.5	38.8	34.0

図1　都民のインフルエンザウイルスに対するHI抗体保有状況の逐月変動



のB型ウイルス流行発生の可能性が残っていることを示していたものと考えられる．

次に健康都民の血中抗体保有状況の逐月変動から見たAホンコン型ウイルス流行の動向を推測した．毎月約160例の都内居住成人都民血清につきA／東京452／73株を用いてHI抗体を測定した．図1はその成績である．1973年10月から1974年2月にかけての抗体保有状況には大きな変動はなく，2月から3月にかけ高い抗体価を示す比率が多くなり，抗体保有率も上昇し，4月には若干下降した．このことから1973年秋にはAホンコン型「イ」の大きな流行はなく，局地的小規模な患者発生が細々と続き，2月から3月にかけて流行があったことがうかがわれた．

東京都における集団かぜの主病因は1973年9月より1974年2月にかけB型「イ」ウイルスであり，それ以後A型「イ」ウイルスがB型に取って変ってその主病因となった．著者らの検索した42集団は集団かぜとして届出られたクラス数の上からいっても1/100にも満たないものであり，まして患者数からいえば微々たるものである．それにもかかわらず表1に見られるごとく，8集団は病因が確認できなかった．またB型「イ」流行最盛期に，しかもA型の流行に先がけてAホンコン型「イ」ウイルスを検出したことは流行予測的な見地からも重要であると考えた．またアデノウイルスはB型の流行と時を同じくして6集団から18株も検出された．18株のうち未同定の1株を除き，すべて3型である．1973年の秋から冬にかけた集団かぜにおいてアデノ3型ウイルスの占めた役割はかなり大きかったといえる．

以上のことから東京都における今回の集団かぜの病因として演じた「イ」B型ウイルスの役割は重要であったが，他の病因の演じた役割も相当なものであることが確認出来た．したがって当然のことであるが，集団かぜにおける病因は検索対象のウイルス種類を多くして，幅広く，きめこまかい検索を行なうことが必要であろう．

結　論

1973年9月以降，1974年4月までに都内に発生した集団かぜのうち42集団の病因検索，健康都民における「イ」ウイルス血中抗体保有の逐月消長調査を行ない次の結論を得た．

1，1973年9月より1974年2月までの集団かぜの主病因は「イ」B型ウイルスであり，1974年2月以降の集団かぜの主病因はAホンコン型「イ」ウイルスであった．これらのことは都民の抗体保有状況の逐時的推移からも明らかにできた．

2．検出されたB型ウイルスは1973年7月以前の流行を起した新型ウイルスと抗原的に差がなかった．1973年秋に検出されたA型ウイルスは1974年の流行時のA型ウイルスと抗原的に差がなかった．

3．1974年2月以降のA型「イ」流行に先行してB型「イ」流行の最盛期であった1973年10月，11月Aにホンコン型「イ」の局地的小規模な患者発生を確認した．

4．今回の集団かぜの病因としてA，B型「イ」ウイルス以外にアデノ3型ウイルスの占めた役割はかなり大きいものであった．

附記：（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「流行閑期におけるインフルエンザウイルスの感染源は握の研究」として実施したものである）

文　献

1) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：都衛研年報（24）81（1972）
2) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，岩崎謙二，根津尚光：都衛研年報（25）13(1974)
3) 坂井冨士子，岩崎謙二，藪内　清，柏木義勝，山田澄夫，根津尚光：都衛研年報（21）15(1969)
4) 坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内　清，安藤泰正，佐々木路子，岩崎謙二，根津尚光：都衛研年報(23)41（1971）
5) 福見秀雄，武内安恵，石田正年，中山幹男，根路銘国昭，第21回日本ウイルス学会総会演説抄録1061（1973）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 65 — 68, 1974

1973年流行時に分離したインフルエンザB型ウイルスの抗原分析に関する研究

坂井冨士子* 伊藤忠彦* 藪内 清*
岩崎謙二* 根津尚光*

Antigenic Analysis of B Type Influenza Virus Isolated in 1973

FUJIKO SAKAI*, TADAHIKO ITO*, KIYOSHI YABUUCHI*,
KENJI IWASAKI* AND NAOMITSU NEZU*

緒　言

東京都において1973年1月から3月のインフルエンザ（以下「イ」と略す）A型ウイルス流行にひきつづいて4月下旬から集団かぜが多発し，ウイルス学的，血清学的検索の結果，従来の「イ」B型ウイルスとは抗原的にかなり異ったB型ウイルスによるものであったことが判明した．検索概要はすでに報告[1]したが，今回はさらにニワトリ免疫血清を用いた交叉赤血球凝集抑制（以下HIと略す）試験，患者血清，都内居住成人血清を用いたHI試験を行なって分離ウイルス株の抗原の詳細な解析につとめたので，その概要を報告する．

実験材料および方法

1　ウイルス抗原

1973年4月以降，7月までの流行期間中に都内で分離した26株のB型ウイルス中12株を選択し，孵化鶏卵培養を行ない，採取した漿尿液をHA抗原とした．なお分離株の起原，分離概要については前報に記載[1]した．B/群馬1/73株は北里研究所五十嵐博士より分与を受けた．HA抗原は0.01%にマーゾニンを添加し，4°C 氷室内に保存した．B/鹿児島1/68株，B/大阪2/70株は当研究室で継代中のものを用いた．またこれらB型株の対照としてA/東京452/73株，A/愛知2/68株を用いた．A／愛知2/68株以外のHA抗原の作成，保存は上記分離株と同じである．A/愛知2/68株のみは市販（武田薬品製）のものを用いた．

2　ヒト血清

実験に用いた患者血清は1973年4月以降，7月までの流行期間中および1971年3月のB型「イ」流行に際して得られた小中学校児童生徒の急性期および回復期の血清である．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中からサンプリングした．

3　ニワトリ免疫血清

今流行期に分離したウイルスのうちB/東京 63/73株，B/東京53/73株，B/東京69/73株，B/東京144/73株およびB/群馬1/73株を選び，9～10日孵化鶏卵の漿尿腔内に接種，35°C，72時間培養後，漿尿液を採取し，生理食塩水で10^{-3}に希釈したものをあらかじめ血中抗体のないことをたしかめたニワトリの翼下静脈に5 ml 宛接種し，以後1週間おきに10^{-2}，10^{-1}，10^{-0}希釈とウイルス量を漸時増量して免疫した．最終免疫した1週間後に試血を行ない免疫抗原に対する十分なHI価の上昇をたしかめてから全採血し，血清を採取した．前記以外のウイルス株に対するニワトリ免疫血清の作成も同じである．

4　血清検査

HI試験は微生物検査必携[2]に準じ行なった．多くの反応はマクロトレイ（トミー製作所製）で行なったが，交叉HI試験，一部患者血清のHI試験についてはマイクロタイター法で行なった．被検血清はRDE処理し，マクロトレイ法では 0.1ml の2倍倍数希釈列に4 *HAU*/0.1ml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を0.2ml

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ずつ加え，さらに室温1時間静置し，その血球凝集像により成績を判定した．またマイクロタイター法では血清希釈はピペットを用い，マクロトレイで母希釈を行ない各段階の希釈血清を0.025m*l*量のドロッパーで1滴ずつマイクロトレイ（LINBRO IS—MRC—96）に移し，抗原4 HAU/0.025m*l*，ついで 0.5％ニワトリ赤血球0.05m*l*を添加して試験を行なった．

実験成績および考察

東京都における1973年4月より7月までの「イ」流行期間中に分離したB型ウイルスは計26株である．分離した各ウイルス株はニワトリ免疫血清を用いた同定

表1　分離株のニワトリ免疫血清による同定試験

ニワトリ免疫血清 ＼ 抗原	B/鹿児島1/68	B/大阪2/70	東京/63/73	東京/53/73 (武蔵野第二小学校)	東京/69/73 (第一中学校)	東京/67/73 (第一小学校)	東京/50/73 (上高田小学校)	A/愛知2/68	A/東京452/73
179 B/鹿児島1/68	4096	2048	1024	<32	<32	<32	<32	<32	<32
204 B/大阪2/70	4096	8192	2048	256	128	128	256	<32	<32
161 A/愛知2/68	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	8192	1024
217 A/東京452/73	<32	<32	<32	<32	<32	<32	<32	256	8192

試験の結果，B型ウイルスと同定された．表1にその成績を示した．分離株26株のうち1株（B/東京63/73株）は従来のB型株（B/鹿児島1/68株，B/大阪2/70株）の免疫血清によってよく抑制されたが，他の25株はB/鹿児島1/68株の免疫血清ではまったく抑制されず，(<32)，高度に免疫されたB/大阪2/70株の免疫血清では若干抑制された．表2および表3は過去のB型「イ」にり患した患者と今流行期間中に得られた患者ペア血清の今期分離株，および従来のB型抗原に対

表2　1971年3月B型インフルエンザ流行時の患者のHI試験

患者	血清No.	採血月日 (1971)	HI試験 A/東京452/73	B/鹿児島1/68	B/大阪2/70	B/東京63/73	B/東京69/73
1	70・965	3月2日	16	512	256	128	<16
	70・978	〃 18	16	≧8192	≧8192	≧8192	32
2	70・966	〃 2	16	256	64	32	<16
	70・979	〃 18	32	≧8192	4096	512	<32
3	70・967	〃 2	64	256	128	64	<16
	70・980	〃 18	128	≧8192	≧8192	4096	64
4	70・968	〃 2	64	256	128	32	<16
	70・981	〃 18	64	≧8192	≧8192	4096	16
5	70・969	〃 2	16	512	256	64	<16
	70・982	〃 18	16	≧8192	4096	1024	<16

するHI試験の成績である．表2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抗体は従来のB型抗原に対するのと同様によく上昇したが，B/東京69/73株に対してはあまり有意な上昇が見られなかった．表3に示した1974年の患者血清ではB/東京53/73株，B/東京69/73株に対し有意な上昇を示し

表3　1973年4～5月B型インフルエンザ流行時の患者のHI試験

患者	血清No.	採血月日 (1973)	HI試験 A/東京452/73	B/鹿児島1/68	B/大阪2/70	B/東京63/73	B/東京69/73	B/東京53/73
		月 日						
1	73・36	4. 24	256	512	256	128	<16	<16
	73・52	5. 8	256	4096	1024	256	256	128
2	73・38	4. 24	64	1024	256	128	16	<16
	73・54	5. 8	64	4096	1024	512	128	256
3	73・39	4. 24	32	4096	1024	512	16	32
	73・55	5. 8	32	8192	2048	1024	128	512
1	73・62	5. 9	1024	4096	1024	512	<16	<16
	73・135	5. 18	1024	8192	2048	512	1024	512
2	73・63	5. 9	256	256	64	32	16	<16
	73・136	5. 18	256	256	128	256	1024	512
3	73・64	5. 9	256	512	512	256	16	<16
	73・137	5. 18	256	4096	4096	2048	512	256

たが，B/東京63/73株および従来のB型抗原にはそれほどの上昇は見られなかった．しかも従来のB型抗原に対して急性期にかなり高いHI抗体価を示した血清でもB/東京53/73株あるいはB/東京69/73株に対してHI抗体はほとんどの例で証明されなかった(<16)．以上のことから26株の分離株中1株(B/東京63/73株)のみが従来のB型株に抗原的に近似しており，他の25株は(B/東京53/73株，B/東京69/73株で代表される)抗原的に従来のB型株と相違した株であることがわかった．さらに詳細な抗原分析をするためにB/東京63/73株，B/東京53/73株，B/東京69/73株，B東京144/73株および群馬県下で今回の流行に際して分離した

表4　ニワトリ免疫血清による交叉HI試験

ニワトリ免疫血清 ＼ 抗原	B/鹿児島1/68	B/大阪2/70	B/東京63/73	B/東京53/73	B/東京69/73	B/東京144/73	B/群馬1/73
179 B/鹿児島1/68	4096	2048	1024	<32	<32	<32	
204 B/大阪2/70	4096	8192	2048	256	128	128	128
224 B/東京63/73	2048	4096	2048	64	128	32	64
222 B/東京53/73	<32	32	<32	2048	1024	1024	1024
229 B/東京69/73	<32	<32	<32	1024	4096	1024	4096
231 B/東京144/73	64	128	64	2048	1024	2048	1024
228 B/群馬1/73	<32	<32	<32	256	1024	256	2048

表5　患者ペア血清における抗原別HI抗体価

患者	血清No.	B/東京53/73	〃 69	〃 144	〃 70	〃 135	〃 136	〃 142	〃 172	〃 89	〃 91	〃 99	B/群馬1/73	B/東京63/73	A/東京452/73	ウイルス分離
A	73−63	<16	16	<16	<16	<16	<16	<16	16	<16	<16	<16	16	64	256	+
	136	1024	1024	512	<16	256	512	512	512	128	256	512	1024	512	128	
B	79	<16	32	<16	<16	<16	<16	<16	32	<16	<16	<16	32	256	64	−
	148	512	1024	256	16	256	256	256	512	128	256	256	1024	512	64	
C	80	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16	64	64	−
	149	256	128	128	16	64	64	128	64	32	64	64	64	512	128	
D	87	<16	16	<16	<16	<16	<16	<16	16	<16	<16	<16	32	128	128	−
	163	512	1024	128	32	128	256	256	1024	64	64	128	1024	256	128	
E	88	16	16	<16	<16	<16	<16	<16	16	<16	<16	<16	16	64	512	+
	164	128	64	64	16	32	64	64	32	32	32	32	64	256	512	
F	91	<16	32	<16	<16	<16	<16	<16	16	<16	<16	<16	32	256	128	+
	167	16	128	<16	<16	<16	16	<16	128	<16	<16	<16	256	256	64	

表6　同一標本（成人血清）のB型インフルエンザウイルスHI抗体価分布における株間の相関

B/大阪2/68					
0.94	B/東京63/73				
0.48	0.50	B/東京53/73			
0.51	0.32	0.56	B/東京144/73		
0.13	0.07	0.50	0.55	B/東京69/73	
0.02	0.00	0.48	0.60	0.94	B/群馬1/73

B/群馬1/73株(1973年度ワクチン株)に対するニワトリ免疫血清を作成し，交叉HI試験を行なった．表4はその成績である．以下便宜上B/東京63/73株以外の4つの分離株を一応新型株，B/東京63/73株を含む従来の株を旧型株として記載する．新型株の免疫血清はそれぞれのホモ株とともに他の新型株のいずれのウイルスの赤血球凝集をもよく抑制したが旧型株はほとんど抑制しなかった．逆にB/東京63/73株の旧型免疫血清はホモ株を含めた旧型株の赤血球凝集をよく抑制したが，新型株には極めて低い抑制価しか示さなかった．このようにニワトリ免疫血清による交叉HI試験の成績からも新旧両型株間には抗原的に大きな差のあることが明らかとなった．しかし新型株間の抗原上の差異を認めることはできなかった．この成績は前述の同定試験，患者血清の成績と一致するものである．

約40例の患者ペア血清につきB型「イ」ウイルス13株の抗原に対するHI試験を行なった．成績を表5に示した．新型の分離株に対して患者急性期血清のHI価はほとんど<16であったが，回復期血清では新型株に対する抗体価が株によって明らかな差が見られ，分離株の間に抗体親和性の差があることが想定された．しかし，なかには新旧型両株の抗原に対して同程度の抗体の上昇を示した患者もあった．また新型ウイルスを分離し得た患者で新旧型，両株の抗原に同程度の抗体上昇を示した例もあった．このような現象は感染ウイルスの抗原的差で説明するよりも，患者の過去のウイルス感染歴ないしワクチン接種歴との関連で考える方が妥当であろう．

B/東京53/73株，B/東京69/73株，B/東京144/73株，B/群馬1/73株，および旧型株であるB/東京63/73株，B/大阪2/70株の6抗原を用い，抗体のある成人血清約100例につき，それぞれのHI価を測定し，同一血清の株ごとのHI価を対応させ，株間相互の相関係数を算出して相関係数の値から試験したウイルス株の群別を試みると表6のようになる．すなわち新型，旧型および中間型の3群に分けることができた．中間型は

さらに2つに分けることができた．インフルエンザ感染歴のちがったヒト血清をつかったこの種の抗原分析成績では，①相関係数の値の差は定性的な抗原構造の差としてとることはできるが，定量的に反映していると考えることはできない．②相関係数上での一致は必ずしも抗原構造上の一致であると飛躍することはできない．この成績は前述のニワトリ免疫血清で得られた成績と矛盾するものではない．ニワトリ免疫血清によって得られた分析結果よりも，より詳細な分析が可能であった．

結　論

1973年4月下旬以降7月までの「イ」流行期間中に分離した「イ」B型ウイルスについて，ニワトリ免疫血清，患者血清，都内居住成人血清を用いたHI試験により，その抗原の解析を試みた結果，次の結論を得た．

1　ニワトリ免疫血清でのHI試験結果から分離した26株のB型ウイルスのうち1株（B/東京63/73株）は1970年流行したウイルス株に抗原的に近く，他の25株は，それとは抗原的に明らかに差のある，いわゆる新型株であった．

2　約100例の血清を用いHI試験を行ない，同一ヒト血清でのウイルス株ごとのHI価を対比させて算出した株間相互の相関係数の成績から，1973年の流行株は抗原的に新，旧および中間の3型に分けることができた．この結果はニワトリ免疫血清の成績と矛盾はしなかった．

附記：（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「流行閑期におけるインフルエンザウイルスの感染源は握の研究」として実施したものである）

文　献

1）坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内清，岩崎謙二，根津尚光：都衛研年報（24）81（1972）
2）日本公衆衛生協会：微生物検査必携1966
3）柏木義勝，岩崎謙二，村上一，坂井冨士子，藪内清，根津尚光：都衛研年報（19）67（1967）
4）坂井冨士子，岩崎謙二，藪内清，柏木義勝，村上一，中村義，根津尚光：都衛研年報（20）53(1968)
5）坂井冨士子，岩崎謙二，藪内清，柏木義勝，山田澄夫，根津尚光：都衛研年報（21）15（1969）
6）坂井冨士子，伊藤忠彦，藪内清，安藤泰正，佐々木路子，岩崎謙二，根津尚光：都衛研年報（23）41（1971）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 69 — 72, 1974

東京地区におけるBKウイルス感染の血清疫学的研究

岩崎謙二* 矢野一好* 柳沢靖子*
山崎清* 田口文章**

Incidence of Antibody against BK Virus among Tokyoites and Animals in Tokyo

KENJI IWASAK*I, KAZUYOSHI YANO*, YASUKO YANAGISAWA*,
KIYOSHI YAMAZAKI* AND FUMIAKI TAGUCHI**

緒言

Gardner ら[1]（1971年）は腎臓移植手術を受けた患者の尿から新しいPapovavirus（BKウイルス）を分離した．同ウイルスの病原性を示唆する報告[2]はあるが，その病原性は未だ明らかになっていない．

Gardner ら[3]および Shah ら[4]は英国および米国における正常人のBKウイルスに対する抗体保有状況を調査し，その結果からBKウイルスは幼少期に初感染をおこす，ごくありふれたウイルスの一つであると考えている．

著者らは本邦におけるBKウイルスの汚染状況を知る目的で，東京都在住の正常人のBKウイルスHI抗体保有状況を調査し，また都内および近郊で飼育した豚，家兎および山羊のBKウイルスHI抗体保有状況を調査した．

実験材料と方法

被検血清：ヒト，ブタ，ウサギおよびヤギから採取した血清を試験に用いた．採取した血清は−20°Cのフリーザー内に凍結保存した．

抗体価測定に用いたヒト血清は，1972年および1973年の10～12月に，年齢0歳～75歳の東京都内居住健康者447名から，1958年に健康成人63名から採取したものである．

抗体価測定に用いたブタ血清は，1973年12月に，都内の屠場において採取した都内飼育のブタ94頭のものである．

抗体価測定に用いたウサギ血清は，1963年～1974年の12年間に採取した家兎血清148例で，都の近郊で飼育した後，実験の目的で当研究所に購入されたウサギの血清である．

抗体価測定に用いたヤギ血清は，1971年に都内飼育中の22頭から採取した．

HI試験：マイクロトレイ(LINBRO-IS-MRC)を使用して微量法により行なった．

HA抗原は，Gardner博士からBKウイルス株の分与を受け，同ウイルスのVero細胞培養を行なって作成した．HA抗原は4°Cに冷蔵した．

BKウイルスのHA反応条件を種々検討した結果，赤血球としてヒトO型血球を，希釈液として pH6.4の燐酸緩衝食塩液（PBS）を用い，4°Cで反応させた時に，もっとも高い，安定したHA価が得られた．

各種ウイルスのHI試験に際して，被検血清中の非特異抑制物質（normal inhibitor）除去法[5]として広く利用されているRDE法，KIO_4 法，アセトン法およびカオリン法のBKウイルスHI価におよぼす影響を検討し，本試験には56°C 30分間処理の血清を使用した．

56°C 30分間加温処理した被検血清は，1/50MのPBS（pH6.4）で，0.025ml の2倍倍数希釈列をつくり，4凝集単位/0.025ml のBKウイルスHA抗原を加え，室温で30分間反応させてから，1％のヒトO型赤血球浮遊液を0.05ml 滴下し，よく混和して4°Cに1時間静置して，トレイ穴底の血球凝集を判定してHI価を決定した．HI価は4単位のHA抗原の凝集を完全阻止する被検血清の最高希釈倍数で表現した．

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
**北里大学衛生学部微生物教室

表1 各種非特異抑制物質除去法のBKウイルスHI価におよぼす影響

血清番号	被検血清処理法とHI価 (2^n)				
	RDE法	KIO_4法	アセトン法	カオリン法	対照 56°C 30分
1	7	6	7	8	8
2	7	6	7	8	8
3	8	7	8	8	9
4	7	5	6	6	7
5	8	7	8	9	9
6	6	4	5	6	6
7	8	7	7	7	9
8	8	7	6	8	9
9	5	3	5	4	5
10	5	<3	5	3	5
11	7	7	7	7	7
12	5	<3	5	<3	5
13	7	5	7	7	8
14	5	<3	5	4	5
15	7	7	7	7	7
16	8	7	7	7	7
17	8	7	7	9	8
18	7	6	7	7	7
19	7	5	7	8	7
20	7	6	7	7	7

注：HI価は繰返し3回の実測値から最多値を示した．

実験成績と考察

1）被検血清における非特異的抑制物質（normal inhibitor）の除去法の検討

他ウイルスのHI試験において，被検血清の normal inhibitor 除去法[5]として広く利用されている RDE法，KIO_4法，アセトン法，カオリン法のBKウイルスHI試験における効果を，成人血清20例について検討し，その成績を表1に示した．

上記の各法で処理した被検血清のHI価を，同一血清の56°C 30分間加温時に得られたHI価（対照）に比較すると，KIO_4法による処理群は明らかに低下した．他の3法の処理群はそれほど明らかな低下をみなかった．

KIO_4処理により有意なHI価の低下を示した血清は，対照とした 56°C 30分間加温時のHI価が 2^5（1：32）以下であった．

この実験結果から，BKウイルスのHI価は40以上で考えるかぎり，normal inhibitor の影響はほとんどないものと思う．

2）東京都民のBKウイルスHI抗体保有状況

都民の間における最近のBKウイルス浸淫状況を知るために，1972年および1973年の10～12月に採血した都内居住健康者血清447例についてBKウイルスHI試験を行なった．その成績から供給者の年齢区分別に抗体価分布を示すと表2のようになる．

HI価 5×2^3 以上の抗体保有率をみると，調査した各年齢区分ではほとんど100%であったが，高いHI価を示した血清は低年齢階層に多かった．平均HI価は年齢階層によって差があった．最高のHI価 $5\times2^{8.14}$ を示した1～3歳群のHI価分布をみると，明らかに二つの亜群にわけられた．1一つの亜群の平均価は $5\times2^{5.43}$ で，他は $5\times2^{10.86}$ であった．5～30歳の各年齢階層の平均HI価は $5\times2^{5.65}$～$5\times2^{6.16}$ の間にあり

表2 1972～1973年における東京都民のBKウイルスHI抗体保有状況

年齢区分	試験件数	HI価 (5×2^n) 別分布												平均HI価	標準偏差
		<3	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
～1歳	4			1	3									4.75	0.43
1～3	14			1	3	2	1		2	1	2		2	8.14	3.00
5～10	69	2	3	10	7	17	15	9	5	1				6.06	1.93
11～15	62	1	3	10	14	12	11	5	4	1	1			5.89	1.90
16～20	103	1	2	15	24	18	18	15	6	4				6.16	1.80
21～30	48	1	6	2	14	13	4	4	3	1				5.65	1.88
31～40	70	4	12	15	10	9	13	3	4					5.01	2.12
41～50	47	4	6	10	13	8	2	4						4.62	1.95
51～60	24	1	8	4	4	6	1							4.29	1.57
61～	7		5	1			1							3.71	1.39
計	447	14	44	69	92	85	66	40	24	8	3		2	5.63	

安定していたが，その後は年齢が長ずるに従って低下し，61歳以上の階層で最低の $5\times2^{3.71}$ 価を示した．

英国での Gardner らの調査成績[3] および米国での Shah らの調査成績[4]をみると，年齢階層別に算出された抗体保有率は，10歳ぐらいまで上昇し，それ以上の年齢階層では徐々に減少した．平均HI価の変動でとらえた著者らの年齢推移調査成績もほぼ同一傾向を示した．

都内における過去のBKウイルス浸淫状況を知るために，1958年に採血し，−20°C に凍結保存しておいた都内居住成人血清63例についてBKウイルスHI試験を行なった．その試験結果からHI価分布を示すと表3のようになる．

表3 1958年，東京都在住成人血清のBKウイルスHI抗体保有状況

検査件数	HI価 (5×2^n) 分布							
	<3	3	4	5	6	7	8	9
63	23	18	11	8	3	・	・	・

HI価 5×2^3 以上の抗体保有率は63.5%で，1972年の同年齢階層に比較して明らかに低率であった．

都内におけるBKウイルス浸淫は1958年より1972〜3年の方が増大したと推定された．

3）都内または近郊で飼育した動物のBKウイルス抗体保有状況

動物におけるBKウイルス抗体保有調査の報告はない．その実態を知る目的で，著者らは1973年12月に採取した都内飼育豚血清94例，1963年〜1974年の12年間に採取した実験家兎血清148例および1971年に採取した山羊血清22例についてBKウイルスHI試験を行なった．その試験成績から，ブタ，ウサギおよびヤギ血清のHI価分布を示すと表4のようになる．

表4 東京都内または近郊で飼育した動物血清のBKウイルスHI抗体保有状況

動物種類	採血時期	検査件数	HI価 (5×2^n) 分布							
			<3	3	4	5	6	7	8	9
ブタ	1973年	94	82	11	1	・	・	・	・	・
ウサギ	1963〜1974年	148	42	46	34	15	10	1	・	・
ヤギ	1971年	22	22	・	・	・	・	・	・	・

HI価 5×2^3 以上の抗体保有率を算出すると，ブタ血清では12.8%，ウサギ血清では71.6%，ヤギ血清は0%で，抗体保有率は動物種類によって大きな差があった．

なおウサギ血清について，抗体価分布の年次推移を示すと表5のようになる．

1969年以降に，高いHI価（5×2^5 以上）を示す血清が出現するようになった．

このウサギにおけるHI抗体保有状況の年次推移は，前述したヒト血清の抗体保有調査結果から考察した都内におけるBKウイルス浸淫の近年の増長を支持している．

表5 実験家兎におけるBKウイルスHI抗体保有状況の年次推移

採血年次	試験例数	HI価 (5×2^n) 分布								平均HI価	標準偏差
		<1	1	2	3	4	5	6	7		
1963	20	2		8	9	1				2.35	0.96
1964	5	1			3	1				2.60	1.36
1965	5	1	1	1	2					1.80	1.17
1966	17	9		4	4					1.18	1.29
1967	5				5					3.00	0.00
1968	7			3	3	1				2.71	0.70
1969	11				1	5	1	4		4.73	1.05
1970	21			1	10	8	2			3.52	0.73
1971	15			1		5	6	3		4.67	1.01
1972	20			2	4	8	3	3		4.05	1.16
1973	12			2	4	3	2		1	3.75	1.36
1974	10	1	3	2	1	2	1			2.30	1.55

結　論

東京地区におけるＢＫウイルス浸淫状況を知る目的で，1958年および1927～３年に採取した健康都民血清510 例，1973年に採取した都内飼育豚血清94例，1963～1974 年の 12 年間に採取した 実験家兎血清 148 例，1971年に採取した山羊血清22例について，ＢＫウイルスＨＩ試験を行ない，次の結論を得た．

１）ヒト血清中のＢＫウイルスに対する normal inhibitor はＫＩＯ$_4$処理によって除去できたが，ＲＤＥ，アセトン，カオリン処理ではほとんど除去できなかった．ヒト血清中の normal inhibitor の力価は１：32以下であった．

２）1972～３年に採取した正常都民血清におけるＢＫウイルスＨＩ抗体保有率は，ＨＩ価 5×2^3 以上で算出すると全年齢階層がほとんど 100% であった．高いＨＩ価を示した血清は低年齢階層に多く，年齢階層別に算出した平均ＨＩ価は，１～３ 歳群をピーク（$5\times2^{8.14}$）に，年齢上昇にしたがって低くなった．

３）1958年における成人都民のＢＫウイルスＨＩ抗体保有率は63.5%で，1972～３年に比べて明らかに低率であった．

４）東京地区飼育動物から採取した血清のウイルスＨＩ抗体保有率（ＨＩ価 5×2^3 以上）は動物種類によって差があった．ブタ血清では 12.8%，ウサギでは 71.6%，ヤギでは０%であった．

５）ウサギ血清について1963～1974年のＨＩ価分布年次推移をみると，1969年から高いＨＩ価（5×2^5 以上）を示した血清が出現した．

文　献

１）Gadner, S.D., Field, A. M., Coleman, D.V., and Hulme, B. : *The Lancet*, 1253～1257(1971)

２）Major, F.O. and Mayorca, G.D. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70, 320～3212 (1973)

３）Gardner, S.D. : *Brit. Med. J.*, 1, 77～78(1973)

４）Shah, K.V., Daniel, R.W. and Warsazawski. R.M. : *J. Infect. Dis.*, 128, 784～787 (1973)

５）長木大三：ウィルス学，443～462 (1964)，朝倉書店，東京

Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 73 — 78, 1974

1973年東京都におけるライノウイルス感染の血清疫学的研究

岩崎謙二* 矢野一好*

Incidence of Antibodies against Rhino Viruses in Tokyoites in 1973

KENJI IWASAKI* AND KAZUYOSHI YANO*

緒　言

呼吸器感染症の病因として，ライノウイルスの果す役割について，近年明らかになってきているが，わが国においては，ほとんど究明されていない．

われわれは，都内におけるライノウイルスの感染実態を知るために，1973年6月，および，10月に採取した健康都民血清194例について，ライノウイルス1A，2，13，14，30型に対する中和抗体保有状況を調査し年令別中和抗体保有率の推移を，各型ごとに考察し，さらに，1973年冬季に採取したカゼ患者43名のペア血清についても，抗体変動を調べ，病因として，ライノウイルスが果した役割について，検討した．

実験材料および方法

1）被検血清

1973年6月，および，10月に，生後8か月から75歳までの，健康都民194例より採取した単一サンプル血清と，カゼ患者43名から採取したペアサンプル血清を用いた．血清は，試験を行なうまで−20°Cのフリーザー内に，凍結保存した．

2）HEL細胞の培養

ヒト胎児の肺を，消化コルベンに入れて，37°Cで0.125% Trypsin 消化後，Eagle's MEM に fetal Calf serum (GIBCO社) を10%の割合に加え，抗生物質を添加し37°Cで1週間培養した．実験には，8～13代継代のHEL細胞を，使用した．細胞数30～50万個/mlのHEL細胞浮遊液を microculture plateに0.2ml/well づつ分注し，37°Cの炭酸ガスふ卵器で，1～2日間培養後，Cell sheetの状態を，鏡検確認して使用した．

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratry of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

3）ウイルス

使用したライノウイルス株は，1A型（ECHO 28-JH），2型(HGP株)，13型(353株)，14型(1059株)，30型（106F株）で，日本医科大学衛生学教室の飯田氏より分与された．ウイルスの培養は，川名らの方法[1,2]に準じて行なった．full sheetになったHEL細胞を，維持液（fetal Calf serum 1%，$MgCl_2$ 30 mM，抗生物質を加えたL-15培地）に，交換し，各型ウイルスを接種し，33°Cで3～4日間，回転培養を行ない，凍結隔解後，3000rpm30分間遠心し，小試験管に3mlづつ分注し中和試験用のウイルス液とした．ウイルス液は，試験まで−80°Cのディープフリーザー内に凍結保存した．各型ウイルス液は，あらかじめ数回のくり返し実験により感染価を測定しておいた．また，本試験ごとに back titration を行なって感染価を再確認した．

4）中和試験

健康者血清の中和試験は，microtiter法[1,2]により実施した．microculture plate，および，Transfar plate は，Cook 社製を使用した．被検血清は，試験時に維持液で1：8に希釈し，56°C 30分加熱した．Transfar plate に被検血清 0.025ml と，$100TCID_{50}$/0.025ml に調製した各ウイルス液を混合後，室温（約24°C）で1時間30分反応させ，維持液と交換したHEL細胞の full sheet に接種後，33°Cの炭酸ガスふ卵器に入れ1週間の観察でCPEの出現しなかった被検血清を中和抗体陽性とした．

カゼ患者のペア血清は，維持液を0.025mlづつ分注した Transfar plate とダイリューター (Cook社製) を用いて2段階希釈し，前述の方法で microplate に接種後1週間観察し，CPEの出現をみなかった血清の最高希釈倍数をもって中和抗体価とした．

実験成績および考察

1）健康都民のライノウイルス中和抗体保有状況

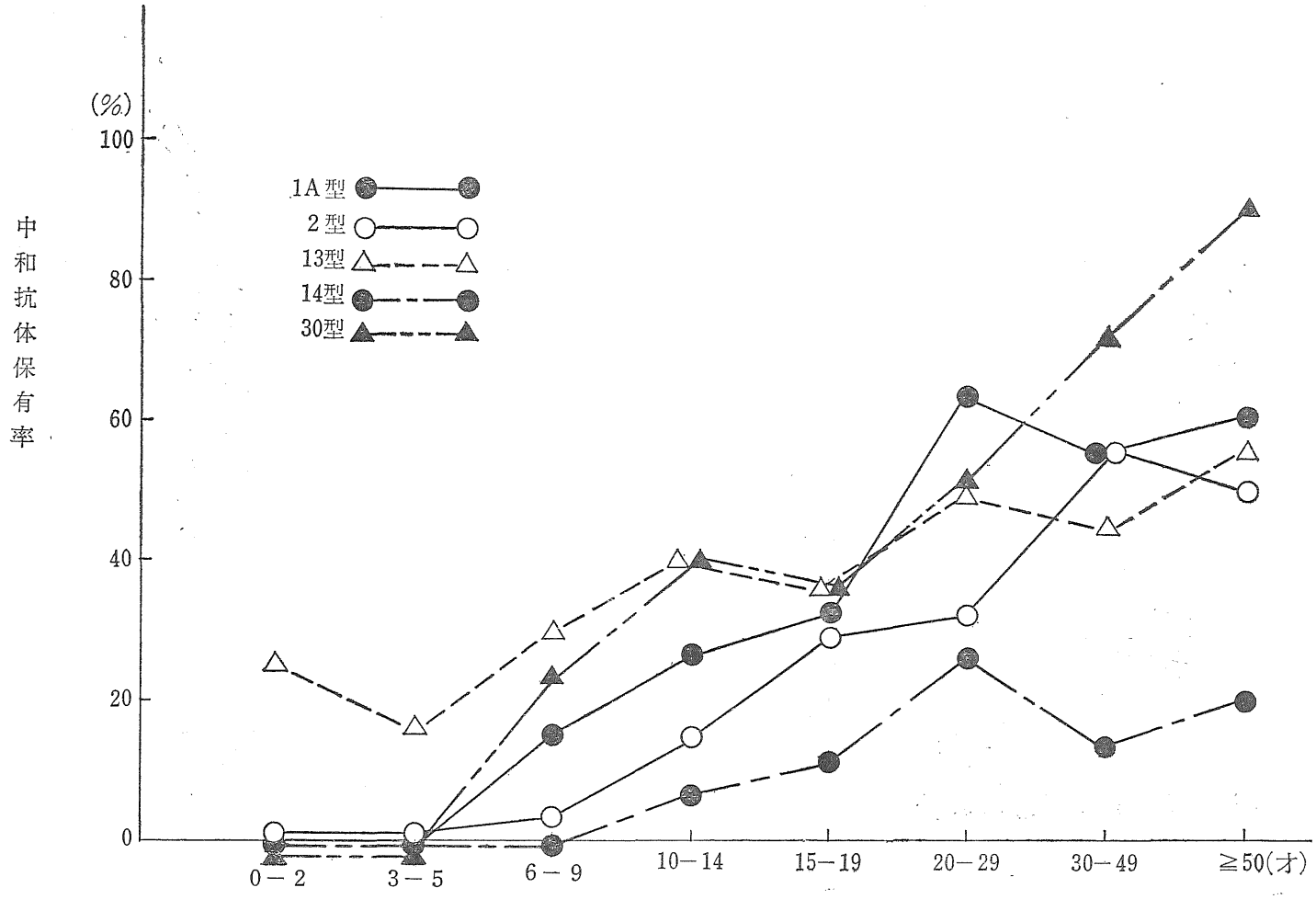


図1　ライノウイルス型別，年令別，中和抗体保有率の推移（血清希釈1：8）

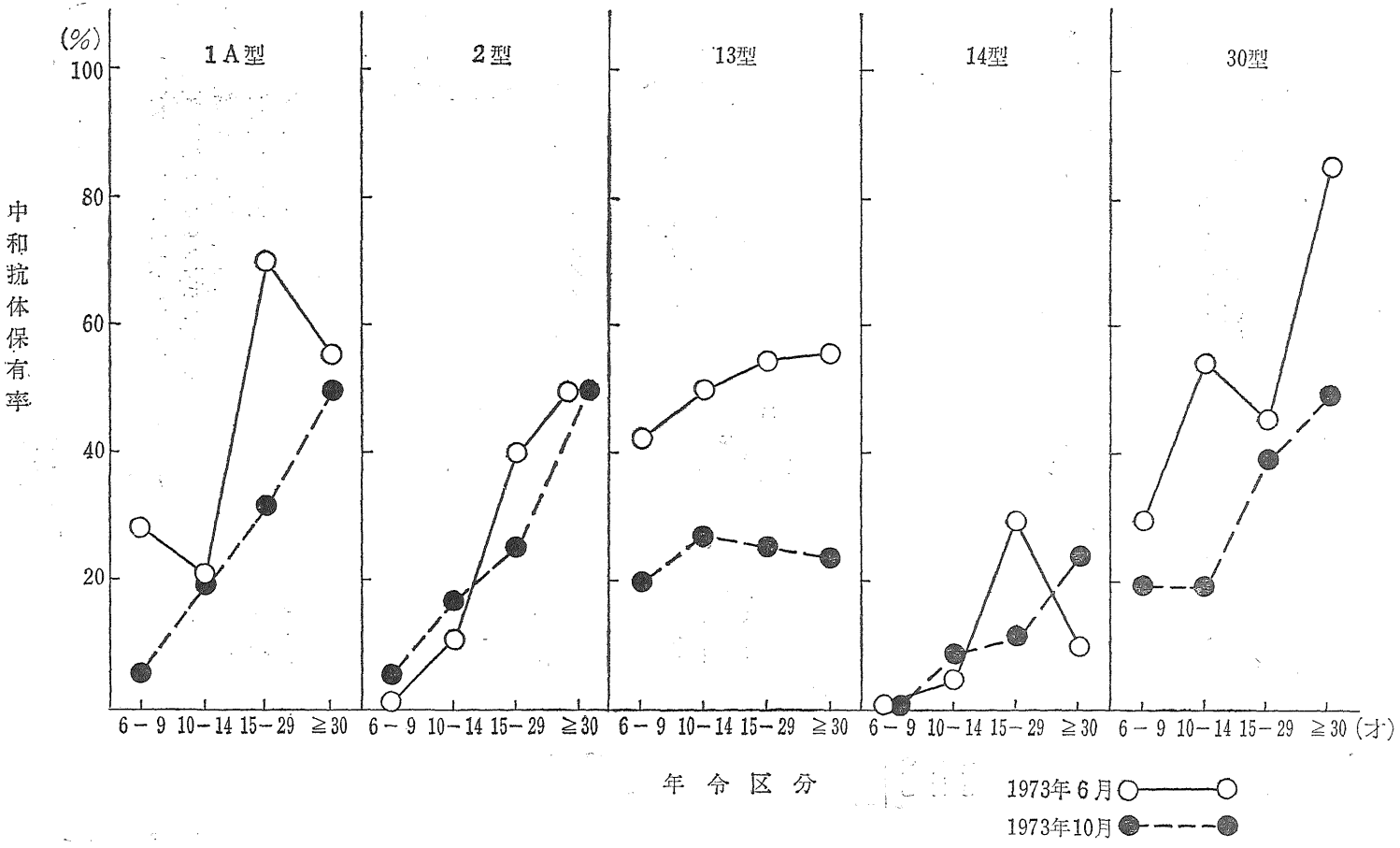


図2　ライノウイルス中和抗体保有率の年令別，月別推移（血清希釈1：8）

1973年6月，および，10月に採取した健康都民の血清194例について，血清希釈1：8における，ライノウイルス1A，2，13，14，30型に対する中和抗体保有率を，ウイルス型別に，各年令層別に示すと表1のようになる．中和抗体保有率の加令変動傾向をみると図1に示したとうりで，加令とともに著じるしい保有率の上昇を示す1A，2，30型，あまり変動のない13型，そして，保有率が全般的に低く，加令変動の少ない14型の3つのパターンに分類出来た．

表1　ライノウイルス型別，年令別中和抗体保有率

年令＼型	1A	2	13	14	30	件数
	%					
0—2	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	8
3—5	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	6
6—9	14.7	2.9	29.4	0.0	23.5	34
10—14	26.2	14.3	40.5	7.1	40.5	42
15—19	33.3	29.2	37.5	12.5	37.5	48
20—29	63.3	31.8	40.9	27.2	50.0	22
30—49	57.1	57.1	42.9	14.3	71.4	14
≧50	60.0	50.0	55.0	20.0	90.0	20

（中和抗体≧1：8）

まず第1のパターンをみると，1A，2，30型はともに5歳まで抗体保有者はまったくみられず，6歳から加令とともに上昇した．なかでも，30型は加令にともなった抗体保有率の上昇がもっとも急激で，30～49歳で71.4%，50歳以上では90.0%と著明な上昇がみられた．

次に，第2のパターンである13型の場合をみると，5歳以下の幼児においてもかなりの抗体保有率がみられた（16.7～25.0%）．しかし，加令に対応した保有率の上昇は，あまり顕著ではなかった．

次に第3のパターンである14型をみると，全年令層を通じ，保有率が最も低率で，9歳以下には，まったくみられず，それ以上の年令層においても12～27%と著じるしい上昇はなかった．

これら3つのパターンの加令変動から，ライノウイルスの中和抗体保有率は，ウイルスの型によって差があることがわかった．

次に1973年6月と10月における保有率を比較し，表2に示した．その加令変動は，図2に示すとうりになり，図1の傾向と同じであった．しかし，各型とも一様に6月に比べて10月の保有率に低下がみられた．もっとも低下が急激であったのは13型であった．6～9歳において42.8%が20.0%に，10～14歳で50.0%が33.5%に，15～20歳で55.0%が32.0%に，30歳以上では56.6%が25.0%と各年令層をつうじ保有率の著明な低下がみられた．1Aおよび，30型においては，13型ほどの保有率の低下はみられなかったが，一部の年令層において低下がみられた．2型においては，各年令層ともに，著じるしい変化はなかった．14型においては，両時期ともに低い保有率であり，両者の差は明らかではなかった．これら各型の抗体保有率の季節変動は，1971年から1972年の川名らのデーター[2]に非常によく一致した．また，都内において1973年春，13型の流行があったであろうと推測された．1960年から1966年にかけて上気道感染患者の病原検索を行なったHamre らも，ライノウイルスの流行は，冬よりむしろ春に多い[4,5]と言っている．

表2　年令別，月別ライノウイルス中和抗体保有率

年令＼型・月	1A		2		13		14		30		検査件数	
	6	10	6	10	6	10	6	10	6	10	6	10
	%											
6—9	28.5	5.0	0.0	5.0	42.8	20.0	0.0	0.0	28.5	20.0	14	20
10—14	22.2	29.2	11.1	16.7	50.0	33.5	5.5	8.3	55.6	29.2	18	24
15—29	70.0	32.0	40.0	26.0	55.0	32.0	30.0	12.0	45.0	40.0	20	50
≧30	56.7	50.0	50.0	50.0	56.6	25.0	16.7	25.0	86.7	50.0	30	4

（中和抗体≧1：8）

2）カゼ患者のライノウイルス中和抗体保有状況

1973年冬季に発生したカゼ患者のペア血清43ペアについて，ライノウイルス各型の中和抗体価を測定し，表3～6に示した．表3のペア血清は，インフルエンザA型に対して抗体価の上昇があったもの，表4は，インフルエンザB型に対して抗体価の上昇があったもの，表5は，アデノウイルスに対して抗体価の上昇があったもの，表6は，これらのウイルスに対して有意な抗体上昇がなかったものである．ライノウイルス各型に対する抗体価の変動があったものは，表中に□印

表3　A型インフルエンザ患者血清のライノウイルス中和試験成績

患者血清	年令	補体結合反応			ライノウイルス中和試験				
		イA	イB	AD	1A	2	13	14	30
1 急性期	11	8	8	—	—	—	8	—	8
回復期		16	8	—	—	—	8	—	8
2 急性期	11	—	—	—	[—]	—	8	—	8
回復期		64	—	—	[8]	—	8	—	8
3 急性期	11	8	8	—	—	8	8	—	[—]
回復期		32	8	—	—	8	8	—	[8]
4 急性期	11	—	8	8	—	—	8	—	[64]
回復期		32	8	8	—	—	8	—	[32]
5 急性期	11	8	—	—	—	—	8	—	[—]
回復期		32	—	—	—	—	8	—	[8]
6 急性期	10	—	8	8	—	—	8	[32]	—
回復期		16	16	8	—	—	8	[16]	—
7 急性期	10	—	8	—	—	—	8	—	32
回復期		32	—	—	—	—	8	—	32
8 急性期	10	—	—	—	—	—	8	—	8
回復期		≧128	—	—	—	—	8	—	8
9 急性期	10	—	—	8	—	—	8	—	—
回復期		8	—	8	—	—	8	—	—
10 急性期	10	—	—	—	—	—	8	—	8
回復期		32	—	—	—	—	8	—	8

イA：A型インフルエンザ　AD：アデノウイルス
イB：B型インフルエンザ　—：抗体価＜8

表4　B型インフルエンザ患者血清のライノウイルス中和試験成績

患者血清	年令	補体結合反応			ライノウイルス中和試験				
		イA	イB	AD	1A	2	13	14	30
11 急性期	6	—	—	—	—	—	8	—	—
回復期		—	16	—	—	—	8	—	—
12 急性期	6	—	—	64	—	—	8	—	[8]
回復期		—	64	≧128	—	—	8	—	[—]
13 急性期	11	—	—	—	—	—	8	—	—
回復期		—	32	—	—	—	8	—	—
14 急性期	15	8	—	—	—	8	8	—	—
回復期		8	16	—	—	8	8	—	—
15 急性期	15	—	—	—	—	—	8	—	—
回復期		—	32	—	—	—	8	—	—
16 急性期	15	—	—	—	—	—	8	—	—
回復期		—	32	—	—	—	8	—	—
17 急性期	15	—	—	—	—	—	8	[—]	8
回復期		—	16	—	—	—	8	[8]	8
18 急性期	15	—	—	—	—	—	—	—	8
回復期		—	32	—	—	—	—	—	8
19 急性期	10	—	—	—	—	—	8	—	—
回復期		—	32	—	—	—	8	—	—
20 急性期	11	—	8	32	—	—	8	—	8
回復期		—	32	16	—	—	8	—	8

イA：A型インフルエンザ　AD：アデノウイルス
イB：B型インフルエンザ　—：抗体価＜8

表5　アデノウイルス患者血清のライノウイルス中和試験成績

患者血清	年令	補体結合反応			ライノウイルス中和試験				
		イA	イB	AD	1A	2	13	14	30
21 急性期	8	16	16	—	—	—	—	—	—
回復期		16	8	64	—	—	—	—	—
22 急性期	7	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	—	64	—	—	—	—	—
23 急性期	7	—	—	32	—	—	8	—	—
回復期		—	—	≧128	—	—	8	—	—
24 急性期	8	—	—	8	—	—	—	—	—
回復期		—	—	32	—	—	—	—	—
25 急性期	8	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	16	64	—	—	—	—	—
26 急性期	8	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	—	64	—	—	—	—	—
27 急性期	8	—	—	8	8	—	—	—	—
回復期		—	16	32	8	—	—	—	—
28 急性期	8	—	—	—	—	—	—	—	[16]
回復期		—	—	32	—	—	—	—	[8]
29 急性期	6	—	—	32	8	—	—	—	—
回復期		—	—	64	8	—	—	—	—
30 急性期	6	—	—	8	—	—	—	—	8
回復期		—	—	32	—	—	—	—	8

イA：A型インフルエンザ　AD：アデノウイルス
イB：B型インフルエンザ　—：抗体価＜8

で表示したが，いづれも有意な上昇を示したものはなく，これらの各型ライノウイルスが1973年冬季のカゼ疾患の病因として，重要な役割を演じていなかったものと，推測する．これら43名の患者の発生は，10月から12月までであり，ライノウイルスの流行季節と，ずれがあったためこのような結果になったものと考えられる．また，興味深かったことは，インフルエンザA型，および，B型ウイルス疾患々者のペア血清20例中19例が，13型に対して8倍の中和抗体価を保有していたのに対して，アデノ，および，原因不明のカゼ患者では，23名中わづかに1名のみが13型の抗体を保有していたことである．このことについては，今後究明してゆきたい．

結　論

1973年6月，および，10月に採取した健康都民血清194例について，ライノウイルス1A，2，13，14，30型に対する中和抗体保有率（血清希釈1：8）を調査し，さらに1973年冬季のカゼ患者のペア血清43ペアについて，中和抗体価を測定し，次の結論を得た．

1）試験した5株のライノウイルスに対する都民の中和抗体（≧1：8）保有率の，加令変動は，次の3

表6　A，B型インフルエンザおよびアデノウイルス以外のカゼ患者血清のライノウイルス中和試験成績

患者血清	年令	補体結合反応			ライノウイルス中和試験				
		イA	イB	AD	1A	2	13	14	30
31 急性期	5	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	—	—	—	—	—	—	—
32 急性期	4	—	—	--	—	—	—	—	—
回復期		—	—	—	—	—	—	—	—
33 急性期	5	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	—	—	—	—	—	—	—
34 急性期	5	—	—	—	—	—	—	—	—
回復期		—	—	—	—	—	—	—	—
35 急性期	7	—	—	—	[—]	—	—	—	—
回復期		—	—	—	[8]	—	—	—	—
36 急性期	7	—	—	16	—	—	—	—	—
回復期		—	—	16	—	—	—	—	—
37 急性期	8	—	—	—	—	8	—	—	—
回復期		—	—	—	—	8	—	—	—
38 急性期	8	—	—	—	—	—	—	—	8
回復期		—	—	8	—	—	—	—	8
39 急性期	10	—	—	8	—	—	—	—	—
回復期		—	—	8	—	—	—	—	—
40 急性期	8	8	8	—	—	—	—	—	—
回復性		8	8	—	—	—	—	—	—
41 急性期	8	—	—	8	—	—	—	—	8
回復性		—	—	8	—	—	—	—	8
42 急性期	10	—	—	32	—	—	—	—	—
回復性		—	—	16	—	—	—	—	—
43 急性期	21	8	32	8	—	8	—	—	8
回復性		—	16	8	—	8	—	—	8

イA：A型インフルエンザ　AD：アデノウイルス
イB：B型インフルエンザ　—：抗体価＜8

つのパターンに分類出来た．1A，2，30型は，加令とともに著しい上昇を示した．とくに，30型がもっとも顕著であった．13型は，低年令層においても，抗体保有者があり，加令変動が，著しくなかった．14型は，全年令層を通じ，保有率も低く，加令上昇もゆるやかであった．

2）1973年6月と10月の中和抗体保有率を比較すると，各型とも，6月より10月が低率であった．とくに13型において両者の差が著しく，6～9歳で42.8%が20.0%に，10～14歳で50.0%が33.5%に，15～29歳で55.0%が32.0%に，30歳以上で56.6%が25.0%と，各年令層とも抗体保有率の著しい低下がみられた．

3）1973年冬季のカゼ患者のペア血清のライノウイルスに対する中和抗体は，各ペア血清ともに有意な抗体価の変動が，みられなかった．

文　献

1）川名林治，松本一郎，稲田捷也，金子克，笹生恵子：臨床とウイルス　1，11～16 (1973)

2）川名林治，松本一郎，稲田捷也，斎藤都，佐藤豊：臨床とウイルス　1　17～26 (1973)

3）John H. Hughes, Donald C. Thomas, and Vincent V. Hamparian : *P.S.E.B.M.* 144, 555～560 (1973)

4）Hamre, D. : *J. Lab. Clin. Med.* 64, 450, (1964)

5）Hamre, D. : *Am. J. Epid.* 83, 238, (1966)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 79 — 84, 1974

市販医療用医薬品の品質について（Ⅲ）
コカルボキシラーゼ注射薬

田窪栄一* 重岡捨身*
宮武ノリエ* 上原真一*

On The Quality of Medical Medicines （Ⅲ）
Co-Carboxylase Injectiones

EIICHI TAKUBO*, SUTEMI SHIGEOKA*
NORIE MIYATAKE* AND SHIN-ICHI UEHARA*

1 はじめに

市販医療用医薬品のうち今回は多くのチアミン誘導体の中で補酵素型チアミンとして医療用に供されているコカルボキシラーゼ注射薬についてその品質を検討し，試験方法とその結果について報告する．

1911年 Neuberg によって酵母のアルコール醗酵の際に糖質代謝の重要な中間生成物である焦性ブドウ酸（ピルビン酸 $CH_3CO\cdot COOH$）に対し接触的に作用して二酸化炭素とアセトアルデヒドに分解するある種の酵素が広く酵母その他の植物界に分布していることが発見され，つづいて Auhagen (1932年) はこれが補助酵素と酵素タンパクより成ることを知り，補助酵素をコカルボキシラーゼと呼び，さらに1937年 Lohmanはこれを結晶状に分離してこのものがチアミンピロリン酸エステル (Thiamine pyrophosphate, Thiamine diphosphate 以下ＴＤＰと略す) であることを明らかにすると同時に，脳組織を用いてチアミンとリン酸塩からこれを合成した[1]．これによりチアミンピロリン酸エステルが炭化水素の代謝の中心をなすものとされている焦性ブドウ酸の分解変化に補酵素として重要な役割を果すことが明らかにされ，コカルボキシラーゼ注射薬は糖質代謝に必須不可欠なものとして，内科的に心疾患，肝疾患等に高単位製剤が用いられ，その他神経科，小児科，産婦人科等に広く使用されるに至った．しかしながらこの種の製造承認内容を検討すると，総チアミンを定量しＴＤＰとする方法，総窒素を定量しＴＤＰとする方法等が見られるため，ＴＤＰを分離して定量する方法を検討し，試験を行なった．

コカルボキシラーゼ注射薬を試験する際に問題となる点は混在する遊離チアミン，Thiamine monophosphate（以下ＴＭＰと略す），Thiamine triphosphate（以下ＴＴＰと略す）とＴＤＰをいかに分離し定量するかということにある．これらを分離して定量するには①イオン交換樹脂による[2-4]，②ペーパークロマトグラフィーによる[5]，③薄層クロマトグラフィーによる[6]，④沪紙電気泳動による[7] 等の方法があるが，いずれも完全とはいいがたく，しかもＴＭＰ，ＴＤＰ，ＴＴＰの標準品が容易に入手できない等の困難な問題があったが，行政上の必要からやむなくＴＤＰの80%程度のコカルボキシラーゼ作用を有するとされているＴＴＰをＴＤＰに含めてＴＤＰとし，これらとコカルボキシラーゼ作用を全く有しないチアミン，ＴＭＰを分離する方針で比較的能率的で，これら三者の分離に有効な結果を示したイオン交換樹脂による方法を用いて定量することとした．

2 試料，使用機器，試薬・試液

試料：著者等が試験を行なったコカルボキシラーゼ注射薬は都内から収去された４種で (Table 1)，Ａ，Ｂ，Ｃの３種はＴＤＰの溶液であるが，Ｄは凍結乾燥したＴＤＰと溶解液とを別々にアンプルに納めたものである．

使用機器：日立自記分光光度計　ＥＰＳ—３Ｔ型

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
160 東京都新宿区百人町３—24—１
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1 性状，異物，pH，内容量

	試料	性状	異物	pH	内容量
A	10m*l* 20アンプル	無色澄明な液を褐色のアンプルに納めたもの	20アンプル中1アンプルに認める	4.3	10.1～10.2m*l*
B	2 m*l* 30アンプル	無色澄明な液を褐色のアンプルに納めたもの	認めない	4.35	2.1～2.2m*l*
C	10m*l* 20アンプル	無色澄明な液を無色のアンプルに納めたもの	認めない	3.87	10.6～10.7m*l*
D	凍結乾燥したもの40アンプル 溶解液 2 m*l* 40アンプル	白色の凍結乾燥物の入った無色のアンプルと無色澄明な液を無色のアンプルに納めたもの	溶解液について40アンプル中1アンプルに認める	溶解液について 8.1	溶解液について 2.1～2.2m*l*

日立分光光度計 124型
日立分光螢光光度計 203型
pHメーター（東亜電波工業㈱）
HM—5型

試薬・試液

酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液：氷酢酸9 m*l* および酢酸ナトリウム5.7 g を水に溶かして2 *l* とする（pH 4）.

2％タカジアスターゼ溶液：タカジアスターゼB（三共㈱ビタミンB_1定量用）2 gを酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液に溶かして 100m*l* とする.

標準塩酸チアミン：国立衛生試験所標準品，塩酸チアミン液標準品. (0.5mg/m*l*).

TDPおよびTMP標品：別途に入手したTDP原体（98％）およびTMP原体（88.5％）。

弱酸性イオン交換カラム：アンバーライト CG50 (Type 1) に水を加えて数回傾斜して洗浄したのち，内径約1cm，長さ約 20cm のガラスカラムに充てんし，希塩酸 50m*l* を通し，水で流出液が中性になるまで洗浄し，層長を約5cmとする.

（その他の試薬，試液は日本薬局方による）

3 試験項目および方法

品質を検査するために行なった試験項目および方法は次のとおりである.

1）性状

各試料につきそれぞれの医薬品製造承認書による.

2）異物

日本薬局方・製剤総則・16. 注射剤 (10) により不溶性異物を検索する.

3）内容量

各試料（Dは溶解液）を20°でホールピペットおよびLT型メスピペットを使用して日本薬局方・製剤総則・16. 注射剤 (11) により内容量を測定する. ただしDは検体量の都合で重量偏差試験法を省いた.

4）pH

各試料（Dは溶解液）のpHを微量液用電極（東亜電波工業㈱ HG—9005, HC—905)を用いてpHメーターで測定する.

5）総チアミン，TDP，TMP，遊離チアミンの定量

(A) 総チアミンの定量

①チオクロム紫外部吸収法

操作法

試料液の調製

試料のTDPとして10m gに相当する量を精密に量り，0.001N塩酸試液を加えて1 m*l* 中TDP20 μ g を含む液を調製し，試料液とする.

標準液の調製

標準塩酸チアミンに0.001N 塩酸試液を加え1 m*l* 中塩酸チアミン16 μ g を含む液を調製し，標準液とする.

定量

試料液10m*l* ずつを 20m*l* のメスフラスコTおよびT′に正確にとり，Tには臭化シアン試液5 m*l* を加えて振り混ぜ，5％水酸化ナトリウム溶液 4 m*l* をすみやかに加え振り混ぜる. T′には5％水酸化ナトリウム溶液 4 m*l* を加えて振り混ぜ，さらに臭化シアン試液 5 m*l* を加え振り混ぜたのち，T，T′に水を加えて 20m*l* とする. 別に標準液10m*l* ずつを20m*l* のメスフラスコSおよびS′に正確にとり，試料液と同様に操作する. それぞれの液につき水を対照として波長370 nm 付近の最大吸収波長で吸光度を測定し，総チアミンを塩酸チアミンとして定量する.

②チオクロム螢光法

操作法

試料液の調製

試料のＴＤＰとして10mｇに相当する量を精密に量り，0.001N塩酸試液を加えて１ml中ＴＤＰ25μｇを含む液を調製する．この液４mlを正確にとり50mlのメスフラスコに入れ，酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液30ml，２％タカジアスターゼ溶液２mlを加えて振り混ぜたのち，40～50°で60～90分間加温する．冷後酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて50mlとし，試料液とする．

標準液の調製

標準塩酸チアミンに0.001N塩酸試液を加えて1ml中塩酸チアミン16μｇを含む液を調製する．この液４mlを正確にとり50mlのメスフラスコに入れ，以下試料液の調製と同様の操作を行ない，標準液とする．

定量

試料液，標準液の各々５mlずつを正確にとりそれぞれ50mlの共せん遠心沈殿管に入れ，以下日本薬局方・塩酸チアミン散・定量法に準じて操作し，総チアミンを塩酸チアミンとして定量する．

(B) ＴＤＰの定量

操作法

試料液の調製

試料のＴＤＰとして10mｇに相当する量を精密に量り，水を加えて正確に100mlとする．この液2.5mlを正確にとり，弱酸性イオン交換カラムに通し，さらにカラムは水10mlずつで７回洗う．流出液を合わせ酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に100mlとし，試料液とする．

標準液の調製

標準塩酸チアミンに酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて１ml中塩酸チアミン２μｇを含む液を調製し，標準液とする．

定量

試料液，標準液の４mlずつをそれぞれ50mlの共せん遠心沈殿管ＴおよびＴ′，ＳおよびＳ′に正確にとり，酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液５ml，２％タカジアスターゼ溶液１mlを加え，40～50°で60～90分間加温する．冷後，以下(A)総チアミンの定量・②チオクロム螢光法・定量に準じて操作し，チアミンの総量を塩酸チアミンとして定量する．

(C) ＴＭＰおよび遊離チアミンの定量

①ＴＭＰ＋遊離チアミンの定量

操作法

試料液の調製

前記(B)においてＴＤＰを分離した弱酸性イオン交換カラムを0.05N塩酸試液10mlずつで７回溶出する．溶出液を合わせ水酸化ナトリウム試液でｐＨを約４としたのち，酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を加えて正確に100mlとし，試料液とする．

標準液の調製

(B)ＴＤＰの定量と同じものを用いる．

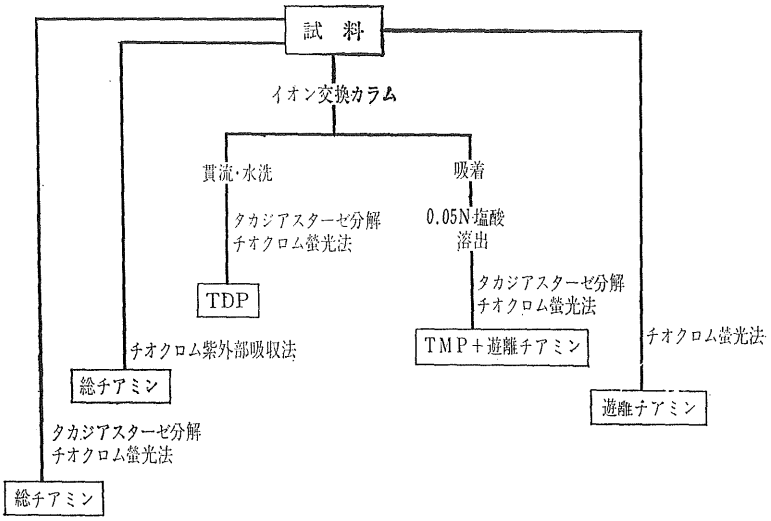


Fig.1 総チアミン，TMP，TDP，遊離チアミンの定量法

定量

(B)ＴＤＰの定量と同様の操作を行ない，チアミンの総量を塩酸チアミンとして定量する．

②遊離チアミンの定量

操作法

試料液の調製

試料のＴＤＰとして10mｇに相当する量を精密に量り，0.001Ｎ塩酸試液を加えて正確に 100ml とし，試料液とする．

標準液の調製

標準塩酸チアミンに0.001Ｎ塩酸試液を加えて１ml中塩酸チアミン 0.8μｇを含む液を調製し，標準液とする．

定量

試料液，標準液の各々５ml ずつを正確にとりそれぞれ 50ml の共せん遠心沈殿管に入れ，以下日本薬局方・塩酸チアミン散・定量法に準じて操作し，チアミンを塩酸チアミンとして定量する．

4　試験法の検討

1）チオクロム紫外部吸収法

チアミン，チアミンのリン酸エステルは Fig２に示すようにそれ自体紫外部に吸収があり，試料が純品またはそれに近いものであればその最大吸収波長で定量することも可能であるが，注射薬には無痛化剤としてベンジルアルコールが添加されていることが多く，ベンジルアルコール自身の吸収がチアミンの吸収と重なるため直接紫外部吸収で定量することは不可能となる．このためチアミンを酸化しチオクロムとすればチオクロムの最大吸収波長（Fig３）でベンジルアルコールの妨害もなく定量が可能となる．チアミンのリン酸エステルを臭化シアンで酸化するときはそれぞれ対応するチオクロムのリン酸エステルを生成し，いずれもチオクロムと同様 370nm 付近に最大吸収を有するので，総チアミンとして定量することが可能である．しかし，ＴＭＰ，ＴＤＰをそれぞれ分離して定量する際には，その絶対量が少なく，この方法で定量することは適当でないと考え，総チアミンの定量にのみ用いた．

2）チオクロム螢光法

チアミンは１）で述べたように酸化されるとチオクロムを生ずるが，チアミンのリン酸エステルはそれぞれに対応するチオクロムのリン酸エステルを生じ，これはチオクロムと異なりいずれもイソブタノールに転溶しない．このため総チアミンを定量する場合はタカジアスターゼでチアミンリン酸エステルを加水分解し，遊離のチアミンとしたのち，酸化して生じたチオクロムの螢光強度を測定し，定量する．この性質を利用してＴＭＰと遊離チアミンの混合物を臭化シアンで酸化し，イソブタノールで抽出するとイソブタノール層には遊離チアミンから生じたチオクロムのみが転溶してくる．この場合イソブタノール層に水層が混在するとチオクロムモノリン酸エステルも同時に測定する

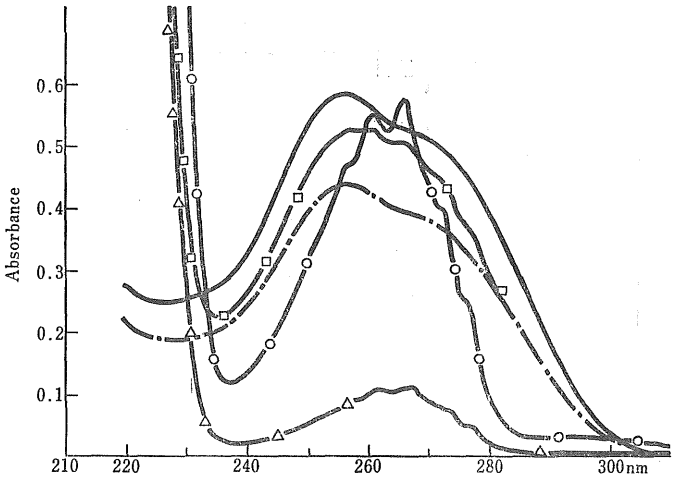


Fig2. 塩酸チアミン，TDP，ベンジルアルコールの紫外部吸収スペクトル

塩酸チアミン 15μg/ml　ベンジルアルコール 200μg/ml　ＴＤＰ 15μg／ベンジルアルコール 40μg/ml

ＴＤＰ 15μg/ml　ベンジルアルコール 40μg/ml

0.01Ｎ塩酸溶液

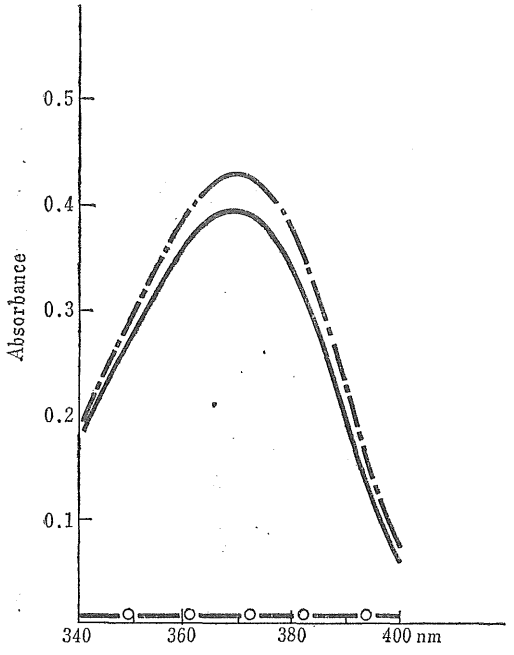


Fig.3 チオクロム，チオクロムピロリン酸エステル，ベンジルアルコールの紫外部吸収
チオクロム　6μg/mℓ
チオクロムピロリン酸エステル　9μg/mℓ
ベンジルアルコール　100μg/mℓ

ことになるので脱水を十分に行なう必要がある．

3）イオン交換樹脂による分離について

アンバーライトCG50(H型)にチアミン，TMP，TDP，TTPを通すとチアミンおよびTMPは吸着され，TDPおよびTTPは流出してくる．遊離チアミン，TMPは3(C)により①TMP＋遊離チアミン，②遊離チアミンを定量し，①から②を差し引くことによりTMPを定量することができる．しかしTDPおよびTTPは分離することができないためTTPも含めてTDPとして定量した．

TDP，TMP，塩酸チアミンのそれぞれのイオン交換樹脂処理での回収試験を行なった．TDP標品の水溶液を用いてTDPとして約250μgを樹脂に通し，3(B)により定量した結果，回収率は100.6～102.0%であった．またTMP標品の水溶液を用いてTMPとして約250μgを樹脂に通し，3(C)①により定量した結果，回収率は92～95%であった．また塩酸チアミン標準品の水溶液を用いて塩酸チアミンとして200μgを樹脂に通し，3(A)②で定量した結果，回収率は99%であった．

5　結果および考察

試験の結果を Table 1 および 2 に示す．

1）性状

試料はいずれも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）異物

4種の試料のうち2種はそれぞれ20アンプル中1アンプル，40アンプル中1アンプルに不溶性異物を認めたが，他の2種には異物を認めなかった．

3）内容量

4種の試料のうち3種は表示内容量に対する過量が

Table 2　総チアミン，TDP，TMP，遊離チアミンの定量結果

測定法		チオクロム紫外部吸収法	チオクロム螢光法						イオン交換樹脂処理後チオクロム螢光法				
試料	表示TDP (mg)	総チアミン				遊離チアミン	総エステル型チアミン		TDP		TMP＋遊離チアミン	TMP	
		塩酸チアミンとして ⓐ	TDPとして ⓐ×f_1	塩酸チアミンとして ⓑ	TDPとして ⓑ×f_1	塩酸チアミンとして ⓒ	塩酸チアミンとして ⓑ−ⓒ	TDPとして (ⓑ−ⓒ)×f_1	塩酸チアミンとして ⓓ	TDPとして ⓓ×f_1	塩酸チアミンとして ⓔ	塩酸チアミンとして ⓔ−ⓒ	TMPとして (ⓔ−ⓒ)×f_2
A	50／10mℓ	49.7	70.6	51.0	72.0	0.6	50.4	71.6	32.0	45.4	13.4	12.8	15.1
B	10／2mℓ	9.9	14.1	9.9	14.1	0.1	9.8	13.9	6.5	9.3	2.6	2.5	3.6
C	50／10mℓ	37.1	52.7	38.7	55.1	0.5	38.2	54.3	21.6	30.7	12.4	11.9	14.1
D	20／アルプル	15.4	21.9	15.6	22.0	0.2	15.4	21.9	9.4	13.3	4.4	4.2	5.5

$f_1=\frac{\text{TDP}}{\text{塩酸チアミン}}$　　$f_2=\frac{\text{TMP}}{\text{塩酸チアミン}}$　　(単位mg)

少なく，他の1種は適合した．

4）pH

4種の試料は3.9～8.1の範囲内にあり，はなはだしく酸性またはアルカリ性のものはなかった．

5）総チアミン，TDP，TMP，遊離チアミンの定量

Table 2 に明らかなように，各試料に含まれるチアミン，チアミンリン酸エステルをチオクロム紫外部吸収法で総チアミンとして定量し，これをTDPに換算するときは表示量に対して105～141%となり，また加水分解しチオクロム螢光法でチアミンのリン酸エステルの総量を定量し，これをTDPに換算するときは表示量に対して109～142%となるが，イオン交換樹脂によりコカルボキシラーゼ作用を有するTDP，TTPを定量しこれをTDPに換算するときは表示量に対して61～95%となり，C，Dのように表示量に対して極めて低い価を示すものがみられる．また4種の試料を通じて遊離チアミンが問題となる程含まれていないのに対してTMPの含量は意外に多く，このことはTMPが生体内に投与されてもTDPにはならないといわれている[8-9]ことから問題と思われる．

本定量法については①標準品，②イオン交換樹脂からのTMPの回収，③TDPとTTPの分離などに問題があるので，これらについて引き続き検討を加える予定である．

謝辞

この試験に際して有益なご助言を頂いた京都大学衛生学教室糸川嘉則先生，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．

文献

1）坂口謹一郎，朝井勇宣：酵素，72，96(1952)，朝倉書店

2）Suzuoki, Z., Yoneda, M. and Hori, M.: *J. Biochem.*, 44, 783—786 (1957)

3）DeGiuseppe, L. and Rindi, G.: *J. Chromat.*, 1, 545—551 (1958)

4）糸川嘉則，井上喜久子：ビタミン，36，544—547 (1967)

5）Lewin, L.M. and Wei, R.: *Anal. Biochem.*, 16, 29—35 (1966)

6）Levorato, C. and Cima, L.: *J. Chromat.*, 32, 771—773 (1968)

7）Masuda, T. and Asai, M.: *Pharm. Bull.*, 2, 287—291 (1954)

8）ビタミン学：337—338 (1956) 金原出版

9）川崎近太郎：ビタミン 140 (1968) 岩波書店

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 85 — 92, 1974

生薬の試験法に関する研究（Ⅴ）
朮類生薬精油のＴＬＣおよびＧＣによる考察

西川洋一* 渡辺四男也* 瀬戸隆子*

Studies on Examination of Crude Drugs (Ⅴ)
Consideration on Essential Oil of Crude Drug Zhu by TLC and GC

YOICHI NISHIKAWA*, YOHYA WATANABE* AND TAKAKO SETO*

Crude drug Zhu were obtained to devide into Bai-Zhu and Cang-Zhu with distribution of main contents in essential oil i.e. atractylon, atractylodin, hinesol and β-eudesmol, by means of TLC and GC.

As a result of experiments, identification of original plant and evaluation of quality were accomplished.

緒　言

近年，漢方薬物療法が再認識され，また天然薬物に対する期待もあって，漢方または生薬製剤の生産が増加している．しかし，医薬品による薬害および薬禍問題以来，医薬品全体の薬効と安全性に対する世論が高まり，医薬品製剤の品質管理が重要な問題となっている．著者等は医薬品製造用原料生薬の品質確保を目的として，漢方処方に繁用される漢薬の一つである朮類生薬の試験法について研究を続けてきた．朮類は基原植物によって精油成分がことなり，薬用上数種に分けられるが，中国または朝鮮半島から輸入されるために流通品ははなはだしく名称が混乱し，また外観上の識別も困難であるので，しばしば混同して使用され，期待する薬効が得られないおそれがある．そこで前報まで[1]基原的識別法として，薄層クロマトグラフィー（以下ＴＬＣと略す）による試験法を確立し市場の朮類に応用して一応の成果を得たが，今回は基原的に代表される近年の市場品を実験材料とし，その精油の主要成分である atractylon, atractylodin, hinesol, β-eudesmol を分離確認または同定し，これらを標品として精油のＴＬＣおよびガスクロマトグラフィー（以下ＧＣと略す）を行ない，それぞれのクロマトグラムにおけるＲｆ値およびt_Rの関係を確認し，併せてガスクロマトグラム・マススペクトル（以下ＧＣ—ＭＳと略す）によっても精油成分を検討し，朮類の基原的考察の資料としたので報告する．

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
160 東京都新宿区百人町３—24— 1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

実験の部

1．実験材料とその性状

前報まで実験に供した試料およびその後の市場品のうち，基原的に代表される次の 12 種を実験材料とした．品名は市場の流通名または著者等の研究[1]により基原的に同定された名称によるものである．

(1) 古立蒼朮

古立蒼朮の名称は本邦市場の流通名で，ホソバオケラ *Atractylodes lancea* D.C. を基原とし，中薬志[2]における茅蒼朮（茅朮）に該当するものである．

本品は不規則に屈曲し，ときに分岐するやや結節状円柱形を呈し，長さ３～７cm，径１～1.5cm，かっ色の外皮をつけ，質堅く，横切面はほぼ円形で，淡かっ色～赤かっ色の油室が多数認められ，切片を放置するとき，切面から白色綿状結晶を析出する．特異のにおいがあり，味はやや苦い．

(2) 西北蒼朮（湖北）

西北蒼朮の名称は1972年秋の中国交易会以来用いられているもので，本品は1973年5～6月湖北で集荷船積みされたもので50kg麻袋入りのものである．

本品の性状品質はほとんど(1)古立蒼朮に類似し，やや小型であるが，切片を放置するとき，切面からよく白色綿状結晶を析出する．

(3) **西北蒼朮（天津）**

本品は天津港船積みとして1973年4～5月に輸入されたもので，前二者と外形，色調，質および臭味が類似し，やや大型のものであるが，白色綿状結晶の析出は認められない．

(4) **中国蒼朮**

本品は1973年武漢出荷として輸入されたもので，形態，色調，臭味は(3)西北蒼朮に類似しているが，質はやや軟らかく，まれに白色綿状結晶を析出するものがある．おそらく産地では西北蒼朮とされているものであると考えられるが，その呼称が本邦市場になじまないので，流通上単に中国蒼朮とされたものと推定する．

(5) **天津蒼朮**

本品は天津港積出により1973年4月頃輸入されたもので，中薬志[2]の北蒼朮中の津蒼朮に該当するものと推定されるが，その基原植物であるシナオケラ *A. lancea* D.C. var. *chinensis* Kitamura の確かな標品が得られないので，基原的考定は保留する．

本品は不規則に屈曲し，ときに分岐するやや結節状の円柱形を呈するものと不整塊状を呈するものからなり，大部分の外皮は除かれ外面は油浸のため一面黄かっ色を呈し，質はやや軟く，横切面の油室はやや不明確である．特異芳香があり，味はやや甘くのち苦い．

(6) **津蒼朮**

本品は切断品で，その名称は市場流通名による．質，切面の性状および臭味から(5)天津蒼朮を切断したものと推定され，略して津蒼朮としたものと考えられる．

(7) **北朝鮮蒼朮**

本品は1972年5月北朝鮮から輸入されたもので，著者等の研究[1]によりナンマンオケラ（チョウセンオケラ）*A. lancea* D.C. var. *simplicifolia* Kitamuraを基原とするものと同定されたものである．本品は日局8のソウジュツの1種であるが，同じく北朝鮮から輸入されるオケラ *A. japonica* Koidzumiを基原とする外皮をつけた白朮としばしば混同されるものである．

本品はよく整った連珠状の横走根茎で，長さ7～13cm，径1～1.5cm，灰かっ色の外皮をつけ，外面に細かい縦溝がある．破折しやすく，折面は繊維性でない．横切面は類白色を呈し，淡黄色の油室が認められ，放置するとき油室はかっ色に変化する．特異のにおいがあり，味は緩和でのちやや苦い．

(8) **唐白朮**

本品はオオバナオケラ *A. ovata* A.P.D.C. を基原とし，本邦市場では流通少なく高価である．

上部に短茎をつけ，これより下方に向かって不整に肥大した根茎からなり，ところどころコブ状の小突起をつけ，縦しわのある黄かっ色の外皮をつけている．質はきわめて堅く角質ようで，切面にしばしば空洞がある．特異のにおいがあり，味はやや甘くのちわずかに苦い．

本品は朮類の中できわめて特徴的な形態を有し，識別は容易である．

(9) **関蒼朮**

本品は1971年秋中国交易会で津蒼朮として契約輸入されたもので，著者等がオケラ *A. japonica* Koidzumi を基原とする中薬志[2]の関蒼朮と同定[1]したものである．性状は(10)北朝鮮白朮（皮付）に類似している．

(10) **北朝鮮白朮（皮付）**

本品はオケラ *A. japonica* Koidzumi を基原とし北朝鮮から輸入され，市場では皮付きのためにしばしば北朝鮮蒼朮と誤称されることがある．

本品は不規則に屈曲し，ときに分岐する結節状の横走根茎でかっ色の外皮をつけ，破折しにくく，破折面は著しく繊維性である．横切面に淡黄色の油室を認める．

(11) **韓国白朮（皮去）**

本品はオケラ *A. japonica* Koidzumi の肥大した

Table 1

Sample	Essential Oil	Ash	Acid insoluble Ash
	ml/50g	%	%
(1)古立蒼朮	2.2	6.9	0.9
(2)西北蒼朮(湖北)	3.1	5.3	0.5
(3) 〃 (天津)	1.5	6.4	0.9
(4)中国蒼朮	2.1	7.1	0.7
(5)天津蒼朮	1.0	5.5	0.7
(6)津 蒼 朮	1.0	6.5	0.4
(7)北朝鮮蒼朮	0.3	4.5	0.4
(8)唐 白 朮	0.7	4.2	0.3
(9)関 蒼 朮	0.7	5.0	0.3
(10)北朝鮮白朮(皮付)	1.3	5.4	0.6
(11)韓国白朮(皮去)	1.3	4.9	0.2
(12)日本産白朮	0.6	5.0	0.5

根茎の外皮を除いたもので，不整塊状を呈し，外面は類白色で破折しにくく，破折面は著しく繊維性で，切面に淡黄色の油室を認める．

⑿ 日本産白朮

本品は神奈川県湘南台に野生するオケラ *A. japonica* Koidzumi を栽培し，細根を除いたのち，外皮をつけたまま乾燥したものである．

各実験材料の精油含量，灰分および酸不溶性灰分は Table 1に示す通りである．

2．精油成分の分離と同定

atractylon 実験材料⑽韓国白朮の粉末 100 g を水蒸気蒸留して得た精油 2.5m*l* を Kieselgel 60 (230～400mesh) 100g を充塡したカラムで，n-ヘキサンを移動相としてカラムクロマトグラフィーを行ない，TLCでRf 0.85を示す画分を芒硝乾燥，溶媒留去．TLC，GCで単一物質と確認．UV λ_{max}^{EtOH}nm : 220，IR $\nu_{max}^{Liq\text{-}film}$cm^{-1} : 3075, 1640, 885(>C=CH$_2$), 1135 (C-O-C). Mass Spectrum m/e : 216 (M^+), 201 (M^+-CH_3), 188 (M^+-CO), 187 (M^+-CHO), 108( ), 43 (CH_3-C≡O^+). 本品はUV，IRとも文献[3-5]の atractylon に一致．

atractylodin 実験材料⑺北朝鮮蒼朮の粉末100 g を同様に処理し，TLCでRf 0.73を示す画分を芒硝乾燥，溶媒留去，氷冷固化したのちメタノール再結晶し，淡黄色柱状晶を得る．TLC，GCで単一物質と確認，mp 50～52°．UV λ_{max}^{EtOH}nm : 258, 272, 335, 354, IR ν_{max}^{KBr}cm^{-1} : 3125, 1550, 1016, 884, 745 (furan), 2190(−C≡C−)．Mass Spectrum m/e : 182 (M^+), 153 (M^+-CHO), 115 (M^+-), 39( )．本品のUV，IRは文献[6-7]の atractylodin に一致．

hinesol, β-eudesmol 実験材料⑵西北蒼朮(湖北)の粉末 500 g を同様に処理し，n-ヘキサンで atractylon および atractylodin などを除去したのち，はじめ n-ヘキサン-ベンゼン(90 : 10)で徐々にベンゼン比率を増加し，次にベンゼンで，さらにベンゼン-エタノール (90 : 10) で徐々にエタノール比率を増加して(50 : 50)で溶出する．各画分はGCを行ない，t_R 13.3′を主成分とするはじめの n-ヘキサン-ベンゼン画分(A)と，t_R 13.8′を主成分とするベンゼン-エタノール画分(B)を分離し，それぞれを同様のカラムで，Aは n-ヘキサン-ベンゼン (90 : 10)，Bはベンゼン-エタノール(90 : 10)で溶出し，A画分は減圧昇華法，B画分はメタノール (80～90%) 再結晶および減圧昇華法で精製する．それぞれTLC，GCで単一物質と確認．

A : mp 56～58°, IR ν_{max}^{KBr}cm^{-1} : 3310, 1134 (OH) 3025, 1660, 827, 797 (>C=C<^{H})．NMR $\delta_{max}^{CCl_4}$ppm : 0.91 (3H, doublet, J= 6 cps, >C$\underline{H}_3$), 1.15 (6H, singlet, −C(OH)<$^{C\underline{H}_3}_{C\underline{H}_3}$), 1.65 (3H, broad singlet, HC=C−C$\underline{H}_3$), 1.85 (2H, multiplet, C$\underline{H}_2$−C=C), 5.24 (1H, broad singlet, −CH=C<), Mass Spectrum m/e : 222(M^+), 204 (M^+-H_2O), 189(204-CH_3), 162(M^+−HO−C<$^{CH_3}_{CH_3}$−H), 161(M^+−HO−C<$^{CH_3}_{CH_3}$−H_2), 59(HO$^+$=C<$^{CH_3}_{CH_3}$)

B : mp 77−79°, IR ν_{max}^{KBr}cm^{-1} : 3270, 1135(OH) 3080, 1645, 885(>C=CH_2), NMR $\delta_{max}^{CCl_4}$ppm : 0.65 (3H, singlet, −C−C$\underline{H}_3$), 1.15 (6H, singlet, −C(OH)<$^{C\underline{H}_3}_{C\underline{H}_3}$), 4.40, 4.67(2H, each broad singlet, >C=C$\underline{H}_2$). Mass Spectrum m/e : 222 (M^+), 207(M^+-CH_3), 204(M^+-H_2O), 189 (204−CH_3), 164(M^+−C(OH)<$^{CH_3}_{CH_3}$+H), 59 (HO$^+$=C<$^{CH_3}_{CH_3}$)

Aのmp，IR，NMRは文献[8-11]の hinesol に，Bは標品 β-eudesmol の mp (混融)，IR，NMR，GC—MSおよび文献[12]の β-eudesmol と一致．

3．TLC

試料溶液の調製 日局8一般試験法精油定量法によって各実験材料から得た精油を 5 v/v% 濃度となるようにキシレンで希釈して試料溶液とする．

標準溶液 2で分離同定した atractylon, atractylodin, hinesol, β-eudesmol を標準品としてエタノール溶液 (1mg/m*l*) を調製し標準溶液とする．

TLCの条件 Merk 社の Kieselgel G または Kieselgel HF_{254} を用いて調製したプレート (250μ) を110°，1時間活性化し，n-ヘキサン-ベンゼン-酢酸エチル(70 : 15 : 15) を移動相として 12cm 展開する．スポット量は10μ*l*．

スポットの検出 p-ジメチルアミノベンツアルデヒド硫酸試液 (以下A試液と略す) (p-ジメチルアミノベンツアルデヒド5 gを10%硫酸 100m*l* にとかした液) またはアニスアルデヒド硫酸試液 (以下B試液と略す) (p-アニスアルデヒド 0.5m*l*, メタノール

8.0m*l*, 硫酸1.5m*l*の混液）を噴霧したのち90°，5分間加熱する．Kieselgel HF_{254} プレートは検出試液を噴霧する前にＵＶ照射（254nm）によってスポットを確認する．

4．ＧＣの条件

3の試料溶液および標準溶液の1μlを島津ＧＣ-4ＢＭＰＦを使用し，次の条件でＧＣを行ない，試料溶液のピーク中各標準品に相当するピークのt_Rを測定した．

Column：2％PEG 20M on Chromosorb W（AW-DMCS），60～80mesh，glass on column，3mm $\phi \times$ 1m，Detector：FID，Temperature：column 70°～220°，rate 6°/min，detector 240°，Carrier gas：N_2 30m*l*/min，H_2 30m*l*/min，Air 0.9*l*/min，Sensitivity Range：$10^2 \times 64$，Recorder Speed：10 mm/min.

5．ＧＣ—ＭＳの条件

ＧＣ中の主要ピークのＭＳは精油含量を適宜増減し，島津ＬＫＢ-900を使用し，次の条件で測定した．

Column：2％PEG 20M on Chromosorb W（AW-DMCS）60～80 mesh，glass on column 4mm $\phi \times$ 1m，Temperature：column 100°—200°，rate 6°/min，inlet 190°，separator 230°，ionsource 270°，Carrier gas：He 30m*l*/min，Electron Energy：70 eV.

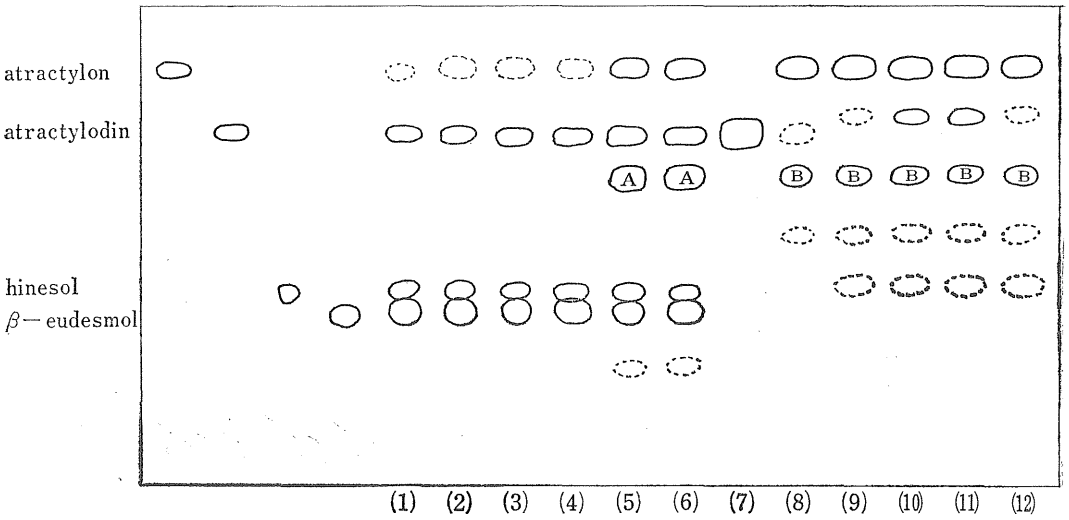


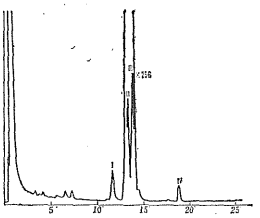
Fig. 1 Thin layer Chromatogram of Zhu
plate：Kieselgel G (250μ, 110°, 1h), solvent：n-hexan-benzen-ethylacetate (70：15：15)
1—12：Sample (Essential Oil)
detection：P-dimethylaminobenzaldehyde-H_2SO_4 R. (90°, 5′)

Table 2 Thin Layer Chromatographic Properties of Essential Oil

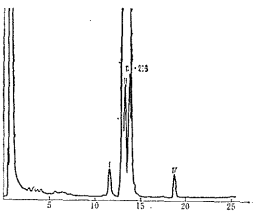
	Rf values (×100)	Colour reactions	
		A. reagent	B. reagent
atractylon	85	red——→purple	orange——→orange
atractylodin	75	dark green	dark green
spot A	65	red——→purple	orange——→violet
spot B	65	yellow→violet	brown
hinesol	40	violet	red→violet
β-eudesmol	35	violet	violet

Plate : Kieselgel G (250μ, 110°, 1h)
Solvent : n-hexan-benzen-ethylacetate (70：15：15)
A. reagent：p-dimethylaminobenzaldehyde-H_2SO_4 R. (90°, 5′)
B. reagent：p-anisaldehyde-H_2SO_4 R.

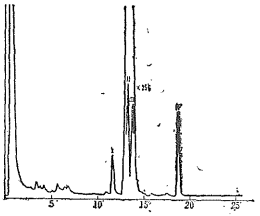
(1) 古立蒼朮



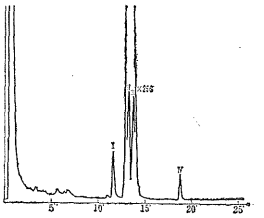
(2) 西北蒼朮（湖北）



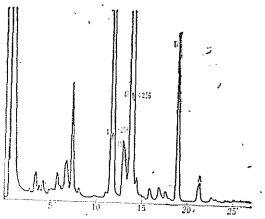
(3) 西北蒼朮（天津）



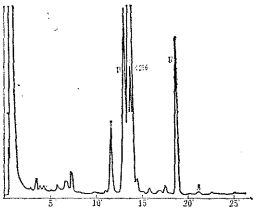
(4) 中国蒼朮



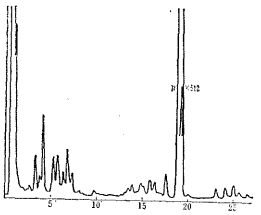
(5) 天津蒼朮



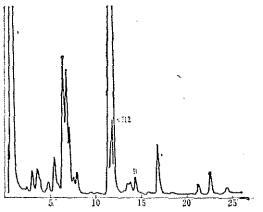
(6) 津 蒼 朮



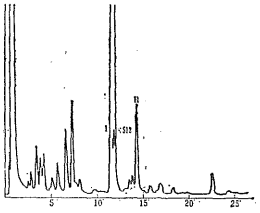
(7) 北朝鮮蒼朮



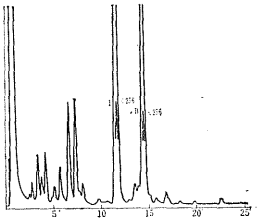
(8) 唐 白 朮



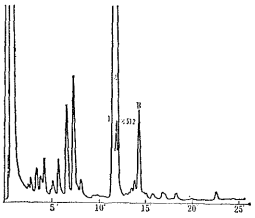
(9) 関 蒼 朮



(10) 北朝鮮白朮（皮付）



(11) 韓国白朮（皮去）



(12) 日本産白朮

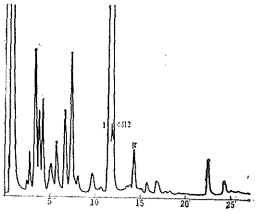


Fig. 2 Gas Chromatograms of Essential Oil

Conditions :

Column : 2% PEG 20M on Chromosorb W (AW-DMCS) 60—80mesh, glass column, i.d. 3×1000mm

Column temp. : 70-220°, rate 6°/min

Carrier gas : N_2 30m*l*/min, H_2 30m*l*/min, Air 0.9*l*/min

Sensitivity : $10^2 \times 64$

Ⅰ : atractylon (t_R 11.6min), Ⅱ : hinesol (t_R 13.3min)

Ⅲ : β-eudesmol (t_R 13.8min), Ⅳ : atractylodin (t_R 18.8min)

結果と考察

ＴＬＣのクロマトグラムおよび各スポットの呈色は Fig. 1 および Table 2に示すとおりである．前回まで hinesol, β-eudesmol はほとんど同一スポットとなり明確な区別ができなかったが，今回は両者の標品との比較および検出試液による呈色の差異によって分別確認することができた．すなわち，hinesol はＢ試液ではじめ紅色を呈し，β-eudesmol よりやや高いＲｆ値を示した．atractylodin は両試液によって汚緑色を呈し，また Kieselgel HF_{254} プレートを用いた場合，ＵＶ照射 (254nm) で暗色スポットとして他のスポットと明確に識別することもできる．atractylon は試液を噴霧すると直ちに呈色し，Ａ試液で紅色，Ｂ試液で橙黄色を呈する．著者等が日局８白朮確認試験および蒼朮純度試験の問題点として，ワニリン・塩酸試液で同呈色を示す atractylon 以外の物質の存在を指摘[1] したが，それはスポットＡの物質で，蒼朮系の(5)天津蒼朮および(6)津蒼朮にかなり大きなスポットとして，また(1)古立蒼朮および(4)中国蒼朮にもわずかに認められ，Ａ試液では atractylon と全く同じ呈色を示し，Ｂ試液ではじめ atractylon と同様の橙黄色を呈するが，加熱するとき，atractylon の呈色は変化しないが，スポットＡは藍色に変化する．また，白朮系に表われるスポットＢはスポットＡとほぼ同じＲｆ値であるが，呈色に差異があり，スポットＡとことなる物質で，後述のＧＣ-ＭＳによっても同一物質でないことが確認された．

ＧＣのクロマトグラムは Fig. 2 に示すとおりである．主要な成分の t_R は atractylon 11.6′, hinesol 13.3′, β-eudesmol 13.8′, atractylodin 18.8′ で，hinesol と β-eudesmol は t_R が近接しピークは完全に分離しないので，カラム充塡剤に２% Reoplex400, ２%ＦＦＡＰを用いたが，大した変化もなく分離も不完全であった．また極性の弱い５% Silicon GE SE-30, ２%OV-17では atractylon, hinesol および β-eudesmol の t_R に差がなく不適当であった．

ＧＣの結果から上記の４成分を指標として実験材料を分類すると Table 3 に示す如く３グループに分けられ，さらにそれらの濃度差によってグループは細別される．ここで，(9)～(12)に hinesol, β-eudesmol に相当する t_R に小ピークが認められるがＧＣ-ＭＳで検討した結果，両者の確認ができなかったので Table 3では(−)とした．また(7)は atractylon に相当するピークはほとんど認められないので (−) と印してあるが，前報のＴＡＳオーブンを用いたＴＬＣにより atractylon のスポットがわずかに確認されているので，さらにＧＣ-ＭＳにより検討した結果，atractylon の存在を再確認することができた．興味あることは，hinesol と β-eudesmol の含有比率である．すなわち，*A. lancea* DC を基原とする(1)～(4)のグループでは両者がほとんど同濃度であるが，中葯志[2] により *A. lancea* DC var. *chinensis* Kitamura を基原とすると推定される(5)および(6)では β-eudesmol に比較して hinesol が低濃度を示していることである．(5)および(6)は同一種の根茎を外皮を除いて調製したものと推定されるが，(6)は流通過程でカット品として調製されたもので，atractylon の分解が進行しているものと推定されたがＧＣの結果でも(5)に比較して atractylon が低濃度を示している．

(1)～(4)で t_R 11.6′ のピークについて，ＭＳを測定した結果，atractylon のほかに M^+ が m/e 222 の sesquiterpene alcohol と推定される物質の混在が認められた．

(10)および(11)は *A. japonica* Koidzumi を基原とし，

Table 3 Distribution of main contents in Essential Oil

Group	Sample number	Contents			
		Atractylon	Hinesol	β-Eudesmol	Atractylodin
A	1. 2. 3. 4	+	+++	+++	+
	5	+++	+	+++	+
	6	+	+	+++	+
B	7	−	−	−	++++
C	10	+++	−	−	−
	8. 9. 11. 12	++++	−	−	−

Note : +, +++ and ++++ show each sensitivity by GC, $10^2\times64$, $10^2\times256$ and $10^2\times512$, respectively.

(10)は円柱形の老旧横走根茎で外皮をつけたまま乾燥し，(11)はその先に位置する不整塊状の幼根茎の外皮を除いて乾燥したものであるが，(10)は(11)に比較して atractylon の含量が低く，逆に t_R 14.3′ のピークが大きく表われている．このピークはＴＬＣのスポットＢに相当し，そのＭＳを Fig. 3 に4成分のＭＳとともに示してあるが，M^+ m/e 218, M^+-15, M^+-28. M^+-15-28が特徴的で，このほかは他の sesquiterpene 類と共通のフラグメントイオンを有し，ＵＶ λ_{max}^{EtOH} nm：254，ＩＲ ν_{max}^{KBr} cm^{-1}：3080, 1680, 1640, 1440,

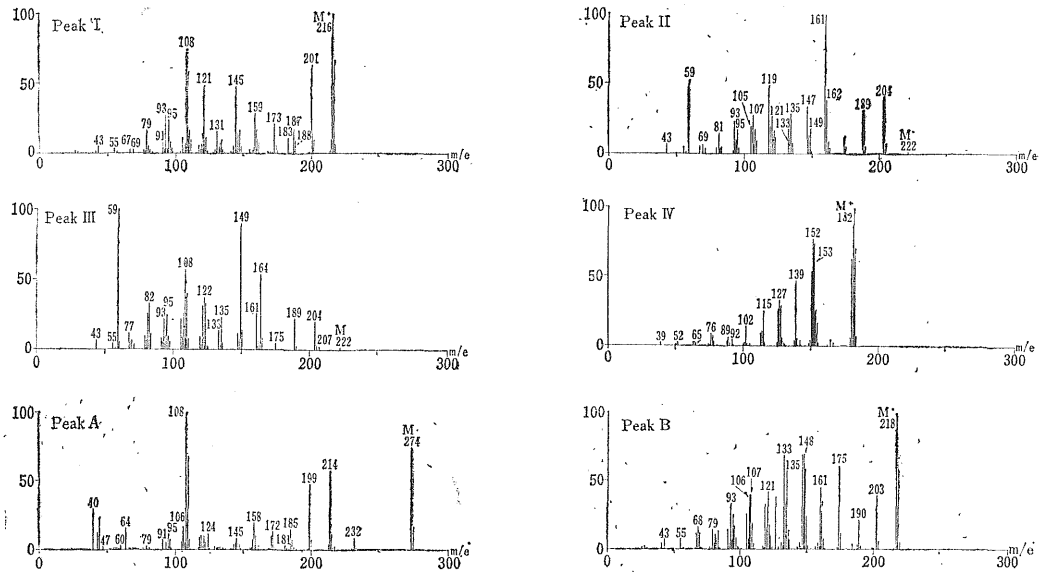


Fig .3. Mass Spectra of Peak Ⅰ～Ⅳ, A and B of Chromatograms in Fig. 2

1380, 890にそれぞれ吸収を示している．

ＴＬＣで(5)および(6)に顕著に表われるスポットＡはＧＣで t_R 21.5′ にピークを示し，そのＧＣ-ＭＳは m/e 274 に M^+, m/e 108 に基準ピークがあり M^+-42, M^+-42-18のほかは m/e 214 以下 atractylon のＭＳを移動させたようなパターンを示し，またＡ試液で atractylonと同様の呈色を示すことからatractylon類似の骨格を有するものと推定される．

また4成分以外に t_R 2～8′ に表われる多くのピークは大部分M^+ が m/e 204 で，sesquiterpene hydrocarbone と推定され，各グループで特徴あるパターンを示している．

結　論

精油主成分であるatractylon, atractylodin, hinesol および β-eudesmol を指標としてＴＬＣを行ない，朮類を蒼朮系と白朮系に分別してその基原を考察し，さらに分解能のすぐれたＧＣにより各成分の濃度比率を比較することによって詳細な基原の検索および品質評価が可能であることを認めた．

謝　辞

本研究に当り終始ご指導ご鞭撻をいただいた当所松本茂理化学部長，β-eudesmolの標品をいただいた大阪大学吉岡一郎博士および実験材料の収集にご協力下さった各社の方々に深謝いたします．

文　献

1）西川洋一：東京衛研年報，20, 223—225 (1968)
西川洋一，風間成孔：*ibid.*, 22, 141—146 (1970)
西川洋一，勝田隆子，上原真一：*ibid.*, 23, 73—79 (1971)
西川洋一，勝田隆子，渡辺四男也：*ibid.*, 24, 103—108 (1972)
2）中薬志Ⅰ，中国人民衛生出版社刊：308-313(1961)
3）Hikino, H., Hikino. Y. and Yoshioka, I.: *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 641—642 (1962)
4）Hikino, H., Hikino, Y. and Yoshioka, I.: *ibid.*, 12, 755—760 (1964)
5）Minato, H. and Nagasaki, T.: *J. Chem. Soc.* (C), 1966, 1866—1872.
6）吉岡一郎，高橋真太郎，ヒキノヒロシ，佐々木靖子：薬誌，80, 1564—1566 (1960)
7）Yoshioka, I., Hikino, H. and Sasaki, Y: *Chem. Pharm. Bull.*, 8, 949—951 (1960), 952—

956 (1960), 957--959 (1960)
8) Yoshioka, I., Takahashi, S., Hikino, H. and Sasaki, Y. : *ibid.*, 7, 319—323 (1956)
9) Yoshioka, I. Hikino, H. and Sasaki, Y. : *ibid.*, 7, 817—820 (1959)
10) Chow., W.Z., Motl, O. and Sorm, F. : *Collection Czechoslov. Chem. Commus.*, 27, 1914—1926 (1962)
11) Yoshioka, I. and Kimura, T. : *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 851—857 (1969)
12) 藤田路一，糸川秀治，指田豊：薬誌，93，415—421 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 93 — 102, 1974

生薬の品質評価に関する研究（Ⅲ）
市販原料生薬の品質について

西川洋一* 渡辺四男也* 瀬戸隆子*

Studies on the Evaluation of Crude Drugs (Ⅲ)
The Quality of Commercial Crude Drugs

YOICHI NISHIKAWA*, YOHYA WATANABE* AND TAKAKO SETO*

Twenty-eight kinds (total of 463 samples) of crude drug on the market (1971～1973) were investigated by examination conducted in accordance with J.P. Ⅷ.

Results indicate that 16.2% of samples did not conform to the requirement of J.P. Ⅷ. and incorect original plants were found in these samples.

Powdered crude drugs generally got poor results.

緒言

近年.医薬品の生産と消費が著しく増加しているが，サリドマイド，キノホルムなどの薬害事件等の発生もあって，医薬品全般に対する効能効果とともに品質と安全性が重要な問題となってきている．他方，天然物に対する期待と漢方薬物療法の再認識によって，数年来の漢方薬ブームが定着し，漢方製剤および生薬と合成医薬品の製剤などが多くなり，生薬の需要が増加しつつある．わが国の市場で流通している生薬は約 250～300 種に達し，その約80%は輸入品で，主な輸入国は中国，韓国，インド，ネパール，イラン，インドネシア，アメリカ，マダカスカル，ソビエトなどである．需要の増加に伴い品質の疑わしいものも少くなく，天然物たる生薬に化学的合成医薬品のように，高純度の括一的な品質を望むべくもないが，生薬を医薬品としてある種の薬効を期待して使用する以上は，その薬効に相当する品質評価が必要である．日本薬局方に収載されている生薬については一応の基準が定められているが，これらの基準が必ずしも品質評価を満足しているとはいい難い．すなわち成分の定量にしても，その対象となる特定の物質が薬効のすべてを評価する指標とならないからである．ときには薬理学的な評価も必要であるが，漢薬系の生薬は単味で用いられることはなく，漢方医学的理論によって数種が配合されるので，何をその主薬効とするか問題が多く薬効評価も困難である．しかしながら，医薬品の品質と安全性確保の観点から原料生薬の品質確保は重要な課題であり，少なくとも基原が適合しないもの，土砂や異物の多いもの，異物で偽和されたものなどは排除されなければならない．

東京都内の医薬品製造工場で昭和47年に製薬原料として消費された原料生薬は 176 種，約 678 トンに達している．生薬製剤～漢方製剤は最終製品で品質のすべてをチェックすることが極めて困難であるから，これら製剤の品質管理は先ず原料生薬の品質チェックが出発点とならなければならない．最近，分析機器の進歩により漢方製剤中の特定成分を定量することにのみ専念し，原料生薬の品質をおろそかにする傾向があるが，漢方の本旨から逸脱したものといわざるを得ない．そこで著者等は薬事監視員と協力して薬務行政上の指導ならびに監視の資料とするために，市場の原料生薬のうち第8改正日本薬局方（以下日局8と略す）収載品目で流通上比較的問題があると思われるものを選び，日局8の基準に従って検査を行ない品質評価について検討したので報告する．

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1 市販原料生薬試験成績

品目	試料数	乾燥減量			灰分			酸不溶性灰分			成分含量		
		min～max	平均	日局8	min～max	平均	日局8	min～max	平均	日局8	min～max	平均	日局8
		%	%	%	%	%	%	%	%	%			
ウイキョウ (全)	3				7.9～ 9.1	8.4	10.0	0.5～ 0.8	0.6	1.5	E.O. m*l*/50g 0.7～ 1.4	1.0	〃 0.7
エンゴサク (切)	4				2.0～ 2.5	2.2	3.0						
オウゴン (切)	5				3.6～ 4.4	4.0	6.0						
〃 (末)	8				4.2～ 5.5	4.9	〃						
オウバク (切)	6	5.0～ 7.7	6.1	9.0	6.2～ 8.3	7.2	6.0				berberine% 0.03～ 4.0	% 2.2	% 1.0
〃 (末)	27	3.3～ 9.0	6.5	〃	6.0～ 8.9	7.5	〃				〃 0.04～ 3.0	1.5	〃
オウレン (切)	6	2.6～ 7.6	5.5	9.0	2.2～ 2.9	2.5	4.0				〃 4.5 ～ 7.3	5.5	3.5
〃 (末)	24	3.5～11.8	6.0	〃	2.5～ 8.0	4.3	〃				〃 0.9 ～ 7.7	4.4	〃
カノコソウ (切)	1				5.5	5.5	6.0				E.O. m*l*/50g 0.1	0.1	0.5
〃 (末)	3				4.8～10.8	7.0	〃				〃 0.1 ～ 0.3	0.2	0.35
							7.0			2.0	H_2Ox %	%	%
カンゾウ (切)	9	6.3～10.1	7.8	12.0	3.8～ 5.4	4.7	5.0	0.3～ 0.9	0.5	1.0	23.9～36.0	30.4	25.0
							〃			〃			
〃 (末)	11	4.7～10.7	7.8	〃	3.7～ 6.9	5.1	〃	0.2～ 2.1	0.7	〃	28.0～39.5	34.8	〃
ケイヒ (切)	10	9.8～14.5	11.5	15.0	2.0～ 5.2	2.9	5.0				E.O. m*l*/50g 0.6 ～ 3.0	〃 1.0	〃 0.5
〃 (末)	38	4.7～12.5	9.2	〃	2.1～ 5.9	4.0	〃				〃 0.4 ～ 1.3	〃 0.7	〃 0.35
ゲンチアナ (切)	2				4.5～ 5.0	4.8	6.0	0.7～ 1.2	1.0	3.0			
〃 (末)	8				3.7～ 4.9	4.2	〃	0.5～ 1.3	0.7	〃			
ゲンノショウコ (末)	2				9.9～ 9.9	9.9	10.0	1.5～ 1.7	1.6	1.0	H_2Ox % 22.6 ～29.9	% 26.3	% 12.0
コウブシ (切)	5				1.8～ 2.5	2.1	3.5				E.O m*l*/50g 0.4 ～ 0.4	0.4	0.3
〃 (末)	4				0.7～ 4.7	2.2	〃				〃 0.3 ～ 0.4	0.4	0.2
コウボク (切)	3				4.3～ 5.5	4.7	6.0						
〃 (末)	3				4.4～ 5.5	5.0	〃						
シャクヤク (切)	8				3.6～ 6.7	4.7	5.5						
〃 (末)	14				2.7～ 9.8	5.7	〃						
ショウキョウ (切)	7				4.6～ 8.7	6.2	8.0						
〃 (末)	7				4.6～ 7.1	5.6	〃						
シャウマ (切)	4				5.1～ 5.5	5.3	9.0						
センキュウ (切)	8				3.1～ 4.7	3.9	6.0	0.2～ 0.7	0.5	1.0			
〃 (末)	16				3.4～11.5	5.5	〃	0.2～ 7.4	1.6	〃			
センブリ (全)	3				3.1～ 3.9	3.5	6.5						
ソウジュツ (切)	8				5.7～ 7.0	6.4	7.0				E.O. m*l*/50g 1.0 ～ 3.8	〃 2.8	〃 0.7
〃 (末)	6				4.7～ 9.1	6.9	〃				〃 0.3 ～ 2.8	2.2	0.5
ダイオウ (切)	17	6.8～13.8	9.1	10.0	5.2～ 6.9	6.0	13.0				D.EtOH % 35.7 ～48.8	〃 47.7	〃 30.0
〃 (末)	37	4.8～10.4	8.2	〃	5.6～10.8	7.2	〃				38.2 ～48.7	45.5	〃
チクセツニンジン (切)	4				3.7～ 5.4	4.6	5.0						
〃 (末)	2				4.5～ 8.0	6.3	〃						
チョウジ (全)	6				5.6～ 6.3	5.9	7.0	0.1～ 0.3	0.2	0.5	E.O. m*l*/10g 1.5 ～ 2.1	〃 1.8	〃 1.6
〃 (末)	10				5.6～ 8.3	6.4	〃	0.1～ 1.0	0.4	〃	〃 0.5 ～ 1.7	1.2	1.3
トウキ (切)	11				4.6～ 6.7	5.6	7.0	0.4～ 1.2	0.6	1.0			
〃 (末)	9				4.0～ 9.0	7.0	〃	0.2～ 5.7	3.2	〃			
ハチミツ	8				0.01～ 0.3	0.04	0.4						
ビャクジュツ (切)	10				4.2～ 5.5	4.8	5.0				E.O m*l*/50g 0.9 ～ 1.5	〃 1.2	〃 0.7
〃 (末)	6				4.8～ 7.4	5.6	〃				〃 0.5 ～ 1.3	1.3	0.5
ボウイ (切)	7				4.7～ 5.5	5.0	6.0	0.1～ 0.5	0.3	0.5			
ボタンピ (切)	17				2.6～ 4.6	3.8	8.0	0.1～ 0.9	0.4	1.0			
〃 (末)	6				2.8～ 4.5	3.7	〃	0.2～ 0.7	0.5	〃			
マオウ (切)	7				6.2～ 8.8	7.7	9.0				alkaloid % 0.7 ～ 1.9	〃 1.3	〃 0.7
ヨクイニン (末)	8				0.8～ 2.0	1.3	3.0						

品目ごとの結果および考察

試料は昭和46～48年の間に都内の医薬品製造業者，医薬品輸入販売業者または生薬元卸売業者から薬事監視員が収集したものである．

各品目の次の（ ）内は形態別の試料数を表し，全は全形生薬，切は切断生薬，末は粉末生薬とする．

乾燥減量，灰分，酸不溶性灰分，精油含量，エキス含量および成分含量等の測定値は表1に示す通りである．表中の試料数は各品目中基原植物が日局8に規定するものでないと判定できるものおよび異種生薬を偽和したものなどを除外したもので，各測定値もこれらを除外したものである．

ウイキョウ（全3）

試料は中国産で外面黄緑色～灰黄色を呈し，日本産に比してやや大粒である．現在の市場品はほとんど中国産で占められ，精油含量は日本産の約半量であるが，両者の精油はガスクロマトグラフィー（以下ＧＣと略す）によれば anethol を主成分とし，その他の成分もほとんど同じである．

エンゴサク（切4）

試料は切断品のため全形は不明であるが，断面が鮮黄色を呈するものと灰黄色を呈するものに分類される．現市場品は中国産と北朝鮮産であるが，薬効的に中国産がすぐれているといわれている．岩佐ら[1]の研究に従って薄層クロマトグラフィー（以下ＴＬＣと略す）を行なった結果，断面が鮮黄色のものは中国産，灰黄色のものは中国東北地区～北朝鮮産と推定される．

オウゴン（切5，末8）

市場品は中国産を主とし，わずかに韓国産がある．試料の性状その他異状を認めない．

オウバク（切6，末27）

オウバクは鳥取，宮城，長野，北海道などから約200トン生産され，中国，香港，韓国，北朝鮮などから約200トン輸入されているが，国産品は年々減少の傾向にある[2]．キノホルムの薬害問題以来，健胃整腸剤およびベルベリン抽出用として需要が増加しつつある．ベルベリン含量は台湾産が高い値を示すほか一般に輸入品が国内産に劣り，特に北朝鮮産および中国東北地区産は1.0%以下の低含量である．

粉末でウコンの curcumin が検出されたものが1種，ベルベリン含量が規定以下のものが切断品に2種，粉末に6種あり，そのうち粉末の1種を除いては著しく含量が低く，これら低含量のものを除外すれば切断品2.4～4.0%（平均3.3%），粉末0.7～3.0%(平均1.8%）である．切断品と粉末のベルベリン平均含量にかなりの差があるが，市場の粉末は各種の含量のものを混合調製しているもののようである．灰分がほとんどの試料で規定の6.0%を上回っているが，日局8の規定は実情に合わないようである．

これらの問題に関連して著者等は先に東京都薬用植物園で栽培した樹齢20年生と8年生の各10本の地上約1mの部位から毎月採取調製したオウバクについてベルベリン含量および灰分を測定しそれらの通年変化について研究[3]したが，ベルベリン含量は20年生群が 2.6～4.7%（平均3.7%），8年生群が 2.5～4.5%（平均3.7%）で大差なく，灰分は20年生群が5.3～7.4%(平均6.4%)，8年生群が 4.2～5.8%（平均5.0%）で高樹齢のものほど灰分が多く，また樹齢25年生の地表より50cm間隔に採取調製したオウバクにおける灰分の垂直分布は50cm：7.5%，1m：7.0%，1.5m：7.1%，2m：6.8%，2.5m：6.7%，3m：6.4%，3.5m：6.3%で上部にいたるほど少なくなる傾向が認められた．オウバクの生産はおおむね樹齢20年生以上のコルク層が発達した幹から採皮されていることから考えるならば，日局8の灰分規格値は改正の必要があると認める．

オウレン（切6，末34）

オウレンは鳥取（因州黄連），兵庫（丹波黄連），福井（越前黄連），石川（加賀黄連），新潟などで年間約27トンが生産され，そのうち約10トンが輸出されている．因州黄連が調製法もよく品質がよいといわれ著名である．また近年需要の増加に伴い，ビルマ黄連と称して輸入されているものがあり，これらはストロンが長くのび日本産に比して細長く，横切面は橙黄色である．これらの基原植物に一部不明確な点はあるが日局8に規定するものではない．

試料を形態別に試験した成績は表2～4に示す通りであるが，粉末のうち12種から鏡検によりオウバク特有の蓚酸石灰結晶細胞列が認められ，これらは明らかにオウバク末を偽和したもので，その成績は表4に示す如く灰分は4.0～9.2%（平均 5.8%）で切断品または粉末に比較して著しく高い値を示し，ベルベリン含量は規定の3.5%に達しないものが多く，また灰分が多くなるに従って，オウバク末の偽和率も高くなるためかベルベリン含量が低くなる傾向を示している．

オウバク末を偽和したものは試料0.5gに水2m*l*を加えてかき混ぜるとき粘液状を呈し，オウバク末の粘液含量にもよるが混和率5%程度まで確認することができる．オウレン末の市場価格がオウバク末の20～25

倍という高値から増量剤としてオウバク末が偽和されたものと考えられるが，鏡検の所見から約50%程度まで偽和されていると推定されるものもあり，単にベルベリン含量測定のみでオウレン末の品質を評価することは大きな誤ちをおかすおそれがあり，多面的に総合判断しなければならない．なお，オウレン末には土砂の混入が予想されるので日局8に規定はないが，酸不溶性灰分を測定した結果，表2～4の如く切断品に比較して粉末に多く，灰分が多くなるに従って酸不溶性灰分も多くなる傾向を示し，品質評価上規格設定の必要があると考えられる．

表2　市販オウレン（切断）の試験成績

試料No.	乾燥減量	灰　分	酸不溶性灰分	ベルベリン含量
1	4.7%	2.2%	0.3%	4.9%
2	5.8	2.2	0.3	5.1
3	7.6	2.3	0.3	4.5
4	6.3	2.4	0.3	6.2
5	2.6	2.9	0.5	5.0
6	5.7	3.0	0.2	7.3
平均	5.5	2.5	0.3	5.5

表3　市販オウレン末の試験成績

試料No.	乾燥減量	灰　分	酸不溶性灰分	ベルベリン含量
1	5.4%	2.5%	0.3%	5.1%
2	6.3	2.5	0.2	4.9
3	7.2	2.8	0.4	5.3
4	5.0	2.9	0.5	5.1
5	5.7	3.3	0.7	4.3
6	3.1	3.3	0.5	5.1
7	4.3	3.4	0.6	6.9
8	6.7	3.5	0.5	7.7
9	5.6	3.6	0.5	7.6
10	5.3	3.7	0.4	5.5
11	3.5	3.8	1.1	4.5
12	8.2	3.9	0.3	5.6
13	6.8	3.9	1.2	4.5
14	7.7	3.9	1.0	4.9
15	3.5	4.0	1.3	4.0
16	6.6	4.1	1.0	4.9
17	6.4	4.2	1.4	3.7
18	7.6	4.3	1.3	4.2
19	6.6	4.4	1.5	4.6
20	6.5	5.0	1.5	2.3
21	10.1	5.3	2.1	5.1
22	11.8	5.8	1.5	4.5
平均	6.4	3.8	0.6	5.0

表4　オウバク末で偽和された市販オウレン末の試験成績

試料No.	乾燥減量	灰　分	酸不溶性灰分	ベルベリン含量
1	7.5%	4.0%	1.0%	0.9%
2	5.0	4.5	0.6	3.3
3	4.3	4.6	0.5	4.9
4	5.8	4.7	0.2	6.5
5	6.3	4.8	0.7	4.3
6	4.4	4.9	0.3	4.8
7	4.8	5.4	0.9	2.8
8	3.5	5.7	1.2	2.9
9	2.8	6.5	1.8	2.6
10	6.6	7.6	2.4	3.9
11	7.8	8.0	3.7	2.4
12	4.9	9.2	1.5	2.2
平均	5.3	5.8	1.2	3.5

カノコソウ（切1，末3）

試料の精油含量はいずれも少なく，また粉末で灰分が規定をこえるものがあった．

カノコソウには数種の品種があり，かつて神奈川県下で栽培されていたカメバキッソウが著名で精油含量も3～5%と高いが収穫量少なく栽培しにくい欠点があったので，現在北海道では収穫量多く栽培容易なホッカイキッソウの「タコ」と「ボタン」と称する2栽培品種が栽培されている．現市場品はこの北海道産で占められ，精油含量は1～2%[4]で日局8の規定に適合しない，そこで精油含量規格は希エタノールエキス含量など適当な規格に改訂することが望ましい．

カンゾウ（切9，末11）

カンゾウの年間輸入量は約6,000トンで医薬用としては250～300トンが消費され，そのほかはグリチルリチン酸およびその誘導体製造用である．最近，チクロの禁止により天然甘味料として需要が急増し，医薬用としてもカンゾウ特有の解毒，抗炎症作用が薬理学的に認識されるようになり輸入量が増加している．医薬用として使用されるものは中国産に限られ東北産80%，西北産15%，粉末用の皮去りが5%程度であるが，皮去りは最近輸入が激減し，香港で西北産を加工している．成分抽出および誘導体製造用は中国新疆産3,000トン，アフガニスタン産2,200トン，ソビエト産1,500トン，イラン産1,200トンなどが輸入され，これらの価格は中国東北産の約1/3～1/4である[2]．

試料のうち切断品はすべて皮付で，粉末は皮付1種，皮去2種が表示されているのみでそのほかは皮付きま

たは皮去りの表示がない．日局８では同一品目中に灰分および酸不溶性灰分が別個の規格値として規定されているが，水製エキスは同一規格値である．しかし，皮去りはほとんど輸入がなく，また最近皮部の成分が研究され[5,6]薬理効果も期待されることから規格値は皮付を主体とし皮去りも含めて一体化を考えてもよいのではなかろうか．また現行の別個規定を必要とするならば表示に対して何らかの行政指導が望ましい．なお，局方には規定されていないが品質評価上，グリチルリチン酸の含量測定も必要であろう．

ケイヒ（切10，末38）

医薬用以外に香辛料として需要多く，中国産800トン，北ベトナム産200トン，台湾産100トンが輸入されている[2]．医薬用としては芳香，甘味および辛味がともに強く，渋味と粘液性の少ないものが良品とされ，カンファー臭のあるものまたは粘液性の強いものは医薬用に適さないといわれている．

粉末で灰分が規定をこえるものが９種あった．切断品で精油含量が1.5～3.0m*l*/50ｇの高い含量を示すものが２種あったが，それらの精油はＧＣ（２％ＰＥＧ，Col. temp. 60—220°）の結果，cinnamicaldehyde を主成分としそのほかの成分も通常の精油含量（0.5～1.0m*l*/50ｇ）のものと大差は認められなかった．

ゲンチアナ（切２，末８）

ゲンチアナは南ヨーロッパ各国に産し，わが国へは主としてスペイン産が年間約120トン輸入され，品質は比較的安定しており，試料は性状その他特に異状を認めない．

ゲンノショウコ（末２）

ゲンノショウコは家庭薬原料として需要があり国産を主とするが，わずかに輸入品もある．茎葉に軟毛があり，茎は直立せず地表をはう習性があるので土砂が付着し易く，灰分および酸不溶性灰分に問題点がある．粉末としての流通性はあまりないようで，試料の灰分は規定以下であるが，酸不溶性灰分は規定をこえ土砂混入を示している．なお，市場品はほとんど野生品が小中学生および農村老人会などの人々によって採取されているもので，地下部を含んだり，調製法がよくないため茎葉がかっ色になり葉が脱落したものなどがしばしばあるので注意を要する．

コウブン（切５，末４）

韓国から年間80トン輸入されている．粉末で１種灰分が規定をこえ，その灰分は灰かっ色を呈し土砂の混入が疑われるものがあった．

コウボク（切３，末３）

わが国で約100トン生産され，約30トンが輸入されている．試料は性状その他異状を認めない．

シャクヤク（切８，末14）

北海道，奈良，鳥取などで約40トン生産されるが，中国および韓国から約100トンが輸入されている．わが国で生産されるもので湯通しして乾燥したものを真芍と称し主として輸出用に向けられ，製薬原料用としては安価な中国産などが用いられている．

試料中灰分が規定をこえるものが９種あったが，中国産は一般に灰分が多く，特に品質の悪い細いものが高い値を示している．最近有効成分が研究[7]され，その薬理作用も解明されたので，有効成分を指標とする化学的な品質評価も必要である．

ショウキョウ（切７，末７）

わが国各地に栽培されるショウガは主として食用に供され，医薬用は中国およびインドなどから輸入されるものが多い．

日局８のショウキョウは漢方の乾生姜で，市場品は皮をはぎそのまま，または縦割りにして乾燥したもので，石灰をまぶして速かに乾燥したものもある．試料の切断品で灰分が8.7％のものがあったが，外面に石灰をまぶしたものである．

ショウマ（切４）

日本産の和升麻（黒升麻）は *Cimicifuga simplex* Wormskの根茎であるが，現在ほとんど市場性なく，中国および北朝鮮に分布する *C. dahurica* Maxim. の根茎を調製した北升麻が主として用いられている．井上ら[9]は両者の成分を研究し，共通成分としてferuic acid, caffeic acid が含まれているが，北升麻に含まれている isoferuic acid はろ紙クロマトグラフィーおよびＴＬＣによって和升麻から検出されなかったと報告し，漢方処方に配合される升麻に両者のいずれを用いるかによって治療効果も変ってくるのではなかろうかと指摘している．

試料は日本産に比しやや強い黒かっ色を呈し，井上らの方法によってＴＬＣ（メタノール抽出液，Silica-gel HF_{254}, benzen：dioxane：AcOH＝90：25：4, ＵＶ～NH_3＋ＵＶ）を行ない，標品の和升麻および北升麻と比較検討した結果，全試料が中国産北升麻であった．

センキュウ（切８，末16）

北海道で約230トン生産され，そのうち約130トンが輸出されている．日本産センキュウの基原植物は木島ら[10]によれば中国産と相違し，現在の *Cnidium*

officinale Makinoの学名に問題があり *Conioselium* 属が支持されている.

試料中切断品に異状は認められないが，粉末に灰分が規定をこえるものが5種あって，これらの灰分はいずれも灰黒色を呈し，酸不溶性灰分も多く，明らかに土砂が多く混入しているものである.

センブリ（全3）

試料は全草で苦味も強く，基原および品質に問題はないが，市場にはまれに中国産または韓国産と称するものがあり苦味が弱く薬用としない．最近，需要の増加と生産が徐々に減少していることから価格が著しく高騰し，市場のセンブリ末にはこれらのものまたは延命草末などが偽和されているといわれ，またセンブリの国内生産量をはるかに上回るセンブリ末が流通しているともいわれていることから，ある程度この事実の真実性を裏書きしているのではなかろうか．著者の経験によれば延命草末は炭酸水素ナトリウムと配合し，数日を経過すると苦味がほとんどなくなるので，延命草末で偽和されたセンブリ末を用い，日局8のセンブリ・重曹散を調製した場合には数日にして苦味が弱くなるので識別の一方法となる.

日局8に規定するセンブリ *Swertia japonica* Makino はわが国特産の越年草といわれ，韓国産は苦味弱く薬用に用いられないムラサキセンブリ *S. pseudochinensis* Haraとされている．しかし，近年，韓国産センブリと称するものに形状が *S. japonica* に類似し，苦味もかなりあるものがあり，これより得た種子で東京都薬用植物園小林主査の協力により栽培試験を行ない基原について目下研究中である.

ソウジュツ（切10，末14）

ソウジュツはビャクジュツとともに朮類生薬として漢方製剤に繁用される要薬で，日局6で朮はオケラの品名でオケラ *Atractylodes japonica* Koidzumi の根茎が規定され，日局7第2部の昭和46年改正以来基原的にソウジュツとビャクジュツに区分され，別品目として規定されている.

Atractylodes 属は東亜地域にのみ分布する植物で3種2変種がある．これらを日局8によって区分すれば，ソウジュツの基原はホソバオケラ *A. lancea* D. C.，シナオケラ *A. lancea* var. *chinensis* Kitamura，ナンマンオケラ *A. lancea* var. *simplicifolia* Kitamura，ビャクジュツの基原はオケラ *A. japonica* Koidzumi，オオバナオケラ *A. ovata* A.P.D.C.である．わが国にはオケラが野生しているが，市場性がなく，市場の朮類はすべて中国，北朝鮮または韓国から輸入されたものである.

朮類は産地，集荷地などによって多くの呼称があり，これら現産地での名称がわが国市場の流通名と一致しないこともあって，市場品の名称ははなはだしく混乱し，一部のものを除いて外観による識別はきわめて困難であるので，市場では日局の基原に従った区別が正しく行なわれていない．そこで著者等は1968年以来市場品を調査し，ＴＬＣおよびＧＣによる基原的識別法を研究した[11-14].

著者等の識別法に従って試料を基原的に考察し，灰分および精油含量を測定した結果は表5に示す通りであるが，9種が *A. japonica* に基づくビャクジュツであった．日局8ではビャクジュツの確認試験およびソウジュツ中に混在するビャクジュツを検出する純度試験として，ビャクジュツの精油成分である atractylon がバニリン・塩酸試液によって紅色を呈する反応を応用しているが，ビャクジュツの精油含量によって呈色が不明確である．また，ソウジュツに atractylon を含有するものがあり，ＴＬＣによれば atractylon 以外に同様の呈色反応を示す物質が含まれ，ものによってはこの物質が atractylon よりも含量多く，強い呈色を示すので，この呈色反応は両者を識別する適当な方法ではない．著者等の方法[15]は atractylon，atractylodin，hinesol eudesmol，などを主な指標としてその他の成分もＴＬＣまたはＧＣによって総合的に比較検討するものである.

表5に示す如く，ソウジュツの精油含量に大きな差があるが，著者等の調査によれば，わが国市場で *A. lancea* に基づく古立蒼朮は切面から白色綿状結晶を析出する良質のもので，精油含量は 2.5～3.5m*l*/50ｇ，*A. lancea* var. *chinensis* に基づくと推定されるものは 0.7～1.5m*l*/50ｇであるが，*A. lancea* var. *simplicifolia* に基づく北朝鮮産の朮は0.3m*l*/50ｇ程度で日局8に適合しないものである.

ダイオウ（切17，末37）

日局8は *Rheum* 属 *Palmata* 節の薬用種の3種またはそれらの種間雑種を規定しているが，わが国に年間約 100～120 トン輸入されている大黄は *R. officinale* Baill に基づく雅黄のようである．また，近年信州大黄として栽培されているものは朝鮮大黄の基原である *R. coreanum* Nakai 系であるが，まだ市場性がない.

日局8では純度試験として *Rhapontica* 節植物に基づく非薬用大黄（土大黄など）をＴＬＣによって rhaponticin の青紫色けい光をチェックしている．試料中

表5　市販ソウジュツの試験成績

形態	試料No.	灰分	精油含量	白色綿状晶	atractylon	atractyrodin	hinesol	β-eudesmol	基原植物	日局8区分
		%	ml/50g							
切断	1	6.2	2.7	+	±	+	+	+	*Atractylodes lancea*	ソウジュツ
	2	6.2	3.2	+	±	+	+	+		
	3	6.7	3.2	+	±	+	+	+		
	4	6.0	2.9	+	±	+	+	+		
	5	6.7	2.7	+	±	+	+	+		
	6	7.0	3.8	+	±	+	+	+		
	7	5.8	3.1	+	±	+	+	+		
	8	5.7	1.0		+	+	+	+	*A. lancea* または *A. lancea* var. *Chinensis*	
	9	5.3	0.3		+					
	10	5.6	0.2		+				*A. japonica*	ビャクジュツ
粉末	11	8.9	2.5	+	±	+	+	+	*A. lancea*	ソウジュツ
	12	9.6	2.2	+	±	+	+	+		
	13	7.2	2.2	+	±	+	+	+		
	14	6.7	2.4	+	±	+	+	+		
	15	5.5	2.8	+	±	+	+	+		
	16	4.7	0.6		+				*A. japonica*	ビャクジュツ
	17	6.6	0.4		+					
	18	5.3	0.6		+					
	19	5.7	0.7		+					
	20	6.1	0.4		+					
	21	7.5	0.5		+					
	22	6.9	0.8		+					
	23	6.1	0.4			+			*A. lancea* var. *simplicifolia*	ソウジュツ
	24	5.9	0.3			+				

6種がこの反応を呈し非薬用のものであったが，このTLCはスポットがかなりテーリングし，また類似のけい光を示すスポットが隣接して表われるので，試験に際しては著明にrhaponticinのけい光が表われる土大黄または和大黄，あるいはこれらのエタノール浸液でTLCを行ない，薄層板のけい光部分をかきとりエタノールで抽出したrhaponticin溶液を対象として同時展開し比較する必要がある．

このほか，近年瀉下効果を代表する成分としてセンナ葉などに含まれているsennoside Aがダイオウに含有されていることが研究されその化学的定量法および生物学的検定法も確立されたので[16]，これら薬効に直接関係ある品質評価も必要である．

チクセツニンジン（切4，末2）

チクセツニンジンはわが国各地に産し，一部がニンジンの代用として用いられている．灰分が規定をこえるものが切断品および粉末に各1種ずつあった．

チョウジ（全6，末10）

年間約180トン輸入され，医薬用以外に香辛料としての消費が多い．

全形生薬に問題はなかったが，粉末のうち灰分で2種，酸不溶性灰分で3種がそれぞれ規定をこえ，また精油含量の少ないものが4種あった．

トウキ（切11，末9）

トウキは北海道で約120トン，奈良県で約5トン生産され，韓国から約20トン輸入されている[2]．日局8は奈良県産の大和当帰（大深当帰）を規定し，北海道で栽培されているものはホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikinoであり，韓国産のものはかつて大和種の種子が輸出されそれから栽培されたものといわれている．

奈良県では一部ホッカイトウキが栽培され，種間雑種もかなり多く，純系の大和当帰が次第に少なくなりつつあるという．奈良県産の北海当帰は大和当帰ようの栽培および調製がなされているので，外観性状がきわめて類似している．真正の大和当帰は帯赤かっ色を呈し，甘味があるが，奈良県産北海当帰は色調がやや淡く，甘味が乏しい．しかし，同時に両者を比較対照

しなければほとんど識別困難である．北海道産は細根がほとんど除かれたもので，外面黒かっ色を呈し識別は容易である．両者の化学的識別はきわめて困難で，日局の基原規定も一考を要すると考える．

粉末試料に灰分および酸不溶性灰分が規定をこえるものが多く，水洗不十分による土砂の混入が考えられる．

ハチミツ（8）

レゾルシン呈色反応を示すものが3種あった．この反応は日局7まで人工転化糖の検出法とされていたが，必ずしも人工転化糖によらず，小分けに際して加熱によって生成する 5-hydroxymethylfurfral（以下HMFと略す）によっても呈色を生ずる．HMFは天然ハチミツ中にも微量に存在し，増加の要因としては加熱，酸度，貯蔵中の経時変化などがあげられる．この反応は抽出に使用するエーテルに添加されている酸化防止剤が反応を妨害するので必ず蒸留精製したものを，塩酸はなるべく開封直後の特級品を，またレゾルシンは無色のものを用いなければ呈色がだいだい色を帯びた赤色となり判定が不明確となる．

近年，人工甘味料が問題となり，いわゆる自然食品の流行によって，甘味，滋養強壮を目的として消費が急増し，昭和47年には年間約23,000トンが輸入されている．食品関係ではFAO/WHOの暫定規格およびわが国の全国ハチミツ公正取引協議会の公正競争規約などによって品質基準が定められている．著者等は先に市販日本薬局方ハチミツの品質評価について報告[17]したが，HMF定量値とレゾルシン呈色反応は必ずしも平衡関係にないがFAO/WHOの暫定規格（4 mg/100g）以下の低濃度でも陽性となり，かなり厳格な反応である．TLCによって糖組成を検討した結果によれば，グルコースとフルクトースの比率は密源によってかなりの幅があるために品質評価の対象になりにくいが，シュクロースまたはマルトースなどがかなり多量に検出されるものがあり，麦芽分解の水あめなどを偽和した疑いがあるものがあった．

日局で規定しているハチミツは巣から遠心分離し，異物を絹ごしたままのもので各種の活性があり，栄養価の高いものである．しかし，市場品の多くは脱色，脱臭，濃縮などの加工を施し各種のものをブレンドしたもので，単なる糖液にすぎないような感がある．天然のハチミツには熱に不安定な抗菌物質や α-アミラーゼなどが含有されており，FAO/WHOの暫定規格ではジァスターゼ活性を規定しているが，加熱度のチェック法として一考を要する．

ビャクジュツ（切11，末8）

ソウジュツと同様に流通名に混乱がある．わが国では *Atractylodes japonica* の肥大し油分の少ない根茎の外皮を剝いだものをビャクジュツ，老成し油分の多い根茎を外皮をつけたまま調製してソウジュツとして中国産ソウジュツに代用したので，同じ基原に基づく生薬に別種のよび名をつける習慣が生じ，現在でも外皮をつけたものはソウジュツで，外皮を除いたものをビャクジュツとする外観による識別法が残っている．日局8では *A. japonica* に基づくものをワビャクジュツ，*A. ovata* に基づくものをカラビャクジュツとして規定しているが，カラビャクジュツは高価で流通がきわめて少なく，市場の大部分は北朝鮮または韓国から輸入された *A. japonica* に基づくもので外皮を除いた不整塊状のものと外皮をつけたままの細長い結節状のもので，皮付きのものがしばしばソウジュツとして誤って流通している．ワビャクジュツの特徴は破折面がきわめてせんい性で類白色を呈し，数日間放置しても油室のかつ色変化が起らないことである．

試料は大部分がワビャクジュツで，カラビャクジュツは認めなかった．基原のことなるものとしては北朝鮮西部から中国東北地区南部，山東半島に分布する *A. lancea* var. *simplicifolia* に基づくものが3種あった．

著者等の調査によればワビャクジュツは 1.0～1.5 m*l*/50 g の精油含量であるが，カラビャクジュツは 0.5～1.0 m*l*/50 g である．

ボウイ（切9）

アオツズラフジ *Coculus trilobus* DC に基づく木防已と中国産のシマハスノハカズラ *Stephania tetrandra* S. Moore に基づく漢防已（粉防已）が1種ずつあったが，これらは日局8に規定するものではない．ボウイは日局7の2部旧版までカンボウイ（漢防已）と名づけられていたので市場では名称に多少の混乱がある．

ボタンピ（切16，末7）

ボタンピは奈良県などわが国で約8トン生産され，韓国および中国などから約15トン輸入されている．近年，西康丹皮と称され基原不明のものがしばしば中国から輸入されているが，このものは半管状で，長さ3～7 cm，厚さ1～2 mm，外面は暗かっ色，内面は灰かっ色～淡紫かっ色を呈し縦じまが認められ，日局8の確認試験を行なうとき，淡赤紫色または淡緑かっ色を呈する．試料のうち切断品および粉末の1種ずつに同様の反応を呈するものがあった．木島ら[18]は

paeoniflorin, paeonol, paeonoside を指標としてＴＬＣ，確認試験，paeonol 含量からボタンピの化学的品質評価について報告し，その中で西康丹皮は日局８の確認試験に合格し得るとし，ＴＬＣで西康丹皮は邦産および韓国産ボタンピと若干の差が認められ，paeonolは西康丹皮に少なく，邦産および韓国産ボタンピに多く含まれる傾向にあるのに対し，paeoniflorin はその逆であり，また分取ＴＬＣによって paeonol を定量した結果，邦産および韓国産ボタンピは1.8～1.9％であるのに対して西康丹皮は 0.4％ 以下で品質が劣るとしている．

前記の確認試験に問題のある試料の２種はSilicagel G plate を用い，メタノール抽出液を検液とし，chloroform : methanol (3 : 1) を展開溶媒とするＴＬＣおよび木島らの酢酸エチル抽出液を検液とし，toluen : ethylformate : formic acid : chloroform (5 : 6 : 3 : 6)を展開溶媒とするＴＬＣを行なった結果，スポットの濃淡によってpaeonolがボタンピに比較して少ないことが認められ，西康丹皮であることが判明した．

マオウ（切７）

マオウは主として中国産，まれにインドおよびパキスタン産が輸入されているが，インドおよびパキスタン産が比較的総アルカロイド含量が高いようである．

試料は総アルカロイド含量など特に問題はなかったが，最近の輸入品で含量が規定の 0.7％未満のものが多いといわれている．

日局８の定量法はアンモニア水の量が少ないために抽出されにくく，また 0.02 N塩酸 25m*l* では計算上1.65％以上は定量できないので，アンモニア水の量を5～8m*l*に，0.02N塩酸25m*l*を0.05N塩酸20m*l*にそれぞれ改正するか，もしくは日局８法は操作が繁雑で時間を要し，データーのばらつきが多いので，試料の乾燥を日局８に従って行なったのち，日局６の定量法に従って実施した方が誤差も少なく能率的と考える．

ヨクイニン（末８）

全試料とも性状，確認試験および純度試験において異状を認めなかった．

総　括

１）輸入生薬で基原植物が日局８に規定されていないものがしばしばあったが，外国における分類方法や名称と日局８のそれとがことなるため，または改正前の局方名と現行局方名がことなるために，国内流通過程において名称の混乱をきたしたものと考えられる．

２）日局８には数種の基原植物または「その他同属植物」などの表現で，通例，同様の成分薬効を有する生薬として用いられる基原植物を規定しているが，薬効評価の面から，使用目的によっては基原を明らかにして使い分けをする必要がある．

３）日局８の規格値のうち特に灰分が，市場品の実態と合っていないものがある．無論，いたずらに粗悪な流通品に合わして規定をゆるくすることには問題があるが一部改訂の必要がある．オウバクのように規定がきびしすぎるもの，また必要以上にゆるいものもある．

４）粉末生薬の品質が一般に全形～切断生薬に比較して劣っている．日局８の粉末生薬は日局８に適合する全形～切断生薬から製造することとし，別に規定するもののほか，これを製するに用いた全形～切断生薬中に含まれていない組織の破片，細胞，細胞内容物またはその他の異物を含まないとし，精油含量のように製造工程中やむを得ず減少するもの以外は，成分含量，灰分，酸不溶性灰分などの規格値は原料と同一に規定している．しかし，全形または切断品としては外観上商品価値の劣るもの，または切断生薬を製した際の粉末状になったもの，あるいは成分含量等が局方に適合しないものなども適当にブレントして，最終的に局方の規格に合わして粉末を製するなどの行為が一部行なわれている模様で，価格高騰のためかオウレン末にオウバク末が偽和増量された悪質な例もあった．同一品目の切断品と粉末の灰分または酸不溶性灰分を比較するとき，一般に粉末の方が高い値を示し，品質の悪いものまたは切断品を製する際に粉末状になった部分のように土砂を多く含むものがかなり使われているものと推定される．

酸不溶性灰分の規定は元来，根茎または根などで調製中ある程度混入がさけられない土砂の限度を規定するものであるが，粗悪品の流通防止および品質確保の見地から粉末生薬にはできるだけ規定する必要がある．

５）品種によっては試料数が少ないため，本報の研究を通じて流通市場品のすべてを評価するには多少の危険性はあるが，昭和 46～48 年の間の流通品について，ある程度の評価ができたものと考えられる．品種によってはその後の流通事情によって品質に変動をきたしているもの，または偽和等の悪質なものに対する適切な行政指導ならびに取締りによって流通品がよくなっているものもある．

原料生薬の品質評価は単に理化学的，生物学的試験にとどまらず，絶えず流通事情を調査し，輸入品など

は現産地，集荷地，船積港などをチェックし，さらに相手国との国際関係なども参考にしなければならない．

6）具体的には各品目ごとに記したが，取扱業者の間には「生薬は特別扱いである」という従来からの誤った観念が依然として残り，五感による識別のみに頼る傾向があり，試験室はあっても取扱い商品の品質に有効に機能していないためか，かなりの粗悪品が認められた．

すでに，流通生薬の品質を確保するために昭和47年12月23日薬監第335号薬務局監視課長通知「品質の粗悪な生薬の流通防止について」により自家試験実施の不十分が指摘され，引き続き，昭和48年12月10日薬発第1216号薬務局長通知「生薬の取扱いに関する薬事法の適用範囲について」および昭和49年2月4日薬監第20号薬務局監視課長通知「生薬の取扱いに関する監視指導上の措置について」で示されているように，生薬に対する行政上の取扱いが一般医薬品なみになったことは，医薬品の製造原料である生薬の品質確保上当然の措置である．

謝　辞

本研究に当り終始ご指導ご鞭撻をいただいた当所松本茂理化学部長，試料の収集にあたられた薬事監視員の皆様，生薬の流通情報ならびに貴重な標準試料を提供された各社，イソフェルラ酸の標品をいただいた星薬科大学井上隆夫博士に深謝いたします．

参考文献

1）岩佐準三，成戸俊介，宇津井雄三：薬誌86, 396—399 (1966)
2）永井吉澄：月刊薬事15, 63—65 (1973)
3）渡辺四男也，上原真一，西川洋一：東京衛研年報24, 109—116 (1972)
4）畠山好雄，本間尚治郎，逸見誠三郎，ヒキノヒロシ：衛生試報，89, 67—72 (1971)
5）斉藤保，柴田承二：日本生薬学会長崎大会要旨，p17 (1872)
6）木下武司，斉藤保，柴田承二：日本生薬学会東京大会要旨，p45 (1973)
7）Sibata. S. and Nakahara. N.: *Chem. Pharm. Bull.* 11, 372, 379 (1963)
8）高木敬次郎，原田正敏：薬誌89, 879—886, 887—892, 893—898, 899—908 (1969)
9）井上隆夫，中田千津子，伊沢一男：生薬：24, 76—80 (1970)
10）木島正夫，石貴徳，新田あや：日本生薬学会東京大会要旨，p25 (1973)
11）西川洋一：東京衛研年報，20, 223—225 (1968)
12）西川洋一，風間成孔：*ibid.*, 22, 141—146(1970)
13）西川洋一，勝田隆子，上原真一：*ibid.*, 23, 73—79 (1971)
14）西川洋一，勝田隆子，渡辺四男也：*ibid.*, 24, 103—108 (1972)
15）西川洋一，渡辺四男也，瀬戸隆子：*ibid.*, 25, 投稿中
16）松岡敏郎：代謝，10, 臨時増刊，709—714(1973)
17）勝田隆子，西川洋一：東京衛研年報，23, 81—86 (1971)
18）木島正夫，鹿野美弘，大塚恵子，井原紀子：生薬，27, 124—128 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 103 — 109, 1974

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 (Ⅱ) 市販婦人および乳幼児用肌着中のホルムアルデヒドについて (2)

吉原武俊* 奥本千代美* 寺島 潔*
長嶋真知子* 遠山逸雄* 西川洋一*

Studies on Examination Method of Household-necessities Containing Poisonous Chemical Substances (Ⅱ) Determination of Formaldehyde in Commercial Underwears for Ladies and Infants (2)

TAKETOSHI YOSHIHARA*, CHIYOMI OKUMOTO*, KIYOSHI TERASHIMA*
MACHIKO NAGASHIMA*, ITSUO TOYAMA* AND YOICHI NISHIKAWA*

It has been concluded in the previous report that different content of formaldehyde in cloth samples resulted from pH and temperature conditions in tests.

The further study on determination from clothes was discussed in this paper.

The results obtained are summarized as follows :

1) Distribution of formaldehyde content in clothes had a wide range, but deviation of measurement was observed smaller when test clothes was cut larger than 5×5cm in size.

2) Although there was no difference of formaldehyde content between the control extract and the solution after dialyzed, the content in dialyzed solution was shown slightly smaller by the steam-distillation.

3) When sample was kept at room temperature, formaldehyde content in the extract showed a tendency to decrease and ratios, the above-noted content to that before steam-distillation, were also decreased.

Ⅰ はじめに

一般消費生活の用に供される家庭用品に各種の有害物質が含まれているが，著者らはこれら有害物質の試験方法について研究し，前報[1]で婦人および乳幼児用肌着中のホルムアルデヒドについて，抽出条件および各種定量法の検討を行い市販品中のホルムアルデヒド含有量を調査した結果を報告した．その中で抽出方法およびその他の試験条件がことなる場合，ホルムアルデヒドの測定値に変化がみられたが，これは試料中に遊離状態で残留しているホルムアルデヒドのほかに，試験操作中に樹脂の分解によって生ずるホルムアルデヒドによるものと考えられる点を指摘した．

ホルマリン樹脂加工布中の遊離ホルムアルデヒドの測定は種々試みられているが[2-4]遊離状態の正確な定量は容易でなく，繊維中の遊離ホルムアルデヒドをいかに定量的に抽出し，かつ精密に測定するかが問題となってくる．ホルムアルデヒドの抽出方法を大別すると次のようになる．

抽出法
- 液相法
  - 直接法—抽出液の混濁
    - 不純物の影響
  - 蒸留法—抽出液中の樹脂の分解
- 気相法

* 東京都立衛生研究所理化学部医薬品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

気相法は液相法に比べ操作が複雑であり，試験に長時間を要し，液相法では試料を水に浸漬して抽出するので，加工布に存在する遊離ホルムアルデヒドのほかに，未反応のもの，または樹脂化反応の際に繊維と強力に結合しなかった低縮合樹脂などが脱離し，試験法によっては，これら脱離樹脂の分解によって生ずるホルムアルデヒドを加算した測定結果を得ることもある．

そこで著者等は各種抽出液を直接測定した値と水蒸気蒸留後の測定値との比率が等しい場合はほぼ遊離ホルムアルデヒドのみを測定していると考えられることに注目して，各抽出液およびそれらをⅡ5-bで述べる条件で処理した液について，上記比率の測定を試みた．また試料中のホルムアルデヒド測定値は，樹脂の種類および樹脂加工条件など[5-9]にかなり影響されることが考えられるので，市販樹脂加工繊維製品のほかに繊維加工用樹脂を用いて実験的に加工調製した自家製樹脂加工布について比較実験を行い，併せて抽出液中に脱離してくる樹脂の除去方法，試料上におけるホルムアルデヒドの濃度分布および経時変化等についても検討を行った．そのほか前報にひきつづき，アセチルアセトン法[10]により市販婦人および乳幼児肌着62品目についてホルムアルデヒドを定量したので，報告する．

Ⅱ 実験の部

1．試薬

a．ホルムアルデヒド標準原液(HCHO：約2.5%)

b．ホルムアルデヒド標準溶液(HCHO：約100μg/ml)

c．アセチルアセトン試薬（衛生試験法[10]）

d．フロログルシン試薬（JIS-L1041[11]）

e．0.01%非イオン系浸透剤溶液

f．ホルマリン樹脂

住友化学工業株式会社製の繊維加工用樹脂

Sumitex Resin NS-1spe（グリオキザール樹脂）

〃 M-3（メラミン樹脂）

〃 901（エチレン尿素樹脂）

〃 ULW(尿素・メラミン・ホルマリン初期縮合物)

a～eは前報[1]に準じて調製する．

2．装置

日立自記分光々度計 EPS-3T型

3．試料

婦人および乳幼児用肌着 都内のデパートまたはスーパーマーケットにて昭和48年7～11月の間に購入したものである．

自家製樹脂加工布 無加工綿ブロードを用い，Table 1に示した組成の樹脂浴に室温で1分間浸し，平板上に広げローラーで余分の液を絞ったのち（絞り率約80%），80°，3分間前乾燥し，150°，3分間の熱硬化（いわゆるキュアリング）を行なって調整する．この加工条件は住友化学工業株式会社の方法[12]および近藤らの方法[3]を参考にしたが，実際に工業的にはおおむね次の5工程によって加工されている．

1）処理浴の調製

2）布地への処理浴の飽充

3）前乾燥

4）熱硬化

5）洗浄および乾燥仕上げ

ここでは5）の工程を省略した．

Table 1 Composition of Padding Bath

Resin No.	Name of Resin (g)	Accelerator (g)	Bath volume (ml)
R-1	S.R.NS-1spe : 90	KX : 45	300
R-2	S.R.M-3 : 30	ACX : 21	300
R-3	S.R. 901 : 30	ACX : 21	300
R-4	S.R.ULW : 30	ACX : 12	300

S.R.=Sumitex Resin

4．樹脂量の測定

JIS—L1041[11]に従い測定した定着樹脂量をもって表す．

5．試料中のホルムアルデヒド定量法

a ホルムアルデヒドの抽出

試料上任意の部分から5×5～10×10cmの大きさの範囲で試料片を切りとり，共栓試験管にいれ水100 mlを加えて密栓し，60°の水浴中で30分間振とう抽出し温時ろ過する．

b 検液A，ミリポアフィルターろ液A-vc，A-$_{VM}$，A-vsおよび透析処理液A-$_{Di}$の調製

aで得た抽出液の一部を必要に応じて遠心分離し，澄明な溶液を検液Aとする．同じ抽出液の20～50mlをとり，東洋ミリポアフィルターVC(孔径100nm)，VM（孔径50nm）およびVS（孔径25nm）を用いてろ過し澄明な溶液とし，これを検液A-vc，A-$_{VM}$およびA-vsとする．また，同抽出液を10～20mlとり，Visking company製のセルロース透析膜により，一定量の水を外液とし，約16時間透析し，この外液を検液A-$_{Di}$とする．これらは直接測定の検液とする．

c　検液B，B-vc，B-$_{VM}$，B-vsおよびB-$_{Di}$の調製　（bにおける各検液の水蒸気蒸留）

検液A～A-$_{Di}$の10～50mlを500mlの蒸留フラスコにとり，20%リン酸1mlを加えたのち，前報[1]に従い水蒸気蒸留を行なった留液を検液B，B-vc，B-$_{VM}$，B-vsおよびB-$_{Di}$とする．

d　ホルムアルデヒドの定性および定量試験法

検液A～A-$_{Di}$およびB～B-$_{Di}$について，前報[1]に準じアセチルアセトン法でホルムアルデヒドの定性および定量試験を行なう．

6．実験と結果

6—1　試料採取部位および試料布の大きさによるホルムアルデヒド測定値の変化

試料上のホルムアルデヒド濃度分布を検討するため，ベンベルグ製市販婦人用スリップから不規則に1×1，2.5×2.5，5×5，および10×10cmの大きさの布片各10枚を採取した．1枚のスリップからすべての試料を採ることが望ましいが，量の関係上同一商品を2枚用いた．各々の試料片中のホルムアルデヒドを測定した結果，試料片の大きさを5×5cm以上にすることによって，ホルムアルデヒド測定値の変動係数を少なくすることができた．(Table 2)

標準には同試料の抽出液を等量ずつ10回水蒸気蒸留した留液10本を用いた．

つぎに，同スリップを10×10cmの大きさにとり，そのまま抽出した場合と，細切したのち抽出した場合のホルムアルデヒド測定値を比較したところ，有意の差が認められなかった．

これらの実験結果より，ホルムアルデヒドの抽出には前報[1]のように細切した試料を適当量秤りとる方法をやめ，試料上の任意の部分から，5×5～10×10cmの試料片を切りとり，これを抽出するように改めた．

Table 2　Sample Size and Deviation of Formaldehyde Value

Sample cm^2	$\bar{x}$ (HCHO μg/ml)	$\sigma=\sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x}-xi)^2}{10}}$	C=$\frac{\sigma}{\bar{x}}\times100$ (%)
1^2	815	43.64	5.35
2.5^2	773	37.42	4.84
5^2	918	34.87	3.80
10^2	681	24.26	3.56
St.	774	16.85	2.18

6—2　市販樹脂中のホルムアルデヒド

市販のホルマリン樹脂 Sumitex Resin（以下S.R.と略す）NS-1，M-3，901およびULWの一定量を20°の水に溶解し，樹脂1g当りのホルムアルデヒドを測定した結果，S.R.-NS-1(グリオキザール系)からホルムアルデヒドはほとんど検出されず，S.R.-ULW（尿素・メラミン・ホルマリン初期縮合物），S.R.-901（エチレン尿素樹脂），S.R.-M-3（メラミン樹脂）の順にホルムアルデヒド含有量が多く，また水蒸気蒸留の前後における測定値の比は同じ順に大きくなった．

6—3　自家製樹脂加工布中のホルムアルデヒド

3に示した方法に従って調製した自家製樹脂加工布中のホルムアルデヒドを測定し，別に樹脂量はJIS

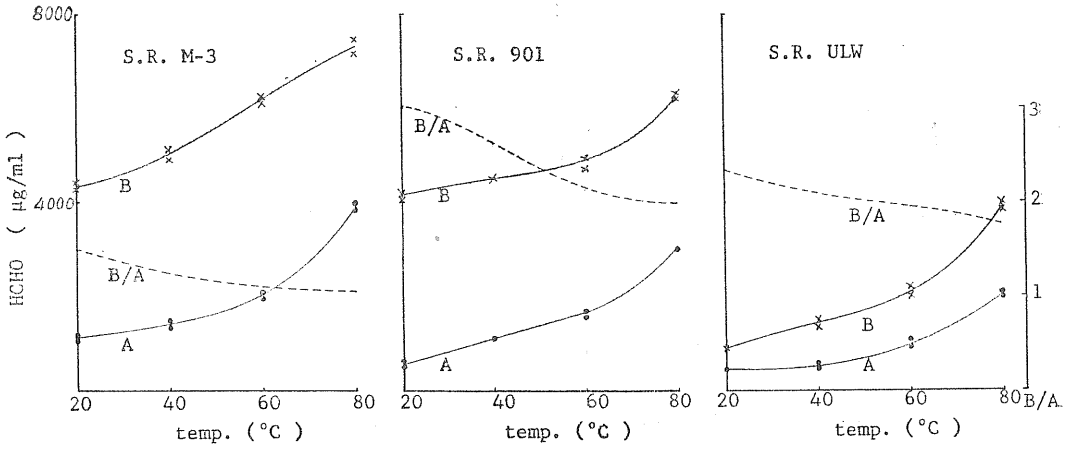


Fig. 1　Effect of Extracting Temperature on the Formaldehyde Content from Clothes
A and B : the values of formaldehyde before and after steam-distillation of the extract

Table 3 Formaldehyde Content of Resin Solution and Cross-linking Finished Product

Resin	Resin solution		Finished product	
	HCHO μg/g	S.D / D	Resin %	HCHO μg/g
S.R.NS-1	0			
S.R.M-3	154,100	1.46	11.0	1,250
S.R. 901	237,600	1.84	9.6	2,860
S.R.ULW	475,200	1.96	10.2	2,480

-L1041 に基づいて測定し，加工により付着した樹脂量に対するホルムアルデヒドの測定値は Table 3 に示すとおりである．

6—4 遊離ホルムアルデヒドの抽出と測定

a 抽出温度

樹脂加工後の洗浄工程を除いた自家製樹脂加工布3種を用いて，抽出温度20°，40°，60°および80°でホルムアルデヒド測定値と抽出温度の関係を検討した結果，Fig 1 に示す如く使用した樹脂の種類にかかわらず，抽出温度の上昇に伴い，直接測定値（検液Aの測定値）および水蒸気蒸留後の測定値(検液Bの測定値)はともに上昇し，両測定値の比は低下した．

b 測定条件

発色温度 60° のアセチルアセトン法でホルムアルデヒドを測定してきたが，aの実験結果より発色温度が60° の場合には遊離ホルムアルデヒドが生成するおそれがあるので，抽出溶媒：水～非イオン系浸透剤2種，抽出温度：25°±1°～60°，発色温度：25°±1°～60°，発色試薬：フロログルシン～アセチルアセトンを各種に組合せてホルムアルデヒド測定値を比較したところ，同温度で抽出した場合，発色温度によるホルムアルデヒド測定値の差は認められず，フロログルシン試薬を発色試薬として用いた場合アセチルアセトン法よりやや高めの測定結果が得られた．抽出液として水および2種類の浸透剤溶液を用いた場合の測定値に有意の差が認められなかった．

c 樹脂成分の除去

抽出液中の樹脂成分を除去するため，ミリポアフィルター（孔径100, 50, 25nm）とセルロース透析膜（孔径2.4nm）によりろ過および透析を行なった検液 A-vc, A-$_{VM}$, A-vs および A-$_{Di}$ と未処理の抽出液（検液A）中のホルムアルデヒド測定値は，Table 4 および Fig. 2 に示す如く各検液の間に有意の差は認められなかった．各々を水蒸気蒸留したのちの値（検液B，B-vc, B-$_{VM}$, B-vs および B-$_{Di}$ の測定値）は

Table 4 Formaldehyde in the Extract of Cross-linking Finished Product

HCHO μg/mℓ / Resin	before S.D	after S.D				
		B	B-$_{VC}$	B-$_{VM}$	B-$_{VS}$	B-$_{Di}$
S.R·M-3	2,140	5,320	5,110	5,250	5,330	4,980
S.R. 901	3,040	6,060	5,810	5,940	5,480	5,320
S.R.ULW	800	1,410	1,410	1,450	1,460	1,290

S.D : steam distillation
B : the untreated extract
B-$_{VC, VM, VS, Di}$: the treated extract with miliporfilter. VC, VM, VS and dialysis

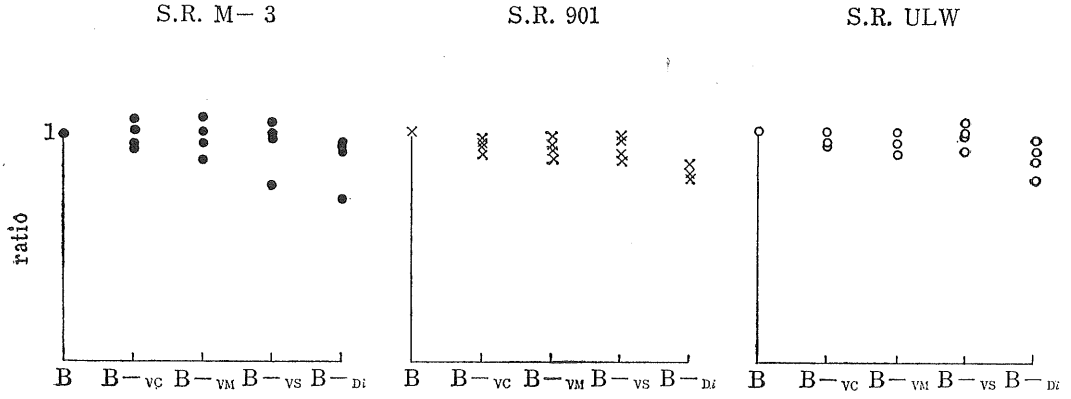


Fig 2 The Ratio of Formaldehyde Content in the Treated-extract to That in the Untreated-extract
B : the untreated-extract
B-$_{VC, VM, VS, Di}$: the treated-extract with miliporefilter-VC, VM, VS and dialysis

Table 5-1 Formaldehyde from Ladies' Underwears

Sample name		Material	HCHO (μg/g)	Sample name		Material	HCHO(μg/g)
Slips	1	B	13,480	Swim suits	1	N	0
*	2	B, N	9,850	*	2	C	20
	3	B, N	8,500	Slips	1	B	3,250
	4	B, N	7,120	**	2	B	820
	5	B, N	2,990		3	B	920
	6	B, N	2,430		4	B, N	4,570
	7	N	0		5	B, N	4,730
	8	C	0		6	B, N	1,680
Panties	1	B	15,600		7	B, N	70
*	2	B, N	4,900		8	B, N	60
	3	B, N	2,810		9	B, N	70
	4	B, C	30		10	B, N	50
	5	C	30		11	B, N	40
	6	C	60		12	B, N	30
	7	C	50		13	B, N	40
	8	PU	0		14	B, N, PU	930
	9	C, PU	40		15	B, N, PU	110
	10	N	0		16	B, N, PU	930
Brassieres	1	N, PU	40		17	N	40
*	2	N, PU	90		18	N	20
	3	N, PU	40		19	N	0
	4	C, PE, PU	0		20	N	0
	5	C, PE, PU	0		21	N	0

* purchase date 48. 7
** 〃 48.11
B : bemberg PE : polyester
N : nylon PU : polyurethan
C : cotton

Table 5-2 Formaldehyde from Infant's Underwears

Sample		HCHO	
Name	Number	+	−
Diapers	7	1	6
Diaper-covers	6	1	5
Swim-suits	3	1	2

孔径の小さなもので処理した液になるに伴い減少する傾向にあるが，いずれも水蒸気蒸留前の値に比べ高い値を示した．

6—5 市販肌着中のホルムアルデヒドと樹脂量

a 市販婦人および乳幼児用肌着中のホルムアルデヒド

婦人肌着41検体，乳幼児用肌着21検体を 60° の水浴中で水100m*l*で30分間振とう抽出し，水蒸気蒸留したのち，アセチルアセトン法によるホルムアルデヒド測定値は Table 5 に示す如く，婦人用肌着のほとんどからホルムアルデヒドが検出された．

b 市販肌着中の樹脂量とホルムアルデヒド

ホルムアルデヒド検出率の高い婦人用スリップ10検体を用い，定着樹脂量およびホルムアルデヒドを定量した結果は Table 6 に示す如く，両者の間に相関関係が認められなかった．

c 衣服中ホルムアルデヒドの経時変化

市販婦人用肌着を，店頭包装状態のまま長期間室温に放置して1ヵ月おきにホルムアルデヒドを定量したところ，高濃度のホルムアルデヒドが検出された試料については購入後約1年の間に急激なホルムアルデヒド含有量の減少がみられた．水蒸気蒸留したのちの値

Table 6 Formaldehyde and Resin-weight from Ladies' Underwears

	Resin (%)	HCHO(μg/g)		B/A	B′/A
		A	B		
1	14.85	980	2,990	3.05	3.03
2	17.07	2,410	7,120	2.95	2.69
3	15.87	4,880	13,480	2.76	2.10
4	11.76	810	2,430	3.00	2.97
5	10.81	2,750	8,500	3.09	2.74
6	13.57	3,320	9,850	2.96	2.12
7	15.59	3,450	15,600	4.52	3.59
8	2.25	1,110	2,810	2.53	2.69
9	7.25	1,060	4,900	4.62	4.08
10	6.99	0	0	—	—

A, B : formaldehyde content on the extract before and after steam distillation
B′ : that on the extract treated with dialysis tubing after steam distillation

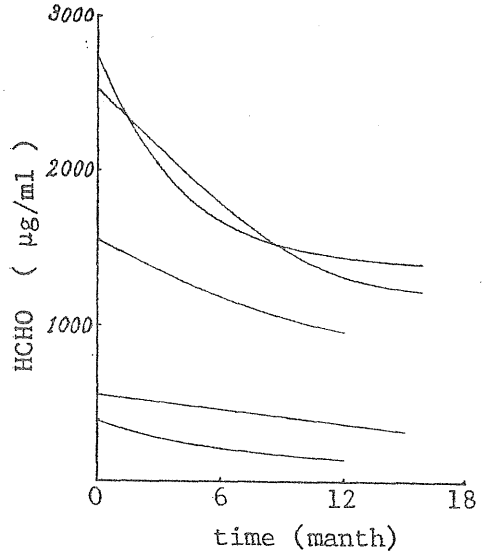


Fig. 3 Change of Formaldehyde Content in the Extract during the Storage of Samples.

(検液Bの値)と直接測定値(検液Aの値)の比(B/A)は試料の放置により1に近づく傾向が認められた.

Ⅲ 考 察

前報[1]で抽出液の水蒸気蒸留後の測定値と直接測定値の差は加熱により樹脂の分解が促進されるためと考えられることを報告したが,本実験では遊離ホルムアルデヒドと樹脂成分を分離する目的で抽出液をミリポアフィルターおよび透析による処理を行なった.各処理液を水蒸気蒸留したのちのホルムアルデヒド測定値は,未処理の抽出液の値に比べやや減少する傾向が認められたが,直接測定値よりは大きな値を示した.これは直接測定値と水蒸気蒸留したのちの測定値の差の原因となる物質の大部分が透析膜(孔径2.4nm)を通過することの可能な未反応成分または低分子の樹脂成分であるためと思われる.

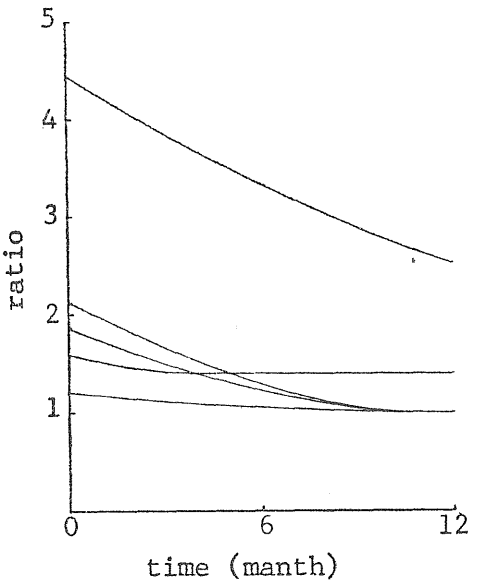


Fig. 4 Change in Ratio (Formaldehyde Value after Steam-Distillation/F.A.V. before S.D.) during the Storage of Samples.

抽出温度の上昇に伴い水蒸気蒸留後の測定値および直接測定値はともに増加し,さらに両測定値の比が低下することから,抽出操作中の樹脂の分解は抽出温度の高いほど促進されることが考えられる.

試料を室温に放置した場合,ホルムアルデヒド測定値が減少し,時間の経過とともに水蒸気蒸留後の値と直接測定値の比が1に近づくことから,貯蔵中に樹脂中の未反応または低分子量の部分が除々に分解または重合し,樹脂加工後一定時間経過したのち,平衡状態に達するものと推定される.

Ⅳ 結 論

自家製樹脂加工布および市販肌着を用いて加工布中のホルムアルデヒド測定方法を検討した結果,試料上のホルムアルデヒド濃度分布に対する測定値は,試料片を5×5～10×10cmにすることによりほぼ一定にすることができた.抽出液の水蒸気蒸留後の測定値と

直接測定値の差は，抽出温度の上昇に伴い小さくなる傾向を示し，また抽出液を透析処理することによって顕著な変化を示さなかった．試料を室温に放置することにより，ホルムアルデヒド測定値は減少した．

謝　辞

本研究にあたり，終始ご指導いただいた当研究所松本茂理化学部長，加工用樹脂液などを提供された東レ株式会社繊維研究所の伊藤信也氏に深く感謝いたします．

〔付記〕

本研究は昭和48年度当研究所調査研究課題「家庭用毒物劇物（衣服処理剤）の試験法に関する研究」として実施したものである．

文　献

1）吉原武俊，奥本千代美，福士真知子，松本茂：東京衛研年報，24，117—123 (1972)
2）日本界面活性剤工業会繊維技術委員会：繊維製品消費科学，14，250—254 (1973)
3）近藤智吏，石橋博：*ibid.*, 13, 226—230 (1972)
4）近藤智吏，下村寿：*ibid.*, 14, 219—228 (1973)
5）Baitinger, W.F., Nakajima, W. and Depaolo, G.: Text. Res. J., 38, 432—439 (1968)
6）Tolgyesi, W.S.: *ibid.*, 38, 416—425 (1968)
7）Rath, H., Herbolsheimer, E. and Stapf, S.: *ibid.*, 30, 201—207 (1960)
8）Mehta, P.C. and Metha, R.D.: *ibid.*, 30, 524—531 (1960)
9）Kottes, A. B. A., Arceneaux, R. L., Frick, J. G. and Reid, J.D.: *ibid.*, 32, 489—496 (1962)
10）衛生試験法：衣服処理剤試験法
11）日本工業規格：樹脂加工織物試験方法
12）住友化学工業株式会社：Sumitex Resins

参考文献

増田俊郎，塩沢和男：増補　繊維加工技術第3版，地人書館 (1971)

三輪一郎，松永英夫：ユリア・メラミン樹脂，日刊工業新聞社 (1969)

井本　稔，垣内　弘，黄慶雲：ホルムアルデヒド—その化学と応用，朝倉書店 (1965)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 111 — 118, 1974

有機ハロゲン化合物のケイ光反応に関する研究（第2報）
Diphenylamineを用いるPCB各種単体のケイ光薄層デンシトメトリー

植田忠彦* 鎌田国広* 観　照雄*
風間成孔* 戸谷哲也*

Studies on Fluorescence Reactions for Organic Halogen Compounds (2)

Investigation on in situ Fluorimetry of Polychlorinated Biphenyls and Their Isomers on Thin-Layer Chromatograms Using Diphenylamine

TADAHIKO UETA*, KUNIHIRO KAMATA*, TERUO KAN*,
MASAYOSHI KAZAMA* AND TETSUYA TOTANI*

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and their isomers were turned to stable light blue fluorescent compounds on thin-layer chromatogram by using diphenylamine (DPA) and irradiating with 254nm wave length of UV ray. Using alumina thin-layer plate containing 1% DPA and liquid paraffin-kieselguhr plate, each solution containing constant amount of PCB and its isomer was spotted and chromatographed. Kieselguhr plate was irradiated with UV ray after spraying with 1% DPA ethanol solution.

The fluorescence intensity and Rf-value of the spot appeared were calculated from the pattern obtained by direct fluorimetric scanning method of thin-layer chromatogram using fluoridensitometer.

It was observed that number of chlorine, their substituted position and correlation of substituted position exerted distinctly influence on the Rf-values and the fluorescence intensities of the isomer.

緒　言

有機ハロゲン系農薬がある種の芳香族アミンを用い，紫外線照射することによって呈色することは良く知られているところである[1].

われわれはさきにポリ塩化ビフェニール（以下PCBと略す）がジフェニールアミンの共存下で，適度な紫外線の照射条件によって単なる可視部の呈色とは異なり，特異なケイ光反応を示すことを見い出し，これを薄層デンシトメトリーに適用してPCBの定性ならびに定量法を確立し前報[2]で報告した.

この際，PCBの保有する塩素数の多いものより，少ないものほど等しい量においてケイ光強度は増大し，また，デンシトグラムのパターンから塩素含有量の異なるPCBのタイプを区別できることも同時に報告した.

今回われわれは塩素の置換数あるいは置換位置を異にするPCBの単体を相当数入手し，これらについてケイ光薄層デンシトメトリーを行ない，それぞれのケイ光強度とRf値を測定し，ビフェニール核に対する置換塩素位置，塩素数との関係等について検討した結果，2，3の知見を得たので報告する.

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験方法

試料

(1) PCB——カネクロール（和光純薬K. K. 以下

Table Ⅰ. Samples of PCB isomer

NO.	PCB isomer	No.	PCB isomer
1	2-Chlorobiphenyl	23	2, 3, 5, 6 -Tetrachlorobiphenyl
2	3-Chlorobiphenyl	24	2, 3, 2′, 3′-Tetrachlorobiphenyl
3	4-Chlorobipheny	25	2, 3, 2′, 5′-Tetrachlorobiphenyl
4	2, 3 -Dichlorobiphenyl	26	2, 4, 2′, 4′-Tetrachlorobiphenyl
5	2, 4 -Dichlorobiphenyl	27	2, 4, 2′, 5′-Tetrachlorobiphenyl
6	2, 5 -Dichlorobiphenyl	28	2, 5, 2′, 5′-Tetrachlorobiphenyl
7	2, 6 -Dichlorobiphenyl	29	2, 5, 3′, 5′-Tetrachlorobiphenyl
8	2, 2′-Dichlorobiphenyl	30	2, 6, 2′, 6′-Tetrachlorobiphenyl
9	2, 4′-Dichlorobiphenyl	31	3, 4, 3′, 4′-Tetrachlorobiphenyl
10	3, 4 -Dichlorobiphenyl	32	2, 3, 4, 5, 6 -Pentachlorobiphenyl
11	3, 5 -Dichlorobiphenyl	33	2, 3, 4, 2′, 5′-Pentachlorobiphenyl
12	3, 3′-Dichlorobiphenyl	34	2, 4, 5, 2′, 5′-Pentachlorobiphenyl
13	4, 4′-Dichlorobiphenyl	35	2, 3, 4, 2′, 3′, 4′-Hexachlorobiphenyl
14	2, 3, 4 -Trichlorobiphenyl	36	2, 3, 4, 2′, 4′, 5′-Hexachlorobiphenyl
15	2, 4, 5 -Trichlorobiphenyl	37	2, 4, 5, 2′, 4′, 5′-Hexachlorobiphenyl
16	2, 4, 6 -Trichlorobiphenyl	38	2, 4, 6, 2′, 4′, 6′-Hexachlorobiphenyl
17	2, 4, 4′-Trichlorobiphenyl	39	2, 3, 4, 5, 6, 2′, 5′-Heptachlorobiphenyl
18	2, 5, 2′-Trichlorobiphenyl	40	2, 3, 4, 5, 2′, 3′, 4′, 5′-Octachlorobiphenyl
19	2, 5, 3′-Trichlorobiphenyl	41	2, 3, 5, 6, 2′, 3′, 5′, 6′-Octachlorobiphenyl
20	2, 5, 4′-Trichlorobiphenyl	42	2, 3, 4, 5, 6, 2′, 3′, 4′, 5′-Nonachlorobiphenyl
21	3, 4, 2′-Trichlorobiphenyl	43	2, 3, 4, 5, 6, 2′, 3′, 4′, 5′, 6′-Decachlorobiphenyl
22	2, 3, 4, 5-Tetrachlorobiphenyl		

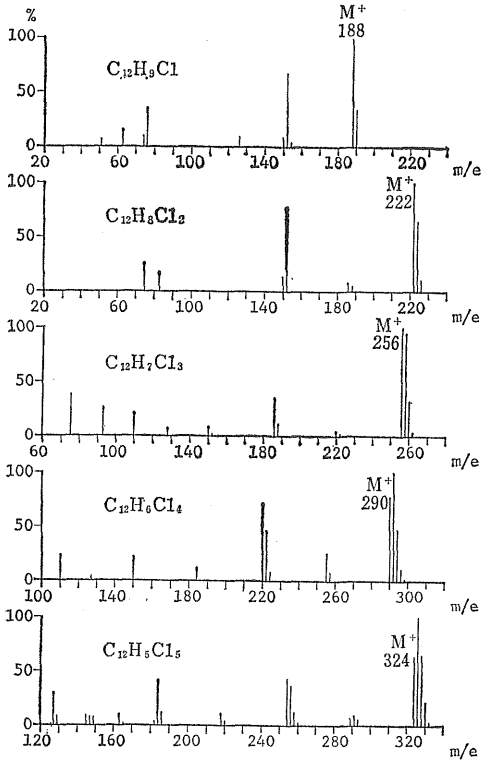


Fig. 1-1 Mass Spectra of PCB isomer

KCと略す）—200, 300, 400, 500および600の5種

(2) PCB単体——Table Ⅰに示す塩素数1から10までの塩化ビフェニールとその異性体（Analabs社）43種

(3) 試料溶液の調製——KC-200, 300, 400, 500, 600およびPCB各種単体各10.0mgをとり，それぞれn-ヘキサンに溶かして100m*l*とし試料溶液とする．この溶液は1m*l*中100μgの試料を含む．またこの溶液をn-ヘキサンで希釈し1m*l*中10μgの試料を含む試料溶液を調製する．

なお各単体の100μg/m*l*試料溶液を用いて質量スペクトルを測定し，試料の確認を行なった．Fig. 1-1, Fig. 1-2に本試料の各塩素数に対するガスクロマトグラフィー質量スペクトルグラムを示す．

試薬

特にことわりのない限り，試薬はすべて特級を用い，また水は蒸留水をイオン交換樹脂カラムにとおした精製水を使用した．

(1) ケイ光標準溶液——① 硫酸キニーネ基準溶液：硫酸キニーネ10.0mgをエタノールに溶かして100m*l*とする．② 4.4′-ジクロロビフェニールケイ光内標準溶液（以下DCBケイ光内標準溶液と略す）：4.4′-Dichlorobiphenyl 10.0mgをとり．n-ヘキサン

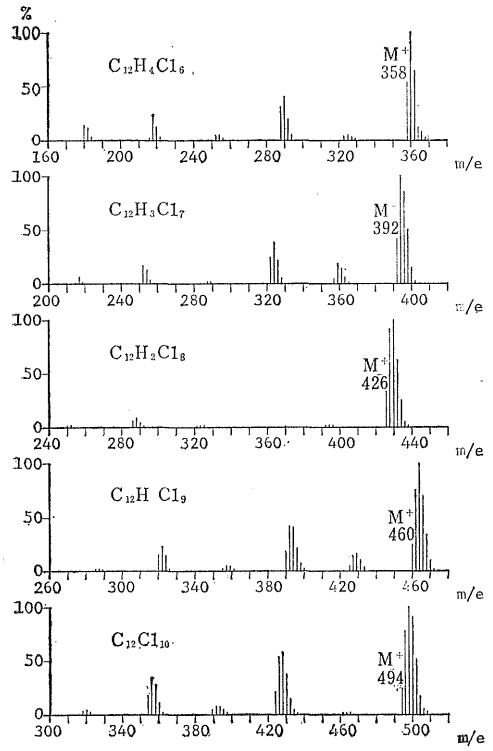


Fig. 1-2 Mass Spectra of PCB isomer

に溶かして 100ml とし内標準原液とする．この溶液を希釈して 1 ml 中それぞれ，5 μg，20μgを含む溶液を調製しこれを内標準溶液とする．

(2) 顕色剤——① ジフェニルアミン：Diphenylamine（以下ＤＰＡと略す，和光純薬）を含水エタノールから 2回再結晶；ｍｐ53～54°，② 1%ＤＰＡ溶液：前項①のＤＰＡ 1ｇをエタノールに溶かし100mlとする．

(3) 吸着剤——① アルミナ：Aluminium Oxid G Type E (Merck社) ② ケイソウ土：Kieselguhr G (Merck社) ③ シリカゲル熔着プレート：ヤマトリプレート 5×20cm（ヤマト科学）

(4) 薄層クロマトグラフィー用展開溶媒——① n-ヘキサン—ベンゼン (19：1) ② アセトニトリル—アセトン—エタノール—水 (35：20：35：10) に流動パラフィン 20ml を加え，振り混ぜたのち静置し，上層を分取する．③ ベンゼン—メタノール (9：1)

装置

(1) 薄層アプリケーター——Desaga 社タイプのもの（藤原製作所）

(2) 展開槽——縦5.5cm，横21.5cm，高さ 21.0cmの角形展開槽（萱垣製作所）

(3) 紫外線照射器——ミツミ紫外線検出器（254，366nm 各6Ｗ）SJ-1031型（ミツミ科学産業）

(4) 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）

(5) ガスクロマトグラフ—質量分析装置——ＬＫＢ—9000型（島津製作所）ガスクロマトグラフ—質量分析装置にデータ処理システム（ＧＣ—ＭＳ・ＰＡＣ—300）を接続して使用した．

操作方法

薄層クロマトグラフィーならびにケイ光の測定条件等は前報にほぼ準拠しているので簡潔に記す．

薄層クロマトグラフィー

(1) 薄層の調製——① ＤＰＡ含有アルミナ薄層(以下薄層①と略す)：ＤＰＡ0.5gをメタノール55ml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を用いて厚さ約0.25ｍｍの薄層を調製し，風乾後遮光した乾燥貯蔵箱中に保存する．なお加熱による活性化処理は行なわない．② 流動パラフィン含有ケイソウ土薄層（逆相クロマトグラフィー用，以下薄層②と略す)：流動パラフィン1.8ｇをクロロホルム78ml に溶かし，ケイソウ土18ｇを加え十分に混和したのち，以下前項同様に操作して薄層を調製し保存する．

(2) 展開ならびに紫外線照射条件——薄層①の一端2.5cm の位置にハミルトン製マイクロシリンジ(全量10μl 用）を用いて各試料溶液 2 μl (20ng に相当）およびＤＣＢケイ光内標準溶液 2μl (10ngに相当）を塗布し，展開溶媒①を用いて上昇法によって約 10cm 展開する．風乾後暗室中で254nmの紫外線を薄層の上方10cmの距離から 10 分間照射する．このとき試料溶液中のＰＣＢは薄層上に青色のケイ光スポットとして認められる．ついで，ケイ光薄層デンシトメトリーはなるべく速やかに行なう．

薄層②では試料塗布量は 5μl (500ng)，ＤＣＢケイ光内標準溶液 5μl (100ng) とし，薄層①と同様にマイクロシリンジを用いて塗布したのち，展開溶媒②を用いて展開後，風乾燥し，１%ＤＰＡエタノール溶液を噴霧して10cm 上方より60分間紫外線を照射する．ケイ光測定は速やかに行なう．（少なくとも約30分以内とする）

薄層③（ヤマトリプレート）に基準溶液３μl（硫酸キニーネ300ngを含む）をマイクロシリンジで塗布し，展開溶媒③を用いて展開風乾燥後，ケイ光強度の較正および測定波長の基準に用いる．

(3) ケイ光薄層デンシトメーター測定条件——負高圧 -800Ｖ，レスポンス 4，カットフィルターＵＶ—39，

薄層走査スリット1×5mm，走査速度 2cm/min，記録計チャート速度2cm/min，レンジは薄層① 50mV，薄層 ②200mV，測定波長は薄層①励起極大波長（以下 Ex. max. と略す），351nm，ケイ光極大波長（以下 Em. max. と略す）432nm，薄層②Ex. max. 348nm，Em. max. 395nmである．

なおケイ光強度の較正には薄層③による薄層クロマトグラフィーの硫酸キニーネのスポットに走査スリットを固定して記録計のフルスケールを50%にあわせて各試料を測定した．

結果および考察

励起ならびにケイ光波長

薄層①には展開溶媒①を，また薄層②には展開溶媒②をそれぞれ用いてPCB単体の薄層クロマトグラフィーを行ない，得られたスポットに走査スリットを固定して励起，ケイ光極大波長を求めた．TableⅡにはビフェニール核に対する塩素数または置換塩素位置を異にするPCB単体について，薄層②の条件で行なった比較的ケイ光強度の大きいものを示した．また同時にKC-200～600についても実施した．

Table Ⅱ. Fluorescence Excitation and Emission Spectra of PCBs and PCB isomers with DPA on Liquid Paraffin-Kieselguhr

No.	PCB isomer	Ex. max. (nm)	Em. max. (nm)	PCB	Ex. max. (nm)	Em. max. (nm)
3	4-	342	392	KC-200	348	395
13	4, 4′-	346	399	KC-300	348	395
17	2, 4, 4′-	346	399	KC-400	348	393
19	2, 5, 3′-	341	404	KC-500	350	398
25	2, 3, 2′, 5′-	347	407	KC-600	349	395
26	2, 4, 2′, 4′-	343	397	Used wave		
28	2, 5, 2′, 5′-	347	406	length	348	395
34	2, 4, 5, 2′, 5′-	342	401	Quinine sulfate	338	415
38	2, 4, 6, 2′, 4′, 6′-	347	402			

そこで，置換塩素数の差異によって，励起ならびにケイ光極大波長にシフトが見られるか否かを検討した．その結果PCB単体の Ex. max. はNo. 3 の 4-, No. 34の2, 4, 5, 2′, 5′-のいずれも 342nm であり，最小がNo. 19の2, 5, 2′, 5′- の 341nm，最大がNo. 25の2, 3, 2′, 5′-，No. 28の2, 5, 3′-およびNo. 38の 2, 4, 6, 2′, 4′, 6′-で 347nm，その差は 6 nmである．一方 Em. max. はNo. 3 の 4-，No. 25 の 2, 3, 2′, 5′- がそれぞれ392, 407nm の最小，最大値を示し，その差は 15nmを有するが全体としては塩素数の増減に依存するわけではない．またKC-200，600についても Ex. max. は348, 349nm とほとんど実験誤差の範囲に入り，Em. max. については395nmと全く同一の値を示している．

これらの事実より塩素数の差異は励起，ケイ光極大波長の変動にほとんど影響を与えていない．

また一方塩素の置換位置と励起，ケイ光波長との関係であるが，励起極大波長では有意の差は見られないが，ケイ光極大波長ではNo. 3，No. 13，No. 17，No. 26，No. 34，No. 38 が 392～402nm，No. 19，No. 28，No. 25 が 404～407nmとそれぞれ最小，最大値を示し，両者の差異は 4または 4, 4′ 位に塩素を有するか否かである．一般的に 4 または 4, 4′ 位に塩素を保有する isomerのケイ光極大波長は 4 または4, 4′位に塩素を持たないisomerに比較して短波長にシフトするといえる．

相対ケイ光強度

さきの励起，ケイ光波長の項で述べた通り，PCB単体のケイ光強度測定波長の設定にあたりケイ光波長の変動幅は必ずしも大きいものではなく，したがって便宜上PCBの励起，ケイ光波長の平均値を使用しても実用上著しい影響はないと考えられる．そこで薄層①では Ex. max. 351nm，Em. max. 432nm，薄層②では Ex. max. 348nm，Em. max. 395nmを用いて測定を行なった．このときの基準物質として用いた硫酸キニーネの Ex. max と Em. max はそれぞれ338nmおよび415nmである．

そこで，KC-200～600 の 5 種およびPCB単体43種，計48種の試料について，薄層①ではそれぞれ試料溶液 2 μl (20ng)，プレート間の変動等の補正のためのDCBケイ光内標準 2 μl (10ng)，薄層②ではそれぞれ試料溶液 5 μl (500ng)，DCBケイ光内標準 5 μl (100ng) を塗布し薄層クロマトグラフィーを行ない，そのときのケイ光強度を測定した．

TableⅢ，Ⅳは測定デンシトグラムより得たケイ光強度を 4, 4′- のケイ光強度を 100 としたときの等モル

Table Ⅲ. Relative Fluorescence Intensities and Rst-Values of PCBs and PCB isomers on DPA-Alumina Plate

No.	PCB isomer	Rst	RFI	No.	PCB ismer	Rst	RFI	No.	PCB isomer	Rst	RFI
13	4,4′-	1.0	100	23	2,3,5,6-	1.05	22	24	2,3,2′,3′-	0.95	1
31	3,4,3′4′-	0.98	71	9	2,4′	1.03	21	2	3-		
37	2,4,5,2′,4′,5′-	1.11	52	16	2,4,6-	1.05	20	7	2,6-		
3	4-	1.02	43	19	2,5,3′-	1.04	20	8	2,2′-		
17	2,4,4′-	1.05	42	32	2,3,4,5,6-	1.07	20	12	3,3′-		
15	2,4,5-	1.06	38	43	2,3,4,5,6,2′,3′,4′,5′,6′-	1.15	20	30	2,6,2′,6′-		
29	2,5,3′,4′-	1.06	34	33	2,3,4,2′,5′-	1.02	19	1	2-		
36	2,3,4,2′,4′,5′	1.06	34	40	2,3,4,5,2′,3′,4′,5′-	1.11	19				
10	3,4-	1.02	33	14	2,3,4-	1.00	18		PCB		
20	2,5,4′-	1.05	33	6	2,5-	1.05	17		KC-200	1.02	23
26	2,4,2′,4′-	1.09	33	27	2,4,2′,5′-	1.06	17				
21	3,4,2′-	1.03	30	28	2,5,2′,5′-	1.03	14		KC-300	1.04	25
38	2,4,6,2′,4′,6′-	1.18	28	18	2,5,2′-	1.02	12				
22	2,3,4,5-	1.06	27	39	2,3,4,5,6,2′,5′-	1.11	12		KC-400	1.05	25
5	2,4-	1.06	24	41	2,3,5,6,2′,3′,5′,6′-	1.15	12				
35	2,3,4,2′,3′,4′-	0.97	24	25	2,3,2′5′-	1.12	8		KC-500	1.05	26
34	2,4,5,2′,5′-	1.09	23	4	2,3-	1.00	4				
42	2,3,4,5,6,2′,3′,4′,5′-	1.11	23	11	3,5-	1.11	1		KC-600	1.08	21

Table Ⅳ Relative Fluorescence Intensities and Rst-Values of PCBs and PCB isomers on Liquid Paraffin-Kieselguhr Plate

No.	PCB isomer	Rst	RFI	No.	PCB isomer	Rst	RFI	No.	PCB isomer	Rst	RFI
13	4,4′-	1.00	100	15	2,4,5-	0.81	5	23	2,3,5,6-		
31	3,4,3′,4′-	0.95	51	28	2,5,2′,5′-	0.99	4	24	2,3,2′,3′-		
17	2,4,4′-	0.86	38	39	2,3,4,5,6,2′,5′-	0.44	4	30	2,6,2′,6′-		
3	4-	0.96	24	40	2,3,4,5,2′,3′,4′,5′-	0.33	4	32	2,3,4,5,6-		
38	2,4,6,2′,4′,6′-	0.56	23	41	2,3,5,6,2′,3′,5′,6′-	0.40	4	43	2,3,4,5,6,2′,3′,4′,5′,6′-		
20	2,5,4′-	0.90	21	14	2,3,4-	0.92	3				
26	2,4,2′,4′-	0.90	20	25	2,3,2′,5′-	1.03	3		PCB		
37	2,4,5,2′,4′,5′-	0.54	19	18	2,5,2′-	1.06	2		KC-200	1.02	5.4
36	2,3,4,2′,4′,5′-	0.56	15	19	2,5,3′-	0.90	2			0.86	2.9
29	2,5,3′,4′-	0.86	12	42	2,3,4,5,6,2′,3′,4′,5′-	0.17	2			0.74	0.4
34	2,4,5,2′,5′-	0.74	12	6	2,5-	0.99	1		KC-300	1.01	1.2
9	2,4′-	1.03	10	11	3,5-	0.89	1			0.86	6.2
10	3,4-	1.00	10	1	2-					0.75	1.0
33	2,3,4,2′,5′-	0.87	10	2	3-				KC-400	0.87	3.7
27	2,4,2′,5′-	0.94	9	4	2,3-					0.75	2.1
5	2,4-	0.97	8	7	2,6-				KC-500	0.74	0.4
16	2,4,6-	0.92	6	8	2,2′-					0.66	2.2
21	3,4,2′-	0.92	6	12	3,3′-					0.54	2.0
35	2,3,4,2′,3′,4′-	0.71	6	22	2,3,4,5-					0.44	1.3
									KC-600	0.66	2.3
										0.54	0.6
										0.43	2.6
										0.35	1.0

RFI : (Relative Fluorescence Intensity) Fluorescence Intensities of PCB and PCB isomer /Fluorescence Intensity of 4, 4′-Dichlorobiphenyl

Rst : Rf-Values of PCB and PCB isomer/Rf-Value of 4′-Dichlorobiphenyl

量での強度比およびその Rf 値を 1.00 とした Rf 値の比で，それぞれ相対ケイ光強度（以下ＲＦＩと略す），相対 Rf 値（以下 Rst と略す）として表わしたものである．なお表中の空欄個所は本条件下ではケイ光の測定ができなかった単体で，薄層①と薄層②では前記の試料塗布量等からも明らかなようにケイ光強度に差が認められる．このケイ光感度の差は主として吸着剤の特性によるものであり，含有する流動パラフィンの影響は少ないように思われる．

ここでケイ光強度について，Table Ⅲ，ⅣのＲＦＩを塩素数別にプロットすればFig. 2 のような分布を示し，塩素数による影響は認められない．したがって，ケイ光強度は塩素置換位置およびその共役π電子系内の置換塩素の相互作用によって影響されることが想定される．

まず，塩素置換位置およびその相互作用について全般的にいえることは，相対ケイ光強度として20を越える単体は 4 または 4,4′ 位に塩素を有し，4-Chlorobiphenyl に比較して 4,4′-Dichlorobiphenyl ははるかに強いケイ光を呈する．

ただし薄層①における 2,3,5,6-，2,5,3′- を例外とする．

しかし，これら 4-，4,4′- のケイ光は同一分子内の他の置換塩素の影響を受けて減少する．すなわち Table Ⅲに示す相対ケイ光強度について，4-のＲＦＩ43に対して，3,4-の33，2,4-の24また4,4′-のRFI 100に対して，3,4,3′,4′-の71，2,4,2′,4′- の 33等と明らかである．

したがって，4または 4,4′ 位の置換塩素がこのケイ光反応に強く関与し，かつ3位，または2位に更に塩素置換した場合これらの同一分子内置換塩素の相互作用によってこの反応は障害されるものと考えられる．

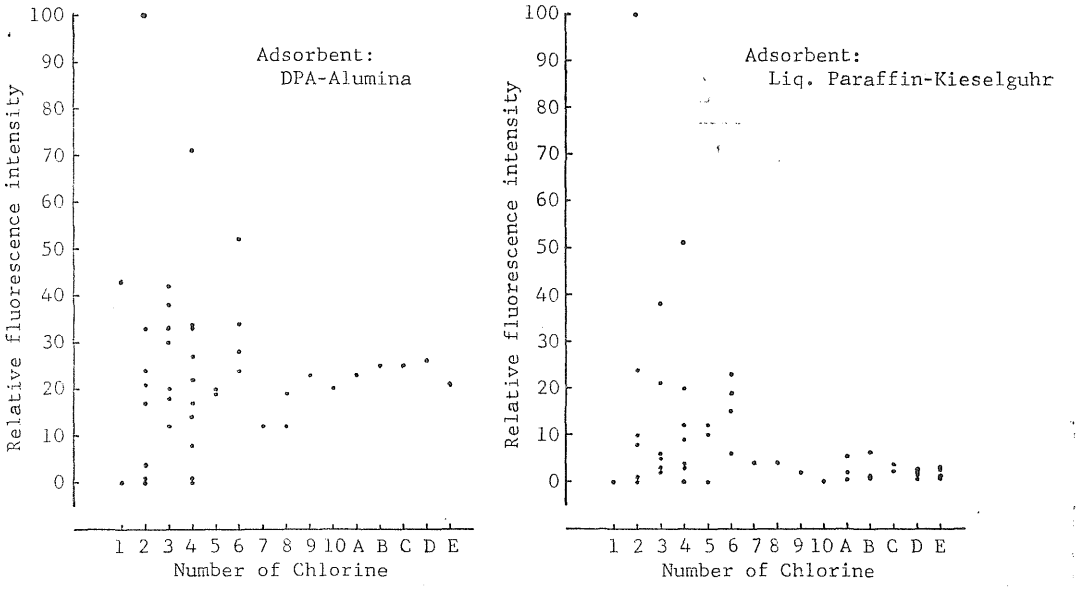


Fig. 2 Relative Fluorescence Intensity of PCBs and PCB isomers on DPA-Alumina Plate and Liq. Paraffin-Kieselguhr Plate
A : KC-200 B : KC-300 C : KC-400 D : KC-500 E : KC-600

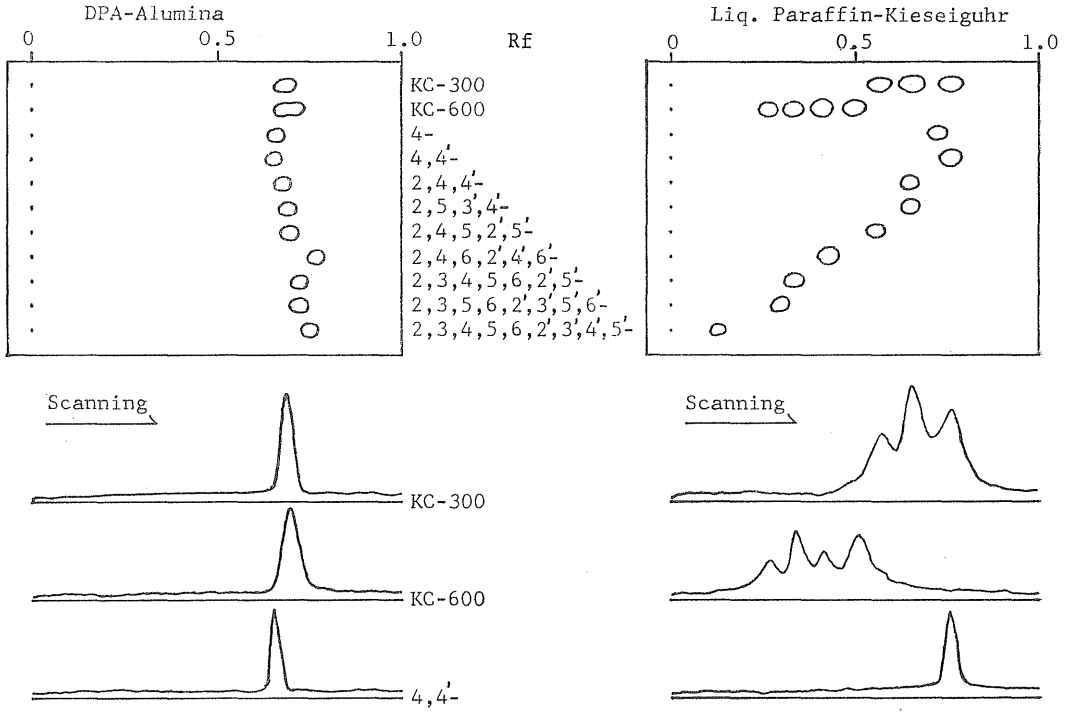


Fig. 3 Fluorescence Emission Profiles of PCB and PCB isomer with Thin-layer Chromatography

ＰＣＢ各種単体およびＰＣＢのＲｆ値

ケイ光強度がビフェニール核に対する塩素の置換位置およびその相互作用に依存することは前記のとおりであるが，ここでさきの条件下で，ＫＣ-300，600および4-，4,4'-，2,4,4'-，2,5,3',4'-，2,4,5,2',5'-，2,4,6,2',4',6'-，2,3,4,5,6,2',5'-，2,3,5,6,2',3',5',6'-，2,3,4,5,6,2',3',4',5'-の各単体について薄層①と②を用いて行なった薄層クロマトグラムとそのデンシトグラムの一部をFig. 3に示す．すなわち薄層①におけるＲｆ値は単体で0.65～0.77とモノクロル体からノナクロル体と塩素数の増加と共にＲｆ値の増大することが認められるがその変動幅は小さく，またＰＣＢも一つのスポットとなるのに対し，薄層②におけるＲｆ値は単体で0.30～0.76と塩素数の増加と共にＲｆ値が減少し，その変動幅は大きい．このようなＲｆ値の増大，減少のパターンはＫＣ-200～600の薄層クロマトグラフィーの結果からすでに十分予測されたことである．

結　論

ＰＣＢおよびＰＣＢ各種単体に１％ＤＰＡ含有アルミナ薄層と10％流動パラフィン―ケイソウ土薄層を用いてクロマトグラフィーを行ない，得られたクロマトグラムの直接ケイ光薄層デンシトメトリーによって次のことを明らかにした．

(1) 流動パラフィン―ケイソウ土薄層を用いることによって，塩素置換位置がケイ光波長に若干の変動を与えることを認めた．

(2) ケイ光強度は塩素の置換位置によって著しく影響され，かつ同一分子内の他の置換塩素の相互作用も強くこれに関与する．すなわち，４あるいは 4,4' 位に塩素を持つ単体はケイ光強度が強く，３位または２位にさらに塩素置換した場合，これらの塩素の影響によりケイ光強度が減少する．この作用は３位より２位の塩素の方が大であった．また単に塩素の置換数によるケイ光強度の変動は認められなかった．したがってＰＣＢ各種単体中 4,4'- Dichlorobiphenyl は最も強いケイ光を示すものと推定される．

(3) 流動パラフィン―ケイソウ土薄層クロマトグラフィーによって，ＰＣＢとＰＣＢ各種単体のＲｆ値は置換塩素の増加にほぼ従って減少することを認めた．

また，ＰＣＢの分離スポットは各々何種かの単体の集まったものであるが，今回用いた単体でこれらのスポットに一致するものは比較的少なかった．

なおこのケイ光反応における反応生成物，反応機構等については現在検討中である．

〔付記〕 本研究は1973年11月22日，日本分析化学会第22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）観　照雄，鎌田国広，植田忠彦，山添律子，戸谷哲也：東京衛研年報，24，137-145 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 119 — 126 1974

東京都における PCB 汚染の実態について（第2報）
食品中の PCB 含有量について

山野辺 秀夫* 天川映子* 鈴木助治*
小泉清太郎* 戸谷哲也*

Survey of Pollution with Polychlorinated Biphenyls in Tokyo (Ⅱ)
Polychlorinated Biphenyls Content of Foods

HIDEO YAMANOBE*, EIKO AMAKAWA*, SUKEJI SUZUKI*, SEITARO KOIZUMI* AND TETSUYA TOTANI*

The concentrations of polychlorinated biphenyls (PCB) in fishes, shellfishes, dairy products, meats, human's milk and cod-liver oils were determined by means of gas liquid chromatography with electron capture detector for the survey of PCB pollution in Tokyo during the period from Apr., 1973 to Mar., 1974.

The results obtained are summarized as follows :

1. The concentrations of PCB in fishes and shellfishes were higher than those in dairy products and meats. The maxium concentration of PCB in examined fish meats was recorded as 1.87 ppm of Anago (conger), and the mean concentration of the 3 samples of them was 1.41 ppm. Residue levels of higher contaminated fish meats were as follows : Fukko (perch) 0.10—0.78 ppm(mean 0.54 ppm), Hamachi (yellow tail) 0.26—0.68 ppm (mean 0.53 ppm), Konoshiro 0.16—0.57 ppm(mean 0.44 ppm), Saba (mackerel) trace—1.20 ppm (mean 0.20 ppm).
2. The concentrations of dairy products and meats were generally very small, ranging from trace to 0.1 ppm, and mean concentrations of butter, beef, pork and chicken were 0.05 ppm, 0.01 ppm, 0.01 ppm and 0.02 ppm respectively.
3. The concetrations of the 20 samples of human's milk ranged from 0.010 to 0.062 ppm with a mean of 0.030 ppm, almost as much as level in the 1971 survey.
4. Some of the cod-liver oils contained relatively high concentration of PCB, 0.81 and 0.39 ppm for the marketed products, and 0.17 and 1.55 ppm for the fish liver oils as raw material of them : the contamination of PCB for the marketed products was believed to be due to presence of PCB in the fish liver oil.

緒　言

ポリ塩化ビフェニール（以下ＰＣＢと略す）はその高い安定性から長期間環境内にとどまり[1]，食物連鎖によって濃縮が繰り返えされ，最終的には人に摂取蓄積[2]されることは周知のとおりである．ＰＣＢを原因とするカネミ油症事件は単に化学物質による中毒と考えられていたが，その後環境汚染物質としてにわかにクローズアップされ，その汚染の実態[3~5]が高濃度，かつ広範囲なところから，ことの重大性が認識され，行政当局もＰＣＢの製造および使用禁止にふみきった．厚生省は昭和47年８月には食品衛生調査会答申に基づき暫定規制値を設定した．すなわち遠海沖合魚介類0.5 ppm，近海内湾魚介類3.0 ppm，牛乳 0.1 ppm，乳製品1.0 ppm，育児用粉乳0.2 ppm，肉類0.5 ppm，卵類0.2 ppm，容器包装5.0 ppm である．

われわれは前回行なった東京都におけるＰＣＢ汚染の実態調査[6]にひきつづき今回も同様に東京都内で購入した魚介類等についてＰＣＢ含有量を測定し，昭和48年度におけるＰＣＢ汚染の実態を把握するとともに

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

暫定規制値を適用し，都民の食生活の安全性確保を目的として本調査を行なった．

実験方法

1) 試　料

測定試料は昭和48年4月より昭和49年3月までの1年間に東京都内の市場および小売店から入手した．その内訳は魚37種類130検体，貝類3種類22検体，食肉3種類47検体，乳製品4種類44検体，鶏卵12検体，肝油3種類18検体，包装紙7検体，母乳20検体，計53種類300検体である．

2) 操作方法

前処理は，魚介類，食肉，乳製品，母乳は厚生省環境衛生局PCB分析研究班"分析方法に関する研究"[7]に準拠し，包装紙については昭和47年10月26日付環食化第385号 "容器包装中のPCB分析法"[8]に準拠して行ない，クリーンアップはいずれもフロリジルカラムを用いた．

肝油には，錠剤，錠剤の原料となる合成油（パルミチン酸レチノール）[9]および魚油[10]の3種類があり，さらにそのうちの錠剤は合成油を含む糖衣錠と魚油を含む錠剤からなる．それぞれの試料調製法は，

ⓐ 魚油および魚油を含む錠剤については，厚生省環境衛生局PCB分析研究班 "分析方法に関する研究" に準拠し，クリーンアップはフロリジルカラムを用いた．

ⓑ 合成油を含む糖衣錠については，試料10.0gを200 m*l* ナス形フラスコにとり，エチルアルコール・水（1：1）100 m*l* を加え，ジムロートを接続して水浴上で30—60分加熱溶解する．冷後，*n*-ヘキサン50 m*l* を加え 300 m*l* 分液ロートに移し，激しく振とうして合成油を抽出する．*n*-ヘキサン層を分取し，さらに2回同様の抽出操作を繰り返す．*n*-ヘキサン層をあつめ，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水，濃縮して約5 m*l* とし，クリーンアップはⓒにしたがって行なう．

ⓒ 合成油（パルミチン酸レチノール）については，N. F. Wood[11]によって検討され，脂肪中の有機塩素系農薬の分析に適用され，鈴木[2]らが検討採用したセライト・ドライカラム法によって，合成油から直接PCBを抽出し，含水フロリジルカラムでクリーンアップを行なった．

3) 定　量

PCBの同定および定量は，ECD付ガスクロマトグラフィーによって行なったが，その測定条件を示す．

装　置：島津ガスクロマトグラフ GC—5 AP_3FE型
カラム：1.5%OV—17+1.95%QF—1(UniportKS, 100—120メッシュ) ϕ 3×1000 mm，ガラスカラム
カラム温度：180°
検出器温度：210°
検出器：^{3}H(300 mc)
注入量：5 μl

PCB標準液：カネクロール（和光純薬工業製，以下KCと略す）400, 500を用いた．

① KC—500を *n*-ヘキサンに溶かし，1 m*l* 中に1 μg を含む溶液を調製する．

② KC—400と KC—500を 1：1 に混合し，*n*-ヘキサンに溶かして1 m*l* 中に1 μg を含む溶液を調製する．

さらに①，②を*n*-ヘキサンで0.1—1.0 ppm の濃度範囲に調製して検量線用のPCB標準液とする．

試料のガスクロマトグラムのパターンから①あるいは②の標準液を選定し，①のときは4本，②のときは8本のそれぞれのピーク高の総和をもって検量線を作成し，これによりPCBを定量した．

結果および考察

1. 試料中の PCB のパターンについて

試料溶液中のPCBのガスクロマトグラムは主として KC—500のパターンを示し，魚介類，乳製品，肉類，肝油および母乳は KC—500 の標準溶液をもってPCBの定量を行なった．しかし，魚介類中のアジ，アナゴ，ボラ，ハゼ，ハマチ，フッコ，イワシ，キス，コノシロ，コハダ，マコガレイ，サバ，サンマ，スズキ，赤貝の可食部と内臓およびイカの内臓はKC—400のパターンも含んでおり，したがってKC—400・KC—500（1：1）の標準溶液をもって定量した．

2. 食品中の PCB について

1) 魚　類

魚37種類130検体についてPCBを測定した結果をTable 1 に示す．

可食部では，37種類中33種類からPCBを検出した．このうち 1 ppm を越えたものは，アナゴの1.87 ppm，1.56 ppm，サバの1.20 ppm の3検体で他の魚種はすべて 1 ppm 以下であった．平均値ではアナゴが1.41 ppm と最も高い値を示したが，サバは 0.20 ppm であった．このほかに高い平均値を示したものは，フッコの0.54 ppm，ハマチ 0.53 ppm，コノシロ 0.44 ppm などであった．前報[6]では，タチウオが最も高い値を示し，4.70 ppm，平均でも2.04 ppm であ

Table 1 Concentrations of PCB in Sea Fishes

Sample	PCB concentrations in fish meat (ppm wet wt)			PCB concentrations in internal organ (ppm wet wt)		
	N	Range	Mean	N	Range	Mean
Aji (horse-mackerel, *Trachurus trachurus*)	12	trace—0.08	0.03	10	trace—0.37	0.14
Anago (conger, *Astroconger myriaster*)	3	0.83—1.87	1.41	3	0.17—0.45	0.34
Bora (gray mullet, *Mugil cephalus*)	1		0.40	1		0.33
Haze (goby, *Aconthogobius flavimanus*)	1		0.06	1		6.46
Hatahata (*Arctoscopus japonicus*)	1		0.12	1		0.06
Hamo (sea eel, *Muraenesox cinereus*)	1		nd	—		
Hamachi (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	3	0.26—0.68	0.53	1		3.58
Hirame (flounder, *Paralichthys olivaceus*)	2	trace—0.03	0.02	2	0.13—0.19	0.16
Houbou (gurnard, *Chelidonichthys kumu*)	1		0.06	1		0.05
Hukko (perch, *Lateolabrax japonicus*)	3	0.10—0.78	0.54	3	1.52—26.82	11.11
Ika (cuttlefish, *Doryteuthis bleekeri*)	5		trace	3	0.50—0.98	0.72
Inada (yellow tail, *Seriola quinqueradiata*)	1		0.08	1		0.07
Isaki (*Parapriatipoma trilineatum*)	5	trace—0.04	0.02	5	trace—0.17	0.06
Iwashi (sardine, *Sardinops melanosticta*)	12	0.01—0.63	0.08	12	trace—0.74	0.10
Kasugo (*Chrysophrys major*)	1		0.04	1		0.08
Kamasu (barracuda, *Sphyraena japonica*)	4	0.04—0.09	0.07	4	0.11—0.34	0.19
Katsuo (bonito, *Katsuwonus pelamis*)	1		trace	1		trace
Kegani (*Erimacrus isenbeckii*)	1		nd	—		
Kisu (sillago, *Sillago sihama*)	1		0.06	1		0.49
Kinmedai (*Beryx splendens*)	3	0.03—0.06	0.05	3	0.17—0.42	0.27
Konosiro (*Clupanodon punctatus*)	5	0.16—0.57	0.44	5	0.12—1.12	0.50
Kohada (*Clupanodon punctatus*)	1		0.51	1		0.61
Kiwada (tuna, *Neothunnus albacora*)	4	trace—0.02	0.01	—		
Makogarei (flat fish, *Limanda yokohamae*)	2	0.07—0.11	0.09	2	1.76—6.12	3.94
Mebachi (tuna, *Parathunnus obesus*)	6		trace	—		
Menuke (*Sebastes baramenuke*)	7	trace—0.07	0.02	5	0.06—0.16	0.10
Mebaru (*Sebastes inermes*)	2		0.02	2	0.23—0.34	0.29
Medai (*Mupus japonicus*)	1		nd	1		nd
Sagochi (*Scomberomorus niphonius*)	2	0.02—0.03	0.03	2	trace—0.02	0.01
Sawara (*Scomberomorus niphonius*)	1		0.01	1		0.06
Saba (mackerel, *Pneumatophorus japonicus*)	23	trace—1.20	0.20	20	trace—2.35	0.42
Sanma (mackerel pike, *Cololabis saira*)	8	trace—0.09	0.03	7	trace—0.25	0.06
Shiira (*Coryphaena hipprus*)	1		0.02	1		0.15
Suzuki (perch, *Lateolabrax japonicus*)	1		0.44	1		0.50
Takabe (*Labracoglossa argentiventris*)	1		0.03	1		0.36
Tobiuo (flying fish, *Prognichthys agoo*)	2		nd	2		nd
Umitanaga (*Ditrema temmincki*)	1		0.05	1		2.37

nd=not detectable.
N =no. of samples.

ったが，本報では前述のようにこのような高い値を示したものはなかった．本報と前報[6]を平均値で比較すると，前報[6]ではアジ，サンマがそれぞれ0.003 ppm, trace であったが，本報ではおのおの0.03 ppm, 0.03 ppm と本報のほうが高い値を示している．しかし，ハマチは前報[6]1.02 ppm, 本報0.53 ppm と本報が低い値である．したがって，以上のべた結果から今回の調査では前報[6]ほど高値なものがみられないとはいえ魚の可食部のＰＣＢによる汚染度が低下していることを示すものとは考えられない．

魚のＰＣＢ汚染調査については多数の報告があるが，今回われわれが調査したアジ，イワシ，サバの3種類について，山本[12]，飯田[13]，竹下[14]らによるそれぞれの報告例を平均値で比較したところ，アジについて最も高い値は，山本[12]らの0.22 ppm, 以下順に飯田[13]らの 0.19 ppm, 竹下[14]ら 0.04 ppm に対し本報のそれは0.03 ppm であった．イワシについては飯田[13]らの0.31 ppmが最も高く，山本[12]らの0.20 ppm, 本報 0.08 ppm, 竹下[14]ら 0.03 ppm, サバについては山本[12]らが0.61ppm, 飯田[13]らが0.44ppm, 本報が 0.20 ppm, 竹下[14]ら0.07 ppm の順であった．これらの平均値は0.50 ppm の前後あるいはそれ以下を示し，汚染度は低くみえる．しかしサバについて，今回のわれわれの調査では検体数23, 範囲 trace-1.20 ppm, 飯田らは検体数19, 範囲0.06—2.2 ppm と比較的バラツキの範囲は広く，したがって東京都のように全国の出荷地から魚が集まる都市では，平均値の高低だけでその魚種の汚染度をとらえるのみではなく，個々のデータを十分に吟味する必要がある．

内臓については，採取できた33種類のうち31種類からＰＣＢを検出した．このうち高値のものは，フッコの26.82 ppm, ハゼ6.46 ppm, マコガレイ 6.12 ppm, ハマチ3.58 ppm などである．これらは可食部の最高値より3倍から14倍という高濃度であるため内臓の摂取はさけるべきであろう．

2) 貝　類

カキ，アカ貝，バイ貝3種類についてＰＣＢを測定した結果を Table 2 に示す．

カキは，出荷地が宮城県，広島県と判明しており，宮城県産の最高値は 0.12 ppm，平均 0.04 ppm，広島県産の最高値は 0.30 ppm，平均は 0.15 ppm であった．全平均は0.07 ppm であり，前報[6]の0.09 ppm とほぼ同じ結果であった．また飯田[13]らの報告例では平均0.13 ppm，市川[15]らは平均0.09 ppm の報告例があり，特にＰＣＢの汚染度が高いものとは考えられない．

アカ貝，バイ貝からはそれぞれ 1.32 ppm, 0.14 ppm の PCB を検出したが，検体はそれぞれ1件であ

Table 2 Concentrations of PCB in Shellfishes

Sample	N	PCB concentration (ppm wet wt)	
		Range	Mean
Oyster, cultured in Miyagi Prefecture	15	0.01—0.12	0.04
Oyster, cultured in Hiroshima Prefecture	5	0.08—0.30	0.15
Akagai (*Scapharca broughtonii*)	1		1.32
Baigai (*Babylonia japonica*)	1		0.14

N=no. of samples.

Table 3 Concentrations of PCB in Dairy Products

Sample	N	PCB concentrations in wet material (ppm)		PCB concentration in extractable fat (ppm)	
		Range	Mean	Range	Mean
Milk	26		trace	trace—0.21	0.08
Modified milk powder	11		trace	trace—0.09	0.01
Butter	4	0.03—0.10	0.05		
Process cheese	3		trace		trace

N=no. of samples.

るため，その数値のみをもって汚染度を判定することは困難である．

3) 乳製品

乳製品4種類44検体についてＰＣＢを測定した結果は Table 3 に示すとおりである．

牛乳および粉乳については，全量あたりの平均値は共に trace であり，前報[6]と比較して差はなく，個々のデータも痕跡を認める程度である．また脂肪量あたりＰＣＢ含有量の平均値は，牛乳，粉乳それぞれ0.08 ppm，0.01 ppm と前報[6]の0.31 ppm，0.067 ppm を下まわった．牛乳については市川[15]らが年間をとおして4回調査しており，そのそれぞれの平均は順に，0.007 ppm，0.003 ppm，0.005 ppm，0.003 ppm とかなり低い値である．さらに森[16]らは平均0.004 ppm 松田[17]らは平均0.03 ppm 等の報告例があり，また粉乳についても森[16]らの平均0.014 ppm の報告例がある．しかしこれらの報告例と今回の調査を比較して大きな差は見られなかった．

バター，チーズについては，バターで最高0.10 ppm のＰＣＢを検出したが，平均は 0.05 ppm であった．チーズについては，ＰＣＢの痕跡を認めたのみであった．前報[6]では，バター，チーズは共に trace であったが，今回はバターからＰＣＢを検出したことが相異としてあげられよう．しかしバターについては，森[16]らが平均0.073 ppm，伊東[18]らが0.2 ppm を検出したとの報告例があり，今回われわれが検出した値 0.10 ppm は特に高い値とはいえない．またチーズについては森[16]らによる平均0.017 ppm の報告例があるが，われわれの調査では，前述のとおりＰＣＢの痕跡を認める程度である．したがって，これら乳製品の汚染度は低いと考えられる．

4) 肉　類

牛肉，豚肉および鶏肉については，それぞれ平均で 0.01 ppm，0.01 ppm，0.02 ppm であった．前報[6]では牛肉，豚肉，鶏肉はともに trace であったが，今回は低値ではあるがＰＣＢを検出した．肉類についても多数の報告例があるが，牛肉については，森[16]らが，肩肉ともも肉それぞれ平均 0.003 ppm，0.001 ppm，市川[15]らは平均0.03 ppm，竹下[14]らは平均0.0888 ppm のＰＣＢを検出したと報告している．豚肉についても，森[16]らは，肩肉，もも肉それぞれ平均0.003 ppm，0.003 ppm，市川[15]らは平均0.02 ppm，竹下[14]らは平均0.065 ppm の報告例があり，鶏肉についても，森[16]らは，もも肉，ササミ肉のＰＣＢ平均含有量，0.003 ppm，0.001 ppm，松田[17]らは不検出とそれぞれ報告し，本報と比較しても大きな差はなく，汚染度が非常に低いことを示している．

Table 4 Concentrations of PCB in Meats

Samle	N	PCB concentration (ppm wet wt)	
		Range	Mean
Beef	17	trace—0.03	0.01
Pork	19	trace—0.03	0.01
Chicken	11	0.02—0.03	0.02
Hen's egg	12	trace—0.02	trace

N=no. of samples.

鶏卵については最高 0.02 ppm，平均で trace であった．大谷[19]，市川[15]，松田[17]，伊東[18]らもそれぞれ平均で，0.006 ppm，0.01 ppm，0.006 ppm，0.05 ppm という報告例がある．特に鶏の餌に魚粉が混入している場合には，鶏肉，鶏卵ともに汚染されていることが予測されたが，肉類と同様に汚染度は低く餌へのＰＣＢの規制の効果と考えられるがなおひきつづき調査を実施する必要がある．

5) 肝　油

試料は，糖衣錠および錠剤（製品）12検体，それらに添加する原料の合成油（パルミチン酸レチノール）4検体，同じく原料の魚油2検体，計18検体である．その結果は Table 5 に示す．

合成油を含む糖衣錠および合成油は，アルカリ分解することはむずかしく，したがってアルコール・水（1：1）による溶解，抽出，ドライカラムによるクリーンアップを行なった．

製品中，魚油を含む錠剤2検体から，0.39 ppm，0.81ppm の PCB を検出した．合成油4検体中1検体

Table 5 Concentrations of PCB in Cod-Liver Oils

Sample	N	PCB concentration (ppm wet wt)	
		Range	Mean
Cod-liver oil tablet[a]	12	nd—0.81	0.01
Vitamin A palmitate[b]	4	nd—0.88	0.22
Codfish liver oil[b]	2	0.17—1.55	0.86

nd=not detectable ; N=no. of samples.
a) maketed product.
b) a raw material of cod-liver oil.

Table 6 Concentrations of PCB in Human's Milk

Name	Age	PCB concentrations in wet material (ppm)	PCB concentrations in extractable fat (ppm)	Fat (%)
I.M.	28	0.020	0.58	3.5
F.M.	36	0.031	0.59	5.2
Y.K.	29	0.063	0.83	7.5
M.S.	30	0.029	0.63	4.5
M.O.	26	0.023	0.68	3.4
K.O.	36	0.026	0.50	5.2
K.T.	29	0.033	1.04	3.1
Y.N.	26	0.035	0.81	4.3
S.K.	32	0.040	0.74	2.4
K.F.	28	0.010	0.42	2.3
M.H.	23	0.031	0.60	4.1
Y.F.	25	0.034	0.64	5.3
H.S.	26	0.023	0.57	4.0
K.T.	26	0.023	0.30	7.6
A.T.	31	0.015	0.70	2.2
Y.A.	25	0.031	0.62	4.9
K.N.	26	0.032	0.53	6.0
K.N.	24	0.039	0.39	9.9
A.T.	31	0.035	0.82	4.3
S.Y.	23	0.024	0.54	4.5
Mean	28	0.030	0.63	4.9

から0.88 ppm の PCB を，また魚油中からは調査した2検体ともに，0.71 ppm，1.55 ppm の PCB を検出した．これらのことから製品中の PCB は，原料である魚油からの汚染であると考えられる．

魚油は，食用魚類の新鮮な肝臓から得た脂肪油である．魚の内臓は，可食部より高濃度のＰＣＢで汚染されていることは，今回の調査でも認められている．したがって魚油がＰＣＢによって汚染されていることは容易に想像がつき，また肝油が長期的に学童ならびに病弱者に投与される医薬品の一種である以上十分な調査が必要であろう．

6) 包装紙

冷凍食品用，ハム用，パン用，バター用，経木，チーズ用，アンマン用など各1検体，計7検体についてＰＣＢを調査したところ，いずれもＰＣＢを検出しなかった．前報[6]では，パンの包装紙から 85 ppm という高濃度のＰＣＢを検出しており，その後，大谷[19]，市川[15]，池辺[20]，伊東[18]らがそれぞれ報告している．それらによれば，最高220 ppm という報告例もあるが，多くは低濃度である．したがって，今回の調査から，ＰＣＢの使用規制の効果が現われてきたものと考えられる．

7) 母　乳

都内に在住する主婦20人から，出産後２―３週間以内の母乳の提供を受け，それらについてＰＣＢ含有量を調査した結果を Table 6 に示す．

全検体からＰＣＢを検出した．全量あたりの最高値は0.063 ppm，最低値は0.010 ppm，平均は0.030 ppm であった．脂肪量あたりの最高値は1.04 ppm，最低値は0.30 ppm，平均0.63 ppm であった．これを前報[6]と比較すると，全量あたり，前報[6]では0.031 ppm で本報と差はない．また，脂肪量あたりの平均は，前報[6]0.92 ppm で本報はそれをわずかに下まわっているが，汚染された魚介類を摂取する機会がある現在，染汚度が低下しているとはいえない．また，母乳について島本[21]らは，検体を４地区に分けて採り，それぞれの平均を求めた結果，都市住宅地区0.05 ppm，漁村地区，問題工場地区0.04 ppm，農村地区0.02 ppm の順であったと報告し，さらに山本[12]らは，漁村地区，都市地区，山間地区の３地域に，竹下[22]らは，農村地区，都市地区に分け，それぞれ漁村地区，都市地区が他地区より高い平均ＰＣＢ含有量を示したと報告して

いる．しかしながら，昭和47年度に厚生省が実施した，第1回母乳中のＰＣＢ全国調査の結果は，平均で漁村地区が最も高く，0.045 ppm，ついで問題工場周辺地区0.040 ppm，都市住宅地区0.038 ppm，農村地区0.028 ppm の順である．昭和48年度第2回母乳中のＰＣＢ全国調査では，問題工場周辺地区と漁村地区が入れかわり，それぞれ，0.044 ppm，0.039 ppm，以下都市住宅地区0.031 ppm，農村地区0.028 ppm と発表されている．第1回に比べて第2回は，わずかにＰＣＢ含有量は減少してはいるが，われわれの調査ではあまり変っておらず，汚染度に変りはない．この2回の全国調査で注目すべき点は，西日本の方が東日本に比べて汚染度が高く，それは瀬戸内海浴岸県に多いこと，さらに瀬戸内海はＰＣＢの汚染度の高い海域であることを考え併せると，母乳汚染の主因は，魚の多食にあるものと思われる．東京のような都市でも，魚を食べる機会は多く，今回の調査でもほとんどの魚からＰＣＢを検出しており，したがって妊婦は，脂肪分の多い魚の多食，連食をさけ，特に内臓はさけるべきであろう．

要　結

1. 都内で入手した，魚37種類130検体についてＰＣＢを測定した．可食部で1 ppm を越えたものは，アナゴの1.87 ppm，1.56 ppm，サバの1.20 ppm の3検体であり，これらを含めて暫定規制値を越えたものはなかった．

内臓は採取した33種類中31種類からＰＣＢを検出し，高値のものはフッコ26.82 ppm，ハゼ6.46 ppm，マコガレイ6.12 ppm，ハマチ3.58 ppm などであった．

2. 貝類については，広島県産のカキが平均で0.15 ppm，宮城県産のカキは平均0.04 ppm で広島県産のカキがやや高いＰＣＢ含有量を示した．

3. 乳製品の汚染度は低く，暫定規制値を越えたものはなかった．

4. 肉類の汚染度も低く，暫定規制値を越える食肉はなかった．

鶏卵も同様の結果であり，暫定規制値を下まわった．食肉中の鶏肉および鶏卵は，鶏の飼料に魚粉が加えられることがあるが，ＰＣＢの検出濃度は低く，注目された．

5. 肝油製品から0.39 ppm，0.81 ppm のPCBを検出した．また，原料の合成油から0.88 ppm，魚油から0.17 ppm，1.55 ppm のPCBを検出した．肝油製品の汚染は，魚油中のＰＣＢに由来すると思われる．

魚油は，魚の肝臓の脂肪油であるが，内臓についてはＰＣＢの規制がなく，この点で盲点といえよう．

6. 7検体の包装紙についてＰＣＢを検査したが，ＰＣＢは検出しなかった．包装紙に対する規制が十分行き届いているものと思われる．

7. 20例の母乳について調査したところ，全量あたり平均0.030 ppm，脂肪量あたり平均0.63 ppm の結果を得た．前報と比較して，全量あたりでは大差なく，脂肪量あたりでは前報[6]の2/3であった．また，厚生省が実施した第2回母乳中のＰＣＢ全国調査の都市住宅地区平均0.031 ppm とほとんど同じであったが，魚介類の汚染は依然として存在するので，妊婦は魚の多食，連食はさけるべきである．

〔付記〕本研究は，昭和48年度当研究所研究課題「東京都におけるＰＣＢ汚染の実態について」として実施したものである．

文　献

1) Jensen, S.: *New Scientist*, 32, 162 (1966)
2) 鈴木助治，山野辺秀夫，大沢映子，小泉清太郎，戸谷哲也：東京衛研年報，24，159—166 (1972)
3) Jensen, S., Johnels, A. G., Olsson, M.and Otterlind, G.: *Nature*, 224, 247—250(1969)
4) Risebrough, R.W., Reiche, P., Peakall, P. B., Herman, S. G. and Kirven, M. N.: *Nature*, 220, 1098—1102(1968)
5) 立川　涼，磯野直秀：自然，26　26—30 (1971)
6) 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：東京衛研年報，23，111—122 (1971)
7) 厚生省環境衛生局ＰＣＢ分析研究班：分析方法に関する研究　昭和47年1月
8) 厚生省環境衛生局食品化学課：昭和47年10月26日環食化第385号，容器包装中のＰＣＢ分析法について
9) 厚生省，第8改正日本薬局方第1部，1971，C—1353
10) 厚生省，第7改正日本薬局方第1部，1961，C—473
11) Wood, N. F.: *Analyst*, 94, 399—405 (1969)
12) 山本　博，山本吉男，木下サト子，田原　巧，井上堅志，広瀬哲也，三村　守，松家　修：徳島県衛生研究所年報，12，265—267 (1973)
13) 飯田勝彦，貝瀬利一，斎藤芳久，渡辺重信，和

田　裕，高橋慶彦，渕上信也，黒井信義：神奈川県衛生研究所研究報告，3，9—13 (1973)
14) 竹下忠昭，犬山義晴：島根県衛生公害研究所年報，14，33—36 (1972)
15) 市川　博，松田　昇，芋生真子：奈良県衛生研究所年報，7，53—57 (1972)
16) 森　量夫，丹川義彦，北山正治，山本勇夫，河井保人，都築俊文，堀　義宏，設楽泰正：北海道における食品環境の汚染に関する総合的調査研究並びにその対策，第1報，北海道立衛生研究所，10—13 (1972)
17) 松田 宏，島本 勉，芳之内政則，森 喜一，冲永悦子，山竹定雄：愛媛県立衛生研究所年報，34，75—77 (1972)
18) 伊東康晴，肥後公子，迫田隆平：鹿児島県公害衛生研究所報，9，33—35 (1973)
19) 大谷　惇，小林義明，川越章善，富所謙吉：札幌市公衆衛生研究業績集，衛生試験所編，10—18 (1972)
21) 池辺秀人，工藤隆子，奥本真知子，立花敏弘，二村哲男：大分県衛生研究所報，46—47 (1972)
21) 島本　勉，松田　宏，芳之内政則，冲永悦子，森　喜一，山竹定雄：愛媛県立衛生研究所年報，34，91—95 (1972)
22) 竹下忠昭，犬山義晴：島根県衛生公害研究所年報，14，32 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 127 — 132, 1974

有害性元素に関する衛生化学的研究（第5報）
野菜などの重金属含有量について

雨宮 敬* 伊藤弘一* 山添律子
原田裕文* 戸谷哲也*

Hygienic Chemical Studies on Harmful Elements (V)
Contens of Heavy Metals in Vegetables and Fruits

TAKASHI AMEMIYA*, KOICHI ITO*, RITSUKO YAMAZOE*,
HIROFUMI HARADA* AND TETSUYA TOTANI*

Contents of cadmium, lead, arsenic, copper, zinc and manganese in various kinds of vegetables and fruits were surveyed from 1971 to 1973.

Samples were 5 kinds of vegetables ; tomato, cucumber, spinach, potato and tea, and 3 kinds of fruits : appele, strowberry and summer orange, collected from markets. The samples were digested with sulfuric acid and nitric acid. Arsenic and the other metals in the digested solution were determined by spectrophotometry using silver diethyldithiocarbamate and atomic absorption spectrophotometry, respectively.

The results obtained are summarized as follows :

1) The mean content of cadmium in each sample was ranged from 0.05 ppm in apple to 0.0091 ppm in spinach.

2) The content of lead in spinach was averaged 0.081 ppm, and in the other samples was less.

3) The content of arsenic in all the samples examined was almost trace.

4) Copper and zinc were contained at the level of 5.96 ppm and 32.9 ppm in tea, respectively, but far less in the other samples.

5) Manganese was more contained in all the samples compared with the other metals, and, especially, the highest level of 1980 ppm was detected from tea examined in this research.

緒　言

近年，カドミウム，鉛，ヒ素などの微量金属元素による環境の汚染が問題となっている．さらには環境の汚染を通して農作物などへの汚染に連鎖してゆく．

野菜，果実中の微量金属元素は植物生育上の必須元素として，自然界から天然に生体中にとりこまれて存在している場合と，公害あるいはヒ酸鉛，ボルドー液などの農薬散布による人為的なものに起因する汚染が考えられる．

現在，食品衛生法[1]で米のカドミウムと一部の野菜，果実に対し残留農薬としてヒ素および鉛について許容量が定められている．

銅は，わが国では食品安全基準が定められていないが，ボルドー液の散布による残留量についてリンゴの場合に規制されている[2]．

亜鉛は銅同様に食品安全基準はないが，カナダにおける基準によると，野菜，果実および茶などについて規制されている[2]．

マンガンは活性二酸化マンガン法による排ガス脱硫装置などからの飛散が考えられる[3]．

そこで，野菜，果実中の重金属含有量を把握するため，昭和46年から48年の3年間にわたり総数270試料についてカドミウム，鉛，ヒ素，銅，亜鉛およびマンガンの含有量の調査を行なったので報告する．

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

1. 実験方法

1—1 試　料

東京都内の市販の野菜，果実で食品衛生法でヒ素と鉛の基準のあるもののうち，トマト，イチゴ，リンゴ，キュウリ，夏ミカン（実，皮），ホウレンソウ，バレイショおよびヒ素と鉛の基準はないが，常時多量に飲用される茶の9種類で，産地の明確なものを試料とした．

1—2 試　薬

特にことわりのないかぎり試薬特級（和光純薬工業K.K.）を用い，硝酸，硫酸およびアンモニア水は精密分析用を用いた．

0.1%ブロムチモールブルー（BTB）試液：BTB 0.1 g を希エタノールに溶かして 100 ml とする．

25%酒石酸ナトリウム・カリウム溶液：酒石酸ナトリウム・カリウム 250 g を水（蒸留水をさらにイオン交換樹脂 IR—120および IRA—400 を用いて精製した）に溶かして 1,000 ml とする．

1%ジエルジチオカルバミン酸ナトリウム(DDTC)溶液：DDTC 1 g を水に溶かして 100 ml とする．

飽和硫酸アンモニウム溶液：硫酸アンモニウムを水に溶かし，結晶を析出させてから上澄液を用いる．

飽和シュウ酸アンモニウム溶液：前記の飽和硫酸アンモニウム溶液と同様に操作して調製する．

40%塩化第一スズ溶液：塩化第一スズ 40 g を塩酸に溶かして 100 ml とする．

15%ヨウ化カリウム溶液：ヨウ化カリウム 75 g を水に溶かして 500 ml とする．

0.1%ジエチルジチオカルバミン酸銀（SDDTC，ドータイトアルセノン）・ピリジン溶液：SDDTC 0.1 g をピリジンに溶かして 100 ml とし，冷暗所に保存する．

亜鉛（砂状）：無ヒ素亜鉛を用いる．

酢酸鉛脱脂綿：酢酸鉛 9.5 g を水 100 ml および酢酸1滴を加えて溶かした液に脱脂綿を浸し，つぎにこれをとりだし，過量の液を除いて乾燥して用いる．

カドミウム標準溶液：純度99.9%以上の金属カドミウム1.000 g を硝酸 10 ml および水 50 ml を加え，加熱して溶かし，水を加えて 1,000 ml とし標準原液とする．この原液をさらに0.1 N 硝酸で正確に希釈して1 ml 中10 μg の Cd を含む液を調製する．

鉛標準溶液：硝酸鉛1.598 g を 1N 硝酸に溶かし1,000 mlにする．前記のカドミウム標準溶液と同様に操作して 1 ml 中 10 μg の Pb を含む溶液を調製する．

ヒ素標準溶液：無水亜ヒ酸 1.320 g を40% 水酸化ナトリウム溶液に溶かし，水を加えて，1,000 ml とする．さらに，この溶液を水で希釈して 1 ml 中 1 μg の As を含む液を調製する．

銅標準溶液：硫酸銅 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 3.925 g を 1 N 硝酸に溶かして1,000 ml とする．カドミウム標準溶液と同様に操作して 1 ml 中 10 μg の Cu を含む液を調製する．

亜鉛標準溶液：純度99.9%以上の細片状の金属亜鉛 1.000 g を 1 N 硝酸 100 mlを加えて，加熱して溶かし，1 N 硝酸を加えて1,000 ml とする．カドミウム標準溶液と同様に操作して 1 ml 中 10 μg の Zn を含む液を調製する．

マンガン標準溶液：過マンガン酸カリウム 0.290 g を水100 ml に溶かし，硫酸 (1+1) 1 ml を加える．つぎに亜硫酸水素ナトリウム 0.5 g を加えて煮沸して過剰の亜硫酸を追い出す．冷後，水で 1,000 ml にする (100 ppm)．さらに 1 ml 中 10 μg の Mn を含む液を調製する．

1—3 装　置

原子吸光分析装置：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：パーキンエルマー社製ホローカソードランプ (Cd, Pb, Cu, Zn および Mn) を，またバーナーはスリースロットを用い，空気-アセチレンフレームで測定を行なった．

比色分析装置：日立自記分光光度計（EPS—3T型）を用いた．

pHメーター：日立掘場 M—5型を用いた．

1—4 試験溶液の調製

前処理に際し，試料に泥が付着しているものは泥をおとし，トマト，イチゴなどのようにヘタのついているものはそれを除き，水洗し，最後に精製した水で流し，可食部を試料に供した．

1—4(1) カドミウム，鉛および銅

試料をステンレス製の包丁を用いて細切し，その 50.0 g を 300 ml ケルダールフラスコにとり，硝酸 10 ml を加えて一夜放置する．

おだやかに加熱し，放冷したのち，硫酸 5 ml を静かに加える．さらに加熱し，白煙が生ずるまで加熱を続ける．放冷したのち，硝酸 5 ml を加えて再び加熱し，白煙が生じたら加熱を止めて放冷する．さらに硝酸 5 mlを加えて再び加熱する．内容液が無色ないし淡黄色になるまでこの操作をくり返し有機物を完全に分解する．

1—4(2) 亜鉛およびマンガン

別に試料50.0 g を前記と同様に操作して試料を灰化する．冷後，水を加えて正確に50 m*l* とし，試験溶液とした．

1—4(3) ヒ 素

試料50.0 g をカドミウム，鉛および銅の試験溶液調製と同様に操作し，冷後，灰化液に飽和シュウ酸アンモニウム溶液 5 m*l* を加えて加熱し，完全に硝酸を除去して試験溶液とした．

2. 定量操作

2—1 カドミウム[4-8]，鉛[9-10]および銅[11-13]

前記の方法によって得られた試験溶液全量を 100 m*l* のビーカーに移し，ケルダールフラスコ内を少量の水で2回洗い，洗液を前液に合し，0.1%BTB 試液2滴を加え，強アンモニア水を液が黄色から青色に変化するまで加える．

さらに，25%酒石酸ナトリウム・カリウム溶液5 m*l* を加えたのち，塩酸およびアンモニア水を用い pH メーターによって pH を7から7.5に調整する．

つぎに，この液を 100 m*l* 分液ロートに移し，飽和硫酸アンモニウム溶液 10 m*l* および1%DDTC 溶液を 5 m*l* 加えてよく振りまぜて，しばらく放置する．

メチルイソブチルケトン (MIBK)10 m*l* を正確に加え，振とう機を用いて5分間振とうする．MIBK 層と水層が完全に分離するまで静置し，MIBK 層を分取する．

この液について Table 1 に示した測定条件によって原子吸光分析を行なった．

2—2 亜鉛[4,10]およびマンガン[3]

亜鉛およびマンガンは溶媒抽出を行なうことなく，水溶液で直接原子吸光分析を行なった．

2—3 ヒ 素[14,15]

試験溶液を 40 m*l* 標線付きのヒ化水素発生ビンに移し，少量の水でケルダールフラスコ内を2回洗い，洗液は前液と合する．

これに硫酸 5 m*l* および水を加えて約20 m*l* とし，ついで15%ヨウ化カリウム溶液2 m*l*，40%塩化第一スズ溶液 0.2 m*l* および水を加えて全量を 40 m*l* とし，よく振りまぜて常温に15分間放置する．

15分放置後，ヒ化水素発生ビンに無ヒ素亜鉛(砂状) 3 g を加え，酢酸鉛脱脂綿をつめたヒ化水素導入管をすばやく取り付ける．発生するヒ化水素を0.1%SDDTC・ピリジン溶液を 3 m*l* 正確に入れたミクロ試験管中に1時間吸収させる．

この吸収液を分光光度計用の 1 cm セルに移し，0.1%SDDTC・ピリジン溶液を対照として 540 nm における吸光度を測定した．

3. 結果と考察

以上のに方法したがって行なった試料中のカドミウム，鉛，ヒ素，銅，亜鉛およびマンガンの含有量を Table 2—1, 2—2, 2—3 にそれぞれ示す．

3—1 カドミウム

カドミウムについてはホウレンソウの含有量が比較的高値で，47年および48年の2年間の平均で 0.091 ppm を示した．さらに，イチゴ 0.033 ppm，パレイショ 0.025 ppm，茶 0.097 ppmであり，その他の試料においてはさらに低値であった．主食である米中の含有量も記載した．都衛生局環境衛生部より送付された(48年12月18付) 46種の水稲うるち玄米について調査したところ最高3.04 ppm を示し，平均値0.21 ppm で

Table. 1 Operating Conditions

Element	Cd	Pb	Cu	Zn	Mn
Wave Length Å	2288	2833	3247	2138	2795
Lamp Current (Hollow Cathode Lamp, mA)	8	8	15	15	15
Slit	4	4	4	4	4
Range	(1 mm, 7A) U.V.	(1 mm, 7A) U.V.	(1 mm, 7A) U.V.	(3 mm, 20A) U.V.	(1 mm, 7A) U.V.
Acetylene Flow Rate (liter/min)	4	4	4	6	6
Air Flow Rate (liter/min)	23	23	23	23	23
Acetylene Pressure	0.55 kg/cm² (8 psi)				
Air Pressure	2 kg/cm²(30 psi)				
Burner Head	Three-Slot				

Perkin-Elmer Model 403 Atomic Absorption Spectrophotometer

Table. 2—1 Contents of Heavy Metals in Vegetales and Fruits

Sample	Year	Cd(ppm)	Pb(ppm)	AS(ppm)	Cu(ppm)	Zn(ppm)	Mn(ppm)
Tomato	1971	0.028 (0.021—0.038)	0.055 (0.022—0.103)	0.045 (0.010—0.176)	0.599 (0.470—0.750)		
	1972	0.020 (0.010—0.029)	0.094 (0.021—0.348)	0.008 (0.002—0.012)	0.415 (0.160—0.480)	0.850 (0.530—1.325)	1.034 (0.020—2.136)
	1973	0.009 (nd —0.029)	0.020 (nd —0.058)	nd	0.140 (0.070—0.210)	0.821 (0.672—1.141)	0.627 (0.429—1.386)
	Mean	0.019	0.056	0.018	0.385	0.836	0.831
Strow-berry	1971	0.023 (0.011—0.032)	0.064 (0.018—0.145)	0.036 (0.006—0.086)	0.763 (0.390—1.680)		
	1972	0.034 (0.009—0.083)	0.087 (0.039—0.151)	0.024 (0.002—0.081)	0.459 (0.300—0.900)	1.063 (0.037—1.960)	6.230 (1.636—13.16)
	1973	0.042 (nd —0.167)	0.030 (nd —0.108)	nd	0.230 (0.130—0.370)	1.004 (0.698—1.311)	3.993 (0.770—7.084)
	Mean	0.033	0.060	0.020	0.484	1.034	5.112
Apple	1971	0.008 (0.005—0.014)	0.169 (0.053—0.494)	0.071 (0.002—0.246)	1.026 (0.640—1.460)		
	1972	0.005 (0.002—0.008)	0.184 (0.040—0.458)	0.005 (0.002—0.023)	0.850 (0.540—1.190)	0.181 (0.017—0.487)	0.825 (0.248—1.691)
	1973	0.002 (nd —0.004)	0.063 (0.004—0.229)	nd	0.300 (0.220—0.440)	0.256 (0.026—0.381)	0.954 (0.125—1.869)
	Mean	0.005	0.139	0.025	0.725	0.219	0.890

Table. 2—2 Contents of Heavy Metals in Vegetables and Fruits

Sample	Year	Cd(ppm)	Pb(ppm)	As(ppm)	Cu(ppm)	Zn(ppm)	Mn(ppm)
Cucum-ber	1971	0.012 (0.005—0.026)	0.069 (0.040—0.117)	0.019 (0.005—0.056)	0.637 (0.280—0.940)		
	1972						
	1973	0.004 (0.001—0.007)	0.026 (nd —0.057)	nd	0.260 (0.060—0.420)	2.410 (1.680—3.460)	0.806 (0.575—1.209)
	Mean	0.008	0.049	0.010	0.449		
Potato	1971	0.034 (0.021—0.051)	0.121 (0.044—0.261)	0.009 (0.001—0.012)	1.458 (1.010—2.060)		
	1972	0.029 (0.019—0.051)	0.089 (0.034—0.261)	0.016 (0.002—0.118)	1.108 (1.010—1.440)	2.276 (1.295—3.404)	1.400 (0.788—2.554)
	1973	0.011 (nd —0.028)	0.038 (nd —0.132)	nd	0.480 (0.280—0.680)	1.915 (1.424—3.545)	0.910 (0.735—1.318)
	Mean	0.025	0.083	0.008	1.015	2.100	1.155
Spinach	1971						
	1972	0.100 (0.050—0.150)	0.187 (0.130—0.270)	0.029 (0.002—0.067)	1.025 (0.760—1.790)	5.662 (2.324—11.22)	6.227 (3.722—8.354)
	1973	0.082 (nd —0.177)	0.079 (nd —0.141)	nd	0.364 (0.100—0.510)	5.493 (1.667—11.90)	4.270 (1.547—6.993)
	Mean	0.091	0.133	0.015	0.695	5.578	5.249

Table 2—3 Contents of Heatals in Vegetables and Fruits

Sample	Year	Cd(ppm)	Pb(ppm)	As(ppm)	Cu(ppm)	Zn(ppm)	Mn(ppm)
Summer Orange (fruit)	1971	0.009 (0.001—0.017)	0.101 (0.028—0.175)	0.059 (0.011—0.137)	0.680 (0.400—0.930)		
	1972	0.006 (0.004—0.007)	0.094 (0.022—0.180)	0.031 (0.002—0.012)	0.410 (0.090—0.930)	0.266 (0.055—0.567)	0.602 (0.250—1.166)
	1973	0.004 (nd —0.008)	0.049 (0.004—0.108)	nd	0.240 (0.171—0.350)	0.694 (0.426—0.925)	0.462 (0.184—0.893)
	Mean	0.006	0.081	0.030	0.443	0.480	0.532
Summer Orange (peel)	1971	0.009 (0.006—0.013)	0.135 (0.033—0.294)	0.087 (0.006—0.313)	0.680 (0.500—0.820)		
	1972	0.005 (0.002—0.008)	0.255 (0.072—0.300)	0.058 (0.002—0.187)	0.578 (0.240—0.980)	0.826 (0.435—1.930)	1.521 (0.259—2.743)
	1973	0.003 (nd —0.010)	0.108 (0.003—0.290)	nd	0.150 (0.070—0.350)	1.440 (0.273—6.509)	1.148 (0.473—2.164)
	Mean	0.006	0.166	0.048	0.469	1.133	1.335
Tea	1973	0.070 (0.010—0.125)	0.820 (0.340—1.420)	nd	5.960 (4.500—11.20)	32.88 (22.80—39.00)	1112 (800—1980)

あった.

今調査において，イチゴの平均含有量が46年から48年の3年間にかけて増加しているが，その他の試料では減少の傾向にあった．しかし，その原因がいかなるものに起因しているか今後検討の必要性があろうかと思われる．われわれの人体蓄積調査[16]では70歳代の男子の腎臓から 70 ppm にもおよぶカドミウムの蓄積例を見い出している．今回は野菜，果実の種類が少数であり，かなり低値であったとはいえ，人体における高蓄積例の真の原因がいかなる媒体に由来しているかは極めて興味のあることである．

3—2 鉛

今調査では，ホウレンソウ，リンゴ，夏ミカンの皮において比較的高値を示し，それぞれ0.133，0.139，0.166 ppm であり，その他の試料ではさらに低値であった．経年の増減は今調査でみるかぎりは数種の試料において47年に多少増加しているものもみられたが，年々減少しているものの方が多かった．

鉛は食品衛生法で 1.0から5.0 ppm の基準が定められているが[1]，すべて1.0 ppm 以下であり，その基準値をこえているものはみられなかった．その他の機関で行なわれた結果によると，昭和39年および40年ではリンゴの平均値1.60，キュウリ0.10，トマト0.10 ppm と報告している．今調査結果は 2,3 の報告例[17,18]とほぼ同様であった．

3—3 ヒ 素

夏ミカンの皮 0.048，夏ミカンの実 0.030，イチゴ 0.020 ppm であったが，その他はさらに低値であった．すべての試料が経年的に減少していて，基準値[1]をこえるものはみられなかった．

今調査では nd を示すものが多数みられたが，植物にとっては低値であってもそれなりの意味があるものと思われる．

3—4 銅

バレイショ 1.015，ホウレンソウ 0.70，茶の含有量は他の試料よりも高値で5.960 ppm であった．すべての試料において経年的に減少の傾向にある．

しかし銅は生体にとって必須元素の一つであり，自然界に広く分布している．他の報告例では野菜，果実中に0.5から 2 ppm 程度含有しており，豆類，米には2から10 ppm 程度であると報告している[17]．

農作業において古くから銅を多量に含む著名なボルドー液が殺菌剤として用いられ，散布後の残留が果実において問題となったこともあった．現在ではリンゴの場合のみに 50 ppm 以下と規制されている[2]．

3—5 亜 鉛

今調査では，ホウレンソウ5.578，キュウリ2.410，バレイショ2.100 ppm であり，茶の亜鉛含有量は他のいずれの試料よりもはるかに高値で32.88 ppm を示した．

亜鉛も銅同様生体にとって必須元素であることは周知のとおりであるが文献上，野菜では 1 から 10 ppm 程度，豆類では20から50 ppm 程度である[17]．

しかし，飲料水をはじめ亜鉛による中毒事故例もかなりあることから，その毒性は無視し得ない，

3—6 マンガン

今回の調査においてホウレンソウ 5.249, イチゴ 5.112 ppm が高値であった．ホウレンソウは20件，イチゴ30件調査したところ，前者においては 0.770 から 13.16 ppm を，また後者においては1.547 から 8.354 ppm という含有量を示したが，その他の試料ではさらに低値であった．

今回調査したすべての試料中で最も高値を示したものに茶が挙げられる．銘柄の異なるものを10件調査したところ，最高1,980 ppm，最低でも800 ppm，平均値1,112 ppm であった．この結果は田中ら[17]の報告例と同様の傾向を示した．マンガンは生体の必須元素であるが，茶に多く含有しているのは茶の特異的な吸収によるものと思われる．

マンガンは酸化作用に関係があるものといわれており，マンガン欠乏の葉は葉脈に緑色のまま特徴のある斑点が生じるが，生理作用については不明な点が多い[2]．

今回調査したカドミウムをはじめとする各金属元素において，全般的にみて，試料中の含有量が年々減少していくものが多かった．

さらに今後も調査を継続し，野菜，果実のみにとどまらず他の食品をも実施していく必要があると考えられる．

4. 要　結

1. 昭和46年から48年までの3年間にトマト，イチゴ，リンゴ，キュウリ，夏ミカン（皮，実），ホウレンソウ，バレイショおよび茶の9種（270試料）について重金属含有量の調査を行なった．対象とした金属元素は，カドミウム，鉛，ヒ素，銅，亜鉛およびマンガンの6種で計1,190件である．

2. カドミウムについては，ホウレンソウが他の試料と比較して高値を示し，平均値は 0.091 ppm であったが，このうち0.150 ppm のものもみられた．

3. 鉛については，夏ミカンの皮が0.166 ppm であった．その他のものはさらに低値であった．

4. ヒ素については，特に高値のものはみられなかった．

5. 銅および亜鉛については，茶の含有量が高値であった．さらにホウレンソウの亜鉛含有量は 5.578 ppm であった．

6. マンガンは特に茶に多く，最高値1,980 ppm を示し，最低値でも 800 ppm であった．

〔付記〕本調査は第10回全国衛生化学技術協議会総会で発表した．

謝　辞

本調査にあたり，試料の入手にご協力いただいた都衛生局環境衛生部ならびに食品衛生監視機動班の方々に深謝いたします．

文　献

1) 食品衛生小六法（1971）新日本出版
2) 環境庁土壌農薬課編：公害と防止対策，土壌汚染，(1973)白亜書房
3) 鈴木幸夫，西山敬太郎，梶本雅俊，藤井信夫，近藤多美子：日衛誌，24．86—88(1969)
4) 石崎有信，福島匡昭，坂元倫子：日衛誌，25，207—222（1970）
5) 秋田喜美，高橋正，湯本弘忠，山添三郎：日公衛誌，21，11—15（1974）
6) 田中涼一，矢田光子，小林太郎：食衛誌，11，84—87（1970）
7) 永田正，志村博，寺倉敏雄：日衛誌，11，41—45(1970)
8) 日本分析化学会関東支部編：公害分析指針7，食品編1—a，カドミウム，10(1972)，共立出版
9) Willis, J. B.: *Anal. Chem.*, 34, 614—617 (1962)
10) 池辺克彦，田中之雄，田中涼一，国田信治：食衛誌，13，195—204（1972）
11) A. O. A. C.: 10 thed, 23, A. O. A. C., Washington, D. C,(1965)
12) 近藤竜雄，山田正一：食衛誌，7，324—326（1966）
13) 近藤竜雄：食衛誌，7，327—330（1966）
14) 下川洪平，掘部信好，寺町雅子，森　仁：食衛誌，12，330—332（1971）
15) 小泉清太郎，鈴木助治，山野辺秀夫，雨宮敬，大沢映子，戸谷哲也：東京衛研年報，23，101—109（1971）
16) 江波戸挙秀，伊藤弘一，竹内正博，雨宮敬，原田裕文，戸谷哲也：衛生化学，20，(1974)，投稿中
17) 田中之雄，池辺克彦，田中涼一，国田信治：食衛誌，14，196—201（1973）
18) 山梨県衛生研究所研究年報：17—18（1971）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 133 — 139, 1974

有害性元素に関する衛生化学的研究（第6報）
アルカリ分解による魚肉中のメチル水銀の定量法

竹内正博* 江波戸挙秀* 伊藤弘一* 雨宮敬*
原田裕文* 戸谷哲也*

Hygienic Chemical Studies on Harmful Elements (VI)
Determination Method of Methylmercury in Fish by Alkaline Digestion

MASAHIRO TAKEUCHI*, KIYOHIDE EBATO*, KOICHI ITO*,
TAKASHI AMEMIYA*, HIROFUMI HARADA*
AND TETSUYA TOTANI*

A method for the determination of methylmercury in fish has been investigated, for the purpose of improving the ordinary method authorized by F D A.

The ordinary method is often attended with emulsion at the steps of the extraction of methylmercury with benezene.

Sample was digested with a potassium hydroxide ethanol solution (2 N) in order to prevent the formation of emulsion.

Methylmercury was extracted as methylmercuric chloride (MMC) with chloroform after acidification of the digested solution, back-extracted with a cysteine acetate solution from the extract, re-extracted with benzene, and determined by gaschromatography equipped with an electron capture detector.

The average recovery of MMC added to samples was 86.2%, and the standard deviation was 1.1%.

The MMC extracted from samples was identified by mass spectrometry combined with gaschromatography.

緒　言

魚肉中のメチル水銀の定量法として，現在，直接抽出法[1]およびパパイン分解法[1,2]の2つの方法が衛生試験法に採用されている。直接抽出法はWestöö[3-5]が確立した方法を若干改良したもので，塩酸酸性とした試料から直接メチル水銀をベンゼンで抽出し，システイン・アセテート溶液に転溶後，ベンゼンで再抽出し，電子捕獲型ガスクロマトグラフ（ECD—GC）によって，定量する方法である。この方法の欠点は試料中の蛋白質などの生体組織のために，抽出過程において強固なエマルジョンが形成され，ベンゼン層あるいは水層の分取が非常に困難になることと，エマルジョンの程度が魚種によって異なるため，メチル水銀の回収率が魚種毎に相異し，常に回収実験の並行を必要とすることである。

パパイン分解法は，あらかじめ蛋白質分解酵素パパインを用いて試料を液化し，その後メチル水銀を連続抽出することによって，このような欠点をかなり改良しえたものといえるが，試料の液化および連続抽出操作に長時間を要し，迅速性を必要とするルーチン分析法としては，かならずしも適当でない。

著者らは，より迅速なメチル水銀の定量法を確立することを目的として，魚肉を水酸化カリウム・エタノール溶液で分解し，その後塩酸酸性としてから，メチル水銀を抽出する方法を検討したところ，エマルジョ

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ンの形成がほとんどみられず，簡便に操作することができた。また回収率および再現性においても良好な結果が得られ，迅速なメチル水銀の定量法として活用することができると考えられるので報告する。

実 験 の 部

1. 試薬 (1) ベンゼンおよびクロロホルム——試薬特級を使用する。ただし，ベンゼンは使用に先だち，塩化メチル水銀の定量を妨害する不純物が存在しないことを，ECD—GC により確認する。

(2) 塩酸——試薬特級をあらかじめ適量のベンゼンで洗浄し，塩化メチル水銀の定量を妨害する成分を除去してから使用する。

(3) 2N—水酸化カリウム・エタノール溶液—水酸化カリウム 112 g（2モル）を水 200 m*l* に溶解し，エタノールを加えて，1,000 m*l* とする。

(4) システイン・アセテート溶液——和光純薬製，特級塩酸L—システイン1.0 g，酢酸ナトリウム ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) 0.8 g，塩化ナトリウム 12.5 g を水に溶解し，100 m*l* とする。

(5) 塩化メチル水銀標準溶液——①ベンゼン溶液：純度99%以上の塩化メチル水銀（mp 169—170°）をベンゼンに溶解して，1 mg/m*l* の保存溶液を調製し，さらに適量のベンゼンで希釈して，標準溶液を調製する。

② エタノール溶液：前項①のベンゼンのかわりにエタノールを用い，他は同様にして標準溶液を調製する。この溶液は添加回収実験に供する。

2. 装置 (1) ECD—GC 装置は島津 GC—5A型（線源：^3H）を使用した。

カラムは 10%DEGS—HG（クロモソルブ WAW—DMCS，80—100メッシュ）3 mmϕ×1.5 m（ガラス）を用いた。温度はカラム 160°，注入口 180°，検出器 200°とし，キャリヤーガスは N_2 60 m*l*/min とした。

(2) GC—MS 装置は島津 LKB—9000型（多重イオン検出器つき）を使用した。

GC カラムは 2 mmϕ×2 m（ガラス）を使用し，充塡剤は(1)と同一で，温度は150°，キャリヤーガスは He 30 m*l*/min とした。MS イオン源温度は270°，イオン化電圧70 eV，イオン加速電圧3.5 kV，トラップ電流は 60 μA とした。イオン源出口スリット幅およびコレクタースリット幅は 0.1 mm，磁場走査範囲は 0—400 で，マススペクトル測定時間は5秒間，UVレコーダースピードは 8 cm/sec とした。なお，モレキュラーセパレーター温度は220°とした。

3. 定量法 (1) 試験溶液の調製——ホモジナイズした試料5.0 g を 200 m*l* のナス型フラスコにとり，2 N—水酸化カリウム・エタノール溶液10 m*l* を加え，還流冷却器を付して，試料が分解液化し，固型物が消失するまで（約30分），水浴上で加熱する。冷後，1 N—塩酸20 m*l* を加えて中和し，1 %硫酸銅溶液5 m*l* を加え混和してから，さらに塩酸 5 m*l* を加えた後，内容物を 200 m*l* の分液ロートに移す。フラスコの壁を 1 N—塩酸 10 m*l* で洗浄し，前液に合した後，クロロホルム 30 m*l* を加え，3分間激くし振り混ぜる．静置後，クロロホルム層を別の 200 m*l* の分液ロートに分取し，水層はさらに，クロロホルム 30 m*l* ずつを用いて，2回抽出を繰り返し，クロロホルム層を前液と合する。次に，このクロロホルム層にシステイン・アセテート溶液 20 m*l* を加え，5分間振り混ぜた後，下層をすて，システイン・アセテート溶液層を *n*-ヘキサン 20 m*l* ずつを用いて，2回洗浄する。つぎに，システイン・アセテート溶液層10 m*l* を正確に 100m*l* の分液ロートにとり，塩酸2 m*l*，ベンゼン20 m*l* を加え，3分間振り混ぜた後，ベンゼン層をとり，ECD—GC の試験溶液とする。

(2) 検量線——塩化メチル水銀標準溶液 5 μ*l* を ECD—GC に注入し，ピーク高と濃度から検量線を作成する。通常，この検量線は原点をとおり，最高 0.1 μg/m*l* 程度まで直線にのる。

この検量線を用いて，試験溶液 5 μ*l* を注入したときのピーク高から，その試験液中のメチル水銀濃度を求め，さらに，試料中のメチル水銀含有量を算出する。

実験結果および考察

1. 定量法の検討 (1) アルカリ分解——アルカリ分解の目的は試料中の蛋白質，脂質等を分解して，メチル水銀が抽出され易い状態にするためと，抽出時のエマルジョンの形成を無くすためである。そこで，このアルカリ分解に要する水酸化カリウム・エタノール溶液の濃度および加熱時間について検討した。

すなわち，試料としてメカジキの食肉部 5 g を用い，これに 0.5 N，1 N，2 N，3 N の水酸化カリウム・エタノール溶液10 m*l* をそれぞれ加え水浴上で加熱し，固型物が消失し均一な溶液となるまでの時間を測定し，その結果を Fig. 1 に示した。ここにみられるように，0.5 N では180分以上，1 N では70分を要し，2 N 以上では30分以内に完全に液化することが認められた。そこで，0.5 N のアルカリ濃度は除外して，1 N以上の濃度条件において，時間を変えて加熱し，魚肉中のメチル水銀の回収率を測定することによって，

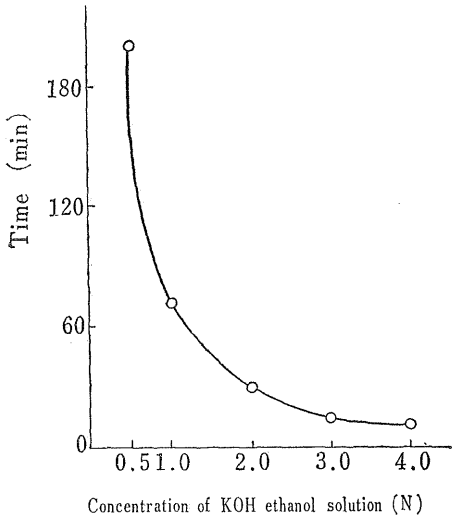


Fig. 1 Time required for digestion of fish with KOH ethanol solution

アルカリ分解操作の至適条件を求めることにした。

メカジキの食肉部 5 g に 1 N, 2 N, 3 N の水酸化カリウムエ・タノール溶液 10 m*l* を加え, 0—2 時間の範囲で, それぞれ時間を変えて加熱し, 3.(1)に示した方法に従って, メチル水銀を定量し, 回収率を求め, その結果を Fig. 2 に示した。1 N の場合は, 加熱時間が30分未満であると, 最初のクロロホルム抽出の段階で, エマルジョンが形成し, 分析不能もしくは著しく困難であったが, 60分以上加熱すれば, エマルジョンの形成がなく, メチル水銀の回収率も一定となることが認められた。また, 2 N の場合は30分以上, 3 Nの場合は20分以上加熱したとき, 回収率が一定となった。この結果は, Fig. 1 における固型物が消失し, 均一溶液になるのに要する時間とよく一致しており, アルカリ分解の有効性を示すものであると考えられる。

以上の結果から, アルカリ分解に用いる水酸化カリウム・エタノール溶液は 2 N とし, 加熱時間は30分とした。

(2) メチル水銀の抽出条件——動物組織中のメチル水銀は, 含硫アミノ酸の S H 基と結合して存在するといわれているが, アルカリ分解の過程では, 水酸化物 (CH_3HgOH) または, メルカプタイド (CH_3HgSR) を生成していると考えられる[3]。そして, 生成したこれらのメチル水銀化合物は塩酸で容易に塩化メチル水銀に変わるので, 溶媒抽出が可能になると考えられる。以下に抽出時における塩酸濃度および抽出溶媒について検討した。

1 %システィン溶液 (塩酸 L—システィン1.0 g, 酢酸ナトリウム 0.8 g を水 100 m*l* に溶解したもの) 5 m*l* に塩化メチル水銀 5 μg を添加し, 2 N—水酸化カリウム・エタノール溶液10 m*l* を加え, 還流冷却器を付して, 水浴上で30分加熱した。冷後, 1 N —塩酸 20 m*l* で中和して試料溶液とし, これらの試料溶液に適量の塩酸を加えて, 0.2 Nから4 Nまでの濃度を異にする塩酸を含む液に調整してから, ベンゼン, *n*-ヘキ

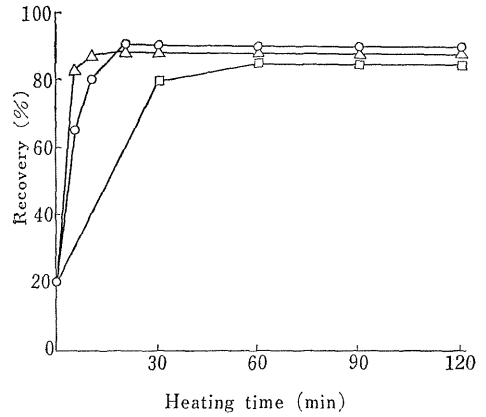


Fig. 2 Eeffect of heating time on recovery of methylmercurey

□——□ 1N—KOH ethanol solution
○——○ 2N—KOH ethanol solution
△——△ 3N—KOH ethanol solution

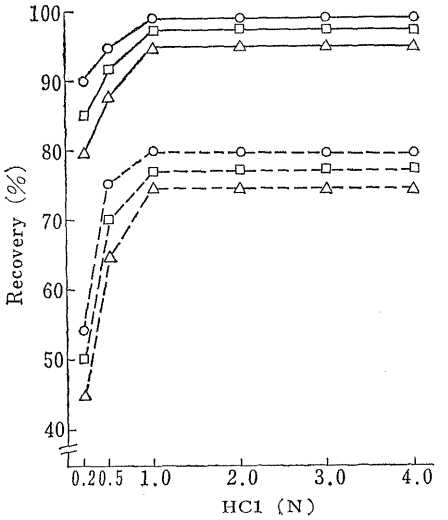


Fig. 3 Effects of HCl and solvent on extraction of methylmercuric chloride

○---○Benzene 30ml　○——○Benzene 30ml× 3
□---□Chloroform 30ml □——□Chloroform 30ml×3
△---△n—Hexane 30ml △——△n—Hexane 30ml×3

サン，クロロホルムの3種の溶媒を用いて，メチル水銀を抽出した。ベンゼン，*n*-ヘキサンの場合は抽出液を直接 ECD—GC の試料に供したが，クロロホルムの場合はそのままでは ECD—GC に注入することができないので，システイン・アセテート溶液に転溶後多量のベンゼンで再抽出し，ECD—GC の試料に供した。この結果を Fig.3 に示す。

いずれの溶媒の場合も，塩酸濃度1N以上で，塩化メチル水銀の回収率が一定となり，30 m*l* 1回抽出の場合，ベンゼンでは80%，クロロホルムでは77%，*n*-ヘキサンでは75%であった。30 m*l* ずつ3回，計90 m*l* で抽出した場合，ベンゼンでは99%，クロロホルムでは97%，*n*-ヘキサンでは95%とほぼ定量的な回収率が得られた。従って，初めに添加した塩化メチル水銀は，アルカリ分解，中和および塩酸による酸性化の過程では，全く損失のないことがわかった。以上のことから，塩化メチル水銀の抽出条件として，本法では，塩酸濃度を1.5 N とすることにした。また，抽出溶媒としては，実際の試料を行なった場合の操作上の利点を考慮して，クロロホルムを採用し，3回抽出を行なうことにした。

(3) システイン・アセテート溶液について——システイン・アセテート溶液で逆抽出した塩化メチル水銀をベンゼンで再抽出する場合の抽出率について検討した。

衛生試験法に従って調製したシステイン・アセテート溶液（塩酸L—システイン 1.0 g，酢酸ナトリウム 0.8 g，硫酸ナトリウム12.5 gを水に溶解して，100 m*l* としたもの）10 m*l* に塩化メチル水銀 1 μg を添加し，種々の濃度の塩酸酸性としてから，それぞれベンゼン 20 m*l* で抽出した。また硫酸ナトリウムのかわりに塩化ナトリウムを用いて調製したシステイン・アセテート溶液について，同様の実験を行ない抽出率を比較し，Table Ⅰ に示した。塩析剤として，硫酸ナトリウムを使用した場合，ベンゼンによる1回抽出では，最高93%程度の抽出率であったが，塩化ナトリウムを使用した場合は，97%程度まで上昇することが認められた。従って本法では，システイン・アセテート溶液の組成は塩酸L—システイン1.0 g，酢酸ナトリウム0.8 g，塩化ナトリウム12.5 gとし，これらを水に溶解して100 m*l* としたものを使用することにした。また，塩化メチル水銀をベンゼンで抽出するときの塩酸濃度は，Table Ⅰより，2 N が最適であることがわかったので，このシステイン・アセテート溶液10 m*l* に対して，塩酸 2 m*l* を加えることにした。

Table Ⅰ Effects of HCl and salts on extraction of methylmercuric chloride from cysteine acetate solution

Variety of salt (Wt. %)	Concentration of HCl(N)					
	0	1	2	3	4	5
Na_2SO_4 (12.5)	0	76.7	91.5	92.7	91.2	87.7
NaCl (12.5)	0	95.8	96.9	94.5	92.1	90.9
NaCl (20.0)	0	94.9	96.8	93.8	92.6	90.5

Methylmercuric chloride added : 1 μg
Cysteine acetate solution : 10 m*l*
Extraction solvent : Benzene 20 m*l*

次にこのシステイン・アセテート溶液によるクロロホルム中の塩化メチル水銀の逆抽出について，検討した。

すなわち，クロロホルム 100 m*l* に塩化メチル水銀 1μg，5μgおよび10 μgを添加し，システイン・アセテート溶液 10m*l*または 20m*l*を加え，5分間振トウ後，システイン・アセテート溶液層10 m *l*採取し，塩酸 2 m*l* を加え，ベンゼン 20 m*l* ずつで抽出を2回繰り返すことによって，システイン・アセテート溶液中の塩化メチル水銀を完全に回収したところ，ほぼ100%の回収率が得られた。(Table Ⅱ)

従って，システイン・アセテート溶液による塩化メチル水銀の逆抽出は，10 m*l* 以上で1回行なえば十分であることがわかった。

Table Ⅱ Extraction of methylmercuric chloride in chloroform with cysteine acetate solution

Cysteine acetate solution (m*l*)	Methylmercuric chloride		
	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)
10	1	0.98	98.0
20	1	0.99	99.0
10	5	4.93	98.6
20	5	4.92	98.4
10	10	9.90	99.0
20	10	9.87	98.7

Volume of chloroform : 100 m*l*

(4) システイン・アセテート溶液層の洗浄——本法では，試料中のメチル水銀の抽出に，ECD—GC に対して感度の高いクロロホルムを使用するので，最終試験溶液にクロロホルムが混入するのを防がなければならない。もし微量でも混入すれば，ガスクロマトグラムのベースラインが上昇して，塩化メチル水銀の定量を妨害する。そこで，クロロホルム溶液から塩化メ

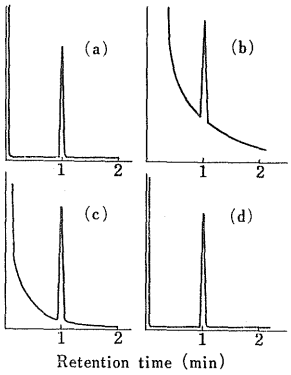


Fig. 4 Influence of chloroform residue in cysteine solution layer on the peaks of methylmercuric chloride
(a) Standard solution of methylmercuric chloride
(b) Without washing
(c) Washing cysteine solution layer with n-hexane (20ml×1)
(d) Washing cysteine solution layer with n-hexane (20ml×2)

チル水銀を逆抽出した後，システイン・アセテート溶液層を*n*-ヘキサンで洗浄することにした。洗浄した場合と，しなかった場合の最終試験溶液のガスクロマトグラムを Fig. 4 に示したが，20 m*l* ずつで2回洗浄すれば，妨害となるクロロホルムを完全に除去できることがわかった。その際，洗浄に用いた*n*-ヘキサン層への塩化メチル水銀の移行は，全くないことが ECD—GC により確認された。

2. 添加回収率

本法と直接抽出法によって，数種の魚肉中のメチル水銀を定量し，また別に，一定量の塩化メチル水銀を添加した場合の回収率を，Table Ⅲ に示した。

直接抽出法は最初のベンゼン抽出とシステイン溶液による逆抽出の段階で，エマルジョンを形成した。前者のエマルジョンは3,000 rpm，10分程度の遠心分離で容易に分離し，操作上それ程大きな支障とはならなかったが，後者のエルマジョンの程度は魚種によって著しく相異し，4,000 rpm，15分程度の遠心操作では分離しきらない場合があり，操作上の大きな問題点となった。今回の試料では，マグロ，イワシ，アジ等に

Table Ⅲ Comparison between the recovery of methylmercuric chloride by Direct Extraction Method and Alkaline Digestion Method

Sample			Method[a]	Methylmercuric chloride			Recovery[d]		
Name	No	wt. (g)		Present($\bar{x}$) (μg)	Added (μg)	Found($\bar{x}$) (μg)	Average($\bar{x}$) (%)	SD[b]	RSD[c]
Albacore	5	5	AD	3.40	5	7.74	86.8	1.11	1.28
			DE	3.08	5	6.94	77.2	1.33	1.72
Swordfish	5	5	AD	4.13	5	8.54	88.2	1.35	1.53
			DE	3.88	5	8.11	84.6	1.99	2.35
Bonito	5	5	AD	1.11	5	5.47	87.3	1.36	1.56
			DE	0.87	5	4.83	79.2	1.34	1.64
Yellowtail	5	5	AD	0.66	5	4.92	85.3	0.93	1.09
			DE	0.23	5	4.42	77.9	1.91	2.45
Menuke	5	5	AD	3.08	5	7.36	85.6	0.98	1.14
			DE	2.81	5	6.19	67.7	1.54	2.28
Sardine	5	5	AD	0.10	1	0.95	85.3	0.94	1.10
			DE	0.60	1	0.74	67.7	0.48	0.70
Mackrel pike	5	5	AD	0.31	1	1.17	86.3	0.47	0.54
			DE	0.22	1	1.12	89.7	0.48	0.54
Horse mackel	5	5	AD	0.23	1	1.09	84.7	0.48	0.57
			DE	0.17	1	0.89	72.0	0.82	1.14
Flying-fish	5	5	AD	0.20	1	1.06	86.3	0.47	0.54
			DE	0.11	1	0.90	78.7	0.48	0.61

a) AD : Alkaline Digestion DE : Direct Extraction
b) Standard Deviation
c) Relative Standard Deviation
d) The average recovery and the standard deviation
AD : 86.2±1.1(%) DE : 77.2±5.9(%)

強固なエマルジョンを形成する傾向がみられ，それらについては遠心操作後，できるだけ多量のシステイン・アセテート溶液層を採取して操作を続行したが，試料の差異による回収率のバラツキが大きく（平均回収率77.2%，標準偏差5.9%），各試料毎に回収実験を併行する必要性が認められた。

本法の場合は，クロロホルムによる抽出過程で，界面に若干の浮遊物を生成したが，分液操作上は支障とならなかった。またシステイン・アセテート溶液で塩化メチル水銀を逆抽出するときに，わずかにエマルジョンを形成する試料もあったが，次の*n*-ヘキサン洗浄の段階で消失し，遠心操作はほとんど不要であったため，全工程にわたって，かなり円滑に操作することができた。本法による回収率は試料の種類に関係なく，平均86.2%で，その時の標準偏差は1.1%と極めて小さく，良好な結果となった。

3. 魚肉から抽出した塩化メチル水銀の確認について

アルカリ分解を行なってもメチル水銀は分解しないことを立証する意味から，本法によって魚肉から抽出した塩化メチル水銀を，次のようにして確認した。

(1) 最終試験溶液を濃縮し，GC—MSに注入して，ガスクロマトグラム上の塩化メチル水銀のピーク位置のマススペクトルを測定したところ，親イオン CH_3HgCl^+ に基因するピークが M/e 248—252 に，また CH_3Hg^+ および Hg^+ に基因するピークが，それぞれ M/e 213—219，198—204 に出現した。これらのピーク群は，いずれも水銀化合物に特有な7本の同位体ピークから構成されており，標準溶液について測定したスペクトルと良く一致した。(Fig. 5)

(2) 次に，ECD—GC クロマトグラム上の塩化メチル水銀のピークに，同じ保持時間を有する他の成分が

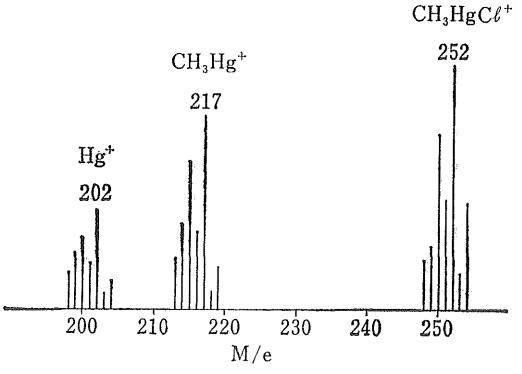


Fig. 5 Mass spectrum of methylmercuric chloride extracted from fish

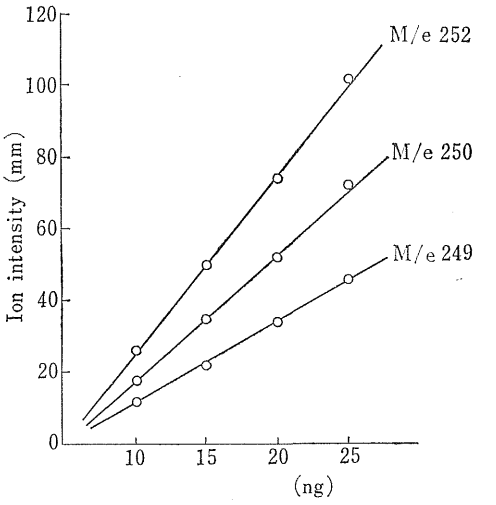


Fig. 6 Calibration curves of methylmercuric chloride

重なっていないことを確認するために，先の濃縮液中の塩化メチル水銀を ECD—GC 法とマスフラグメント（MF）法によって定量し，分析値を比較した。(Table Ⅳ)

MF 法の場合は，親イオン（CH_3HgCl^+）の同位体ピークのうち，M/e 249,250,252の3ピークについてフラグメントグラムを測定した。定量に際しては，塩化メチル水銀標準溶液から作成した検量線を使用した。(Fig. 6)

Table Ⅳより，濃縮液中の塩化メチル水銀の分析値は，ECD—GC 法と MF 法でよく一致していることが認められた。

Table Ⅳ Determination values of extracted methylmeruric chloride by massfragmentography and ECD-gaschromatography (ppm)

ECD—GC		6.73
MF	M／e 252	6.80
	M／e 250	7.00
	M／e 249	6.77

(3) 次に，M/e 249,250,252の相対イオン強度を計算し，Table Ⅴに示した。濃縮試料液と標準溶液の相対イオン強度は，実験誤差の範囲内で一致し，さらにそれらは水銀の同位体存在比（理論値）と一致した。

以上の3点から，ECD—GC クロマトグラム上のピークは塩化メチル水銀であり，他の不純成分は全く重なっていないことが確認された。

Table V Relative ion intensity of each fragment

	M/e		
	252	250	249
Standard Methylmercuric chloride	2.2	1.5	1.0
Extracted Methylmercuric chloride	2.1	1.6	1.0
Natural abundance of Mercury	(2.2)	(1.6)	(1.0)

総括

1. 魚肉中のメチル水銀定量の前処理として，試料を 2N—水酸化カリウム・エタノール溶液で分解し，塩酸酸性としてからメチル水銀を抽出する方法を検討したところ，エマルジョンの形成がなく，迅速に操作することができた。

2. 数種の魚肉に添加したメチル水銀の回収率は86.2%とほぼ満足できる結果となった。またその時の標準偏差は1.1%で，魚種の相異による回収率のバラツキは極めて小さいことがわかった。

3. 本法によって，魚肉から抽出したメチル水銀はマススペクトルならびに親イオンのフラグメントグラムから同定することができた。

謝辞

本研究にあたって，御便宜を賜わった当所，松本茂理化学部長に深謝いたします。

〔附記〕本研究は日本分析化学会1973年夏季研究発表会で報告した。

文献

1) 日本薬学会編：衛生試験法注解，339—345 (1973)，金原出版

2) 田中克彦，島田武憲，福井昭三，菅野三郎：衛生化学，18，256—263 (1972)

3) Westöö G.: *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790—1800 (1967)

4) Westöö, G.: *Ibid*, 22, 2277—2280(1968)

5) Kamps, L. R. and Mcmahon, B.: *J. A. O. A. C.*, 55, (3), 590—595(1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 141 — 152, 1974

東京都における水銀汚染の実態について（第1報）

魚介類および水産加工品中の水銀含有量について

伊藤弘一* 竹内正博* 江波戸挙秀* 雨宮敬*
原田裕文* 戸谷哲也*

Survey of Pollution with Mercury in Tokyo (1)

Mercury Content of Marine Fish, Shellfish and Marine Products

KOICHI ITO*, MASAHIRO TAKEUCHI*, KIYOHIDE EBATO*, TAKASHI AMEMIYA*,
HIROFUMI HARADA* AND TETSUYA TOTANI*

The content of total mercury and methyl mercury in about 400 samples of fish, shellfish and marine product collected from Tokyo central market were determined for the purpose of investigating pollution with them.

The maximum amount of 1.10 ppm of total mercury and that of 0.97 ppm of methyl mercury in one of Menuke were found. The mean cotent of total mercury and methyl mercury in fishes was 0.16 ppm and 0.13 ppm respectively. Most of fishes and shellfishes contained less than 0.1 ppm of total mercury.

The mean ratio of methyl mercury to total mercury in all fishes was 82% in this reserch. It was shown that fishes caught inland sea or coastal sea contained almost as much amount of mercury as those caught in open sea. The level of mercury in marine fishes showed a tendency to increase in propotion to size of fish. Generally, deep-sea fishes had more amount of mercury than fishes of continental shelf.

The maximum amount of 0.51 ppm total mercury was found in one of Hanpen. The mean content of mercury of marine products ranged from 0.00 to 0.13 ppm with the exception of Hanpen in this reserch.

緒　言

水俣湾沿岸ならびに新潟県阿賀野川流域など特定地域に発生した有機水銀中毒事件[1-2]は，環境よりメチル水銀を濃縮した魚介類の多食に由来するものとして著明な事件である．ついで1973年5月，熊本大学の10年後の水俣病研究班の報告書第2年度分により，有明海の一部水域に「第三水俣病」の存在の可能性が指摘されたことにより，国は全国の各海域を広範囲にわたり，水銀汚染の実態について調査を行なった．その結果，数海域の汚染が明らかにされ[3]魚介類多食民族であるわれわれに大きな衝撃を与えた．そのため国は人の健康を守る立場から，FAO, WHO 合同食品添加物専門家委員会による水銀の暫定取り込み規制勧告および水俣病発症における魚介類からの水銀の推定摂取量等[4]により，魚介類に含まれる水銀量に暫定規制値を総水銀（以下 T—Hg)0.4 ppm，メチル水銀（以下 Me—Hg)0.3 ppm と定めた[5]．なおメチル水銀の値は水銀としての値で，本調査におけるメチル水銀量もすべてこの値に換算してある．そこで東京都は，市場に出回わっている介魚類の水銀による汚染度を調査する目的で，築地市場に陸揚げされた魚介類について水銀含有量を測定した．

今回はこの調査の48年度分およびこの期間に東京都

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

内で入手した二次製品である加工品中の総水銀およびメチル水銀の含有量を報告する．

実験方法

1. 試　薬

特にことわりのない限り，和光純薬 K. K. の試薬特級を用いた．

水銀標準液：塩化第二水銀 ($HgCl_2$) 135.40 mg をとり，少量のエタノールに溶解したのち，1 N 硝酸で 100 m*l* とする．この液は Hg として 1 m*l* 中 1,000 μg を含み，これを標準原液とする．この液をさらに 0.5 N 硝酸で希釈し，1 m*l* 中 0.10 μg の Hg を含有する液を調製し，標準溶液とする．

2 N 水酸化カリウム・エタノール溶液：水酸化カリウム (KOH)112.22 g を蒸留水 100 m*l* に溶解し，エタノールを加えて 1,000 m*l* とする．

1 % L—システィン溶液：L—システィン塩酸塩 ($HSCH_2CH(NH_2)COOH \cdot HCl \cdot H_2O$)1.0 g，酢酸ナトリウム ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)0.775 g，無水硫酸ナトリウム ($Na_2SO_4$)12.5 g を蒸留水に溶かし 100 m*l* とする．

塩化メチル水銀標準溶液：塩化メチル水銀 (CH_3HgCl)（純度99.99%）0.10 mg をベンゼン 100 m*l* に溶解し標準原液とする．この液は 1 m*l* 中にメチル水銀 1,000 μg を含む．この原液をベンゼンで希釈し，1 m*l* 中 0.10 μg を含有する溶液を調製し，標準溶液とする．

2. 装　置

島津水銀専用分析計 UV—201 型

島津ガスクロマトグラフ GC—5 AP_3EF 型 (^3H 線源使用 ECD 付)

3. 試　料

昭和48年 6 月から昭和49年 4 月までの11ヵ月の間に東京築地市場に陸揚げされた魚介類63種 346 検体，およびこの期間に東京都内で入手した鯨肉 3 種11検体，水産加工品 8 種44検体を分析検体とした．

4. 試 験 法

今回行なった測定法は，厚生省通達[5]に従った．

A. 試料の調整

A—1　魚介類

以下に掲げる魚介類の分類に従いサンプリングを行ない，これを検体とし，ブレンダーで均一化したものを分析試料とする．

1) 小型魚類（体長 20 cm 未満のもの）

無作為に10匹を選び，それぞれの可食部から約 30 g ずつをとり，混和した約 300 g を 1 検体とする．1 匹の可食部が 30 g 未満のものは可食部の総量 300 g に相当する匹数をもって一検体とする．貝類のサンプリングもこれに準ずる．

2) 中型魚類（体長20 cm 以上 60 cm 未満のもの）

無作為に 5 匹とり，それぞれの可食部から約60 g ずつをとって混和した約 300 g をもって一検体とする．

3) 大型魚類（体長 60 cm 以上のもの）

無作為に 3 匹とり，それぞれの可食部から約 100 g ずつをとって混和した約 300 g をもって一検体とする．

A—2　鯨　肉

検体をブレンダーにて均一化したものを試料とする．

A—3　水産加工品

検体をそのまま試料とする．

B　試験溶液の調整

B—1　総 水 銀

均一にした試料5.0 g を 500 m*l* 分解フラスコにとり硫酸 10 m*l* および硝酸 20 m*l* を加え，還流冷却器をつけて静かに約30分間加熱後水冷したのち過マンガン酸カリウム 1 g を加え再び加熱する．過マンガン酸カリウムの紫色が消失したならば，冷却後再び過マンガン酸カリウム 2 g を加えて加熱する．この操作を過マンガン酸カリウムの紫色が消失しなくなるまで行ない，冷後過剰の過マンガン酸カリウムの紫色が消えるまで20%塩酸ヒドロキシルアミン溶液を添加し，水を加え 100 m*l* とし，これを総水銀の試験溶液とする．

B—2　メチル水銀

試料10.0 g をブレンダーカップにとり，水55 m*l* のうち適量を加え 3 分間ホモジナイズし，分液ロートに残りの水を用いて試料を移す．つぎに濃塩酸14 m*l*，塩化ナトリウム 10 g を加え混合したのち，ベンゼン 70 m*l* を加え，振とう機で 5 分間振とう抽出する．内容物を250 m*l* 遠沈管に移し，2,000 rpm で10分間遠心分離後，そのベンゼン層50 m*l* をとり，分液ロートに移し，システィン溶液 6 m*l* を加え，振とう機で再び 2 分間振とう抽出する．10分間静置後，35 m*l* の遠沈管に移し，3,000 rpm でさらに 20 分間遠心分離する．水層 2 m*l* を分液ロートにとり，6 N 塩酸1.2 m*l*，ベンゼン 4 m*l* を加え，2 分間振とう機で振とう後10分間静置する．水層をすて無水硫酸ナトリウム少量を加えて脱水し，これをメチル水銀の試験溶液とする．

しかし，本法においてベンゼン抽出およびシスティン抽出時に強固なエマルジョンの形成がみられ，分析が困難となった試料があったため，それらのものに対

しては，ＦＤＡ法を若干改良したアルリカ分解による方法を適用して分析を行なった．すなわち均一化した試料 5.0 g に 2N 水酸化カリウム・エタノール溶液 10ml を加え，還流冷却しながら沸騰水浴上で30分間加熱分解する．分解後 1N 塩酸 20 ml にて中和し，1％硫酸銅溶液5 ml，濃塩酸 5 ml を加えて，塩酸酸性とした後，クロロホルム30 ml ずつを用いて3回抽出を行なう．以下前記のシステイン抽出以後の操作を準用する．なおこのアルカリ分解による方法については別に報告する[6]．

C 定量操作

C—1 総水銀

試験溶液20 ml をとり，還元剤として20％塩化第一スズ溶液 2.5 ml を使用して，還元気化法により水銀蒸気を発生させ，フレームレス原子吸光法により吸収波長 253.7 nm を使用し吸光度を測定する．別に水銀標準溶液を 0.50 ml から 2.00 ml までの範囲でとり同様に操作して作成した検量線より定量を行なう．

C—2 メチル水銀

試験溶液 5 μl をとり，ガスクロマトグラフィーを行なってピーク波高を測定し，別に塩化メチル水銀標準液をベンゼンで希釈し，0.02 ppm から0.10 ppm の範囲で調製した液を同様に操作して作成した検量線より定量を行なう．

ガスクロマトグラフィーの測定条件を次に示す．

装　置：島津ガスクロマトグラフ装置
GC—5 AP$_3$FE 型

カラム：10％DEGS on chromosorb W (AW—DMCS) 80−120 mesh, glass on clumn, 3 mm φ×1.5 m

温　度：カラム：160°
注入口：180°
検出器：200°

検出器：^{3}H (300 mci)

キャリヤーガス：N_2 70ml/min

結果および考察

1. 添加回収率の検討

今回測定した総水銀の回収率について検討した結果を Tabl. 1 に示す．回収実験に用いた試料はメヌケ 5.0 g およびサンマ 5.0 g とし，それぞれに Hg として 2.0 μg および 0.2 μg を添加して，各試料について5回ずつくりかえし実験を行なった．平均回収率はサンマ95.0％，メヌケ92.0％で変動係数は両者とも約２％と比較的良好な成績であった．

メチル水銀の分析法には Westöö[7~8]，Kamps[9] らのいわゆるＦＤＡ法が一般に用いられている．今回はＦＤＡ法に準じた厚生省通達の方法（以下直接抽出法とする）および，ＦＤＡ法に若干の改良を加えたアルカリ分解による方法（以下アルカリ分解法とする）で分析を行なったが，Table. 2 には前記二法の回収率ならびに分析精度を示す．メチル水銀の回収実験には，カツオ，ハマチ，メヌケ，イワシ，サンマ，アジおよびトビウオの計７種を用い，直接抽出法およびアルカリ分解法により実験を行なった．試料はそれぞれ 5.0 g をとり，メチル水銀の添加量をカツオ，ハマチおよびメヌケは5.0 μg，イワシ，サンマ，アジおよびトビウオは1.0 μgとした．回収実験は各魚種ごとに直接抽出法およびアルカリ分解法を５回ずつ行なった．アルカリ分解法による７試料の平均回収率は85.8％で変動係数は0.9％であった．一方直接抽出法では，平均回収率76.1％で変動係数は９％であった．この結果アルカリ分解法は直接抽出法に比較して，回収率で10％変動率で10倍程度分析精度が良い結果が得られた．従って前者は後者に比し，魚種および水銀含有量に比較的左右されずに一定の回収率で分析が行なえると思われる．なお本報における総水銀およびメチル水銀の分

Table 1, Recovery of mercury added to muscle tissue of fish.

Sample Name	Sample Size (g)	Mercuy			Recovery of added Mercury		
		Peesent ($\bar{X}$) (μg)*	Added (μg)	Found ($\bar{X}$) (μg)*	Mean ($\bar{X}$) (%)*	S D	R S D (%)
Mackerel-Pike	5	0.199	0.200	0.379	95.0	1.79	1.88
Menuke	5	2.075	2.000	3.750	92.0	1.63	1.77

S D : Standard deviation
R S D : Relative standard deviation
* : The datum represents mean Value of five tests.

Table 3. Mercury content of muscle in fishes and shellfishes.

Sample name	N	Total Hg		Methyl Hg (as Hg)		Me-Hg/T-Hg (%)	
		min may	mean	min max	mean	min max	mean
1. Horse-mackerel	23	0.03−0.12	0.05	0.01−0.09	0.04	50.0−100	66.6
2. Akauo[1]	4	0.08−0.34	0.15	0.07−0.28	0.13	82.3−100	90.0
3. Conger eel	3	0.04−0.08	0.06	0.02−0.07	0.04	40.0−87.5	59.2
4. Angler	4	0.08−0.28	0.14	0.07−0.18	0.11	64.3−87.5	80.7
5. Isaki[2]	8	0.04−0.12	0.07	0.03−0.09	0.05	75.0−85.7	76.5
6. Isimochi	2	0.08−0.27	0.18	0.06−0.13	0.10	48.1−75.0	61.6
7. Sardine	15	0.01−0.05	0.03	0.01−0.03	0.02	33.3−100	58.2
8. Umazurahagi[4]	1	0.02	0.02	0.02	0.02	100	100
9. Umitanago[5]	1	0.06	0.06	0.05	0.05	83.3	83.3
10. Kasago[6]	3	0.09−0.30	0.20	0.09−0.28	0.16	47.6−100	80.3
11. Bonit	1	0.21	0.21	0.19	0.19	90.5	90.5
12. Kawahagi[7]	3	0.04−0.06	0.05	0.01−0.04	0.03	25.0−80.0	51.7
13. Plaice	14	0.01−0.14	0.07	0.01−0.12	0.05	50.0−100	78.0
14. Barracuda	9	0.02−0.12	0.07	0.02−0.09	0.05	50.0−100	76.5
15. Sillago	1	0.08	0.08	0.06	0.06	75.0	75.0
16. Koichi[8]	1	0.11	0.11	0.07	0.07	63.6	63.6
17. Konoshiro[9]	10	0.02−0.06	0.04	0.01−0.05	0.03	25.0−83.3	60.3
18. Kohada[10]	6	0.01−0.02	0.02	0.01−0.02	0.01	50.0−100	66.7
19. Kinkidai[11]	6	0.12−0.25	0.19	0.05−0.21	0.16	41.7−87.5	77.6
20. Kinmedai[12]	6	0.60−0.83	0.74	0.49−0.80	0.62	70.1−100	84.7
21. Medai[13]	5	0.06−0.18	0.13	0.05−0.17	0.12	83.3−94.4	90.9
22. Kintokidai[14]	1	0.17	0.17	0.13	0.13	76.5	76.5
23. Chidai[15]	1	0.24	0.24	0.17	0.17	70.8	70.8
24. Mackerel	18	0.04−0.16	0.11	0.04−0.16	0.09	75.0−100	83.2
25. Mackerel pike	13	0.05−0.08	0.07	0.05−0.07	0.06	75.0−100	87.6
26. Shiira[16]	1	0.33	0.33	0.21	0.21	63.6	63.6
27. Sawara[17]	2	0.03−0.14	0.09	0.02−0.14	0.08	66.7−100	83.4
28. Sagochi[18]	7	0.02−0.06	0.03	0.01−0.04	0.02	33.3−100	71.4
29. Halfbeak	2	0.03	0.03	0.01	0.01	33.3	33.3
30. Suketodara[19]	10	0.04−0.14	0.08	0.02−0.12	0.05	42.9−90.9	67.1
31. Gindara[20]	1	0.22	0.52	0.52	0.52	76.9	76.9
32. Codfish	19	0.08−0.73	0.37	0.07−0.65	0.32	69.2−98.1	85.7
33. Madara[21]	3	0.06−0.14	0.10	0.05−0.09	0.06	55.6−83.3	67.6
34. Takabe[22]	1	0.16	0.16	0.14	0.14	87.5	87.5
35. Hair-tail	2	0.06−0.10	0.08	0.06	0.06	60.0−100	80.0
36. Flying-fish	2	0.05−0.07	0.06	0.03−0.04	0.04	42.9−80.0	61.5
37. Hagatsuo[23]	1	0.12	0.12	0.11	0.11	91.7	91.7
38. Hatahata[24]	2	0.06−0.10	0.08	0.03−0.08	0.06	50.0−80.0	65.0
39. Goby	1	0.06	0.06	0.02	0.02	33.3	33.3

Sample name	N	Total Hg			Methyl Hg (as Hg)			Me-Hg/T-Hg (%)		
		min	max	mean	min	max	mean	min	max	mean
40. Sea eel	5	0.16	0.90	0.37	0.13	0.57	0.28	63.3	100	80.8
41. Flounder	5	0.01	0.08	0.06	N.D.	0.05	0.03	50.0	80.0	63.8
42. Perch	14	0.16	0.78	0.56	0.16	0.66	0.47	77.1	100	83.8
43. Fukko[25]	4	0.09	0.29	0.15	0.08	0.24	0.12	72.7	88.9	79.3
44. Hokke	4	0.08	0.22	0.12	0.07	0.21	0.11	87.5	100	93.3
45. Gurnard	2	0.04	0.07	0.06	0.02		0.02	28.6	50	39.3
46. Gery mullet	4	0.02		0.02	N. D.		N. D.		50	···
47. Mebaru[26]	16	0.02	0.20	0.10	N.D.	0.02	0.08	40.0	100	86.9
48. Managatsuo[27]	1	0.06		0.06	0.02		0.02	33.3		33.3
49. Mutsu[28]	2	0.18	0.53	0.36	0.14	0.50	0.32	77.8	94.3	86.1
50. Menuke[29]	9	0.32	1.10	0.79	0.22	0.97	0.62	60.0	98.4	79.0
51. Inada[30]	5	0.04	0.12	0.08	0.04	0.12	0.07	66.7	100	85.8
52. Hamachi[31]	5	0.07	0.18	0.12	0.06	0.18	0.09	37.5	100	83.1
53. Cuttlefish	23	0.03	0.16	0.06	0.11	0.14	0.04	33.3	100	67.5
54. Octopus	5	0.02	0.03	0.02	0.01	0.04	0.02	50.0	66.7	75.0
55. Shortneckedclam	2	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.02	50.0	100	58.4
56. Bloody clam	1	0.02		0.02	0.01		0.01	50.0		50.0
57. Oyster	20	0.01	0.04	0.01	N. D.		N. D.	···		···
58. Kegani[32]	1	0.04		0.04	0.04		0.04	100		100
59. Red crab	2	0.48	0.51	0.50	0.39	0.42	0.41	81.3	82.4	81.9

Subject

1) *Sebastes bramenuke*
2) *Parapistipom trilineatum*
3) *Argyrosomus argemtatus*
4) *Amanses modestus*
5) *Ditrema temmincki*
6) *Sebastiscus marmoratus*
7) *Stephanolepis cirrhiber*
8) *Nibea mitsukurii*
9) *Clupanodon punctatus*
10) Young konoshiro
11) A species of sea bream
12) *Beryx splendens*
13) *Mupus japonicus*
14) A species of Sea bream
15) *Euynnis japonicus*
16) *Coryphaena hippurus*
17) *Scomberomorus niphonius*
18) Young Sawara
19) *Theragra chalcogramma*
20) A species of Codfish
21) A species of Codfish
22) *Labrocoglossa argentiventris*
23) *Sarda orientalis*
24) *Arctoscopus japonicus*
25) Middle sized Perch
26) *Sebastes inermis*
27) *Pampus argentesus*
28) *Scombrops boops*
29) *Seqastes matsubarai*
30) Middle sized Yellow tail
31) Middle sized Yollow tail
32) *Erimacrus isembekii*

Table 2 Recovery of methyl mercury added to muscle tissue of fish by Alkaline Digestion Method and Dieect Extraction Method.

Sample Name	Method	Me-Hg			Recovery of added Me-Hg		
		Present ($\bar{X}$) (μg)*	Added (μg)	Found ($\bar{X}$)(μg)*	Mean ($\bar{X}$) (%)*	S D	R S D (%)
Bonito	A. D a)	1.11	5.00	5.47	87.27	1.36	1.56
	D. E b)	0.87	5.00	4.83	79.20	1.34	1.64
Yellowtail	A. D	0.66	5.00	4.92	85.27	0.93	1.09
	D. E	0.53	5.00	4.42	77.87	1.91	2.45
Menuke	A. D	3.08	5.00	7.36	85.60	0.98	1.14
	D. E	2.81	5.00	6.19	67.67	1.54	2.28
Sardine	A. D	0.10	1.00	0.95	85.33	0.94	1.10
	D. E	0.06	1.00	0.74	67.67	0.48	0.70
Mackerel-Pike	A. D	0.31	1.00	1.17	86.33	0.47	0.54
	A. E	0.22	1.00	1.12	89.67	0.48	0.54
Horse-mackerel	A. D	0.24	1.00	1.09	84.67	0.48	0.57
	D. E	0.17	1.00	0.89	72.00	0.82	1.14
Flying-fish	A. D	0.20	1.00	1.06	86.33	0.47	0.54
	A. E	0.11	1.00	0.90	78.67	0.48	0.61

S D : Standard deviation
R S D : Relative standard deviation.
* : The datum represents mean value of five tests.
a) : Alkaline Digestion Method
b) : Direct Extraction Method
Each amount of test samples is five grams.

析値は，分析に用いたそれぞれの方法の回収率で補正がしてある．

2. 魚介類

A 魚介類の総水銀およびメチル水銀の含有量

今回調査対象とした検体は一般食用魚介類とした．調査対象とした魚種54種のうちわけは内湾沿岸魚58%で外洋回遊魚42%であった．また中層および深海に生息する魚は全魚種の13%をしめていた．そして魚体の大きさによるクラス分けでは，体長20 cm 未満の小形魚が13%，20 cm 以上 60 cm 未満の中形魚が44%および60 cm 以上の大形魚が43%であった．その他貝類3種類およびカニ類を2種類調査した．今回の調査結果を Table 3 に示す．試料はすべて可食部としたが，全試料より水銀およびメチル水銀が検出された．総水銀において最高値を示した検体はメヌケで，1.10 ppm を示し，平均値でも0.79 ppm と最高であった．これについでキンメダイの 0.83 ppm，平均値 0.947 ppm およびスズキの0.78 ppm，平均値0.56 ppm と平均値において魚介類の暫定規制値である 0.4 ppmを上まわっていた．またタラ，ギンダラおよびムツの検体のなかより，0.73 ppm，0.52 ppm および 0.53 ppm とそれぞれ規制値を上まわるものが検出された．次にメチル水銀においても最高値は同じくメヌケで 0.97 ppm を検出し，平均値も0.62 ppm を示した．そして上記の魚種はそれぞれ暫定規制値0.3 ppm をこえていた．しかしながらタラおよびムツの平均値は，総水銀の基準は上まわっていないが，メチル水銀の基準は上まわっていた．

今回調査した食用魚を総水銀含有量で5クラスに分けて Table 4 に示した．この表によると，規制値0.4 ppm 以上の平均値を持つ魚種は4種で，全魚種の7%であった．0.10 ppm 以下の魚種は28種で，52%を占めていた．しかしながらメチル水銀の規制値 0.3 ppm を超える魚種は6種で，全魚類の 11% であり，総水銀より高い比率を示した．また今回調査した魚種の約50%が0.1 ppm 以下で，約80%が0.20 ppm 未満であることにより，現在市場に出まわっている可食魚類の大半が0.20 ppm 以下のものと思われる．キンメ

Table 4. Classification of marrine fish accoding to meFcury content in fish

Range of Mean	Sample Name		
0 −0.10 ppm	1. Horse-mackerel	2. Conger eel	3. Isaki
	4. Sardine	5. Umazurahagi	6. Unitanago
	7. Kawahagi	8. Plaice	9. Baracuda
	10. Sillago	11. Konoshiro	12. Kohada
	13. Mackerel Pike	14. Sawara	15. Sagochi
	16. Halfbeak	17. Suketodara	18. Hair-tail
	19. Flying-fish	20. Hahata	21. Goby
	22. Flounder	23. Gurnard	24. Grey mullet
	25. Managatsuo	26. Inada	27. Cuttlefish
	28. Octopus		
0.10−0.20 ppm	1. Akauo	2. Angler	3. Ishimochi
	4. Koichi	5. Kinkidai	6. Medai
	7. Kintokidai	8. Mackerel	9. Madara
	10. Takabe	11. Hagatsuo	12. Fukko
	13. Hokke	14. Mebaru	15. Hamachi
0.20−0.30 ppm	1. Kasago	2. Bonit	3. Chidai
0.30−0.40 dpm	1. Shiira	2. Codfish*	3. Sea eel
	4. Mutsu*		
0.40− ppm	1. Kinmedai	2. Gindara	3. Perch
	4. Menuke		

*: The sample exceeded the regulative Value (0.3 ppm) of methyl mercury.

ダイ，メヌケおよびムツなどの深海魚，タラ類，スズキ，シイラおよびカツオ等の肉食魚の値は一般に大きく，アジ，イワシおよびコノシロなどの小形近海および沿岸魚では小さい値を示した．

B 総水銀およびメチル水銀のヒストグラム

今回調査した試料について総水銀およびメチル水銀の含有量のヒストグラムを Fig. 1 に示す．図の横軸には濃度をとり，縦軸に出現度数をとった．全試料数は321で，総水銀の平均値は 0.157 ppm でメチル水銀の平均値は0.125 ppm であった．両者共出現度数は低含有量側に集中し，高含有量側へ分布が続く形を示した．

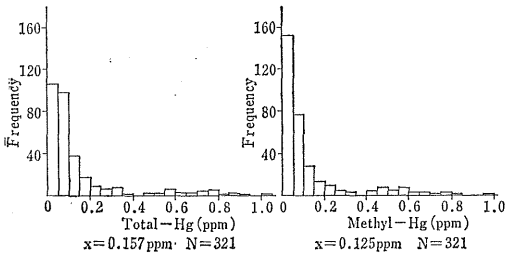


Fig. 1 Distribution of total mercury and methyl mercury content in marine fish.

C 総水銀量に対するメチル水銀量

今回調査した全魚種について総水銀含有量とメチル水銀含有量との相関図を Fie. 2 に示す．総水銀量とメチル水銀量の間には，相関係数 r=0.943 と強い相関関係がみられた．また回帰直線はほぼ原点を通り，勾配は 0.815 であった．総水銀に対するメチル水銀がしめる比率はとかく論議を呼んでいるところであるが

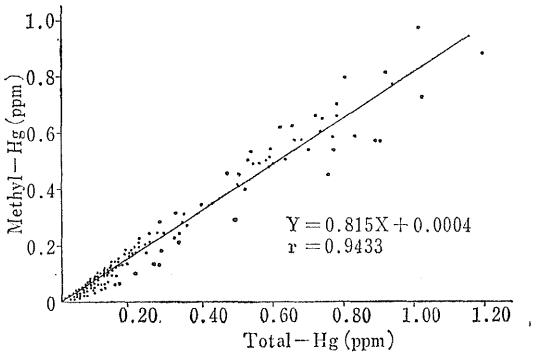


Fig. 2 Relationship of methylmercury content to totalmercury content in marine fish

Table 5. Variation of ratio of methyl mercury to total mercury in every range of total mercury contents.

T-Hg Ranges (ppm)		X≦0.08	0.08< X≦0.16	0.16< X≦0.32	0.32< X≦0.48	0.48< X≦0.64	0.64< X≦0.80	0.80<X
$\bar{X}$ (ppm)	Me-Hg	0.0344	0.0948	0.1874	0.3000	0.4793	0.6115	0.7142
	T-Hg	0.0482	0.1211	0.2311	0.3657	0.5580	0.7323	0.9428
Me-Hg/T-Hg (%)		71.36	78.28	81.09	82.03	85.89	83.50	75.75

Mean of totalmercury····· 0.157 ppm
Mean of ratio of methyl mercury to total mercury·····81.45%

Table 6. Content of total mercury and methyl mercury in fish on classification of living area of sea.

living place	ppm / Hg from	X≧0.4	0.4>X≧0.1	0.1>X	$\bar{X}$	Range
coastal sea	T—Hg	1 (3)	11 (33)	21 (64)	0.14	0.10—0.90
S.N.=33	Me—Hg	1 (3)	9 (27)	23 (70)	0.11	N.D.—0.66
open sea	T—Hg	3 (14)	11 (50)	8 (36)	0.19	0.01—1.10
S.N.=22	Me—Hg	3 (14)	8 (36)	11 (50)	0.15	N.D.—0.97
open sea except deep-sea	T—Hg		6 (50)	6 (50)	0.13	0.10—0.73
S.N.=12	Me—Hg		3 (25)	9 (75)	0.10	N.D.—0.65

S.N.·····Species numbers
( )·····%

Westöö[10-11] や Kamps[12] の欧米の分析および西垣ら[13]の分析によるとその比率は80～100% と比較的高い値が報告されているが，一方山中ら[14]の分析によると20～60%と低い値が報告されている．今回の調査においては総水銀とメチル水銀の間に強い相関性がみられたことにより，実際には魚種によって例外はあるとしてもその勾配を統計的な比率とみなせると思われる．従って魚種による Me—Hg/T—Hg のバラツキはあまりなく，その値は82%の近くに集中しているものと思われる．

総水銀含有量により，試料を7クラスに分けて，各クラスにおける総水銀に対するメチル水銀の比率を Table 5 に示す．Rivers ら[15]がハワイのクロカワジキの分析でメチル水銀がある水準をこえると何らかの作用がはたらきメチル水銀の無機化がおこるかまたは無機水銀のメチル化がおさえられることにより，Me—Hg/T—Hg が総水銀量の増加に逆比例すると報告した．また山中ら[14]は Me—Hg/T—Hg の値は水銀の濃度に比例すると報告したが，今回の調査によると，総水銀濃度のある点までは Me—Hg/T—Hg の値は水銀量に比例して増加していくが，その点以上に増加していくと逆に減少していく傾向がみられ，前記 RIVERS らおよび山中らの報告と同様な傾向が得られた．

D 内湾沿岸魚と外洋魚との比較

今回調査した魚種を内湾，沿岸魚と外洋魚とに分け，それぞれのクラスについて，水銀含有量を Table 6 に示す．総水銀およびメチル水銀の両者とも外洋魚の方が約4～5%高含有を示した．しかし，一般に水銀の含有量が多いといわれている深海魚を外洋魚より除いて比較すると，内湾，沿岸魚の総水銀濃度0.14 ppm に対して，外洋魚の 0.13 ppm，またメチル水銀の場合でも0.11 ppm に対し 0.10 ppm となった．この結果より生息海域の間の差異はあまりみられないことにより特定地域を除き，沿岸魚の水銀の人為汚染の可能性はそれ程ないと思われる．清水ら[16]は海域に

Table 7. Content of total mercury and methyl mercury in fish on classification of depth of sea.

Depth (m)	ppm / Hg form	X≧0.4	0.4>X≧0.1	0.1>X	$\bar{X}$	Range
50≧X	T—Hg	1 (5)	6 (32)	12 (63)	0.14	0.10—0.90
S.N.=19	Me—Hg	1 (5)	5 (26)	13 (69)	0.11	N.D.—0.66
50>X≧200	T—Hg	1 (4)	9 (36)	15 (60)	0.13	0.10—0.73
S.N=25	Me—Hg	1 (4)	6 (24)	18 (72)	0.10	N.D.—0.65
X>200	T—Hg	3 (30)	5 (50)	2 (20)	0.34	0.30—1.10
S.N.=10	Me—Hg	3 (30)	5 (50)	2 (20)	0.28	0.20—0.97

S.N.……Species numbers
( )……%

Table 8. Content of total mercury and methyl mercury in muscle tissue of fish on size of fish.

Body size(cm)	ppm / Hg from	X≧0.4	0.4>X≧0.1	0.1>X	$\bar{X}$	Range
20>X	T—Hg		1 (14)	6 (86)	0.06	0.02—0.16
S.N.=7	Me—Hg		1 (14)	6 (86)	0.04	0.01—0.14
60>X≧20	T—Hg	1 (4)	10 (42)	13 (54)	0.12	0.02—0.74
S.N.=24	Me—Hg	1 (4)	7 (29)	16 (67)	0.10	0.01—0.62
100>X≧60	T—Hg	3 (18)	8 (47)	6 (35)	0.22	0.02—0.79
S.N.=17	Me—Hg	3 (18)	6 (35)	8 (47)	0.17	N.D.—0.62
X≧100	T—Hg		3 (50)	3 (50)	0.18	0.08—0.37
S.N.=6	Me—Hg		3 (50)	3 (50)	0.13	0.06—0.28

S.N.……Species numbers
( )……%

よる魚体中の水銀濃度の差異はあまりないと同様の見解を述べているが，一方水銀の生物濃縮は沖合の生態系で拡大され外洋魚において，その含有量が多くなるという松井[17]の報告もある．

E 生息深度との関係

つぎに一般に深海魚中の水銀含有量は多いといわれているが，Table 7 に魚の生息深度による魚体中の総水銀およびメチル水銀の含有量を示す．水深 50 m までの海表および浅海魚においては総水銀濃度0.14ppm メチル水銀濃度0.11 ppm で，50 m から 200 m までの魚では総水銀濃度0.13 ppm，メチル水銀濃度 0.10 ppm で，水深 200 m までの太陸棚生息魚および同深度までの外洋魚の平均総水銀は 0.14 ppm で，平均メチル水銀濃度は0.11 ppm であった．一方200 m 以上の中層および深海魚では，総水銀の平均濃度は 0.34 ppm，メチル水銀の平均濃度は 0.28 ppm ををを示し，水深200 m 以下の魚類の 2 倍以上の含有量であった．この結果より，海水中の水銀濃度が深度により変化することが考えられるが，文献によると水深200 m までの海水の水銀含有量は特定海域をのぞき，海域による差はなく0.1 ppb 前後とされているが，深海においては深度により大きくなるという説がある．また深海に

おける生態系が表層のそれとは異なっているために深海魚の水銀濃度が高いともいわれている．

F 魚の体長との関係

つぎに，魚体の大きさによる水銀濃度の変動は，Bache ら[15]，Barber ら[19]，Rivers ら[15]，Forester[20] 和泉ら[21]，山中ら[14]，が水銀濃度は魚体の大きさに比例するといっている．特に山中らは，同一海域で捕獲された三魚種を比較し，高濃度含有の魚種は，魚種特異性ではなく，魚体が大型で餌の摂取量が多いという食物連鎖説により，魚体の大きさと水銀濃度との比例関係を述べている．そこで今回調査した魚類について，体長と水銀含有量の比較を Table 8 に示す．20 cm 以下の小形魚では，その約86％が0.1 ppm 未満で，平均値も総水銀0.06 ppm，メチル水銀0.04 ppm と非常に小さな値を示した．また 20 cm 以上 60 cm 未満の中形魚では，総水銀濃度0.1 ppm 未満のものと 0.1 ppm 以上 0.4 ppm 未満のものが半々となり，平均値は総水銀 0.12 ppm，メチル水銀で 0.10 ppm であった．60 cm 以上 100 cm 未満の大形魚では暫定規制値 0.4ppm 以上のものが約 20％ あり，平均値も総水銀 0.22ppm，メチル水銀0.17 ppmと高い値を示した．しかしながら100 cm 以上の大形魚では規制値をこえるものは検出されず，平均値も総水銀0.18 ppm，メチル水銀0.13 ppm と前記の大形魚に比し水銀濃度は低かった．これはこのクラスには比較的深海魚が少なく，タチウオ，ハモ等のように，体長に比し体重の少ないものが入っているためであると思われる．

G 貝およびカニ類

貝類は魚類に比し，一般に水銀濃度は低い値を示した．カキと他の貝類とを比較して，前者が低い値を示していることは，前者は養殖したものであり，海底に生息している他の貝類はその場所の水銀濃度に比較的影響をうけていることが考えられる．またカニ類では紅ズワイガニより平均0.50 ppm と規制値を上まわる高い値の総水銀を検出した．しかしケガニは 0.04 ppm と低い値を示しており，種類によって含有量の差が大きいことも認められた．

3. 水産加工品

今回調査した水産加工品中の水銀含有量を Table 9に示す．鯨肉ではナガス鯨，イワシ鯨およびミンク鯨のすべてより平均0.05 ppm の総水銀を検出した．また加工品であるカマボコ，チクワ，ハンペン，ツミレおよびフリカケのほとんど全試料から水銀を検出した．カマボコ，チクワはスケトーダラなどのような水銀濃度の低いものを原料としているためか，製品中の含有量も少ない値を示したものと考えられる．一方ハンペンは原料に水銀含有量が多いといわれているサメ類を使用しているため，規制値を大幅に上まわっている．またツミレはアジ等の雑魚を使用しているためか比較的低い値を示したものと推定される．さらにフリカケでは Table 9 に直接示しているわけではないが，各製品には原料の表示があり，タラコと記載のあるもの

Table 9. Mercury content of marine product

Sample name		N	Total Hg		Methyl Hg (as Hg)	
			min max	mean	min max	mean
1. Whale meat	A	5	N. D. −0.08	0.05	N. D. −0.06	0.04
	B	5	N. D. −0.07	0.05	N. D. −0.05	0.04
	C	5	N. D. −0.07	0.05	N. D. −0.05	0.04
2. Kamaboko		5	N. D. −0.05	0.03	N. D. −0.01	0.01
3. Chikuwa		5	N. D. −0.10	0.02	N. D. −0.06	0.02
4. Hanpen		5	0.35−0.51	0.45	0.32−0.49	0.42
5. Tsumire		1	0.02	0.02	N. D.	
6. Furikake		3	N. D. −0.15	0.08	N. D. −0.14	0.07
7. Ham		10	N. D. −0.40	0.13	N. D. −0.36	0.12
8. Sausage		10	N. D. −0.05	0.01	N. D. −0.04	0.01
9. Beacon		5	N. D. −0.21	0.10	N. D. −0.18	0.09

subject
Whale meat A……Nagasu
B……Iwashi
C……Minku

は検出しなかったが，カツオ，魚粉・記載されたものからはそれぞれ水銀が検出された．またハム，ソーセージおよびベーコンにはいずれも水銀を含有している試料が多かった．なかでもハムのうちの一試料からは0.40 ppm という高濃度の水銀を含有しているものがあった．水銀を含有している試料はハムの80%，ソーセージの90%およびベーコンの60%であった．このように高い検出率を示した理由としては，原料に魚肉が使用されているか，添加されていることによると思われる．なおハムとソーセージの区別はレツテル等の商品名によっているため，多少上記の比率には変動があると思われる．全般にハンペンとハムの一部を除くと，水産加工品の水銀含有量は比較的低い値を示している．近藤[22]は，加工品の水銀含有量の一般値を出すのは非常にむずかしく，その値は参考値程度の意味しか持たないと述ている．しかし魚介類を中心としてその加工品を含めて総喫食量がその個人の総水銀摂取量に大きな比重をしめていることにも言及しているとおり，食品衛生学上，加工食品について今後なおもっと多種類の試料について調査の必要があると考えられる．

要　結

1. 築地市場に陸揚げされた魚介類および，東京都内で入手した水産加工品について，総水銀およびメチル水銀の測定を行なった総水銀の分析には，湿式分解法を，メチル水銀の分析には，直接抽出法および同法で分析困難なものはＦＤＡ法の改良法であるアルカリ分解法を用い，フレームレス原子吸光分光分析法および，ガスクロマトグラフ法により定量を行なった．

2. 今回調査した海洋魚の全試料より水銀を検出し，全試料の約15%が総水銀の暫定規制値0.4 ppm をこえる値を示した．最高値はメヌケの一試料より総水銀1.10 ppm を検出した．また平均値でもメヌケが最高で0.79 ppm であり，これにつぐものがキンメダイで0.74 ppm であった．平均値で暫定規制値をこえるものには上記２つの他スズキおよびギンダラであった．

3. 魚類中の総水銀とメチル水銀との間には強い相関性がみられ，今回調査した魚類中の総水銀に対するメチル水銀の統計的比率では一部の魚種を除き81.5%であった．

4. 総水銀に対するメチル水銀の割合は総水銀が増加するに従い増加するが，ある程度増加すると逆に減少する傾向がみられた．

5. 内湾，沿岸魚と外洋魚について水銀含有量を比較したところ，深海魚を除いた場合には，明らかな差異はみられなかった．

6. 水銀を高濃度に含有している魚は深海魚で，体長60cm 以上 100cm 未満の大型魚にそのしめる割合が大きい．また20cm 未満の小形魚は，その約90%が0.1 ppm 以下であることから，体の大きさと水銀濃度には相関があると思われる．

7. 今回調査した貝類には高濃度に水銀を含有しているものはみられなかった．一方カニ類では紅ズワイガニより総水銀0.5 ppm と高い値がえられた．

8. 水産加工品ではハンペンより平均値で0.45ppm と高濃度の水銀が検出され，ハムの一試料からも0.40 ppm を検出した．一方その他の加工品中の水銀濃度は0.2 ppm 以下と比較的低い値を示した．

今回の調査においては，水銀高含有魚といわれているマグロ類およびサメ類についてはすでに多数の報告があるが別の観点より検討する必要があり，また魚種および試料数量にかなりかたよりが見られること，出荷地は判明しているものの魚獲海域を明確にすることが出来なかった点などを考慮し，今後調査を続行する予定である．

謝　辞

本調査に御便宜をはかっていただいた東京都衛生局環境衛生部食品監視課ならびに，市場衛生検査所の諸氏に深謝いたします．

文　献

1) 入鹿山且郎：水俣病，水俣病研究班，秀版印刷 (1966)
2) 椿　忠雄：POPULAR MEDICINE, 18, 6—9 (1967)
3) 環境庁公害保健課：河川海域などの水銀汚染調査資料 (1973)
4) 天野慶之：POPULAR MEDICINE, 41, 40—43 (1971)
5) 厚生省環境衛生局通達：48衛環乳第423号昭和48年８月６日
6) 竹内正博，江波戸挙秀，伊藤弘一，雨宮敬，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報 25, 133—139 (1973)
7) Westöö, G.: *Acta Chem, Scand.*, 21, 1790—1800, (1967)
8) Westöö, G.: *Acta Chem. Scand.*, 22, 2277—2280 (1968)
9) Kamps, L.R. and Mcmahon, B.: *J. A. O. A. C.* 55, (3) 590～595 (1972)

10) Westöö, G. : *Acta Chem. Scand.*, 20, 2131—2140, (1966)
11) Westöö. G. : *Science*, 181, 567—568 (1970)
12) Kamps, L. R., Carr, R. and Miller, H. : *Bull. Environ. Contami. Toxicol.*, 8, 273—279 (1972)
13) 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：東京衛研年報，24, 239—248 (1972)
14) 山中すみへ，上田喜一：日衛誌，28, 582—587 (1974)
15) Rivers, J. B., Pearson, J. F. and Shultz, C. D. : *Bull. Environ. Contami. Toxicol.*, 8, 257—266 (1972)
16) 清水 誠，土井陸雄：科学，43, 357～362 (1972)
17) 松井三郎：公害研究，2, 45—50 (1973)
18) Bache, C. A. Gutermann, W. H. and Lisk, D.J. : *Science*, 172, 951—952 (1971)
19) Baber, R. T. and Vijakumar, A. : *Science*, 178, 636—639 (1972)
20) Forester, C. R. and Kechen, K. S. : *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 29, 1487—1490 (1972)
21) 和泉四郎，奈良忠明：日衛誌，29, 50, (1974)
22) 近藤雅臣：衛生化学，20, 47—66 (1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 153 — 162, 1974

アルカリ分解——フロリジルカラムクリンアップ法を用いる油脂加工品中熱媒体のガスクロマトグラフィーによる定量法

観　照雄* 鈴木助治* 植田忠彦* 山野辺秀夫*
鎌田国広* 戸谷哲也*

Gas-Liquid Chromatographic Determination of Heat Transfer Medium in Processed Fatty and Oily Foods by Means of Alkaline Decomposition-Florisil Column Cleanup Method

TERUO KAN*, SUKEJI SUZUKI*, TADAHIKO UETA*, HIDEO YAMANOBE*, KUNIHIRO KAMATA* AND TETSUYA TOTANI*

A method was investigated for analysis of the individual ingredients of heat transfer medium, such as diphenyl (DP), phenylether (PE), monoisopropyltetrahydronaphthalene (MPT) and monoisopropylnaphthalene (MPN) which contaminated hardened oil, the raw material of the processed fatty and oily foods, during the process of the manufacture of it.

The results obtained were as follows :

After saponification of a sample, all ingredients were extracted withe *n*-hexane, and the extract was passed through a Florisil column with *n*-hexane, and then concentrated. At this time *n*-nonane was preliminaly added for preventing the evaporation of heat transfer medium ingredients. Determination of each ingredient was made by gas-liquid chramatography using 2% SE-30 column and hydrogen flame ionization detector (FID).

The limit of the detection was about 250 ng per gram, respectively.

Stability of them under saponified condition was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry.

As the results of applying this method to 5 samples of mayonnaise, 11 samples of margarine and 19 samples of hardened oil which had doubt of contamination with heat transfer medium, no components of it were detected.

It was possible to determine each of them at detection sensitibity of about 250 times high as FID by using mass-fragmentography.

緒　言

食用油脂中の熱媒体の分析法については高木[1]のアルカリ分解法ならびに厚生省環境衛生局食品衛生課によって示された「油脂等食品中の熱媒体の検出法（暫定法）について」[2]（以下直接抽出法と略称する）があることは周知のとおりである．

しかしながら前者の方法では油脂をアルカリ分解処理後，多量の水を添加し，エーテル抽出を行なうためエマルジョンを形成しやすく，また抽出液は水洗のほか特別なクリーンアップを行なわないため，ガスクロマトグラム上に異常ピークが出現しやすい．一方後者の方法は食用油には満足すべき結果が得られたがマヨネーズのような二次加工品によってはときに抽出操作等が困難になる場合もみられた．

ときに著者らは昭和48年3月，千葉ニッコーK.K.で発生した熱媒体漏洩事件にともない，行政上，油脂加工品中からの熱媒体の分析の必要性にせまられた．

東京都衛生局公衆衛生部食品監視課の立入り調査によって，使用されている熱媒体はダウサムAとKSK Oil 260の混合物であることが確認された．

そこでこれらの主成分であるジフェニル（DP），フ

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ェニルエーテル (PE), モノイソプロピルテトラハイドロナフタレン (MPT), モノイソプロピルナフタレン (MPN) を分析目的の対象とした. そして主としてマヨネーズなどの二次加工品への適用性を目的として, アルカリ分解とクリーンアップの基礎的諸条件について検討し, ガスクロマトグラフィーならびにガスクロマトグラフ—質量分析法による微量から超微量の分析法を確立し得た. さいわい, 都内で市販されていたマヨネーズ等すべての分析試料から熱媒体成分は検出されなかったが, このような事件の発生は関連中小企業への経済的損失はもとより, 一般消費者にあたえる不安感は大きい. 再度全く同様な事件の発生は起らないと思われるが, 今後に資する点も大きいと考え, 確立し得た分析法について報告する.

実験方法

1. 試　料

試料は千葉ニッコー油事件に関連し東京都衛生局公衆衛生部食品監視課が収去したマヨネーズ5検体, マーガリン11検体および硬化油19検体計35検体, ならびにこの間, 本件に関連しない国産のマヨネーズ, マーガリン, 硬化油を購入し, 試験用対照試料とした.

2. 試　薬

熱媒体：呉羽化学K.K.より分与されたダウサムA (Dow Chemical Co.), KSK Oil 260 (呉羽化学K.K.) を標準として用いた.

熱媒体標準溶液：ダウサムA 100.0 mg と KSK Oil 260 100.0 mg を混合し, *n*-ヘキサンに溶かし, 200m*l* とする. (混合した熱媒体として 1,000 ppm 溶液) これを原液として用時希釈して用いた.

ジフェニル標準溶液：ジフェニル (DP) 和光純薬K.K.製のものを含水エタノールから再結晶(mp, 70°−71°) し, その100.0 mg を *n*-ヘキサンに溶かし100 m*l* とする. これを原液として用時 *n*-ヘキサンで希釈し, 0.01−0.075 ppm 溶液として用いた.

フェニルエーテル標準溶液：フェニルエーテル (PE) 特級, 和光純薬K.K.製のものを含水エタノールから再結晶 (mp, 28°) し, その100.0 mg を *n*-ヘキサンに溶かし100 m*l* とする. これを原液として用時 *n*-ヘキサンで希釈し, 0.02−0.25 ppm 溶液として用いた.

2N 水酸化カリウム・エタノール溶液：水酸化カリウム11.2 g をエタノールに溶かし 100 m*l* とする.

フロリジル：フロリジル(合成ケイ酸マグネシウム) 60−100メッシュ和光純薬K.K.製を使用した.

n-ヘキサン：残留農薬分析用試薬(和光純薬K.K.) を使用した.

3. 装　置

ガスクロマトグラフ装置：島津製作所製 GC—5A 型, 水素炎イオン化型検出器付を使用した.

ガスクロマトグラフ—質量分析装置：島津製作所製 LKB—9,000 型, 多重イオン検出器付, データ処理システム (GS—MASPAC−300) を使用した.

Kuderna-Danish 濃縮器 (以下 KD 濃縮器と略す)：A.O.A.C の規格に準じた装置を使用した.

4. 操 作 法

(1) 試験溶液の調製

① アルカリ分解

試料約 20 g を精秤し, 300 ml のフラスコに移しとる. これに 2 N水酸化カリウム・エタノール溶液 100 m*l* を加え, 還流冷却器を付けて水浴上でおだやかに 1 時間煮沸する. 温時 (50°付近) *n*-ヘキサン 60 m*l* を加えかるく振り混ぜ, 冷後, 内容物を 500 m*l* の分液ロートに移し, フラスコを少量のエタノールで洗い, 洗液をさきの分液ロートに合する. さらに水100 m*l* と *n*-ヘキサン40 m*l* を加えて振り混ぜ, *n*-ヘキサン層と水層を分け, 水層はさらに*n*-ヘキサン 100 m*l* ずつを用いて 2 回くり返し抽出を行なう. つぎに抽出液を合し, さらに水100 m*l* ずつを用いて 2 回洗滌を行ない, 無水硫酸ナトリウムで十分に脱水したのち, これをKD濃縮器に移して濃縮管内の液量が約10 m*l* になるまで濃縮を行なう.

② クリーンアップ

つぎに内径2 cm, 長さ30 cm のコック付ガラスカラムに *n*-ヘキサンを用いて常法に従って活性フロリジル5 gを充塡し, フロリジルカラムを調製する. このカラム上にさきに得た濃縮液を注意して注ぎ, さきの濃縮管を少量の *n*-ヘキサンで2回洗い, 洗液をカラムに注ぎ, 気泡が生じないように注意して操作し, フロリジル上層の液がほとんどなくなるまで流下させる. つぎに毎分 2 m*l* の流速になるようにコックを調節して *n*-ヘキサンを流し, 流出液200 m*l* の分画まで集める. ここに得た流出液を再びKD濃縮器に移し, *n*-ノナン0.8 m*l* を加えてから, 1 m*l* 以下の量になるまで濃縮し, *n*-ヘキサンを加えて正確に 1 m*l* としガスクロマトグラフィー試験溶液とする.

(2) ガスクロマトグラフィーによる定量

熱媒体中の DP, PE, MPN, MPT 4成分についての分離定量は以下のガスクロマトグラフィーの測定条件によった.

i) カラム：2 %Sillicone Oil GE SE—30 Chrom-

osorb W AW DMCS 60—80 メッシュ 3 mm×2.0 m ガラス，温度 100°， ii) 水素炎イオン化型検出器：水素 50 ml/min，空気 1.1 l/min，温度 200°，iii) キャリヤガス：窒素 62 ml/min，iv) 感度：8×10^2 v) 記録計：記録紙速度 5 mm/min とし，試験溶液の注入量は 5 μl とした．ここに得たガスクロマトグラムの保持時間から熱媒体の同定を行ない，その波高と半値幅から面積を測定し，別に濃度を異にする熱媒体標準溶液の一定量ずつをとって同様に操作して得た検量線より，熱媒体4成分それぞれの含有量を同時に求めた．

結果および考察

熱媒体の安定性

熱媒体のアルカリ分解時における安定性について検討した．

熱媒体（ダウサムA，KSK Oil 260 各1 mg）をとり，2N水酸化カリウム・エタノール溶液を加え，1時間加熱還流したのち，*n*-ヘキサン20 ml で抽出し，その抽出液をガスクロマトグラフに注入しクロマトグラムを求めた．また熱媒体標準液100 ppm をガスクロマトグラムに直接注入しクロマトグラムを得た．その結果，アルカリ分解した熱媒体の示す個々のピークの保持時間は標準の熱媒体のそれと合致し，ピークから得られた面積もほぼ一致した．

したがって熱媒体自体はアルカリ分解操作の過程では化学分解されにくい，いわゆる不ケン化物であり，アルカリに安定であることが確認された．

熱媒体の揮散とその防止について

熱媒体を抽出した溶媒を減圧下で濃縮する操作で起こる熱媒体の揮散とその防止について検討した．

すなわちKD濃縮器に熱媒体（ダウサムA，KSK Oil 260 各 100 μg）をとり，*n*-ヘキサン 400 ml を加え，1 ml まで濃縮した場合と，さらにこれとは別に揮散防止に効果があると考えられる試薬を添加し，濃縮したときの揮散の有無について比較した．すなわち，ここに得た濃縮液 5 μl を注入量とし前項の条件に従ってガスクロマトグラフィーを行ない，DP，PE，MPT，MPN の残留量を求めた．

Fig. 1 にその結果を示す．縦軸はおのおのの濃縮条件で得られた残留量を濃縮前の添加量に対する百分率で示した．なおそれぞれの縦の線は3～5回同一操作方法を繰返し行なったときの上限と下限の幅を示し各番号（揮散防止剤の種類）の左に記入した横線で回収率の平均値を示した．No. 1，6，7，は熱媒体に *n*-ヘキサンだけを加えて，濃縮する方法のみを異にした場合である．No. 1 はKD濃縮器にアスピレーターを付け吸引することにより毛細管通気する方法，No. 6 はKD濃縮器にアスピレーターを付け沸騰石を加えて通気を行なう方法，また No. 7 は通常のロータリーエバポレーターを用いた方法である．その結果一般にDP をはじめとする各熱媒体成分は No. 1の場合，DP の例をみても明らかなように最高100% 近い残留がみられる一方，30%程度の最低値を示し，このばらつきの大きい傾向はDP以外のものでも同様に認められる．また No. 6 は No. 1 に比しばらつきの幅こそ小さいが，全般にもっとも残留率が低く，また No. 7は No. 1 と同程度のばらつきであるが，残留率はこれよりかなり高い．以上三つの濃縮法のうち No. 1の方法はたしかに残留率は大きな変動幅を有するが，その最大値は他の二つの方法より高い残留率を示す．また操作上試験溶液の調製にあたって取扱いに便利なこともあって No. 1 の方法をあえて採用した．

そこで揮散防止に役立つとおもわれる物質数種をえらんで添加し，第1の方法によって残留率を求めた．すなわち，No. 1 の方法において用いた *n*-ヘキサン溶媒より沸点の高い SE—30，*n*-Nonane，*n*-Undecane および Picric acid の4種をそれぞれ加えて濃縮した結果を No. 2～No. 5 に示した．平均値がもっとも高く，かつばらつきの少ないものは No. 3，4 の *n*-Nonane と *n*-Undecane を添加した場合で，その平均値は96%以上の値を示した．このことは DP，PE MPT，MPN にほぼ共通していて，熱媒体の揮散を防止する効果が十分に認められた．

つぎに No. 3，4から得られた濃縮液をガスクロマトグラフィーに注入したときの溶媒ピークの幅を求めたところ，No. 3 は *n*-ヘキサンと同様のするどいピークを示すが，No. 4 はわずかに広くテーリングが起こるので，今回は直接抽出法と同じ *n*-Nonana を添加して濃縮操作を行なうこととした．

カラムクロマトグラフィーによるクリーンアップ

熱媒体のカラムクロマトを行ないクリーンアップを目的として検討した．アルカリ分解処理後 *n*-ヘキサンで抽出した溶媒層には油分等に由来すると思われる妨害物質の混入がおこり，これらはガスクロマトグラム上に不明ピークとして出現し同定上誤認を生ずる原因となりうる．しかし，直接抽出法，高木の方法などでは抽出液を特にクリーンアップする操作は行なわれておらず，また林[3]らはかんきつ類中のジフェニル試験に薄層クロマトグラフィー（TLC）による方法を報告しているが，しかしTLCによるクリーンアップ

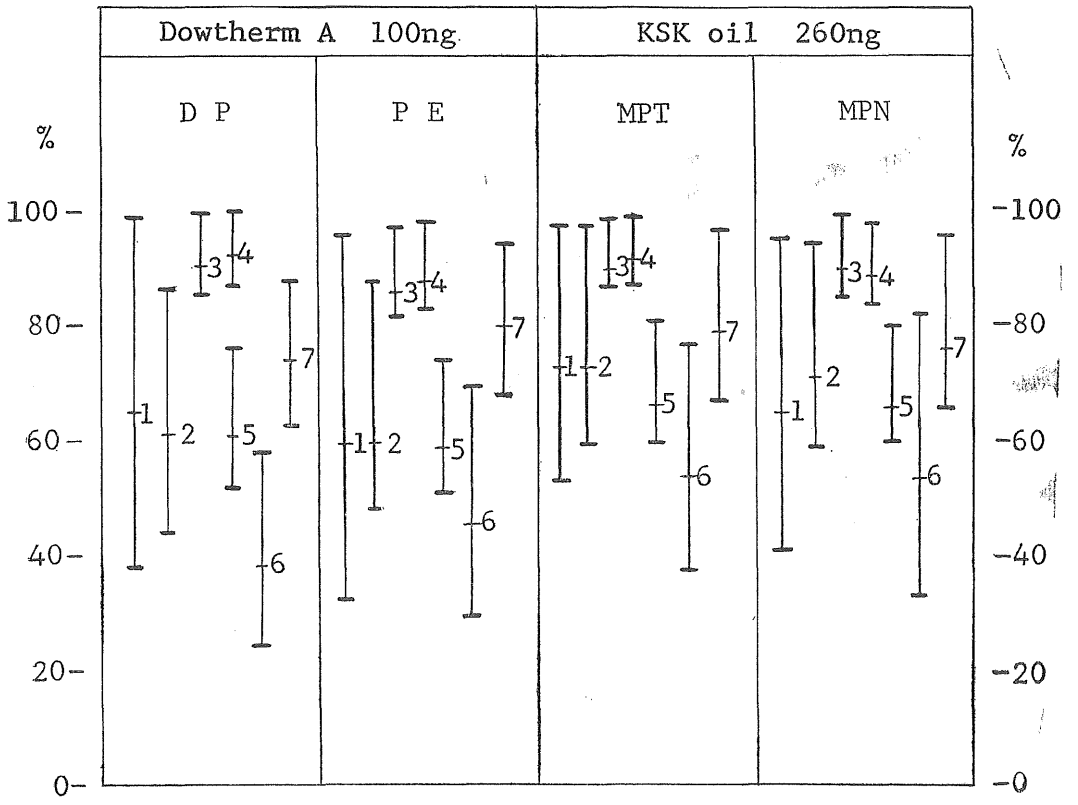


Fig 1. Effect of Reagents Used to Prevent the Evaporation of Heat Transfer Medium
1. Kuderna-Danish concentrator, capillarry tube, *n*-Hexane 400 m*l*
2. 1+SE-30 1 mg
3. 1+*n*-Nonane 0.8 m*l*
4. 1+*n*-Undecane 0.8 m*l*
5. 1+Picric acid 1 mg
6. Kuderna-Danish concentrator, *n*-Hexane 400 m*l*
7. Rotary vacum evaporator, *n*-Hexane 400 m*l*

は今回目的とする食用油脂などの油分の多い試料では困難であったので，カラムクロマトによるクリーンアップを実施した．

そこで内径2cm，長さ30cm のカラムにフロリジル 5gならびにシリカゲル5g を別々に充塡した2種のカラム柱を調製し，500 μg を含む熱媒体溶液を注入後，*n*-ヘキサンを1分間約 2 m*l* の流速で流出させ，5 m*l*ずつのフラクションに分取し，各分画液につきガスクロマトグラフィーによって熱媒体成分の溶出量を定量した．その溶出パターンを Fig. 2 に示した．

フロリジールカラムでは MPT, MPN, DP, PE の順に溶出し，溶出に必要とした液量は 200 m*l* であった．一方シリカゲルカラムでも各熱媒体成分は同じ順位で溶出するが，*n*-ヘキサンの溶出液量は 800 m*l* を必要とした．これらのことから熱媒体のクリーンアップには溶出液量が少なくてすむフロリジールカラムを適用することとした．

ガスクロマトグラフィーによる分離分析

1) ガスクロマトグラフィー用カラムの選択

ガスクロマトグラフィーで熱媒体を分析するときに DP, PE, MPT, MPN が同時に分離判明することが可能なカラムを見出すべく検討した．

カラムは液相に SE—30（2%），OV—17（2%）DEGS（10%）の3種を，担体にはクロモソルブW（60—80メッシュ）を用い，それぞれ最適カラム温度に設定し熱媒体のガスクロマトグラフィーを行なったそのガスクロマトグラムから求めた保持時間（分）を Table 1 に示した．

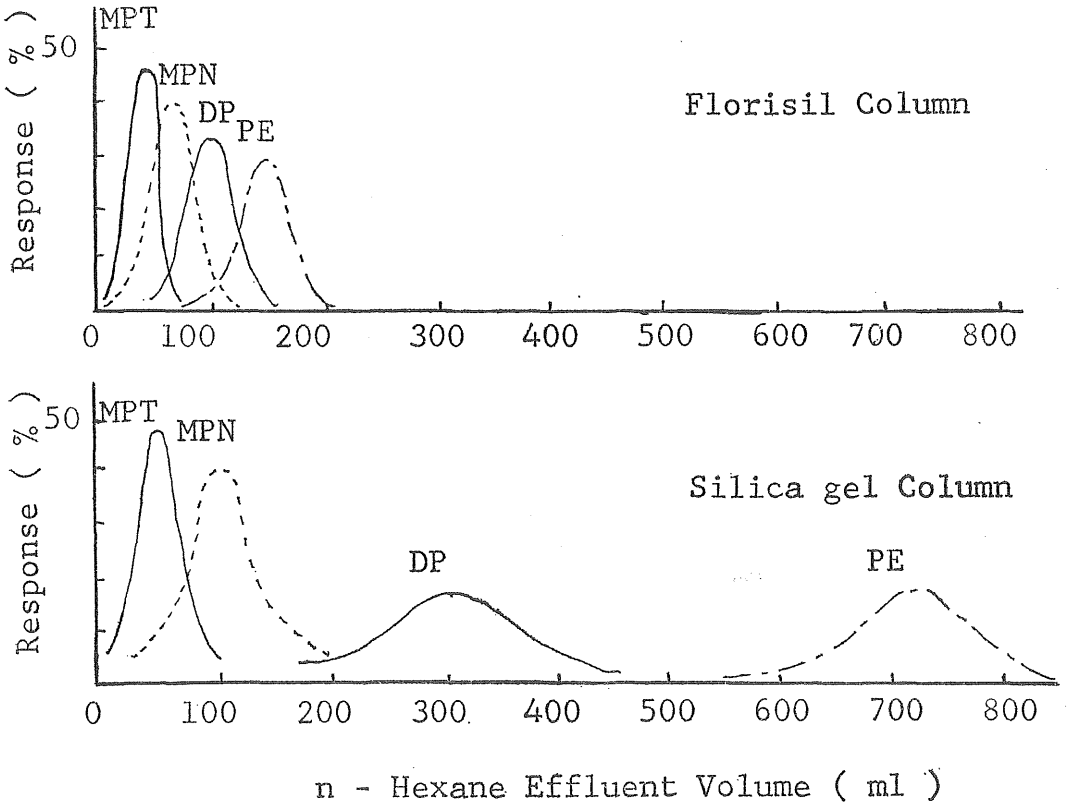


Fig. 2 Elution Patterns of Heat Transfer Medium by Florisil and Silicagel Colums

SE—30 を用いたカラムはピークの分離能，保持時間などの点で良好であることを認めた．OV—17 のカラムは MPT と DP のピークが重なり分離能が低く，DEGS カラムは熱媒体成分のすべてを検出し終るまでの時間が約30分と長い．高木[1] は熱媒体のガスクロマトグラフィーに15%SE—30 を用いているが，このような高い濃度の液相は必要でないことが以上の結果から認められたので，2 %SE—30 を用いることとした．

2) 熱媒体の検量線の作成

前記の操作法に従って設定した測定条件において，熱媒体標準溶液 (5, 10, 20, 50, 100 ppm) 5 μl を注入し，得られたクロマトグラムから DP, PE, MPT, MPN の保持時間の波高と半値幅から面積を測定したところ，Fig. 3 に示すとおり，それぞれ良好な直線関係の成立することが認められた．また各測定値のバラツキは小さく，再現性の良い結果を示した．

油脂加工中の熱媒体のガスクロマトグラフィーによる定量

1) 油脂加工品に添加した熱媒体の回収率

試験用対照試料として入手したマーガリン，硬化油ならびにマヨネーズ各 20 g に熱媒体標準溶液 100 μg/ml (ダウサム A, KSK Oil 260 各 50 μg) を添加し，定量操作法に従って回収率を求めた．Table 2 に示すような測定結果が得られた．回収率は80%以上であり，食品中の分析法としてほぼ満足すべき値であった．

2) 油脂加工品中の熱媒体の定量

以上の結果から本法の実際試料への応用について検討した．試料はマヨネーズ 5 種，マーガリン11種，硬化油19種について定量操作法に従い測定したところ，いずれの試料からも熱媒体は検出されなかった．また同時にすべての試料に熱媒体標準溶液 100 ppm を 1 ml 添加して，回収率を求めたところ，前項1) とほぼ同じ高い値を示し，ガスクロマトグラフ上には添加した熱媒体によるピーク以外にはなにも認められなかった．

これらのことは本法におけるアルカリ分解と溶媒抽出条件などの他，特にカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップが有効にはたらいている結果と考え

Table 1 Retention Time of Heat Transfer Medium on Three Colums by FID-Gas Chromatography

Column Condition			Retention Time (min)			
			DP	PE	MPT	MPN
SE—30	2%	100°	4.2	4.7	5.3	6.6
OV—17	2%	180°	5.2	5.8	4.8 5.5	6.3 6.7
DESG	10%	80°	21.6	24.5	6.4	17.8 19.7

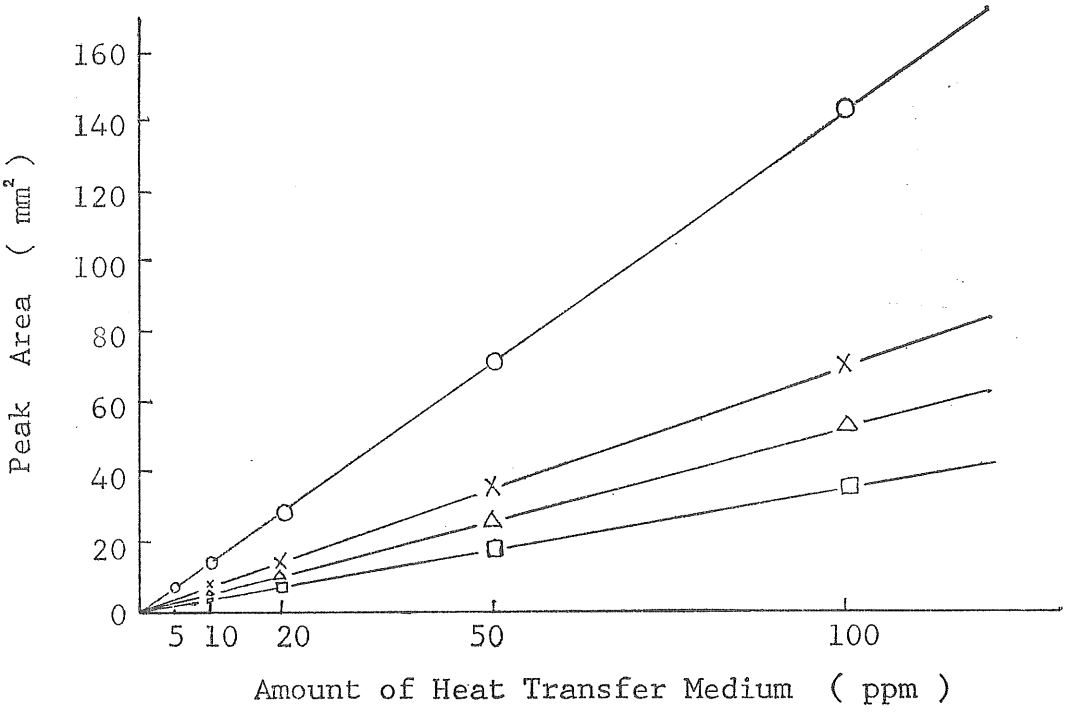


Fig. 3 Calibration Curves of Heat Transfer Medium by FID-Gas Chromatography
×——× : DP, ○——○ : PE, △——△ : MPT, □——□ : MPN

られる．事実直接法で行なった場合ではマヨネーズ，硬化油などはエマルジョンを形成し，試料に熱媒体を添加していない場合でも，ときにガスクロマトグラム上に熱媒体成分と多少重なる異常ピークが観察された．

ガスクロマトグラフ—質量分析計による測定

またさらに本定量操作法で得られる試験溶液についてガスクロマトグラフ—質量分析法（以下GC—MS法と略す）を行なった．GC—MS装置のトータルイオンモニターに感じて記録されるガスクロマトグラム（以下 TICM クロマトと略す）とこの TICM クロマトが示す個々のピークのマススペクトル（以下 MS と略す）を測定し，熱媒体の成分の構造決定と MS の測定を障害する物質の有無について検討した．さらに超高感度の分析を行なうためのマスフラグメントグラフィーの応用も目的として検討した．ただし GC—MS の測定は次の条件に従って行なった．

i) GC カラム：SE—30（2%），OV—17（2%）DEGS（10%）を充塡したガラスカラム，ii) キャリヤーガス：ヘリウム，30 ml/min，iii) 検出器：全イオンコレクター（TIC），iv) 試料注入口温度：240°，v) セパレーター温度：230°，vi) イオン源温度：250°

Table. 2 Recovery of Heat Transfer Medium Added to Processed Fatty and Oily Foods

Foods	Added (μg)		Found (μg)	Recovery (%)
Margarine	DP	14.4	12.2	84.5
	PE	36.8	31.1	84.6
	MPT	16.8	14.5	86.4
	MPN	15.7	12.9	82.3
Hardened Oil	DP	14.4	11.4	79.5
	PE	36.8	29.4	79.9
	MPT	16.8	13.8	82.1
	MPN	15.7	13.1	83.4
Mayonnaise	DP	14.4	12.6	87.4
	PE	36.8	31.4	85.3
	MPT	16.8	14.6	86.7
	MPN	15.7	13.3	85.0

Heat Transfer Medium 100 μg=Dowtherm A, 50 μg+KSK oil 260, 50 μg

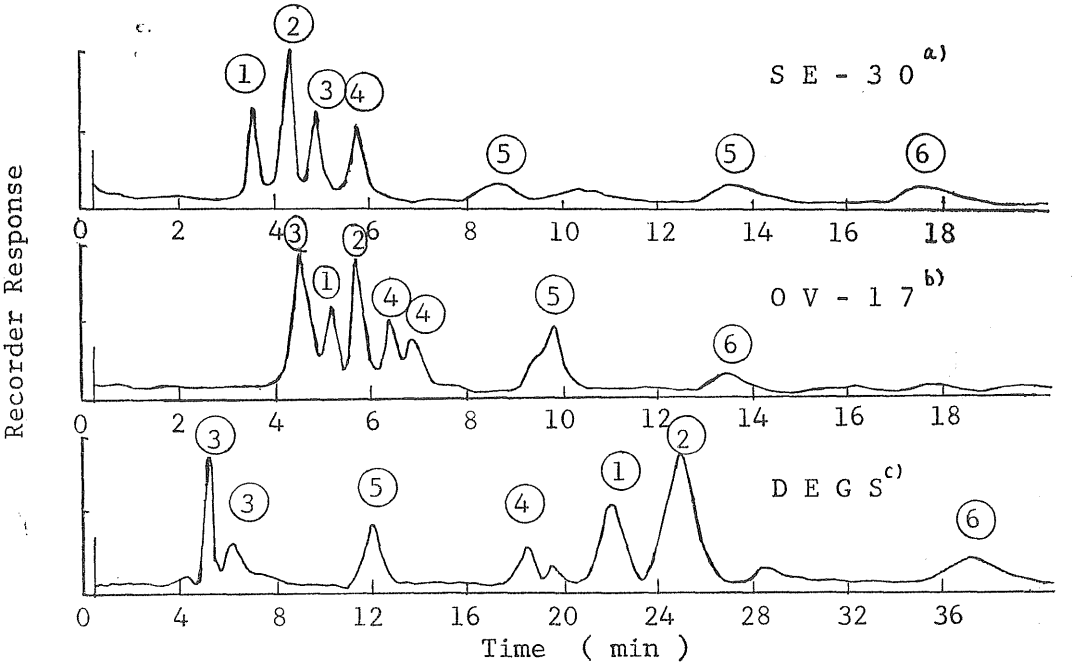


Fig. 4 TICM Chromatograms of Heat Transfer Medium by GC—MS
a) 2%SE—30, Temp. 100°, 3 mm φ×2 m
b) 2%OV—17, Temp. 180°, 3 mm φ×2 m
c) 10%DEGS, Temp. 8°, 3 mm φ×1 m
① DP ② PE ③ MPT ④ MPN
⑤ Diisopropyltetrahydronaphthalene ⑥ Diisopropylnaphthalene

vii) イオン加速電圧：3.5 KV, viii) イオン化電圧：20 eV (TIC), 70 eV (MS), ix) トラップ電流：60 μA, x) 出口スリット：0.1 mm, xi) コレクタースリット：0.1 mm, xii) TIC 記録計：2 mV, チャート送り, 10 mm/min, xii) ビジグラフ：チャート送り, 100 mm/sec,

1) ガスクロマトグラムとマススペクトル

GC—MS 装置に熱媒体標準溶液を注入して得られる TICM クロマトを Fig. 4 に示した. GC カラムに SE—30 (2%), OV—17 (2%), DEGS (10%) を用いたときの熱媒体の分離ピークを示し, またそれぞれのピークの MS を求めた. 各スペクトルから分子イオンピークならびにフラグメントピークが明らかに検出され, それらの化合物は ① DP, ② PE, ③ MPT, ④ MPN さらに新らたに, ⑤ Diisopropylterahydronapthalene, ⑥ Diisopropylnapthaleneであることが確認できた. Fig. 4 に相当するピークの肩に①などの番号で記載した. このうち, 特に SE—30 のカラムで求まる ①から④の CP, PE, MPT, MPN の MS をデータ処理システム, GC—MASPAC—300によってバックグランド消去処理して得られた MS を Fig. 5 に示した.

さらに前項1), 2)で回収率を求めた試験溶液について GC—MS を行ない, その結果を熱媒体標準溶液のそれと比較したところ, TICM クロマトのピーク高は回収率の割合だけ減少することが認められたが, MS は完全に一致するため本試験法が熱媒体既知成分のみを測定し, 障害物質の混入がないことを確認することができた.

2) マスフラグメントグラフィー

1)で測定した MS のデータを基礎として, 超微量の熱媒体の定量分析を目的とし, マスフラグメントグラフィー (Mass fragmentography, 以下 MF と略す) につき検討した. ただし今回の熱媒体のように混合標準試料を用いると MF の操作や結果が繁雑になるので単一の試薬として入手できた DP と PE のみを MF の測定対象とした. 測定条件はカラム SE—30 (2%), 3 mm φ×2 m を用い, コレクタースリット：0.3 mm, イオン化電圧：20 eV, ビジグラフ：チャート送り 10 mm/min とする以外の分析条件は前項(1に従って行なった.

a) ジフェニル：Fig. 5 に示されたピーク番号①の MS で最も強いピークは分子イオンピーク m/e 154であり, 同位体ピーク m/e 155も12%の相対強度で求められた. そこで m/e 154, 155 の2点にしぼりGC—MS の多重イオン検出器を調整し, それぞれのイオン強度を連続的に記録させることによってガスクロマトグラムと同じマスフラグメントグラム (mass fragmentogram) を求めることとした.

検量線は注入量 1 μl で作成し, その結果を Fig. 6 に示した. DP の濃度として0.010, 0.020, 0.050, 0.075 ppm にほぼ直線性を示した. そこで試験用対照試料

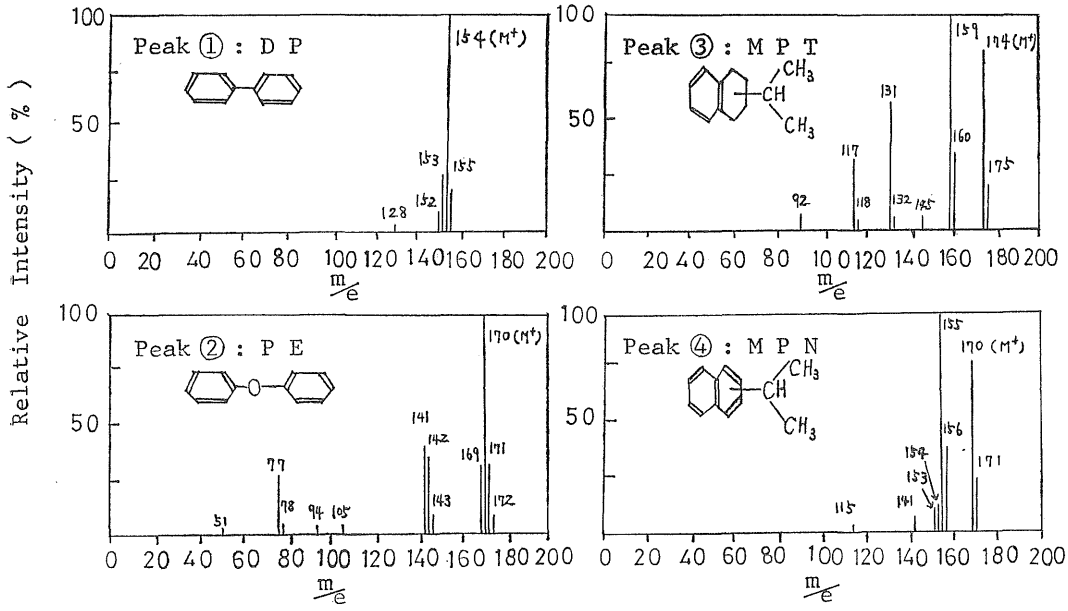


Fig. 5 Mass Spectra of Peak (①, ②, ③, ④)

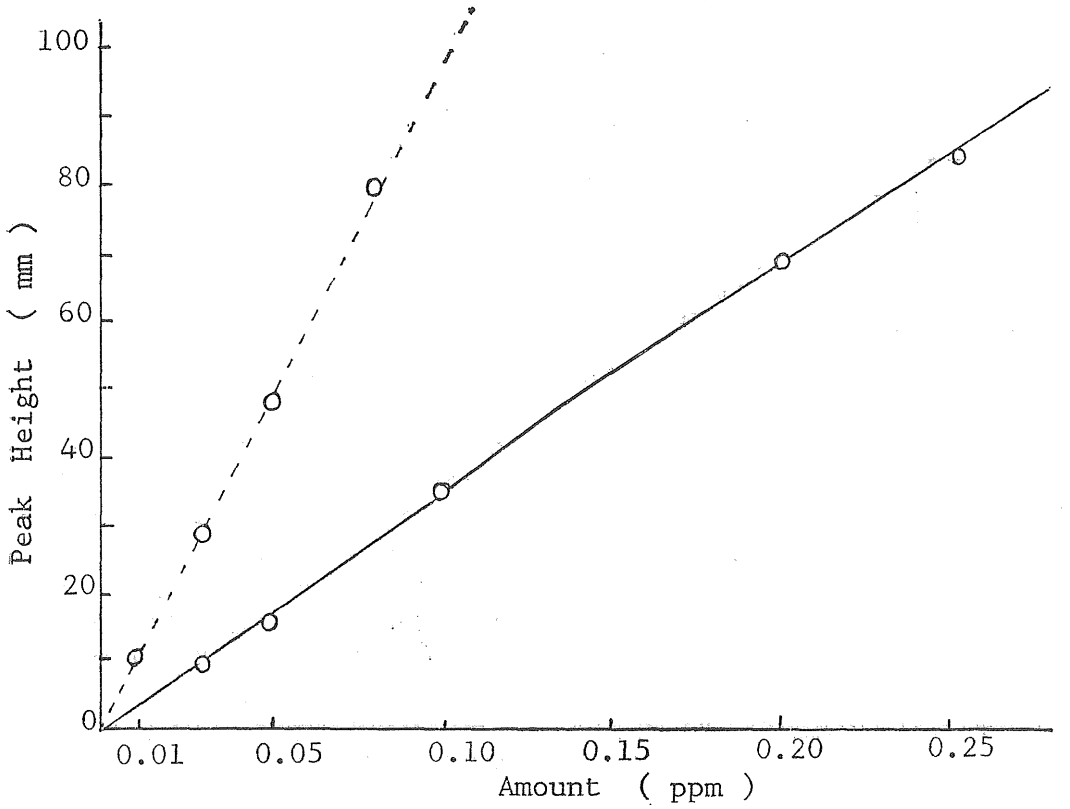


Fig.6 Caliblation Curves of Diphenyl and Phenylether by Mass Fragmentography
○……○ : Diphenyl (DP, m/e 154)
○——○ : Phenylether (PE, m/e 170)

のマーガリン20 g に DP 0.05 μg を添加し，4. 操作法に従い抽出して得た試験溶液について MF を測定した．Fig. 7 に DP 0.05 ppm *n*-ヘキサン溶液と共にそのマスフラグメントグラムを示した．

DP 0.05 ppm 溶液の質量数154の軌跡から得られるクロマトグラフ上の DP のピークは注入してからピークの出現時間，すなわち保持時間 5.0分が得られ，マーガリンに添加した試験溶液も同時間にピークを検出した．また分子イオンピーク (m/e 154) の示すピーク高に対する同位体ピーク (m/e155) のピーク高との強度比は0.05 ppm DP溶液で得られたその強度比とほぼ一致した．これらのことからマーガリン中の超微量の DP が抽出同定し得ることが確認できた．また質量数154のピーク高からその回収率は75%であり，試料中の定量限界は0.0005 ppm である．

b) フェニルエーテル：操作方法は多重イオン検出器の質量数170 (分子イオンピーク)，171，172 の3点をえらび，他は DP と同じ条件で行なった．

検量線は 1 μl の注入量で作成し，DP と同じ Fig. 6 に示した．PE の濃度 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 ppm に直線性が認められたので，マーガリン 20 g に PE 0.1 μg を添加し，4. 操作法に従い抽出した．この試験溶液から得られるマスフラグメント上のピークは PE 標準溶液と同じ 5.6 分の保持時間を示し，分子イオンピーク (質量数170) と同位体ピークが示す質量数 171 と 172 の強度比をそれぞれ求めたところ，PE の

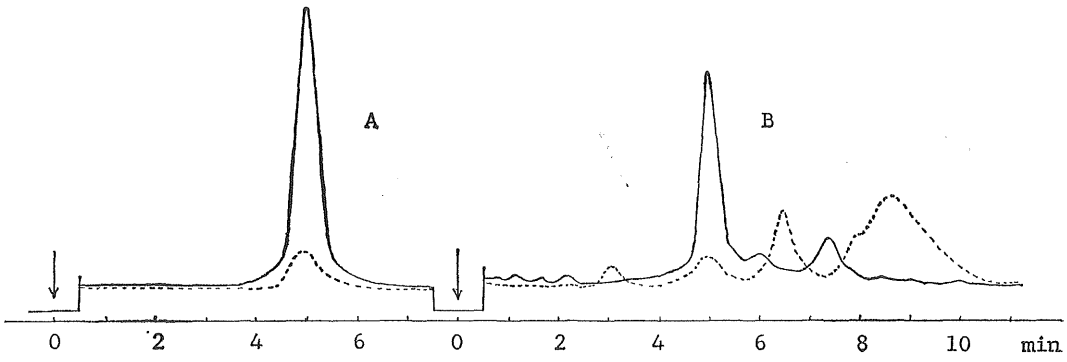


Fig. 7 Mass Fragmentograms of Diphenyl in Margarine
A : DP 0.05 ppm B : Margarine 20 g+DP 0.05 μg
—— : m/e 154 …… : m/e 155

強度比とほとんどよく一致した．回収率は質量数170でDPとほぼ等しい値が得られ，試料中の定量限界は0.0015 ppm を得ることができた．

以上のことから本定量試験法は油脂加工品中の熱媒体の超微量定量に十分応用することができるものと考えられる．

結　論

油脂加工品中に過誤によって混入したと推定される熱媒体につきガスクロマトグラフィーによる定量法について検討し，つぎのことを明らかにした．

1) 抽出方法としては油脂加工品を2N水酸化カリウム・エタノール溶液で加熱還流したのち熱媒体を不ケン化物として *n*-ヘキサンで抽出した．2) 抽出液中の妨害物質を除くためのクリーンアップは吸着剤をフロリジルとするカラムクロマトグラフィーを行なった．3) 熱媒体はKD濃縮器を用いた濃縮方法でも20—60%の揮散が起こることを見い出したので，*n*-ノナンを加えることで揮散を防止することが出来た．4) 熱媒体の定量はガスクロマトグラフィーを用い，カラム2%SE—30，温度100°，水素炎イオン化検出器の測定条件では熱媒体濃度 5—100 ppm と DP，PE，MPT，MPN の各4成分の示す面積との間に直線関係が得られ，定量性を認めた．5) 食用油脂加工品中に添加した場合の回収率は80%以上が得られた．6) 本定量法の検出限界は 0.25 ppm (1 g 中ダウサムA 0.125 μg，KSK Oil 260 0.125 μg) である．7) マヨネーズ5種，マーガリン11種，硬化油19種の試料からは熱媒体の含有は認められなかった．8) GC—MS法に本法を応用したところ，アルカリ分解抽出によって熱媒体成分は安定であり，さらに障害物質の混入はなく，フロリジルカラムによるクリーンアップは完全におこなわれていることを確認した．9) フラグメントグラフィーに適用したところ，検出限界はDP質量数154で0.0005 ppm，PE 質量数174で0.0015 ppm と超微量検出が可能であった．

本法の特徴は障害物質の混入がなく，迅速に高感度で定量できる点にある．

謝　辞

本研究にあたり，ご便宜を賜わった当所松本茂理化学部長に深謝いたします．

〔付　記〕本研究の概要は1973年12月7日に開催された第10回全国衛生化学技術協議会で発表した．

文　献

1) 高木　徹：油化学，18，235—239 (1969)
2) 厚生省環境衛生局食品衛生課：各都道府県，各指定都市衛生主管部（局）長宛事務連絡，4月16日 (1973)
3) 林　敏夫：食品衛生研究，21，1215—1221 (1971)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 163 — 173, 1974

アルキルベンゼンスルホン酸塩のガスクロマトグラフィーに関する研究

観　照雄* 植田忠彦* 水石和子* 中村義昭*
風間成孔* 戸谷哲也*

Studies on Quantitative Determination of Alkylbenzenesulfonate by Gas Chromatography

TERUO KAN*, TADAHIKO UETA*, KAZUKO MIZUISHI*, YOSHIAKI NAKAMURA,*
MASAYOSHI KAZAMA* AND TETSUYA TOTANI*

A specific and selective method was established for the determination of alkylbenzenesulfonate in detergents.

The method obtained was summarized as follows :

1) Alkylbenzenesulfonate displaced alkylphenol when it was fused with potassium hydroxide at 310-330° for 4 minutes.

2) Alkylphenol converted easily into bromine derivative by adding bromine solution.

3) The bromine derivative was determined at the high detection sensitivity (0.4 ng/ml) by using gas-liquid chromatography with electron captuer detector.

4) It was possible to distinguish between linear alkylbenzenesulfonate (LAS) and branched alkylbenzenesulfonate (ABS).

緒　言

アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ABS）の定量法についてはこれまでにかなり多数のものが報告されており，このうちのいくつかのものは既に実用に供されている．しかしこれらの方法はそれぞれ長所短所があって，いまだに理想的な方法が確立されたとはいえない．現在最も簡便な方法として ABS と複合体を形成するような塩基性色素を用いる比色法があり，なかでもメチレンブルーを用いる方法が繁用されている．このメチレンブルー比色法は Longwell-Maniece 法[1]，Abbott 法[2]が代表的であるが，ABS 以外のメチレンブルーに陽性な物質も極めて多数あり，これらも同時に定量されてしまうところに問題が残されている．この比色法において陽性物質を除去するための抽出条件や分解などの多くの改良が試みられているが，ABS だけを発色させる完全な方法は確立されるに至っていない．またこのメチレンブルーとの複合体を赤外吸収スペクトル法[3]や交流ポーラログラフ法[4]を用いる改良法も報告されているが，感度とか特異性の面で満足すべきものとはいえない．

つぎに ABS を分解処理して ABS 誘導体について分析する方法として ABS を酸で加水分解し生成するアルキルベンゼン誘導体をガスクロマトグラフィーにより定量する方法[5]，また ABS を塩化チオニル試薬と反応させスルホニルクロライド誘導体とし，遠赤外[6]，赤外吸収スペクトル[7]ならびにガスクロマトグラフィー[8]によって定量する方法などが報告されている．この誘導体として分析する方法は ABS 複合体よりかなりの信頼性はあるが，特に高感度等を目的とし，検出器に電子捕獲型を使用したガスクロマトグラフィー（ECD—GC）による分析方法はいまだ報告されていない．Rosen[9]らはアルカリ熔融を用いて親水基を水酸基に置換し，アルキルフェノール誘導体としてからジアゾ試薬とカップリングさせて橙色から赤色に呈色することを見出し，アルキルベンゼンスルホン酸類の定性試験に利用できることを報告している．

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

そこで著者らはアルキルベンゼンスルホン酸のうち直鎖型のもの (LAS) と分枝型のもの (ABS) とをECD—GC 法に適用すべく検討した.

さきにわれわれはフェノール類のガスクロマトグラフィーにあたり，これをブロム誘導体とすることにより ECD—GC 法によって高感度で定量でき，また分離能の改善がみられたことを報告[10]した．したがってさきの Rosen[9]らの定性法の条件を定量的に検討し，アルカリ熔融によりアルキルベンゼンフェノールとした後にブロム誘導体とし，ECD—GC 法による LAS と ABS との微量定量法を確立することを意図した．いまだ十分満足すべき結果は得られていないが，二，三の知見について報告する．

実験の部

試薬および標準品

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) 標準溶液：花王石ケンK．K．より分析用試薬として分与された LAS 200.0 mg を水 4 m*l* に溶かし，*n*-プロパノールを加えて 10.0 m*l* とする．これを原液とし用時希釈して用いた．

分枝型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS) 標準溶液：ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (東京化成K．K．)，その200.0 mg を水 4 m*l* に溶かし，*n*-プロパノールを加えて 10.0 m*l* とする．

ドデシルフェノール標準品：カロナイト化学K．K．より分与された分枝型ドデシルフェノールを*n*-ヘキサンに溶かしてから希硫酸ならびに水で十分に洗滌し，無水硫酸ナトリウムで脱水後，溶媒を除いて精製した．その 100.0 mg をとり，アセトンに溶かし 10.0 m*l* とした溶液を固定相シリカゲル，展開溶媒に石油エーテル—酢酸 (88：12) を用いて，薄層クロマトグラフィーを行なったところ，Rf 0.18—0.24 にスポットを検出した．またガスクロマトグラフ—質量分析法でマススペクトルは分子イオンピークを示し，アルキル基数10～13のアルキルフェノールの混合体であることを確認した．

臭素—臭素カリウム溶液 (以下 Br_2—KBr 溶液と略す)：臭素カリウム 16 g を少量の水に溶かし，これに臭素 10 g を加えて溶かしてから水で全量 100 m*l* をとする．

ドデシルフェノールブロム化標準溶液：ドデシルフェノール標準品 100.0 mg にエタノール 5 m*l* を加えて溶かし，Br_2—KBr 溶液 5 m*l* を加え振り混ぜてから，冷風で溶媒を留去し残留物を得る．これにアセトン 10.0 m*l* を加えて溶かし，これをドデシルフェノール臭素化標準溶液とする．

その他の試薬類はすべて市販特級品を使用した．

装　置

ガスクロマトグラフ装置：島津製作所製 GC—5 A 型，水素炎イオン化型ならびに電子捕獲型 (^{63}Ni) 検出器付を使用した．

ガスクロマトグラフー質量分析装置：島津製作所製 LKB—9000型，データ処理システム (GC—MASPAC—300) を使用した．

試験溶液の調製

試料を 80%*n*-プロパノールに溶かし，LAS ならびに ABS 標準溶液の 1～5 倍程度に相当するように希釈し，これを試験溶液とする．

ブロム誘導体標準溶液の調製

1) アルカリ熔融

LAS ならびに ABS 標準溶液を 2 倍希釈した溶液 1 m*l* を中型試験管に正確にとり，これに水酸化カリウムの結晶 3 g と沸騰石を加える．はじめバーナーの炎で試験管の底をおだやかに加熱し，試験管内の溶媒を揮散させる．加熱をさらにつづけて水酸化カリウムを熔融状態 (310°—330°) として，約 4 分間保ち，この間試験管内を十分に振り混ぜる．冷後，水 20 m*l* を用いて内容物をビーカーに洗い込み，これにメチールレッドを指示薬として，注意しながら希硫酸で中和を行ない，さらに希硫酸 2 m*l* を加え液性を酸性とする．100 m*l* 分液ロートにこのビーカーの内溶液を移し，ビーカー内を少量の水で洗い，洗液をさきの分液ロートに合する．さらに塩化メチレン 20 m*l* を加えて振り混ぜ，塩化メチレン層と水層を分け，水層をさらに塩化メチレン 10 m*l* ずつを用いて 2 回くり返し抽出を行なう．つぎにこの抽出液を合し，水 20 m*l* で 2 回洗ったのち無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し，再度ビーカーに移し，冷風で溶媒を留去して残留物を得る．

2) ブロム化

前項 1)の残留物にエタノール 2 m*l* を加えて溶かし，Br_2—KBr 溶液 1 m*l* を加え，振り混ぜてから，冷風で溶媒を留去し残留物を得る．これにアセトン 1.0 m*l* を加えて溶かし，これをブロム誘導体の標準溶液とする．

試験操作

試験溶液 1 m*l* をとり，ブロム誘導体として下記の条件に従い，水素炎イオン化型検出器を用いたガスクロマトグラフィー (FID—GC) ならびに電子捕獲型検出器を用いたガスクロマトグラフィー (ECD—GC)

によって LAS および ABS の定性ならびに定量を行なう.

すなわち LAS および ABS 2.0—20.0 mg を含む各濃度範囲の標準溶液をとり，ブロム誘導体の標準溶液の調製の項に従って操作し，FID—GC によって，そのガスクロマトグラムから LAS および ABS の定性を行なう，一方，LAS と ABS のガスクロマトグラムより相互に重ならないところのピークをえらび，その波高から検量線を作製し，この濃度範囲に相当する試験溶液の一定量をとり，全く同様に操作してブロム誘導体としたもののピーク波高から定量を行なう．なお ECD—GC については FID—GC におけるブロム誘導体とした試験溶液ならびに標準溶液を約5000—10000倍すなわち 0.4—2.0 μg/ml に希釈して操作する.

i) FID—GC 測定条件

カラム：2% Silicone OV—101 Chromosorb W AW, DMCS 60—80メッシュ，3 mm×1 m, 温度210°

検出器：水素炎イオン化型，水素 50 ml/min, 空気 1.1 liter/min, 温度 240°

キャリヤガス：窒素 58 ml/min

感　度：8×10^2

記録計：記録紙速度 5 mm/min

注入量：5 μl

ii) ECD—GC 測定条件

検出器：電子捕獲型，線源^{63}Ni，温度 240°

注入口温度：240°

他は FID—GC 測定条件と同じ条件で行なった.

結果および考察

LAS ならびに ABS のアルキルフェノール化ならびにブロム化等について検討したが両者ともほぼ同様の挙動を示すため，以下 LAS を中心に記載する．なおアルキルフェノール化，ブロム化の生成率等の基礎的条件の検討にあたっては便宜上 FID—GC 法を主として用いた.

アルカリ熔融によるアルキルフェノール化

1) アルカリ熔融試薬

LAS のベンゼン核に結合しているスルホン基を水酸基にもっとも良く置換し得る試薬を選択することを目的とし，つぎの方法によって検討した．試験管に LAS 標準溶液 (10 mg/ml) 1 ml とアルカリ熔融試薬またはその混合した試薬 3 g をとり，以下ブロム誘導体標準溶液の調製の項に従ってアルカリ熔融，ブロム化を行ない，その試験溶液について操作法に従って定量した．その結果を Table 1 に示した．水酸化カリウムと水酸化ナトリウムとでは芳香族スルホン基を水酸基に置換する態度が異なることを Wagner[11]らが報告しているので，水酸化カリウム，水酸化ナトリウム各単独，またさらにこれらを混合した試薬条件において熔融したところ，これらの試薬では水酸化カリウムが最も高いブロム誘導体の収率を示した．他のアルカリ熔融剤として水酸化リチウムと水酸化カリウムの混合または水酸化リチウム単独あるいは水酸化カリウムと水酸化カリシウムの混合条件ではほとんどブロム誘導体は得られないことが認められたので，アルカリ熔融剤は水酸化カリウムとした.

2) 水酸化カリウム試薬量

アルカリ熔融に必要な水酸化カリウムの量を検討した．LAS 標準溶液(10 mg/ml) 1 ml に水酸化カリウム 0.1 g—4.0 g 量を加え，以下，前項 1)と同様に操作して定量したところ，Fig. 1 に示す結果が得られた．LAS ブロム誘導体量は水酸化カリウム 2 g—4

Table 1 Effect of Reagents for Alkaline Fusion

Reagent	ratio	Found (mg)	Recovery (%)
Potassium hydroxide		9.48	94.8
Sodium hydroxide		1.05	10.5
Potassium hydroxide-Sodium hydroxide	3 : 1	8.03	80.3
Potassium hydroxide-Sodium hydroxide	1 : 1	6.29	62.9
Potassium hydroxide-Sodium hydroxide	1 : 3	4.63	46.3
Lithium hydroxide		(—)	(—)
Potassium hydroxide-Lithium hydroxide	3 : 1	0.51	5.1
Potassium hydroxide-Calcium hydroxide	3 : 1	(—)	(—)

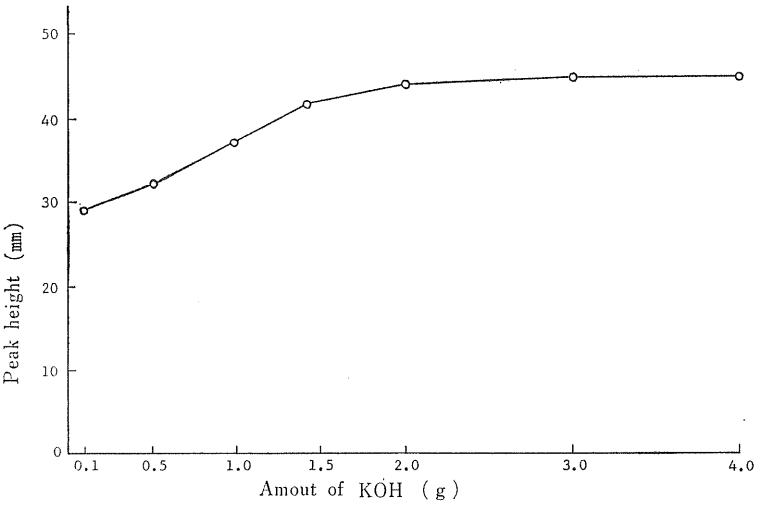


Fig. 1 Effect of Amount of Potassium Hydroxide for the Alkaline Fusion Reaction

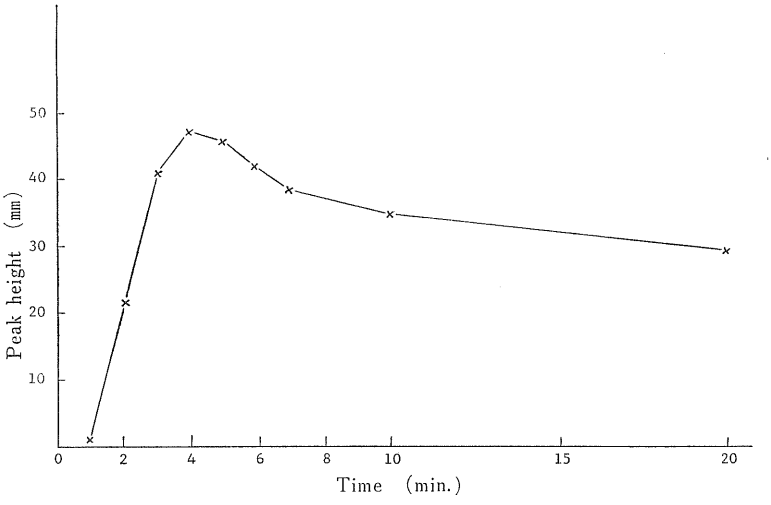


Fig. 2 Effect of Reaction Time for the Alkaline Fusion Reaction

でほぼ一定になったので，中和操作のしやすい 3 g を用いることとした．

3) アルカリ熔融温度

LAS 標準溶液 (10 mg/m*l*) 1 m*l* に水酸化カリウム 3 g をとり，試験管内温度を200°—350° にして，約 4 分間加熱し，前項 1)と同様に操作して定量したところ，その熔融至適温度は310°—330°で最大の収量を示したので，この条件で操作することとした．

4) アルカリ熔融時間

LAS 標準溶液 (10 mg/m*l*) 1 m*l* に水酸化カリウム 3 g をとり，310°—330°を熔融温度とし，前項 1)と同様に操作して経時的に定量したところ，Fig. 2 から明らかなように 4 分間を中心に LAS ブロム誘導体生成量が増加することを認めた．したがって熔融時間は約 4 分間とした．

5) 反応促進補助剤の検討

さきに山口[12]はアルカリ熔融に際してクロム酸カリウム，硝酸カリウム，酸化鉛，酸化銅，炭酸カリを用い，Kirk[13]らは過塩素酸ナトリウム，Buzbee[14]は硝酸銀，塩化ナトリウムを用いることで反応が容易になることを報告している．

そこで反応をさらに促進させる補助剤について検討

Table 2 Effect of Alkaline Fusion Reaction with Alcoholic Reagents

Reagent	m*l*	Weatr (m*l*)	Fond (mg)	Recovery (%)
		1.0	9.16	91.6
Methanol	0.8	0.2	8.74	87.4
Ethanol	0.8	0.2	9.61	96.1
n-Propanol	0.8	0.2	9.84	98.4
n-Buthanol	0.8	0.2	7.68	76.8
iso-Pentanol	0.8	0.2	8.24	82.4

した．Table 2 はアルコール系溶媒，Table 3 は無機化合物を示し，LAS 100.0 mg を水 10.0 m*l* に溶かした液 1 m*l* にそれぞれ一定量を加えた．前項 1)に従い定量した結果，Table 2 に示すように *n*-プロパノールが反応促進補助剤としてもまた溶剤としても優ぐれているので，以下*n*-プロパノールを用いることとした．

6) アルカリ熔融生成体の抽出条件

① 抽出時における pH の影響

アルカリ熔融したのち，水に溶解した液を有機溶媒

Table 1 Effec of Alkaline Fusion Reaction with Inorganic Reagents

Reagent	(mg)	Found (mg)	Recovery (%)
1. Potassium carbonate	500	8.00	80.0
2. Sodium carbonate	500	8.19	81.9
3. Potassium nitrate	500	7.65	76.5
4. Potassium chromate	100	8.28	82.8
5. Potassium chlorate	100	8.21	82.1
6. Sodium borate	100—2,000	8.03	80.3
7. Iron powder	100	8.51	85.1
8. Ferric chloride, anhydrous	200	7.41	74.1
9. Lead monoxide	100	8.01	80.1
10. Lead peroxide	100	7.53	75.3
11. Cupric oxide	100	7.19	71.9
12. Silver nitrate	300		
Sodium chloride	300	(—)	(—)

で抽出する際の pH の影響を調べた，その結果を Fig. 3 に示す，中性ならびにアルカリ性側ではアルカリ熔融生成体の抽出率が10%ほど低下するが，pH 1-3 の酸性範囲ではほとんど完全に抽出されることが明らかになった．そこで，pH 3 以下の酸性側で抽出することにした．

② 抽出溶媒の選択

①の液性で抽出するときの有機溶媒について検討した．すなわち，*n*-ヘキサン，ベンゼン，石油エーテル，エーテル，クロロホルムおよび塩化メチレンを用いそれぞれアルカリ熔融生成体を抽出したところ，いずれの溶媒を用いても完全に抽出し得ることが認みられた．しかし分離操作上下層にきて，かつ揮散しやすいため取扱いやすい塩メチレンを抽出溶媒に選んだ．

アリカリ熔融生成体のブロム化試薬

アルカリ熔融生成体のブロム化はもっとも容易に核置換反応し，ブロム誘導体の高い収率で得られるような溶媒等を異にする種々のブロム溶液について検討した．LAS 10 mg から得た生成体に Table 4 に示すブロム溶液 1 m*l* を加え，前項 1)に従い定量したところ，臭素-臭素カリウム溶液が良い収量を与えたので，以下ブロム化反応にはこの溶液を採用した．

ガスクロマトグラフィーによる分離分析

1) GC 法におけるカラム液相の選択

GC 法で LAS と ABS が分離判明することが可能なカラムを見い出すために検討した．LAS, ABS のブロム誘導体標準溶液について FID—GC の操作法に従い液相について比較した．カラムは SE—30 (2%), OV—1 (2%), OV—101 (2%), OV—210 (2%), PEG 20 M (2%), DEGS (10%), FFAP (2%), Chromosorb 103 計 8 種を用い，それぞれ最適カラム温度(恒温)に設定した．

その結果 FFAP, Chromosorb 103 のカラムはピークを検出できず，DEGS, OV-210 は LAS, ABS 誘

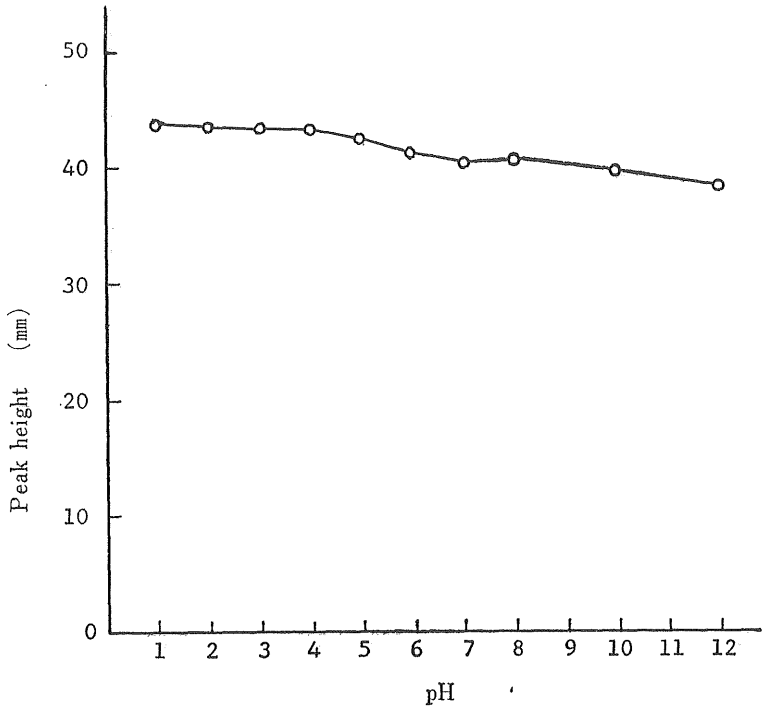


Fig. 3 Effect of pH for the Extraction of Alkylphenols

Table 4 Solvent Effect to the Bromination of Alkylphenols

Bromination agent	Found (mg)	Recovery (%)
Bromine saturated aqueous soln.	7.36	73.6
Bromine carbontetrachloride soln. (5%)	5.89	58.9
Bromine ethylaclcohol soln. (5%)	6.48	64.8
Bromine acetic acid soln. (2%)	8.33	83.3
Bromine-Potassiumbromide aqueous soln. (16%—10%)	9.53	95.3

導体の示す肩ピークの分離が悪く，他のシリコン系カラムと PEG 20 M は良く分離したピークパターンを示すが，最もLAS ピークとABS ピークが離れて，さらに ECD—GC 法でも適用可能なカラムとしてOV—101 を用いることとした．

2) クロマトグラムならびに検量線の作製

LAS および ABS につき前項測定条件に従い操作して得た FID—GC ならびに ECD—GC によるクロマトグラムを Fig. 4 に，また検量線を Fig. 5 に示した．

LAS では比較的よく分離した No. 1—No. 4 ピークを認め，一方 ABS はあまり分離のよくない No. 5 と 6 ピークが認められた．しかし前者のNo. 3，4 ピークは後者の No. 5，6 と保持時間を異にし，若干ピークの裾がかさなるがほぼ完全に分かれ，No. 6 に対する No. 3，4 の相対保持時間は1.24，1.66を示し，求めた波高の和と濃度は Fig. 5 に示すとおり原点を通り，かつ直線性を得た．なお ECD—GC において多少ピーク強度を異にするが，FID—GC と同じピークをえらんで検量線を作製した．

3) LAS 定量時における ABS の影響

LAS ブロム誘導体を GC 法に用いて定量するとき，得られたクロマトグラムが ABS のクロマトグラムと一部重複することはすでに記したが，LAS 定量

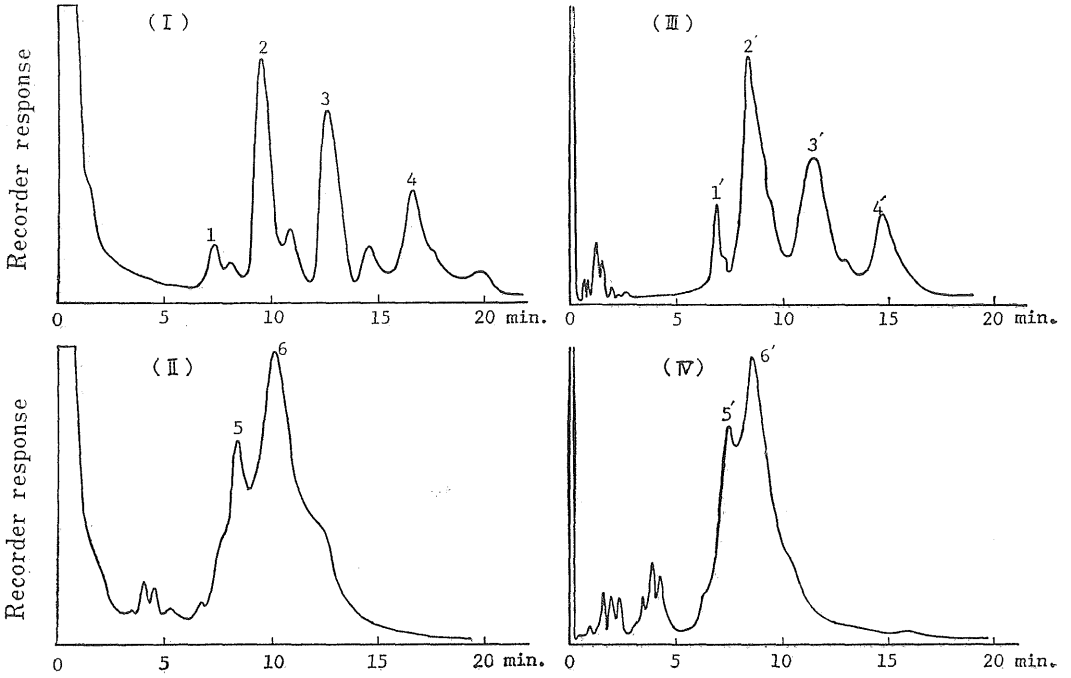


Fig. 4 Gas Chromatograms of Derivatives from Liner and Branched Type Detergents
Ⅰ : LAS derivative, liner dibromoalkylphenols, FID—GC
Ⅱ : ABS derivative, branched dibromoalkylphenols, FID—GC
Ⅲ : LAS derivative, liner dibromoalkylphenols, ECD—GC
Ⅳ : ABS derivative, branched dibromoalkylphenols, ECD—GC

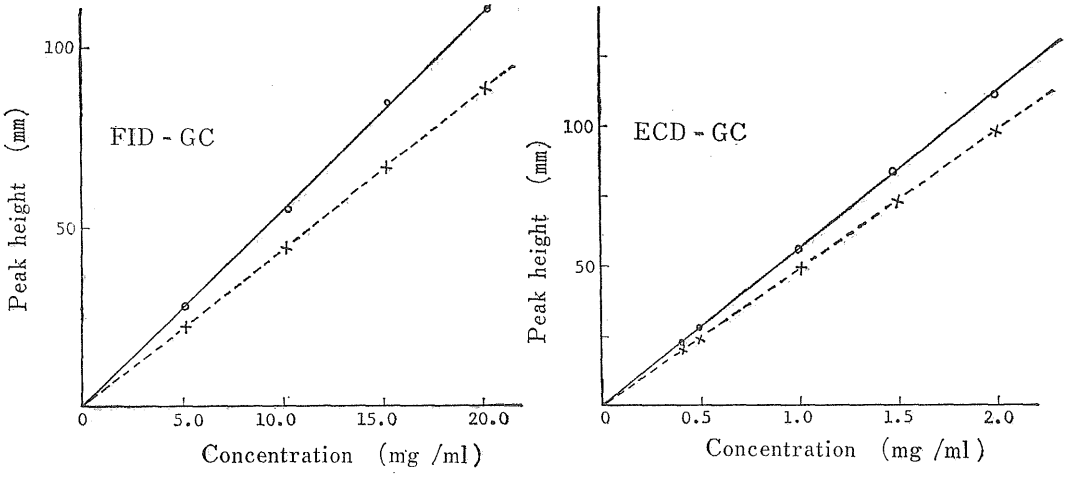


Fig. 5 Calibration Curves of Derivatives from Liner and Branched Type Detergents by FID and ECD—GC
×·····× : LAS ○——○ : ABS

Table 5 Effect of LAS Recovery to Various Concentration of ABS

LAS (mg)	Added ABS (mg)	LAS found (mg)	LAS recovey (%)
10.0	0.0	10.0	100.0
10.0	5.0	10.1	101.0
10.0	5.0	9.9	99.0
10.0	8.0	10.32	103.2
10.0	10.0	10.49	104.9
10.0	20.0	11.07	110.7
10.0	50.0	12.81	128.1

値に実際に影響を及ぼす ABS 濃度を求めるために検討した.

LAS 標準溶液 1 m*l* をとり, ABS 標準溶液0—5.0 m*l* をさらに加えて, 以下操作法に従い FID により定量した. その結果を Table 5 に示した. LAS 10 mg は ABS 8 mg を添加されると LAS 定量値は約3%のプラスの影響を与え, さらに ABS 濃度が増すのにともないプラスの誤差が大きくなることが認められ, LAS を 1.0 としたときの ABS の割合が0.8以下であれば正確に定量できた.

4) FID—GC と ECD—GC 法による検出感度

LAS ブロム誘導体試験溶液を *n*-ヘキサンで希釈し 2 mg/m*l* から 0.1 mg/m*l* 濃度として, FID—GC を行なったところ, ピークとして判別できる濃度は 0.5 mg/m*l* であり, ECD—GC は 0.4ng/m*l* の濃度までピークが検出され, 約 1,200 倍の検出感度の上昇が認められた. LAS は本法のブロム化反応をすることによって高感度に検出できた.

また ABS についても, そのブロム誘導体標準溶液を希釈して ECD—GC を行なったところ, ほぼ LAS と同様の濃度に検出感度が上昇することが認められた.

LAS を直接熔融できる濃度の検討

本操作法で適用できる LAS 濃度について検討した. LAS 標準溶液を80%プロパノール溶液で希釈し, 1 m*l* 中 LAS 1.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 ng 濃度に調製し, 各 1 m*l* を別々の試験管にとり, 以下ブロム誘導体標準溶液の調製の項に従い試験溶液を得た. これを必要ならば *n*-ヘキサンで希釈し ECD—GC 法によって定量したところ, 1.0—50.0 ng では検出できず, また 100.0 ng でもわずかにピークを検出するにとどまった. そこでドデシルフェノール 10 ng をとり, ブロム化のみの操作を行なった. その生成量を ABS のブロム標準溶液を基準として定量したところ, ほとんど100%近い収率を示した. このことからブロム化反応は微量のフェノール体に対しても定量的に反応するが, アルキルベンゼンスルホン酸類のアルカリ熔融反応に未だ問題があり, 微量だあと反応中における器具等への吸着, あるいは副反応がおこり, 収率が急速に低下することが考えられる.

ガスクロマトグラフ質量分析法による確認

LAS ならびに ABS ブロム誘導体について GC—MS 法によって測定し, GC—MS 装置のトータルイオンモニターによって記録されるガスクロマトグラム (以下 TICM クロマトと略す) とこの TICM クロマトの示す個々のピークの各マススペクトル (以下 MS と略す) を求め, 分子イオンピークとフラグメントピークから分子量, 元素組成式および化学構造を推定した. つぎにその測定条件を示す.

カラム : 2% Silicone OV—101 を充塡したガラスカラム (3 mm×2 m), 温度190°から240°, 4°/minで昇温

キャリヤガス : ヘリウム, 30 m*l*/min

検出器 : 全イオンコレクター (TIC)

試料注入口 : 温度 250°

セパレーター : 温度 270°

イオン源 : 温度 290°

イオン加速電圧 : 3.5 KV

イオン化電圧 : 20 eV (TIC), 70 eV (MS)

トラップ電流 : 60 μA

出口およびコレクタースリット : 0.1 mm

TIC 記録計 : 2 mV, 記録紙速度, 10 mm/min

注入量 : 2 μl

1) TICM クロマトグラム

そこで測定用試験溶液としては A : LAS アルカリ熔融生成体のアセトン溶液, B : LAS ブロム誘導体試験溶液, C : ABS アルカリ熔融生成体のアセトン溶液, D : ABS ブロム誘導体試験溶液の 4 種とした. Fig. 6 にこれらの TICM クロマトを示す.

A—TICM クロマトは a—j の10ピークを認め, B は a—l の12ピークで2ピーク増し, Aの c, f, h の主ピークには認められない肩ピーク d, g, j が表われ, LAS ブロム誘導体とすることで分離能が良くなったことを認めた. また保持時間は A—C ピークに対する B—C ピークは 2.00倍, A—f に対する B—f は 1.84, A—h に対する B—i は1.76倍移動することが認められた. C, D クロマトは主ピーク C—i, D—h を示し, A, B 直鎖型と C, D 分枝型アルキルベンゼンスルホン酸は GC—MS の TICM クロマトでも判

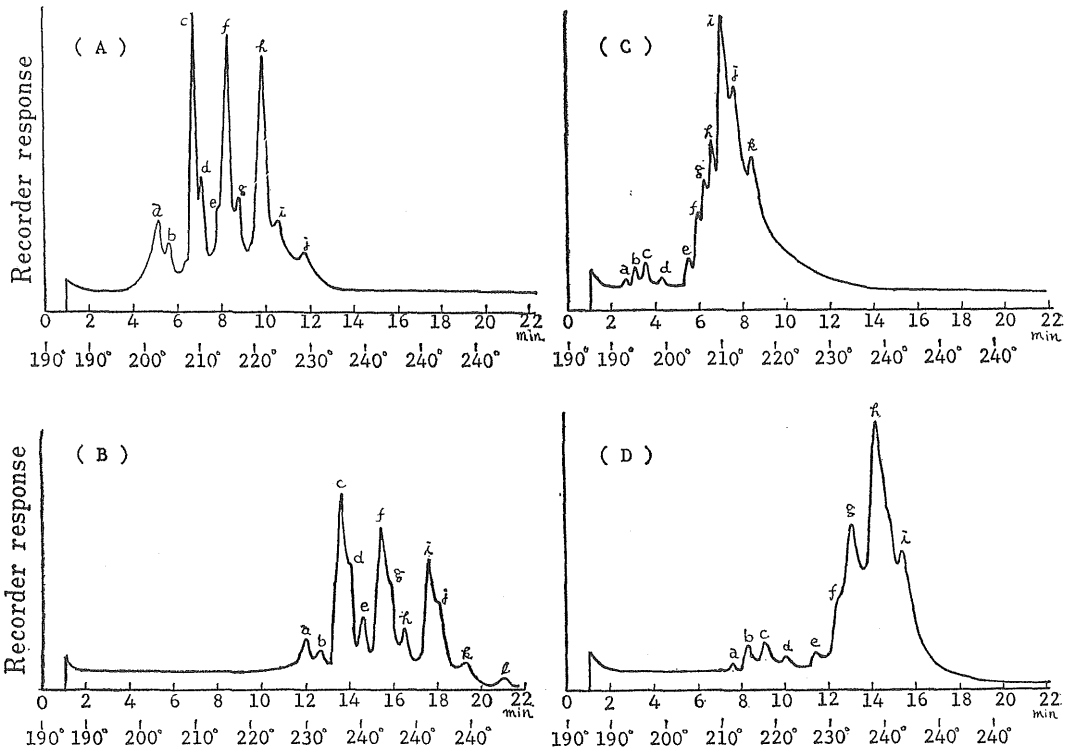


Fig. 6 TICM Chromatograms of Derivatives from Liner and Branched Type Detergents by GC—MS

A : LAS derivative, liner alkylphenols
B : LAS derivative, liner dibromoalkylphenols
C : ABS derivative, branched alkylphenols
D : ABS derivative, branched dibromoalkylphenols

別できた.

2) マススペクトル

A—TICM クロマトの各ピークの示す MS を求めたところ，分子イオンピーク (M^+)，基準イオンピーク，フラグメントイオンピークが検出された．これらをつぎに示す.

A—a ピーク：m/e 235(2.1%), 234(12.5%)(M^+), 233(2.0%), 177(23.2%), 163(31.8%), 108(9.5%), 107(100.0%)

A—b ピーク：m/e 235(2.0%), 234(9.0%)(M^+), 205(11.5%), 191(7.5%), 177(7.8%), 163(10.0%), 135(35.0%), 121(7.5%), 107(100.0%)

A—c ピーク：m/e 249(2.0%), 248(12.0%)(M^+), 191(17.0%), 177(20.0%), 163(24.5%), 149(8.8%), 135(5.4%), 121(10.0%), 108(11.0%), 107(100.0%)

A—f ピーク：m/e 263(1.8%), 262(9.8%)(M^+), 219(4.9%), 205(12.5%), 177(20.4%), 163(23.0%), 149(8.0%), 135(15.3%), 121(17.0%), 108(12.0%), 107(100.0%)

A—g ピーク：m/e 263(2.0%), 262(10.0%), 248(5.5%), 233(6.0%), 219(7.5%), 205(7.5%), 191(6.3%), 177(8.3%), 163(11.0%), 149(17.5%), 135(26.0%), 121(61.0%), 107(100.0%)

A—h ピーク：m/e 277(1.5%), 276(7.2%)(M^+) 233(4.7%), 219(9.0%), 205(12.0%), 191(16.0%), 177(15.5%), 163(18.0%), 149(7.7%), 135(17.0%) 121(22.0%), 107(100.0%)

A—j ピーク：m/e 277(1.4%), 276(7.5%)(M^+), 262(4.8%), 247(2.0%), 233(8.5%), 219(7.3%), 205(6.5%), 191(8.5%), 177(9.5%), 163(14.7%), 149(18.7%), 121(65.2%), 107(100.0%)

これらのことからそれぞれのピークはつぎの元素組成式と分子量が得られた.

A—a, b ピーク, $C_{16}H_{26}O$, 分子量 234

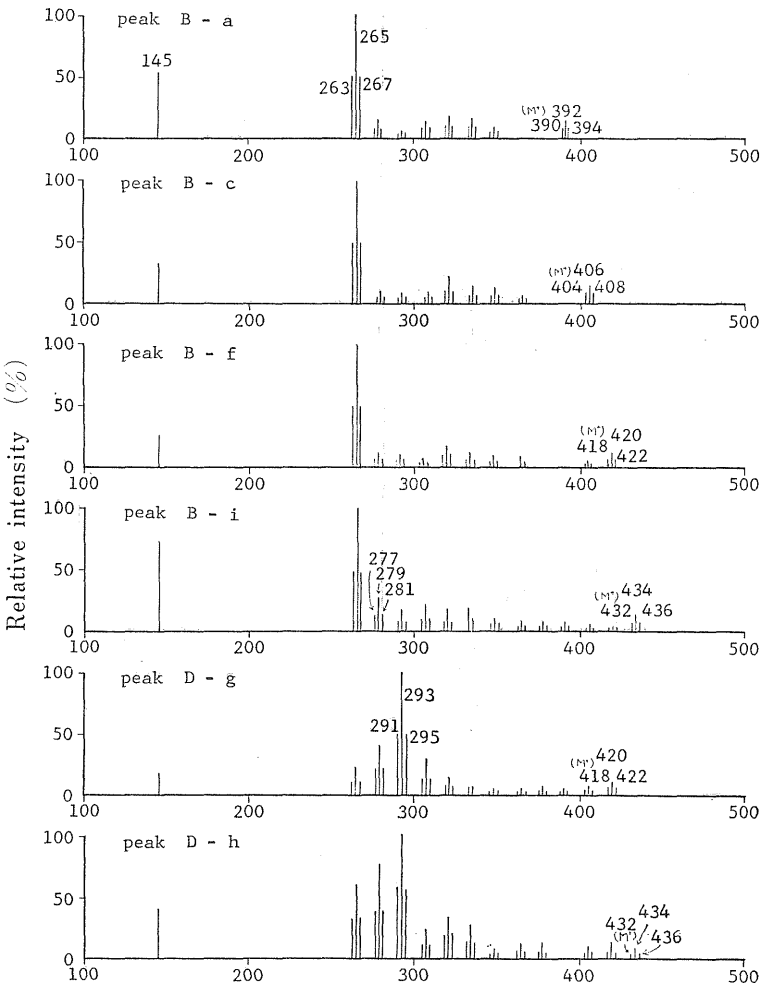


Fig. 7 Mass Spectra of Peak (B—a, c, f, i, D—g, h)

A—c, d ピーク, $C_{17}H_{28}O$, 分子量 248

A—f, g ピーク, $C_{18}H_{30}O$, 〃 262

A—h, i ピーク, $C_{19}H_{32}O$, 〃 276

つぎに B—TICM クロマトの示す各ピークの MS を求め, 代表的な B—a, c, f, i ピークの MS を Fig. 7に示した. これらの MS を解析したところ, つぎの元素組成式と分子量が得られた.

B—a, b ピーク, $C_{16}H_{24}OBr_2$, 分子量392

B—c, e ピーク, $C_{17}H_{26}OBr_2$, 〃 406

B—f, h ピーク, $C_{18}H_{28}OBr_2$, 〃 420

B—i, k, l ピーク, $C_{19}H_{30}OBr_2$, 〃 434

また A, B—TICM クロマトから直鎖アルキル基の炭素数とその炭素のどの位置にフェニル核 (ϕ) が結合しているかをフラグメントイオンピークが示す特性イオンの α-開裂から解析したところ, つぎのことが判別できた.

A—a, B—a ピーク, 炭素数 10, 2ϕ

A—b, B—b ピーク, 〃 10, 2ϕ, 4ϕ

A—c, B—c ピーク, 〃 11, 2ϕ,

A—d, B—e ピーク, 〃 11, 2ϕ, 3ϕ, 4ϕ

A—f, B—f ピーク, 〃 12, 2ϕ

A—g, B—h ピーク, 〃 12, 2ϕ, 3ϕ, 4ϕ

A—h, B—i ピーク, 〃 13, 2ϕ, 3ϕ, 4ϕ, 5ϕ

A—i, B—k, l ピーク, 〃 13, 2ϕ, 3ϕ, 4ϕ

以上のことから例えば A—f ピーク, $C_{18}H_{30}O$ は炭素数12のドデシル基 $C_{12}H_{25}$ を除くと C_6H_5O が得られ, C_6H_4OH (o, p 位は不明) のフェノール核を認め, $C_{12}H_{25}$・C_6H_4OH, ドデシルフェノールと確認し

た.

そこでAとB—TICM クロマトの全てのピークについて同様に解析したところ，Aは炭素10—13数の直鎖アルキルフェノール，BはAのブロム誘導体でジブロムアルキルフェノールと確認でき，LAS はそのベンゼン核のスルホン基を水酸基と，ベンゼン核の水素2コが臭素2コで置換されていることが認められた.

つぎに C, D—TICM クロマトから得られる MS を A, B と同様に解析したところ，C—e から i ピーク，D—e から hピークまでアルキル基の炭素数は12，C—j, h, D—j は炭素数13を示し，C はアルキルフェノール，Dはジブロムアルキルフェノールと判別でき，ABS も LAS と同様に水酸基と臭素2コが置換されていることを認めた．また Fig. 7 に D—g, h ピークの MS を示した.

さらにドデシルフェノールブロム化標準溶液について GC—MS 法を行なったところ，TICM クロマト，MS は ABS ブロム誘導体のそれらとよく合致した．またアルキル基に結合するフェニル基の位置は Boyer[15]が報告するように4級炭素があるため判別できなかった.

ま と め

合成洗剤中のアルキルベンゼンスンホル塩酸のガスクロマトグラフィーを用いる特異的な定性ならびに定量法を検討した.

アルキルベンゼンスルホン酸塩は水酸化カリウムとともに310°—330°で4分間アルカリ熔融するとアルキルフェノールを生成する.

このアルキルフェノールはブロム溶液を添加することによって容易にジブロム誘導体に変化した.

このブロム誘導体は電子捕獲型検出器を用いるガスクロマトグラフィーによって高感度 (0.4 ng/ml) で定量することができる.

また直鎖型 (LAS) と分枝型 (ABS) アルキルベンゼンスルホン酸塩を判別することが可能である.

謝 辞

本研究にあたり標準品の入手について便宜をいただいた花王石ケンK. K.ならびにカロナイト化学K. K.に謝意を表します.

〔付記〕本研究は昭和48年度当研究所研究課題「ソフト型合成洗剤の微量分析法の設定とその安全性の評価に関する研究」として実施したものである.

文 献

1) Longwell, J. and Maniece, W.D. : *Analyst*, 80, 167—171(1955)
2) Abbott, D.C. : *Analyst*, 87, 286—293(1962)
3) 安部喜也，半谷高久：分化，21，252—256 (1972)
4) 神原富民，長谷部清：分化，14，491—495 (1965)
5) Swisher, R.D. : *Journal WPCF.*, 35, 877—891(1963)
6) 橋本茂，徳若 博，永井敏雄：分化，22, 559—563(1973)
7) 永井敏雄，橋本 茂，森 昭：工化，73, 1968—1970(1970)
8) 渡辺重信：第10回全国衛生化学技術協議会 (1973)
9) Rosen, M. T. and Goldfinger, G.C. : *Anal. Chem.*, 28, 1979—1981(1956)
10) 原田裕文，観 照雄，鈴木助治，水石和子，戸谷哲也：東京衛研年報，22，159—166(1970)
11) Wagner, R. B. and Zook, H. D. : *Synthetic Organic Chemistry*, 3 rd Ed., 167—167(1961) John Wiley & Sons., New York
12) 山口誠太郎：実験有機化学，9, 638—647(1944) 南江堂出版
13) Kirk, R.E. and Othmer, D.F. : *Encyclopedia of Chmical Technology*, 1, 463—465(1960) Interscience Encyclopedia, New York
14) Buzbee, L. B. : *J. Org. Chem.*, 31, 3289—3292(1966)
15) Boyer, E. W., Mamming, H. C. and Ford, H. T. : *Anal. Chem.*, 35, 1168—1171(1963)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 175 — 186, 1974

化粧品カブレ等による事故検体の品質，性状について

水石和子* 風間成孔* 中村義昭*
山添律子* 戸谷哲也*

Investigation of Qualities and Properties of Cosmetics as Cause of mainly Damage to Human Skin

KAZUKO MIZUISHI*, MASAYOSHI KAZAMA*, YOSHIAKI NAKAMURA*,
RITSUKO YAMAZOE* AND TETSUYA TOTANI*

This work reported here was undertaken to survey the cosmetics which produced damage to human skin,hair and eyes.

The number of the cosmetic subjects reported from residents in Tokyo from April 1971 to March 1973 and investigated here was 82.

The clinical symptoms caused by cosmetics were diagnosticated as contact dermatitis, contact photodermatitis, seborrhoeic dermatitis, alopecia and conjunctivitis.

Classification and the number of cosmetics reported is as follows ; basic cosmetics (39), makeup cosmetics (8), hair preparations (15), cold wave lotions and hair dyes (6) and the others (14).

It was recognized from this data that basic cosmetics produced diseases most.

All substances were applied for patch test according to designed Draize's method using male rabbits. Cleansing cream, shampoo and hair rinse proved positive irritant action on rabbits skin, and the others showed negative.

Harmful heavy metals such as As, Pb and Cd were not detected from all these substances.

There are many components of cosmetics that cause problems for human skin : for instance, basic materials, surfactants, preservatives, dyes, perfumes and so on.

It cannot be generalized that the components are only the immediate cause of diseases, such factors as sensitizing, constitution, ultraviolet ray, psychiatric disorder and wrong use also have an important relationship to diseases.

はじめに

化粧品の普及率は年々めざましく上昇し，その種類も変化，増加している．また各人が使う化粧品も多種多様である．一方，化粧品はその性格上医薬品と異なり，極めて長期間継続的に使用されるものであるから，経皮吸収などの点からも健康障害に関係するが，特に皮膚障害の関係は視覚的に認識が一見容易なところから，真の要因は別にしても多くの問題が提起されている．

* 東京都立衛生研究所理化学部微量分析研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

そこで，最近の化粧品による皮膚障害等の実状を知るため，昭和46年4月から48年3月の間に都民が東京都薬務部に届け出た化粧品による苦情にもとづき，その化粧品の種々の内容を調査把握し，若干の考察を試みた．すなわち，届け出化粧品の品質，性状調査，Draize 法によるパッチテストを行ない[1]，また，化粧品の消費動向，化粧品によると思われる皮膚の障害の症状および事故化粧品の種類，外観，処方内容（基剤，界面活性剤，防腐剤，色素，香料などの成分），pH などとその症例の関連性について考察を行なった．さらに起炎性物質を含むものとして特に注目されている香料原料の Bergamot 油を用いてウサギに対するパッチテストを行なった結果についても，あわせて報告する．

実験方法

試料 届け出化粧品82種目，Bergamote Residues "D"（ルール・ベルトランド・デュポン社）池田物産

試薬 特にことわりのない限り，和光純薬K.K.の試薬特級を用いた．硫酸，硝酸およびアンモニア水は精密分析用を用いた．

装置 pH メーター：Beckmann ガラス電極 pH メーター，原子吸光分析装置：Perkin-Elmer Atomic Absorption Spectrophotometer Model 403 紫外線ランプ：PAN—UV ランプ PUV—1A 型広領域紫外線（250—400 nm）4W×2本，フィルター寸法75×45 mm東京光学機械K.K.，動物用バリカン：TN式小動物電気バリカン（スカイブ900）大東電気工業K.K.製

実験動物 ウサギ（アンゴラ種）体重約2.5 kg，雄

固型試料 オリエンタル酵母K.K.製飼育用RC—4

実験操作 i） pH の測定 液状検体はそのまま，固体検体は 1 g を精製水 50 m*l*，または精製水25 m*l* およびエタノール25 m*l* に懸濁して，ガラス電極 pH 計で測定する．

ii） 鉛，ヒ素，カドミウムの定量 雨宮[2]らの方法に従う．

iii） ホルムアルデヒド，メチルアルコールの定量 衛生試験法（日本薬学会編）香粧品試験法[3]に従う．

iv） ウサギを用いたパッチテスト 前記実験動物の項に記したアンゴラウサギ3匹を1群として，その背部に背柱を境に両側に3ヵ所ずつ5×5 cmの大きさに，バリカンで毛を刈りとる．一日放置後バリカンによる物理的な刺激が消失し，皮膚に異常が認められないことを確認したのち，施行者の側から相対するウサギの頭部より見て，背柱の左半分の3ヵ所に試料を，右半分の3ヵ所に対照として10%エタノールまたは生理食塩液を塗布する．クリームなど半固体状のものは 0.5 g，乳液，化粧水など液状のものおよび Bergamot 油は 0.5 m*l* を除毛部に塗布し，20秒間指でまんべんなく擦り込む，24時間後，皮膚の状態を観察し，評価点を与える．判定後，さらに試料をそれぞれの部分に塗布する．この操作を1日1回，7日間連続して行なう．（ただし Bergamot 油塗布の場合は，その部位に毎回紫外線照射を20分間行なう）さらに1週間そのまま放置し，この間の経過を観察する．

評価点は Table 1 に示すように(1) 発赤（紅斑）と痂皮形成，(2)浮腫の程度に応じて点数を与え，(1)と(2)の点数の合計点をもって刺激の強度を示すものとする．24時間毎における3ヵ所の点数の平均値を求め，評価点が2以下の場合刺激作用は mild，2—5 の場合は moderate，5以上の場合は severe と判定する．

調査事項と結果

対象：はじめに述べた，東京都衛生局薬務部に都民から届け出された苦情品を主な対象とした．苦情件数は47件で，対象検体数は82，そのうち17品目は東京都消費生活対策室が消費者モニター1000人を対象にアン

Table 1 Evaluation of Skin Reactions

	Score[a)]
(1) Erythema and Eschar Formation	
No erthema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Total possible erythema score	4
(2) Edema Formation	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)	4
Total possible edema score	4

a) Test results according to the Draize scoring system for primary irritation tests on rabbits

Table 2 Diagnosis of Disease Caused by Cosmetics

Diagnosis	Cosmetics
Contact Dermatitis Allergic Dermatitis of Contact Type Toxic Dermatitis Primary Irritant Dermatitis Contact Eczema Contact Photodermatitis Contact Photodermatitis of Lipstics	Cleansing Cream, Hair Dye, Emollient Lotion, Milk Lotion, Pressed Powder Cake, Hair Lacquer, Shampoo, Hair-setting Lotion, Hair Spray, Hair Cream, Hair Rinse, Color Spray, Suntan Oil, Tooth Paste, Lipstick, Perfume
Seborrhoeic Dermatitis	Cleansing Cream, Hair Liquid
Alopecia Alopecia Areata Alopecia Symptomatica Alopecia Generalized	Hair Bleach, Hair Color, Shampoo
Conjunctivitis	Milk Lotion

ケート調査したところ被害の訴えが多かったため，消費生活対策室から送られてきた化粧品であり事故検体というわけではない．

苦情者：75% (36/47) は女性，8.5% (4/47) は乳児，17.0% (8/47%) が男性であり，女性のうち半数以上は家庭の主婦であった．

事故者の症状：事故者で医師の診断を受けたものは76.6% (36/47) で，それらのほとんどが皮膚科を訪れているが，他に眼科，整形外科，内科の診察を受けていた．診断名として Table 2 に掲げるように接触皮膚炎，急性皮膚炎，主婦手湿疹，脂漏性湿疹，結痂性湿疹，アレルギー性皮膚炎，日光皮膚炎，光アレルギー口唇炎，瀰漫脱毛症，症候性脱毛症，汎発性脱毛症，円形脱毛症，結膜炎，眼瞼結膜炎，アレルギー性結膜炎，薬物性眼瞼結膜炎，その他単に皮膚炎，湿疹，毛髪損傷などがあげられている．医師を訪れなかった事故者の症状は，顔面，耳の後，首，あご，両前腕，腹部，下肢の湿疹，発疹，かぶれ，痛み，痒み，口唇の荒れ，手の荒れ，目の腫れ，ただれなどの訴えがみられた．

化粧品の種類：被害届けのあった化粧品の種類は，基礎化粧品ではクリーム類（バニシング，栄養，マッサージ，コールド，クレンジング），乳液，化粧水，ファウンデーションクリームなど，メークアップ化粧品では白粉（固型，粉型），口紅，アイライナーなど，頭髪剤，染毛剤などではシャンプー，リンス，セットローション，ヘアートニック，ヘアクリーム，ヘアーリキッド，スプレー，ヘアーラッカー，白髪染，ブリーチ，ヘアーカラー，コールドウェーブ液など，薬効化粧品は薬用クリーム，日焼止めクリーム，防虫クリーム，洗眼剤など，その他ベビーパウダー，石けん，歯みがき，クレンザーなどである．Fig. 1 に事故品目と件数を示す．

被害届けの出た化粧品の pH：Fig. 1 に示すとおり，クリーム類は 4.5—9.6，乳液 3.9—8.1，化粧水 4.6—8.0，白粉・ベビーパウダー6.4—8.4，ファンデーションクリーム7.3—7.7，ヘアースプレー・ヘアーリキッド・ヘアートニック・セットローション4.2—7.9，シャンプー 6.3—8.8，リンス2.2，染毛剤Ⅰ剤 9.9—11.4，Ⅱ剤2.7—2.9，コールドウェーブ液Ⅰ液9.0，Ⅱ液7.7，石けん10.4，歯磨7.2—8.1であった．これらのうち固型のものは 1g を水50 m*l* に溶かして測定し，水に難溶のファンデーションクリームは 1g を水，アルコールそれぞれ 25 m*l* の混液に溶かして測定した．

被害の生じた季節：障害発生時を季節別にみると夏，秋がそれぞれ21.5%，次いで春16.9%，冬10.8%でその他は不明であった．

事故検体における有害性物質の有無の試験および品質規格の適合性：有害性物質検査として全事故検体について重金属（鉛，カドミウム），ヒ素，および液体検体についてフェノール，ホルムアルデヒド，メタノール等の試験を行なったところいずれも基準以下であった．さらに，11検体について製品の主な品質規格試験を行なったところいずれも適合した．

事故検体の容器の形態および材質：事故検体のうち

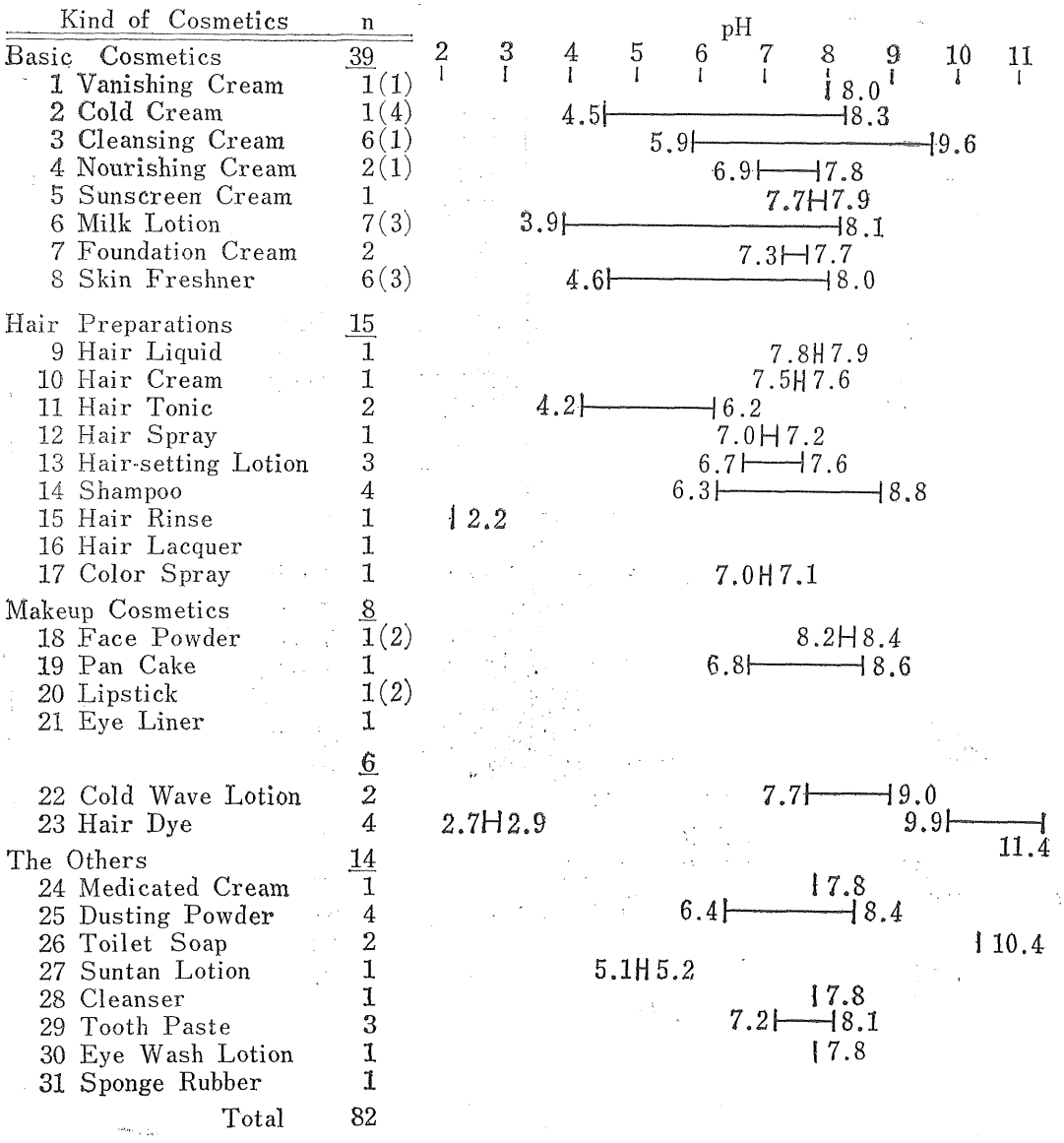


Fig. 1 pH Range of Cosmetics
n=number : Products from Pharmaceutical Affairs Division, Bureau of Public Health, Tokyo Metropolitan Government
( ) : Products from Tokyo-to Consumers Center

クリーム，乳液，化粧水，ファウンデーション，パウダー類，アイライナーなどの入っていた容器の形および材質を Table 3 に示す．

パッチテストの結果：全検体について，Draize の改良法[1]によるウサギの背に対するパッチテストを行なった結果，陽性のものはクレンジングクリーム1検体，ヘアーリンス1検体，シャンプー3検体であった．クレンジングクリーム，シャンプーでは皮膚の肥厚，硬化症状がみられ，リンスでは紅斑が認められた．

考　察

〔化粧品消費の動向〕

化粧品の年間出荷高は増加の傾向を示し，消費支出

Tabl 3 Containers of Cosmetics

Cosmetics	Form	Plastics	Glass	Metal	Paper
Cream	wide mouth bottle	6	7		
	tube	1		1	
Milk Lotion	bottle	1	6		
Skin Freshner	bottle	1	7		
Foundation Cream	wide mouth vessel		1		
	bottle		1		
Face Powder	wide mouth vessel	2			
Dusting Powder		1		2	1
Lipstick				1	

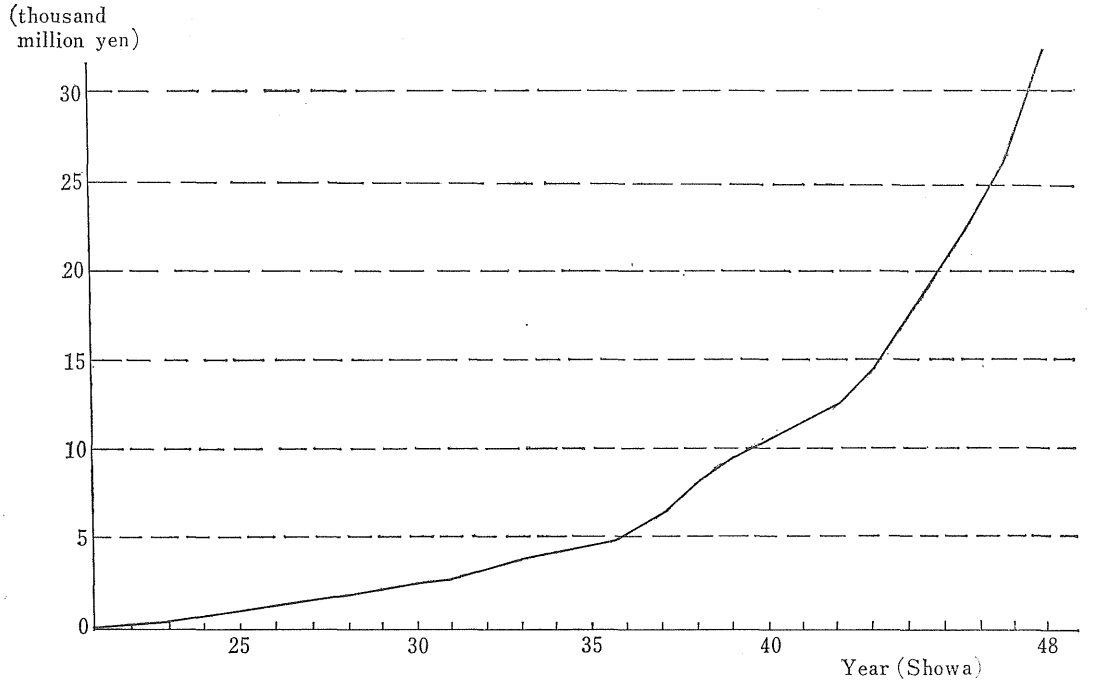


Fig. 2 Forwarding Amounts of Cosmetics[4](Showa 21—48 nen)

に占める化粧品の割合も毎年増えている．(Fig. 2)昭和48年の化粧品出荷高の品目別内訳けは Fig. 3 のとおりであるが，基礎化粧品，メークアップ化粧品が半分以上，次に頭髪用品が約 1/4 の割合で使用されていることがわかる[4]．

〔化粧品による障害〕

このような化粧品の種類や使用量の増加傾向に伴い，化粧品の安全性に対する注意の必要性および化粧品による障害を熟知する必要があるといえる．化粧品が人体におよぼす障害は，経口毒性，経皮毒性，皮膚障害が考えられるが，それらのうち皮膚障害の占める割合がほとんど大半である．

東京都消費生活対策室のアンケート調査の結果は，アンケート対象の31%の家庭が過去に化粧品でなんらかの被害を受けていて，対象家庭の23.4%がかぶれの被害を受けたとしている．症状は罹患者の主訴をそのまま表現しているためかあまり学問的に分類されているわけではないが，「かゆみ」20.9%，「赤いブツブツ」20.3%などで，頭痛，水ほう，顔全体のはれなどの重症を訴えるものもあった．障害の原因はクリーム類が最も多く25.8%ついで乳液，化粧水などとなっている．被害を受けた化粧品は80%の人がその後使わないと答えているが，二度以上使った人で「再び悪化した」「なんともない」が半数ずつであった．この時被害届けの多かった2化粧品会社のクリーム類，口紅，化粧水など17品目が当所に送られてきたが，それらについ

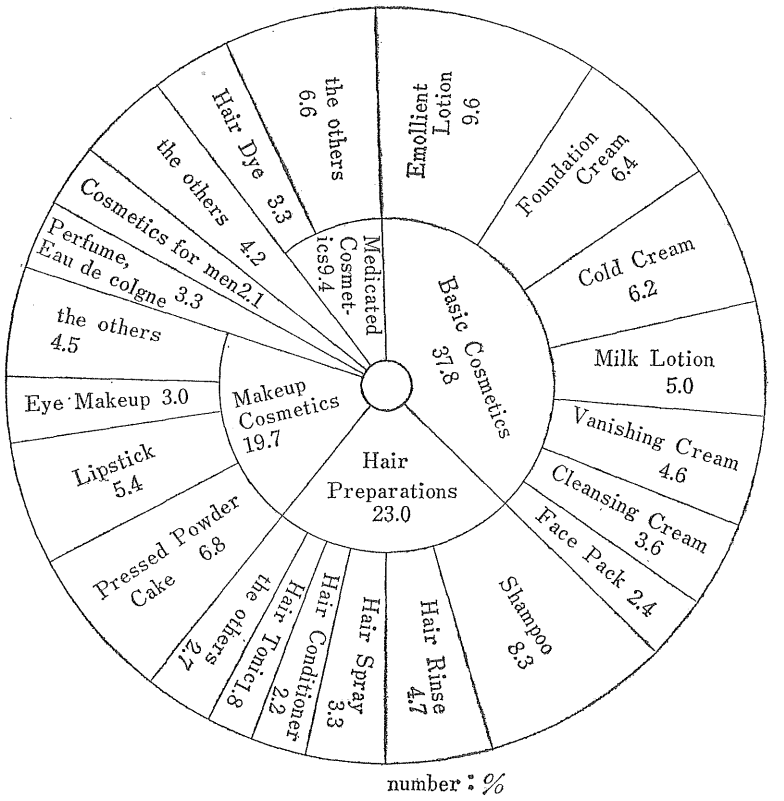


Fig. 3 Forwarding Amounts of Cosmetics in 1973[4]

て刺激物質の有無を調査するため，ウサギ(アンゴラ)を用いての前項のパッチテストを行なったがいずれも陰性であった．

届け出のあった82検体のうち，内容成分の分離などによる変質，変敗，悪臭など品質の劣化したものの届け出はクレンジングクリーム1検体で，他は外観に異常はなく化粧品使用後に生じた皮膚障害の届け出であった．障害品目はFig. 1のとおりで，基礎化粧品47.6%(39件/82件中)，メークアップ用化粧品9.8%(8/82)頭髪用 18.3%(15/82)，染毛剤・コールドウェーブ液7.3%(6/82)，その他17.0%(14/82)の割合で基礎化粧品による障害率が高かった．早川[5]らのアンケート調査でも，化粧品の皮膚障害率は，昭和43年は37.9%，48年は38.5%で，障害品目はクリーム，化粧水，乳液の占める割合が43年は61.1%，48年は69%を示し，ファウンデーションは43年は9.5%，48年は12%であり，パッチテスト陽性品目もクリーム，化粧水，乳液が約60%で，今回の調査と同様に基礎化粧品が多くを占めていた．前項のとおり出荷高の高い基礎化粧品がやはり障害率も高いが，また市場性の高い化粧品会社のものほど障害品の届け出が多くみられる．理化学的な面からの保証，使用感等の面のみでなく，皮膚に及ぼす影響の面からさらに品質の確保に留意することが重要な点と思われる．

化粧品皮膚障害の主なものは接触皮膚炎（かぶれ）であるが，今回の届け出も医師の診断で接触皮膚炎と診られたものが16/36件であり，そのうち日焼けオイルと口紅・歯みがきが原因とされる接触炎が光アレルギー性のものと診断された．石原[6]は接触皮膚炎の原因別頻度の年次推移を調べたが，その結果をみると昭和45年の化粧品による接触皮膚炎は78/12,913件，頭髪用品によるものは23/12,913件で，化粧品は化粧品以外の外用薬についで，接触皮膚炎発症の要因の第2位を占めていることを報告している．

接触皮膚炎を部位別にみると好発部位は一般に手，顔である．今回の苦情の内訳はクリーム類，化粧水，乳液，白粉，パウダー，ファウンデーション，セットローション，ヘアラッカー，コールドウェーブ液など

Table 4 Main Component of Cosmetics

Component	Basic Cosmetics		Makeup Cosmetics				Hair Preparations		
	Cream Milk Lotion	Emollient Lotion Face Pack	Emulsified matter	Lipstick	Face Powder	Pressed Powder Cake	Pomade	Hair Liquid	Hair-Setting Lotion
Oils and Fats	◎	○	◎	◎	—	◎	◎	◎	○
Waxes	◎	—	◎	◎	—	◎	◎	—	—
Fatty Acids	◎	—	◎	—	—	○	—	—	—
Moistenning Agents	◎	◎	◎	—	—	○	—	—	○
Surface Active Agents	◎	○	◎	○	○	○	○	○	○
Ethanol	—	◎	—	—	—	—	—	◎	○
Pigments and Dyes	○	○	◎	◎	◎	◎	○	○	○
High Polymers	○	◎	○	○	○	○	—	○	◎
Water	◎	◎	○	—	—	—	—	○	○
Perfumes	○	○	○	○	○	○	○	○	○
The Others	○	○	○	○	○	○	○	○	○

◎ mainly used
○ added according to recipe

による顔面皮膚炎，石けんによる腹部発赤，およびさきに述べた日焼けオイルによる全身日光皮膚炎，口紅と歯みがきによる光アレルギー性口唇炎などであった．接触皮膚炎は発生病理から一次刺激とアレルギー性に区別される．刺激原，感作原が化粧品であればその接触原を除去すればよいが，実際の刺激原，感作原は化粧品組成の種々の成分つまり基剤，乳化剤や付着性（いわゆる「つき」），展延性（いわゆる「のび」）をよくする目的の界面活性剤，また防腐剤，保湿剤，抗酸化剤，螢光物質，色素，香料，その他の添加物などが考えられる．また，これら成分の組み合わせによる接触皮膚炎の発症をみることもある．そこで，個々の成分およびその組み合わせについて分析する必要性も考えられる．

他に接触皮膚炎について届け出のあったものは頭髪用品による脱毛を主とする障害である．シャンプーによる続発性瀰漫脱毛症，ヘアートニックによる症候性脱毛症，ヘアーカラーによる汎発性脱毛症，コールドウェーブ液による脱毛，毛髪損傷などであった．須藤[7]によるとコールドウェーブ液によるものは断毛で脱毛は考えられないとある．

その他の届け出障害は，石けんによる腹部発赤，乳液，アイライナー，洗眼剤による結膜炎，目の腫れなどがあげられる．

〔化粧品の内容成分の問題〕

化粧品の皮膚に及ぼす影響を考慮する際，組成に関する知識と分析的理解が必要であることはさきにも述べた．化粧品の一般的な構成成分を Table 4 に示す．今回の届け出化粧品の処方内容をみると，これらもおおむねこの構成に準じている。種々の化粧品成分の生体に及ぼす影響などの報告が多くなされているが，届け出化粧品中の成分と関連のあるものについて述べ，若干の考察を行なった．

a) 基剤：アルコール類，グリコール類は化粧水，乳液，クリーム，セットローション，スプレー等の基剤として用いられている．脂肪族アルコールのアレルギー性皮膚感作はまれであるといわれているが，イソプロピルアルコール，エチルアルコールに感作例の報告がある[8]．化粧水，乳液，クリーム，セットローション，アイライナーに含まれているプロピレングリコール（PG）は毒性が少なく，溶解性，保湿性の点ですぐれていてグリセリンの代りに広く用いられている．PGについて Warshaw[9]は濃厚液のパッチテストを行ない，陽性率16%を得た．2.5%液では陽性反応が一次刺激によるものかアレルギーによるものか決定できなかったが，終局的にはその皮膚刺激作用は一次刺激によるもので，皮膚に対する強い脱水作用，乾燥化によるものとしている．また Fisher[10]は10%PG水溶液による湿疹様反応はアレルギー感作とみている．石原[11]はいわゆる“ちりめんじわ”（人工性乾皮症）の原因をPGや界面活性剤によるものとしPG貼布により潮紅を生じその後に“ちりめん様皮膚変化”の例をみとめている．

クリーム類，乳液の基剤ポリエチレングリコール

(PEG)はその分子量によって皮膚に与える影響は異なるといわれている．Smyth[12]，川村[13]らは基剤の刺激性，抗原性を調べるためアルコール，アセトン，カーボワックス，吸水軟膏，オリブ油，白色ワセリン，黄色ワセリンの貼布試験を行ない，カーボワックス，オリブ油，ワセリンに弱陽性を認めたが，これは皮膚の被刺激性によるものとし，刺激，アレルギー反応を起こすことはないとしている．森川[14]はヒトでは Hexachlorophene はワセリン，オリブ油，ポリエチレングコールなどに10%での添加反応では認められないが，プロピレングリコールを基剤にした場合 0.1% の濃度ですでに強い反応がみられ，基剤により閾値は 100 倍以上も変動したとしている．添加原料の皮膚障害も化粧品基剤でかなり影響を受けるものと思われる．

ミツロウは口紅，クリーム，化粧水に用いられている．わが国ではミツロウ感作の例は報告されていないが外国では養蜂家のアレルギー皮膚炎などとして知られている．

乳剤性基剤の油相中に用いられるセチルアルコール（化粧水，乳液，ファウンデーション，クリーム，パウダー，カラースプレーに含まれていた）やステアリルアルコールは使用量に比較して感作例の報告は少ないが Hjorth[15] は長鎖アルコールは潜在的感作体でありうると推測している．

クリーム類などに頻用されているラノリンによるアレルギーは外国では羊毛による過敏症など多くの報告がなされている．ラノリン感作の詳細な研究によりラノリン分画のフラクションのうちラノリンアルコールが接触抗原であることが一般的にいわれている[16]．また水素添加ラノリンによる感作例も報告されている[17]．

b) 界面活性剤：乳剤性基剤は水溶性，油脂性のものより刺激性が強いといわれているが，それは乳化剤として用いられている界面活性剤によるものと思われる．今回の検体中にも白粉を除いて，ほとんどすべてが界面活性剤を含んでいた．特にクリーム，乳液，シャンプーは種類，使用量ともに多い傾向がみられた．

界面活性剤の皮膚への作用は皮膚の脱脂，一次刺激性，角層の障害，油脂や炭化水素類の経皮吸収の促進，感作作用などがあげられる．定井[18]らは陰イオン界面活性剤について皮膚損傷を調べたが，直鎖および分岐鎖アルコールエステル塩の損傷作用が最も強く，次いで直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩が強く，2-オレフィンスルホン酸は最も弱かったという．ラウリル硫酸ナトリウムやセチル硫酸ナトリウムは単独に用いると皮脂腺からの浸透性が増し，上皮細胞に作用し，湿疹症状を現わすといわれている．これらアルキル硫酸ナトリウムの中で炭素数12—24のものが皮膚に対する影響が大で，炭素数18では影響がないという．

非イオン界面活性剤は低濃度では皮膚刺激は生じないとされているが高濃度使用の場合障害をもたらす．一般にアルキル基が増すと，また HLB (Hydrophile Lipophile Balance) が大きいほど刺激は弱い．高須[19]らによると非イオン界面活性剤のうちエステル型結合のものよりエーテル型結合系の乳化剤が皮膚に対して強い変化を現わしたとしている．

クリーム，乳液，化粧水，スプレー等に広く用いられているトリエタノールアミンによる感作例は比較的多く報告されている[20]．

c) 防腐剤と化粧品等の微生物汚染：乳剤性製品には欠くことのできない防腐剤によるアレルギーもしばしば発生している．今回届け出のあった製品はパラベン類がクリーム類，乳液，化粧水，ファウンデーション，パウダー．口紅，アイライナー，歯みがきなどに添加され，最も多かった．他にソルビン酸（クリーム），レゾルシン（ヘアーカラー），安息香酸ナトリウム（シャンプー），サリチル酸（ヘアートニック），スルホ石炭酸亜鉛（化粧水，ヘアートニック），ヒノキチオール（ヘアーリキッド），ヘキサクロロフェン（ベビーパウダー），トリブロモサリチルアニリド（パウダー），塩酸クロルヘキシジン（歯みがき），デヒドロ酢酸（乳液，スポンジ）などが添加されていた．

パラベン類は高濃度含有の場合で局所塗布によってのみ感作が起こるといわれているが，比較的低濃度に配合されている化粧品でも繰り返し塗布すれば十分に感作原となることを Fisher[20] が報告している．また慢性皮膚炎にかかっている人はパラベン感作を受けやすく，化学的に関連性のある局所麻酔剤たとえばパラアミノ安息香酸エステルなどと交叉感作を生ずることがあるとされている．中山[21]もパラベン類を化粧品の皮膚炎の原因アレルゲンとして指摘しうることとしている．

ソルビン酸は化粧品に0.1，0.3，0.5% の濃度で用いられている．Eryklöf[22] がソルビン酸を含むクリームの塗布で顔面に紅斑と痒みを生じ，さらに感作した例を報告している．この時の感作のうち陽性反応を生じた最低濃度は0.01—0.02%水溶液，コールドクリームでは 0.02—0.05%であったという．Klaschka[23] はソルビン酸の湿疹様アレルギー作用はモルモットで確かめられたという．

水野[24]はハロゲン化フェノール類などの殺菌，防カビ剤の光線過敏について報告している．年次推移からみるとこれらの物質による光パッチテスト陽性症例数，物件数は減少してはいない．陽性を示す物質のうち Bithionol（昭和45年禁止）は昭和46年以後減少しているが 3, 3′, 4′, 5-Tetrachlorosalicylanilide, 3, 5-Dibromosalicylanilide, 4′, 5-Dibromosalicylanilide, 3, 4′, 5-Trichlorocarbanilide, 5-Bromo-3′-Chlorosalicylanilide, 3, 4, 4′-Trichlorocarbanilide および Chlorohexidine などによるものが増加している．大野[25]らは Bithionol, Chloropromazine, 3, 4′, 5-Trichlorocarbanilide, 3, 5-Dibromosalicylanilide について光毒性，光アレルギーの場の特性を述べている．光毒性反応は，高濃度—少光エネルギーで反応を起こしうるが，低濃度—高光エネルギーでは反応が起こらない場合があるが，光アレルギー反応では，低濃度—少光エネルギーでも強い反応を起こすとしている．さきに述べたビチオノールについで，ジクロロフェンは光接触皮膚炎の原因物質として，昭和47年1月12日に配合が禁止された．

ホウ酸，ホルムアルデヒド，水銀化合物などは過去に問題になったが，最近ではヘキサクロロフェン配合のベビーパウダーで乳児が大量死亡するという事故が起こっている（1972年8月フランス）．これは6％も配合されたということで，量的な安全性も含めた防腐剤への検討が必要と思われる．

一般に化粧品は長期に使用するため製品を保証する目的で防腐剤が用いられているが，その配合量は使用目的，安全性から考えて最少限にしなければならない．二次汚染防止（使用中に生ずる汚染防止）に必要な量を越えて添加してはならないが，化粧品の処方構成から防腐剤の抗菌活性を減弱する成分が混在する可能性が大きい．また，化粧品に用いる防腐剤は抗菌スペクトラムの広いものが望まれるなど防腐剤は皮膚への安全性の他に問題を含んでいる．

化粧品の二次汚染の報告として Myers[26](1973) の報告がある．それによると使用後の汚染度の上昇が著しく，一般細菌の他にブドウ菌，レンサ球菌が非常に多いことがわかる．二次汚染は手指からの汚染，開放による落下菌の汚染が原因と考えられる．今回の届け出事故品のうち，明らかに微生物の作用によるものと思われる基剤成分の分離したクレンジングクリームがあった．また，アイライナー，乳液による結膜炎症状の原因も微生物汚染の可能性が考えられた．クリーム検体（13/15件），パウダー検体（全部）の容器の形態は，使用に際し微生物汚染を受けやすい広口ビンであったが，クリームはチューブ型，パウダー類は口の細いふりかけ型にするのも汚染防止に有効と思える．

47年春，薬務部が収去し，当所に送られたベビーパウダー37検体についての無菌試験（当所微生物部細菌第二研究科による検査成績）によると29検体が陽性であった．これらのうち13検体は Table 5 に示すように殺菌（防腐）剤が添加されていた．一方，陰性の検体はクロルヘキシジン0.05％，ヘキサクロロフェン0.1%—0.5%含有のものであったことから，汚染は殺菌（防腐）剤が低濃度であるためかまたは不活性化されてしまったためによるもので，一次汚染と思われる．この点，原材料の微生物検査，製造時の洗浄殺菌の実施，衛生管理の必要性が望まれる．

スポンジ，ブラシなどの美容具の使用時の汚染も考えられる．今回もパンケーキ用スポンジによると思わ

Table 5 Kind of Preservatives Added in Dusting Powders

Preservative	%	Sterility Test
Chlorhexidine gluconate	0.05	(−) negative
Hexachlorophene	0.5	(−)
	0.1	(−)
	0.01	(+) positive
Chloroxylenol	0.25 mixed	(−)
Hexachlorophene	0.25 mixed	
Trichlorocarbanilide	0.1	(+)
Benzethonium chloride	0.1	(+)
Alkyldiaminoethylglycine hydrochloride	0.03	(+)
Methylbenzethonium chloride	0.2	(+)
Benzalconium chloride	0.5	(+)

Table 6 Kind of Dyes in Cosmetics

Dye		Content (%)	Cosmetic
Red	2	0.00015—0.002	Emollient Lotion, Foundation Cream
Red	106	0.06	Cream
Red	202	0.017—0.06	Lipstick
Red	204	0.021—0.63	Face Powder, Lipstick
Red	213	0.0000075—0.002	Milk Lotion, Cold Waving Lotion, Hair-setting Lotion
Red	219	0.15	Lipstick
Red	220	0.03	Lipstick
Red	223	0.06—0.18	Lipstick
Red	225	0.0005	Suntan Oil
Red	226	0.05	Face Powder, Toilet Soap
Red	404	0.02	Face Powder
Yellow	4	0.0003—0.001	Hair Liquid, Milk Lotion, Lipstick
Yellow	5	0.001	Foundation Cream
Yellow	202	0.0001	Shampoo
Yellow	203	0.0003—0.02	Milk Lotion, Emollient Lotion, Shampoo Cold Waving Lotion
Yellow	204	0.005	Suntan Oil
Yellow	403	0.02	Cream
Yellow	406	0.0005	Shampoo
Orange	201	0.61	Lipstick
Orange	203		Toilet Soap, Hair Dye
Green	3	0.0001—0.006	Milk Lotion, Emollient Lotion
Green	201		Emollient Lotion
Green	202	0.2	Hair Color
Green	401	0.002	Emollient Lotion
Blue	1	0.00005—0.00065	Shapmoo, Cold Waving Lotion
Blue	404	0.00035—0.05	Shampoo, Hair Dye
Brown	201	0.003	Hair Cream
Violet	1	0.09	Cream
Violet	201	0.009	Suntan Oil

れる顔面のカブレ，目周辺の発赤の届け出があった．スポンジにはデヒドロ酢酸（90～125 mg/1ケ）が含有されていた．この場合デヒドロ酢酸による刺激も考えられるが，数回使用後デヒドロ酢酸が溶出したため細菌が繁殖し，その作用による可能性もある．

容器の材質（材料）と中味の関係についても問題が提起されている．47年末に「ツケまつ毛をつけたら目のまわりがかゆくなった」という女性の届け出で，市販品12種のツケまつ毛接着剤について調査したところ2種のものから680，60 ppm という高濃度の鉛が検出された．異常のない接着剤はアルミニウム，スズなどで出来たチューブを使っていたが，鉛が検出された接着剤は鉛製チューブでチューブの鉛が接着剤に混入したものと思われる．重金属の他に容器と中味のふれる部分からの有害な可塑剤の溶出，香料，アルコール，他成分の器壁への浸透，透過性，光による変色なども問題になる場合があるが今回の届け出品には，これらの変化はみられなかった．

d) 色素，香料など：色素，香料はほとんどすべての化粧品に含まれ最も重要な成分である．届け出事故化粧品に使用されていた色素は Table 6 のとおりである．色素のもつ障害作用は一般に，一次刺激性，慢性毒性，光毒性および感作性などが考えられる．口紅による口唇炎の届け出があったがこれは医師の診断によると，口紅と歯みがきによる光アレルギー性口唇炎とされている．口紅に含有されている色素およびその他の誘因により慢性的なかぶれが生じ，光線過敏症を起こした可能性も考えられる．

またファンデーションによる紅潮症が訴えられたが一般にファンデーションによるかぶれ，色素沈着は主な成分の一つである鉱物油が原因にあげられる．鉱物油はのびがよく，皮膚への密着にすぐれていて皮膚表面をなめらかにするが，長期間にわたって使用していると角層が肥厚して，皮膚が荒れ，急性のかぶれだけではなく慢性のかぶれを起こし，さらにメラニン増加を招くといわれている．

香料による皮膚障害の例は昔から数多くみられる．例えばベルロック皮膚炎はベルガモット油中の5-メトキシソラレン等のフロクマリン類による光中毒現象とされている．中山[24]は化粧品中の香料アレルギーについて報告しているが，原因アレルゲンとしてJasmin, Eugenol, Ylang-ylang oil, Cananga oil Hydroxy-citronellal, Patchouli, Benzyl 系，Cinnamic 系，Balsam 系，Geraniol などを指摘した．シャンプーによるアレルギー性皮膚炎の抗原がシャンプー中の香料（ローズ油）[25]であったという報告がある．今回の届け出品のほとんどが香料を含んでいるが，その成分内容は不明である．香料に起因した皮膚障害の場合にはかりにA社の製品で障害をうけたからといって，同系統の香料によって付着されているB社の製品に変えて使用しても，再び誘発されるおそれがある．しかし香料は全くの合成香料，あるいは異種の香料成分の配合によってローズ香，柑橘香を調香することができ，その分析同定は容易でない．

e) 頭髪中の成分：頭髪用品による障害も多い．シャンプーによる届け出障害は，頭部，手足の急性皮膚炎，脱毛があるが，原因は成分の界面活性剤の刺激作用，脱脂作用，ケラチン変性作用により皮膚が過敏になったためと思われる．使用時の濃度，使用時間，回数なども皮膚炎の誘因となり，シャンプーによる皮膚炎は一次刺激といわれている．染毛剤による接触皮膚炎がみられたが，いずれも *p*-フェニレンジアミン(パラアミノ化合物）は類似構造をもつ局所麻酔薬の塩酸プロカイン，アネステジンやパラアミノ安息香酸，アニリン，パス，サルファ剤などと交叉反応を起こすことが知られている[27]ので使用時にパッチテストの励行が望ましい．

コールドウェーブ液による接触皮膚炎は第1剤によるものが多い．1剤の主成分のチオグリコール酸アンモンの酸化物であるジチオグリコール酸塩によるパッチテスト陽性の報告がみられる[27]．コールド液はpHが高過ぎたり，使用時間が長い場合などによる皮膚刺激から毛の損傷さらに脱毛することも考えられ，正しい調製と使用法を行なえば安全といわれている．

f) 石けん成分：7歳女子の腹部に石けんによると思われる発疹，発赤を生じた届け出があった．皮膚は石けん使用により一時的アルカリ性となるが，その皮膚が健全な限り自己中和能のため3—4時間するとおよそもとのpHに回復する．しかし，過度の使用や過敏症になっている皮膚，荒れ症の皮膚にはよくないといえる．石けんによる接触皮膚炎の多くはアルカリ素地などによる一次刺激性皮膚炎であるが増田らは石けんによるアレルギー性皮膚炎17例（男4，女13）を観察している[27]．

〔パッチテスト〕

化粧品およびその原料などの安全性は，最終的には人におけるパッチテストや使用経験で評価されることが必須条件である．人における反応閾値と動物のそれとでは一致しない場合が多いが，量的問題は人において慎重に検討されるべきで，動物試験を行なうことは，人が未知の物質や新しい物質を直ちに応用し接触しておこす事故を防ぎうると考えられる[28]．このような考えをもとに動物実験を行なってその安全性の評価に役立てている．皮膚に対する局所刺激試験にはDraize 法[29]があるが今回はこれに準拠し，さらに改良したウサギを用いる皮膚の一次刺激試験法[1]を行なった．

事故検体のシャンプーおよび古くから起炎性を有することで知られており，最近はその起炎性成分の研究がJ. AOAC などで[30,31]とりあげられている香料の一つである Bergamot 油を用いて行なった皮膚刺激試験の例を Photo. 1 に示す．対照は10%アルコールを用いた．

化粧品による障害は，内容成分の刺激作用，感作，品質の劣化，紫外線，生理的要因，栄養状態，外傷，不適切な使用法・管理など種々の原因が考えられる．障害を減らすためには内容成分・原料の安全性，製品の衛生的製造・管理への留意，過度な誤った使用法や化粧品に過敏な人への注意など安全性を常に追求してゆく態度が必要と思われる．

まとめ

化粧品による皮膚障害を知るため，昭和46年4月から48年3月までに東京都薬務部薬事衛生課に届け出のあった化粧品による障害例について，その内容を調査し考察を試みた．届け出件数は47件，検体数は82品目で基礎化粧品39，メークアップ化粧品が8，頭髪用品が15，染毛・コールドウェーブ液が6，その他14であった．これらの検体について Draize 法の改良法によ

るウサギを用いたパッチテストを行なったところ，クレンジングクリーム，化粧水，リンス各検体，シャンプー検体に陽性を認めた．また鉛，ヒ素，カドミウムなど有害性金属試験を行なったところ異常はなかった．

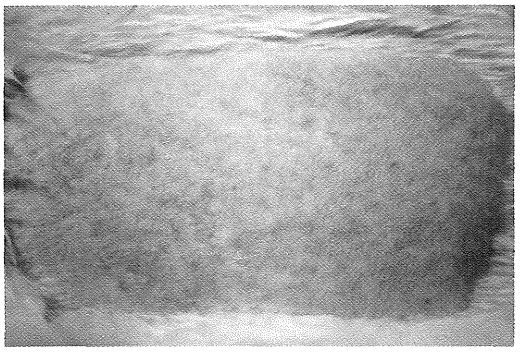
障害の起きた要因としては内容成分，感作，体質，紫外線，汚染などいろいろの原因が考えられる．障害の訴えがクリーム，乳液，化粧水など皮膚生理に直接関連のあるものに多いことも問題である．製品面での研究，使用法の注意など常に必要とされ，とくに頭髪用品，染毛，コールドウェーブ液による刺激作用に対してパッチテストなど施行し安全性を確かめて使用することが望ましい．

さらにメーカーが安全な製品の開発に努めることも必要である．

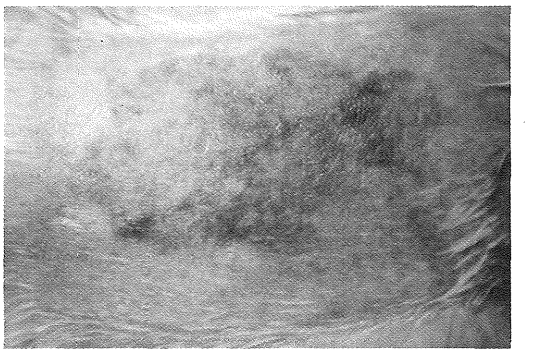
謝辞 本研究に際し Bergamote Residues "D" (Roure Bertrand Dupont, France) の標品を分与していただいた池田物産株式会社佐藤昌弘氏に厚く感謝します．

文　献

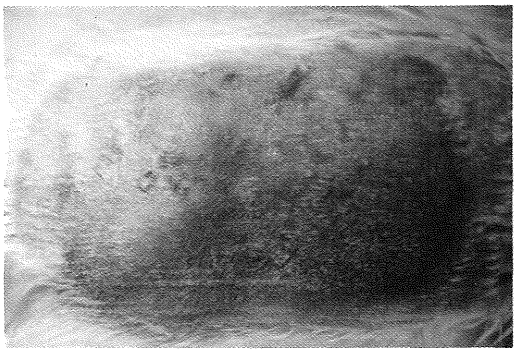
1) 池田良雄，堀内茂友，吉本浜子，降天強，川俣一也，金子豊蔵：医薬品研究，1，23—27 (1970)
2) 雨宮敬，伊藤弘一，山添律子，原田裕文，戸谷哲也：東京衛研年報，25，(1974) 投稿中
3) 日本薬学会編：衛生試験法，561—617，金原出版 (1973)
4) 化粧品工業年報，昭和48年度，東京化粧品工業会編，昭和49年5月
5) 早川律子，小林美恵，上田　宏，小林敏夫：日皮会誌，84，53—54 (1974)
6) 石原勝：日皮会誌，82，754—761 (1972)
7) 須藤武雄：改訂版日本毛髪図鑑，日本毛髪科学協会，昭和46年
8) 清水潤一：図解接触皮膚炎，昭和46年（昭和シンテックス）
9) Warshaw, T. G. : *J. Invest. Derm.*, 19, 423 (1952)
10) Fisher, A.A. : *Arch. Derm.*, 104, 286(1971)
11) 石原　勝：皮膚科の臨床，11，131—138(1969)
12) Smyth, H. F. : *J. Am. Pham. Assoc.*, 34, 172 (1945)
13) 川村太郎，笹川正二，増田　勉，本田史明，木下正子，原田昭太郎，石崎　達：日皮会誌，80，301—314 (1970)
14) 森川藤凰：日皮会誌，82，794—801 (1972)
15) Hjorth, N. : *Trans. Johns. Hosp, Derm. Soc.*, 49, 127 (1963)
16) 安田利顕：皮膚と泌尿，17，576 (1955)
17) 中内洋一，増田　勉：日皮会誌，82，773—778 (1972)
18) 定井正直，水野信行：日皮会誌，82，207—221 (1972)
19) 高須良夫：日皮会誌，71，381
20) Leon, F. R. : *Arch. Derm. & Syph.*, 36, 116 (1940)
21) 中山秀夫：日皮会誌，84，64 (1974)
22) Eryklöf, L. E. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 10, 719—720 (1958)
23) Klaschka, von F. : *Münch. Med. Wschr.*, 107, 185 (1965)
24) 水野信行：日皮会誌，84，64—65 (1974)
25) 大野盛秀，水野信行：日皮会誌，84，171—172 (1974)
26) Myers, G. E. and Pasutto F.M. : *Canad., J. Pharm. Sci.*, 8, 19 (1973)
27) 増田　勉，本田史明，中内洋一，伊藤裕喜，木下正子，原田昭太郎，矢尾板英夫，溝口昌子：日皮会誌，80，515—543 (1970)
28) 森川藤凰：日皮会誌，82，794—800 (1972)
29) Draitze, J. H. : Dermal Toxicity in *Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics*, 1959, Assoc. Food & Drug Officials, U. S., Austin, Texas
30) Cieri, U. R. : J. AOAC, 52, 719—728 (1969)
31) Porcaro, J. and Shubiak, P. : J. AOAC, 57, 145—147 (1947)



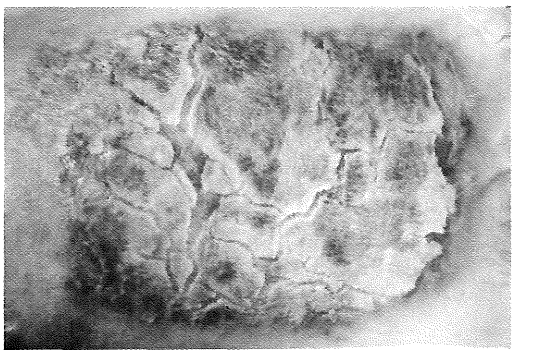
Control applied 10% ethyl alcohol once a day during seven days



Erytematous reaction on rabbit skin due to contact with shampoo once a day during three days



(a)



(b)

Ultraviolet-(UV-) induced phytophoto-dermatitis on rabbit skin due to contact with bergamot-oil and UV-irradiation on the site once a day during three days (a) and seven days (b)

Photo. 1. Photographies of Patch Test

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 187—190, 1974

生乳および牛乳の蛋白還元価について

松本昌雄* 村上文子* 竹葉和江*
村上　一* 春田三佐夫*

Studies on the Values of Protein-reducing Substance of Raw and Pasteurized Whole Milk

MASAO MATSUMOTO*, FUMIKO MURAKAMI*, KAZUE TAKEBA*,
HAJIME MURAKAMI* AND MISAO HARUTA*

The value of protein-reducing substance (PRS) of cow's milk has been suggested as a good indicator for the recognition of the adulteration of reconstituted non-fat powdered milk in whole milk. Since heat treated milk always shows higher PRS value than the raw one, according to its grade of protein degeneration. In this survey, a total of 222 milk specimens consisting of 45 raw and 177 pasteurized whole milk was studied for their PRS value, in order to clarify the applicability of the value on UHT (ultra high temperature) treated milk or on so called "aseptic milk".

Conseqently, it was found that PRS values of UHT treated milk were ranged from 2.8 to 10.6 with their average of 6.8, and aseptic milk from 13.4 to 15.0 with their average fo 14.2, while the ones obesrved on raw milk were always between 1.2 and 4.0 with their average of 2.5. Thus, it was concluded that the PRS value of pasteurized whole milk by UHT or aseptic process can not be directly applied as an indicator of the significance of the adulteration of reconstitued powdered milk.

緒　言

牛乳の異種脂肪問題が社会的話題となり，消費者の牛乳に対する不信感を醸成するに至ったことは，まだ記憶に新しいところである．不信の余りさらに，消費者の一部には，牛乳への脱脂粉乳あるいはカゼインの添加までも疑っている節がある．

牛乳に脱脂粉乳を添加すること自体は衛生上の危害とは何の関係もないが，牛乳が純正食品であるというたてまえから，それは偽和行為とみなされ，法律で堅く禁じられている．

牛乳中の脱脂粉乳検出法については従来いくつかの報告が[1-6]あるが，いまだに確実な方法がなく早急にその検査法の確立が望まれている．

それら鑑別法のうち，AOAC 公定法[3]として採用され，しかも日本国際酪農連盟が検討案として提起している蛋白還元価（Protein-reducing substance：PRS）測定法について検討を試みることとした．

この方法は，すなわち，牛乳の加熱処理の際に蛋白質が変性し，還元物質を生ずるのでその還元力にもとずいて脱脂粉乳添加の有無を判別するものである．Choi, Junker[1]らは，牛乳のPRSが5を越えた場合，牛乳に脱脂粉乳が添加されたものと判定すると述べている．

そこで，著者らは1973年から1974年にかけて都内5個所の乳処理場に搬入された生乳45例，並びに都内市販牛乳のうち，26処理場の牛乳177例を対象にPRSの測定を試みたので，その成績について報告する．

対象試料および試験方法

1. 対象試料

1973年3月より1974年4月までの間に都内の乳処理場に受乳された生乳45例並びに都内で市販されている牛乳（乳等省令でいう「牛乳」）177例について実施した．

2. 試験方法

1) 試薬

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Ⅰ 酢酸溶液：氷酢酸50ml を蒸溜水で稀釈して1,000 ml とする．

Ⅱ 飽和尿素溶液：

Ⅲ フタール酸緩衝液：NaOH 2.0g を蒸溜水に溶解して 250ml としたもの 158.8ml と，酸性フタール酸カリウム10.2g を蒸溜水に溶解して250ml としたもの 200ml と混合し，蒸溜水でさらに稀釈して800ml としたもので，pH を 5.6 となるように，両液を適宜に加えて調節する．

Ⅳ．赤血塩溶液：10g の $K_3Fe(CN)_6$ を蒸溜水に溶解して 1,000 m*l* とする．

Ⅴ．トリクロル酢酸溶液：トリクロル酢酸 100g を蒸溜水に溶解して 1,000 m*l* とする．

Ⅵ．塩化第二鉄溶液：0.1g の $FeCl_3$ を蒸溜水に 100 m*l* としたもので用時に調製する．

2） 操作

試料乳を 40° に加温し十分に混和した後，室温まで冷却し，その15m*l* を蒸溜水15m*l* を含む共栓遠心管に採取する．これに酢酸溶液を 3m*l* 加えてガラス棒で完全に混合し，毎分1,500～2,500回転の速度で 5 分間遠沈する．上澄液を捨て，15m*l* の蒸溜水で洗浄し，もう一度同じ操作をくりかえす．

沈でんと盲験用遠沈管に飽和尿素溶液 3 m*l* を加え，蒸溜水を追加し15 m*l* てとする．

ガラス棒で完全に混合した後，緩衝液5m*l* と赤血塩溶液 5 m*l*を加えてガラス棒で混合し，70° の水浴に正確に20分間浸してから氷冷する．次にトリクロル酢酸溶液 5 m*l* を加えて完全に混合した後，ろ過する．

ろ液の最初の数 m*l* は捨て，得られたろ液 5m*l* を，あらかじめ蒸溜水 5m*l* を入れた試験管にとり，塩化第二鉄溶液 1m*l* を加えて混合し，正確に10分間放置した後，610mμ で盲験液を対照として吸光度を測定する．

測定値を検量線にあてはめて得た値を40倍して，これを蛋白還元価（ＰＲＳ）とした．

3） 標準液の調製並びに検量線の作製

$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ を 0.1147g を正確にとって蒸溜水に溶解して１ *l* としたものを標準液とする．これを原液として各濃度の稀釈標準液を調製し，その後，試料液と同様の操作して各吸光度を測定しフェロシアン化カリウム mg の数と吸光度の関係を求めて検量線を作製した．

試験成績および考察

1. 生乳のＰＲＳ

生乳45例のＰＲＳの測定結果は Table 1 に示したとおり，その範囲は1.2～4.0で(平均2.46)，しかも大部分が２～３の範囲内にあった．

Table 1. PRS Values of Raw Milks

Prefecture	Number of specimens examined	PRS Values		
		Range	Average	S.D.
Tokyo	9	1.90—4.00	2.66	0.22
Saitama	9	1.30—3.20	2.37	0.20
Chiba	9	1.40—3.60	2.42	0.19
Tochigi	9	1.20—3.20	2.38	0.20
Gunma	9	1.40—3.60	2.46	0.20

これは Clay[7] らの米国における調査結果，すなわち生乳のＰＲＳは0.90～4.18の範囲内にあり平均2.28であったという報告とほぼ一致している．

2. 牛乳のＰＲＳ

都内の牛乳177例についてＰＲＳの測定を行なって，その結果を，殺菌条件別，同一殺菌条件における処理場別，並びに月別にそれぞれ整理してTable2～Table 6に示した．

現在，わが国で工業的に行なわれている牛乳殺菌方法には，120°～135°，２～３秒の超高温処理法（Ultra High Temperature Sterilization，略称 UHT 法），70°～75°，15～16秒の高温短時間殺菌法（High Temperature Short Time Pasteurization，略称 HTST 法），75°～75°，15分の保持殺菌（Holding Pasteurization）などがあり，そのうち 99.99999%の殺菌効果を有するＵＨＴ法が広汎に採用されているのが実情である．

都内の市販牛乳の大部分は120°，２秒あるいは130° ２秒のＵＨＴ法によって殺菌されている．Table 2 に示したように 120°，２秒の殺菌乳のＰＲＳの平均は 5.98（範囲4.00～9.90）であるのに対して130°，２秒の殺菌乳のＰＲＳの平均は 6.49（範囲 2.80～10.60）と上昇を示し，135°，２秒の加熱乳のＰＲＳの平均は 7.82（範囲5.80～10.10）であった．

わが国でも 1972年 以降市販をみた Longlife Milk（あるいは無菌乳 Aseptic Milk）のＰＲＳの平均は 14.24（範囲 13.40～15.00）で，従来から採用されている135°，２秒の加熱乳のそれに比較して著しい高い値を示した．

無菌乳（Aseptic Milk）はＵＨＴ法と無菌充填法の併設により生産されるものであるが，著しく高いＰＲＳ値からみて，製品の長期保存を確保せんがために表示された加熱条件よりもさらに厳しい条件で処理されているものと考えられる．

Table 2. PRS Values of Normal Liquid Milks

Type of pasteurization	Number of specimens examined	PRS Values		
		Range	Average	S.D.
135°C, 2 second	9 (10)	5.80—10.00 (13.40—15.00)	7.84 (14.24)	1.68 (0.52)
130°C, 2 second	109	2.80—10.60	6.49	1.42
120°C, 2 second	64	4.00— 9.90	5.98	1.17
80°C,15 minute	1	6.20	6.20	
75°C,15 second	2	3.00, 6.12	4.56	
75°C,15 minute	1	10.40	10.40	

( ) shows the aseptic milk.

Table 3. PRS Values of Normal Liquid Milks pasteurized for 2 second at 130°C

Milk plant	Number of specimens examined	PRS Values		
		Range	Average	S.D.
A	19	5.40—8.80	6.78	1.40
B	18	5.70—9.60	7.48	1.15
C	18	2.80—5.80	4.79	0.91
D	23	5.30—8.80	6.85	0.89
E	20	4.10—8.80	5.88	1.14
F	4	7.40—8.00	7.63	

Table 4. PRS Values of Normal Liquid Milks pasteurized for 2 second at 120°C

Milk plant	Number of specimens examined	PRS Values		
		Range	Average	S.D.
A	20	5.00—9.20	6.57	1.12
B	17	4.80—9.90	6.12	1.46
C	18	4.00—6.00	5.33	0.56
D	3	5.50—7.20	6.20	

Table 5. PRS Values of Normal Liquid Milks pasteurized for 2 second at 135°C

Milk plant	Number of specimens examined	PRS Values	
		Range	Average
A	3	6.30, 6.30, 8.80	7.13
B	3	5.80, 6.20, 7.30	6.43
C	3	9.72, 10.00, 10.00	9.91

諸外国における牛乳は，ＨＴＳＴ法あるいは保持式殺菌法 (Low Temperature Long Time pasteurization, 略称ＬＴＬＴ，処理条件61°～65°，30分) で処理されているものが大部分で，そのＰＲＳは５を越えることがないと Choi, Junker[1] らは報告している．

ところが都内の牛乳のＰＲＳは2.80～15.00で平均7.95と５を大幅に上まわっている．

このＰＲＳの上昇の原因として，脱脂粉乳の使用も考えられないわけではないが，Choi, Junker[1] らの述べているようにＰＲＳが５を越えた場合は脱脂粉乳添加の事実があると判定するのは，ＵＨＴ処理乳の場合なお問題があると考えられる．

すなわち，ＵＨＴ処理では予備加熱（80°～85°で一定時間保持）後，120°～135°で数秒間加熱されるのでＰＲＳの上昇もＨＴＳＴやＬＴＬＴ殺菌乳のＰＲＳの上昇よりも高くなるからである．

135°，２秒，130°，２秒，120°，２秒の各ＵＨＴ処理条件における各乳処理場別のＰＲＳの比較成績をTable ３～５に示した．

これによると同じ加熱条件の表示にもかかわらず，処理場によってＰＲＳの差異が認められた．例えば，130°，２秒のＵＨＴ処理乳でＣ社のＰＲＳ平均値4.79（範囲2.80～5.80）に対してＢ社のＰＲＳ平均値7.48（範囲5.70～9.60）であった．

この原因は前述したように，たとえ，表示どおりの加熱条件でＵＨＴ処理されたとしても，予備加熱の温度と保持時間が各処理場によって異なることも考えられる．さらにまた，各処理場が正確に表示どおりのＵＨＴ処理条件を厳守しているとは限らないことなどにも起因しているが，脱脂粉乳添加の事実がなかったとは否定できない．

月別の生乳と殺菌乳のＰＲＳの相関はTable 6 に示した．この成績によると生乳のＰＲＳの大部分が２～３の間にあるにもかかわらず，６月および８月の殺

Table 6. Comparison of the Average of PRS Values in Raw Milks and Normal Liquid Milks

Month of examination	Average of PRS Values		
	Raw Milk	Normal Liquid Milks pasteurized by	
		130°C, 2 sec.	120°C, 3 sec.
Jan.	2.48 (0.24—2.60)	5.84 (4.10—8.40)	5.53 (5.20—5.90)
April	3.00 (2.00—4.00)	7.24 (5.00—8.80)	5.92 (5.00—7.20)
May	2.80 (2.00—2.40)	6.15 (2.80—8.40)	5.79 (4.00—7.50)
June	1.44 (1.20—1.90)	7.82 (5.60—9.60)	7.13 (4.60—9.90)
Aug.	2.72 (2.40—2.80)	8.00 (7.60—8.40)	
Sept.	2.86 (2.80—3.00)	6.50 (5.00—7.60)	6.35 (5.60—7.40)
Nov.	2.60 (2.20—3.00)	6.16 (4.40—7.50)	5.65 (5.00—6.10)

Note: ( ) shows the range of PRS Values.

菌乳のＰＲＳは，ほかの月の殺菌乳のＰＲＳに比較して高い値を示し，特に６月においては，生乳のＰＲＳの平均が1.44（範囲1.20～1.90）と各月の間で最低値を示したのに対し，130°，２秒のＵＨＴ処理乳の各月のＰＲＳの平均値のうち８月の平均値8.00（範囲7.60～8.40）に続いて7.82（範囲5.60～9.60）と高い値を示し，120°，２秒の処ＵＨＴ理乳においても同じような傾向を示した．これは夏期に生乳の細菌学的品質が一般に低下するために殺菌加熱条件を強化することにも起因していると考えられる．

以上，わが国のように牛乳の殺菌の大部分がＵＨＴ法によってなされている所では，ＰＲＳ５の値をもって脱脂粉乳添加の有無を論ずるのは妥当でないように思われる．

もしも，ＰＲＳを脱脂粉乳添加の尺度にするのであれば，牛乳のＰＲＳについての全国的調査を実施するかたわら，さらに基礎的研究をかさねる必要があろう．

ただし，最近のように食品の製造加工技術が急速に進歩し，食品添加物について再検討が叫ばれている現在，消費者の自然食品への要望が高まり，牛乳についても新鮮で自然なものが求められている現状の下ではＰＲＳが２～３に近い牛乳ほど生乳に近い性状を保持するものと言えるであろう．

結　語

都内の乳処理場に受乳された生乳45例並びに都内の市販牛乳177例について，そのＰＲＳを測定した結果，次の成績を得た．

(1) 生乳のＰＲＳは1.2～4.0で，大部分が２～３の範囲内にあった．

(2) ＵＨＴ殺菌乳のＰＲＳは2.8～10.6を示した．

(3) 無菌乳のＰＲＳは13.4～15.0であった．

文　献

1) Junker, G.M.: *J.of A.O.A.C.*, 43, 407—411 (1960)

2) Hobbs, W. E. and Coulter, S.T.: *J. Dairy Sci.*, 45, 661—662(1962)

3) Association of Official Analytical Chemists : *Official Method of Analysis of A. O.A. C.*, 11 th Ed. 249(1970) Washington.

4) Murthy, G. K. and Kaylor, L.: *J. Dairy Sci.*, 54, 826—829(1971)

5) 樫本隆，福島成彦，小林太郎：大阪府立公衆衛生研究所報告，7，136—137(1969)

6) 足立達，中西武雄：農化，32，309—313(1958)

7) Clay, C.M., Burke, M.B. and Junker, G.: *J.of A.O.A.C.*, 28, 311—313(1958)

東京衛研年報
Ann, Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 191—196, 1974

畜肉を主原料とした調理冷凍食品の加工処理工程における細菌汚染要因の解析

小久保弥太郎* 井草京子* 梅木富士郎*
春田三佐夫*

Factors Affecting on the Bacterial Contamination on Cooked Frozen Food with Meat during Their Procession

YATARO KOKUBO*, KYOKO IGUSA*, FUJIO UMEKI*
AND MISAO HARUTA*

A total of 234 cooked frozen food with meat, which consisted of 117 Hamburg-stake, 68 Gyoza (a chinese dish), and 49 Shao-mai was studied for their bacteriological qualities. In addition to this, factor analysis on the bacterial contamination of the products was also made, under the cooperation of the 4 factories which located near Tokyo. Consequently, it was found that 24.2% of the products manufactured in summer season and 10.5% of the ones in winter were contaminated with greater than 10^5/g of bacteria.

Predominant bacterial flora found in the products were *Lactobacillus* and other gram positive bacteria. It was indicating that the bacteria derived from vegetable is likely to be the one playing very important role for the contamination of the products.

最近，各種調理冷凍食品（以下冷食と略す）が大量に生産されているが，なかでも畜肉を主原料としたハンバーグ，餃子およびシューマイは比較的大量生産のラインにのせやすい調理加工品であり，大衆のし好にも良く合うところから，生産量の増加が著しく，昭和47年末には42,000トン，すなわち全冷凍食品生産量の15%以上にも達する製品が市場に出廻ったといわれている[1]．しかし，これらの製品は大量生産のためのライン化が比較的最近になって実現したために，製品の細菌学的な品質の制御が果して軌道に乗っているか否か，その実態については明らかにされていない．そこで今回はこれらの市販冷食の細菌汚染の実態を究明するかたわら，加工工程ラインを点検し，細菌汚染の要因を発見する目的で，首都近効の4冷食工場を対象に実態調査を行なった．

以下，その成績について報告する．

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

試料ならびに試験方法

1. 試　料

1) 実態調査用市販冷食

東京都内の小売店の店頭から食品機動班によって，昭和46年～48年の3年間にわたって2月または9月に採取されたハンバーグ 117例，餃子 68例，シューマイ 49例，計 234例の市販冷食を対象とした．

2) 加工工程別の試料

昭和48年5月から昭和49年2月の間に東京近郊の4ヵ所の冷食工場を対象に，それぞれ原料，成型，加熱，凍結，製品の5工程に分けて調査を実施した．なお，4工場中2工場はハンバーグ，餃子およびシューマイの3品目を，他の2工場はハンバーグまたは餃子とシューマイのいずれかを加工していたので，それぞれの加工ラインについて調査した．また，餃子とシューマイは原料や加工工程が近似しているため餃子を対象に実施した．

原料としては主要構成成分と考えられる肉（豚，牛マトン，馬肉などを混合したもの），野菜（タマネギ，ニラ，キャベツなどを細切し混合したもの），調味料（香辛料，食塩，砂糖などを混合したもの）を全工場から，パン粉を3工場から，大豆蛋白または小麦蛋白

を2工場からそれぞれ3例ずつ，また，餃子の場合は外皮と中種を共に3例ずつ無菌的に採取した．成型後の工程では1時間おきに3回にわたって各工程終了後のものをただちに無菌的に採取し試験に供した．

2. 試験方法

1) 試料の調整

未凍結のものはそのまま，凍結したものは検査に先立って，2°の氷室内に一夜放置解凍したもの10gを無菌的に秤量採取し，90m*l* の滅菌リン酸緩衝希釈水(pH 7.2)を加えて均質化し，10倍希釈原液を作成し，必要に応じて前記希釈水で10進希釈を行なった．

2) 使用培地

標準寒天培地（栄研化学製）粉末を蒸留水1,000m*l* に溶解し，121°で15分間高圧滅菌を行ない，滅菌プラスチックシャーレ（日水製）に15m*l* ずつ分注し平板とし，35°で1時間乾燥後使用した．

3) 生菌数の測定法

前記1）で調整した各段階試料希釈液0.1m*l* ずつを前記2）で作成した標準寒天培地平板上に滴下し，滅菌コンラージ棒で均等に塗抹し，25°で48時間の条件[2]で培養後，出現した集落数を計測して生菌数を算定した．

4) 分離菌株の同定

菌数測定を行なった後の各試料平板から，原則として10個ずつ釣菌分離した菌株について Vanderzant らの分類法[3]に準拠して，属レベルにおける同定を行なった．

試験成績

1. 市販冷食製造後の貯蔵期間

Table 1. に都内小売店の店頭にあった製品の製造後の経過日時を示す．

この表から明らかなように，年間を通じてほぼ70%が製造後1カ月以内のものであったが，夏期には製造後比較的日の浅い製品が多く出廻わっており，冬期に

Table 1. Surveys made on the storage period of cooked frozen foods at retailers of Tokyo

Month of survey was conducted	Storage period after the procession (monthes)					Total
	0.5	1	2	3	4	
September	77(65.2)	18(15.3)	14(11.9)	2(1.7)	7(5.9)	118
Feburuary	39(33.7)	28(24.1)	21(18.1)	15(12.9)	13(11.2)	116
Total	116(49.5)	46(19.7)	35(15.0)	17(7.3)	20(8.5)	234

Note : Figures in the table indicate the number of samples found, and parentheses indicate per cent occupied.

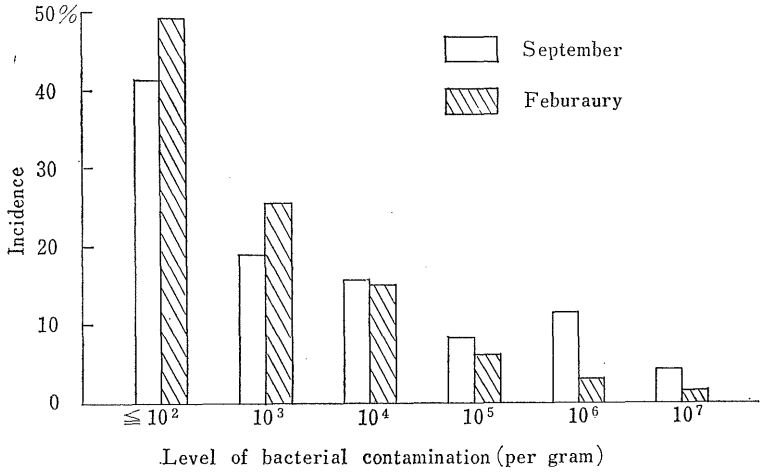


Fig 1. Incidence of bacterial contamination of cooked frozen foods.

はその貯蔵期間がやや長くなっている傾向が認められた.

2. 市販冷食の細菌汚染の実態

Fig. 1. は市販冷食のうち，製造後1カ月以内のハンバーグ，餃子およびシューマイの細菌汚染率を夏期の製品95例と冬期の製品67例について調べた成績を示したものである.

図から明らかなように，これらの製品は加熱工程を経ているため，一般に生菌数が少ないものが多く，製品1g当り 10^3 個以下のものが夏期の製品では60.1%冬期の製品では74.6%を占めていた．しかし，予想外に高い細菌汚染を示した製品も小数ではあるが夏冬共に認められ，最高のものは製品1g当り 10^7 個の細菌数を示した.

また，一部の製品について分離菌株の種類を調べたところ，製品の種類や夏冬に関係なく，*Bacillus* や *Lactobacillus* などのグラム陽性桿菌が圧倒的であった.

3. 冷食原料およびその各加工工程での汚染菌数の消長

先きに述べた4冷食工場における原材料ならびにその加工工程中における細菌汚染状況を追跡調査した結果，Table 2. のような成績を得た．なお，表に示した測定値は同一工程から採取された3例とも測定値に差が認められなかったので，その平均値を示した.

いずれの工場の場合も共通して，肉，野菜などの冷

Table 2. Vicissitude of bacterial contaminants in each step of processing of frozen food

Factory	No. of bacteria found in raw matarial						No. of bacteria found at the end of each processing			
	meat	vege-table	seaso-ning	pouder break	pules wheat	skin	con-tent	embodi-ment	heat-ing	freez-ing	pack-ing
A	38×10^6	13×10^6	72×10^2	43×10^4	13×10^3	—	—	15×10^7	19×10^3	20×10^3	99×10^2
B	19×10^5	23×10^5	$<30\times10$	66×10^3	—	—	—	13×10^6	$<30\times10$	$<30\times10$	$<30\times10$
C	82×10^5	15×10^6	27×10^2	$<30\times10$	—	—	—	81×10^6	10×10^2	$<30\times10$	$<30\times10$
B	—	—	—	—	—	62×30^3	62×10^5	36×10^5	$<30\times10$	$<30\times10$	28×10^2
C	—	—	—	—	—	20×10^7	26×10^6	25×10^7	$<30\times10$	$<30\times10$	$<30\times10$
D	74×10^6	15×10^6	32×10^2	—	63×10^3	59×10^6	75×10^6	66×10^6	49×10	$<30\times10$	$<30\times10$

Note : Upper half are the result on the line for hamburg-stake and lower half are the ones for Gyoza.

食原材料の細菌汚染は1g当り 10^6～10^7 個のレベルにあり，それが成型の段階で 10^7～10^8 個レベルと，10倍程度の菌数増加を示した．これが加熱処理後一挙に 10^2 個レベル以下あるいは汚染の高いものでも 10^4 個レベルへと急激な測定値の落ち込みがみられ，この状態は包装終了の時点まで維持されていた．ちなみに，各工場で採用している加熱温度と時間を示すと，A工場が85° で7～8分間製品を加熱するようなシステムを組んでおり，以下B工場が90° で7～8分，C工場が93° で7分，D工場が90° で8分とそれぞれの工場ごとに異なった温度と時間を採用しており，これが加熱処理後の製品中の生菌数に反映されていた.

4. 冷食原料およびその各加工工程での汚染細菌叢の変化

今回調査の対象としたハンバーグ，餃子およびシューマイは製品の種類により原材料の混合比が多少異なるものもあるが，使用される原材料はどの工場も大同小異であった．Table 3. は前記4工場の調査の際に分離された細菌の種属を群別し，各原材料別またはその加工工程中に検体中で占めた割合を100分率で表わしたものである.

表から判るように，冷食原材料の主要菌叢は原材料ごとにそれぞれ特徴のあるパターンを示していた．すなわち，肉では *Pseudomonas*，野菜では *Lactobacillus*，調味料では *Bacillus*，パン粉，大豆または小麦蛋白では *Micrococcus* などの球菌となっていた．一方，表中の原材料の項目に便宜上示した餃子の皮および中種からはいずれも *Lactobacillus* が最も多く検出された.

なお，全製品を通じて，成型後の検体中には *Lactobacillus* が最も多く，次いで *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Bacillus* などが認められたが，加熱，処理，包装の各工程を経たものでは *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* の占める割合が激減したのに反し，*Lactobacillus* を主体とするグラム陽性桿菌の占有率が急増した．これは，先きに述べた市販冷食から

Table 3. Predominant bacterial flora found in raw materials and in each specimens at the end of the series of processing

Genera	raw materials					each processing step					
	meat	vege-table	seaso-ning	pouder bread	pules wheat	skin	con-tent	embodi-ment	heat-ing	freez-ing	pack-ing
Pseudomonas	33.4	21.3	2.8	3.7	6.0	3.3	4.4	16.7	8.0	—	1.9
Flavobacterium	9.3	4.0	9.4	15.9	22.0	—	1.1	3.9	4.5	1.3	1.0
Achromobacter	4.7	5.3	—	3.7	10.0	3.3	5.6	10,6	4.5	5.0	13.3
Enterobacteriaceae	3.3	26.0	10.4	—	12.0	2.2	20.0	17.8	3.4	2.5	—
Other gram negative bacilli	9.3	7.3	4.7	6.1	6.0	—	—	5.0	—	—	3.8
Coryneforms	17.4	1.3	3.8	9.8	4.0	1.1	4.4	5.0	8.0	6.3	9.5
Lactobacillus	9.3	33.4	8.5	13.4	4.0	77.9	36.8	29.3	46.6	38.7	41,0
Bacillus	3.3	0.7	51,0	13.4	8.0	—	3.3	1.1	21.6	37.4	25.7
Micrococcus and others	10.0	0.7	9.4	34.0	28.0	12.2	24.4	10.6	3.4	8.8	3.8

Note : Figures in the table indicate per cent occupied.

分離された菌株の80%以上がグラム陽性桿菌であった事実と良く一致した.

考　察

今回調査の対象とした冷食はいずれも完全包装がなされている製品であり，しかもその貯蔵あるいは輸送中も −15° 以下に保つことが義務づけられている．したがって，製造後の貯蔵期間が長びいたとしても，製品を汚染していた細菌が極端に増加することはまず考えられない．なお，先きの市販冷食の調査結果からも明らかなように，夏期の製品の細菌汚染が冬期のそれよりも高いものが多かった事実は，夏期に作業環境の気温が高くなりやすいなどのために，使用原材料中の汚染細菌数も多くなりやすく，その結果として製品中の細菌数が多くなるものと考えられる．以上の事実は，細菌学的な意味で良品質の製品を得るためには細菌汚染の少ない良質の原材料を選んで使用すべきことを物語るものであり原料汚染細菌がそのまま製品の生菌数に影響すると述べている小嶋の報告[4]とも符合する点である．

一方，これらの製品を汚染している細菌叢の問題であるが，Table 3. に示したように，成型の段階ですでに畜肉の主たる汚染菌である *Pseudomonas* をはじめとするグラム陰性菌の占有率の低下がみられ，かわりに野菜の主たる汚染菌である *Lactobacillus* が首位の座を占めた．以後の加工工程ならびに包装終了後の製品完成の段階まで，すべて *Lactobacillus* が首位の座を確保しつづけ，また，加熱後には本菌属の次に *Bacillus* が多数を占めていた．これは，これらの製品が畜肉を主原料とする冷食とはいうものの，その実，植物性の原材料の占める割合が意外に高いことを示すものであり，市販冷食の細菌汚染調査で，炭水化物を主体とした原料に由来すると思われる乳酸菌群を多数分離している金子らの報告[5]を思い合わせると，*Lactobacillus* は調味料の主たる汚染菌である *Bacillus* と共に，この種の製品の細菌汚染に重要な役割を演じていることを示唆するものと考える．

なお，今回われわれが検査した貯蔵1カ月以内の冷食の場合，冬期の製品の4.5%，および夏期の製品の15.8%が製品1g当り 10^6 個以上の細菌によって汚染されていた (Fig 1. 参照)．しかし，このような高い細菌汚染は今回調査した4工場で使用していた原材料の汚染度にも匹敵する程度のものであるところから，表示の上では一応加熱あるいは未加熱の区別はあるにしても，加工の過程で必らずしも加熱処理を経ているとは信じ難いものがある．

そこで，今回の調査に協力を願った前記4冷食工場における加工工程ラインのフローシートにしたがって，細菌汚染要因分析図を画いてみた．その結果，全工程にわたって開放部分が多く，一方では今回対象とした冷食は他のものにくらべて，かなりライン化が進んでいるとはいえ生産設備が未発達[6]のため，原料や半製品の運搬およびトイレ中の製品の手なおしなど，作業員の手作業にまたねばならない工程が多く，いたるところに二次汚染の要因の存在が認められた．また，作業環境は湿気が高く，床なども水びたしの場所が多く，特に夏期の高温時には細菌の増殖の可能性が考えられた．なかでも，省力化のためのライン形成に力が注がれている割には，機械器具の使用前後の自動洗浄

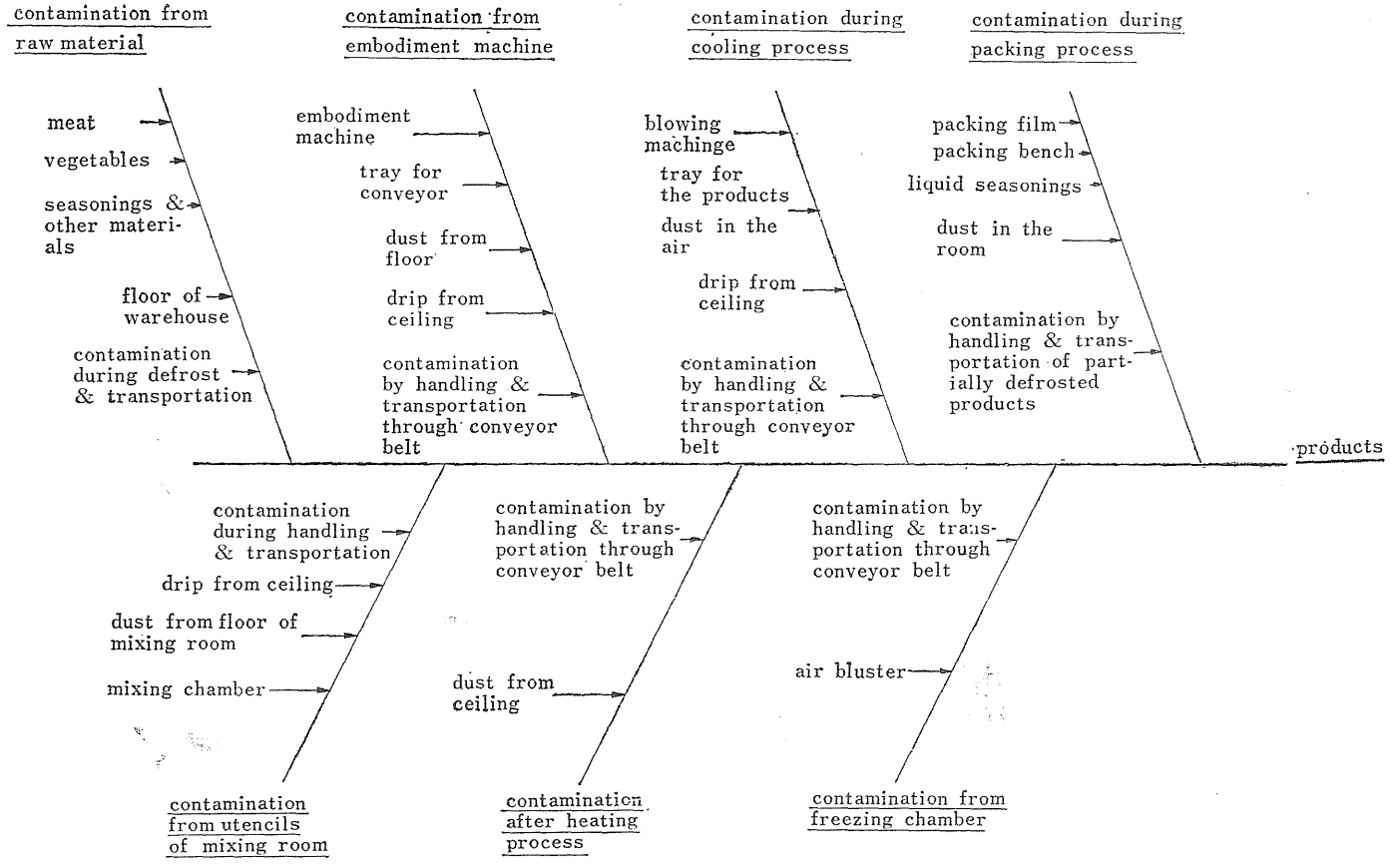


Fig. 2 Schematical presentation of the factors affecting on the bacterial contamination of the products

装置などはほとんど組み込まれておらず，新しい分野の産業であるとはいいながら，過去の乳工業や肉加工業での経験が全く生かされていないように思われた．また，加工工程中に程度の差こそあれ，加熱工程があり，その後直ちに凍結，包装されるという安易感から，加熱前後の細菌汚染あるいは増殖に対して十分な配慮がなされていないことがうかがわれ，特に加熱処理以前の工程における衛生管理面にかなり問題があるように思われた．

以上のことから，冷食の分野で常時，細菌学的に品質の良い製品のコンスタントな生産を可能にするための生産工程全般にわたる管理態勢[7]が確立されるまでには，改善になお多くの努力と時間を必要とすることが判明した．

結　論

ハンバーグ 117例，餃子　68例およびシューマイ49例よりなる市販冷食　計 234例の細菌汚染の実態を明らかにするとともに，東京近郊の4冷食工場を対象に，冷食加工工程中の細菌汚染要因を解明する目的で調査を実施し，次のような成績を得た．

1. 都内に出廻っている冷食の貯蔵期間は夏期の場合その80.5%が，冬期の場合その57.8%が製造後1カ月以内であった．

2. 市販冷食のうち，夏期の製品の24.2%，冬期の製品の10.5%が製品1g当り 10^5 個以上の細菌に汚染されていた．

3. 冷食原料の畜肉，野菜などは1g当り 10^6～10^7 個の細菌汚染を示したが，製品となった時点には 10^2～10^4 個またはそれ以下のレベルまで低下していることが判った．

4. 冷食製品中の菌叢はその大部分が *Lactobacillus* や *Bacillus* などのグラム陽性桿菌によって占められていた．

5. 市販冷食中に細菌汚染の顕著な例の混在が認められた．このことは，プラントの実態調査で認められたように，加工処理の工程中に今後改善を要すると思われる汚染要因が数多く存在しており，それらの諸要因が恐らくは影響を与えたことによるものと推測された．

〔付記〕本研究は昭和48年度当研究所研究課題「冷凍食品の衛生細菌に関する研究」の一環として実施したものである）

文　献

1) 日本冷凍食品協会編：冷凍食品に関連する諸統計，12. 5 (1973)
2) 梅木富士郎，小久保弥太郎，井草京子，春田三佐夫，四宮栄：東獣畜誌.，19.20　合併号，178—183 (1973)
3) Vanderzant, C., Nickelson, R.: *J. Milk and Food Tech.*, 32, 357—361 (1969)
4) 小嶋秩夫：*New Food Indust.*, 13(9) 1—7 (1971)
5) 金子精一，武原文三郎，長谷川幸江，小金井掬江，光崎研一，野沢竜子：神奈川県衛研研究報告，3, 41—56 (1973)
6) 寳谷幸男：*New Food Indust.*, 15 (7) 6—8 (1973)
7) De Figueiredo, M. P.: *J. Milk and Food Tech.*, 35, 148—151 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 197 — 202, 1974

有機塩素剤の使用禁止後における牛乳中の残留農薬の推移

山岸達典* 堀井昭三* 境野米子* 竹葉和江*
森本キミ* 春田三佐夫*

Residual Level of Chlorinated Hydrocarbon Insecticide in Cow's Milk, After the Prohibition of their use in Tokyo

TATSUNORI YAMAGISHI*, SHOZO HORII*, KOMEKO SAKAINO*, KAZUE TAKEBA*, KIMI MORIMOTO* AND MISAO HARUTA*

During the Period from March 1971 through December 1973, a total of 206 specimens, consisting of 151 market milk and 55 raw milk, which obtained from several milk plants and retailer shops in Tokyo, was studied for the presence of chlorinated hydrocarbon pesticides. The detection and identification of them in milk was made by the use of electron capture gas chromatograph of Shimadzu model GC-5 APTFEE with the method of analysis of AOAC.

Results obtained are as follows :

1) The pesticide residues in milk were found to be the alpha, beta, and gamma isomers of the BHC, p-p′-DDT, p, p′-DDE and dieldrin. Among them, approximately 55% of the BHC was existed in the form of β-BHC and 50% of the DDT in p, p′-DDE.

2) Residual levels of these pesticides in milk were remarkably decreased from the beginning of 1972.

3) Detection rate of γ-BHC to total BHC showed remarkable increase during the period of summer and autumn every year.

4) There were no differences on the residual level of the pesticides between raw and market milk.

はじめに

わが国の母乳中の残留有機塩素系農薬，とくに β-BHC が欧米諸国のそれと比較して明らかに高い汚染状況[1~3]にあった関係上，乳児に与える影響が懸念され，母子衛生上極めて深刻な問題[4~7]となった．この問題に対して，著者らは農薬汚染と妊娠中の母体ならびに胎児に及ぼす影響などの関連性について実験的な検討を試み，さきに動物実験により β-BHC のマウス胎仔の発育に及ぼす影響について検討し，次いで都内在住者の母乳，母体血液，臍帯血液および胎便などを対象にして有機塩素剤の汚染実態を調査し逐次報告[9~12]した．今回は，母体の農薬汚染源の最大の媒体が食品[13~14]であることから，その指標として牛乳を選び，有機塩素剤の使用禁止後の汚染実態を約3年間に亘って調査し，若干の成績を得たので報告する．

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

検査材料および検査方法

1) 材 料

試料の市販牛乳は昭和46年3月から昭和48年12月までの期間に都内の工場および販売所から当所へ搬入したもので，原則として毎月5検体ずつ採取し計151例を対象とした．また原料乳は昭和47年6月から翌年5月までの期間に直接工場で採取し計55例を試料としたこの際，同一の工場から市販牛乳61例も合わせて採取した．なお，これらの原料乳の主な産地は埼玉，千葉，茨城，群馬県などの近県であった．

2) 測定方法

試料の残留有機塩素系農薬の分析測定は A. O. A. C. 法[15]に準じて行なった．

検査成績

1) 市販牛乳中の残留有機塩素系農薬量

年間の残留農薬量の推移：有機塩素剤の使用が禁止

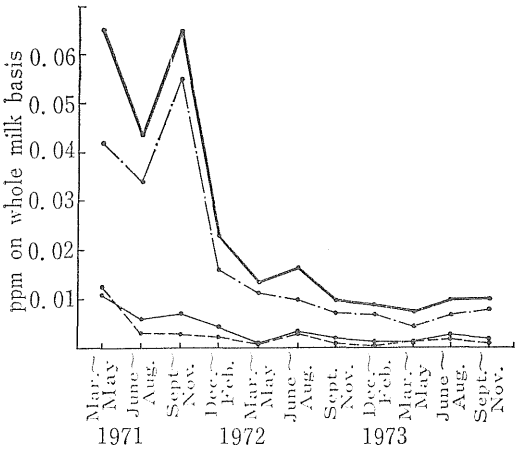


Fig.1 Seasonal variation of organochlorine pesticide residue levels in market milk Mar.1971～Dec.1973
The abbreviations used are:
●——● total organochlorine pectieide
●—·—● total BHC, ●——● total DDT,
●– – –● Aldrin, Dieldrin

された昭和46年代の市販牛乳中の残留農薬レベルは極めて高い汚染状況にあったが，その翌年以降は漸次低下の傾向を示した(Fig. 1).

すなわち，昭和46年3月から同年12月までの市販牛乳中の残留有機塩素系農薬は若干の変動を示したが，総 BHC (α-, β-, γ-, δ-BHC などの各異性体の和)，総 DDT(p,p′-DDT, p,p′-DDE, o,p′-DDTなどの和)，環状ジエン剤（ディルドリン，ヘプタクロルポキサイドなどを含む）などの平均値はそれぞれ 0.035 ppm, 0.008 ppm, 0.006 ppm であった．昭和47年1月から同年12月までの総 BHC, 総 DDT, 環状ジエン剤の平均値ではそれぞれ 0.010 ppm, 0.003 ppm, 0.002 ppm であり，これらの値を前年の平均値と比較するといずれも約1/3に低下した．また昭和48年1月から同年12月までの成績ではさらに低下の傾向を示し，本調査の当所年次の平均値と比べていずれも約1/6まで低下した(Table 1)．なお，市販牛乳の産地別についてみると，埼玉，茨城，群馬県などはその他の県に比べて若干高い値を示す傾向にあった．

Table 1 Organochlorine Pesticide Residue Levels in Market Milk 1971—1973

(ppm on whole milk basis)

Year	No.	Item	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	Total BHC	p,p′-DDD	p,p′-DDE	p,p′-DDT	Total DDT	Dieldrin	Heptachlor epoxide
1971	44	range	tr～	0.002-	tr～	nd～	0.009～	nd～	tr～	tr～	0.001～	nd～	
(Mar.～Dec.)			0.065	0.060	0.009	0.008	0.097	0.009	0.021	0.028	0.043	0.034	
		mean	0.012	0.019	0.002	0.001	0.035	0.001	0.003	0.004	0.008	0.006	nd
		S.D.	0.013	0.013	0.002	0.002	0.021	0.002	0.005	0.005	0.008	0.009	
1972	55	range	tr～	tr～	tr～		0.002～		tr～	nd～	tr～	tr～	nd～
(Jan.～Dec.)			0.012	0.017	0.007		0.030		0.004	0.005	0.006	0.004	0.003
		mean	0.004	0.005	0.001	nd	0.010	nd	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001
		S.D.	0.002	0.004	0.001		0.006		0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
1973	25	range	0.001～	0.001～	tr～		0.002～		tr～	nd～	tr～	tr～	tr～
(Jan.～Dec.)			0.007	0.006	0.004		0.015		0.005	0.002	0.006	0.004	0.002
		mean	0.002	0.002	0.001	nd	0.007	nd	0.001	0.001	0.002	0.001	—
		S.D.	0.001	0.002	0.001		0.002		0.001	0.001	0.001	0.001	—

Keys for abbreviation, tr=trace, nd=not detected, S.D.=standard deviation

四季別の各残留農薬の分画百分率の推移：市販牛乳中の全残留有機塩素系農薬量に対する総 BHC，総 DDT 量などの占める割合は，総 BHC が各年間を通じて最も多く約60～85%を占めており，次いで総 DDT が約10～20%，環状ジエン剤約5～20%の順位であった．これらの季節的な推移についてみると，総 BHC, 総 DDT は毎年その比率にほとんど変化がなく，環状ジエン剤では春期か夏期に一時高くなる傾向が認められた(Fig. 2)なお，環状ジエン剤のうち約90～95%がディルドリンで占められており，ヘプタクロルエポキサイドは約5～10%にすぎなかった．またアルドリン，エンドリンは微量検出か，あるいは検出されなかった．

次に，総 BHC 量に対する各異性体の割合は，β-BHC が最も多く約40～57%を占め，次いで α-BHC

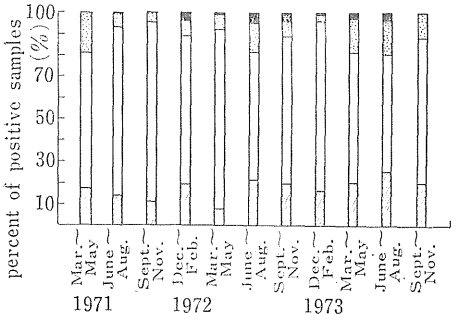


Fig.2 Distribution of BHC, DDT, Dieldrin and Heptachlorepoxide to total pesticide residues in market milk
The abbreviations used are:
▨ total DDT □ total BHC
■ Heptachlorepoxide ▩ Dieldrin

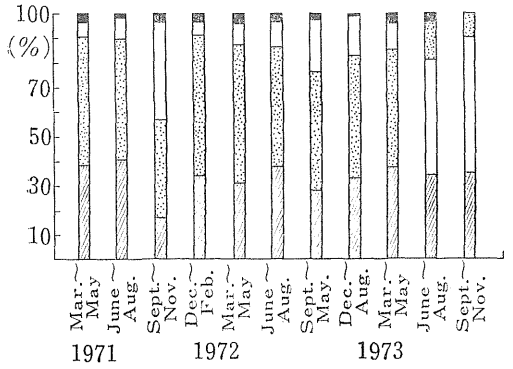


Fig.3 Distribution of α-, β-, γ- and δ-BHC to total BHC in market milk
The abbreviations used are:
▨ α-BHC ▩ β-BHC □ γ-BHC ■ δ-BHC

約17～40%, γ-BHC 約5～40%であり, δ-BHCが最も少なく約1～4%であった. これらの四季別の推移では, γ-BHC の変動が著しく, 夏期か秋期に高くなる傾向を示した. しかし, α-BHC では γ-BHC の場合と逆に秋期に低くなる傾向を示した. β-BHC, δ-BHC では変動の幅が小さくほぼ一定の推移を示した(Fig. 3).

他方, 総 DDT 量に対する代謝産物の DDE などの比率は p,p'-DDT 約20～63%, p,p'-DDE 約10～57%, p,p'-DDD trace～27%であり, その変動の幅はさきの BHC の場合と比較すると極めて広い. これらの四季別の推移についてみると, p,p'-DDT が夏期または秋期に一時高くなる傾向を示したが, p,p'-DDE では冬期, 春期に高くなる傾向を認めた(Fig. 4).

2) 原料乳と市販牛乳との残留有機塩素系農薬量の比較

すでに述べたごとく, 著者らは有機塩素剤の使用禁止時から現在にいたるまで継続して都内の市販牛乳中

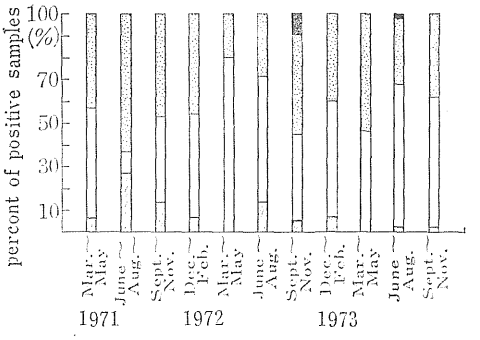


Fig.4 Distribution of p,p'-DDD, p,p'-DDT, p,p'-DDE and o,p'-DDT to total DDT in market milk
The abbreviations used are:
▨ p,p'-DDD □ p,p'-DDE ▩ p,p'-DDT
■ o,p'-DDT

の残留農薬量を測定し, その汚染実態を調査してきたが, その間, 牛乳中の異種脂肪の混入事例が報告され, 原料乳と市販牛乳との間に残留農薬量に差を生じているのではないか, あるいは牛乳の処理過程で残留農薬が減少しているのではないかと考えられた. そこで原料乳と市販牛乳中の残留農薬量を昭和47年6月から翌年5月までの1年間について比較調査した. その結果, 次のような成績を得た.

原料乳, 市販牛乳中の残留有機塩素系農薬量：原料乳中の残留農薬量の1年間の平均値は総 BHC 0.007±0.006 ppm, 総 DDT 0.002±0.002 ppm, ディルドリン0.001±0.001 ppm であった. 一方, 市販牛乳では総 BHC 0.007±0.004 ppm, 総 DDT 0.002±0.001 ppm, ディルドリン0.001±0.001 ppm であり, 原料

Table 2 Comparision of Pesticide Residue Levels in Raw and Market Milk June 1972～May 1973 (ppm on whole milk basis)

Pesticide	Item	Market milk No. of samples 61	Raw milk No. of samples 55
Total BHC	range	0.003～0.039	0.002～0.024
	mean	0.007	0.007
	S.D.	0.006	0.004
Total DDT	range	nd ～0.008	nd ～0.006
	mean	0.002	0.002
	S.D.	0.002	0.001
Dieldrin	range	tr ～0.003	tr ～0.004
	mean	0.001	0.001
	S.D.	0.001	0.001

Keys for abbreviation, tr=trace, nd=not detected, S.D.=standard deviation

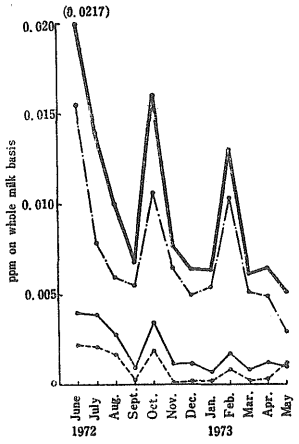


Fig 5 Monthly variation of organochlorine pesticide residue levels in raw milk

The abbreviations used are:
total organochlorine pesticide
total BHC, total DDT,
Aldrin, Dieldrin

乳と市販牛乳中の残留農薬量との間には有意の差を認めなかった (Table 2). なお，原料乳中の脂肪含量は平均して3.3±0.2%であり，市販牛乳中のそれは3.2±0.2%であった.

四季別の原料乳，市販牛乳中の残留農薬量の推移：原料乳 (Fig. 5)，市販牛乳中の総BHC量の平均値は夏期ではいずれも0.001ppmと同じ値であり，秋期では0.008 ppmと0.007 ppm，冬期0.007 ppm，0.007 ppm，春期0.005ppm，0.005 ppmで，原料乳と市販牛乳の総BHC量はほぼ同じ様な値で推移した．また総 DDT，ディルドリン量では前述の BHC の場合と同様にそれぞれのレベルに差がなく酷似した値を示した．なお，全残留農薬量に対する総 BHC，総 DDT などの占める割合では原料乳と市販牛乳との間に若干の差異がみられたが，それらの推移はほぼ同じ傾向を示した (Fig. 6). 以上述べたごとく，原料乳と市販牛乳中の残留農薬量やその推移あるいは比率などには差異を認めなかった.

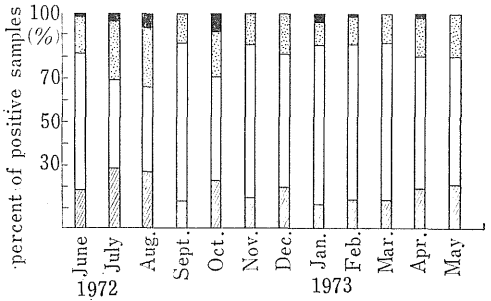


Fig.6 Distribution of BHC, DDT, Dieidrin and Heptachlorepoxide to total pesticide residues in raw milk

The abbreviations used are:
total DDT, total BHC, Dieldrin
Heptachlorepoxide

考　察

十数年前までの農薬の理想的な効果像は残効性の大きい方が好ましい薬剤であると評価されており，当時は農薬の生物連鎖による濃縮や慢性毒性などの問題については何ら危惧されなかったが，1962年 R, Carson の "Silent Spring" の出版を契機に欧米諸国では生物圏の残留農薬，とくに DDT が大きな社会問題[2,16]にまで進展した．一方，わが国では上田ら[17](1966年)の乳・乳製品中の残留有機塩素剤の調査により，β-BHC による汚染が英米両国のデータと比べて極めて高い状況にあるとの報告をみて以来，にわかに食品中の残留農薬が問題となり，厚生省[18]は1970年1月から翌年3月までの期間に原料乳，市販牛乳などの残留農薬の実態調査を実施した．その結果，牛乳から BHC，DDT，ディルドリンなどの残留が認められ，そのうちβ-BHC の汚染濃度が諸外国のそれと比較して明らかに高いことが確認された．また，これらの汚染状況は西日本に高く，東日本に低かった．なお，この際，飼料の稲ワラ，ふすま，乾草，ペレットなども調査しており，そのうち稲ワラ中のβ-BHC量が他の飼料と比べて極度に高いことが明らかとなり，牛乳の汚染の主因は農薬の残存する稲ワラを乳牛に給飼したために牛体に蓄積され，それが牛乳中に移行したものであることが判明した．このことは病害虫の多い西日本で稲作に使用した BHC 量が東日本よりも多いことからもうなずける．これらの問題に対処するため農林省は昭和46年に DDT，BHC などの全面使用禁止の措置をとり，厚生省では農薬の残存する稲ワラの給与の禁止ならびに牛乳中の残留有機塩素剤の暫定基準を設け，β-BHC 0.2 ppm 以下，DDT (総 DDT) 0.05 ppm，ディルドリン0.005 ppm と定めるにいたった．しかし，これらの措置によって農薬の残留問題がすべて解決したわけではない．このことは基準設定後においても人体の農薬汚染の実態が何ら変っていない事実[12]からみて，公衆衛生上極めて重要な問題であると考える.

そこで著者らは有機塩素剤の使用禁止時にあたる昭和46年3月から昭和48年12月までの約3年間に亘って都内の市販牛乳中の残留農薬の汚染実態を追跡調査した結果，すでに調査成績の項で述べたごとく，昭和48年12月の市販牛乳中の残留農薬レベルは調査当初の残留量と比べて約1/6～1/10までに低下したが，殺虫成

分である γ-BHC，ディルドリンなどが春期から秋期にかけて一時増加する傾向にあった．この増加現象は総 BHC に対する各異性体の占める割合の推移からみても，あるいはそれらの絶対量からみても，程度の差こそあれ冬期のそれと比較して明らかに高くなっている．有機塩素系農薬の使用禁止が完全に守られているとの仮定の下で，なぜ暖期の牛乳に γ-BHC などの残留量が高いかについて考えてみると，次のようなことが推測される．

すなわち，春から秋の間は飼料として牧草が給与されるが，その場合，牧草地の土壌は水田のそれに比べて乾燥状態にあるため，残留農薬の分解消失が緩慢[19]，である一方，γ-BHC ディルドリンなどは水に対する溶解性が β-BHC よりも高い[20]ため，土壌のかなり下層部に浸透して安定状態にあること，また各化合物の揮散性とその残存率の関係[21]からみると，γ-BHC は土壌中の温度，湿度の上昇によりすみやかに揮散して表層土壌に移行[22]し，そこから吸収されて牧草中の残留量が高くなり，暖期の牛乳中 γ-BHC 量が高くなるものと考えられる[23]．

次に，さきに述べた暫定基準値と本調査成績とを照らし合わせてみると，DDT，β-BHC 量ではその汚染が極めて高いレベルにあった昭和46年の牛乳でさえも基準以下にあった．すなわち，現在にいたるまでそれらの基準量を上回る牛乳は1例も認められなかった．

なお，基準設定後のわが国の牛乳中の残留農薬の実態調査に関する文献[22]を総括しても，この基準量を越えるものはほとんどみあたらない．一方，ディルドリン量では0.005 ppm の基準量を越えたものが昭和46年3月から同年7月までの牛乳に多く，28例中7例という高率であったが，その後は基準量の約1/2～1/5程度に維持される傾向にあった．

以上述べたごとく，牛乳に関する限り，明らかにその残留農薬量は減少し，有機塩素剤の使用禁止による効果と推測されるが，しかしここで留意しなければならない点は，農薬の使用が禁止されてから約3年を経過してもディルドリンの残留量がその基準量に近いという点に注目しなければならない．また，暫定基準についてはその量を越えなければ人体に対する安全性が確保されているという意味合のものではなく，あくまでも汚染防止のための努力目標であると考えるべきである．したがって，単に暫定基準を越すか否かではなく，人体の農薬汚染との関連性について重視しなければならぬ問題である．その点からみれば，母乳中の残留農薬量が牛乳のそれよりも高く(Table 3)，さらにそのレベルは牛乳の場合と比較して低下する速度が遅いという事実から，胎児あるいは新生児の汚染状況は農薬の使用禁止前と何ら変っていないと予測されるし，今後とも牛乳をはじめ食品全般について農薬汚染防止の努力を払わなければならぬのは当然であろう．

Table 3　Organochlorine Pesticide Residue Levels in Human Milk 1971—1973
(ppm on whole milk basis)

Year	No.	Item	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	Total BHC	p,p′-DDD	p,p′-DDE	p,p′-DDT	Total DDT	Dieldrin	Heptachlor epoxide
1971	30	range	tr～	0.0030～	nd～		0.0070～	nd～	0.0030～	nd～	0.0040～	tr～	tr～
			0.0030	0.1620	0.0250		0.1770	0.0010	0.0960	0.670	0.1520	0.0120	0.0300
		mean	0.0009	0.0348	0.0043	nd	0.0400	—	0.0280	0.0132	0.0418	0.0026	0.0086
		S.D.	0.0006	0.0321	0.0056		0.0347	—	0.0212	0.0138	0.0322	0.0021	0.0064
1972	10	range	0.0010～	0.0260～	0.0010～		0.0280～	nd～	0.0070～	nd～	0.0170～	0.0020	tr～
			0.0030	0.1260	0.0030		0.1290	0.0010	0.0840	0.0440	0.1280	0.0080	0.0030
		mean	0.0017	0.0564	0.0018	nd	0.0599	—	0.0431	0.0198	0.0629	0.0052	0.0013
		S.D.	—	0.0331	—		0.0331	—	0.0264	0.0100	0.0346	—	—
1973	10	range	0.0010～	0.0190～	0.0050～		0.0089～		0.0061～	0.0038～	0.0103～	0.0012	nd～
			0.0220	0.1017	0.0230		0.1029		0.1099	0.0144	0.1244	0.0056	0.0012
		mean	0.0092	0.0317	0.0096	nd	0.0336	nd	0.0397	0.0078	0.0479	0.0034	—
		S.D.	0.0056	0.0293	0.0049		0.0295		0.0270	0.0035	0.0302	0.0011	—

Keys for abbreviation, tr=trace, nd=not detected, S.D.=standard deviation

要　約

都内の市販牛乳を対象にして有機塩素系農薬の汚染実態を有機塩素剤の使用禁止時の昭和46年3月から毎月牛乳を採取し，約3年間継続して調査した．なお，昭和47年6月から翌年12月までの1年間は原料乳も合わせて同様な調査を実施した．その結果を要約すると下記の通りである．

1) 昭和46年3月から同年12月までの市販牛乳中の残留農薬量の平均値は総 BHC 0.033 ppm 総 DDT 0.008 ppm，環状ジエン剤0.006 ppmと極めて高い値を示したが，昭和47年1月から同年12月までの総 BHC 総 DDT，環状ジエン剤などの平均値はそれぞれ0.010 ppm，0.003 ppm，0.002 ppm となり，前年の値と比較していずれも約1/3に低下した．昭和48年ではさらに低下する傾向を示し，調査開始の年次に比べて約1/6に低下した．

2) 市販牛乳中に検出された全残留有機塩素系農薬量に対する各農薬量の占める割合は年間を通じて総 BHC が最も高く約60～85%の範囲で推移した．次に総 DDT が約10～20%，環状ジエン剤約5～20%の幅で変動した．それらのうち，γ-BHC，p, p′-DDT，ディルドリンなどは各年次とも春期から秋期にかけて一時増加する傾向を示した．なお，環状ジエン剤では約90～95%がディルドリンで占められていた．

3) 原料乳と市販牛乳中の残留農薬量ではその両者ともほぼ同様な値を示し有意差を認めなかった．また原料乳中の全残留農薬量に対する総 BHC，総 DDT などの占める割合，あるいは各異性体，代謝産物の比率などの推移は市販牛乳の場合と同様な傾向を示した．

謝　辞

本調査にご協力をいただいた東京都衛生局乳肉衛生課，牛乳検査室および食品機動監視班の職員各位に深謝いたします．

〔附　記〕

本研究は昭和48年度当研究所研究課題「食品中の残留有機塩素系農薬による母体の汚染と胎児への影響について」の一環として実施したものである．

文　献

1) Egan, H., Goulding, R., Roburn, J. and Tatton, J. O'G.: *Brit. Med. J.*, 2, 66—69 (1965)

2) Curly, A. and Kimbrough, R.: *Arch. Environ. Health.*, 18, 156—164 (1969)

3) 西本孝男，上田雅彦，田植　栄：医学のあゆみ，73 (6)，275—277 (1970)

4) 道口正男，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：日本公衛誌，19 (10)，541—543(1972)

5) 厚生省母乳農薬汚染研究班：食衛誌，13 (5)，422—437 (1972)

6) 厚生省母乳農薬汚染研究班：*ibid*，13(5)，438—450(1972)

7) 林　路彰：産婦人科の世界，23(4)，33—36 (1971)

8) 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)

9) 山岸達典，藤本千鶴，竹葉和江，吉岡政雄，春田三佐夫：*ibid*，40(7)，929—934(1972)

10) 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：*ibid*，41(2)，209—215 (1972)

11) 山岸達典，藤本千鶴，竹葉和江，森本キミ，春田三佐夫，海沼　勝：*ibid*，41(4)，471—475 (1972)

12) 山岸達典：都衛研・研究報告環境汚染（いわゆる公害）に関する調査・研究（その1）28，69—75 (1973)

13) 上田雅彦，田植栄，近沢紘史，西本孝男：食衛誌，12(6)，445—450 (1971)

14) 上田雅彦：科学，42(10)，553—560(1972)

15) Horwitz, W.: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 11 th Ed., 475—511 (1970), A. O. A. C., Washington, DC

16) O'Leary, J. A., Davies, J. E., Edmundson, W. F. and Reich, G. A.: *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 107(1), 65—68 (1970)

17) 西本孝男，上田雅彦，田植栄：食衛誌，7(2)，152—162(1966)

18) 厚生省乳肉食品農薬汚染研究班：*ibid*，13(4) 299—309(1972)

19) 能勢和夫：衛生化学，19(4)，177～188 (1973)

20) 湯嶋健，桐谷圭治，金沢純：生態系と農薬，(1973) 岩波書店

21) 立川　涼，脇本忠明，小川恒彦：食衛誌，11 (1)，1—8(1970)

22) 中江利孝：*ibid*，14(1)，1—17(1973)

23) 山岸達典，春田三佐夫，高田峰昭，大塚伸幸，田中錠太郎，太田亨二：畜産の研究に投稿中

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 203 — 206, 1974

食品中のマイコトキシンに関する研究（第5報）
小麦粉の T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol 試験法

直井家寿太* 風間栄治* 斎藤和夫* 小川仁志*
志村公子* 木村康夫*

Studies oa Mycotoxins in foods (5)
Analytical Procedure of T—2 Toxin and Diacetoxyscirpenol in Powdered Wheat

YASUTA NAOI*, EIJI KAZAMA*, KAZUO SAITO*, HITOSHI OGAWA*,
KIMIKO SHIMURA* AND YASUO KIMURA

The Procedure for chemical detection of trichothecene-type (T-2 toxin and Diacetoxyscirpenol) and it application to the screeing from powdered wheat were described. These toxins were visualized under visible or ultra violet light (360 nm) afer spraying the plate with 20% H_2SO_4 and then heating at 10°, 20 min.

1. 緒　言

1973年 Ueno[1]らは14種の Fusarium sp. について Tricho thecene 型 mycotoxin の検出をおこなった．その結果殆んどの species が2種以上の toxin を産生することを確認している．この事実は食品が Fusarium sp. によって汚染された場合，Tricothecene 型 toxin による複合汚染を考慮する必要があることを示唆している．前報[2]において我々は穀類のうち特に米，押麦，小麦粉について Fusarenon-X の試験法を作製し報告した．この試験法においては，Fusarenon-X のほか，Nivalenol の試験も同時におこなうことができる．しかしながら他の Tricothecene 型 toxin のうち，大部分の *Fusarium sp.* が産生する T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol は，化学構造上 Aluminum との間にキレートをつくり難い．従ってこの方法ではこれらの toxin を検出することは不可能である．そこで我々は他の手段による T—2 toxin 及び Diacetoxyscirpenol の試験法を確立し，trichothecene 型 toxin による複合汚染の究明に資する目的で本研究に着手した．

2. 実験の部

(1) 試　料　小麦粉

(2) 標準品

(A) T—2 toxin（東京理科大学薬学部微生物学教室）8 α-(3-methyl-butyryloxy)4 β,15-diacetoxyscirp-9-en-3 α-ol の scirpene 系化合物である．メタノール，クロロホルム，アセトン，ベンゼンに可溶で，エーテル，*n*-ヘキサン，H_2O に不溶である．

(B) Diacetoxyscirpenol (Makor Biochemicals for Research). α-4 β, 15-diacetoxyscirp-9-en-3 α-ol の scirpene 系化合物である．メタノール，クロロホルム，アセトン，ベンゼンに可溶，エーテル，*n*-ヘキサン，H_2O に不溶である．

(3) 試験法

(A) 抽出法

試料50 g を精秤する．これにメタノール220 m*l* を加え，ホモジナイザーで5分間攪拌抽出後遠沈する．これよりメタノール層 110 m*l* を正確に分取する．次に16%塩化ナトリウム溶液90 m*l* を加え，メタノール水

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

層を *n*-ヘキサン 100 m*l* で2回洗浄する．このメタノール水層をクロロホルム50 m*l* で3回抽出する．クロロホルム層は合わせ，無水硫酸ナトリウム 15 g を投じて攪拌，静置後沪過沪液を約30 m*l* になるまで減圧濃縮する．

(B) Clean up 及び試験溶液の調製

カラム管 (22 mm×500 mm) にクロロホルムを約半分まで満たし，Na_2SO_4(anh)10 g Kieselgel 10 g を除々に加え，Na_2SO_4(anh)10 g，更に Florisil 10 g を静かに加えたのち，最後に Na_2SO_4(anh)10 g を積層する．クロロホルムを流出させた後，(A)で得られた約30 m*l* のクロロホルム抽出液を加え，吸着させた後，*n*-ヘキサン250 m*l*，エチルエーテル 250 m*l* で洗浄する．次にメタノール：クロロホルム (3+97) の混液350 m*l* で T-2 toxin と Diacetoxyscipenol を溶離する (流速 5～10 m*l*/min)．溶離液は減圧濃縮した後，クロロホルム，メタノール混液 (1+1) 500 μl を加え，ミキサーで激しく混和溶解させる．これを試験溶液とする．

(C) 分離検出

TLC 用プレート20×20 cm (ADSOLBOSIL—1. 厚さ0.25 mm，110°C，2時間活性化) を使用する

(イ) 1次展開：上記 TLC プレートに試験溶液 10 μl を spot した後展開する．展開溶媒はトルエン：酢酸エチル (1+3) を使用し，展開終了後は充分に風乾する．

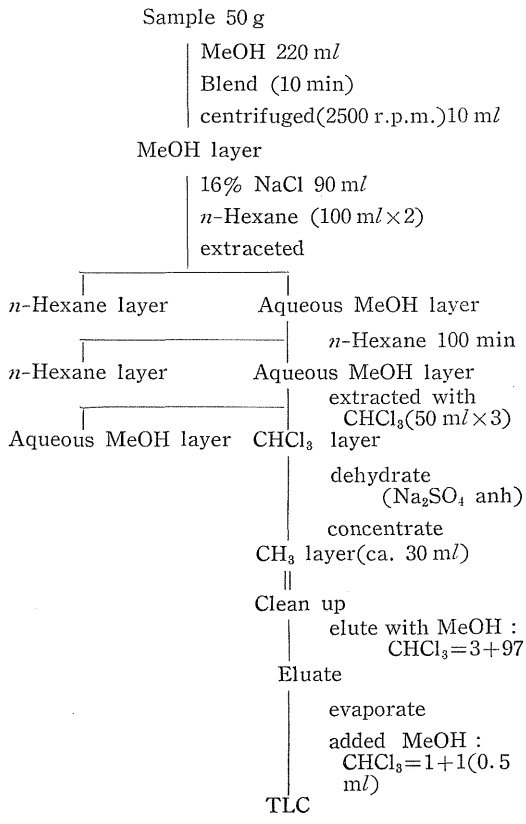
(ロ) 2次展開：1次展開終了後のプレートに，T-2 toxin と Diacetoxyscierpenol の標準品を各々80 ng，100 ng，120 ng と段階的に spot した後展開する．展開溶媒はトルエン：酢酸エチル：氷酢酸 (6+3+1) の混液を使用し，展開終了後プレートは充分に風乾する．次に20%H_2SO_4 を噴霧し，105°C で 20 分間加熱する．室温まで冷えた後，紫外線照射下で，T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol の有無を検する．

3. 実験結果および考察

前報[2]において，小麦粉から toxin を抽出する時，1次抽出にはメタノールのみを使用し，得られたメタノール層に16%塩化ナトリウム溶液を加える方法が，抽出時のエマルジョンを防ぐために極めて有効であったので，今回も同様におこなった．次にメタノール水層を *n*-ヘキサン100 m*l* で2回洗浄すると，黄色物質が多量に除かれる．

Clean up において，Kieselgel，アルミナ，Celite 545，Florisil について検討を加えてみたが，Fusarenon-X 試験法の場合と同様に，Kieselgel 10 g と Florisil 10 g の組合せがもっとも有効であった．カラムの洗浄は *n*-ヘキサン，エチルエーテル各250 m*l* でおこなうことにより，目的物以外の螢光および非螢光物質の除去が略目的を達する．溶離溶媒はクロロホルム，メタノール，アセトン，ベンゼンについて種々の混合比で検討したが，クロロホルム：メタノール (97+3) がもっとも有効であった．この溶離溶媒は 350 m*l* を使用するが，この時の回収率は80～85% である．しかし，これ以下の量では60～65%と低くなる．

Table 1. Analytical procedure of T—2 toxin and Diacetoxyscirpenol in Powdered wheat



定性的確認法として，1次展開終了後，同一プレートについて次は直角の方向に2次展開をおこなったのち，20%H_2SO_4 溶液を噴霧して105°C，20分間加熱して，UV 照射下各 toxin を確認する．二次展開をおこなうのが前報[2]と異なる点であるが，これは，T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol の両者を同時に定量するためと，妨害螢光の影響をなくすためである．2次展開後の TLC プレートは充分に風乾する必要がある．これは酢酸が残っていると，以後の確認において

困難を生ずる場合があるからである．又20% H_2SO_4 噴霧はプレートがしめってくる程度に充分おこない，105°C，20分間加熱する．この発色条件でおこなわないと，T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol の定量値はばらつきが多くなることがある．以上の条件で T—2 toxin は Rf=0.6附近に緑青色でまた Diacetoxyscirpenol は Rf=0.5附近で青白色の螢光を発し確認できる．肉眼による確認限度は0.04 μg である．

TLC 螢光デンシトメトリー

TLC プレート上で T—2 toxin および Dicetoxyscirpenol に20%H_2SO_4 を噴霧加熱した後紫外線照射した時，緑青色および青白色の螢光を発することを確認した．この螢光について螢光分光々度計により励起波長 (excitation) および螢光波長 (emission) を測定した結果，Fig. 1—A および Fig. 1—B に示すとおり，励起波長365 mm 螢光波長440 nm であった．次にそれぞれの toxin を0.06～0.12 μg の範囲で展開したプレートを，展開方向に移動させて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. 2 は 0.06～0.12 μg/spot の濃度における螢光デンシトグラムであり，Fig, 3 はその検量線である．検量線は測定のつど作製する．

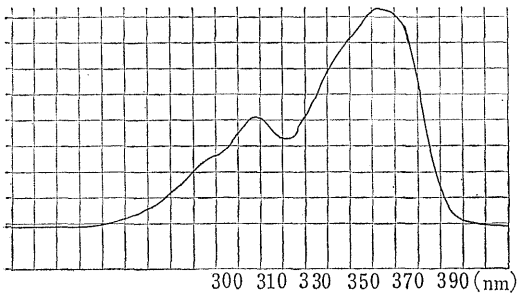


Fig. 1—A Excitation Wavelength

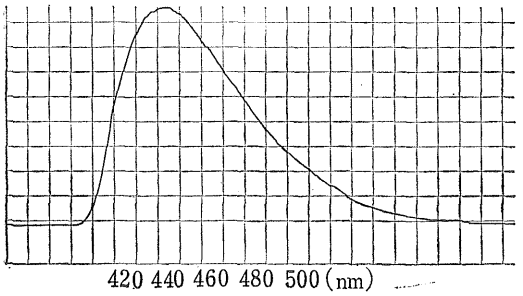


Fig. 1—B Emission Wavelength

Fig. 2 Densitogram of T—2 toxin and Diacetoxyscirpenol on TLC plate.
T—2 : T—2 toxin
Di : Diacetoxiscirpenol

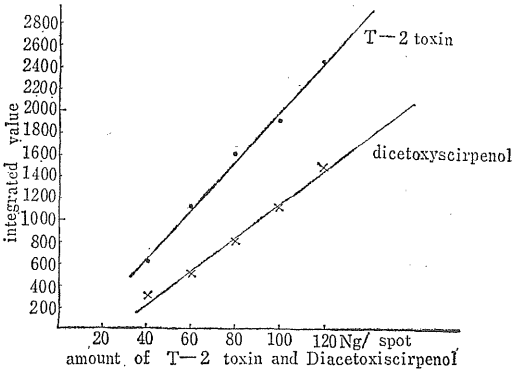


Fig. 3 Calibration curve of T—2 toxin and Diacetoxiscirpenol in TLC densitometry.

4. 試料に対する添加実験

上記の試験法で添加実験をおこなった．Fig. 4 は Clean up をおこなわない時の試験溶液の薄層クロマトグラムである．T—2 toxin, Diacetoxyscirpenol は妨害螢光によって確認困難である．Fig. 5 は Clean up をおこなった時の試験溶液の1次展開薄層クロマトグラムである．妨害螢光は相当部分が除去されているが，なお T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol の間に桃色の螢光が出現し，このままでは定量不可能である．Fig. 6 は2次展開をおこなった薄層クロマトグラムである．妨害螢光と，各 toxin は完全に分離し，螢光デンシトメトリーによる定量が可能となった．

5. 結　論

T—2 toxin と Diacetoxyscirpenol は Fusarenon

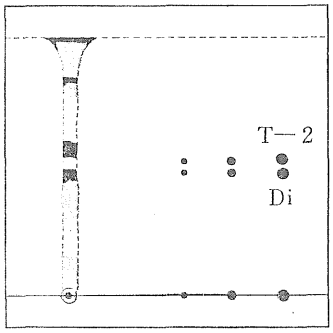


Fig. 4 non-clean up
Visualized in ultraviolet light,
after spraying 20%H_2SO_4 solution.
developər : toluene : AcOEt=1+3

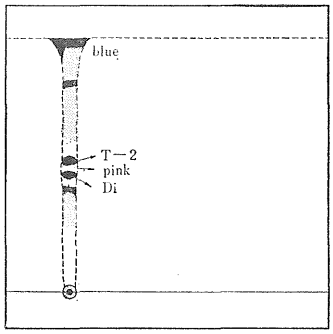


Fig. 5 clean up (development-1)
visulized in ultraviolet light,
after spraying 20% H_2SO_4 solution.
developer : toluene : ACOEt=1+3

-X 及び Nivalenol と同時に産生される場合が多いが，本試験法と前報[2]における Fusarenen-X の試験法を組み合わせることにより，薄層クロマトグラフィ法でこれら Fusarium-toxin を検出することができる．田中[3]らは数種の Trichothecene 型 toxin のガスクロマトグラフィによる試験法を報告した．すなわち各 toxin を TMS 化したのち，ガスクロマトグラフィによって検出する方法であるが，一部の穀類を除

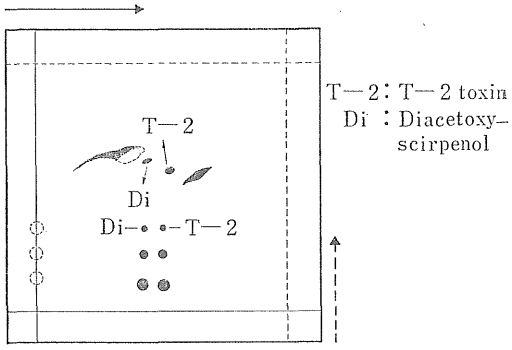


Fig. 6 clean up (development-2)
visualized in ultraviolet light,
after spraying 20%H_2SO_4 solution.
developer : toluene : AcOEt :
HAc=6+3+1

いては共存する妨害物質による ghost peak の出現が懸念されるので，われわれは各種食品からの抽出法を検討中である．何れにしてもガスクロマトグラフィの場合 Retention time による同定のみでは不安があるので，薄層クロマトグラフィ法を必らずおこなって，定性的に正確に同定した後，定量にうつる必要がある．

謝辞 本研究を進めるにあたり，貴重な標準品をいただいた東京理科大学上野教授に深謝致します．

附記（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「食品中のマイコトキシンに関する研究」として実施したものである）

文 献

1) 直井家寿太，齋藤和夫，風間栄治，小川仁志，木村康夫：都立衛研年報，23，175～182 (1971)
2) Ueno. Y, Sato. N, Ishii. K, Sakai. K, Tsunoda. H, and Enomoto. M, App. Micro., 25 699～704 (1973).
3) 田中邦幸，天野立爾，川田公平田辺弘也：食衛試，15，3，195～200 (1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 207—211, 1974

食品中の残留ABSについて

西島基弘* 冠 政光* 高橋尚子*
上村 尚* 中里光男* 木村康夫*

Studies on Residual ABS in Foods

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*, HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO* AND YASUO KIMURA*

はじめに

昭和37年，食品衛生調査会より“中性洗剤を野菜，果物類，食器等の洗浄に使用することは洗浄の目的から甚だしく逸脱しないかぎり人の健康をそこなうおそれがない”と中性洗剤の安全性に関しての答申があり現在に至っているが，最近，再び一部の学者から，中性洗剤のうちのアルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（以下ABSと云う）の毒性について問題にしたため，消費者の間でABSを野菜，果物類および食器類に使用することに種々の懸念をもちはじめた．そこで東京都は中性洗剤の安全性に関する調査研究を決定し，人体への影響，使用実態，除去効果などについて系統的な調査研究をおこなうことになった．

それらのうちで，われわれは主として，使用実態調査を担当し，次の事項についての調査をおこなった．

① 学校，病院，ホテル等の給食施設，飲食店などで使用している洗剤濃度と洗浄後の野菜，果物への残留実態．

② 他府県からの流通食品(農産物)が産地でABSを使用して洗浄したのち，出荷される懸念がもたれているため，青果卸売市場の野菜類についての使用実態．

③ 漬物に関しては原料野菜および漬物容器の洗浄に中性洗剤処理をおこなう可能性があるため漬物類についての実態．

④ ジュース類の原料を中性洗剤で処理する可能性があるため市販の生ジュースおよびかん詰ジュース類についての実態．

⑤ 飲食店などにおいて，洗浄後の食器類に残留している洗液について，中性洗剤の残留実態．

⑥ 人体への影響調査のうちで，ABSを含む日用品による皮膚障害の調査研究の一環として，広尾病院皮膚科の外来患者が実際に使用しているABSの濃度分析．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験の部

1. 検体

（Ⅰ） 中性洗剤使用後の野菜および果物
（Ⅱ） （Ⅰ）の洗剤溶液
（Ⅲ） 青果卸売市場の野菜
（Ⅳ） 漬物およびその原料野菜
（Ⅴ） 市販炭酸飲料水およびジュース類
（Ⅵ） 飲食店等で洗浄後の食器類に付着していた水
（Ⅶ） 広尾病院通院の皮膚病患者が家庭で使用していた洗剤溶液

2. 機器および試薬

（Ⅰ） 自記分光々度計（日立EPS—3T）
（Ⅱ） TLCプレート (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 “Ohne Fluoreszenzindikator,, Schich tdicke 0.25mm)
（Ⅲ） 分析試薬はすべて和光純薬特級をもちいた．

3. 抽出および前処理

ABSの試験法としてガスクロマトグラフ法[1-3]，液体クロマトグラフ法[4,5]，赤外吸収スペクトルによる方法，紫外または可視吸収スペクトルによる方法[6-13]，薄層クロマトグラフによる方法[14]等があるが，いずれの方法も単独では食品中の残留ABSを検出することは困難であるため，いくつかを組合せた方法[15-19]も報告されている．著者らはつぎの方法により

クリーンアップをおこない Abbott 法により定量をおこなった.

(Ⅰ) 試料の調製

検体50gを秤取し，等量の水を加えてホモジナイズしたものを試料とした.

(Ⅱ) エタノール抽出

試料20gを秤取し，pH を 9.0～10.0 に調製したものに無水エタノール 30ml を加え，沸騰水浴中で30分間加熱して抽出したのち，3G4ガラスフィルターをもちいてロ過した．フィルター上の残渣を熱エタノール 30ml で3回洗浄後，全ロ液を合わせたのち，エバポレーターをもちいてエタノールを留去した.

(Ⅲ) 酸加水分解

(Ⅱ)で得た残留物に蒸留水約 100ml および濃塩酸 15ml を加え，還流冷却器をつけて直火で2時間加水分解したのち，50%水酸化ナトリウムをもちいて pH を9.0～10.0に調製した.

(Ⅳ) 石油エーテル処理

(Ⅲ)で得た溶液を石油エーテル 100ml で2回抽出し，石油エーテル層を少量の水で洗浄，洗液を水層に合わせた．つぎに微量の石油エーテルを除去するために，水層を煮沸した.

(Ⅴ) クロロホルム処理

(Ⅳ)で得た水層を冷却したのち，クロロホルム 50ml で2回洗浄をおこなった．水層に混入しているクロロホルムを除去するため水層を煮沸し，冷後，硫酸で中和した.

(Ⅵ) Addott 法によるメチレンブルー活性物質の抽出

(Ⅴ)で得た溶液を Abbott 法によりメチレンブルー活性物質を抽出した．ここで青色を呈しないものはＡＢＳを含有しないものとした．青色を呈したものは 100ml のナス型フラスコに移し，エバポレーターをもちいてクロロホルムを留去した.

(Ⅶ) ＴＬＣによるクリーンアップ

(Ⅵ)で得た残留物の全量をシリカゲルプレートにスポットし，展開溶媒としてイソプロパノールをもちい約 15cm 展開した．展開終了後，ピナクリプトールイエローで発色した．標準ＡＢＳと同じ Rf の部分をけずりとった．シリカゲル中のＡＢＳを熱エタノールで抽出し，ロ紙でロ過した．ロ液をエバポレーターで留去し，残留物の全量を再びシリカゲルプレートにスポットした．展開溶媒として，クロロホルム：メタノール：水＝65：25：4を使用し約 15cm 展開した．次にピナクリプトールイエローを噴霧し，紫外線下でオレンジ色を呈する部分をけずりとり，熱エタノールで抽出し，ロ紙でロ過した．ロ液をエバポレーターで留去し，残留物に 10～20ml の水を加え定量用の試験溶液とした.

4. **Abbott 法による定量**

(Ⅶ)で得た試験溶液の全量を分液ロートに移し，Abbott 法によりＡＢＳを測定した．あらかじめラウリルベンゼンスルホン酸で作成した検量線により含量をもとめた．(Chart 1.)

結果および考察

○中性洗剤使用後の野菜，果物の ABS 残留実態

学校，病院，ホテルおよびレストラン等の飲食店で，中性洗剤を使用して野菜，果物を洗浄したのちの

Table. 1 Amount of ABS detected from fruit and vegetable

Survey was mode at	Sample	No. of tested	Amount of ABS detected (ppm)			
			<1.0	1.0～5.0	5.1～10.0	10.0<
School	Fruit	5	2	3		
	Vegetable	16	10	4	2	
Hospital	Fruit	3	2	1		
	Vegetable	9	5	2	1	1
Hotel	Fruit	2			2	
	Vegetable	7	3	3		1
Restraurant	Fruit	1	1			
	Vegetable	5	2	2	1	
Total		47	25	15	6	2

Note : Figure in the table indicate the number of specimens

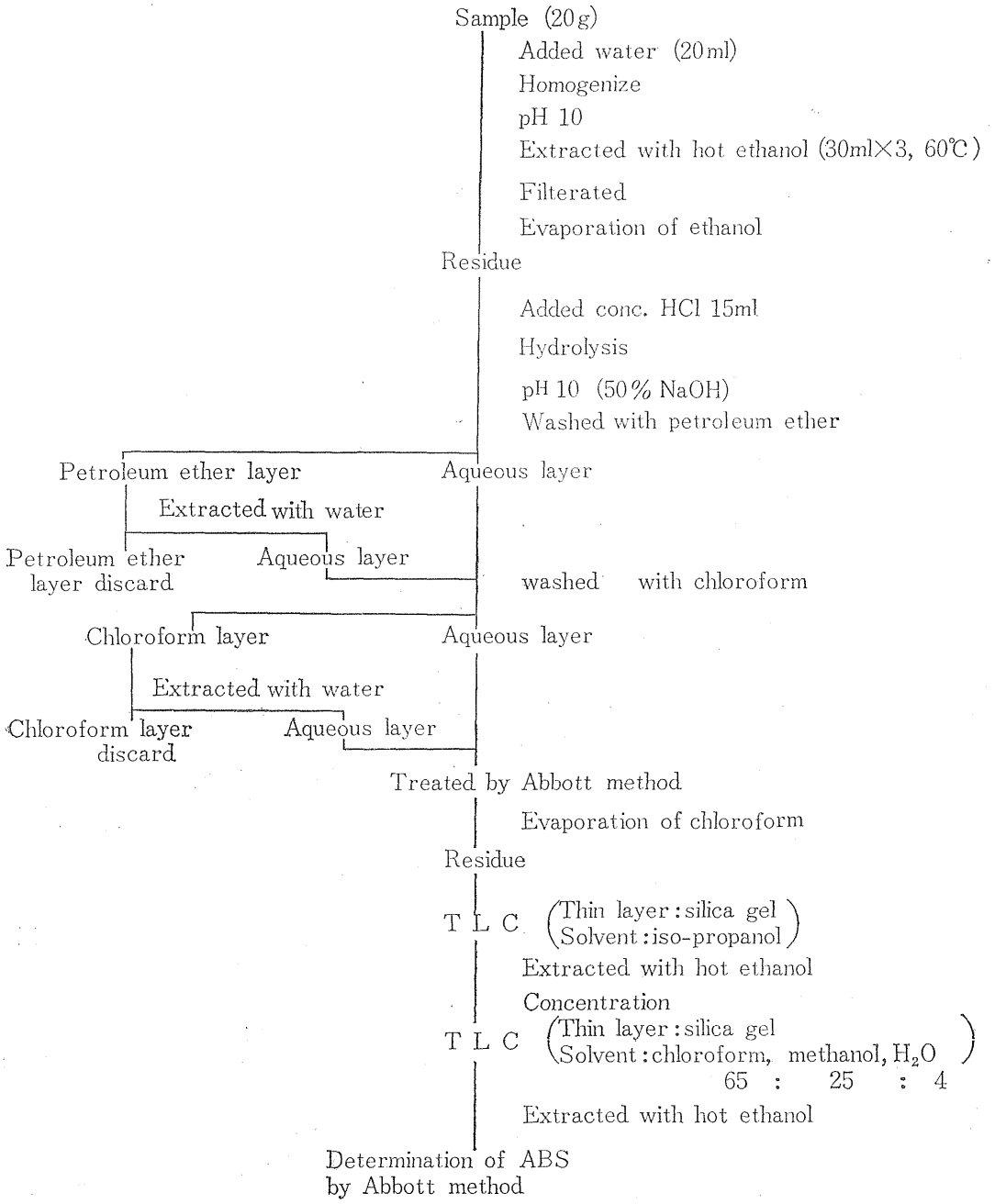


Chart 1. Determination procedure applied in this investigation

残留実態調査をおこなったところ，結果は Table 1. に示したとおりである．

この結果は昭和37年の食品衛生調査会[20]および渡辺ら[21]のモデル実験に照らして，実際の残存量は比較的低い値を示した．

ホテルで比較的高い値の 30 ppm を示したものは，衛生局の調査によると，野菜類をスライスし，かつ，混和したものを，中性洗剤の溶液にひたしたのち，流水で洗滌しているものであることが判明した．

現在，総合調査の一環として長期毒性についての研究が進行中であること，またＡＢＳに関する食品中の残存基準が定められていないこともあるが，しかし，食品添加物として定められていない化学的合成品であるＡＢＳが残存しない方が好ましいことは当然である．したがってスライスしたのちに洗剤で洗浄するような不必要な使用は避けるべきと考える．

給食施設など計22件について，野菜，果物の洗浄に使用していた洗剤濃度は500ppm 以下で使用していたところが20件，他は 1,600ppm（学校）と 1,730ppm（病院）であった．昭和48年４月28日厚生省告示第98号の洗浄剤の使用基準１で“脂肪酸系洗浄剤以外の洗浄剤（もっぱら飲食器の洗浄の用に供されることが目的とされているものおよび固型石けんを除く）にあっては界面活性剤の濃度が0.1% 以下となるようにして使用しなければならない”とあるが，これに照らし合わせてみると２件が過剰使用をしていたことになる．しかし，使用洗剤濃度と食品中の残留量とは相関関係はみられなかった．

○卸売市場の野菜果物類，市販ジュース類，炭酸飲料水および漬物の中性洗剤の使用実態

野菜類が生産地から都内に搬入されるまでの間に，ＡＢＳによる処理をほどこされる可能性がある．そこで，大根２，かぶ１，にんじん１，やまいも１，さつまいも１，ひねしょうが１，新しょうが１，キャベツ１，レタス１，白菜２，ねぎ１，みょうが１のそれぞれの検体数について調査をおこなったが，いずれからも検出されなかった．また飲料類として市販のジュース５，炭酸飲料水10，および漬物（一夜漬）として白菜８（原料２，漬込中３，製品３），きゅうり４（原料２，漬込中１，製品１）について調査をおこなったが，いずれからも検出されなかった．

○食器洗浄後の溜水中の ABS の残留実態

飲食店で食器類を洗浄したのちの溜水，および付着水中のＡＢＳの濃度を調査した，１試料はおよそ20個の食器に残留している水を集めたものであるが，ＡＢＳを含有している洗剤で洗浄しているものからはすべて残留を認め，その含量は５ppm 以下が68%であり，最高が 17ppm であった．

○皮膚病患者が使用していた洗剤濃度

広尾病院の皮膚科に通院している患者のうちで，手指に皮膚障害のある患者が家庭でどの程度の洗剤を使用しているか，１日のうち朝夕の２回について調査をおこなった．使用濃度は各人まちまちであるが，20検体中７検体（４人）が洗剤の使用基準に照らし合わせて過剰の濃度で使用しており，最高2,600ppm の濃度のものもあった．

むすび

各種食品中の残留量，洗液の濃度等について調査をおこなった結果を要約すると次のとおりである．

1. 学校給食およびレストラン等において中性洗剤を使用して洗浄した野菜，果物のすべてから 0.1～32 ppmのＡＢＳが検出された．

2. 各施設が使用していた洗剤濃度は，28検体中洗剤の使用基準をこえるものが２検体あった．ほかはすべて 500ppm 以下であった．

3. 青果卸売市場における野菜類，市販ジュース，炭酸飲料水，漬物およびその原料からＡＢＳが検出されなかった．

4. 飲食店等で，洗浄後の食器に残留している水から最高 17ppm 検出した．食器に付着している水の量から考えて特に問題はないと思われるが，水切りを完全におこなうことが望ましい．

5. 広尾病院外来の皮膚病患者が使用していた洗剤濃度は使用基準の 0.1% に照らして10人中４人が過剰使用していた．

附記

（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「食品中の残留ＡＢＳに関する研究」として実施したものである）．

文献

1) Blakeway, J.M.: *J. Chromatog*, 6, 74—79 (1961)
2) Carnes, W.J.: *Anal. Chem.*, 36, 1197—1200 (1964)
3) Kirkland, J.J.: *ibid.*, 32, 1388—1393 (1960)
4) Mysels, K.J., Biswas, B. and Juvell, M.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 66—69 (1962)
5) Sallee, K.J.: *Anal. Chem.*, 28, 1822—1826 (1956)

6) Mukerjee, P. : *ibid*. 28, 870—873 (1956)
7) Fairing, J,D. and Short, F.R. : *ibid*. 28, 1827—1834 (1956)
8) Gould, E. : *ibid*. 34, 567—571 (1962)
9) Weber, W.J., Morris, J.C. and Stumn, W. : *ibid*. 34, 1844—1845 (1962)
10) Abbott, D.C. : *ibid*. 87, 286—293 (1962)
11) Cropton, R.W.G. and Joy, A.S. : *ibid*. 88, 516—521 (1963)
12) 青木大，岩山陽治：薬学雑誌 79, 526—530 (1956)
13) 斎藤俊英，小篠善雄，土師正子，近藤五郎：分析化学，12, 1179—1183 (1963)
14) Desmond, C.T. and Borden, W.T. : *J. Am. Oil Chem. Soc*., 39, 201—206 (1962)
15) 大場健吉：日農化誌，39, 508—513 (1965)
16) 飯森正秀：同上，45, 1—5 (1971)
17) 川城巌，岡田太郎，辰濃隆：食衛誌，3, 392—398 (1962)
18) 板東平助，木下サト子：食衛誌，6, 373—375 (1965)
19) 毛利善一，常盤文克：食衛誌，13, 141—146 (1972)
20) 食品衛生課指定係：食品衛生研究，12, 3—22 (1962)
21) 渡辺悠二，中村弘，樋口育子，会田朋子，高橋保雄，三村秀一：東京衛研年報，24, 363—370 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 213—220, 1974

かん詰食品中の重金属に関する研究（第3報）
かん詰開かん時に生ずる切り屑について

西島基弘* 冠 政光* 高橋尚子*
上村 尚* 中里光男* 木村康夫*
小林博義** 篠原 楷*** 鯉沼一夫****

Studies on Heavy Metals Dissolved in Canned Foods (III)
Metal Fragments in Canned Foods

MOTOHIRO NISHIJIMA*, MASAMITSU KANMURI*, SHYOKO TAKAHASHI*, HISASHI KAMIMURA*, MITSUO NAKAZATO*, YASUO KIMURA*, HIROYOSHI KOBAYASHI**, TADASHI SHINOHARA*** AND KAZUO KOINUMA****

Solubility of tin and lead into canned fruits after the opeing of the can had been discussed in the previous report. This report deals with metal fragments which fallen into canned foods when they are opened. The survey was conducted on 600 cans and 10 with different sort of can openers.

Results obtained are summarized as follows:

1) Amount of metal fragments found in a canned food after the opening has varied 0～12 mg according to the sort of can openers used.
2) These metal fragments were slightly soluble in both artificial gastric and intestinal juices.
3) Oral administration of 2～32mg of metal fragments into adult rats weighting about 115g did not develop any macroscopical changes in their internal organs.

まえがき

かん詰食品は保存性が高く，大量生産に適し，また輸送，保管等の有用性から今後ますます消費量の増大が見込まれる[1]．

昭和48年春に，かん詰中に金属様物質が混入しているとの苦情が発生した．それについて調査をおこなったところ，かん詰を開かんする際に食品中に切り屑が落下する場合があることが判明した．切り屑についての報告がほとんどないため[2,3]，かん切りと切り屑の関係，切り屑の胃液ならびに腸液での溶解性，切り屑の消化器系への影響などについて検討をおこなったので，その結果を報告する．

* 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毒性部病理研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho, 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
*** 東京都食品監視課
**** 東京都食品衛生課

実験方法

1. 試 料

（Ⅰ） かん切り：家庭で一般に使用しているかん切り9種類，ならびに苦情者の使用していたかん切り1種類をもちいた．

（Ⅱ） かん：Table 1. に示したサイズのもので内容物を入れないで蓋をしたもの（以下空気かんと云う）

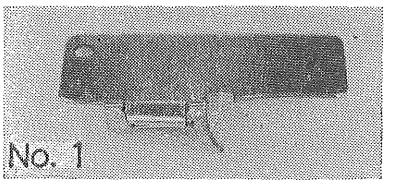
Table 1. Various Kind of test cans (cm)

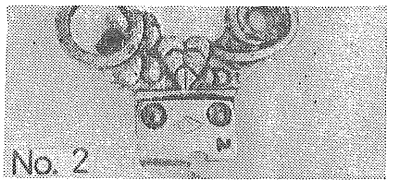
Type of Can	Diameter	High	Circumference
Tall can	5.5	13.2	17.3
Regular can	7.5	5.0	23.5
Baby can	5.5	4.5	17.3
Oval can	12.8×8.6	2.2	34.0

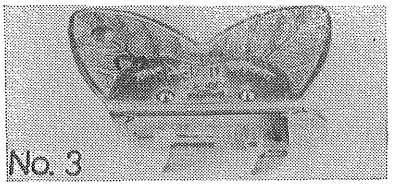
2. 装置および試薬

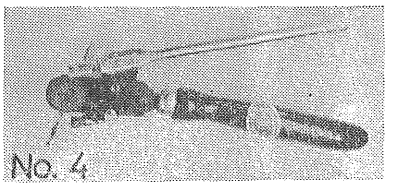
（Ⅰ） 原子吸光分光光度計：パーキンエルマ社製403型

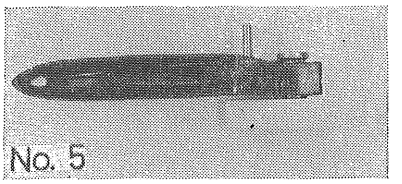
（Ⅱ） ポーラログラフ：柳本P 8

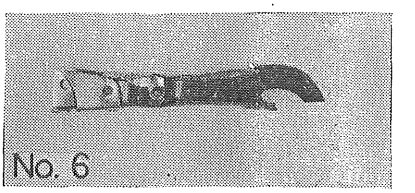


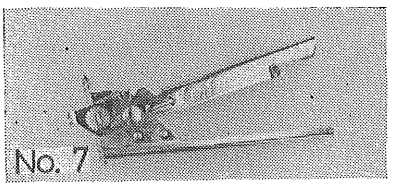


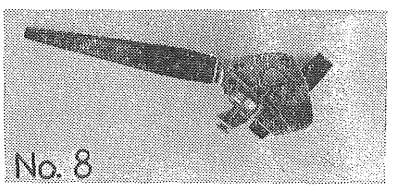


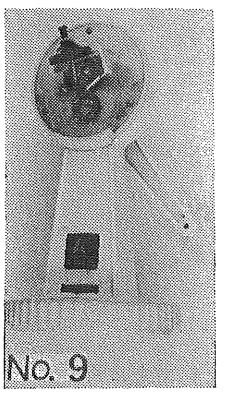












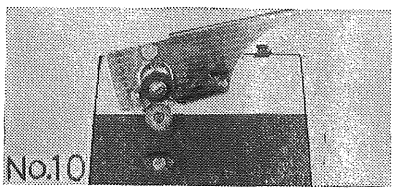


Photo. 1. Various kind of test can openers

（Ⅲ） 電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope）：日本電子製ＪＥＭ100Ｂ走査型電顕により撮影をした．

（Ⅳ） 人工胃液（第一液）および人工腸液（第二液）[4]：第八改正日本薬局方崩壊試験法の項に準じた．

（Ⅴ） 試薬はすべて特級品をもちいた．

3. 各種かん切りによる切り屑の測量法

空気のかんを水で洗滌し乾燥したのち Photo 1. に示すかん切りで開かんした．かん内に落ちた切り屑はパラフィン紙に集め，化学天秤で秤量した．

4. 切り屑および切断面の形態

切り屑および切断面は接写で撮影したのち電子顕微鏡用ガラスプレート上に銀ペーストで接着させ，さらに試料台に固定し，金蒸着を施したものを鏡検した．またかん内面については開かん時に生じる塗装の削れ（きず）を観察した．

5. 人工胃液および人工腸液による切り屑の溶解性

人工胃液および人工腸液それぞれ200m*l* に切り屑約200mg を精秤したものを投入し（液温37°±2°）水浴中で保温し，スターラーで3時間攪拌したのち上澄液を試験溶液とした．

（Ⅰ） 人工胃液および人工腸液中のスズの定量法（ポーラログラフィー）

試験溶液200m*l* をロ紙でロ過し，ロ液を濃縮乾固したのち濃硫酸 5m*l* および支持電解液（１Ｎ－塩酸）を加え，正確に 20m*l* としてポーラログラムを作成した．また同時に作成した検量線により定量した．

（Ⅱ） 鉄の定量法（原子吸光法）

試験溶液 5m*l* に10% 塩酸ヒドロキシルアミン 1m*l* を加え，水で全量を 10m*l* として原子吸光で測定し，同時に作成した検量線により定量をおこなった．

（Ⅲ） 鉛，銅，亜鉛の定量法（原子吸光法）

試験溶液 20m*l* に濃硝酸 5m*l*，過塩素酸 1m*l* を加え，水浴上で乾固したのち，６モル塩酸 30m*l* をもち い分液ロートに移しかえた．分液ロートにエチルエーテル 50m*l* を加え，15分間強振したのち静置し，水層をビーカーに移した．エーテル層に６モル塩酸 10m*l* を加え，５分間強振し水層はさきのビーカーに合せた．ビーカーを加温して水層中のエチルエーテルを揮散させ，冷却したのち約 50m*l* の水で分液ロートに洗い込みＢＴＢを指示薬とし，液が緑色を呈するまで濃アンモニア水を加えた．それに10%ロッセル塩溶液 10m*l*，１%ＤＤＴＣ溶液 10m*l* を加え，振り混ぜたのち，10分間放置し，ＭＩＢＫ 10m*l* を加え，５分間振とうし静置後ＭＩＢＫ層を分取した．そのＭＩＢＫ層を原子吸光により鉛，銅，亜鉛を測定し，それぞれ同時に作成した検量線により定量した．

6. 動物実験

（Ⅰ） 試料投与方法

体重 115.0±1.74ｇ のラット４週令を１週間観察したのち，試料投与14時間前に飼料止めをおこなった．切り屑の体内移行時間については１群３匹とし，ゾンデの先端を１%ゼラチンで栓をして試料各 10mg をつめたのち，水道水 3 cc と共に経口投与した．また消化器系への影響をみるために１群８匹として各 2, 4, 8, 16, 32mg およびコントロール群を同様の方法で投与した．

結果および考察

1. 各種かん切りと切り屑の量について

ベビーフード用のかんを各種かん切りで開かんしたときの切り屑量は Table 2. に示したとおりであり，同じかん切りで開かんした場合も切り方（力の入れぐ

Table 2. Amount of fragments in the canned baby food after opening

Can Opener	Amount of Fragment (mg)					Average
No. 1	0.5	0.6	0.8	0.7	0.5	0.6
No. 2	0.1	0	0.2	0.2	0.2	0.2
No. 3	0.4	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4
No. 4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2
No. 5	0	0	0	0	0	0
No. 6	0.3	0.6	0.4	0.4	0.3	0.4
No. 7	0.1	0.1	0	0.2	0.1	0.1
No. 8	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
No. 9	0.2	1.5	0.5	2.4	1.5	1.2
No. 10	1.1	0.5	0.8	1.2	0.3	0.8

Table 3. Amount of fragments in the canned food after opening (mg)

Can Opener	Type of Can			
	Tall	Regular	Baby	Oval
No. 1	1.0	1.1	0.6	1.5
No. 2	1.0	0.7	0.2	—
No. 3	0.4	0.4	0.4	1.1
No. 4	0.8	1.0	0.1	12.0
No. 5	0	0	0	—
No. 6	1.0	2.8	0.4	3.2
No. 7	0.9	1.1	0.1	1.4
No. 8	0.6	0.3	0.1	—
No. 9	1.0	0.7	1.7	—
No. 10	0.9	0.5	0.9	0.6

あい等）によっても差があるように思われる．

No. 5のかん切りは外側を切るため，内側への切り屑はなく，No. 9, No. 10については比較的多量であった．かんの形態による比較は Tabel 3. に示すとおりであり，各数値はそれぞれ5かんの平均値を示した．Regular かんに比較して Baby かんは No. 1, No. 2, No. 4, No. 6, No.7, No. 8 は屑量は少なかった．一方 No. 3, No. 9, No. 10においては切断距離が短いにもかかわらず切り屑量が多いのはかんの曲率（曲りの度合）と刃の角度等が適していないためと思われる．Oval かんと他の形のかんを比較した場合，切断距離が長いことから切り屑量が多いことは充分考えられるが，No. 4 は開かんの際，抵抗が強く比較的切り屑が大きく，量も 12mg と多かった．また一線のものは全て曲率の少ない（曲がりのなだらかな）部分で開かん不能になった．

2. 切り屑，切断面の形態およびかん内面の側面について

各切り屑の形態は Photo. 2. に示したとおりであり，押し切り式かん切り（No. 1, 2, 3, 6）では比較的粉状になり Photo. 2—1, 歯車式（No. 4, 7, 8, 9) Photo. 2-2 および電動式（No. 10）かん切り Photo. 2—3 は比較的細長く，ねじれた形のものもあった．さらに走査型電顕により切り屑を拡大すると Photo. 3 のような紋様が観察された．切断面は Photo. 4 に示したとおりである．落下寸前のきり屑もあり，また塗装面のはがれも観察された．側面については No. 1, No. 2, No. 3 のかん切りでは Photo. 5—(1) にみられるような削れ（きず）が，また，No. 4 には 5—(2) にみられる削れが観察された．これらについては切り屑中にも塗装部分が検出された．

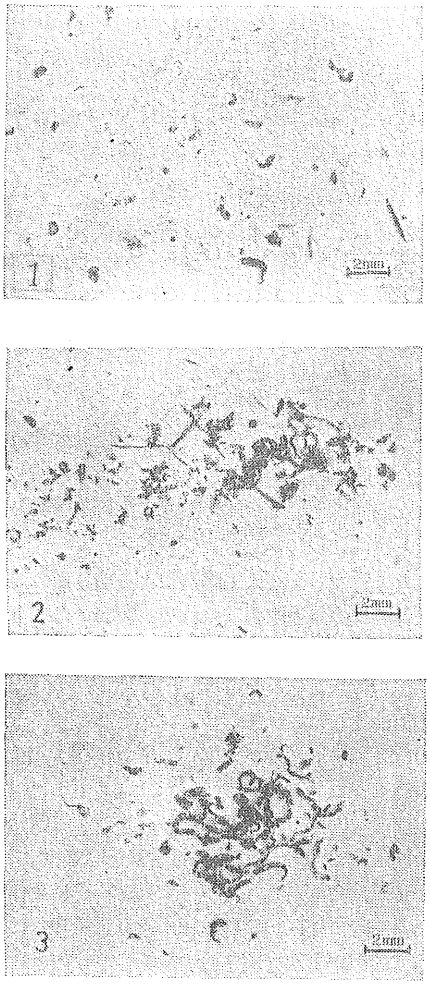


Photo. 2. Metal fragments

Teble 4. Amount of soluble metal from fragment

Artificial Juice	Amount of Metal(%)				
	Sn	Pb	Cu	Zn	Fe
Gastric Juice	0.35	trace	trace	trace	5.10
Intestinal Juice	0.06	trace	trace	trace	0.47

3. 人工胃液，人工腸液による切り屑の溶解について

人工胃液および人工腸液による切り屑の溶解性は Teble 4. に示したとおりであり，人工胃液においては微量のスズおよび鉄が溶解したが，実際の金属落下量から考えて，問題はないものと思われる．

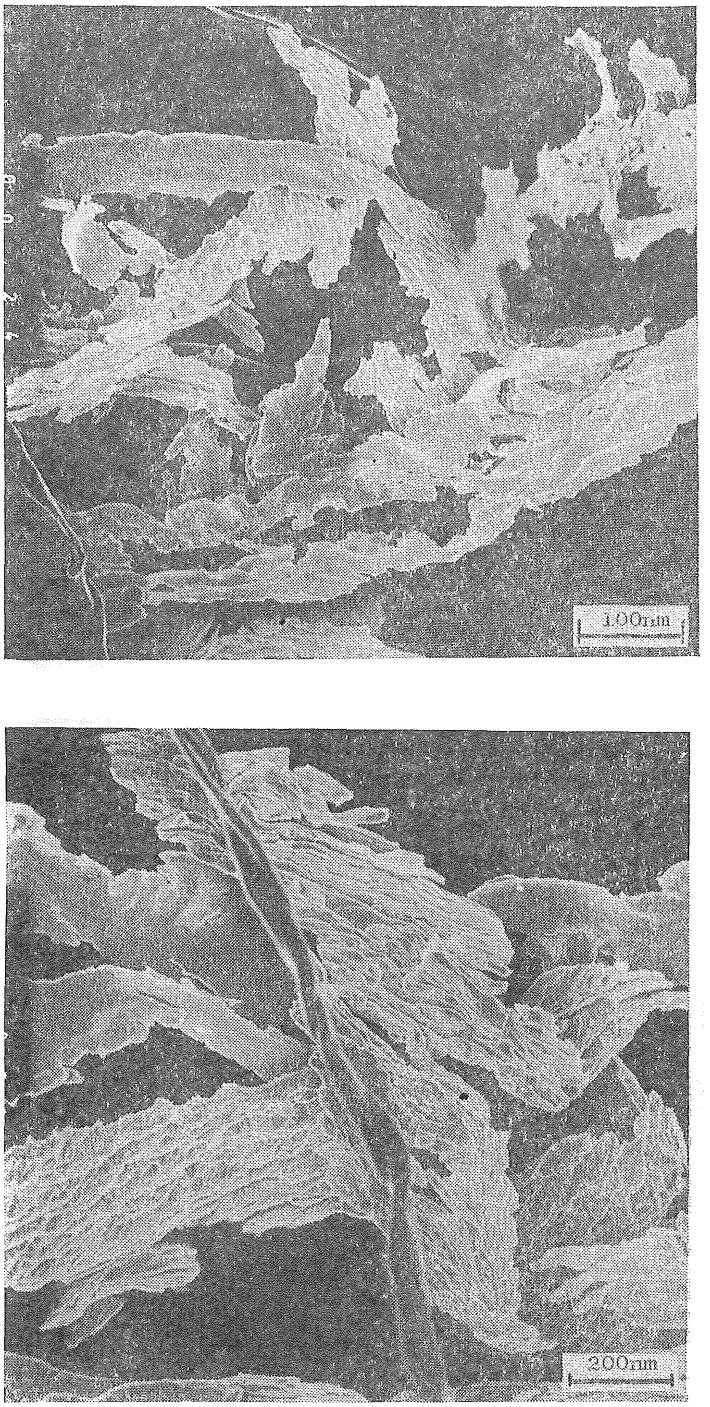


Photo. 3. Metal fragments

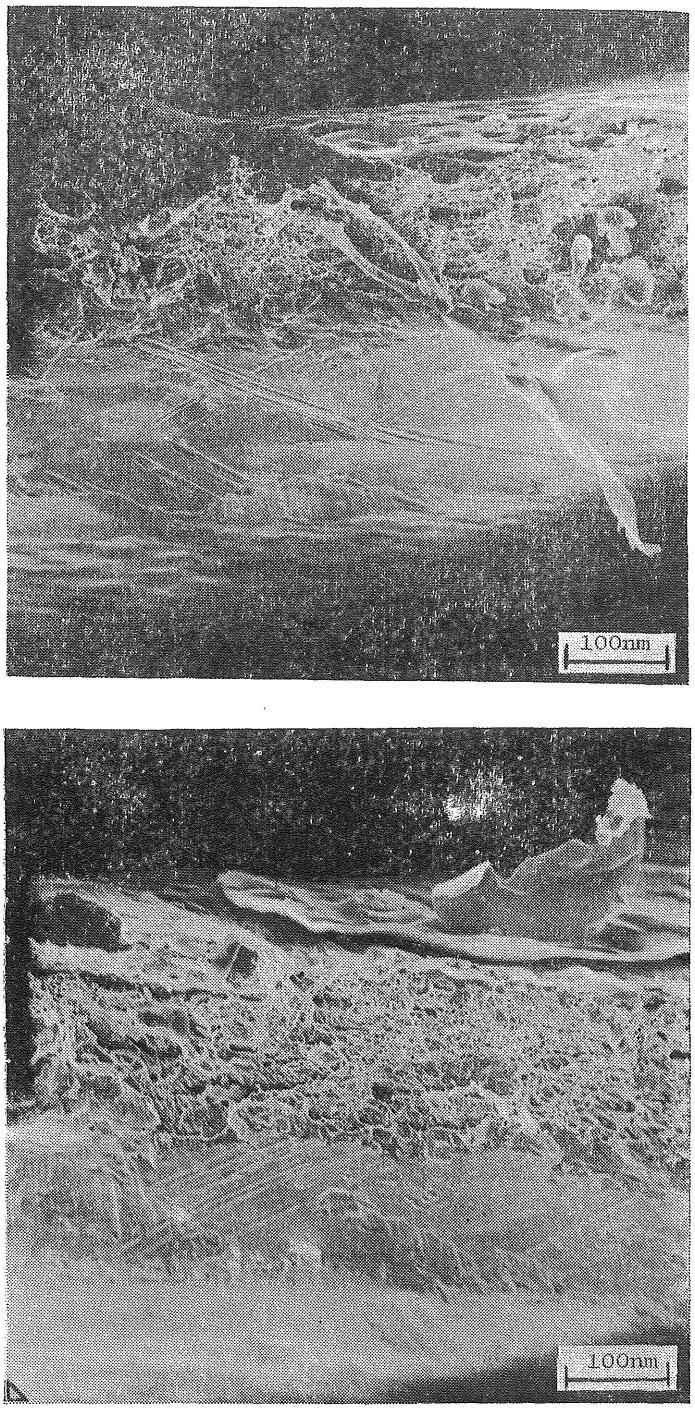


Photo. 4. Section of can

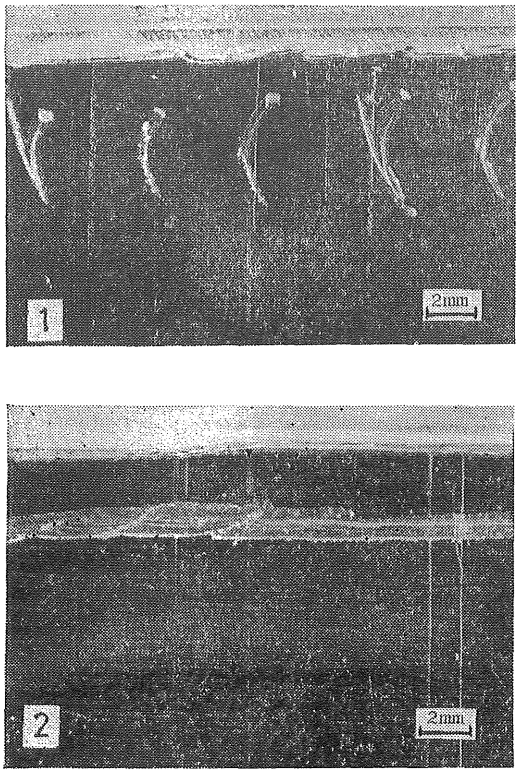


Photo. 5. The inside of can after opening

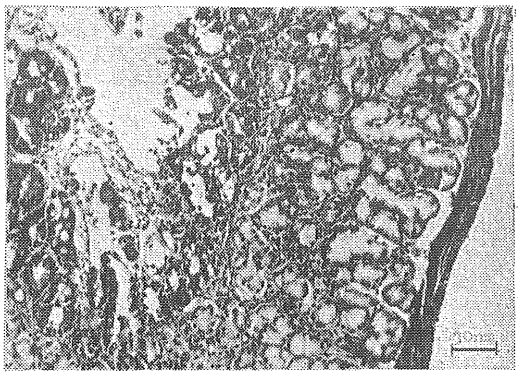


Photo 6. Dodeum tissue of adult rat after administration of metal fragments (32mg)

4. 動物試験について

実験動物‥ラット：日本クレア wister 系の雄を使用した.

切り屑の体内移行時間についての結果は Table 5. に示したとおりであり，投与後3時間で消化器系全体に分散され，大部分が体外に排出される時間は24時間以上かかることが判明した.

消化器系の影響をみるために，2, 4, 8, 16, 32mg を経口投与し，ほぼ消化器系全体に分散される3時間後の胃から直腸までの消化管に関しての肉眼的および組織切片についての所見は，コントロール群に比べて特に異常は認められなかった.（photo. 6）

まとめ

かん詰を開かんする際に，食品中に落下する切り屑の実態を調べたところ，次の事が判明した.

1. ヘッドの外側を切るかん切り No. 5 以外はすべて切り屑が食品中に落下し，その量は0.1～12mgであった. かんの形態に適したかん切りを使用し，また切れ味の良いかん切りを使用することが必要である.

2. 切り屑の人工胃液ならびに人工腸液による溶解性から考えて重金属による有害性は無いものとおもわれる.

3. ラットを用いた急性毒性試験の結果，消化器系における充血等の障害はコントロール群に比べ，ほとんど差はみられなかった.

以上の結果，かん詰開かん時に生ずる切り屑は金属の溶解性，ラットによる動物試験，また切り屑の量から考えて特に問題になるとはおもわれない. しかし本実験において特に問題はないにしても，離乳期に多用するベビーフードかん詰等については全く安全であるとの保障はない. また切り屑は本来的には混入物であることから，食品中に混入することはさけるべきものである. そこで日本缶詰協会，その他関連協会等に本実験をもとに勧告，指導をおこなった結果，現在では

Table 5. Amount of fragment residues in digestive organs

Organ	Time (hr)							
	1	3	5	7	9	12	24	32
Gaster	++	+	+	+	−	−	−	−
Pylorus ～ Intestinum ilium	++	++	+	+	+	−	−	−
Intestinum ilium	−	++	++	++	++	+	+	±
Colontenum ～ Intestinum rectum	−	+	+	++	++	++	+	−

切り屑の生じないもの，または最小限度に止められるかん切りについて研究中であり，さらにかんの形態についても同様検討中であるとの回答を得た．

謝　辞

本研究にあたり，動物実験を御指導いただいた当所生活科学部長春田三佐夫博士，乳肉衛生研究科小久保弥太郎氏，電子顕微鏡撮影等に御尽力をいただいた前木吾市主任研究員，試料収集に御協力いただいた世田谷保健所衛生課長宇井昌生氏，食品監視課田川哲氏ならびに組織学的検索に多大の御協力をいただいた芝浦食肉衛生検査所尾崎正美主査に深謝いたします．

文　献

1) 平野考三郎：食品衛生研究，17，499—514 (1967)
2) Cunningham, H.M. and O'brien, R.: *Jornal of Food Seience*. 37, 572—573 (1972)
3) U.S.A.: *Association of Food and Drug Officials*. 22 (1), 24—25 (1958)
4) 日本公定書協会編：第8改正日本薬局方第一部解説書，B—206 (1971) 広川書店

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 221—225, 1974

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Ⅱ報）マンガンの分析について

西垣　進* 田村行弘* 真木俊夫*
山田　洋* 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 (II) Analysis of Manganese

SUSUMU NISHIGAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA* AND YASUO KIMURA*

The heavy metals in foods has been determined by means of DDTC-MIBK method of atomic spectrophotometry in the previous report.

However, Mn-DDTC chelate is unstable in MIBK, it is necessary for determination Mn to be carried out immediately after extraction.

The addition of Ammonium nitrate improve time stability of Mn-DDTC in MIBK by eliminating the aqeous phase after the separation of water emulsified in the MIBK, without resulting in significant impairment of sensitivity.

The results indicated that an average recovery of 101% and coefficient variation of 4.28% were obtained from the samples.

緒　言

第Ⅰ報[1]において，DDTC-MIBK 原子吸光法で食品中の Cr, Cd, Zn, Pb, Cu, Co の分析を確立し一斉分析に有効であることを報告した．今回はこれら重金属に Mn を組み入れ，食品中からの同時定量について報告する．従来から，MIBK 中の Mn-DDTC あるいは Mn-APDC キレートは安定性に問題があることが知れらていた[2-4]．このため，Mn-DDTC の MIBK 溶液は直ちに測定をしなければならない不便さがあった．

そこで，Jenn らは[5] アセトン添加，Dean らは[6]アセチルアセトン添加により Mn の安定度を高めた．またTakeuchi らは[7] 抽出有機溶媒を種々変えその安定性を検討しアミルアセテート，ブタノールで安定性が得られ，田中らは[8] 水溶液による分析に切り換えている．

われわれは Mn を他の金属と同時に，かつ正確に高感度で分析できる方法の確立を目的とし，少なくとも抽出後数時間の安定を得るために種々検討を行なっていたところ，硝酸アンモニウム添加がこの Mn-DDTC の安定性を高めることが判ったので基礎的な検討を加えて食品への添加回収実験ならびに食品中の Mn の分析も行なった．

実験方法

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，バーナーには長さ 10cm のスリースロットバーナー，空気—アセチレンフレームにより測定を行なった．

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. 試　薬

Mn 以外の重金属標準液調製は前報[1]に従って作製

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

した．Mn は和光純薬特級金属マンガン（純度 99.99 %）を2N-硝酸に溶解し，イオン交換蒸留水（以下蒸留水とする）に溶かし，マンガン濃度1,000ppm の原液を調製，この原液を蒸留水で希釈して 1m*l* 中10μg Mn を含有する液を調製した．

硝酸アンモニウム液：和光純薬特級試薬の１％溶液をあらかじめ２％ DDTC-MIBK で不純の重金属を取り除いた液 100m*l* につき，DDTC 2g を再び加えて使用した．

3. 定量操作

前報の定量法に一部改良を加えた．すなわち，試料５～10ｇをパイレックスビーカーに精秤し，赤外ランプで炭化後，電気炉（500°C）で一昼夜灰化する．灰化不十分の場合，2N-硝酸5m*l* 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，2N-硝酸 5～10m*l* を加えて蒸発乾固し，ついで2N-硝酸 10m*l* を加えて10—20分放置する．次に５％過硫酸アンモニウム1m*l* を加え，SSG アンモニア水（１—２）で pH4 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100m*l* のスキーブ型分液漏斗に移し，30～40m*l* 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，IM-酢酸，酢酸ナトリウム緩衝液 pH5.0 を 5m*l* 加え全量を60m*l* とする．１％硝酸アンモニウム含有２％DDTC 液 5m*l* を加えて３分間放置，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．

測定条件

Mn 単一中空陰極ランプ（日立製）
波長 2,795A Lamp Current 15mA
Slit Width 4 を用いた．

実験結果

1) Mn キレートの生成および抽出に対する条件の検討

Mn-DDTCキレートはMIBKに抽出されるがMIBK中での安定性はきわめて悪くこのままでは実用分析に役立ない．われわれは Mn キレート抽出の塩析効果，協同抽出の効果として硝酸アンモニウムがこの役目を十分にもっていることをみい出したので，Mn-DDTC キレートを MIBK に抽出する pH 等安定性の諸条件を検討した．

2) pH の影響

Mn と DDTC の反応や生成抽出キレートの MIBK 抽出の至適 pH 域を知るため，抽出された Mn と pH の関係を調べたところ，Fig. 1. に示す通り pH 4～8 の範囲で最大かつ一定値を示した．クロムの pH 域も考慮して以後 pH 5 で抽出することにした．

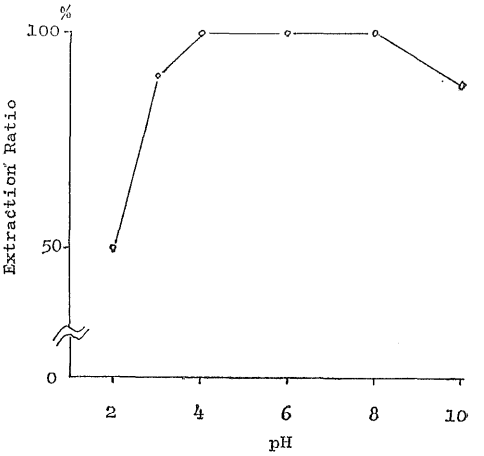


Fig. 1. pH Dependence of Extraction of Mn from DDTC-MIBK System

3) Mn-DDTC 抽出率における硝酸アンモニウム濃度の影響

硝酸アンモニウム濃度変化により Mn-DDTC キレート抽出にどのように影響するか検討したところ，Fig. 2. に示すように１～10％では Mn の抽出率に影響がなかった．以後１％溶液を用いることにした．

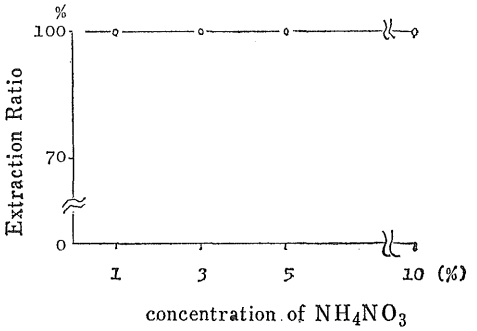


Fig. 2. Effect of Concentration of NH_4NO_3 on the Extraction Ratio of Mn DDTC Complex

4) DDTC 添加後の放置時間による Mn-DDTC 抽出率への影響

１％硝酸アンモニウム含有２％ DDTC 液で Mn とキレート化を行ない，1, 3, 5, 10, 20 分各々放置して Mn 分析を行なったところ，Fig. 3. に示すように３～５分の間で一定値を得た．以後３分放置を用いた．

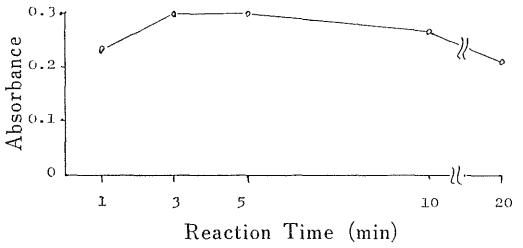


Fig. 3. Effect of Reaction time after added DDTC containing NH_4NO_3 Reagent.

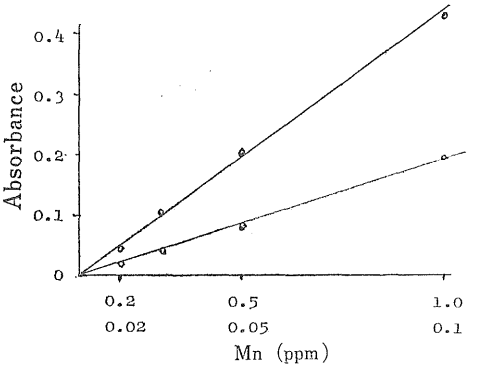


Fig. 4. Calibration Curves of Mn-DDTC Complex

5) Mn の定量範囲と検量線

以上の検討の結果をもとにして Mn の定量条件を3のように定め，Mn の濃度と抽出キレートの Mn 吸光度との関係を調べたところ，Fig 4. に示すように 0～1.0μgMn/ml において 原点を通る直線関係が 得られた．検出限界は0.02μg/ml であった．

6) 硝酸アンモニウム添加による Mn-DDTC キレートの安定性

Mn の標準溶液10μg，検体としてグレープジュースを用いて各々1％硝酸アンモニウム含有2％DDTCと2％ DDTC で抽出を行なったもの，更にグレープジュースについては，酢酸，酢酸ナトリウム緩衝液pH5.0で調製したものと，2N-硝酸，アンモニウム水（1→2）で調製し pH メーターで pH 5.0 に合わせたものについて Mn の経時変化を5時間まで調べた．それを Fig 5. に示す．標準溶液，検液いずれも2％DDTC のみでキレート抽出したものについては安定性が著しく悪くすでは1時間経た時点で吸光度の低下を示した．

一方，1％硝酸アンモニウム含有2％ DDTC 抽出では標準溶液，検液また緩衝液，pH メーターいずれの pH 5.0 調製においても3時間経過後までは吸光度の低下はみられなかった．したがって，キレート抽出等安定性における 緩衝液の影響も考えられたが，Mn の安定性にはわれわれの用いた酢酸，酢酸ナトリウム

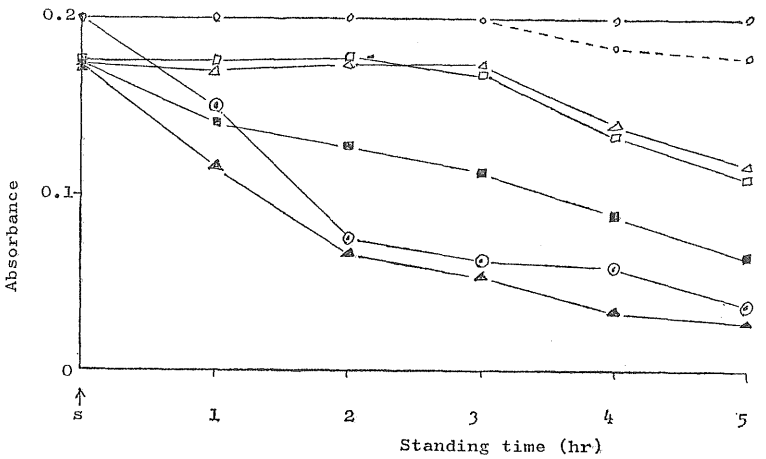


Fig. 5. Effect of NH_4NO_3 on the stability of Mn-DDTC Complex in MIBK

○——○ standard solution + NH_4NO_3
⊙——⊙ standard solution − NH_4NO_3
△——△ sample solution + NH_4NO_3
▲——▲ sample solution − NH_4NO_3 } pH adjusted with HNO_3, NH_4OH
□——□ sample solution + NH_4NO_3
■——■ sample solution − NH_4NO_3 } pH adjusted with Acetate Buffer

緩衝液は関与していないことが判った．また硝酸アンモニウム無添加の両方の pH 調性における吸光度低下に差がみられたが，今回はこの点について検討を行なっていない．なお標準溶液の点線は放置の影響を観察したもので，5時間まで吸光度が一定している標準溶液はその測定する時点で毎回作製したものである．このことより実際検体の測定に際して，3時間以内に測定を終了することが望ましい．

7) 食品中への添加回収実験

粉ミルク 5 g に Mn 標準液，1，2，3，5 μg 各々添加し，3の操作に従い回収実験を行なったところTabel 1. に示すように99～103%の回収率を得た．

Table 1. Recovery of Mn in milk powder

	Mn added(μg)				
Sample	Nil	1	2	3	5
found(μg)	2.0	3.0	4.05	5.05	6.95
Recovery(%)		100	103	103	99

8) $Fe^{(III)}$ イオンの影響

食品中に混入してくる $Fe^{(III)}$ が Mn の分析にどのように影響するか，粉ミルクに $Fe^{(III)}$ として100，200，250，500，800，1,000，2,000μg 各々添加し，3の分析をしたところ Fig 6. に示すように $Fe^{(III)}$ 500μg までの共存は無視できた．なお，前報分析法による一斉分析を行なうにあたり1,000μgまでの $Fe^{(III)}$ の共存は定量に影響がなかったが，Mn も組み入れた本分析法では $Fe^{(III)}$ の共存 500μg 以上では影響があらわれた．

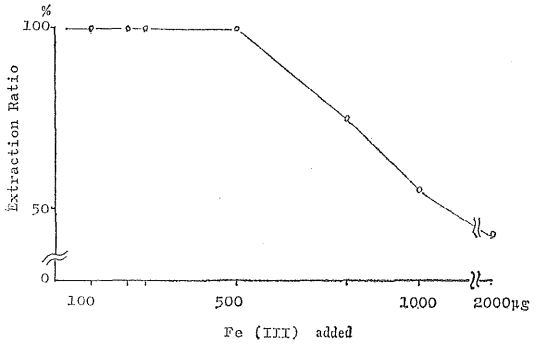


Fig. 6. Effect of Amount of Fe(III) on the Extraction Ratio of Mn

9) 添加実験における分析と精度

試料としてグレープジュース 5g に Mn 標準液 5μg を添加し，3の操作に従い Mn の定量を行なったところ，Table 2. に示す値を得た．5回のくり返えし精度は標準偏差0.21，変動係数4.28%であった．

Table 2. Precision test on grape juice

Mn added(μg)	found(μg)
5	5.0
〃	4.9
〃	5.1
〃	5.0
〃	4.5
Average	4.9
S.D.	0.21
Coefficient of Variation	4.28

10) 食品中の Mn 分析結果

本法を用いて魚類，貝類，粉ミルク，グレープジュース等について分析した一部を Table 3. に示した．

Table 3. Analysis of Mn concentrations in several foods

Sample \ Metal	Mn(ppm)
Sebastes iracundus	0.19
Striped marlin	0.17
Broard swordfish	0.12
Beryx	0.20
Red crab	0.50
Mirushell	0.17
Arkshell	0.17
Milk powder	0.40
Grape juice	1.14

(Wet weight)

考　察

Dean ら[6] が述べているアセチルアセトン説も，われわれの硝酸アンモニウム添加も，基本的には Mn と他の重金属の交換反応がＤＤＴＣとの間に行なわれ，Mn のみがより水層に移る現象を防いでいるものと思われる[9]．更にアセチルアセトン添加による安定性の増加は Mn-DDTC キレート中の親水性を示す２水和分子を置き換え，より親油性にするためと述べている．おそらくわれわれの硝酸アンモニウムも何んらかの形でこの説を支持するものと思われる．

結　言

前報の DDTC-MIBK 法に１%硝酸アンモニウム含有２%DDTC-MIBK 抽出により３時間まで Mn の定量には影響がなかった．

文　献

1) 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：東京衛研年報，

24, 231—237 (1972)
2) Mansell, R.E. : *Atomic Absorption Newsletter*, 4, 276—277 (1965)
3) Joyner, T., and Finley, J.S., : *ibid.*, 5, 4—7 (1960)
4) Nix, J., and Goodwin, T.,: *ibid.*, 9, 119—122 (1970)
5) Jenn, E.A., and Ball, J.W.,: *ibid.*, 11, 90—91 (1972)
6) Dean, J.A. and Cain, C. Jr.,: *Anal. Chem.*, 29, 530—532 (1972)
7) Yanagisawa, M., Suzuki, M., and Takeuchi, T., *Anal. Chim. Acta*, 43, 500—502(1968)
8) 池辺克彦，田中之雄，田中涼一：大阪府立公衆衛生年報，2，15—20 (1971)
9) ユ・ア・ゾロトフ著，田中元治，中須賀徳行，小島 功，舟橋重信，共訳：キレート化合物の抽出 初版，177 (1972) 培風館
10) 赤岩英夫：抽出分離分析法，初版，79，112 (1972) 講談社

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 227—233, 1974

生体試料中の総水銀の迅速分析法

田村行弘* 真木俊夫* 山田 洋*
嶋村保洋* 西垣 進* 木村康夫*

A Rapid Method for the Determination of Mercury in Biological Sample

YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*, HIROSHI YAMADA*,
YASUHIRO SHIMAMURA*, SUSUMU NISHIGAKI*, AND YASUO KIMURA*

A rapid precise method for routine determination of total mercury at microgram amounts in biological sample, fish and other food products is described.

The mothod is as follows. : Biological sample were digested with vanadium pentoxide-catalzed nitric-sulfuric acid in boiling water bath. Mercury which were vaporized by addition of stannous chloribe were measured by flameless atomic absorption spectrometry in the unique method used with syringe to transfer into the cell.

The results indicated that an average recovery of 98.5% and variable coefficient of 1.7% were obtained from samples added inorganic and organic mercury compounds at levels from 0.3 to 2 ppm of mercury.

This digestion method was compared with the official A. O. A. C. Method and the Oxygen-Flask combution method. These results agreed very closely.

On a routine basis, 2 analists can analyze more than 50 samples a day.

緒　言

総水銀の定量法として，フレームレス原子吸光分析は，高精度，高感度の利点を有するため広く使用されている．この方法で分析するための水銀気化法は，還元法[1]や酸化燃焼法[2-4]など数多くの手法があり，また生体試料等の前処理にも湿式分解[5-7]や乾式分解[8-10]など，種々の方法が報告されている．

これらの方法には，それぞれ一長一短があるので，多数の検体を迅速かつ精度良く処理できるルーチンワークに適した方法をつくる目的から，いくつかの方法について比較検討した．その結果，五酸化バナジウムを触媒とする硫硝酸分解法[11]と，還元気化した水銀蒸気を注射器で吸収セル内へ導く方法[11-13]の組合せにおいて，食品あるいは生体試料中の0.01ppm以上の水銀分析に適した迅速分析法を確立したのでここに報告する．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Labratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験の部

試　薬

硫酸，硝酸：精密分析用

アルコール：試薬特級，エチルアルコール

五酸化バナジウム：試薬特級，粉末

シュウ酸アンモニウム溶液：試薬特級，飽和水溶液

塩化第一スズ溶液：試薬特級，20%，5 N硫酸溶液

水銀標準液：試薬特級（和光純薬），塩化第二水銀1.354g を水に溶かし，水銀標準原液（1,000ppmHg）を調整する．用時，適宜5 N硫酸溶液で希釈して用いる．

メチル水銀標準液：試薬特級（和光純薬），塩化メチル水銀 0.125 g を水に溶かし，メチル水銀標準原液（1,000ppmHg）を調整する．用時，適宜1％システィン溶液で希釈して用いる．

装　置

原子吸光装置：島津製ＵＶ201型

光源：島津製水銀放電ランプ

エアーポンプ：日本磁製産業製ＮＳ-1型

石英セル：ガス用セル，内径1cm，長さ10cm

還元気化用容器：ガラス製，栓付50m*l*遠沈管(Fig. 2. を参照)

分解用容器：三角フラスコ，試験管

注射器：プラスチック製（採血用），10m*l*または5m*l*

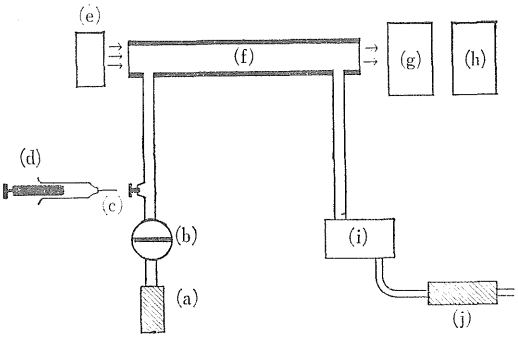


Fig. 1. Diagram of the system for Hg determination
(a),(j) charcoal, (b) stop cock, (c) silicone stopper, (d) disposable plastic syringe, (e) Hg lamp, (f) 10cm quartz cell, (g) detector, (h) recorder, (i) pump

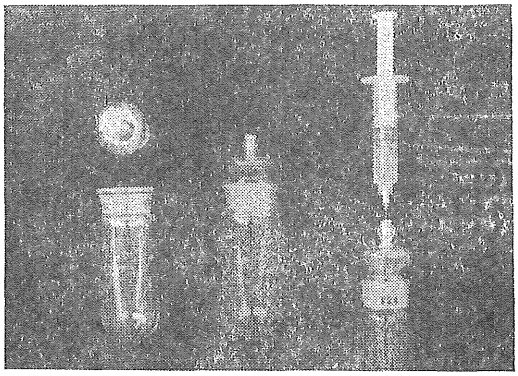


Fig. 2. Vessel for reduction of mercury

分析方法

1. 測定条件

波長：253.7mμ

スリット：Entrance 1nm, Exit 2nm

記録計：フルスケール10mV，チャートスピード1.25cm/min，スケール拡大×1，×2，×5

エアーポンプ流量：0.7*l*/min

2. 分解法

本報では五酸化バナジウム硫硝酸改良法とＡＯＡＣ法および酸素フラスコ燃焼法の分解と比較した．

(1) 五酸化バナジウム硫硝酸改良法

試料をホモジナイザーで十分にホモジナイズし，その５ｇ以下を精秤し（粉末または乾燥試料の場合は２ｇ以下），100m*l*三角フラスコに入れ，0.5m*l*アルコールを加えて十分に混ぜる．それに約40mgの粉末五酸化バナウムおよび10m*l*硝酸を加えて良く混ぜ合せ亜硝酸ガス発生後，沸騰水浴中に入れて10分間加熱する．冷却後，更に10m*l*硫酸を加えよく振り混合し再び10分間加熱する．その後10m*l*飽和シュウ酸アンモニウム溶液を加え，更に５分間加熱を続ける．冷却後水で50m*l*にメスアップし分解溶液とする．同様に空試験をする．

(2) A.O.A.C 法

(3) 酸素フラスコ燃焼法

試料をホモジナイズした後，約 0.2ｇを薬包紙上に精密にはかり，デシケーター（シリカゲル）中で一昼夜放置して乾燥する．この乾燥物を吸収液(0.3%過マンガン酸カリウム溶液・２N硫酸溶液(１：１))40m*l*を入れた酸素フラスコ（薬局方第８に収載）中で燃焼し，振盪後吸収液をメスフラスコ中に移す．酸素フラスコを20%ヒドロキシルアミン溶液３滴加えた硫酸（25→85）で洗い，洗液を吸収液に合わせ分解溶液とする．同様に空試験をする．

3. 測定法

0.02～0.3μgの水銀量の分解溶液を還元気化用容器中へ精秤し，５N硫酸溶液で希釈して20m*l*とする．この液に2m*l*の塩化第一スズ溶液を加えて，直ちに栓をして振盪機に掛ける．４分間振盪した後，注射器を用いて還元気化用容器中の水銀蒸気を正確に5.0m*l*採り，直接原子吸光装置の注入口（Fig. 1. を参照）へ注入し，直ちにポンプを作動させ，253.7mμの波長の吸収を測定する．同様に還元気化用容器中へ水銀標準液を採り，測定して検量線を作成し，この検量線より水銀量を算出する．

本法の測定操作において，Fig. 3. のような還元気

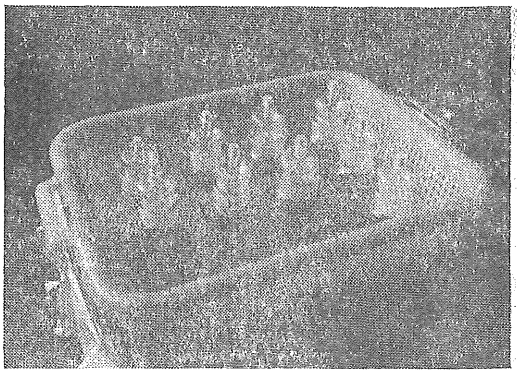


Fig. 3. Apparatus of Shaker

化用容器立て（遠沈管立て）を振盪機に取り付け，約30秒の間隔で容器を振盪機に掛けて行く．4分間振盪したものから順次取りだし，新たに振盪するものをかわりに掛け，取りだしたものは，直ちに水銀蒸気を注射器で取り，注入し測定するならば約20分間で，30本の容器中の水銀測定が可能である．

実験結果と考察

五酸化バナジウムを触媒とする硫硝酸分解法は，一般の金属分析に用いられているが，Deitz 等[11] が初めて水銀分析に取り入れた．

著者等は，この方法を改良し，分解前にアルコールを加え有機物の分解を促進させ，測定する時の亜硝酸の影響を除くためにシュウ酸アンモニウムを加えた．また分解容器は多量試料に100m*l* 三角フラスコ，小量試料には 50m*l* または 20m*l* 試験管を使い，分解溶液より水銀を気化させる容器に 50m*l* 遠沈管を使用し，そのフタの部分に Fig. 2. のようにガスクロマトグラフィー用シリコン栓が取り付けられるように改良した．また遠沈管内の気液相を平衡状態にするために機械的に振盪することにした．

1. 分解法の検討

(1) 分解温度の影響

塩化メチル水銀 2μg（水銀として）を 1％システィン溶液5m*l* に添加し，100m*l* 三角フラスコおよび250 m*l* メスフラスコに入れ，熱板上の温度を70～180° に変化させ分解をおこなって，その回収率について検討した．

この結果，Fig. 4. のように三角フラスコを用いた場合には70°～120°，メスフラスコでは140°まで，100％の回収率が得られた．Deitz 等[11] の実験結果では130°～200° まで回収率は100％あると報告しているが，著者等の実験では，160°以上の分解温度では回収率にやや低下がみられた．また130° 以下でも100％の回収率が得られたが，これはアルコールを加え分解を促進させたためと考えられる．

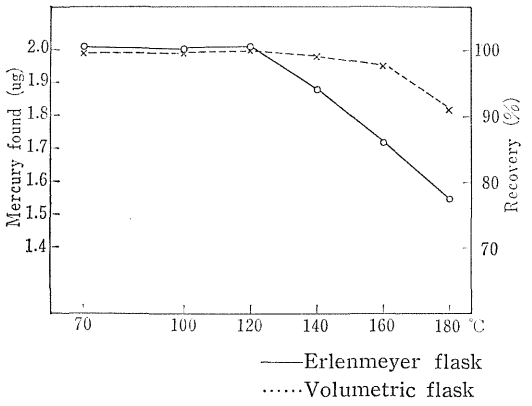


Fig. 4. Effect of digesting temperature and recovery of mercury from added samples

以上の結果から，分解温度は100°で十分である．また熱板は温度分布が均一でなく，更にフラスコとの密着性が十分でないため温度吸収が悪いなどの欠点があるので沸騰水浴を用いることにした．

(2) 分解時間と硫酸量

有機物に硝酸を加えるとまもなくアルコールと反応して，亜硝酸ガスの発生が起こり分解が始まる．一般に魚では 5 分間以内で完全に固型物が消失するが，動物の臓器や固型飼料では，やや長くかかるがほぼ10分間で完全に固型物が消失するため，硝酸分解は沸騰水浴中で10分間とした．

硫酸添加後の分解時間は，Fig. 5. のように 5～15 分間で十分であったため10分間とした．なお少量の試料の場合には，5 分間で十分である．

添加する硫酸量と回収率の関連性について，Fig. 6. に示したが，硫酸なしまたは1m*l* 添加では有機物の分解が不十分なため回収率は低いが，5～15m*l* 添加では100％の回収率が得られたため 10m*l* とした．

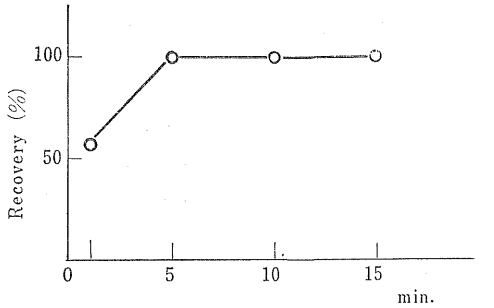
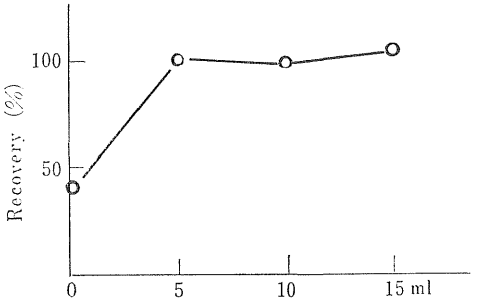


Fig. 5. Effect of digesting time after added H_2SO_4



Flg. 6. Effect of H_2SO_4 volumes

Table 1. Comparison of digestion

Digestion		Sample weight (g)	Found Hg level (ppm)		Standard deviation (%)
			Mean	Range*	
Wet	The official AOAC method	10	0.410	0.399～0.422	2.0
	Modified V_2O_5-H_2SO_4 HNO_3 method	3	0.395	0.381～0.407	2.6
Dry	Oxygen flask comburstion method	0.2	0.398	0.373～0.418	4.2

* Seven analyses

(3) 分解法の比較

代表的な分解法であるＡＯＡＣ法，乾式灰化法で簡便な酸素フラスコ燃焼法と，五酸化バナジウム硫硝酸分解の改良法との三者間の分解法について，マグロ肉を用いて比較した．

ホモジナイズしたマグロ肉を三等分して，各々の方法で分解し分解溶液をつくったのち，各々の一定量を採り，還元気化法の循環式を用いて水銀含有量を測定した．

Table 1. に示すように，同一試料（マグロ肉）7検体の平均がＡＯＡＣ法では 0.410ppm，酸素フラスコ燃焼法で 0.398ppm，改良法で 0.395ppm であり，その変動係数は 2.0%，4.2%，2.6% であった．この結果について統計的処理をして，比較したところ，三者間に有意差は認められなかった．また酸素フラスコ燃焼法における高い変動は，サンプル量が少ないための誤差と考えられる，

2. 還元条件

(1) 液温と水銀気化量

塩化第二水銀0.1μg（水銀として）を含む5Ｎ硫酸溶液 20m*l* を，還元した時に発生する水銀銀量と，その時の還元溶液の温度の関係について調べた．Fig 7. に示すように，15°～20°にかけて大きな差がみられ，20°～30°においては，やや上昇の傾向がみられるがほぼ一定であった．この結果は，先に梅崎等[14]の報告した結果と一致しており，20°～25°において測定することにした．

(2) 振盪時間の影響

5Ｎ硫酸溶液および調整粉乳の分解溶液 20m*l* に，水銀標準液（0.1μg 水銀として）を添加したものについて，振盪機による振盪時間を変化させ，その時の水銀の気液相の分配平衡について検討した． Fig. 8. に

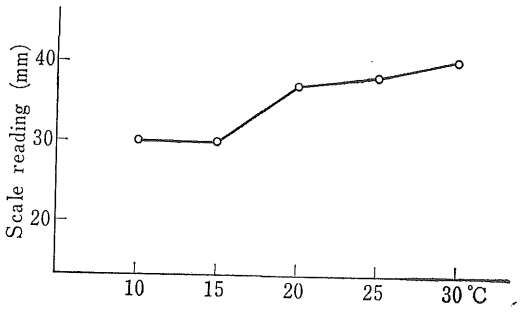


Fig. 7. Effect of temperature with reducting solution

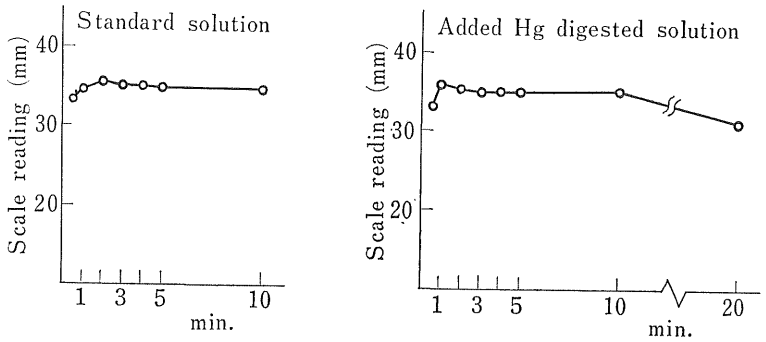


Fig. 8. Effect of shaking time after added reducting agent

示すように，いずれの場合も，3～10分間の振盪で一定の水銀気化量を示した．そこで振盪時間は4分間とした．

(3) 還元剤の濃度の影響

(2)における と同様に，水銀添加溶液について，塩化第一スズの量を変化させ，その時の水銀発生量を検討した．Fig. 9. に示すように0.5%以上の濃度で十分な還元効果があることが明らかとなったので，本実験では2%とした．

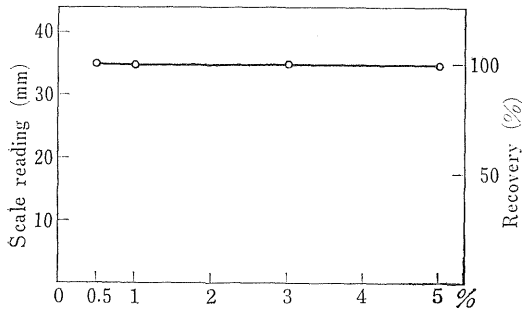


Fig. 9. Effect of tin (II) chloride concentration

(4) 通気流量の影響

水銀蒸気を吸収セル内へ送入し，通気測定する際の空気流量について検討した．この結果0.3～0.9 l/min の範囲で一定の吸収が得られたが，0.3と0.9 l/min においては，くり返しの変動係数が大きいため，本実験では流量を 0.7 l/min と規定したた．

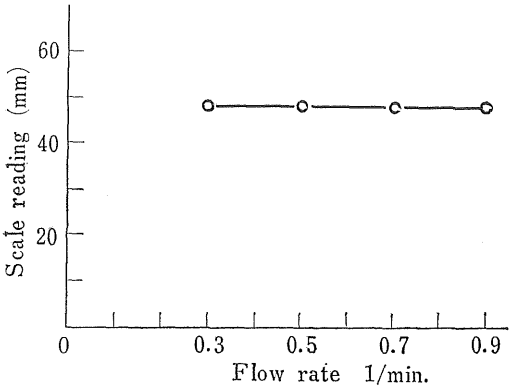


Fig. 10. Effect of air-flow rate

(5) 注入式と循環式測定法の精度の比較

本報の分解法で分解した粉乳分解液に，水銀標準液の濃度を変えて添加して，その各々を2等分し注入式と循環式測定法でくりかえし測定してその値について比較した．この結果についてTable 2. に示した．この測定値について統計的処理をして比較したが，両測定法間に有意な差は認められなかった．

Table 2. Comparsion of precision between syringe technique and circulation of aeration

Samole	Method	Found Hg level(ppm) Mean	Found Hg level(ppm) Range*	Standard deviation (%)
1	Circulation of aeration	0.958	0.975～1.000	2,0
	Syringe techuique	0.946	0.908～0.969	2.0
2	Circulation of aeration	1.94	1.86 ～2.03	2.7
	Syringe technique	1.95	1.93 ～1.96	0.8

* Six analyses.

(6) 定量範囲

本報の測定法で検量線を作成した結果，Fig. 11. に示すように，水銀標準液において 0.02～0.06μg，0.05～0.15μg，0.1～0.3μg の範囲内で直線性が成立した．またこれらの変動係数は1%以下であり再現性も良好であった．

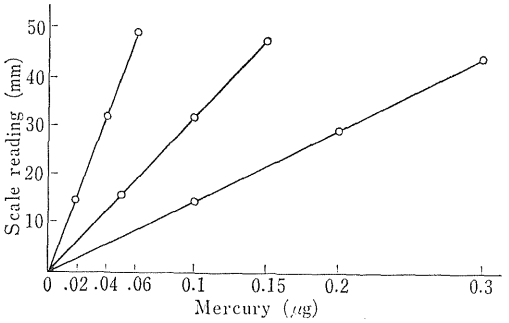


Fig. 11. Calibration curve using the proposed method

3. 本法における再現性

マグロ肉をホモジナイズし2等分して，一方はホモジナイズした当日，他方は冷凍保存しその三日後に，各々本法で分解，測定した．その水銀含有量は，8検体平均当日のもので0.445ppm，三日後のもので0.413 ppm であり，その変動係数は 1.7% と 2.3% であった．

分析日を変えて同一検体について測定した値について，統計的に処理し比較したが両者間に有意な差は認められなかった．また変動係数も低いことからその再現性は十分にある．

Table 3. Reproducibility of the proposed method for determination of Hg in Tuna

Sample weight(g)	Found Hg level (ppm)		Standard deviation (%)	Day analyzed
	Mean	Range*		
3	0.445	0.433～0.456	1.7	Just homogenized
3	0.413	0.396～0.424	2.3	On the 3rd day after homogenized

* Eight analyses.

Thble 4. Recovery of methyl mercury Chloride and mercuric chloride added to tuna, rice, and modified milk powder using the proposed method

Sample	Sample weight (g)	Mercury in sample* (ppm)	Added Hg (μg)		Recovery (%)		
			MeHgCl	$HgCl_2$	Mean	Range*	Standard deviation
Tuna	3	0.310	1	—	96.1	92.3～98.9	2.8
			—	1	96.8	94.4～98.0	1.8
Tuna	3	0.378	2	—	98.2	97.0～99.6	0.9
			—	2	101.6	94.9～106.3	2.0
			6	—	100.7	98.7～103.2	1.6
			—	6	100.8	98.5～102.1	1.3
Rice	1	0.01	1	—	100.1	97.4～102.0	1.6
			—	1	100.5	98.1～102.6	1.7
Modified milk powder	3	< 0.005	1	—	95.7	94.1～98.1	1.7
			—	1	94.5	92.6～97.4	1.8
			Average		98.5		1.7

* Eight analyses.

4. 回収率

マグロ肉，米，調整粉乳について，メチル水銀および塩化第二水銀を次の方法で添加し回収実験をした．

マグロ肉はホモジナイズしたのち，その3 gに1μg 2μg' 6μg の水銀を塩化メチル水銀はシスティン溶液で，塩化第二水銀は水溶液で添加した．また米は粉砕したのち，調整粉乳はそのまま1 gまたは3 gをはかり，1μgの水銀をマグロと同様に添加した．その結果について Table 4. に示すが，試料中の水銀含量および回収率は，各々8検体の測定値の平均である．全体の回収率の平均は 98.5%，変動係数は 1.7% であった．

なお，米のような粒状のものや固形の乾燥物は，粉末にするか，または十分に硝酸を浸透させたのち，分解すると良い結果が得られる．また塩化メチル水銀は，システィン溶液で添加すると，分解前の揮散を防ぐことができ良い結果が得られる．

総　括

水銀の迅速および高精度な分析法である五酸化バナジウム硫硝酸分解改良法と，還元気化した水銀を注射器で原子吸光セル内へ導きフレームレス原子吸光法で，その吸収を測定する方法を組合せた本法の特長について要約すると，注射器使用の注入方式は，①循環式と異なり，測光系の洗滌，排気の必要がなく，簡便で迅速な測定ができる．②循環式の場合，測光系に流入して誤差の原因となる水分の除去装置が必要であるが，本法はこうしたわずらわしい水分の流入がない．

分解法では ①分解所要時間が，30分間で十分と従来の方式と比較して著しく短かい．②多数検体の処理が可能．③特殊な器具，装置を必要としない．④魚，穀物，その他の食品，動物の臓器，血液および飼料等に利用できる．

分析上の精度および再現性は，①回収率94.5%から101.6%，平均98.5%，②変動係数1.3% から2.8%，

平均1.7%

以上のようである.

これらの特徴を持つ本法は，迅速かつ高精度で，0.01ppm 以上の水銀定量分析が可能なため，多数検体処理を必要とするルーチンワークに適した方法であると考える.

なお，多数検体の連続処理をする場合，2人でペアを組んで分析すると，分解容器に試料をはかり入れてから，測定終了まで，各試料をダブルで分析しても，8時間で50検体の処理が可能である.

付　記

本研究の概要は，日本食品衛生学会第27回昭和49年5月16日で発表した.

文　献

1) Hatch, W.R. and Ott, L.W.: *Anal. Chem.*, 40, 2085—2089 (1968)
2) Leong, P.C. and Ong, H.P.: *ibid.*, 43, 940—941 (1971)
3) Anderson, D.H., Evans, J.H., Murphy, J.J. and White, W. W. : *ibid.*, 43, 1511—1512 (1971)
4) 喜田村正次，住野公昭，田口良雄：第27回日本公衆衛生学会総会特集号 No. 2p. 252(1969)
5) Magos, L.:*Analyst*, 96, 847—853 (1971)
6) Bouchard, A.: *At. Absorption Newslett.*, 12, 115—117 (1973)
7) Manns, R.K. and Holland, D.C.: J. AOAC, 54, 202—205 (1971)
8) Pappas. G.E. and Rosenberg, A. L.: *ibid.*, 49, 782—792 (1966)
9) 藤田昌彦，武田寧，寺尾允男，浮田忠之進：衛生化学，14, 285—287 (1968)
10) 仲町秀雄，岡本喜代治，樋見勇：分化， 23, 10—15 (1974)
11) Deitz, D.F., Shell, L.J. and Bristol, D. : J. AOAC, 56, 378—382 (1973)
12) Staiton, P.M.: *Anal. Chem*,. 43, 625—627 (1971)
13) Thorpe, A.V.: J. AOAC, 54, 206—210(1971)
14) 梅崎芳美，岩本和子：分化， 20, 173—179 (1971)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 235 — 239, 1974

魚介類への微量元素の蓄積挙動の研究（第1報）
海水魚の筋肉中へのセレン蓄積と体重増加との相関および水銀蓄積との関連について

西垣　進* 田村行弘* 真木俊夫*
山田　洋* 嶋村保洋* 落合節子*
木村康夫*

Studies on the Behaviour of Accumulation of Trace Elements in Fishes (I)
Mercury-Selenium Correlations in Connection with Body Weight in Muscle of Seafish

SUSUMU NISHIGAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*,
HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA*
SETSUKO OCHIAI* AND YASUO KIMURA*

This investigation was carried out on 279 specimens of 24 species of sea fish as tuna, marlin and the other common fish.

The results obtained were as follows : Concentrations of selenium in fish muscle tissue kept constant levels regardless of their body weight, in spite of the fact that the mercury levels increase with an increase in their body weight, and these constant levels were obtained as 0.69 ± 0.18 ppm ($n=105$) in tuna, 0.62 ± 0.15 ppm ($n=72$) in marlin except blue marlin and 0.48 ± 0.17 ppm ($n=60$) in common fishes, and were the highest value in tuna significantly.

Therefore, its accumulation did not correlate with that of mercury.

These results suggest that selenium is likely to be one of the essential elemnts of fish.

緒　言

魚介類には，他の食品より多量のセレンが含まれ，特にマグロは Dry Base で 5ppm と高い蓄積があるが[1-3]，魚肉中への蓄積パターンについては知られていない．1972年，Ganther[4] 等がマグロ肉で飼育したウズラは，メチル水銀の毒性が軽減されることを提示した中で，マグロ肉中のセレンは，水銀量が多くなるに従ってその蓄積が増え，低水銀肉と高水銀肉の間の2元素の差は，モル比で1：1であったといっている．さらに Koeman[5] 等は，魚介類のみを摂取する正常な海獣の臓器から，100ppm を越える多量の水銀と同時に，モル比で1：1に相当する多量のセレンが検出され，両元素の間には 0.932 という高い相関があることを報告している．古くは水俣病発生当時，死亡した患者や，猫，鳥の臓器から多量のセレンが検出され，一時は標的因子と疑われたが，発病していない猫にも，罹患猫と同程度の蓄積が認められ，この致死量を起すセレンの存在は謎とされていた．しかし，さきの Ganther[4] 等のほかに，セレンが水銀毒性軽減に有効である[6,7] という報告も見られ，この両元素の生理学上の相関がクローズアップされてきた．

そこで，これらの元素の摂取源である魚介類中への蓄積パターンを把握することが必要であると考え，これらの知見から，人為汚染の考えられない高水銀魚のマグロ，カジキを主体に，外洋の一般魚も含めて，体重増加にともなうセレンの筋肉中への蓄積パターンと水銀蓄積との関連について調査をおこなった．

本調査と並行して，東京都公害対策専門委員会水銀保健対策分科会の昭和48年度の調査も実施したので，水銀関係については，その詳細を別報[8] にまとめて報告しておいた．

調査の部

1. 検査試料

1973年2月から1974年3月までに東京築地中央卸売

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

市場に陸上げされ，捕獲海域の判明しているものを採取した．マグロ，カジキ類は，太平洋，インド洋で捕獲されたもので，内臓，背ビレ，口ばしを除去された体重を測定し，一般魚は同一海域で捕獲されたものについて全体重を測定した．

本調査で試料とした魚類は，24種279検体である．

なお，分析するまでは−20°で凍結して貯蔵し，分析時に解凍して血合の付着しない筋肉をホモジナイズしたものについて試験を行なった．

2. 検査法

(1) セレン……過塩素酸，硝酸で分解し，2，3—ジアミノナフタレンを使用した螢光光度法[9]で分析した．

(2) 総水銀……五酸化バナジウムを触媒として硫硝酸で分解後，還元気化注入方式によるフレームレス原子吸光法[10]を使用した．

(3) メチル水銀……FDA法に準拠した別報[11]の方法を，分配抽出時の液量比を若干変更して分析をおこなった．本法での平均回収率は約80%であるので，測定値を0.8で除して補正した．またメチル水銀の値は，水銀として標示してある．

なお，別に試料中の水分も測定したが，それぞれの魚種の各個体について，ほとんど差が認められなかったので，本報の分析値は，すべて Wet Base で示してある．

調査結果

1) セレンは，魚体の小さい時点から水銀をはるかに上回る0.5ppm 程度の蓄積が見られ体重増加にともなう上昇はほとんど認められず，定常状態が保たれている．(クロカワカジキを除く．)

Table 1. Selenium and total mercury levers in muscle tissue of fish.

	Species	n	Body weight Range (kg)	Se (ppm)		Hg (ppm)
				Range	Mean	Range
Tuna	Big-eye tuna	27	55～105	0.41～1.40	0.85	0.07～2.31
	Yellowfin tuna	43	2.6～72	0.30～0.74	0.56	0.10～1.10
	Bluefin tuna	25	1.0～120	0.55～0.84	0.71	0.11～0.87
	Southern bluefin tuna	10	19.6～95	0.60～1.10	0.82	0.26～1.25
	Albacore*	4	7.0～7.5	0.41～0.79	0.59	0.09～0.36
Marlin	Striped marlin	59	24～97	0.32～1.00	0.64	0.03～1.92
	Swordfish	13	30～300	0.31～0.78	0.55	0.09～2.03
	Blue marlin*	38	50～238	0.51～2.45	1.10	0.02～13.02
High mercury level species	Matsubara stingrosh	2	3.0～4.2	0.55～0.60	0.58	1.53～1.69
	Big eye	2	6.7～7.8	0.39～0.55	0.47	1.19～1.32
	Beryx	2	1.3～1.6	0.61～1.22	0.92	0.89～1.14
	Rock-fish	5	2.6～4.9	0.45～0.85	0.65	0.52～1.14
	Goosefish	4	1.0～17	0.37～0.57	0.46	0.11～0.96
Low mercury level speeies	Morid-fish	8	1.12～2.3	0.20～0.45	0.38	0.18～0.57
	Drum	2	0.75～1.15	0.45～0.54	0.50	0.22～0.29
	Taius	10	—	0.32～0.48	0.42	0.12～1.77
	Japanese sea-bass	6	0.55～1.8	0.34～0.51	0.44	0.09～0.24
	Etelis carbunculus	2	1.4～1.65	0.43～0.45	0.44	0.14～0.16
	Mackerel	3	0.35～0.5	0.51～0.55	0.53	0.04～0.08
	Flute mouth	4	0.15～0.3	0.28～0.36	0.31	0.02～0.07
	Theragra chalcogramma	3	0.95～1.05	0.23～0.30	0.26	0.02～0.04
	Flounder	3	0.25～0.7	0.61～0.91	0.79	0.04
	Spanish mackerel	2	1.3～1.5	0.52～0.55	0.54	0.02～0.03
	Jack mackerel (small)	2	0.01～0.04	0.45～0.56	0.51	0.02

* except from statistecal analysis.

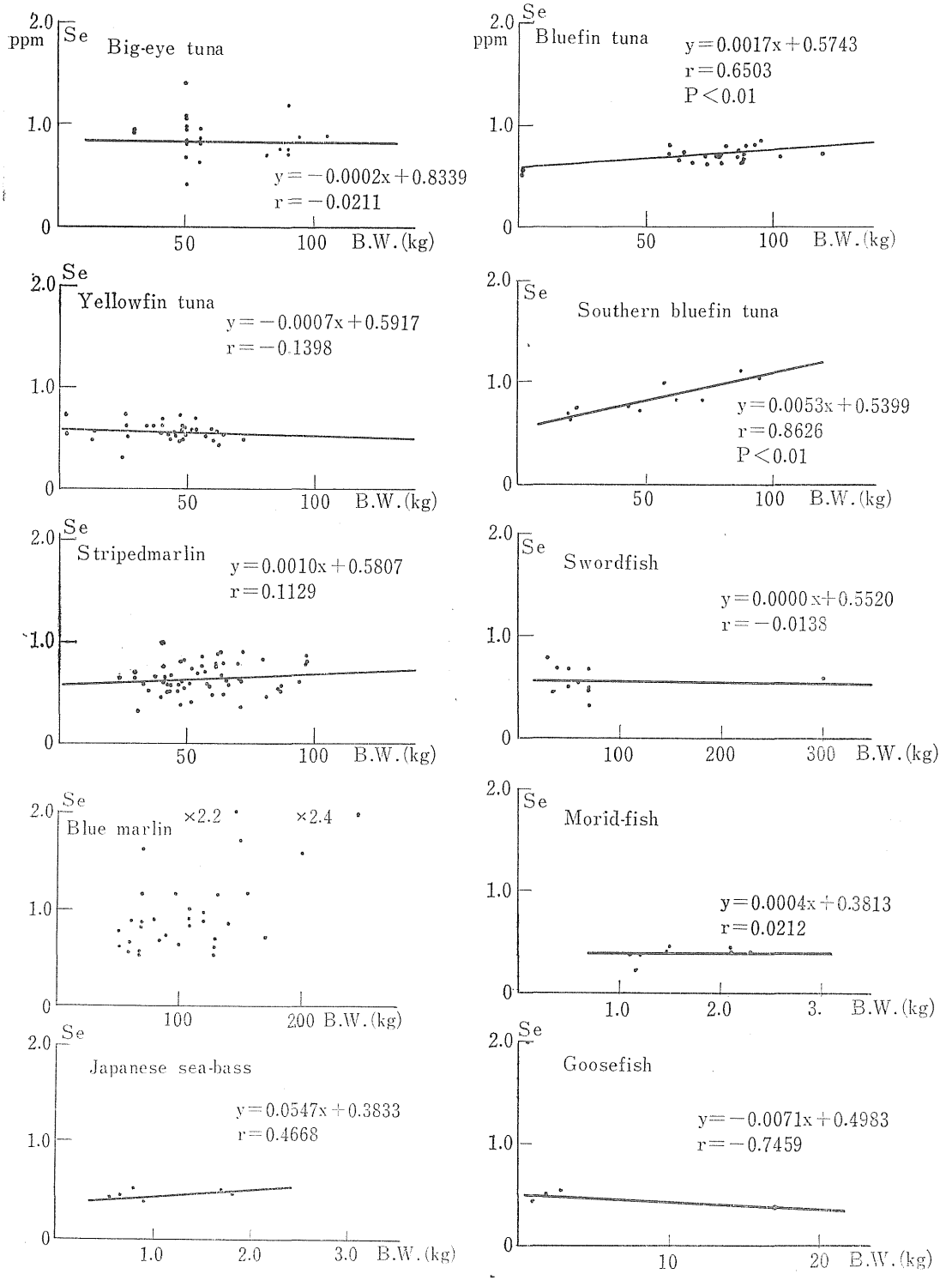


Fig 1. Relation between seleneum level in muscle tissue of fish and body weight.

この定常値は，マグロ類0.69±0.18ppm (n=105) カジキ類0.62 ± 0.15ppm (n=72)，その他の沿岸魚0.48±0.17ppm (n=60) で，マグロ・カジキ類が，他の魚種より有意に高い定常値を示した．(Wet Bese)

2) セレンの蓄積は，水銀との関連は認められない．

3) 同魚種，同体重のもののセレン含有量の個体差は，最高4倍のものが認められたが，ほとんどのものは，2倍以内に納まっている．

4) メチル水銀としての含有率は，魚種や魚体重の増加に関係なく総水銀の80%以上を占めている．

考　察

水銀は別報[8]に詳しく報告したとおり，いずれの魚種も体重増加に伴って，その蓄積が増加する．これに反してセレンは，Fig. 1. に見られるように体重との回帰直線は，ほとんど平行か，むしろ下降の傾向が認められ，定常状態を保っていることが観察された．

このうち，インドマグロとクロマグロだけは，統計上からは体重との間に相関 (P ⟨0.01) が認められているが，その上昇傾向はわずかであり，魚体が小さく，水銀量も 0.1ppm 以下を示している時点から 0.5 ppmと，これをはるかに上回る高い値を示し，その他の魚種と同様に，高いY軸との交点を持っている．海水中のセレン濃度は，水銀と同じく 0.1ppb 位とされているにも拘らず，魚体の小さいうちから5,000倍にも濃縮されて魚肉中に存在していることになり，体重との相関を持って原点付近から上昇する水銀の回帰直線とは異質の相関といえる．したがって，このインドマグロとクロマグロも，巨視的な観点から定常状態が保たれていると考えてよい．

また，ビンナガは体重の差がせまく，統計処理をするのに適当な体重分布の資料の入手が困難であったので，分析値だけを Table 1. に示しておいた．しかし，セレンの含有量は，他の同属魚と大差がないことから，これらと同様に定常状態にあると推定される。したがって，これらの値は，調査結果に記した定常値の計算に組み入れてある．

このように，高水銀魚も低水銀魚も，魚体の小さいうちからその筋肉中に約0.5ppm 程度含まれ，定常状態を保っているということは，セレンが必須元素であるためと解され，第Ⅱ報[12]に報告しておいた銅や亜鉛と同じ蓄積パターンを示している．また Cross 等[13]もセレン以外の多くの元素を調査しているが，われわれの調査結果と同様に鉄，マンガン，銅，亜鉛などの必須元素はこの傾向を示している．

さらにマグロ類が他の魚種より高い定常値を有するのは，運動量や成長速度が大きいためか，その他の理由による生理的要求量が多いためであろう．また，インドマグロのように上昇傾向の見られるものも，魚体が大きくなる程その要求量が増加するためと考えられる．

ついでセレン蓄積と水銀蓄積との関連であるが，セレンが定常値を有するので，当然相関はなく，Ganther[4] 等のいっているような当モル比での2元素の増加は見られなかった．このことは，水俣病発生当時，上田[14]や喜多村[15]が分析した水俣湾やその他の海域の魚肉でも，十数体のうちサバの一体を除いてすべて 0.7 ppm 以下であり，この分析値には水銀量が併記されていないが，少なくとも水俣湾のものは相当量の水銀が含まれていたはずであるのに，どの海域のものも同じ程度の値を示し，われわれの調査で得られた定常値の変動範囲に，おさまっていて，セレン蓄積と水銀蓄積との関連がないことを裏付け，水銀に付随しないことを物語っている．

なお，一般魚では同一海域で捕獲したもので適当な体重分布のものを集めるのが困難であったため，ヒゲダラ，スズキ，アンコウの3種については統計処理がされているが，その他のものについては，分析値を Table 1. に掲げておいた．これらの値も大きな変動を持たないと見て，定常値の平均算出に組入たてある．

また，クロカワカジキの体重と水銀量が極端に高いものに，定常値の変動を大きく上回る 2ppm というセレンが検出され，特殊な魚種と考えられるので，今後 300kg 程度の大型のものをいくつか集めて資料解析をした方が良いと考え，統計処理からはずしてあるが，この魚種については，さらに調査を続けている．

近年，続々と出されたセレンのメチル水銀の毒性軽減に関する報告[16)-21)]や，前述の Ganther[4], Stillings[7] 等の報告から今調査で得られた魚肉中の定常値の約 0.5ppm というセレン量は，毒性軽減の有効量であると考えられ，非感染の魚介類摂取にともなうメチル水銀の人体蓄積は，メチル水銀単独毒性と評価を変えられる可能性もあることが示唆される．

このことは，東京都をはじめ各所で発表されたマグロ魚船員の毛髪に，従来，水俣病の発症低限とされていた 50 ppm を越える量が検出されたが，臨床的に異常が認められない事実，また正常な海獣や水俣病発生当時の正常な猫の臓器中のセレン異常蓄積の事実から考えても，無謀な推測とはいえない．

総括

魚肉中へのセレン蓄積は，体重増加との間に相関は認められず0.5ppm 程度の定常値を保持していて，水銀蓄積に付随した蓄積を示さないことが観察された．

謝辞

本調査に当り，資料の収集や多大のご助言を賜った東京都市場衛生検査所，加納碩人主査をはじめ各位に深謝する．

付記

（本研究の一部は，国際環境保全科学会議第2回国内シンポジウム，昭和49年6月13日で発表した．東京）

文献

1) Scott, M.L., and Thompson, J.N. : *Poultry Science.*, *L*, 1742—1747 (1971)
2) Morris, V.C. and Levander, O.A. : *J. nutr.*, 100, 1383—1388 (1970)
3) Schlettwein-G,D. and Hommsen, S.S. : *Internat. Z. Vit. Ern. Forschung.*, 42, 607—617 (1972)
4) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M.L., Kopecky, M.J., Wagner, P., Sang-Hwan Oh. and Hoekstra, W.G. : *Science*, 175, 1122—1124 (1972)
5) Koeman, J.H., Peeters, W.H.M., Koudstaal-Hol, C.H.M., Tjioe, P.S. and De Goeij, J.J. M. : *Nature*, 245, 385—386 (1973)
6) Stilling, B. : (seein) *Nutr. Reviews*, 31, 27 (1973)
7) Pařizek. J. and Ostádalová. I. : *Experimentia* 23, 142—143 (1967)
8) 西垣進ほか：東京衛研年報， 25， *in Press* (1973)
9) 鈴木助治，小泉清太郎，原田裕文，伊藤弘一，戸谷哲也：*ibid*, 22, 153—158 (1972)
10) 田村行弘ほか：*ibid*, 25, *in Press* (1973)
11) 西垣進ほか：*ibid* : 24, 239—248 (1972)
12) 西垣進ほか：*ibid* : 25, *in Press* (1973)
13) Cross, F.A., Hardy, L.H. and Barber, R.T. : *J. Fish. Res. Board. Canada.*, 30, 1287—1291 (1973)
14) 上田京二：熊本医学会雑誌 34 (補1)141—155 (1960)
15) 喜多村正次，宮田仲蔵，富田実，伊達昌耆，上田京二，上野哲郎，桑野麗仁，皆本宏：*ibid*, 31(補2)318—322 (1957)
16) Iwata, H., Okamoto, H. and Ohsawa, Y. : *Res. Communi. in chem. Pathology and Pharmacology*, 5, 673—680 (1973)
17) Ganther, H.E. and Sunde, M.L. : *J. Food Sci.*, 39, 1—5 (1974)
18) Stoewsand, G.S., Bache, C.A. and Lisk, D. J. : *Bull, Env, Contami. Toxicol.*, 11, 152—156 (1974)
19) 小宮和英，速水淑子，河内佐十：第94回日本薬学大会(仙台)講演要旨，156 (1974)
20) Hill, C.H. : *J. Nutr.*, 104, 593—598(1974)
21) Potter, S. and Matrone, G. : *ibid*, 104, 638—647 (1974)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 241 — 244, 1974

魚介中の微量元素の蓄積挙動の研究（第Ⅱ報）
海水魚の肉中の銅および亜鉛含量と魚体重の関係

西垣　進* 田村行弘* 真木俊夫*
山田　洋* 嶋村保洋* 木村康夫*

Studies on the Behaviour of Accumulation of Trace Elements in Fishes (II)
Relation Between Body Weight and Concentration of Copper and Zinc in Muscle of Seafishes

SUSUMU NISHIGAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*,
HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA* AND YASUO KIMURA*

Concentration of heavy metals in fish gives rise to public discussion now a days.

It is the purpose of this paper to point out that the concentraion of Cu, and Zn remained constant or rather decreased with increased body weight of tuna and swordfish, and that the concentration of Hg increases.

These reuslts indicated the existence of variation in accumulation patterns of the trace metals in muscle of those species as a function of body weight.

In addition, concentration of Cr, Cd, Pb, and As in muscle of seafish are shown in Table.

緒　言

最近，魚肉中の各種重金属を分析した報告が多くみられる[1-4]．しかしながら，現時点での魚肉中の各種重金属の平均的バックグラウンドの値と汚染が進んでいるであろうところの値とを明確に区別または比較できるまでには至っていない．ましてや，魚体重，年齢その他の条件で微量元素が魚体中でどのような蓄積または挙動を示すかという問題になると報告はほとんどない[5-7]．

われわれは第Ⅰ報[8]の水銀魚体重別調査と合わせて各種重金属の分析も同時に行ない，今回は Cu と Zn の蓄積を主体に大回遊性から人工汚染の考えられないマグロ，カジキ類の体重との相関関係を調べた．

1. 試　料

第Ⅰ報[8]の水銀調査の時と同一検体を用いた．

2. 分析方法

各種重金属 Cr, Cd, Pb, Cu, Zn は魚肉 100g に水 50 g を加えホモジナイズしたサンプル10～15 g を著者ら[9]の報告した DDTC-MIBK 原子吸光法で定量を行なった．As は 10～15g を硝酸マグネシウムと乾式灰化後，モリブデンブルー法で分析した．

結果と考察

各種重金属の分析結果の一部を Tabel 1. に示した．この値は1972年，英国で発表された[10]一般魚加工品，マグロ類のデーターとほぼ同じ値を示した．一般魚（n＝50）の各種重金属については最小値と最大値の範囲とその平均値を示した．マグロ，カジキ類については偏差を加えた．

一般魚に関する各種重金属の最小，最大値は Cr はマコガレイ，キスの0.04ppm，イサキの0.42ppm，Cd はキスの 0.002ppm，アジの 0.084ppm，鉛はアジの 0.06ppm，アナゴの 0.87ppm，Cu はマコガレイ，タチウオの 0.11ppm，イサキ，イワシの 1.5ppm，Znはカマスの 0.4ppm，サンマの 8.6ppm，As は冷凍サケの 0.15ppm，ハモの19.5ppmであった．また，マグロ，カジキ類について Cr は平均して0.07ppm，Cd は0.03 ppm，Pd は，0.15ppm，Cu は0.45ppm，Zn は，9.7 ppm，As は 0.88ppm であった．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1. Concentrations of trace metals in muscle of sea fishes (ppm ; wet weight)

Name \ Metal	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn	As
Commom sea fish	0.04～0.42 X=0.11	0.002～0.084 X=0.030	0.06～0.78 X=0.30	0.11～1.5 X=0.65	0.4～8.6 X=4.0	0.15～19.5 X=1.11
Bigeyetuna	0.02～0.26 X=0.07±0.05	0.010～0.060 X=0.027±0.015	0.07～0.31 X=0.13±0.09	0.22～0.85 X=0.53±0.15	4.7～15.6 X=9.3±2.8	0.3～1.9 X=0.91±0.41
Yollowfintuna	0.05～0.11 X=0.09±0.01	0.01 X=0.010±0	0.09～0.19 X=0.13±0.08	0.50～0.52 X=0.51±0.01	6.1～12.3 X=8.2±1.5	0.5～1.4 X=0.98±0.29
Bluemarlin	0.03～0.01 X=0.06±0.02	0.01～0.15 X=0.055±0.048	0.07～0.35 X=0.16±0.08	0.14～0.67 X=0.42±0.14	7.3～16.5 X=12.7±2.33	0.1～0.2 X=0.77±0.43
Stripedmarlin	0.02～0.13 X=0.08±0.04	0.01～0.03 X=0.020±0	0.12～0.23 X=0.15±0.04	0.34～0.48 X=0.42±0.06	4.9～13.2 X=10.2±2.18	0.1～1.5 X=1.10±0.15
Swordfish	0.03～0.28 X=0.08±0.07	0.01～0.220 X=0.053±0.06	0.11～0.30 X=0.19±0.06	0.32～0.55 X=0.42±0.06	5.8～12.4 X=8.95±2.05	0.2～1.6 X=0.61±0.36
Albacoregermon	0.03～0.07 X=0.04±0.01	0.01～0.02 X=0.012±0	0.09～0.18 X=0.13±0.04	0.30～0.60 X=0.40±0.10	4.5～11.1 X=8.8±2.6	0.7～1.4 X=0.91±0.22

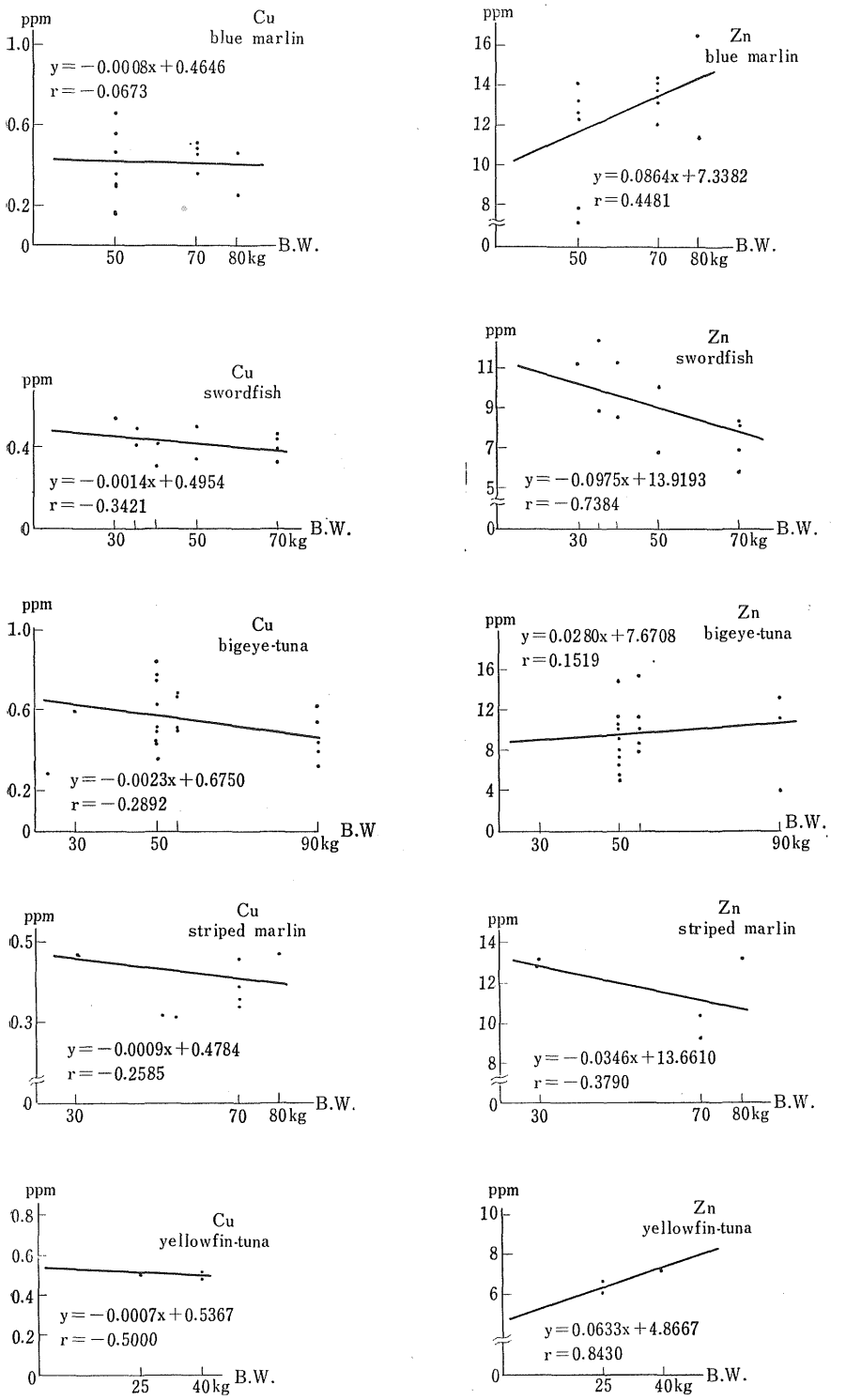


Fig. 1 Relation between body weight and concentrations of trace metals in muscle of tuna and swordfish. (wet weight)

われわれの分析したデーターは，英国で分析されたマグロ類のそれに一致した．

われわれが今回調査している間に Cross ら[6]が大西洋産アジと深海魚の白身中の数種の重金属と魚体重との相関関係の報告が発表されたが，マグロ，カジキ類の体重と重金属含量との相関関係は全く報告がないので，今回はそれらの Cu と Zn の含有量と魚体重の相関関係を魚種別に Fig. 1. に示した．

Cu の相関関係はクロカワカジキ1種を除いて体重の増加に比し減少の傾向を示した．また，Zn のそれはマカジキ，メカジキにおいて減少の傾向，クロカワカジキ，メバチ，キハダに関しては定常，または多少上りぎみの傾向であったが，r値は低く，魚体重との相関関係はみられず，いずれも有意差はなかった．このことは Hg が魚種にかかわりなくほぼ体重との相関をもつことに反して，いずれの魚種でも全く相関を示さないのは Cu と Zn が環境に対して定常状態にあることを意味すると共に，魚が小さい時からすでに数 ppm の濃度を維持しているのは Cu と Zn が魚体組織にとって必須元素であり，生物学的に蓄積と排泄のバランスを維持しているものと思われる．

われわれの得られたデーターと海水中に含有する元素を比べ生物濃縮係数を割り出して Table 2. に示した．

Table 2. Estimated concentrations factors for Cr, Cd, Pb, Cu, Zn and As in muscle of tuna and swordfish and seafish

Element	Seawater conc. (μg/l)	tuna and swordfish (ppb)	Conc. factor	Seafish (ppb)	Conc. factor
Cr	0.46[12]	70	150	100	240
Cd	0.02[11]	30	1,500	30	1,500
Pb	3[11]	150	50	300	100
Cu	3[6]	450	150	640	210
Zn	3[6]	9,700	3,200	4,000	1,300
As	2.6[13]	900	350	1,110	430

一般魚，マグロ，カジキ類の濃縮係数を比較してみると多少の値の差はあるにしても，相対的に大きな差は認められなかった．

Cd, Pb, Hg 以外の必須元素とされている元素はよほどの汚染がない限り，また，Hg のように生物濃縮による桁違いの魚体内異常蓄積をみることはなくほぼ定常値を示すと思われる．

付　記

本研究の概要は国際環境保全科学会議第2回国内シンポジウム，49年6月13日，東京で発表した．

文　献

1) 田中之雄，池辺克彦，田中涼一，国田信治：食衛誌，14，196—201 (1973)
2) 下川洪平，堀部信好，寺町雅子，森　仁：食衛誌，12，330—332 (1971)
3) Lunde, G., : *J. Sci. Fd Agric.*, 19, 432—434 (1968)
4) Ichikawa, R., and Ohno, S., : 日本水産学会誌，40，501—508 (1974)
5) Huggett, R.J., Bender, M.E., and Slone, H. D., : *Water Reserch*, 7, 451—460 (1973)
6) Cross, F. A., Hardy, L. H., Jones, N.Y., and Barber, R. T., : *J. Fish. Res. Board Can.*, 30, 1287—1291 (1973)
7) Covett, R.J., Gutenmann, W.H., Pakkala, I.S., Youngs, W.D., Lisk, D. J., Burdick, G.E., and Harris, E.J., : *J. Fish. Res. Board Can.*, 29, 1283—1290 (1972)
8) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，木村康夫：東京衛研年報，in press 25, — (1974)
9) 西垣　進，田村行弘，真木俊夫，山田　洋，嶋村保洋，木村康夫：東京衛研年報，24, 231—237 (1973)
10) Taylor, D.J., and Chapman, W.B., : *British Food J.*, : January, February 5—8 (1972)
11) 日本化学会訳編：海洋汚染とモニタリング，65 (1973) 丸善
12) 藤永太一郎，中山英一郎：化学，24, 273 (1969)
13) 堤　璋二：公害と対策，9，1219—1226(1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Reb. Lab. P. H.
25, 245 — 249, 1974

マグロ類およびその他の水産食品の水銀含有量調査（Ⅱ報）
魚肉中への水銀蓄積と体重増加との関連について

西垣　進* 田村行弘* 真木俊夫*
山田　洋* 嶋村保洋* 木村康夫*

Investigation on Mercury Levels in Tuna, Marlin and Marine Droducts (II)
Relation Between Boby Weight and Concentration of Mercury in Muscle tissues

SUSUMU NISHIGAKI*, YUKIHIRO TAMURA*, TOSHIO MAKI*,
HIROSHI YAMADA*, YASUHIRO SHIMAMURA* AND YASUO KIMUMA*

This investigation was carried out on 186 specimens of 11 species of sea fish chiefly such as tuna and marlin.

The results obtained were as follows : Either the concentration of total mercury and methyl mercury in muscle tissue had increased according to the increase of body weight on most of the fish species.

Deviation of mercury level of muscle specimen obtained from same species of fish having the same body weight was within 2～4 times.

These deviations observed on the specimen might have been caused by the difference of their age, sex and place of capture etc.

More than 80% of the total mercury found in muscle tissue existed in the form of methyl mercury, regardless of their body weight with the exception of blue marlin.

緒　言

前報[1]で東京都築地中央卸売市場に陸上げされ，われわれが日常摂取しているマグロ・カジキを主体に，魚介類やその加工品の水銀量を調査した時，各魚種にかなりの個体差が観察された．当時いくつかの魚種について，魚齢や大きさの増加とともに水銀蓄積も比例して増加するという報告[2-4]が見られたが，一般的に，メカジキが特に高い水銀蓄積を示し，魚種特異性によるものと考えられており，われわれの調査でも平均値で1 ppmを越え，どの魚種よりもはるかに高い値が得られた．しかしこのような魚種による水銀含有量の違いやバラツキは，捕獲される大きさが魚種によって異なっていて，体重差に基くためと考え，マグロ・カジキ類7種，一般沿岸魚3種について，体重増加にともなう筋肉中への総水銀およびメチル水銀の蓄積パターンについて調査をおこなった．

この調査は前年度に引き続き，東京都公害対策専門委員会水銀保健対策分科会の水銀調査の一貫として実施されたものであるが，当研究所独自に調査した資料を補足して報告する．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

調査の部

1. 調査試料

1973年2月から1974年3月までに東京都築地中央卸売市場に陸上げされ，捕獲海域の判明しているものを採取した．

マグロ・カジキ類は太平洋，インド洋で捕獲されたもので，内臓，背びれ，口嘴を除去した体重を測定し，一般魚は同一海域で捕獲されたものについて全体重を測定した．

本調査で試料とした魚介類は11種186検体である．

なお，分析するまでは −20° で凍結して貯蔵し，分

析時に解凍して血合の付着していない筋肉をホモジナイズしたものについて試験をおこなった.

2. 分析法

(1) 総水銀 五酸化バナジウムを触媒として硫硝酸で分解後，還元気化・注入式によるフレームレス原子吸光法[5]を使用した.

(2) メチル水銀 FDA法に準じた別報[1]の分配抽出時の液量比を若干変更して用いた.

本報での平均回収率は約80%であるので，値を回収率で補正し，水銀として標示した.

なお，別に試料中の水分も測定したが，それぞれの魚種の各個体についてほとんど差が認められなかったので，本報の分析値はすべて Wet Base で示した.

調査結果

1. 筋肉中のメチル水銀としての含有率は前報[1]で得られた結果と同じで，Table 1. に示したように，クロカワカジキを除いてほとんどの個体が総水銀の80%以上を占め，魚体重の増加にともなう変動は認められなかった.

2. 各魚種とも，筋肉中の水銀蓄積パターンは Fig 1. に示してあるように，体重増加にともなって増加し，いずれも統計的に高い相関を有する.

Table 1. Mercury levels and ratio of methyl mercury to total mercury in muscle tissue of fish

Species		n	Body weight (kg) Range	M/T (%)	
				Range	Mean
Tuna	Big-eye tuna	27	55～105	78～108	91
	Yellowfin tuna	22	3.3～72	60～118	97
	Bluefin tuna	18	1.0～120	86～103	94
	Southern bluefin tuna	10	19.6～95	80～100	92
	Albacore	4	7.0～7.5	78～92	85
Marlin	Striped marlin	36	24～97	40～107	85
	Swordfish	13	30～300	77～104	93
	Blue marlin	38	50～238	5～110	38
Other species	Morid-fish	8	1.12～2.3	67～109	86
	Japanese sea-bass	6	0.55～1.8	78～96	88
	Goosefish	4	1.0～17	60～90	74

3. 同一魚種の同体重のものの水銀量の個体差は，総じて体重の軽いもの程大きく，約4倍以内であり，重いもの程小さくなり約2倍以内に納まる傾向が認められた.

4. マグロカジキ類の体重と水銀蓄積の回帰直線は，体重 100kg で約 1ppm の付近を示し，傾斜も魚種による著しい違いは認められない.

考 察

クロカワカジキのメチル水銀含有率は前報[1]と同様，最低値5%と著しく低いものがあったが，その他の魚種については80%以上でほとんどがメチル水銀の形で存在している．また，体重増加にともなう変動も認められず，どの大きさの魚でも総水銀を測定してメチル水銀の含有量として大きな違いはない．FDAでは従来魚肉中の水銀はほとんどメチル水銀の形で存在するとして，行政的な処置をとっていたが，われわれの調査結果もこれをサポートしている.

Bache 等[2]は lake trout の魚齢別にメチル水銀の含有率を調査し，1年魚で30%，3年で50%，4年以上で80%と魚齢上昇にともなってその比率が増加すると報告している.

Westöö[6]はこの報告を見て河川および海洋のサケについて調査したが，魚齢に関係なく筋肉中では93%以上であったと報告し，Bache 等[4]の分析では分配係数による補正がなされていないためであると指摘している．われわれの得た調査結果もこの Westöö の報告を支持している.

前報[1]でも触れておいたが，わが国の魚肉中のメチル水銀の含有率が諸外国より低いのは回収率による補正がなされていない場合が多く，最近は鈴木等[7]も魚肉中の無機水銀の存在は極めて少ないことを報告しており，今調査でさらに魚齢に関係なく，メチル水銀と

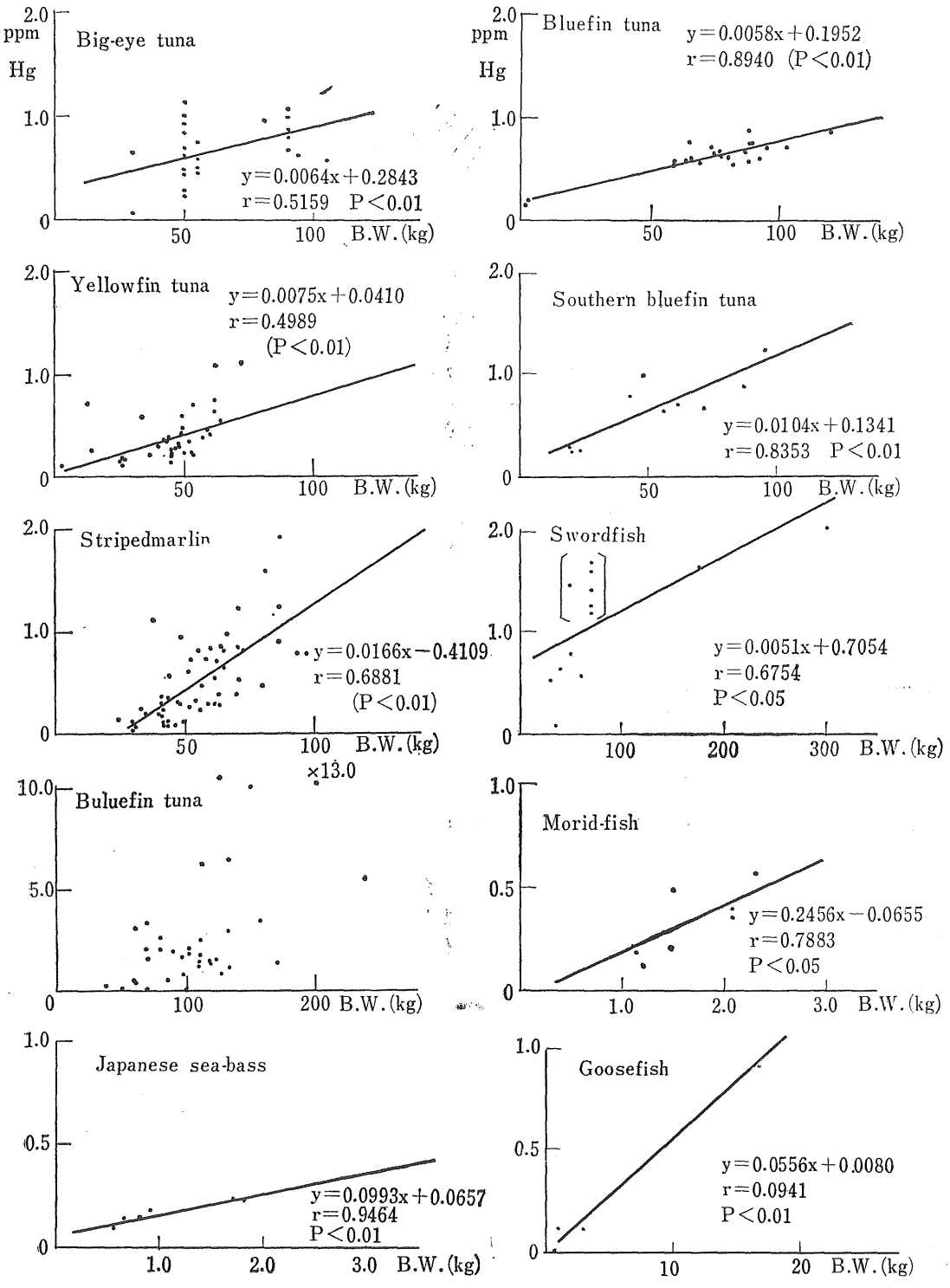


Fig 1. Relation between total mercury levels in muscle tissue of fish and body weight

しての比率はかなり高いことが確認された．

ついで体重増加と水銀蓄積については緒言に引用した三つの報告以外に，調査実施中にも数編見[6,8-12]られるようになったが，これらのものもわれわれの調査と同じく，ほとんどの魚種が体重増加と水銀蓄積について高い相関をもっていることを示している．また同一魚種の同一体重の個体による水銀量のバラツキはメバチが一番大きかったが，総体的に，魚体重の軽いものほど大きく，重いものほど小さい傾向が得られたが，この傾向は Cumont 等[9]が同一魚種100～400体についておこなった調査でも強く現われており，そのバラツキの範囲もわれわれと同程度を示している．

メカジキの Fig 1. に示した回帰直線では，Y軸との交点が，他の魚種では原点に近いのにくらべて，約0.7ppm 付近を示している．ここで黒ワクでかこんだ個体は日本近海のものである．その他は赤道付近の太平洋産のものである．この日本近海産のものによって回帰直線は上方に引き上げられているため0.7付近を通り，太平洋赤道付近のメカジキのみで回帰直線を求めれば他の魚種のように原点付近を通る．メカジキは他の魚種より沿岸定住性が大きいため海域差が現われたものと考えられる．したがって海域別に集計すれば他の魚種と同じく原点付近を通るものと思われる．またメカジキは一般的に水銀含量が高い魚種とされているが，回帰直線からみて同体重のものでは他の魚種と大きな差はみられず，商業ベースでは他のものより大型魚が捕獲されているためと考えられる．

水銀蓄積と魚齢，または大きさとの相関を調べる場合，Westöö[6]の調査は魚齢，体長，体重を同時に記入してあるが，体重は魚齢との偏りがとくに大きく，同じ魚齢のものでも若いほど，その偏りが大きく，サケで約3倍もあり，魚齢の多い時はその半分位に減少する傾向がみられるが，体長は魚齢による変動がほとんど認められていない．また長倉の総説[13]の中で，サメの雌雄による体長と水銀蓄積の比較を引用しているが，性差もかなり認められ，個体差の原因についてのFactor は種々あるようである．今回の調査ではマグロ，カジキ類の体重と水銀蓄積の相関を求め，体長は正確にはかれなく，性の区別もされていないためこのような個体差が得られたものとも考えられる．

いずれにしても魚肉中への水銀の蓄積は，魚齢に比例して高まることに間違いなく，こうした傾向の認められない魚種もいくつかみられるが[10),12)]，体重との相関を取ったため，または性差の区別をしなかったため，あるいは棲息水域環境濃度に大きな変動があったためではないかと考えられる．

最後にクロカワカジキであるが，この魚種だけは特異な水銀蓄積パターンを示し，同体重の他のカジキやマグロと比較して，はるかに高い総水銀レベルが観察され，メチル水銀としての比率も一定せず，本調査の段階で推論することは難しいが，①魚介類の水銀蓄積は現段階では食物連鎖によるものが一番大きいと考えられている．②他の多くの魚種の筋肉中の水銀はほとんどがメチル水銀の形で蓄積されていて，魚体内で無機化される徴候は見られない．③無機水銀と有機水銀の生物学的半減期から考えて，他の同属の魚種と比較して回遊性や食性に大きな違いがないことから，無機水銀の高濃度蓄積はない．などの諸点から次のことが考えられる．まず現在使用されているメチル水銀の分析法で抽出されないか，または電気的に陰性度が小さいため，ＥＣＤ付ガスクロマトグラフでの検出感度が著しく低く，さらに熱分解したり，あるいはリテンションタイムが遅い別の有機水銀に転換されて蓄積されている可能性がある．加えて南太平洋に棲息するクロカワカジキは，他のカジキやマグロと異なり胃内容物にマグロやカツオの出現率が著しく高いことから，ほかのものより高濃度の水銀蓄積が起こるものと思われる．前報[1]の調査でもサメの２種類にメチル水銀との比率が極端に低いものがあったが，とくに著しく大形に成長する魚種にこの傾向があるようである．今後こうした知見に基いて，クロカワカジキを中心に大型魚の水銀蓄積について調査を続けておこなうことにしている．

総　括

魚肉中への水銀蓄積は魚体重の増加にともなって増加し，同一魚種の同体重のものでも最高４倍程度の個体差が認められるが，メチル水銀としての含有率は，クロカワカジキを除いて，体重に関係なく80%以上を占めている．また，水銀蓄積がとくに高いと考えられていたメカジキも体重が同じであれば，他のものと大差のない水銀レベルであるといえる．

謝　辞

本調査に当り，資料の収集をはじめ，多くのご助言をたまわった東京都市場衛生検査所加納碩人主査をはじめ，各位に深謝する．

文　献

1) 西垣進：東京衛研年報，24，239—248 (1972)
2) Bache, C.A., Gutenmann, W. H. and Lisk, D.J.: *Science*, 172, 913—952 (1971)
3) Barber, R. T. Vijayakumar, A. and Cross,

F.A. : *ibid.*, 178, 636—638 (1972)
4) Rivers, J.B., Pearson, J.E. and Shultz, D.: *Bull. Env. Contami. Toxicol.*, 8, 257—266 (1972)
5) 田村行弘：東京衛研年報, 25, *in Press* (1973)
6) Westöö, G. : *Science*, 181, 567—568 (1973)
7) Suzuki, T., Miyama, T. and Toyama, C. : *Bull. Env. Contami. Toxicol.*, 10, 347—355 (1973)
8) Cross, F.A., Hardy, L.H. and Barber, R.T. : *J. Fish Res. Board Canada*, 30, 1287—1291 (1973)
9) Cumont, G., Viallex. G., Lelievre, H. et Bobenrieth, P. : *Rev. Intern. Oceanogr.*, 28 95—127 (1972)
10) 和泉四郎, 奈良忠明：*Jap. J. Hyg.*, 29, 50 (1974)
11) 山中すみへ, 上田喜一：*ibid.*, 28, 582—587 (1974)
12) 鈴木幸夫, 西山敬太郎, 毛利高二, 藤井信男：産業医学, 15, 679—680 (1973)
13) 長倉克男：食の科学, 18, 71—80 (1974)
14) ソ連科学アカデミー海洋学研究所：太平洋の魚類(丸善株式会社), p. 91 (1971)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 251 — 255, 1974

フッ素イオン電極による食品中のフッ素の定量法について

友松俊夫* 鈴木二郎* 中沢久美子* 木村康夫*

Determination of Fluorine Contents in Foods by means of Fluoride Electrode Method

TOSHIO TOMOMATSU*, JIRO SUZUKI*, KUMIKO NAKAZAWA* AND YASUO KIMURA*

The method of analysis of fluoride content with fluoride electrode was studied in this paper. The technique involved ashing of sample with $Ca(OH)_2$ as fluorine fixative, isolation of fluorine by steam distillation at optimal temperature of 145°±5° from 50%(v/v)H_2SO_4, dilution of distillate with same amount of TISAB, and estimation with fluoride electrode.

The results obtained were as follows. The levels of fluoride in the wheat flours, vegetables and muscles of fish determined by this method were shown to be about the same of magnitude on fresh tissue basis.

While in the fish-bones and the skin considerably high concentration of F was observed ; the levels were higher by two or three orders of magnitude than those in the muscle.

はじめに

従来フッ素の分析は，主として口腔衛生の問題と関連して行なわれて来たが，最近では，フッ化物の使用量および発生源の増大に従い，斑状歯，むし歯予防に関してはもとより，公害原因物質[1~3]，生体組織の硬骨化[4]，骨の変形および臓器に対する障害等[5]に関する研究も行なわれるようになった．これに関連して，人が摂取するフッ素も，飲料水由来のものから，食品や，大気のような自然環境に関するものまで，幅広く分析されるようになった．

これらの分析データ[1~3]を用いて，全国平均1人1日当りのフッ素摂取量を推定すると，約3.7 mg から20 mg となり，飲料水由来のフッ素量 0.04 mg から2.7 mg[9]に比較して，かなり多いと思われる．そこでわれわれは，従来の比色法にくらべて，検出感度の高いフッ素イオン電極を用いて，試験法の検討を行ない，あわせて食品中のフッ素の定量を行なった．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Ⅰ. 実験方法

1. 装置および試薬

フッ素（以下Fと略す）イオン電極 ORION Res. Inc. 94—09型

比較電極 ORION Res. Inc. 90—01型

Fイオンメーター ORION Res. Inc. Digital Ionalyzer model 801型

自記分光光度計 島津 MPS—50 L型 10 mm石英セル

スターラー 東洋科学産業 MS—16 B 型 15 mm テフロン攪拌子

pH メーター 日立堀場 M—5 型

F標準原液 フッ化ナトリウム0.2210 g を正確に秤取し，脱イオン水（以下水と略す）に溶かして 100 m*l* とし，ポリエチレン製試薬瓶に保存する．（本液 1 m*l* は，1,000 μg のFを含む）．

F標準液 F標準原液を水で希釈し，用時調製する．

全イオン強度補正用緩衝液（Total Ionic Strength Adjustment Buffer 以下 TISAB と略す）．

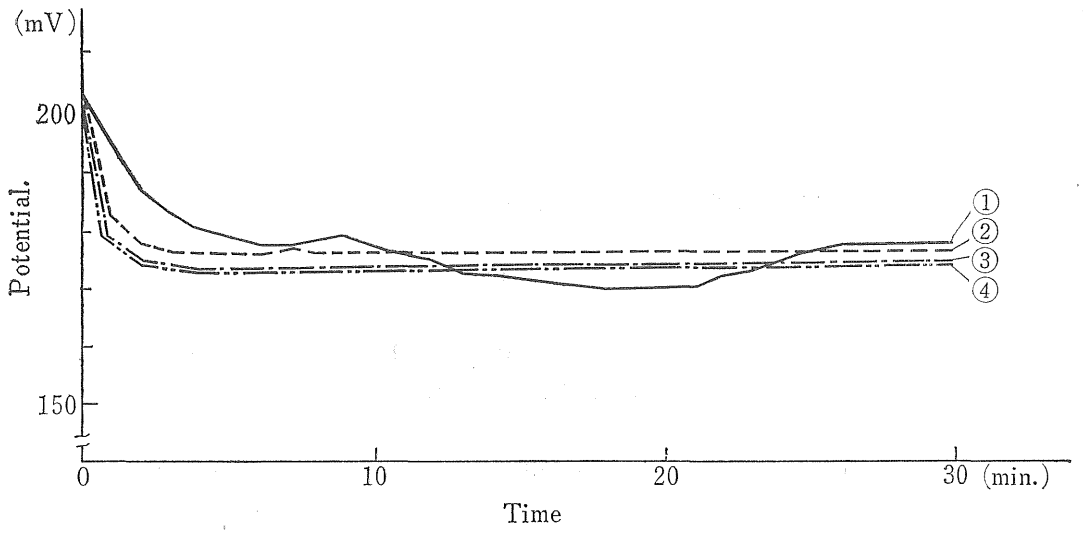


Fig. 1 Effect of warm-up time of Instrument on curve for Potential vs. time relation
Number : Order of measurement

氷酢酸 57 ml と塩化ナトリウム 58 g を 500 ml の水に溶かし，5M 水酸化ナトリウム溶液を加えて，pH を 5.2から5.3に補正し，水を加えて 1 l とする．

水酸化カルシウム混液（以下 $Ca(OH)_2$ と略す）

酸化カルシウムを Megregian の方法に従い除Fし，ポリエチレン瓶に保存する．

50%(v/v) 硫酸　硫酸 1 l を水 1 l に混和する．

クエン酸ナトリウム

塩化アルミニウム（アルミニウムについては以下 Al と略す）．

塩化第2鉄（鉄については以下 Fe と略す）．

2.5%ランタンアリザリンコンプレクソン（以下 La-ALC と略す）溶液　ドータイトアルフッソン（同仁薬化学研究所製）2.5 g を水に溶かして 100 ml とする．（用時調製）．

2. 操　作

i. 灰化および水蒸気蒸留

検体の適当量をニッケルルツボ中に秤取し，$Ca(OH)_2$ 5 ml を加えて良く攪拌し，アルカリ性であることを確かめる．つぎにホットプレートおよび赤外線ランプを用いて乾固し，電気炉中550°で完全に灰化する．冷後，灰化残留物を3頸の蒸留コルベンにうつし，50%(v/v) 硫酸 50 ml を加えて，145°±5° で水蒸気蒸留を行なう．200 ml の留液を捕集し，1%フェノールフタレン1滴と1%NaOH でわずかにアルカリ性とし，可及的少量まで濃縮する．この濃縮残留物を水および TISAB 25 ml でメスフラスコ中に洗入し，水を加えて 50 ml とし，試験溶液とする．

ii. 電極による測定

試験溶液を 100 ml のビーカーに移し，電極を挿入し，スターラーで一定速度に攪拌しながら放置し，安定値に達したところで測定する．

Ⅱ. 実験結果および考察

1. Fイオンメーターの測定準備時間について

F濃度0.2 ppm の50%TISAB 溶液（試薬の項で記した TISAB を100%濃度として）を調製し，Fイオンメーターを1時間ウォーミングアップした後，調製液を4回に分けて，各々30分ずつ1分間隔で測定した．その結果を図1に示す．

この図からも明らかなように，回を追うごとに測定値が接近して行き，2.5時間と3時間の値は，ほぼ一致する．いかなる測定機器でも，実際に測定を開始するまでには，多少のウォーミングアップの時間が必要であるが，この装置の場合には，比較的長い時間（約3時間）が必要であり，数日間連続使用する場合には，電源を切らずにおくのが実際的である．

2. 安定時間について

測定をはじめてから，何分後に一定の値を示すかについて，F濃度0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0および 2.0 ppm の検液を調製し，経時的に電位の変化を調べた．その結果を図2に示す．

Fイオン電極の測定値安定時間は，一般に15分[9]程度であるといわれているが，図2より明らかなように，比較的短時間で一定値を示す．しかし連続する二つの測定溶液の電位差が大きい場合には，第2溶液は安定値に達する時間が長くなる．

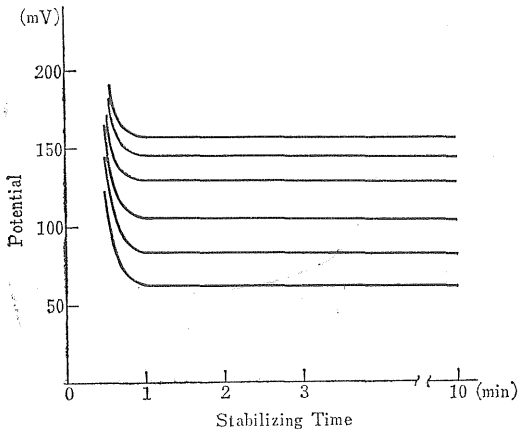


Fig. 2 Relation between Potential and Stabilizing Time

3. 検出感度および検量線について

F濃度 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 および 1.0 ppm の検液を調製し，電位を測定したところ，図3に示す検量線が得られた．

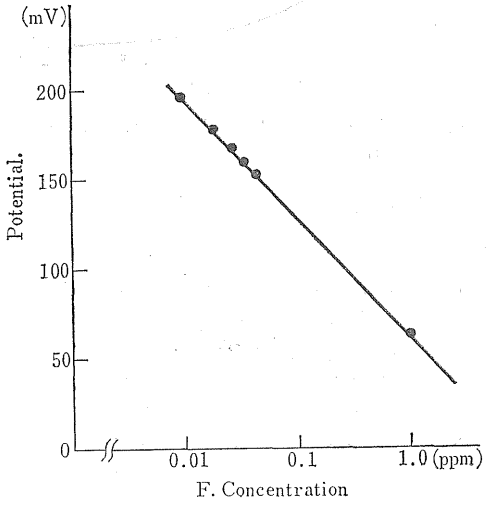


Fig. 3 Calibration curve showing electrode response in millivolts vs. lower range of fluoride Concentration in ppm.

Fイオン電極においては，F化ランタン膜から溶出するF量を基礎に，理論検出限界を 0.02 ppm であるとしている．しかし，実際に膜から溶出するF量は非常に少ないという報告[10]もあるので実験を行なったところ，図3に示す結果を得た．この検量線は 0.01～1.0 ppm の範囲で，ほぼ完全に直線となり，精度が良いことを示している．また従来の比色法の検出限界を調べ，両者を比較してみた結果が表1である．比色法[11]は，標準溶液に2.5%La-ALC 溶液 5 ml，アセトン 20 ml を加え，水を加えて全量 50 ml とし，1.5時間放置したのち，620 mμ で吸光度を測定した．

Table 1 Sensitivity of Electrode method and La-ALC method

F. electrode method		La-ALC method	
mV	F concentration (ppm)		Abso.
191.2	0.01	0.05	0.0044
172.6	0.02	0.25	0.0246
161.0	0.03	0.5	0.0434

電極法は比色法にくらべて，約5倍の感度を有し，測定値は正確に検量線にのる．一方比色法では，620 mμ に吸収があると言うにとどまり，比較的低濃度における定量は困難であった．

4. TISAB の濃度について

測定値におよぼす TISAB の濃度の影響を知るために，つぎの実験を行なった．一定量のFに濃度が段階的に変化するように TISAB を加え，Fの定量を行なったところ，図4および表2に示す結果を得た．

共存イオンが少ない場合には，わずかなイオン量の差が，定量値に大きな影響をあたえ，イオン量が増大するにしたがって，影響が小さくなるが，回収率も低

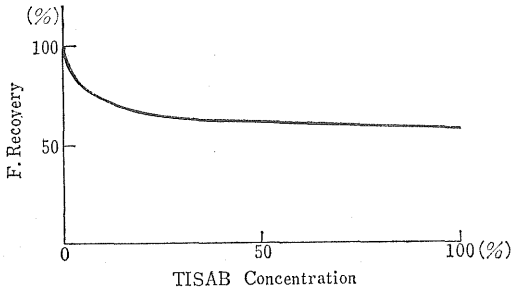


Fig. 4 Effect of Ionic Concentration of TISAB

Table 2 Effect of Ionic Concentration of TISAB

T	F Recovery (%)	T	F Recovery (%)
0	100.0	15	70.1
1	90.3	20	66.7
2	85.9	40	62.9
3	83.3	60	59.6
4	81.3	80	58.9
5	79.2	100	58.2
10	73.8		

T : Ratio of TISAB

下し，TISAB で全量メスアップした場合の Fの回収率は，約60%程度になる．以上の結果より，実験はすべて TISAB 50%で検液を調製した．

5. 妨害イオンについて[12-16]

電極法においては，ほとんど共存イオンの妨害はなく，Fe および Al は F と錯塩を形成して妨害するが，クエン酸の添加によって除去できるとされている[10]．しかしながらキレート滴定の場合には，pH 5から6の範囲では，Al はクエン酸で隠蔽できないとされている[17]．そこで 1l 中に3.0 g のクエン酸ナトリウムを含む TISAB を調製し，Fe および Al の両イオンの除去が可能であるか否かを調べた．その結果を表3および表4に示す．

Table 3 Effect of Fe ion on F Recovery

No.	Fe Added (%)	F Added(ppm)	F Recovery (%)
1	0	2	100.0
2	0.001	2	97.0
3	0.01	2	99.5
4	0.1	2	100.5
5	1.0	2	99.0

Table 4 Effect of Al ion on F Recovery

No.	Al Added (ppm)	F Added (ppm)	F Recovery (%)
1	0	2	100.0
2	0.2	2	99.0
3	1.0	2	90.0
4	2.0	2	80.0
5	4.0	2	69.5

Fe の共存はFの定量にほとんど影響を与えないが，Al はクエン酸を添加しても，ほとんど除去できないため，測定前に何等かの方法で除去しておくことが必要である．

6. 留出曲線，回収率および留出におよぼす Al の影響について

水蒸気蒸留を行なった時の捕集液の量を定めるために，F標準液に50%(v/v) 硫酸を加えて蒸留を行ない留出液を 10 ml ずつ分取，測定して，Fの留出傾向を調べ，図5に示す留出曲線を得た．また蒸留の際，Fと強く結合して，留出に影響をあたえるか否かを知るため，Al を添加して蒸留を行ない，図6 の留出曲線を得た．

つぎに Al 0, 10, 30, 50, および 70 μg に F 100 μg を添加したものおよび麺 10 g に F 100 μg を添加し，灰化したものについて，蒸留後の回収率を求めたところ，表5の結果を得た．

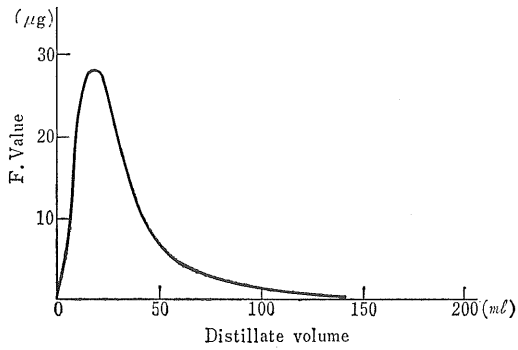


Fig. 5 Distribution Curve of F Determined by Steam Distillation

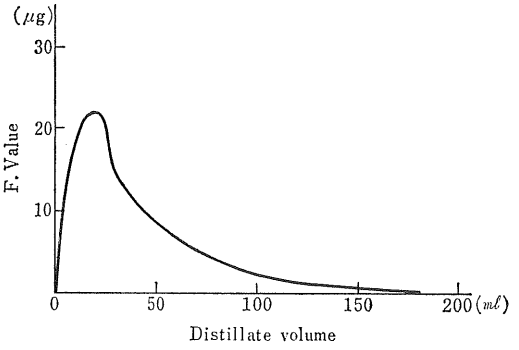


Fig. 6 Effect of Al on distil ation curve of fluoride

Table 5 Recovery of F by Steam-Distillation Method

No.	F Added (μg)	Al Added (μg)	F Recovery (%)	note
1	100	0	99.6	
2	100	10	99.7	
3	100	30	99.3	
4	100	50	98.3	
5	100	70	99.7	
6	100	100	99.9	
7	100		94.3	Added F to noodles
8	100		95.1	〃

先人の実験報告によると，留出液 500 ml を捕集しているが，筆者等の留出曲線に従えば，最小限200 ml で定量的に捕集できるものと考えられる．また麺に添加した場合の回収率の低下は，灰分の微粒子が，蒸留中に完全に溶解されず，粒の中に含まれているFが蒸留されないためと推定される．これは $Ca(OH)_2$ にF

標準液を添加して灰化と同様の操作を行なうと，酸化カルシウムの硬い塊が生成して，機械的に微粉末にするのが非常に困難であり，この場合，92.5%に回収率が低下することからも理解できる．

7. 食品中の F 濃度について

食品中のFを定量し，種別による平均値を求めた．その結果を表6に示す．

Table 6 Average Concentration of F in Foods

No.	Food Items	No. of Samples	Average (ppm)	Range (ppm)
	Agricultural Products			
1	Wheat flour	16	1.0	max 2.6 mini trace
2	Vegetables	12	0.3	max 0.8 mini 0.1
	Marine Products			
1	Fishes I (muscle)	9	0.7	max 1.2 mini 0.3
2	〃 (bone)	6	269.6	max 587.5 mini 79.6
3	〃 (skin)	9	75.1	max 212.5 mini 2.6
4	Fishes Ⅱ	2	35.3	
5	Shrimps	2	30·4	
6	Sea plants	5	9.2	max 35.0 mini 4.6
7	Other marine products	5	1.1	

Fishes Ⅱ……Anchovy, Shishamo (whole)

Ⅲ. 結　論

1. Fイオン電極法は，比色法にくらべて検出感度が高く，実測濃度 0.01 ppm でも，正確な検量線が得られる．

2. 水蒸気蒸留を行なう場合の蒸留温度は，145°±5°が良く，約160°では酸が留出して測定の妨害となり，約120°の低温になると，Fの留出に長時間を要するので適当でない．

3. 留出液の捕集は，200 m*l* で充分であり，食品からの回収率は約95%である．

4. 小麦粉，野菜類および魚の筋肉中のF濃度は，ほぼ同程度である．しかし，魚の骨および皮中のF濃度はかなり高く，筋肉中の濃度の100倍から1,000倍の高さである．

文　献

1) 松井為三郎，小木曽太郎：衛生化学，11，218—223 (1965)
2) 松井為三郎，小木曽太郎：*ibid.*，12，326—330 (1966)
3) 山本丈夫，祐田泰延，高橋公江，永金栄子：*ibid.*，15，90—95 (1969)
4) 寺井　稔：化学と工業，27，456—457 (1974)
5) 日本薬学会編：衛生試験法注解，320—322 (1973)，金原出版株式会社
6) 松浦新之助，国分信英：フッ素の研究，(1972) 東京大学出版会
7) 今村寿明：ＤＢＣニュース，13，2—8 (1974)
8) 厚生省公衆衛生局栄養課：国民栄養の現状，(1968) 厚生省
9) Orion Research Incorporated：機器取扱説明書，(1910)
10) 近藤　武：日衛試，24，448—453 (1969)
11) 木村康夫，山崎堅吉，中村弘，土屋悦輝，重岡捨身：東京衛研年報，19，153—158 (1967)
12) Leon Singep and Armstrong, W. D.：*Analytical Chemistry*, 40, 613—614 (1968)
13) 村上敏治，上杉勝弥：分析化学，14，235—246 (1965)
14) 白石直典，村田行生，中川元吉，小玉数信：*ibid.*，23，148—152 (1974)
15) 藤沼　弘，平野四蔵，斎加実彦：*ibid.*，23，148—152 (1974)
16) 近藤　武：日衛誌，24，491—495 (1970)
17) 上野景平：キレート滴定法，175 (1961)，南江堂

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 257 — 263. 1974

魚介類中の微量元素に関する基礎的研究（第1報）
かつお体内の重金属分布について

勝木康隆* 安田和男* 上田 工* 木村康夫*

Study on Amounts of Trace Elements in Marine Fishes (I)
Distribution of Heavy Metals in Bonito Tissue

YASUTAKA KATSUKI, KAZUO YASUDA, KOU UEDA AND YASUO KIMURA

Five freshly landed bonitos, 52—55 cm in their body length, which caught at a coastal waters of Japan were studied for the clarification of their normal level of heavy metal content in their organs, such as liver, heart, spleen, digestive organs, blood, gill, spawn, spermatic sac, pyloric caecum and stomach content.

Detection and identification of Mn, Pb, Co, Cd, Cu, Cr, Zn and total and methyl mercury in the specimens were made by the use of an Atomic Absorption Spectrophotometery and a gas liquid chromatography.

Results obtained are as follows :

1) Total mercury tended to be accumulate in muscle than the other internal organs and averaged 0.29 ppm in muscle and about 90% of them were found to be present in the form of methyl mercury.
2) When amount of total mercury content in each speciments was compared with that of the content of its stomach, it was found that 5.8 times greater amount was present in muscle.
3) It was also found that heavy metals other than Hg, such as Zn and Cd were tend to be accumulate in the internal organs than its muscle.
4) Remarkable accumulation of heavy metals was observed in spleen, while relatively low level of it in gill and blood.
5) Trace of Pb (less than 0.01 ppm) was detected from all the speciments.

1. 緒 言

1970年，FDA によって指摘されたマグロ缶詰の水銀問題をきっかけとして多くの研究が重ねられ，わが国においては1973年7月，水銀に関する暫定基準が発表された．

しかし，かなり研究されたといわれるマグロにおいても，水銀の侵入経路，濃縮率，メチル化等不明の点も少なくない[1-4]．まして，マグロ以外の魚類に関してはなおさらで，水銀をはじめとする各種重金属の蓄積について解明されていない点が多い．

魚類は環境の汚染をよく反映するため，その変化を知るには好材料であるのでしばしば汚染調査の対象に用いられる．

魚介類中の微量元素については，1，2の特徴的な金属，あるい魚の部位を限って試験したもの，地方的特色のあるもの[5-9]その他種々発表されているが，環境汚染を考える際のバックグラウンドとして総合的なしかも十分な資料があるとはいえないのが現状である．

しかし，現在および将来にわたる環境汚染の進行を考えるとき，衛生学的，総合的な基礎資料の整備は急務であり，加えて，分析精度の向上という点から，すでにデータが適当でないと思われるものも見うけられるため，水銀をはじめとするその他各種重金属についての正常値を得るため調査を行なった．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

調査の対象として選んだかつおは外洋表層に棲息する魚類で，表層以外には出ることはないうえ，生活周期のいかなる時期においても沿岸水と関係をもたない[10,12]という点で，また，食物連鎖の上位にある大型魚であることから指標魚として好適[1]であると考えられる．

調査はかつお体内における各金属の挙動を知る目的で，臓器，組織別に12の部分に分け，部位別に測定を行なった．

2. 調査の部

(1) 試　料

実験に供したかつおは5月初旬に漁獲された日本近海産で Table 1 に示したように採取海域別に五つの海域とし，データのかたよりのないよう注意した．

魚体の大きさにより，水銀はの蓄積率に違いがある[13,14]ため，魚体はほぼ一定の大きさのものを選んだ．

いずれも，東京中央卸売市場より入手したもので以下の部分に分けて試料を調製した．

かつおの肉部は背肉，血合肉に分け臓器は肝臓，脾臓，心臓，消化管，卵巣，精巣，幽門垂に分けた．そのほか血液，鰓，胃内容物（鰯の未消化のものが大部分である）の計12部位をホモジナイズして試料とした．

(2) 装　置

原子吸光分光光度計：パーキンエルマー 403 型，各金属の単一中空陰極ランプを光源とし，空気アセチレンフレーム，スリースロットバーナーにより測定．

分光光度計：島津 UV—200，使用波長253.7 nm

ガスクロマトグラフ：島津 GC—4 B ^{63}Ni ECD．カラム 5 %DEGS(クロモソルブ W AW—HMDS, 80～100メッシュ，ガラス1.0 m×3 mm)

温度条件　Cal. Temp. 150°
　　Inj. Temp. 170°
　　Det. Temp. 170°

(3) 試　薬

ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（以下 DDTC と略す）液：原子吸光分析用 DDTC（和光純薬）2 g を蒸留水にとかし 100 ml とする．用時調製する．

過硫酸アンモニウム液：過硫酸アンモニウム（和光純薬特級）5 g を蒸留水にとかし 100 ml とする．

メチルイソブチルケトン（以下 MIBK と略す）：和光純薬特級

酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液：1M酢酸 5.9 ml と 1 M酢酸ナトリウム 14.1 ml を混和し，pH 5 に調製する。

Table 1　Size of bonito and its area of capture

No.	Area of capture	Length(cm)	Weight (kg)
1	Tosa-Shimizu offing (Kochi)	54.0	3.21
2	Miyama-cho offing (Mie)	55.0	3.31
3	Katsuura offing (Chiba)	53.5	3.13
4	Omaezaki offing (Shizuoka)	52.0	2.83
5	Hachijo-island vicinity (Tokyo)	52.5	2.79

五酸化バナジウム：粉末，和光純薬特級

金属標準液：西垣等[15]の調製法に従った．

(4) 操 作 法

(1)試料の項で調製した13種の試料について Mn, Pb, Cu, Cr, Co, Cd, Zn, 総水銀（以下 T-Hg と略す）およびメチル水銀（以下 Me-Hg と略す）の測定を次の方法で行なった．

Mn, Pb, Zn, Cd, Co, Cr, Cu については試料 5～10 g を精秤し，500°で乾式灰化する．灰化後，硝酸温浸し過硫酸アンモニウム液を加え，アンモニア水で pH を調製して沸とう水浴上酸化を行なう．酢酸—酢酸ナトリウム緩衝液を加え，DDTC—MIBK 抽出を行ない原子吸光分析を行なった[15]．

T—Hg：AOAC 改良，五酸化バナジウム法による．試料 1～5 g を精秤し五酸化バナジウムを加え硝酸および硫酸で湿式分解を行なう．分解後 $SnCl_2$ を加え還元気化法によりフレームレス原子吸光分析を行なった[16]．

Me—Hg：試料 1 g を精秤し FDA 改良法により塩酸，塩化ナトリウムを加え，ベンゼン抽出を行ない，ECD—GC 法により測定した[14,17]．別途同一試料でシスティン振落とし操作を行ないガスクロマトグラフにおける障害の有無を確認した．

3. 結果および考察

調査の結果を Table 2 に示した．表中の数値は，1試料につき数回実験をくり返し，さらに測定段階でダブル操作を行なった．なお1～5の各金属ごとの算術平均を求め表中に mean として付記した．

(1) Mn, Zn, Cr, Co, Cu などは動植物の生育に必要不可欠な元素として生体におけるその働きもすでに知られている[18]．

このうち Mn については，動物体は消化管からの吸収はそれほど多くはなく，魚で 0～0.5 ppm といわれる[19]．

部位別測定の結果では，肝臓が 0.78 ppm で最も高かった．その他の臓器では幽門垂0.49 ppm，脾臓 0.27 ppm，心臓0.20 ppm，卵巣0.25 ppm，精巣0.32 ppm，消化管0.32 ppm で臓器平均0.38 ppm であった．筋肉では背肉が0.06 ppm 血合肉0.16 ppm で臓器のいずれよりも低い値であった．

Zn は含有レベルが高いという点で他の金属とは異なる結果を得た．Zn は Cd と同様かなり高濃度に卵巣に移行し，卵蛋白と結合する[21]といわれ，今回の調査では卵巣 10.45 ppm，精巣 15.83 ppm が高い値であった．

以下，肝臓9.85 ppm，脾臓6.68 ppm，消化管 5.64 ppm，幽門垂 5.46 ppm の順に高濃度であった．また，臓器に比較して筋肉には非常に少なく，背肉0.47 ppm，血合肉0.61 ppm であった．なお Zn の最低値は鰓の 0.41 ppm である．

Zn の毒性については十分わかっていない点があるが，自然界に比較的多い金属で，人間の臓器にも多量に分布している[20]．体内における分布状態は Cu とよく似ているともいわれるが[19]今回の調査では Cu との関連性は見られなかった．

また，Pb のように骨に蓄積する傾向がある[19]かどうか，骨については測定していないため確認することができなかった．

Cr は高等動物ではインシュリンの作用に関係して不可欠の元素である．魚類との異同は明らかではないが，調査の結果は心臓に特に高く 0.82 ppm であった．

背肉0.10 ppm，血合肉0.08 ppm がこれについで高い方で，臓器では肝臓0.07 ppm，鰓0.04 ppm のほかはすべて 0.01 ppm 以下であった．

Co は心臓 0.14 ppm，肝臓 0.13 ppm，血合肉 0.12 ppm，幽門垂，鰓各0.06 ppm，背肉0.04 ppm のほかは 0.01 ppm 以下で，Co は Cr とともに体内濃度の低い金属である．

Cu は肝臓が1.31 ppm で特に高く，他の臓器の約 2～9 倍である．心臓 0.68 ppm，卵巣 0.36 ppm，精巣 0.24 ppm，幽門垂，脾臓，消化管各 0.15 ppm，血液 0.08 ppm で全般に金属蓄積の高い臓器である幽門垂は 0.15 ppm の低い値であった．

背肉0.07 ppm と血合肉 0.79 ppm とでは10倍以上の差が見られた，血合肉はビタミンB群，ミオグロビン，チトクロームなどを比較的多く含有し，筋肉としてよりむしろ内臓と同じ特殊な機能をもっていると考えられており[12,25]上記の差異はこの生理機能の違いによるものと推定される．

(2) Pb

Hg，Cd と同様生体の非必須元素である Pb はいずれの臓器，組織にも痕跡程度（0.01 ppm以下）であった．

Pb は蛋白質と結合し易く[19,22]動物実験では体内に吸収された Pb の大部分が骨に沈着する[23]と推定されているが，骨については検討中である．

環境中の Pb は世界的に漸増の傾向にあり[24]体内に取り込まれた場合，蓄積的毒性をあらわすとして重要視される．したがって Pb の今後の動向には十分注意を払う必要があると考える．

(3) Cd

Cd は筋肉部が0.01～0.02 ppmであるのに比べ臓器では幽門垂2.06 ppm，肝臓11.52 ppm，脾臓0.44 ppm 消化管0.89 ppm といずれも高く両者に著しい差が観察され，主として臓器に蓄積されることが認められた．特に幽門垂，肝臓は背肉に比較してそれぞれ約200倍，1000倍にも達する．

筋肉と同じ横紋筋よりなる心臓は，臓器中では最も高く0.09 ppm であった．

鰓の蓄積は低く，筋肉と同程度の0.01 ppm である．

ウズラの Cd 投与実験によると，肝臓に対して著しい親和性をもっているため，高濃度に残留するが[21]，魚の場合も，このような明らかな親和性が観察された．

(4) 総水銀

T-Hg は Cd とは反対に臓器よりも筋肉に高濃度であった．

肉部の平均0.29 ppm は臓器平均（幽門垂，肝臓，卵巣，精巣，消化管）0.09 ppm の3倍強に相当する．

しかし，かつおの T-Hg は西垣等[14]によるマグロの T-Hg 0.5 ppm および厚生省暫定基準 0.4 ppm を下回った，

筋肉以外では心臓にこれにつぐ0.15 ppm が測定された．なお脾臓は試料不足のため調査を行なっていない．

(5) メチル水銀

Me-Hg の測定値，ならびに Me-Hg と T-Hg との割合（以下 M/T%と略す）を Table 2 に示した，心臓，脾臓，精巣，血液については試料不足のため測定を行なっていない．なお，表中の数値は回収率85%

Table 2. Amount of heavy metals in viscera and muscle of bonito unit : ppm

	No.	Mn	Pb	Zn	Cu	Cr	Co	Cd	T-Hg	Me-Hg	M/T %
White muscle	1	0.06	<0.01	0.49	0.08	0.08	0.05	0.01	0.34	0.33	97
	2	0.07	〃	0.53	0.08	0.14	0.04	0.01	0.32	0.28	88
	3	0.05	〃	0.56	0.10	0.11	0.04	<0.01	0.33	0.25	76
	4	0.08	〃	0.55	0.08	0.16	0.06	0.02	0.36	0.31	86
	5	0.04	〃	0.22	0.08	0.03	0.02	0.01	0.21	0.20	95
	mean	0.06	〃	0.47	0.07	0.10	0.04	0.01	0.31	0.27	88
Red muscle	1	0.20	<0.01	0.66	0.71	0.25	0.13	0.03	0.28	0.22	79
	2	0.16	〃	0.45	0.80	0.07	0.14	0.02	0.31	0.22	71
	3	0.14	〃	0.40	0.80	0.01	0.10	0.01	0.24	0.26	108
	4	0.17	〃	0.96	0.83	0.04	0.18	0.02	0.25	0.24	96
	5	0.14	〃	0.58	0.82	0.01	0.06	0.02	0.21	0.01	100
	mean	0.16	〃	0.61	0.79	0.08	0.12	0.02	0.26	0.23	91
Pyloric caecum	1	0.39	<0.01	5.31	0.13	<0.01	0.06	1.49	0.11	0.09	82
	2	0.35	〃	5.50	0.14	〃	<0.01	2.30	0.16	0.16	100
	3	0.71	〃	5.30	0.16	〃	0.05	2.23	0.10	0.11	110
	4	0.49	〃	5.92	0.15	〃	0.07	2.51	0.11	0.16	146
	5	0.53	〃	5.29	0.16	0.03	<0.01	1.76	0.11	0·09	82
	mean	0.49	〃	5.46	0.15	<0.01	0.06	2.06	0.12	0.12	104
Liver	1	0.99	<0.01	9.82	1.33	0.08	0.14	15.22	0.11	—	—
	2	0.73	〃	10.16	1.49	0.06	0.14	11.05	0.14	—	—
	3	0.47	〃	8.02	1.21	0.05	0.06	7.10	0.14	—	—
	4	0.98	〃	11.22	1.25	0.06	0.16	14.04	0.11	—	—
	5	0.75	〃	9.26	1.29	0.09	0.15	10.19	0.09	—	—
	mean	0.78	〃	9.85	1.31	0.07	0.13	11.52	0.12	—	—
Spleen	1	0.14	<0.01	2.60	0.10	<0.01	<0.01	0.38	—	—	—
	2	0.16	〃	8.00	0.24	〃	〃	0.40	—	—	—
	3	0.47	〃	4.88	0.10	〃	〃	0.36	—	—	—
	4	0.17	〃	8.60	0.13	0.03	〃	0.54	—	—	—
	5	0.41	〃	9.31	0.17	<0.01	〃	0.52	—	—	—
	mean	0.27	〃	6.68	0.15	〃	〃	0.44	—	—	—
Heart	1	0.21	<0.01	2.35	0.64	1.34	0.14	0.15	0.16	—	—
	2	0.18	〃	1.65	0.75	0.25	0.13	0.04	0.16	—	—
	3	0.24	〃	1.40	0.51	1.83	0.11	0.04	0.15	—	—
	4	0.21	〃	1.77	0.75	0.27	0.16	0.09	0.17	—	—
	5	0.16	〃	2.32	0.73	0.43	0.18	0.12	0.12	—	—
	mean	0.20	〃	1.90	0.68	0.82	0.14	0.09	0.15	—	—
Digestive organs	1	0.40	<0.01	5.80	0.10	0.02	<0.01	0.65	0.06	—	—
	2	0.23	〃	5.95	0.20	0.02	〃	0.90	0.07	—	—
	3	0.45	〃	5.77	0.14	<0.01	〃	1.10	0.08	—	—

	No.	Mn	Pb	Zn	Cu	Cr	Co	Cd	T-Hg	Me-Hg	M/T %
	4	0.24	〃	5.37	0.16	〃	〃	0.92	0.08	—	—
	5	0.28	〃	5.30	0.16	〃	〃	0.90	0.05	—	—
	mean	0.32	〃	5.64	0.15	〃	〃	0.89	0.07	—	—
Blood	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	0.35	<0.01	1.18	0.06	<0.01	<0.01	0.22	0.07	—	—
	4	0.06	〃	1.32	0.09	〃	〃	0.09	0.05	—	—
	5	0.09	〃	1.05	0.09	〃	〃	0.11	0.05	—	—
	mean	0.17	〃	1.18	0.08	〃	〃	0.14	0.06	—	—
Spawn	1	0.27	<0.01	10.40	0.40	<0.01	0.01	0.35	0.09	0.05	56
	2	0.22	0.02	10.50	0.31	0.02	〃	0.30	0.11	0.07	64
	mean	0.25		10.45	0.36		〃	0.33	0.10	0.06	60
Spermatic Sac	3	0.32	<0.01	12.16	0.22	<0.01	<0.01	0.46	0.06	—	—
	4	0.35	〃	14.25	0.23	〃	〃	0.63	—	—	—
	5	0.30	〃	21.09	0.26	〃	〃	0.53	—	—	—
	mean	0.32	〃	15.83	0.24	〃	〃	0.54	0.06	—	—
Gill	1	0.18	<0.01	0.87	0.03	0.03	0.09	0.03	0.04	0.05	125
	2	0.18	〃	0.35	0.01	0.09	0.05	0.01	0.05	0.05	100
	3	0.16	〃	0.37	<0.01	0.03	0.05	0.01	0.05	0.05	100
	4	0.14	〃	0.22	0.01	0.02	0.05	0.01	0.04	0.04	100
	5	0.12	〃	0.22	0.01	0.04	0.06	0.01	0.04	0.04	100
	mean	0.16	〃	0.41	0.01	0.04	0.06	0.01	0.04	0.05	105
Stomach content	1	1.62	<0.01	5.10	0.07	0.13	0.08	0.32	0.05	0.05	100
	2	0.38	〃	5.80	0.14	0.08	0.08	0.47	0.05	0.05	100
	3	0.71	〃	5.10	0.10	0.54	0.06	0.23	0.05	0.05	100
	4	0.50	〃	5.64	0.09	0.56	0.06	0.51	0.05	0.05	100
	5	0.46	〃	1.62	0.04	0.07	0.05	0.15	0.03	0.02	67
	mean	0.73	〃	4.65	0.09	0.28	0.07	0.34	0.05	0.04	93

Note : — in the Table indicate the test was not done.

で補正したものである.

Me-Hg は T-Hg と同様筋肉に多く残留する傾向がある. 魚と哺乳動物とは Me-Hg の体内分布がほとんど同じである[25]ことから Me-Hg と筋肉質とは特有の親和性があるように考えられる.

肝臓の Me-Hg に関しては測定段階で障害があり, この部分について現在検討中である.

M/T%は卵巣が60%であるほかはほぼ90～100% であり, 生体内では T-Hg の大部分がメチル化合物として存在することが認められた.

背肉, 血合肉とも M/T 値はおよそ90%であるが, 山中等[15]によるかつおの M/T 値78% (T-Hg 0.23 ppm, Me-Hg 0.18 ppm) を上回り, Westöö[26,27]および西垣等[14]による報告 80～100% と一致する値が得られた.

(6) 胃内容物に対する各部位の濃縮率

胃内容物中の各金属の濃度を 1.0 として他の部位との濃縮率を比較したのが Table 3 である.

Mn はほとんどの部位が 1.0 以下の数値で, 消化管を通しての吸収はそれほど多くはないと推定される.

Zn および Cd は横紋筋（背肉，血合肉，心臓），血液部分（血液，鰓）の濃縮率が平均0.2以下で，臓器に比べて著しく低い．臓器はいずれも1.0以上である．

T-Hg は Zn, Cd とは正反対の様相を呈し，濃縮率の背肉6.2，血合肉5.2は他のどの部位よりも高率である．

4, まとめ

(1) 筋肉中の T-Hg のレベルは平均 0.29 ppm で胃内容物の5.8倍である．臓器よりも筋肉に多く蓄積しその約90%は Me-Hg の型で存在することがわかった．

(2) Hg 以外の金属はおおむね筋肉よりも臓器に高い蓄積が見られ，ことに Cd, Zn はこの傾向が強い．Zn は他の金属よりも比較的含有レベルが高く，とりわけ肝臓，生殖巣に多量のZnが測定された．

(3) Pb はいずれの部位にも痕跡程度（0.01 ppm 以下）であった．

(4) 幽門垂，肝臓は比較的重金属類の蓄積が多く，反対に少ないのは血液，鰓等であることが観察された．

(5) 各金属の個体間のバラツキはほとんど見られず，5海域のかつおに差異は認められなかった．

5. 謝辞

本研究にあたり，試料採取にご協力いただいた市場衛生検査所，主査加納碩雄氏に深謝いたします．

文献

1) 清水誠，土井陸雄：科学，43，357—362(1973)
2) 喜多村正次：食品衛生研究，21，597—619 (1971)
3) 喜多村正次：*ibid.*, 23, 571—598 (1973)
4) 喜多村正次：*ibid.*, 24, 401—421 (1974)
5) 石崎有信，福島匡昭，坂本倫子：日衛誌，25，207—222 (1970)
6) 伴与一郎，赤枝宏，松本紘明，吉弘誠子：第31回日本公衆衛生学会総会講演集，367 (1972)
7) 滝沢行雄，熊倉悠紀子，大山征也，藤井正美：*ibid.*, 365 (1972)
8) 加藤敬香，穴戸純，畑千丈，中川尚彦，加藤裕三，浅香策雄：第32回日本公衆衛生学会総会講演集，167 (1973)
9) 喜多村正次，塚本利之，早川清，柴田孝子：日衛誌，26，29 (1971)
10) ソ連科学アカデミー海洋学研究所編：太平洋の魚類，(1971)．丸善
11) 松原喜代松，落合明，岩井保：魚類学(上)，(1965)，恒星社厚生閣
12) 松原喜代松，落合明：魚類学（下），第3版，(1973)，恒星社厚生閣
13) Cross, F. A., Hardy, L. H., Jones, N. Y. and Berber, R. T.: *J. Fish. Res. Board Can.*, 30, 1287—1291 (1973)
14) 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：東京衛研年報，24，239—248 (1972)
15) 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.*, 24, 231—237 (1972)
16) 田村行弘，真木俊夫，山田洋，嶋村保洋，西垣

Table 3 Ratio of heavy metals detected from each organ against the ones found in stomach content

	Mn	Pb	Zn	Cu	Cr	Co	Cd	T-Hg	Me-Hg
Stomach content	1.0	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
White muscle	0.1	—	0.1	0.8	0.4	0.6	—	6.2	6.8
Red muscle	0.2	—	0.1	8.8	0.3	1.7	0.1	5.2	5.8
Pyloric caecum	0.7	—	1.2	1.7	—	0.9	6.1	2.4	3.0
Liver	1.1	—	2.1	14.6	0.3	1.9	33.9	2.4	—
Spleen	0.4	—	1.4	1.7	—	—	1.3	—	—
Heart	0.3	—	0.4	7.6	2.9	2.0	0.3	3.0	—
Digestive organs	0.4	—	1.2	1.7	—	—	2.6	1.4	—
Blood	0.2	—	0.3	0.9	—	—	0.4	1.2	—
Spawn	0.3	—	2.3	4.0	—	—	1.0	2.0	1.5
Spermatic sac	0.4	—	3.4	2.7	—	—	1.6	1.2	—
Gill	0.2	—	0.1	0.1	0.1	0.9	—	0.8	1.3

進，木村康夫：第27回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨，15 (1974)
17) Kamps, L. R. and Mcmahon, B. : *J. A. O. A. C.*, 55, 590—595 (1972)
18) サイエンス Scientific American，日本版，日本経済新聞社，2, 50—58 (1972)
19) 山田幸孝：食品中の微量元素，第2版，日本食品衛生協会，(1970)
20) 環境庁土壌農薬課編：土壌汚染，(1973)，白亜書房
21) 湯山章，松坂尚典，西村昌数：化学と生物，11, 561—570 (1973)
22) WHO Expert Committee : *WHO Technical Report Series*, No. 532 (1973)
23) 山口正義，祐田泰延，山本丈夫：衛生化学，19, 271—276 (1973)
24) 山県登：環境の地球化学，(1973)，大日本図書
25) 山中すみへ，上田喜一，吉田多摩夫：日衛誌，28, 582—587 (1974)
26) Westöö, G. : *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790—1800(1967)
27) Wetöö, G. : *ibid.*, 22, 2277—2280 (1968)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 265 — 270, 1974

清涼飲料水のカフェインの定性・定量法について

伊東昭子* 関山 登* 石井晴代* 木村康夫*

On the Detection and Determination of Caffeine in Softdrinks

AKIKO ITO*, NOBORU SEKIYAMA*, HARUYO ISHII* AND YASUO KIMURA*

Few handy analytical methods for caffeine contained in softdrinks have been reported, though caffeine is found in many of them.

After extraction of caffeine with organic solvents and or through column chromatography, we compared several analytical methods thin-layer chromatography, UV absorption methods, colorimetry and gas chromatography.

Each one of these methods, in terms of recovery, gave rather satisfactory results.

Twenty three of 28 softdrinks on market were found of contain caffeine ranging from 10 to 650 ppm

緒　言

近時，嗜好の変化や多様化にともない，いろいろな種類の清涼飲料水が市販されるようになった．それらのうちコーラ飲料[1-2]，ガラナ飲料[3]，コーヒー，紅茶飲料，または疲労回復を目的としたり，止渇のためのいわゆるドリンク型の清涼飲料水が多く見られるが，医薬品の分野で取扱われているもの以外は極く普通に清涼飲料水として販売されている．しかし，それらのもののうちには覚醒，疲労回復を目的にしたといわれるカフェインを添加したり，原料中に天然成分としてカフェインを含むものを混合しているものもある[4-5]これらの飲料を多飲すれば，幼児に与える影響は成人に比して大きいと思われる[6]．そこで各種清涼飲料水を目的としたカフェインの分離，定性，定量等一連の試験法を検討し，さらに一部市販品についての調査を行なったので，その結果を報告する．

実験方法

1. 試　薬

カフェイン：カフェイン（日本薬局方8）を80°で4時間乾燥した．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

薄層クロマトグラフィー用展開溶媒：a）クロロホルム・アセトン・アンモニア（45：5：1），b）ベンゼン・メタノール・アセトン・氷酢酸（14：4：1：1）c），クロロホルム・アセトン・氷酢酸（45：10：1）

ドラーゲンドルフ試液：硝酸ビスマス0.85 g に氷酢酸10 m*l* を加えてとかし，水40 m*l* を加えてA液とし，ヨウ化カリウム8 g に水20 m*l* を加えてB液とし，用時，A液B液および氷酢酸の各等量溶液を混和する．

ドラーゲンドルフ噴霧用試液（日本薬局方8に準用する）

タンニン酸試液：タンニン酸1 g にエタノール1 m*l* を加えてとかし，水を加えて10 m*l* とする．（用時調製）

薄層クロマトグラフィー用吸着剤：キーゼルゲルHF 254（メルク）

2. 装　置

柴田化学条線付薄層用ガラス板（20×5 cm）
ミツミ科学産業紫外線検出器　SI—1031
島津自記分光光度計　MPS 50 L
日立自記分光光度計　EPS 3 T
島津ガスクロマトグラフ　GC 5 A

3. 試験溶液の調製

試料中よりカフェインを抽出するには，試料50～200 g（カフェインとして約100 mg を含む）をとり，

10%水酸化ナトリウム液で中性にしたのち，さらに10%水酸化ナトリウム液 5 ml を過剰に加え，食塩約10 g を加えた．そしてクロロホルム 50 ml で2回，25 ml で1回抽出して抽出液を合わせ，水少量で洗ったのち無水硫酸ナトリウムで脱水して減圧下 (20 mmHg 40°以下) でクロロホルムを留去する．クロロホルム，エタノール，熱湯2～3 ml にとかし試験溶液とする．さらに試料を精製する必要のある場合はベンゼンで湿したアルミナカラムを用いて上記クロロホルム試験溶液を注ぎ，クロロホルム 5 ml，エチルエーテル10 ml で2回，ついで石油エーテル 10 ml で2回洗滌したのち，さらにクロロホルム 10 ml でカフェインを溶出させる[8~9]．このクロロホルム溶液をとり，減圧でクロロホルムを留去し，クロロホルム，エタノールまたは熱湯にとかし各々 2～3 ml として試験溶液とする．

4, 呈色反応，沈殿反応

試験溶液の溶媒を留去し，その残留物を点滴板または時計皿にとり，これに過酸化水素試液数滴および塩酸1滴を加え 80°C 以下で乾燥する．そのとき橙色に呈色すれば，カフェインの存在を認める．さらにアンモニア試液1滴を加えると赤紫色に変わり，その色は水酸化ナトリウム試液2～3滴を加えるとき，消える．(ムレキシド反応)[11]その他，沈殿反応として小試験管中に試験溶液（水溶液）をとりタンニン酸試液を加えると沈殿を生ずる．

この沈殿は試液の過剰に溶ける．

5. 薄層クロマトグラフィー法

定性試験

吸着剤は主としてキーゼルゲル HF 254 を使用した．薄層板は5×20 cm，吸着剤層 0.25 mm の薄層プレートを作成し，活性化する．試験溶液（エタノール）を1～5 μl をマイクロシリンジでとり薄層プレートにスポットし風乾する．同様にカフェイン0.1—1%エタノール溶液をスポットして約15 cm 展開した．展開溶媒は氷酢酸・アセトン・メタノールまたは，クロロホルム・アセトン・氷酢酸，等の混液を用いた[10]．上記の薄層プレートに，紫外線照射 (254 mμ) を行ない，その吸収部位により標準液のそれと比較して確認を行なう．または呈色試薬（ドラーゲンドルフ試液，硫酸1→2）を順次噴霧して黄色地に橙色に発色した斑点と Rf で確認した．

定量試験

定性試験において確認した部位に相応する部分を1～2cm 削りとり小試験管中でエタノール，クロロホルムまたはジクロルメタンで抽出した上澄液，または遠心分離したものについて，下記のUV法または可視部吸収法を用いて定量操作を行なった．

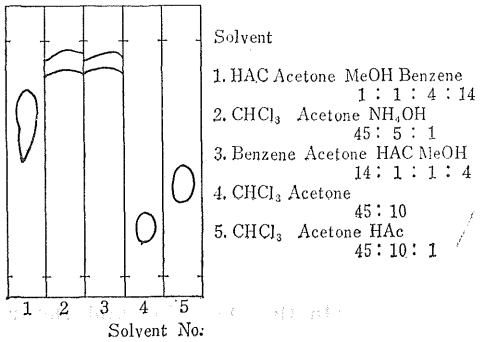


Fig. 1 T. L. C. of caffeine (Solvent and Rf value)

6. 紫外部吸収法

カフェインのクロロホルム，ジクロールメタンまたはエタノール溶液による試験溶液の吸収曲線および検量線の作成を行ないそれを Fig. 2 に示す．クロロホルム溶液の最大吸収波長は 276 mμ，エタノール溶液は 274 mμ であり，ジクロルメタンは275 mμ であった．このときの測定至適濃度は 2.5—15 ppm である．

7. 可視部吸収法[7]

1 ml 中 1 μg のカフェインの水溶液を標準液として0.25, 0.5, 0.75—2 ml をとり水で10 ml としピリジン（1→5）酢酸（1→50）各 2.5 ml を加えて，氷水中5分間放置して冷却し，これに次亜塩素酸ナトリウム (Cl_2 として0.1%) 2 ml を加え，さらに氷水中正確に5分間放冷したのち，チオ硫酸ナトリウム (1→20) 2 ml および4%水酸化ナトリウム 5 ml を加えて水で50 mlとする．この呈色液を 460 mμ で測定して．検量線を作成した．このときの吸収曲線および検量線を Fig. 3 に，また呈色の経時変化を Fig. 4 に示す．この可視部吸収法の測定至適濃度はカフェイン 0.5 ppm～4 ppm であった．

8. ガスクロマトグラフィー法

標準液には 1 ml 中 1 mg のカフェインクロロホルム溶液を用いる．検出器は水素炎ディテクターを用い，マイクロシリンジで標準液，および試験溶液の1～5 μl を注入した．充塡剤としてはシリコン OV 17 をクロモソルブ W(AW—DMCS 60—80メッシュ）に2%の割合にコーティングしたものを用いて測定した．保持時間は5分で，内部標準物質として用いたフェナントレンの保持時間は2.5分である．また同様にしてカラムの長さ1～1.5 m で，充塡剤，ジエチレングリ

Dichlormetane 276mμ
Chloroform 277mμ
Ethanol 274mμ

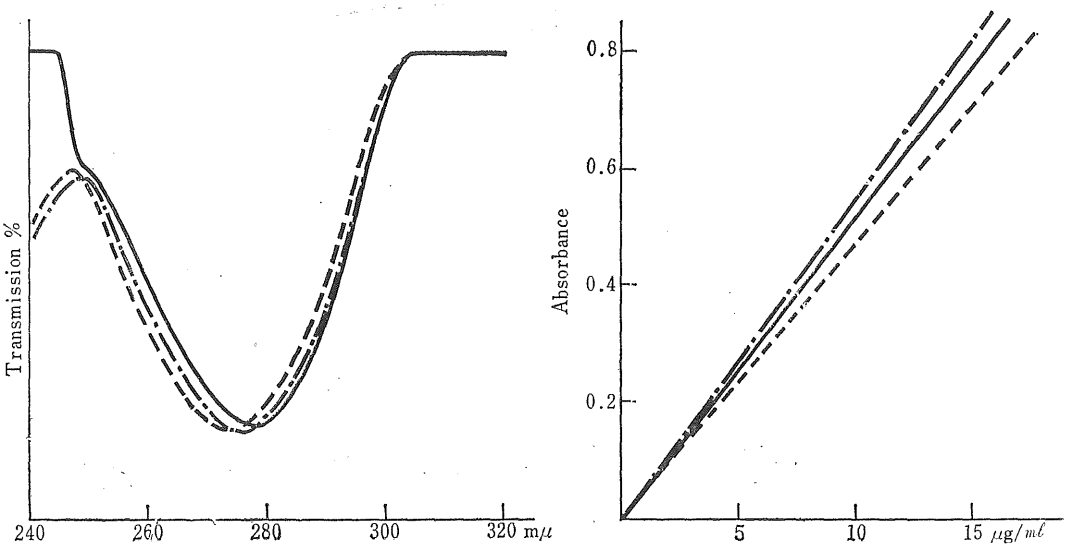
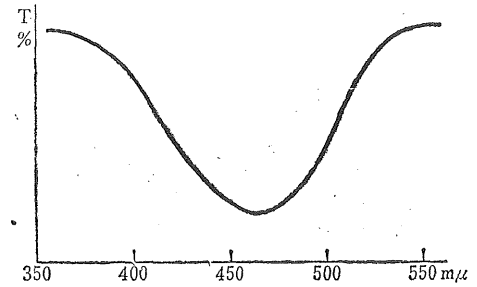


Fig. 2 Absorptio Spectra with various solvents of caffeine and the calibration Curves



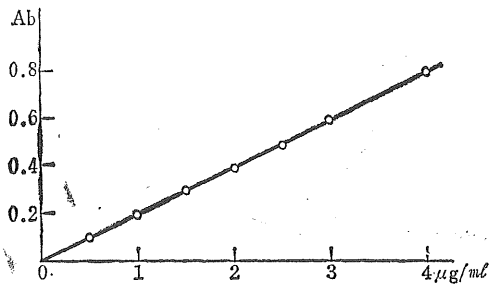


Fig. 3 Absorption spectra of colorimetry

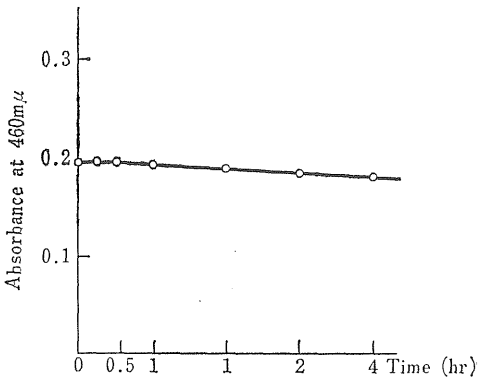


Fig 4 Change in Absorbance at 460 m μ in the lapse of time

コールサクシネートポリエステルをクロモソルブW (AW—DMCS 60—87メッシュ) に2%の割合にコーティングしたxものではカフェインは13.5分，フェナントレンは2.5分であった．

その他充塡剤 0V1 (0.5—1%) カラム長 1mのものはカフェイン4.5分，フェナトンレン3.5分である．また SE30 を用いたものは x カフェイン2.5分，ベンゾフェノン1.5分であった．その他の条件は Fig. 5 に示すとおりである．なお上記の各種試験法による分

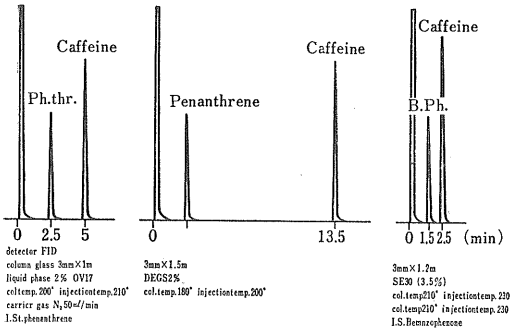


Fig. 5 Gas. Chromatograms of Caffein

析系統図を Fig. 6 に示す.

市販品の調査結果

試料としては清涼飲料水28種について調査を行なった. うち, 医薬品表示以外の強精ドリンク剤タイプ飲料13種（そのうち4種は炭酸含有）について定量試験を行なった結果, 最低14 ppm, 最高 463 ppm のカフェインを検出した. さらにコーヒー・紅茶飲料9種中からも同様に10 ppm—650 ppm, コーラ飲料6種からは 21 ppm—126 ppm のカフェインを検出した. その結果は Table 1 に示すとおりである.

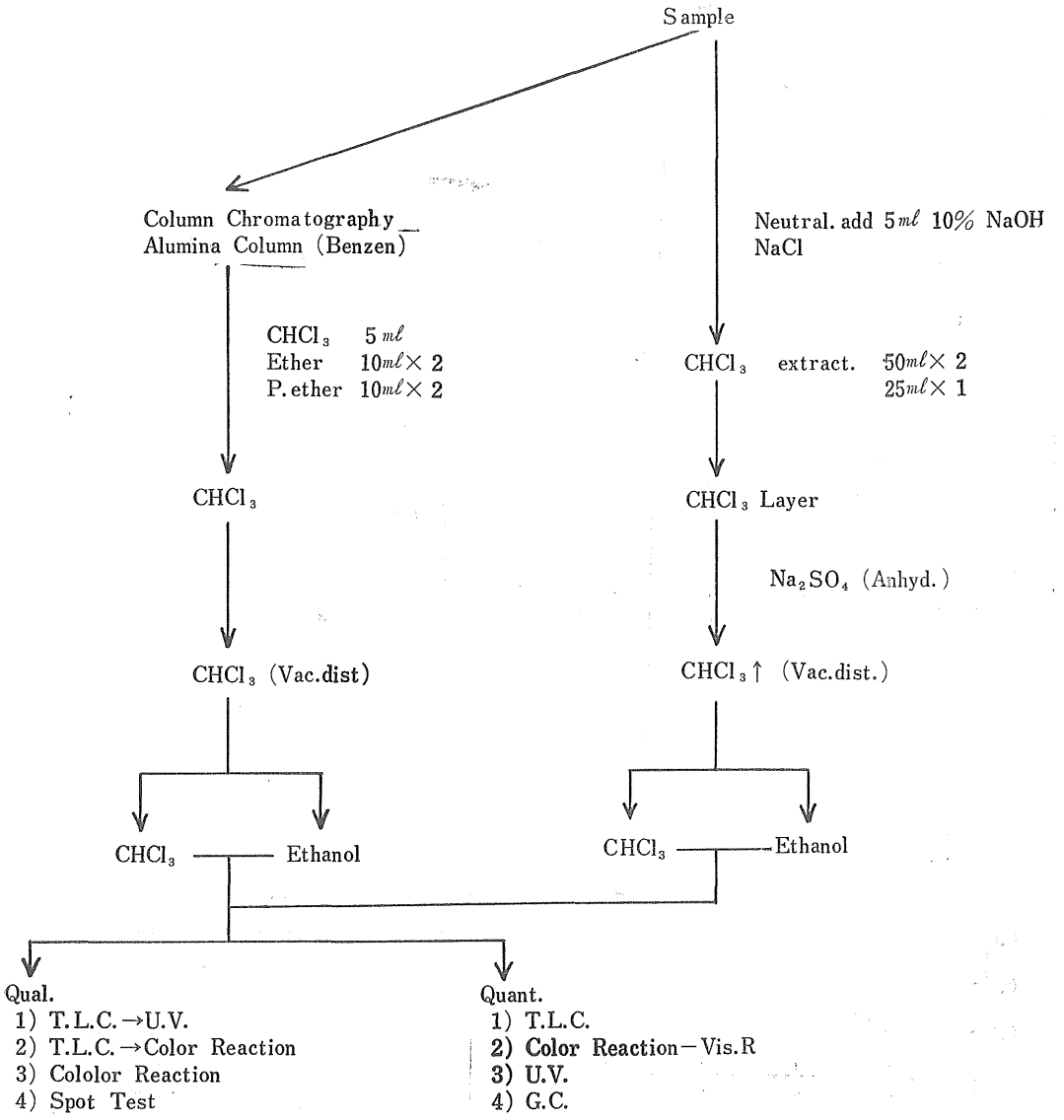


Fig. 6 Analytical system of Caffeine from Softdrinks

Table 1 Caffine Content in Soft Drinks on the market

Sample		Coffine (ppm)	T. L. C.	Reference	
				Preservatives	Vessel
Drink Type	A		(−)	(−)	Bottle
〃	B		(−)	BA BHA	〃
〃	C	460	(+)	BA	〃
〃	D	420	(+)	BA	〃
〃	E	20	(±)	BA	〃
〃	F	180	(+)	BA	〃
〃	G	160	(+)	BA	〃
〃	H		(−)	BA	〃
〃	I		(−)	BA DHA	〃
Drink Type (CO_2)	J	10	(±)	(−)	〃
〃	K		(−)	(−)	〃
〃	L	150	(+)	(−)	〃
〃	M	40	(+)	(−)	〃
Cola Type	A	70	(+)	(−)	〃
〃	B	100	(+)	(−)	〃
〃	C	50	(+)	(−)	〃
〃	D	130	(+)	(−)	〃
〃	E	20	(±)	(−)	Can
〃	F	110	(+)	(−)	〃
Coffee Type	A	650	(+)	(−)	〃
〃	B	600	(+)	(−)	〃
〃	C	470	(+)	(−)	〃
〃	D	50	(+)	(−)	Tetrapack
〃	E	180	(+)	(−)	Can
〃	F	550	(+)	(−)	〃
〃	G	10	(±)	(−)	〃
〃	H	20	(±)	(−)	〃
〃	I	220	(+)	(−)	〃

結果および考察

試験溶液調製の抽出操作においてはリン酸・クロロホルム抽出で実施すると，エマルジョン状態が長く続き水層と溶媒層の分離が困難なときや，保存料等夾雑物を含むときは，その妨害を避けるために，アルカリ性・クロロホルム抽出を行ない．あるいはエマルジョンを起こしやすい粘稠な試料に対しては，水で希釈してから抽出を行なった．このように注意して実施すれば，清涼飲料水の分析に良好な結果を得られる．

薄層クロマトグラフィーによるものは，展開溶媒として，氷酢酸・アセトン・メタノール・ベンゼン等を用いたものは，テーリング，Rf 等に難点があり，クロロホルム・アセトン・酢酸（45：10：1）等の系列の混液で展開を行なった．薄層クロマトグラフィーにより，展開したカフェインを，紫外部吸収法により定量するときは，薄層ベースによる270 μm 付近の吸収が多少認められるので，この分の Blanc を差引いて行なった．T.L.C. の紫外部吸収法によるカフェインの回収率は98％である．また，この方法によると迅速に操作できる利点がある．

呈色反応，ドラーゲンドルフ試液による呈色では，その確認下限は，カフェイン約0.5 μg であり，これをろ紙上で行なうときは，ドラーゲンドルフ噴霧用試液の方が顕著であり，T.L.C. の場合は，ドラーゲンドルフ試液の方が斑点は見やすい．呈色反応中ムレキシド反応を実施するときは，抽出液の蒸発留物中のカフ

ェインが10 mg 以上存在するとき可能であった.

可視部吸収法によるものは，試薬の調製，呈色条件，操作の面でやや複雑ではあるが，この方法はカフェインに対して特異性があり，発色は安定しているので，30分以内に測定することにした．なおこの方法は感度および再現性についても良好な結果を得た.

ガスクロマトグラフィー法ではUV法，可視部測定法，T.L.C. 法にくらべて感度はやや低いが G.C. 法の条件を変えて測定することによりカフェインの確認に適用できる．この方法は，多量のカフェインを含む試料に適当である.

カフェインの清涼飲料水への添加実験による回収率は酸性・クロロホルム抽出，アルカリ性・クロロホルム抽出，アルカリ性ジクロールメタン抽出では回収率99%であり，カラムクロマトグラフィーにより精製を行なったものは92%であった.

上記の各種の方法によって，カフェインの試験を行なったが，そのうち定量方法として試料の少ないときは薄層クロマトグラフィーにより，試験を行なった方がよいし，操作時間を短縮するには，紫外部吸収法が適している．またコーヒー飲料のように，多量にカフェインを含むものでは，G.C. 法が適当であり，試料中カフェイン含量が少なく，他の方法では検出が困難なものについては，高い感度をもつ可視部吸収法が最適である．これらの理由でそれぞれの目的にあった方法を選ぶことが必要である．市販清涼飲料水の調査については，天然成分ないしは特に添加されたカフェインについて，一般にはほとんど注目されていないが，それらのうちにはかなり含量の多いものも見うけられた.

文　献

1) Nomura, T. : *New Food Industry* 13, 12, 9—14 (1971)
2) Nomura, T. : *New Food Industry* 14, 1, 49—53 (1972)
3) Nomura, T. : *New Food Industry* 14, 2, 49—53 (1972)
4) Nomura, T. : *New Food Industry* 14, 5, 49—53 (1972)
5) 刈米達夫：最新植物化学，(1968)広川書店，東京
6) 高木敬次郎，小沢　光：薬物学76—78 (1963) 南山堂，東京
7) 日本公定書協会編：第8改正日本薬局方，第1部—第2部 (1971) 広川書店，東京
8) *AOAC Methods of Analysis* 11 th Ed.(1970) Assoc. offic. Anal. Chemists, Washington, D.C.
9) Lehmann, G., Neuman, B., Lebensmittel, L. : *Untersuch, u. Forsch*, 153, 363 (1973)
10) Fishbin, L. : *Chromatography of Enrironmetal Hazards*, 1, 382—387, (1972) Eisevier Publishing Co., Amsterdam／London／New York.
11) 山口一孝：植物成分分析法，上巻，(1959) 南江堂，東京

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 271 — 277, 1974

食品添加物中の多核芳香族炭化水素（3, 4-ベンズピレン）について（1）クエン酸

遠藤英美* 広門雅子* 半田八十三* 石井和恵*
宇佐美博幸* 藤居瑛*

Survey of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (3, 4-Benzpyrene) in Food Additives (1) Citric Acid

FUSAYOSHI ENDO*, MASAKO HIROKADO*, YASOMI HANDA*, KAZUE ISHII*, HIROYUKI USAMI* AND TERU FUJII*

Recently increasing number and amount of food additives (e. g. citric acid)derive from petroleum product, because of economic reasons.

Seven brands of citric acid were analysed in search of possible contamination by 3, 4-benzpyrene, a potent carcinogenic substance.

3, 4-benzpyrene was not demonstrable in all specimenes at the concentration of 0.10 ppb, our minimal detection level. Recoveries of 3, 4-benzpyrene added to 100 g of citric acid at levels of 0.5 ppb ranged from 93.46 to 96.08%

Several analytical methods were compared in terms of their sensitivity and quantitativity.

緒　言

従来，食品添加物であるクエン酸の製造は，果汁を原料とする方法と，発酵法による方法とが行なわれているが，近年発酵法の一つとして，流動パラフィンを原料とする製法が開発されたので，これに由来する多核芳香族炭化水素の混入が問題となってきた．食品添加物公定書中の「クエン酸」の純度試験にも「多核芳香族炭化水素」の項が追加され，3,4-ベンズピレンを指標として，限度 0.07 ppm 以下と定められている．われわれは，磐田化学工業など，7社のクエン酸の製品中の3,4-ベンズピレンおよびその他の多核芳香族炭化水素の有無を検討した．これらの検討に際し，定性的手段として，けい光励起スペクトル法，マススペクトル法，吸収スペクトル法および薄層スペクトル法を，定量的手段としてけい光スペクトル法を用いた．

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験の部

試　薬

(1) *n*-ヘキサン：けい光スペクトル用を20% 硫酸，20%水酸化ナトリウム液および水を用いて順次洗浄し，硫酸ナトリウム（無水）を加えて脱水した後蒸留した．

(2) 硫酸ナトリウム（無水）：特級品を *n*-ヘキサンで洗浄した．

(3) 3,4-ベンズピレン標準液：3,4-ベンズピレン（東京化成試薬）をベンゼン，メタノールを用いて再結晶し，この結晶 0.010 g を正確に秤り，*n*-ヘキサンに溶かし，100 m*l* とした．標準液 1 m*l*=100 μg 3,4-ベンズピレンを含む．

(4) クリセン：和光特級

(5) 1,12-ベンゾペリレン：和光特級

(6) ベンズアントロン：和光特級

(7) ナフタセン：和光特級

(8) 1,2,5,6-ジベンズアントラセン：和光特級

(9) 20-メチルコランスレン：ドータイト試薬

(10) アントラセン：試薬一級

(11) *o*-ジクロロベンゼン：特級

(12) バターイエロー液：バターイエロー(試薬・特級) 0.5 g を秤り，*n*-ヘキサンに溶かし，10 m*l* とした．

装　置

(1) けい光分光光度計：日立MPF—4型

(2) 二波長分光光度計：日立365型

(3) GC—MS 分析器：島津—LKB 900

(4) 紫外線鑑識器：ミツミ科学SJ型

(5) クデルナダニッシュ濃縮装置

分析用試料

市販品のクエン酸：①玉井化学製，②小松屋化学製③井口食品製，④三栄化学製，⑤磐田化学製，⑥田辺製薬製，⑦九州化工製．

実験操作

試験溶液および対照液の調製

試料 100 g に水120 m*l* を加え，約50°に加温して溶かす．冷後，*n*-ヘキサン80 m*l* ずつでくり返し3回抽出を行ない，n-ヘキサン層を水 30 m*l* で2回洗浄した後，硫酸ナトリウム 10 g を入れて30分間放置する．脱水後，*n*-ヘキサンでよく洗ったろ紙を用いてろ過し，そのろ液をクデルナダニッシュ装置で濃縮し，全量 5 m*l* としこれを試験溶液とする．対照液は水 120 m*l* につき，*n*-ヘキサン 80 m*l* ずつで繰り返し3回抽出を行ない，以下試料の場合と同様に処理した液を用いる．

定　性

(1) けい光，励起スペクトルによる測定[7]

試験溶液および対照液をそれぞれ 2.5 m*l* ずつとり，*n*-ヘキサンで全量 5 m*l* とした溶液について，けい光および励起両スペクトルをけい光分光光度計を用いて比測光法で測定した．ついで，3,4-ベンズピレンの標準溶液を *n*-ヘキサンで希釈し，0.01 μg/m*l* 3,4-ベンズピレン溶液をつくる．これについて，けい光，励起スペクトルを測定し，試験溶液のスペクトルと3,4-ベンズピレンのスペクトルを比較し，試験溶液中の3,4-ベンズピレンの有無を調べた．ついで他の7種の多核芳香族炭化水素のスペクトルも測定し比較した．

(2) 吸収スペクトルによる測定

試験溶液および対照液をそれぞれ 2.5 m*l* とり，*n*-ヘキサンで全量 5 m*l* とした溶液について吸収スペクトルを測定した．ついで3,4-ベンズピレンおよび他の7種の多核芳香族炭化水素の吸収スペクトルを測定し，比較した．

(3) マススペクトル測定

試験溶液を濃縮して 1 m*l* とし，マイクロシリンジで50 μ*l* をセルにとり，*n*-ヘキサンを完全に蒸発させた残留物について，直接導入法でマススペクトルを測定し，3,4-ベンズピレン 0.1 μg のマススペクトルと比較した．また3,4-ベンズピレンの分子量 252 のマスフラグメントグラムも測定した．

(4) 薄層クロマトグラフィ法[1]

薄層は Kieselgel 60 F_{252}（メルク製）を用い，約110°，30分間加熱して使用した．薄層板に試験溶液および対照液を 1 m*l* に濃縮した溶液50 μ*l* と，10 μg/m*l* 3,4-ベンズピレンヘキサン溶液 1 μ*l*，2 μ*l*，4 μ*l*，6 μ*l*，10 μ*l* および展開の指標として，バターイエロー（0.5%ヘキサン溶液）をスポットしたのち，*n*-ヘキサン・*o*-ジクロルベンゼン・ピリジン(10 : 1 : 0.5)を用いて展開した．溶媒の先端が原点から約 10 cm 上昇したら展開をやめ軽く乾燥した後，紫外線(365 mμ)によるけい光によって同定を行なった．

定　量

試験溶液および対照液をそれぞれ2.5 m*l* とり，3,4-ベンズピレン 0.025 μg を加え，*n*-ヘキサンで全量 5 m*l* とする．これらの溶液について，励起波長 366 nm における 425，430，435 nm，および励起波長383 nm における，400，405，410 nm のそれぞれ3点のけい光強度を測定し，ベースライン法[1]により，式 $\left[I=I_{430}-\frac{(I_{425}+I_{435})}{2}\right]$ $\left[I=I_{405}-\frac{(I_{400}+I_{410})}{2}\right]$ から I を求め，3,4-ベンズピレンの標準液から得た検量線より濃度を算出した．試験溶液および対照液の検量線より得た値をそれぞれ a, b とし，試料中の 3,4-ベンズピレン含量を $\frac{(a-b)\times 10}{100}$(ppb) から求めた．また回収実験は試料100 g に3,4-ベンズピレン 0.05 μg を添加し，以下試験溶液作製の場合と同様に抽出，濃縮した後，n-ヘキサンで全量 10 m*l* とし，励起波長 383 nm におけるけい光強度を測定し，その値を c とする．試験溶液 5 m*l* に，3,4-ベンズピレン0.05 μg を添加し全量10 m*l* とした溶液のけい光強度を測定し，d とした．回収率 $=\frac{c}{d}\times 100(\%)$

結　果

励起スペクトルによる定性結果

試験溶液，対照液および 1 ng/m*l* 3,4-ベンズピレン溶液の励起スペクトルは Fig. 1 のごとくであった．試験溶液および対照液とも，3,4-ベンズピレンの特異的な励起波長である366 nm，383 nm にピークがかすかにみとめられた．また他の7種の多核芳香族炭化水素の励起スペクトルは Fig. 2 のごとくであり，それらの特異的な励起帯は Table 1 のごとくであるが，

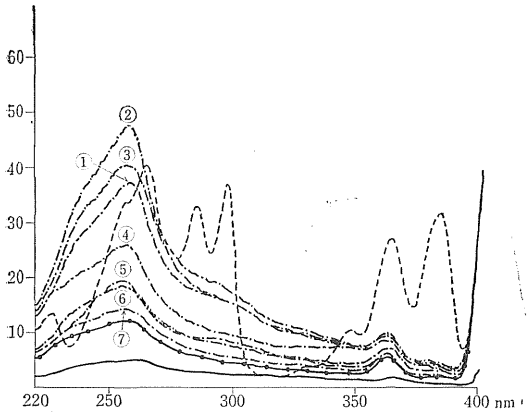


Fig. 1 Excitation spectra of samples, blank and 3,4−benzpyrene
—·— sample solution
—●— blank
——— n-hexane
– – – 3,4-benzpyrene (1ng/ml)
at emission 0, D.V.x5 F9, sensitivity x10 F6, ex.slit 5 and em.slit 12

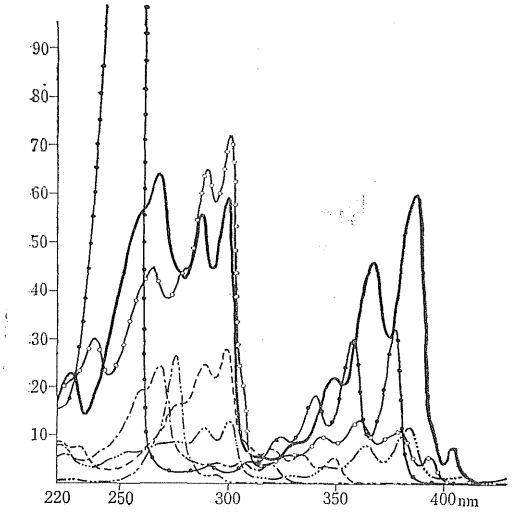


Fig. 2 Excitation spectra of polynuclear aromatic hydrocarbons (1μg/ml)
——— 3,4-benzpyrene
—●— anthracene
—·— chrysene
—··— naphthacene
– – – 1,2,5,6-dibenzanthracene
—·— 20-methylcholanthrene
—··— 1,12-benzoperyrene
——— benzanthron
at D.V.x5 F1, sensitivity x0.1 F3, ex. slit 5 and em.slit 10

いずれのスペクトルとも一致しなかった．なお3,4-ベンズピレンの検出限界は 0.5 ppb であった．

けい光スペクトルによる定性結果

試験溶液，対照液および3,4-ベンズピレンの励起波長366 nm におけるけい光スペクトルは Fig. 3, 383 nm におけるスペクトルは Fig. 4 のごとくである．

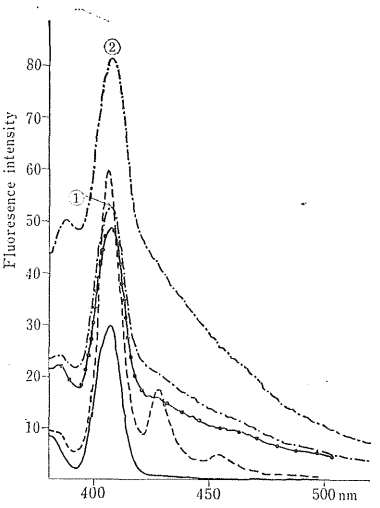


Fig. 3 Fluorescenece spectra of samples, blank and 3,4-benzpyrene at exciting wavelength 366nm
—·— sample solution
—●— blank
– – – 3,4-benzpyrene (1ng/ml)
——— Raman emission of n-hexane
at D.V.x2 F6, sensitivity x10 F6, ex.slit 12 and em.slit 5

Fig. 3 からはすべての試験溶液および対照液とも，3,4-ベンズピレンと同じ，428 nm にかすかにピークが見られた．また Fig. 4 においても，試験溶液および対照液とも，403 nm にかすかなピークが見られた．また Fig. 3 および Fig. 4 に示す通り，366 nm で励起した際は405 nm 付近に，383 nm で励起した際は428 nm に溶媒自体のラマン散乱光によるピークがある．8種の多核芳香炭化水素のけい光スペクトルを Fig. 5 に，特異的なけい光ピークを Table 1 に示した．なお，3,4-ベンズピレンの検出限界は 0.1 ppb であった．

吸収スペクトルによる定性結果

試験溶液，対照液および3,4-ベンズピレンの吸収スペクトルは Fig. 6 のごとくである．また，8種の多核芳香族炭化水素の特異的な吸収帯を Table 2 に示し，試験溶液の特異的な励起帯，けい光帯および吸収帯をまとめて Table 3 にかかげた．

試験溶液①，④，⑤，⑦の場合，273 および 291 nm にナフタレンに類似のピークが見られたが，3,4-ベンズピレンの吸収ピークである 254, 265, 295 nm にはすべての試験溶液ともピークが見られなかった．なお吸収スペクトルの検出限界は 5 ppb であった．

また Table 1 と Table 2 を比較してみると，多核芳香族炭化水素の励起スペクトルと吸収スペクトルは

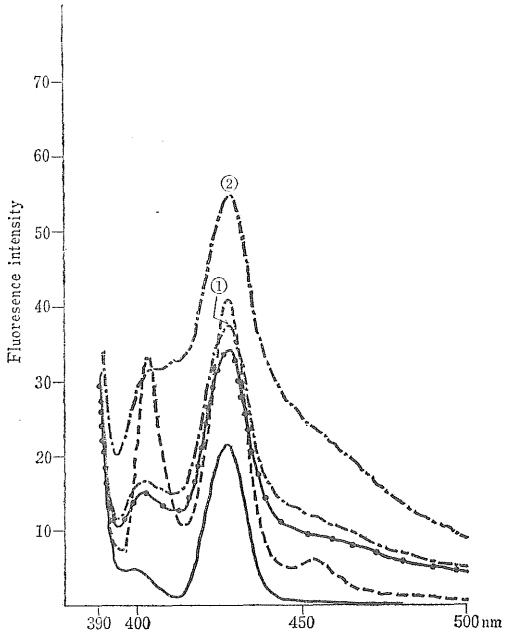


Fig. 4 Fluorescence spectra of samples, blank and 3,4-benzpyrene at exiting wavelength 383nm.
—·—·— sample solution
—●— blank
— — — 3,4-benzpyrene (1ng/ml)
——— Raman emission of n-hexane
at D.V.x2 F6, sensitivity x10 F6, ex.slit 12 and em.slit 5

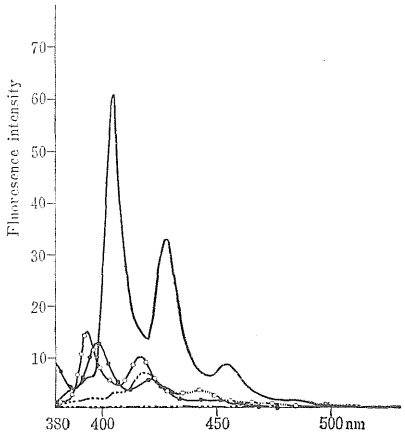


Fig. 5 Fluorescenece spectra of polynuclear aromatic hydrocarbons (1μg/ml):
——— 3,4-benzpyrene
—·—·— anthracene
——— chrysene
—·—·— naphthacene
— — — 1,2,5,6-dibenzanthracene
—o— 20-methylcholanthrene
—··— 1,12-benzoperyrene
at D.V. x3 F1, sensitivity x0.1 F3, ex.slit 10 and em.slit 5

Table. 1 Fluorescence and excitation spectral maxima of polynucler aromatic hydrocarbons

Hydrocarbons	Spectral maxima (nm)									
	Excitation						Fluorescence			
3, 4—benzpyrene	270	290	298	350	366	385	405	428	457	
Benzanthrone										
1, 2, 5, 6—dibenzanthracene	299	300	320	344	348		395	417	442	
Anthracene	252	339	356	375			399	421		
1, 12—benzoperyrene	288	300	345	363	383		419	441		
20—methylcholanthrene	284	298	343	360	379	393	393	417	443	
Naphthacene	274						471			
Chrysene	268	295	308	320			362	382	402	426

かなりよい一致を示すことを認めた.

マススペクトルによる定性結果

試験溶液および 0.1 μg 3,4-ベンズピレンのマススペクトルは Fig. 7,8 のごとくであった. いづれの試験溶液とも3,4-ベンズピレンに特異的な分子量 252 のピークは見られなかった. また質量 252 における試験溶液のマスフラグメントグラフィは Fig. 9 のごとくである.

薄層クロマトグラフィによる定性結果

試験溶液の両スポットとも, けい光は確認されなかった. なお3,4-ベンズピレンならびに類縁の多核芳香族炭化水素を展開させた際の Rb ならびに各々のけい

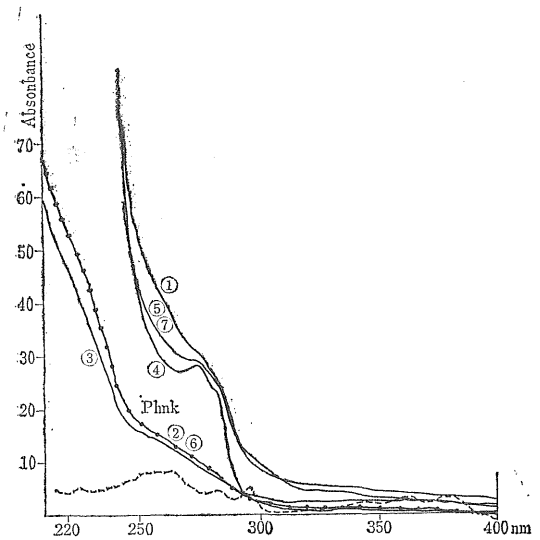


Fig. 6 Absorption spectra of samples, blank and 3,4-benzpyrene
——sample solution
—•—blank
– – –3,4-benzpyrene (0.05μg/ml)

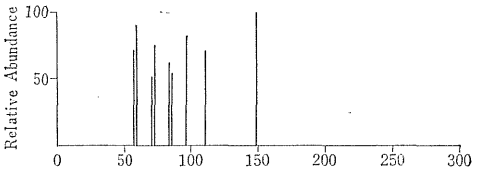


Fig. 7 Mass spectrum of sample

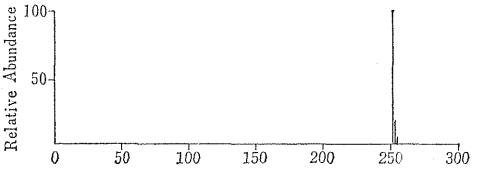


Fig. 8 Mass spectrum of 3, 4-benzpyrene

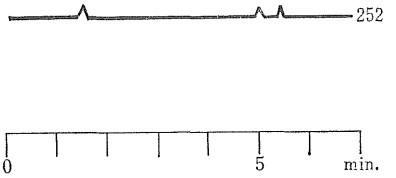


Fig. 9 Massfragmentgram of sample

Table 2 Ultraviolet absorption spectral maxima of polynuclear aromatic hydrocarbons

hydrocarbons	absorption spectral maxima (nm)								
3, 4—benzpyrene	254	265	295	345	365	383	403		
Benzanthrone	249	263	269	280	298	366	393		
1, 2, 5, 6, —dibenzanthracene	285	296	319	332	347	363	372	382	393
Anthracene	250	340	357	376					
1, 12—benzoperyrene	287	298	344	362	383				
20—methylcholanthrene	284	296	303	325	340	358	392		
Naphtacene	272	293							
Chrysene	257	267	292	304	318				

Table 3 Ultraviolet absorption, fluorescence and exciting spectra of samples, blank and 3, 4-benzpyrene

	Spectral maxima (nm)													
	Ultraviolet absorption			Excitation				Fluorescence						
								at 366 nm			at 383 nm			
Sample 1	273	291		258	295	363	383	403	428	455	385	405	428	
〃 2	273	291		256	292	363	383	403	428	460	385	405		
〃 3	250	256		255	365	383		403	428		385	405		
〃 4	273	291		257	363	383		403	428		385	405		
〃 5	273	291		256	295	365		403	428		385	405		
〃 6	250	256		255	363	383		403	428		385	405		
〃 7	250	256		255	363			403	428		385	405		
Blank	250	256		255	363			403	428		385	405	428	
3, 4-benzpyrene	254 365	265 383	295 403	298	350	366	385	403	428	457	405	428	457	

光色を Table 4 に示した．また 3,4-ベンズピレンの検出限界は 4 ppb であった．

定量の結果

けい光スペクトルによる定性結果より溶媒のラマン散乱光をさけるため，励起波長366 nm のときは，425 430，435 nm のけい光強度を測定し，383 nm のときは，400，405，410 nm のけい光強度を測定して検量線を作成するのがよいことがわかり，両者を各々の条件で測定し，検量線を作成した結果，Fig. 10 のごとくなった．図からもわかるように，励起波長 366 nm における検量線の式は $Y=0.0102X+0.0035$ ($r=0.9999$) 励起波長383 nm における場合は，$Y=0.0256X+0.00082$ ($r=0.9999$) となり，両者を比較すると 383 nm の場合の方が，感度が高い上に，原点を通り，しかも直線性を示すことがわかった．

試料中の3,4-ベンズピレンの含量を 383 nm の検量線より算出した値は Table 5 のごとくであった．Table 5 からもわかるとおり，試料中の3,4-ベンズピレンの含量はすべて 0.10 ppb 以下であった．

なお3,4-ベンズピレン 0.05 μg のクエン酸中からの回収率は93.46～96,08%であった．

考　察

いづれのクエン酸中からも，吸収スペクトル（検出限界 5 ppb），マススペクトル（検出限界10 ppb）および薄層クロマト（検出限界 4 ppb）法では，3,4-ベンズピレンは検出されなかったが，感度の高い励起スペクトル（検出限界 0.5 ppb）およびけい光スペクトル（検出限界0.1 ppb）法でかすかに，3,4-ベンズピレンのピークらしきものが検出されたが，対照液にも検出されたので，これは *n*-ヘキサンの不純物によるものと思われる．しかし対照液のピークよりも高いものがあったので定量してみた結果，最高のものでも 0.087 ppb であった．これらの製品のうち，5社がクエン酸カルシウムを原料として製造し，2社が殿粉粕および米糠を原料とした発酵法で行なっているということであったが両者の間には有意の差はなかった．この結果からみるとやはり原料に流動パラフィンは使用していないと考えられる．

けい光測定の際，高感度ではラマン散乱光による影響が現われるが，微量のけい光を測定するには，*n*-ヘキサン自体の影響をさけるため，励起波長 366 nm では 428 nm のピークで比較し，励起波長383 nm ではけい光403 nm のピークで比較すべきであることを認めた．また定量は 383 nm における，400，405，410 nm のけい光強度を測定するのが適当であることを認めた．食品中[1-3,9-10]，くん液中[5,6,8] およびワックス類中[4] からの3,4-ベンズピレンの試験では，他の化合物の影響をうけるので，カラムを通してクリーンアップしているが，クエン酸中からの場合は，その必要がなかった．

Table 4 Rb values of the polynuclear hydrocarbons by the thin layer chromatography[1)]

Hydrocarbons	Rb	Fluorescence colour
Pyrene	1.70	yellow green
1, 2-benzanthracene	1.56	purple
Fluoranthene	1.66	light blue
Naphthacene	1.50	yellow green
1, 12-benzoperyrene	1.22	purple
3, 4-benzpyrene	1.37	purple
Anthracene	1.85	purple
Chrysene	1.46	pink
1, 2, 5, 6-dibenzanthracene	1.19	purple
3-methylcholanthrene	1.48	purple

Rb : Movement of hydrocarbons relative to that of butter yellow

終りに本調査の試料採取にご便宜を計っていただいた，都衛生局食品監視課各位に，深く感謝いたします．

文　献

1) 白石慶子，白鳥つや子：食衛誌，13，41～46 (1972)
2) 白石慶子，白鳥つや子：*ibid.*，14，173～178 (1973)
3) 白石慶子，白鳥つや子：*ibid.*，15，17～21 (1974)
4) 白石慶子，高畠英伍：日本食品衛生学会講演要旨，26，33 (1972)
5) 白石慶子：衛生化学，12，183～186 (1966)

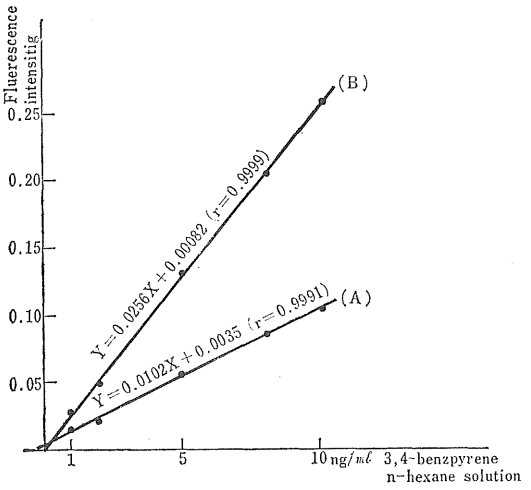


Fig. 10 Calibration curves of 3, 4-benzpyrene for baseline-technique

(A) Obtained from the wave-length of 425, 430, 435 nm at excitation 366 nm
D.V.X 3 F 6, sensitivity x 3 F 6, ex. slit 10, em. slit10 and filter 350

(B) Obtained from the wave-length of 400, 405, 410 nm at excitation 383 nm
D. V. x 3 F 6, sensitivity x 3 F 8, ex. slit 10, em. slit 10 and fliter 390

Table 5 The amounts of 3, 4-benzpyrene in citric acid

Sample. No.	Makers	3.4-benzpyrene determined ppb
1	T. K. Co.	0.004 0.087 0.005
2	K. K. Co.	0.000 0.012 0.000
3	I. S. Co.	0.036 0.017 0.010
4	S. K. Co.	0.009 0.037 0.025
5	I. K. Co.	0.000 0.000 0.005
6	T. S. Co.	0.009 0.031 0.010
7	K. K. Co.	0.021 0.008 0.010

6) 城代 進：工業化学, 73, 2718～2720 (1970)
7) 松下秀鶴, 江角凱夫：*Japan Analyst*, 19, 951～966 (1970)
8) Richard, H. W., John, W. H. : *J. Agr. Food. Chem.*, 19, 143～146 (1971)
9) Malanoski, A. J., Greenfield, E. L. : *J. A, O. A. C.*, 51, 114～129 (1968)
10) John, W. H. : Robert, T. T. : *J. A. O. A. C.*. 49, 595～617 (1966)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 279 — 282, 1974

飲食器，野菜，果実用洗浄剤中の金属類について

安野哲子* 小野綾子* 荻野周三*
大畠敏子* 藤居瑛*

Studies on Metals in Cleansing Agent for Tablewares, Vegetables and Fruits

TETSUKO YASUNO*, AYAKO ONO*, SHUZO OGINO*, TOSHIKO OHATA* AND TERU FUJII*

1. 緒　言

昭和48年4月，食品衛生法の一部改正により新たに飲食器，野菜，果実用洗浄剤の規格基準が定められた．

そこで著者らは，食品衛生課および食品監視課により収去された飲食器，野菜，果実用洗浄剤61件（液体58件，粉末3件）について規格試験を行なうとともに，日本工業規格で定められている「台所用合成洗剤」（JIS K 3370—1973）の試験をもあわせて行なった．

まず，ヒ素および重金属について得られた結果をここに報告する．

2. 実験の部

2.1 ヒ　素

ヒ素の食品衛生法による「洗浄剤」の規格試験の方法は，試料を湿式灰化したのち，添加物一般試験法の19ヒ素試験法に従って行なうように規定されている．

一方，JIS 規格では，ヒ素を水酸化第二鉄の沈殿に吸着させて濃縮し，ヒ化水素として発生させ，ジエチルジチオカルバミン酸銀（以下 SDDC と略す）のピリジン溶液に吸収させ，その吸光度を測定してヒ素を定量している．ところが，水酸化第二鉄の沈殿は，洗浄剤成分のリン酸塩その他によって，その生成を妨害されることがある．また，ピリジンを吸収液として用いることは，その強い不快臭のためルーチン分析法として難点がある．そこで著者らは山本らの報告[1]を参考にして，改良法によることにした．

なお，食品衛生法の規格においてはヒ素の限度は，脂肪酸系洗浄剤にあっては試料を水で30倍に希釈した試料溶液，また非脂肪酸系洗浄剤にあっては水で150倍に希釈した試料溶液について，As として0.05 ppm 以下となっており，JIS 規格では標準使用濃度において，As として 0.05 ppm 以下となっている．

以下，JIS 改良法について記す．

2.1.1 JIS 改良法

試　薬

ヒ素標準溶液（1 μgAs/m*l*）：三酸化ヒ素〔(As_2O_3, MERCK 社製）硫酸デシケーター中に一夜放置し乾燥したもの〕0.133 g に水10 m*l* および水酸化ナトリウム溶液（4 w/v%）2 m*l* を加え，少し加温して溶かし，冷却後フェノールフタレイン指示薬1～2滴を加え，硫酸（1+5）を滴加して紅色が消えるまで中和する．これをメスフラスコに移し入れ，水を加えて1,000 m*l* とし原液とする．原液 10 m*l* をとり，水を加えて1,000 m*l* とする．この液は用時作製する．

塩化第一スズ溶液（40 w/v %）：塩化第一スズ（$SnCl_2 \cdot 2H_2O$）40 g を塩酸50 m*l* に溶かし，水で100 m*l* とする．これに金属スズの小粒を加えて保存する．

ヨウ化カリウム溶液（15 w/v%）：ヨウ化カリウム 15 g を水に溶かし 100 m*l* とする．

酢酸鉛溶液（10 w/v%）：酢酸鉛〔$Pb(CH_3COO)_2 \cdot$

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

$3H_2O$〕11.8 g を酢酸 1～2 滴を加えた水に溶かし，水を加えて 100 ml とする．

砂状亜鉛（1,000～1,410 μ，無ヒ素）

SDDC・ブルシン—クロロホルム溶液：砕粉した SDDC（ドータイト・アルセメート）250 mg とブルシン（$C_{23}H_{26}N_2O_4 \cdot 2H_2O$）100 mg をクロロホルム 100 m$l$ 中に入れて溶かし，暗所に保存する．

試薬は特に指定のないものは，すべて小宗製の特級品を使用した．

装　置

ヒ素捕集装置：Fig. 1 に示す装置を使用した．

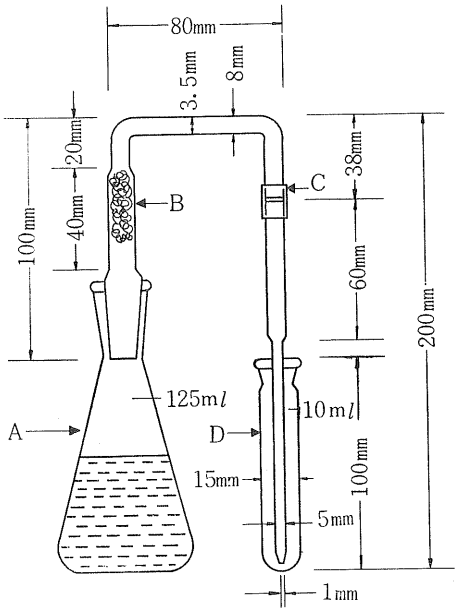


Fig. 1　ヒ素捕集装置
A：ヒ化水素発生びん
B：酢酸鉛溶液（10 w/v%）で湿した脱脂綿をつめる
C：シリコンチューブ
D：ヒ化水素吸収管

356形—日立 2 波長自記分光光度計

操　作

試料約 1 g を精秤し，「洗浄剤」の規格試験に従って湿式灰化したのち，ヒ化水素発生びんに洗い入れ，フェノールフタレイン試液を指示薬としてアンモニア水で中和したのち，水を加えて約 80 ml とする．これに塩酸（1+1）10 ml，ヨウ化カリウム溶液 5 ml および塩化第一スズ溶液 3 ml を加えて振り混ぜる．約 15分間室温に放置したのち，オブラートにつつんだ砂状亜鉛 5 g を加えてヒ化水素を発生させ，SDDC・ブルシン—クロロホルム溶液 5 ml に約 1 時間吸収させる．ついで，一部揮散して容積が減少した吸収液にクロロホルムを添加して正確に 5 ml とする．この溶液について試薬ブランクを対照液として 510 nm における吸光度を測定する．別にヒ素標準溶液 0～7 ml をヒ化水素発生びんに段階的にとり，水を加えて約 80 ml とし，以下同様に操作して検量線を作成する．

2.1.2　試験結果

検体61件について試験した結果，すべて限度（0.05 ppm）以下であり，なお JIS 改良法によって定量した結果は 0.02 ppm 以下であった．

2.1.3　湿式灰化および洗浄剤成分が測定値におよぼす影響

試料として液体の洗浄剤 3 種を用意した．各試料の無機成分を Table 1 に示す．

Table 1　各試料の無機成分（%）
——JIS K 3362-1970「合成洗剤試験方法」による——

試料	全りん酸塩	けい酸塩	硫酸塩	塩化物	炭酸塩
A	1.0	—	—	15.0	—
B	0.3	—	0.1	2.5	—
C	0.3	—	1.3	0.6	—

操　作

(1)　試料A，Bにあっては 0.5000 g，C は 0.1000 g（以下(2)，(3)においても同様）をはかりとり，これを湿式灰化したのち，ヒ素標準溶液をそれぞれのサンプルに対して，3 ml，5 ml，7 ml ずつ加える．

(2)　各試料それぞれに，ヒ素標準溶液 3 ml，5 ml，7 ml ずつを加えてから湿式灰化する．

(3)　各試料を湿式灰化する．

Table 2　各試料におけるヒ素の回収率

試料	ヒ素添加量（μg）	(1)湿式灰化後ヒ素を添加		(2)ヒ素添加後湿式灰化	
		吸光度	回収率（%）	吸光度	回収率（%）
A	3	0.344	103	0.215	63
	5	0.580	104	0.388	69
	7	0.783	101	0.560	71
B	3	0.346	98	0.201	56
	5	0.566	97	0.350	60
	7	0.812	99	0.500	61
C	3	0.357	100	0.316	88
	5	0.581	98	0.549	93
	7	0.834	101	0.755	91

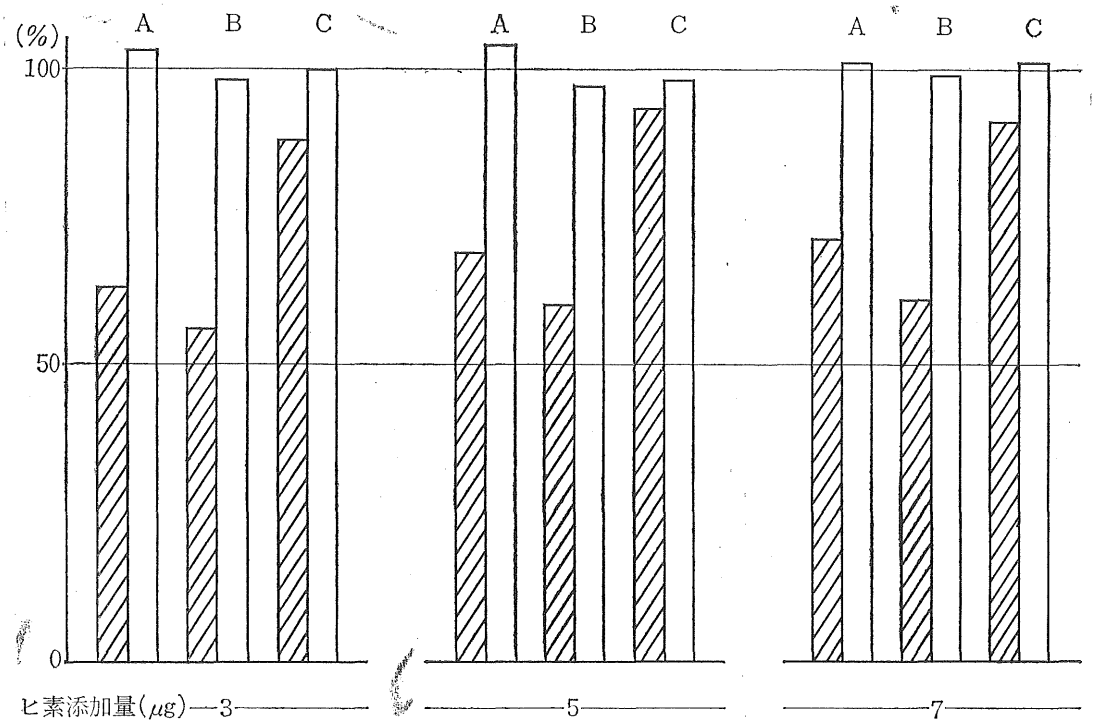


Fig. 2 ヒ 素 回 収 率
▨ ヒ素添加後，湿式灰化したもの
□ 湿式灰化後，ヒ素を添加したもの

以上の各試料についてJIS改良法により測定する．

結果を Table 2, Fig. 2 に示す．

2.2 重 金 属

重金属の食品衛生法による規格試験は，試料を湿式灰化したのち硫化ナトリウム法によるように規定されている．

一方 JIS 規格では，銅，亜鉛，鉛，マンガン，鉄，クロムの各金属個々について原子吸光法で，またスズについては比色法で定量している．

なお，重金属の限度は，食品衛生法の規格においては，水で希釈した試料溶液（脂肪酸系洗浄剤にあっては30倍に希釈し，非脂肪酸系洗浄剤では150倍に希釈する．)について 1 ppm 以下となっており，JIS 規格では標準使用濃度において，銅 1.0 ppm，亜鉛 1.0 ppm，鉛0.1 ppm，マンガン0.3 ppm，鉄0.3 ppm，クロム0.05 ppm，スズ1.0 ppm 以下となっている．

2.2.1 試　　薬

銅，亜鉛，鉛，マンガン，鉄，クロムの各標準液については，和光製の原子吸光分析用標準液を適宜希釈して使用した．それ以外はすべて小宗製の特級品を用いた．

2.2.2 装　　置

PERKIN-ELMER 403形原子吸光分析装置

356形—日立2波長自記分光光度計

2.2.3 試験結果

結果は Table 3 に示すとおり，いずれも限度以下であった．

3. 考察および結語

以上，「洗浄剤」の規格基準が決められたことにより，市販洗浄剤の実態の把握と試験法の検討を目的とした調査のうちで，まず金属類について一応の結果が得られた．これによると，今回試験を行なった検体はすべて，ヒ素，重金属ともに限度以下という結果であったが，食品衛生法の規格試験では限度試験であいま

Table 3 重金属の定量 (150倍希釈，単位 ppm)

検体番号	硫化ナトリウム法	吸光度法						
		Cu	Zn	Pb	Sn	Mn	Fe	Cr^{+6}
1	1以下	0.01以下	0.1以下	0.03以下	0.04以下	0.06以下	0.60	0.02以下
2	〃	〃	〃	〃	〃	〃	0.16	〃
3	〃	〃	〃	〃	〃	〃	0.30	〃
4	〃	〃	〃	〃	〃	〃	0.53	〃
5〜31	〃	〃	〃	〃	〃	〃	0.1以下	〃
32〜61	〃	—	—	—	—	—	—	—

いであり，定量法を定める方が良いと考えられる．その方法として原子吸光法を検討したい．また，試料の前処理（湿式灰化）の段階で，金属類の揮散，損失の問題があるが，これに関して，洗浄剤の各成分が与える影響について，そしてまた湿式灰化にかわる前処理方法などの点についてもあわせて今後検討したい．

謝　辞

本実験にご協力をいただいた，都衛生局食品衛生課および食品監視課の各位に謝意を表します．

文　献

1) 山本勇麓，熊丸尚宏，林康久，菅家惇，松井彰子：*Japan Analyst*, 21, 379—387 (1972)

2) 藤永太一郎，川嶋宗継：化学，25，271—275 (1970)

3) 金田吉男，河内敬朝：*ibid.*, 11, 105—107 (1965)

4) 栗山加代，志村博，寺島敏雄：*ibid.*, 16, 58—62 (1970)

5) 厚生省環境衛生局食品化学課：食品衛生研究，23，699—722 (1973)

6) 化学市場研究所：合成洗剤の無機系配合剤 (1970)，㈱化学市場研究所

7) 食品添加物公定書注解編集委員会：食品添加物公定書注解，第3版(1974)，金原出版

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 283 — 291, 1974

食器洗浄に使用される洗剤残留の実態

渡辺悠二* 佐藤憲一* 諏訪世津子* 吉田令子*
小野綾子* 藤居瑛*

Residual Level of Synthetic Detergent Found of Washed Tablewares

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, SETSUKO SUWA*, REIKO YOSHIDA*
AYAKO ONO* AND TERU FUJII*

Detection of anion surface active detergent which have been used for the washing of tablewares was made by the use of Abbott's method. When an experiment was made on several sort of tablewares, after their immerse in the detergent solution followed by the rinsing according to the recommendation issued by the Ministry of Health and Welfare of Japan. It was found that the residual level found on the specimen was always less than 30 $\mu g/100\,cm^2$. Concentration of the detergent used for the cleaning of tablewares in restaurants, hospitals and schools was fouud to be less than 0.1%. However, greater than 30 $\mu g/100\,cm^2$ of the residual level was found on the 35% of tablewares tested with the maximum of 380 $\mu g/100\,cm^2$. Thus, it was concluded that when hand washing is applied, it is likely to require the very careful rinse of tablewares.

まえがき

鉱油系洗剤（ABS 系洗剤等）が台所用洗剤として食物や食器の洗浄に使用されてから，約20年を経ようとしているが，この間その人体に及ぼす影響並びに環境汚染の両面から，その使用についてはいろいろの論議がなされてきた．そして毒性についてはいまだ結論が出されていないのが現状である．

このような中で厚生省は昨年，洗浄剤の使用基準を告示[1]するとともにその安全性について改めて検討することを決めている．この使用基準は洗浄剤の使用濃度を0.1%以下（脂肪酸系を除く），野菜や果物の浸漬時間を5分以内とし，すすぎについては流水を用いる場合，野菜や果物では30秒以上，飲食器では 5 秒以上，ため水を用いる場合はため水をかえて2回以上すすがなければならないとしている．

一方，東京都では野菜や果物における農薬の残留，寄生虫の有無などについて調査し，かつ洗剤を使用した場合の野菜などへの残留量や洗浄効果などについて，総合的検討を加えた結果，昨年5月洗浄剤の使用について，次のような方針を決めている．これは，野菜や果物の洗浄には洗浄剤を用いる必要性が乏しく，今後は十分な水洗を行なうことによって，食品衛生上の効果があげられるというもので，学校給食や病院等でその指導を行なっている．

また一般家庭でも現在，野菜や果物の洗浄に洗剤は余り使用しない傾向と思われるので，食物の摂取によって体内に取り入れられる洗剤量は，以前よりも相当少なくなってきていると推定される．しかし，洗剤が脂肪性食物の除去に非常に有効であることから，飲食器の洗浄に使用することは従来通りであると思われるが，飲食器への洗剤の付着残留量については 2，3 の報告があるのみである．

筆者らはすでに東京都における洗剤に関する総合的

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table 1 Form of Specimen

	Color	Diameter	Hight	Surface area	Volume
Melamin plate	milk-white	22.5 cm	4.5 cm	475 cm^2	850 ml
Melamin bowl	milk-white	14.5	6.0	267	480
Polypropylene plate	yellow	20.5	3.0	368	500
Polypropylene bowl	yellow	12.5	6.0	241	400
Porcelain plate	white	23.0	5.0	489	850
Porcelain bowl	white	11.0	7.0	188	300

な調査研究の一環として，食器の残留洗剤量について実態調査を行なっているが，更に(1)食器の材質別，新旧による残留量，移行量等について(2)集団給食施設や飲食店等で使用している食器の残留洗剤量，洗浄液の使用濃度およびすすぎ液中の洗剤濃度等に関する調査について実験および調査を行ない，若干の知見を得たので報告する．

実験の部

A. 種々の要因における食器の残留洗剤量について

新たに購入した給食用食器（メラミン樹脂，ポリプロピレンおよび陶磁製）を用いて，洗浄液濃度，浸漬時間およびすすぎ条件を変えたいくつかの洗浄方法を行ない，食器の残留洗剤量を測定した．また熱湯への移行性についても検討した．食器の形状は Table 1 の通りである．

1. 試料 (1)新しい食器

(2)サンドペーパーでキズをつけた食器（使用によりキズのついた食器とみなす）．なお，1試料に食器3個を使用して実験を行なった．

2. 使用洗剤 市販の台所用液体洗剤（主成分：ソフト型アルキルベンゼンスルホン酸塩）．定量の結果陰イオン活性剤として25 w/v%含有する．

3. 洗浄 (1)洗浄液：2の液体洗剤8または80 ml を水で2l に希釈して，0.1 w/v%および1.0 w/v%液を調製．

(2) 浸漬時間：5分および1時間

(3) すすぎ条件：洗浄液から食器を引き上げ，以下次の条件によるすすぎを行なう．(イ)すすぎなし (ロ)ため水（6l）に2回通す方法（ただし，食器1個ごとに水を換える） (ハ)流水下で水をあて5秒間振り洗いする方法 (ニ)水をオーバーフローさせながらスポンジを用いて流水で30秒間軽く洗う方法．また(ロ)ため水に1回通す方法 (ヘ)温水（約40°）による流水下で5秒間洗う方法も行なう．なお，水の流速は100～120 ml/sec.，水温は18°前後であった．

4. 抽出および試験液の調製 各洗浄方法で洗った食器は温風乾燥機で乾燥した後，熱エタノールを満たし，60°恒温槽で30分間浸出する．浸出液を採取後，食器を熱エタノールでよく洗う．浸出液および洗液を合わせ，ロータリーエバポレーターを用いてエタノールを完全に留去する．残査に温水（60～70°）を加えてよく溶かした後，メスフラスコに移し水を加えて 100 ml とし，これを試験液とする．

5. 定量 陰イオン界面活性剤の定量法として精度のよい Abbott 法を用いた．

(1) 試薬 すべて特級品を用いる．

(イ) アルカリ性ホウ酸塩溶液：M/20 $Na_2B_4O_7$ 液と N/10 NaOH を等量混合する．

(ロ) 1 N H_2SO_4

(ハ) 中性メチレンブルー液：メチレンブルー0.25 g を水 1l に溶かす．

(ニ) クロロホルム：クロロホルムを1%メチレンブルー液で2回洗浄した後，CaO を加えて蒸留し無水 Na_2SO_4 で脱水する．

(2) 定量操作 250 ml の分液漏斗(a)には水50 ml，アルカリ性ホウ酸塩溶液 10 ml およびメチレンブルー液5 mlを入れ，分液漏斗(b)には水 100 ml，アルカリ性ホウ酸塩溶液10 ml およびメチレンブルー液5 ml を入れる．それぞれにクロロホルム 10 ml を加え30秒間激しく振りまぜた後，分液する．ついで2～3 ml のクロロホルムでゆるやかに振りまぜて水層を洗う．これらの操作をもう一度くり返して行なう．抽出後，分液漏斗(b)には1 N H_2SO_4 3 ml を加える．

分液漏斗(a)に10～100 μg の陰イオン活性剤を含むように試験液を加える（全量100 ml 以下）．これにクロロホルム15 ml を加え，1分間振盪後静置して完全に二層に分け，クロロホルム層を分液漏斗(b)に移す．分液漏斗(b)を同様に処理し，静置後クロロホルムで潤した脱脂綿をつめたロートを通してクロロホルム層を 50 ml のメスフラスコへ移す．クロロホルム15 ml を分液漏斗(a)に加え

て再び同様の抽出操作をくり返す．全クロロホルム層を集めクロロホルムで50 ml 定容にする．

分光光度計（365型日立自記分光光度計）にて1 cm セルを用い，波長650 nm における吸光度を測定する（対照：空試験液）．この吸光度よりあらかじめ作成してある検量線から濃度を換算する．

6. 回収率　試料(1)に洗浄液を陰イオン活性剤として100 μg を散布し，風乾後，上記4 および5 と同様の操作をして回収率を求めた．

回収率（2回平均）はメラミン樹脂製試料の場合98.9%，ポリプロピレン製試料の場合99.5%，陶磁製試料の場合99.3%であった．

7. 移行性について　6. と同様に調製した食器に熱湯を満たし，室温で1時間放置して浸出し，洗剤の移行量を調べた．

B. 実態調査について

学校，保育園，病院，給食センターおよび飲食店等で使用されている食器に付着している残留洗剤量および洗浄液（下洗い液，洗浄液およびすすぎ液）中の洗剤濃度について調査を行なった．なお，試料は衛生局環境衛生部食品衛生課から送付されたものである．

1. 試料　(1)食器具類（133検体）各施設で使用していた食器を各3個採取．検体の内訳は Table 2 の通りである．

Table 2 Items of Specimen

Facilities	Material / Kind of specimen	Stainless steel	Alumite	Melamin	Polypro-pylene	Porcelain	Glass	Total
School	Plate	2	6	3	25			36
	Bowl		5	1				6
	Tray		5					5
	Spoon, Fork	5						5
Nursery School	Plate			2	4			6
	Bowl			5	6			11
Office	Plate	1		8		4		13
	Bowl			4		4		8
	Deep bowl			5		3		8
	Spoon, Fork	1						1
	The rest				2			2
Hospital	Plate				4	1		5
	Bowl				3	1		4
	Deep bowl				1			1
Restaurant Hotel	Plate	1				14		15
	Bowl			2		1	1	4
	Deep bowl					2	1	3
Total		10	16	30	45	30	2	133

Table 3 Method of Washing at Various Facilities

Facilities / Method of Wahing	Feeding facilities			Restaurant
	School	Nursery School	Office	
Automatic washer			4	3
Semiautomatic washer	11			
Hand-washig	1	7	1	3

Table 4 Detergent Residues on Tablewares washed by Various Methods (unit : $\mu g/100\,cm^2$)

Detergent concentration	Steeping time	Method of rinse	Melamine ware		Polypropylene ware		Porcelain ware	
			Plate	Bowl	Plate	Bowl	Plate	Bowl
(as anion detergent) 0.1% Solution	5 min.	1. Nonrinse	84.2 (0.5)	87.4 (0.5)	97.5 (0.7)	66.4 (0.4)	73.6 (0.4)	58.5 (0.4)
		2. Pass two tanks	27.9 (0.2)	22.5 (0.1)	8.2 (0.1)	9.7 (0.1)	10.2 (0.1)	10.5 (0.1)
		3. Put in running water for 5 sec.	14.6 (0.1)	17.5 (0.1)	7.5 (0.1)	5.9 (blow 0.1)	5.3 (blow 0.1)	8.5 (0.1)
		4. Put in overflowing water for 30 sec.	10.9 (0.1)	10.3 (0.1)	4.1 (blow 0.1)	5.4 (blow 0.1)	4.2 (blow 0.1)	4.3 (blow 0.1)
	1 hr.	1. Nonrinse	77.2 (0.4)	68.7 (0.4)	101.4 (0.7)	79.8 (0.4)	47.4 (0.3)	38.1 (0.2)
		2. Pass two tanks	21.1 (0.1)	19.4 (0.1)	11.9 (0.1)	8.2 (blow 0.1)	8.2 (blow 0.1)	7.6 (blow 0.1)
		3. Put in running water for 5 sec.	17.2 (0.1)	16.9 (0.1)	8.3 (0.1)	6.8 (blow 0.1)	4.4 (blow 0.1)	3.7 (blow 0.1)
		4. Put in overflowing water for 30 sec.	8.8 (blow 0.1)	10.9 (0.1)	5.2 (blow 0.1)	2.8 (blow 0.1)	1.6 (blow 0.1)	0.7 (blow 0.1)
1.0% Solution	5 min.	1. Nonrinse	166.3 (0.9)	263.4 (1.5)	264.5 (1.9)	199.2 (1.2)	151.7 (0.9)	280.2 (1.8)
		2. Pass two tanks	27.8 (0.2)	40.1 (0.2)	36.4 (0.3)	28.3 (0.2)	21.8 (0.1)	36.8 (0.2)
		3. Put in running water for 5 sec.	22.3 (0.1)	15.8 (0.1)	19.9 (0.1)	7.6 (blow 0.1)	7.1 (blow 0.1)	4.4 (blow 0.1)
		4. Put in overflowing water for 30 sec.	3.0 (blow 0.1)	3.7 (blow 0.1)	2.0 (blow 0.1)	2.0 (blow 0.1)	4.8 (blow 0.1)	5.6 (blow 0.1)
	1 hr	1. Nonrinse	530.5 (3.0)	198.5 (1.1)	612.3 (4.5)	298.8 (1.8)	317.0 (1.8)	152.5 (1.0)
		2′. Pass one tank	67.4 (0.4)	51.2 (0.3)	63.8 (0.5)	73.7 (0.4)	40.6 (0.2)	35.0 (0.2)
		2′. Pass two tanks	40.4 (0.2)	32.1 (0.2)	42.7 (0.3)	51.2 (0.3)	25.2 (0.1)	25.3 (0.2)
		3. Put in running water for 5 sec.	33.7 (0.2)	15.4 (0.1)	13.4 (0.1)	6.1 (blow 0.1)	7.5 (blow 0.1)	18.9 (0.1)
		3′. Put in hot running water(40°)for 5 sec.	3.9 (blow 0.1)		3.0 (0.1)		3.1 (blow 0.1)	
		4. Put in overflowing water for 30 sec.	10.3 (0.1)	10.6 (0.1)	4.3 (blow 0.1)	7.5 (blow 0.1)	5.2 (blow 0.1)	3.8 (blow 0.1)

Note : Figures of the upper row indicate μg per $100\,cm^2$.
: Figures in parenthese indicate amount per unit volume changed from amount per unit area.

(2) 洗浄液（110検体）各施設で使用していた下洗い液（25検体），洗浄液（37検体）およびすすぎ液(48検体）を各 250 ml 採取．各施設における洗浄方法は Table 3 の通りである．

2. 試料中の陰イオン活性剤の抽出および定量 A 4および5と同様の操作を行なう．

結果と考察

A. 種々の要因における食器の残留洗剤量について

試料の種類や洗浄方法を変えた時の残留洗剤量の測定結果は Table 4 および5の通りで，値は $\mu g/100\,cm^2$ および ppm で示され，ppm はその食器に水を満たした時の濃度を表わしている．また洗剤を付着させた食器について，熱湯移行量を調べた結果は Table 6 の通りである．

以上の結果から

1. 新しい食器の場合（以下4まで），形状，材質別についてみると Table 4 より，形状別には残留量に差は認められなかったが，材質別には陶磁製食器に

Table 5 Detergent Residues on Flawed Tablewares

	Per one plate (μg)	Per unit area (μg/100 cm²)	Flawless wares under the same method of rinse (μg/100 cm²)
Melamine plate	261.7	55.1	40.4
Polypropylene plate	243.3	66.1	42.7

Method of washing is as follows.
Detergent concentration : 1.0% sol.
Steeping time : 1 hr.
Method of rinse : pass two tanks

Table 6 Rate of Transfer of Detergent to Hot Water from Tablewares (unit : %)

	Melamin		Polypropylene		Porcelain	
	Plate	Bowl	Plate	Bowl	Plate	Bowl
Once	95.7	100.6	88.5	79.2	91.3	81.3
Twice	96.4	82.5	87.7	75.4	78.2	77.4
Average	96.1	91.6	88.2	77.3	84.7	79.3

比較して，合成樹脂製のもの（メラミン樹脂）に若干多い傾向が見られる．

2. 浸漬時間についてみると Table 4 より，野菜や果物では内部への浸透などで浸漬時間が長いほど残留量が増大するが，食器の場合は浸透がほとんどなく，5分と1時間の間には差が認められない．

3. 洗浄液の濃度別にみると Table 4 より，すすぎを全くしない場合0.1%液では 38.1～101.4 μg/100 cm², 1.0%液では 151.7～612.3 μg/100 cm² 付着し，ため水2回のすすぎの場合0.1%液では8.2～27.9 μg/100 cm² (平均13.8 μg/100 cm²)，1.0%液では21.8～42.7 μg/100 cm² (平均34.0 μg/100 cm²) の残留が認められ，濃厚液で洗浄すると明らかに残留量が多くなる．しかし流水5秒の場合では0.1%液で3.7～17.5 μg/100 cm² (平均9.7 μg/100 cm²)，1.0%液では 4.4～33.7 μg/100 cm² (平均14.3 μg/100 cm²) 残留し，流水30秒の場合0.1%液では 0.7～10.9 cm² (平均5.8 μg/100 cm²)，1.0%液では2.0～10.6 μg/100 cm² (平均5.2 μg/100 cm²) の残留があり，濃度による差はあまり認められない．

4. すすぎの条件別にみると Table 4 より，ため水の場合すすぎ効果が悪く，流水30秒ではほとんどが10.0 μg/100 cm²以下になり，流水によるすすぎの方がよい．ため水2回と流水30秒を比較すると最高で1/18最低で1/2に減少している．またため水1回と2回を比較すると，1回の場合2回の約50%増の残留が認められる．次に温水（約40°）の流水5秒ですすいだ場合，その残留量は10.0 μg/100 cm² 以下となり，流水（約18°）30秒と同じ洗浄効果が認められる．

以上から厚生省の使用基準に従って洗浄液濃度を0.1%とし，すすぎ方法をため水2回または流水5秒以上で食器洗浄を行なった場合，残留洗剤量は30.0 μg/100 cm² 以下になるが，ため水2回と流水5秒では差がある．

5. キズのある合成樹脂製食器を使用した場合，Table 5 より，55.1～66.1 μg/cm² の残留が認められ，キズのない新しい食器に比較して約50%増になっている．宮里らによる実態調査[3]においてもキズの多い食器ではキズの少ないそれに比較して残留が多いと指摘されている．

6. 食器に付着させた洗剤について熱湯への移行量を試験した結果，Table 6 より，77～96%の洗剤が移行しており，このような食器を汁物等の液体食品に使用した場合，洗剤のほとんどが摂取される恐れがある．

B. 実態調査について

実態調査の結果は，各施設における食器の残留洗剤量については，Table 7, Fig. 1, 2 および 3，洗浄

Table 7 Distribution of the Detergent Concentration

Kind of Specimen \ ppm	〈0.1 ppm	≦0.5 ppm	≦1.0 ppm	≦1.5 ppm	≦2.0 ppm	2.0 ppm 〈
Plate	26	32	10	2	2	3
Bowl	7	17	3	1	0	0
Deep bowl	3	12	0	0	0	0
Total	36	61	13	3	2	3
(%)	(30.5)	(51.7)	(11.1)	(2.5)	(1.7)	(2.5)

Note : ppm is amount per unit volume changed from amount per unit area.

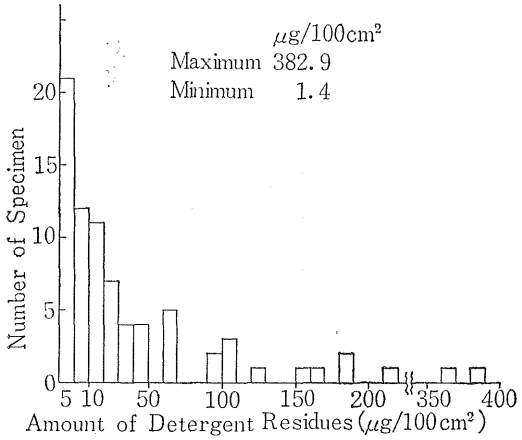


Fig. 1 Distribution of the Residual Detergent on Plates

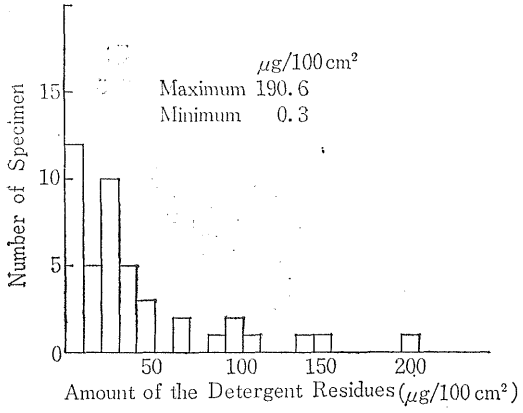


Fig. 2 Distribution of the Residual Detergent on Bowls and Deep Bowls

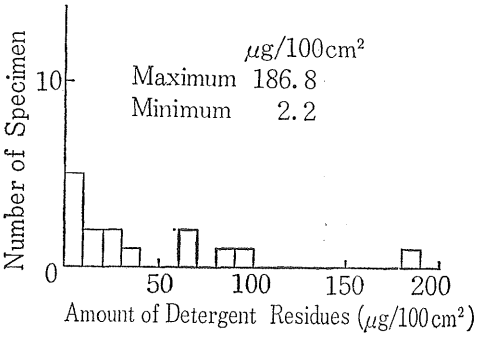


Fig. 3 Distribution of the Residual Detergent on Tablewares except Plates, Bowls and Deep bowls.

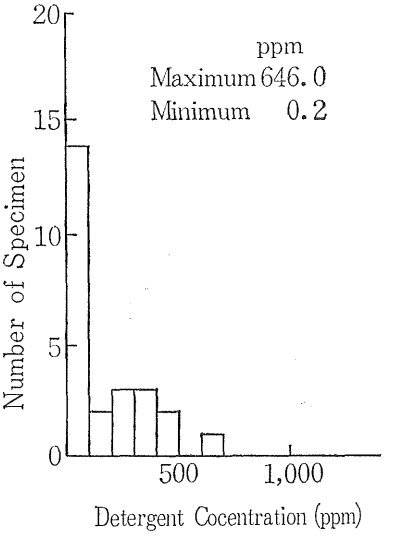


Fig. 4 Distribution of Detergent Concentration in the Pre-washing Solution

液の洗剤濃度分布については下洗い液 Fig. 4, 洗浄液 Fig. 5, すすぎ液 Fig. 6 に示されている. また衛生局環境衛生部食品衛生課で調査した各施設における洗浄方法については, Table 8, 9 および10に示されている.

以上の結果から

1. 食器の残留洗剤量は Table 7, Fig. 1, 2, 3 よ

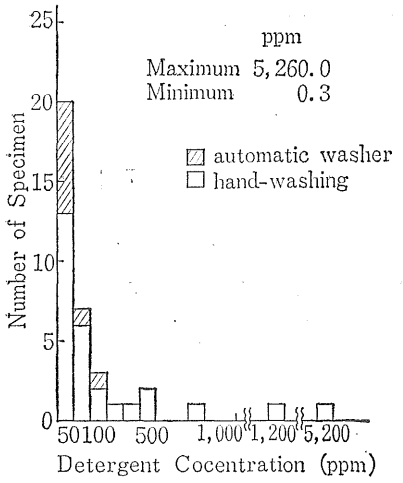


Fig. 5 Distribution of Detergent Cocentration in the Washing Solution

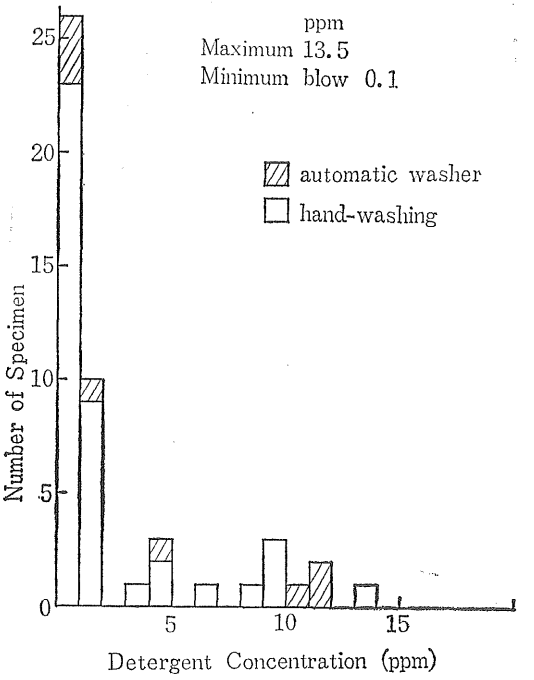


Fig. 6 Distribution of Detergent Concentration in the Rinsing Water

Table 8 Details of Method of Pre-washing

Method of pre-washing \ Method of washing / Facilities			Automatic washer: Feeding facilities (Office)	Automatic washer: Restaurant	Semiautomatic washer: School	Hand-washing: Feeding facilities: Office	Hand-washing: Feeding facilities: School	Hand-washing: Feeding facilities: Nursery school	Hand-washing: Restaurant	Total
Pre-washing	Detergent	use	4	2	11		1	4	1	23
		not use		1						1
	Use hot running water				1					1
	Use hot standing water		4	3	10		1	4	1	23
	Time	Within 1 min.		2	1		1	1	1	6
		Within 5 min.			4			2		6
		Within 15 min.	2	1	3			1		7
		Within 30 min.	2							2
		Above 30 min.			3					3
No pre-washing						1	1	3	2	7

り，皿，わん等の形状および材質別による差はほとんど認められないが，金属製のものに若干多いものがあった．また残留量は，30.0 μg/100 cm² 以内のものが133検体中87検体（65%）あり，50.0 μg/100 cm² をこえている30検体（22.5%）はほとんどが手洗いによるもので，最高382.9 μg/100 cm²（給食施設のメラミン製皿）検出した．自動，半自動洗浄機によるものはほとんど50.0 μg/100 cm² 以内であるが，手洗いによる洗浄法は他の方法と比較して残留が広範囲にわたっている．これは人為的要素に左右され，統一制を欠くためと思われる．

2. 洗浄液の洗剤使用濃度を調べた結果は，Fig. 4

Table 9 Details of Method of Washing

Method of washing \ Facilities		Automatic washer		Semiautomatic washer	Hand-washing				Total
		Feeding facilities (Office)	Restaurant	School	Feeding facilities			Restaurant	
					Office	Scool	Nursery school		
Detergent	Use	4	3	10	1	1	7	3	29
	Not use			1					1
Use hot running water		2	1	5			1		9
Use hot standing water		2	2	6	1	1	6	3	21
Time	Within 5 sec.	1		6			3	2	12
	Within 10 sec.	1	1	5		1	2		10
	Within 30 sec.	2	2				1		5
	Within 60 sec.				1			1	2
	Above 60 sec.						1		1

Table 10 Detalis of Method of Rinse

Method of rinse \ Facilities		Automatic washer		Semiautomatic washer	Hand-washing				Total
		Feeding facilities (Office)	Restaurant	School	Feeding facilities			Restaurant	
					Office	School	Nursery school		
Use hot running water		4	3	2		1	3	3	16
Use hot standing water				2			1		3
Use running water					1		2		3
Use hot standing and running water				7			1		8
Number of times	Once	2	3	1	1		4	3	14
	Twice	2		7		1	3		13
	Thrith			3					3
Time	1～ 4 sec.				1			2	3
	5～15 sec.	3	1	9		1	5		19
	16～30 sec.	1	1	1			2		5
	31～60 sec.		1						1
	60～120sec.							1	1
	Above 120 sec.			1					1

より，下洗い液は全て0.1%以内で使用されており，25検体中24検体（96%）が0.05%以内であった．Fig. 5より，洗浄液は37検体中35検体（95%）が0.1%以内で使用されているが，使用基準の0.1%をこえているものが2ヵ所あり，集団給食施設で0.53%，保育園で0.12%の濃度で使用されていた．自動および半自動洗浄機の場合，陰イオン活性剤はほとんどが低濃度であった．これは陰イオン活性剤を多く含んでいると泡立ちが多くなり，またすすぎが十分に行ないにくいなど洗浄操作が悪くなるので，主成分がアルカリ洗浄剤または非イオン洗浄剤で，副成分が陰イオン活性剤の洗浄剤を使用しているためである．Fig. 6より，すすぎ液の洗剤濃度は48検体中35検体（73%）が2 ppm以内であり，水道水の水質基準0.5 ppm以内のものが22検体（46%）で，最高は13.5ppmであった．また自動洗浄器で10 ppmをこえるものが8検体中3検体もあり，すすぎ工程に問題がある．

3. 各施設における洗浄方法としてはTable 8, 9, 10より，学校では半自動，事業所では自動洗浄機による方法が主であるが，保育園では手洗いで行なってお

り，また飲食店では自動洗浄機と手洗いの両方によっていた．洗浄工程別では，各施設とも下洗いは洗浄剤を使用し，多くが1～15分間で行なわれ，温水によるため水が用いられていた．洗浄液は下洗い同様に洗浄剤を使用し，多くが温水によるため水または流水で30秒間以内で行なっていた．またすすぎについては約半数の施設で流水（温水）を使用し，学校においてはため水（温水）と流水（水）を併用しているところが多い．回数は1～2回，すすぎ時間は5～30秒間であった．しかし，すすぎ時間については，使用基準以下の施設が3ヵ所（事業所1，飲食店2）あった．

まとめ

私たちは飲食器の洗浄剤を使用した場合，どの程度の洗剤が食器に付着残留してくるかをいろいろ要因を変えて検討し，あわせて各施設における洗浄方法並びに飲食器具類の残留洗剤量等について，実態調査を行なった．

本実験の結果，厚生省の使用基準に従って洗剤を使用すると，食器への残留洗剤量は新しい食器の場合で30.0 $\mu g/100\ cm^2$ 以内になる．しかし，残留が全くないことはなく，しかもキズのある古い食器ではその1.5倍程度に増加し，洗剤濃度が10倍の1.0%液では，多いときで66.1 $\mu g/100\ cm^2$ の残留が認められることがわかった．また飲食物によっては，食器から移行して摂取されることも考えられるので，すすぎを十分に行なうとともに十分に水を切る必要がある．なお，この実験（0.1%洗剤液，すすぎ：流水5秒）における平均残留量から換算した1日の洗剤摂取量は0.27 mg程度と推定される．昨年，東京都が発表した都民の洗剤1日最大摂取推定量は14.546 mgで，その中食器からの摂取量は0.3 mgであった．

また実態調査の試験結果からみると，残留洗剤量は50.0 $\mu g/100\ cm^2$ 以内のものが80%をしめており（30.0 $\mu g/100\ cm^2$ 以内のものは65%），この残留量から考察すると，おおむね使用基準にそった洗浄方法を行なっているものと考えられる．これは洗浄方法の実態調査の結果と合致している．ただ残留洗剤量が100.0 $\mu g/100\ cm^2$ 以上のものが15検体（11%）もあり，これはすすぎを全く行なわないものと同じ状態にあると考えられ，洗浄方法に問題を残している．この要因としては，下洗い液や洗浄液の洗剤濃度は大きく影響せず，むしろすすぎ段階での影響が大であるのですすぎ方法を改善しなければならない．例えば，すすぎは必ずオーバーフローさせながら流水下で洗い，かつ全面換水をできるだけ行なった方がよいと思われる．またキズの多い古い食器は残留洗剤量も多くなるので，破損しないまでも耐用年数を考慮して，新しいものと適宜変えていく必要がある．

なお，洗浄剤の使用実態調査結果については，49年3月衛生局環境衛生部食品衛生課から報告書が出されている．

〔付記〕

本研究は昭和48年度当研究所研究課題「食器洗浄に使用されたＡＢＳ類の残留に関する調査研究」として実施したものである．

文　献

1) 官報，昭和48年4月28日厚生省告示第98号，食品，添加物等の規格基準

2) 篠田耕三，伊藤孝治，安田健一，木下恭二：食衛誌，4，387～391（1962）

3) 宮里秀樹，吉永安信，宮城朝光，吉川朝善，東恩納佑行，波平　毅：食品衛生研究，24，3，23～30（1974）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 293 — 296, 1974

ガラス製食器，特にプリントガラスコップの重金属溶出について

渡辺悠二* 佐藤憲一* 諏訪世津子* 吉田令子*
佐藤弥代子* 藤居瑛*

Detection of Eluted Heavy Metals from Glass-Wares (Printed Glass-Tumblers)

YUJI WATANABE*, KENICHI SATO*, SETSUKO SUWA*, REIKO YOSHIDA*, YAYOKO SATO* AND TERU FUJII*

A total of 27 glass-tumblers consisting of 17 imported and 10 domestic ones, having colored print on their outermost within 2 cm from the edge, was tested by adopting the Japanese Standard Procedure for Porcelain for the presence of extractable heavy metals in their printed color enamel. Elution of heavy metals was made by dipping the tumbler upside-down into 2 ml/cm^2 of 4 % acetic acid and left at room temperature for 10 minutes.

All the 27 specimens tested had released 0.1～390 ppm/cm^2 of lead. Of them, 4 (23.5%) of 17 imported ones had released greater than 100 ppm/cm^2 of lead, while 8 (80%) of 10 domestic ones released less than 20 ppm/cm^2 of the one and there was none over 100 ppm/cm^2. Twenty-two (81.4%) of 27 had released 0.1～40 ppm/cm^2 of cadmium, and in these cases cadmium was detected from red or yellow printed color enamel. With a few exceptional case, almost of all the specimens did not releasd any other heavy metals, such as copper, zinc and arsenic.

まえがき

ガラス製品は，従来，衛生的で無害なものと考えられているが，最近，はなやかな図柄のプリントガラスコップが数多く出まわっており，この絵付けについては陶磁器と同じように，重金属溶出の問題があるとおもわれる．このことについては現在 JIS 規格のガラス製コップ[1]の中で，窯業用絵の具などによる焼付加工は，ガラスコップの内面の全面および外面の口部から10 mm 未満のところに施してはならないと規定し，水による溶出で鉛を試験している．さらに日本硝子製品工業会において，プリントガラスコップの重金属溶出についての自主規制[2]が提案されている．しかし食品衛生法では，唇等に接触する部分について陶磁器の規格を準用する規定[3]があるだけである．

ガラスの絵付けには，グラスカラーエナメル[4]が使用されている．このグラスカラーエナメルは，低融点ガラスに金属酸化物，金属硫化物または耐性熱無機顔料を混合した窯業用絵の具であるが，陶磁器と異なり焼成のときガラス器が変形しない程度の低融点であることが要求される．この融点は，おおよそ3区分(500～650°) されているが，食器の絵付けは600°前後で行なわれる．エナメルの融点を，低くするために，鉛が原料として不可欠の成分となっていて，主に PbO が合される．一部 Al_2O_3 などを配合して化学的耐久性を増しているものもあるが，焼付温度が低いものほど重金属が溶出されやすい．CdO もガラスの軟化温度を低下させる目的で用いることもあるが，むしろガラス中の鉛と黄赤系の顔料として用いられる CdS, Cd_3SeS_2 (硫セレン化カドミウム) などのイオウ分による

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku Tokyo, 160 Japan

黒色の硫化鉛の生成を防ぐための安定剤として用いられる.

以上のことから，ガラスコップの外面に施された絵付けからの重金属溶出について検討したので報告する.

実験の部

1. 試　料

デパート，スーパーで市販されているプリントガラスコップ27検体（国産品10検体，輸入品17検体）で，いずれも食品監視課第二機動班から送付されたものを試料とした.

検体をガラスコップ外面の口部から絵図焼付け加工部分までの距離で分別すると，5 mm 以内5検体，10 mm 以内10検体，20 mm以内12検体であった.

2. 試験溶液の調製

(1) 検体をよく水で洗った後，検体の表面積 1 cm^2 につき 2 ml の割合の4％酢酸を逆さまにした検体の口部から 20 mm の高さまで満たし，10分間室温に放置した後，検体をとり出し試験溶液aとする.

(2) (1)と同様にして1時間放置したものを試験溶液bとする.

(3) 検体をよく水で洗った後，50° に加熱した蒸留水1,000 ml をビーカーにとり，この蒸留水中に検体を浸し，時計皿でおおい50° に保ちながら，ときどきかき混ぜて30分間放置した後検体をとり出し試験溶液cとする.（JIS 規格による焼付絵の具試験の条件）

3. 試験操作

(1) 重金属の定量

試験溶液200 ml をとり，水浴上で蒸発乾固した後，支持電解質10 ml に溶かし，く形波ポーラグラフィーを用いて，鉛，カドミウム，銅，亜鉛の定性定量を行なった.

支持電解質：1 N HCl-1 N NH_4Cl 溶液（1：1）

測定機種：柳本P 8型

(2) ヒ素の定量

食品添加物公定書一般試験法23，ヒ素試験法によって行なった.

結果と考察

試験結果は Table 1, 2, 3, 4 のとおりである.

(1) 鉛

試験溶液 a, b については，すべての検体から検出され，検出値は広範囲にわたっている.

最高値は試験溶液aでは390.0 ppm，試験溶液bでは815.0 ppm であった.

試験溶液cでは，最高値 0.3 ppm でほとんど検出されなかった.

試験溶液aより試験溶液bの方が，重金属溶出量が大きいのは当然であるが，鉛溶出量が多い検体では10分間で溶出しきってしまい，1時間溶出で溶出量増加のないものが3検体（266.0 ppm, 385.0 ppm, 390.0 ppm）あった.

食品衛生法に基く陶磁器の規格試験限度（鉛として20 ppm）を超えているものが，試験溶液a で 9検体

Table 1 Amount of Heavy Metals Detected from Domestic Glass-Tumblers

Sample tested	Heavy metals detected (ppm)														
	Pb			Cd			Cu			Zn			As		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	1.8	5.3	0	0.1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	38.0	223.0	0	2.4	17.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	3.5	5.8	0	0.3	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0.1	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0
5	89.2	269.2	0	6.7	26.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6.2	112.2	0.2	2.0	8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	58.0	164.0	0	5.0	17.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0.3	0.3	0	0.1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0.1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0	0	0
10	0.2	0.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0	0

Note : a=10 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
b=60 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
c=30 minutes elution made by 1,000 ml of distilled water previously warmed at 50°.

Table 2 Amount of Heavy Metals Detected from Imported Glass-Tumblers

Sample tested	Heavy metals detected (ppm)														
	Pb			Cd			Cu			Zn			As		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	2.4	5.6	0	0.2	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.7	2.0	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	78.5	433.5	0.3	0	7.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	245.0	815.0	0	4.0	17.5	0	0	0	0	0	114	0	0	0.3	0
5	6.4	6.8	0	0.4	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	3.2	3.4	0	0.4	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7.3	8.2	0	0.4	0.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	385.0	385.0	0.2	15.0	1565.0	0	0	75.0	0	0	0	0	0	0	0
9	390.0	390.0	0	40.0	840.0	0	0	8.2	0	0	0	0	0	0	0
10	4.0	10.9	0	0.7	2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3.8	4.4	0	0.1	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	5.1	21.9	0	1.3	1.9	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0
13	266.0	266.0	0	0.3	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	2.0	12.8	0	0.2	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2	0
15	15.0	55.8	0	1.0	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0.6	0.9	0
16	20.0	41.0	0	0.8	23.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	7.5	14.5	0	0.5	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0.3	0.3	0

Note : a =10 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
b =60 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
c =30 minutes elution made by 1,000 m*l* of distilled water previously warmed at 50°.

Table 3 Incidence of the Amount of Lead Detected

Amount of lead (ppm)	Elution method	
	a	b
< 0.1	0	0
0.1～ 5.0	12	7
5.1～ 10.0	5	5
10.1～ 20.0	2	3
20.1～100.0	4	3
100.1～200.0	0	2
200.0<	4	7

Note : Figures in the Table indicate the number of specimen.
a=10 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
b=60 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.

Table 4 Incidence of the Amount of Cadmium Detected

Amount of Cadmium(ppm)	Elution method	
	a	b
< 0.1	5	4
0.1～ 0.4	10	7
0.5～ 1.0	3	3
1.1～ 5.0	5	4
5.1～10.0	2	2
10.1～50.0	2	5
50.0<	0	2

Note : Figures in the Table indicate the number of specimen.
a=10 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.
b=60 minutes elution made by 4 % acetic acid at room temperature.

(33.0%) あった.

(2) カドミウム

検出値はかなり鉛より低く，15検体が0.4 ppm 以下であった.

最高値は試験溶液 a では40.0 ppm ，試験溶液 b では1,565.0 ppm であり，全く検出しないものは試験

溶液aで5検体（18.5%），試験溶液bでは3検体（11.1%）であった．

試験溶液cからは，全く検出されなかった．

(3) 銅

試験溶液a，cからは，全く検出されなかった．

試験溶液bから検出されたものが，2検体（750.0 ppm，8.2 ppm）あった．

(4) 亜　鉛

試験溶液a，b，cとも，ほとんど検出されなかったが，試験溶液bで114.0 ppmの高い検出値を示したものが1検体あった．

(5) ヒ　素

検出値は低いが，試験溶液aから4検体（16.8%），bより6検体（22.2%）検出されている．

試験溶液cからは，全く検出されなかった．

(6) 外観変化

重金属溶出値に伴い，多いほど激しい変化を示している．

色：濃→淡，明→暗，透明→不透明

試験後カラーエナメルが粉状になり，光沢を失い，おちやすくなった．これらの変化が併せて起こったり，単独で起こったりしている．

変化のないものは，試験溶液aで12検体（44.4%），bで9検体（33.3%）で，cではすべて変化が認められなかった．

以上の結果を鉛，カドミウムについてみると，鉛は特定の色とは関係なくすべての検体から検出され，カドミウムは主に黄，赤の着色を施してあるものが，高い検出値を示している．これは，まえがきで述べたように，グラスカラーエナメルに，低融点ガラスの原料として鉛が用いられているためである．銅の検出された検体は，2検体とも青系の絵付けの施してあるものであり，銅は低融点化の原料ではないので，顔料からの溶出とみられる．外観変化は絵付け面積に関係なく，重金属溶出量が多いほど顕著であり，検出値が広範囲にわたっていることから，焼成温度，耐酸性などのグラスカラーエナメルの個々の違いが現われているものとおもわれる．

日本硝子工業会提案の自主規制では，室温4%で酢酸中に製品を浸し，30分間放置したものを試験溶液として，製品1個につき溶出量が鉛25 mg以下，カドミウム 2.5 mg以下であることとしている．今回の試験と比較するために，4%酢酸10分浸出における重金属溶出量を，コップ1個あたりの総溶出量（mg）に換算すると，時間的には10分間と短時間であるにもかかわらず，上記の自主規制値をうわまわるものが鉛では8検体(国産品2検体，輸入品6検体)，カドミウムでは5検体（国産品2検体，輸入品3検体）あった．

輸入品と国産品を比べてみると，4%酢酸10分浸出の場合，輸入品は重金属高濃度のものが多くみられ，鉛についてみると200 ppm以上（最高390.0 ppm）のものが4検体（23.5%）あった．国産品はすべて100 ppm以下であり，8検体（80%）は20 ppm以下であった．また，1時間浸出の場合も同様の傾向を示している．輸入品の検体は，すべてアメリカからのものであり，色彩豊かな図柄が好まれる反面，グラスカラーエナメルのチェックは，あまり厳しく行なわれていないのではないかとおもわれる．今回の試料にみるように，口をつける部分に絵付けがあるものについて，JIS規格の水50°30分保温浸出条件（試験溶液c）では，鉛，カドミウムの溶出は，ほとんど認められないが，浸出条件が4%酢酸10分の場合では，すべての検体から鉛が，80%以上の検体からカドミウムが検出されている．ガラスの絵付けは，焼成温度が陶磁器より低いとはいうものの陶磁器の釉薬とグラスカラーエナメルとは，かなり組成が類似している．したがって重金属の溶出試験には，JISの溶出条件よりも陶磁器規格試験同様4%酢酸による浸出が適当であるとおもわれる．

まとめ

プリントガラスコップ27検体について口部に近い部分（20 mm以内）よりの重金属溶出を検討した．4%酢酸室温10分浸出液では，鉛はすべての検体から 0.1～390.0 ppm の範囲で検出され，これは鉛がグラスカラーエナメルの原料であることに起因している．カドミウムは0.1～40.0 ppm の範囲で22検体（81.4%）から検出され，その多いものは，黄赤系の彩色を施してあるものであった．鉛，カドミウム以外の重金属（銅，亜鉛，ヒ素）は，ほとんど検出されなかった．また国産品と輸入品を比較すると，輸入品に溶出量が多い傾向がみられた．

JJS浸出条件（水50°30分）では，ほとんど重金属は検出されなかった．またグラスカラーエナメルは，陶磁器釉薬に組成が類似していることからみても，4%酢酸を浸出液として用いる方が安全性が高い．

文　献

1) JIS，ガラスコップ，S 2043（1971）
2) 日本硝子製品工業会：硝子ニュース，98，8—9（1972）
3) 通達，昭和28年8月26日，衛発第659号
4) 柏　守彦：化学と工業，26，4，134—136(1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 297 — 305, 1974

多摩川魚類中の PCB, PCT および農薬蓄積量

深野駿一* 牛尾房雄* 道口正雄*

PCB, PCT and Pesticides Residues in Fish Cpllected from the Tame River

SHUNICHI FUKANO*, FUSAO USHIO* AND MASAO DOGUCHI*

The analyses of PCBs, PCTs, and pesticides residues were made with the fishes sampled at 12 sites in the Tama River running through the Tokyo area from August through Novemver 1972.

The PCBs concentrations in the fish showed a progressive increase when the sample site came close to the estuary. The PCBs levels were below 1 ppm in the fish from the upper reaches on fresh tissue basis and most of those from the middle reaches exceeded 1 ppm. Same of the sample fishes of the estuary exeeeded the level of 3 ppm, the acceptable PCBs limit for fishes in coastal and inland waters.

The constitution of PCB residues in the fishes from the upper reaches was different from those of the middle reaches and the estuary. No or few trichlorobiphenyls were detected in the former. While in the later, trichlorobiphenyls constituted 10 to 20% of the PCBs found in the fish. No particular sources from which PCBs was released to the river were found.

The average concentration of PCTs was 0.0025 ppm with a range of ND to 0.014 ppm on fresh tissue basis. The PCTs residues in the fish was so low that the average PCTs/PCBs ratio was showen to be no more than 1/600. Except for the upper reaches, sample site No. 1 to No. 4, where trace amount of PCTs was detected in the fish, no direct relation between PCTs levels and geographical location was recognizable.

The average levels of DDT and BHC were 0.3 ppm and 0.03 ppm respectively. Apporoximatery 60 % of the DDT was present in the form of p. p′-DDE and 40% of the BHC as β-BHC. The leveles of DDT in the fish were much higher than those of BHC. No geographical location was directly related th the pesticides residue leveles.

Among the chlorinated hydrocarbons detected in the fish, PCBs residues were dominant in all the samples tested except for the two from the upper reaches.

1. まえがき

近年，PCB, DDT, BHC など有機塩素系化合物が広汎な環境汚染をもたらし，食物連鎖を経て人体にまで蓄積され，その慢性的影響が危惧されている．

PCB の人体への主経路は魚類からといわれ[1~2]，水産庁および環境庁は1972～73年にかけ全国110地域の魚2826匹について調査しその内14地域において暫定許容量 3 ppm を越えた魚が見い出されたと報告している．東京都においても47年度 PCB 総合調査を実施し，われわれもこの一員として多摩川の汚染調査に加わり，魚類中の PCB を測定した．水質汚染の指標として魚体中の汚染物質の蓄積量を知ることの有効性については前回の東京湾における PCB 調査[3]で明らかにした通りであり今回においてもひきつづき多摩川からの魚種10種，107匹について調査を行なった．

その他，すでに化学的安定性から環境中での蓄積量が問題となっている DDT, BHC および PCB と類似の化学構造，性質，用途をもつ Polychlorinated Terphenyl（以下 PCT と略す）についても合わせて

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

測定し，若干の知見を得たので報告する．

2. 試料および実験方法

試料 昭和47年8月より11月までに氷川大橋より羽田河口に至る多摩川上流，中流，下流，計12地点において採集したオイカワ，キンブナ，ボラ，コノシロなど10種の魚類を供試した．ボラ，スズキを除く魚類試料は，頭部および内臓を除去しその数匹を混合し一検体とした．

分析方法 抽出方法およびクリーンアップ法は，Jensen ら[4]の方法に従った．すなわち試料にアセトン—ヘキサン混液（5：2）を加え高速回転ミキサー（Ultra Turrax）にてホモゲナイズした．遠心分離後，残査にヘキサン—エーテル混液（9：1）を加え高速回転ミキサー中で再度抽出を行なった．有機溶媒層を1回目の抽出液と合わせ，2％食塩水にて洗浄した．続いて有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムにて脱水し，KD濃縮器にて溶媒を留去し抽出脂肪を得た．

抽出脂肪約170 mg を遠沈管中に精秤しヘキサン7 m*l* を加え溶解後，発煙硫酸（10%SO_3）7 m*l* を加えた．この遠沈管を静かに上下に振り静置後，遠心分離したヘキサン層を，無水硫酸ナトリウム2g，フロリジル2g，ミリカゲル2gの3層よりなる内径1cmの多層カラムに添加し，ヘキサンを溶出液としてクリーンアップした．ヘキサン溶出液量は充填剤の活性化条件により変わるため，DDE の溶出終了を待ってヘキサン溶出画分を決定した．この画分には回収実験において PCB の約90%，PCT の約85%が回収された．さらに15%エーテル含有ヘキサン溶媒 150 m*l* にて DDE 以外の農薬区分を溶出させた．これらの画分を5 m*l* 前後に濃縮し，ECD ガスクロマトグラフィーに供した．

ガスクロマトグラフィーは島津5AP を使用し，その条件は表1の通りである．

ガスクロマトグラム上で DDE と重さなる PCB 化

Table 1. Operating Conditions of Gas Chromatograph

Columns	: 2%OV-1 on Gas Chrom Q 80/100 mesh 2m×3 mm glass for PCB and DDE.
	2%OV-1 on Gas Chrom Q 80/100 mesh 1m×3 mm glass for PCT.
	2%OV-17 on Chromosorb W 80/100 mesh 2m×3 mm glass for pesticides.
	3%DEGS on Gas Chrom Q 80/100 mesh 2m×3 mm glass for pesticides.
Temperatures	: Colum : 200°C, Detector : 250°C, for PCB and DDE.
	Column : 280°C, Detector : 320°C for PCT.
	Column : 180°C, Detector : 230°C, for pesticides.
Carrier Gas	: N_2 80 m*l*/min

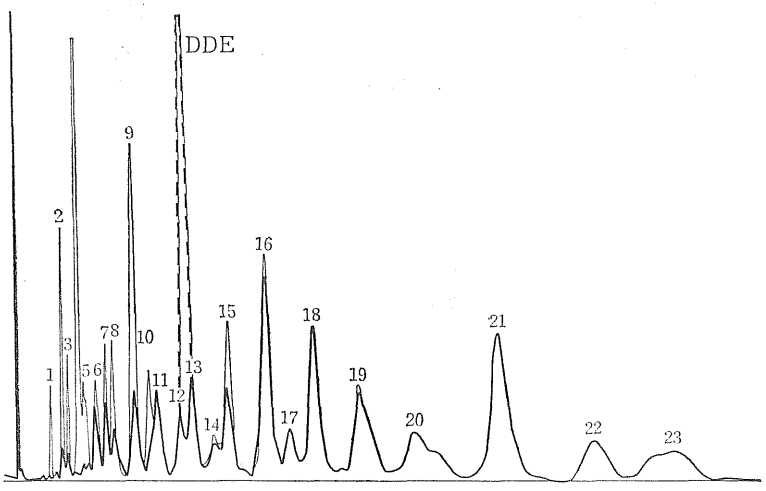


Fig. 1 Gas chromatogram of PCB and DDE mixture after reaction with oxidative reagent (Dissolved 3.0 g CrO_3 in 10 m*l* water and ajusted to 100 m*l* with H_2SO_4)

Cl No.	Cl_2	Cl_3				Cl_4					Cl_5					Cl_6			Cl_7				Cl_8	Cl_9
Peak No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
PCB %	1.67	5.78	2.68	7.57	5.23	7.88	4.83	3.30	10.68	2.37	5.70	3.16	4.20	1.24	6.44	6.16	1.68	4.45	3.45	3.15	3.47	1.27	1.54	0.29	0.71	0.21	99.11

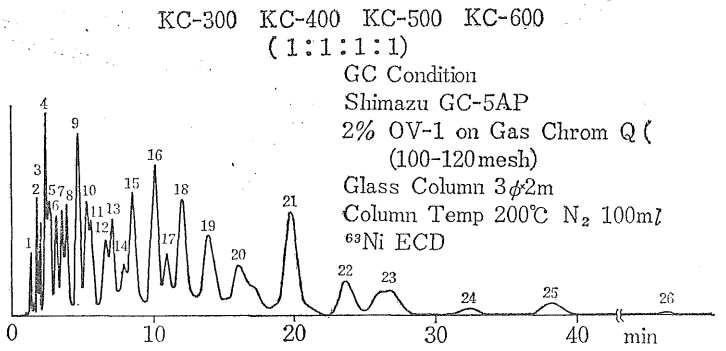


Fig. 2 ECD chromatogram of a PCB standard.

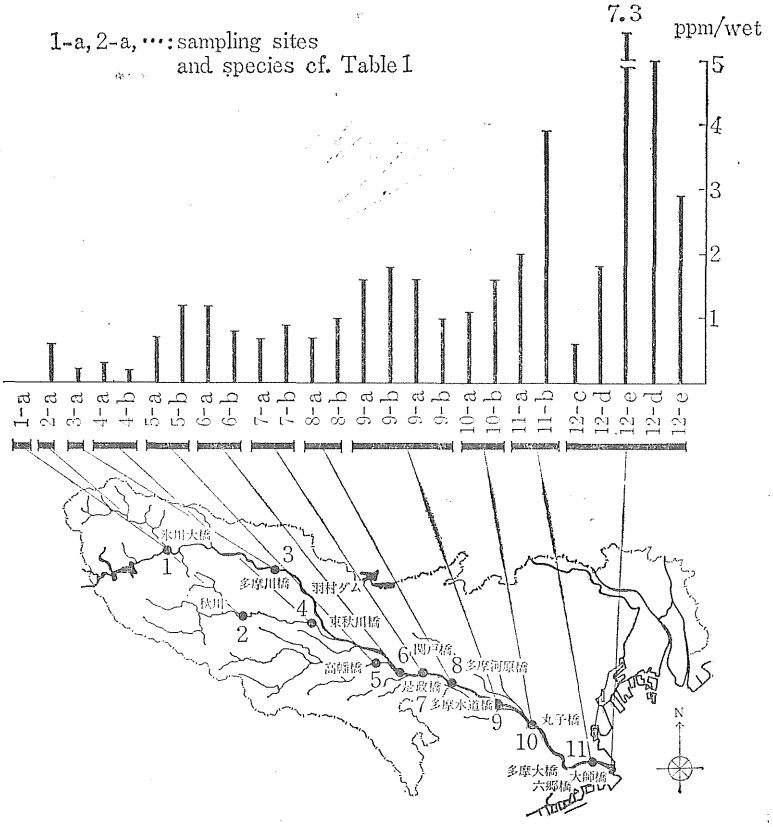


Fig. 3 PCB residues in fish and sampling sites in the Tama River

合物はヘキサン試料溶液に同量の酸化試薬を加えて室温で静かに混合することにより DDE を選択的に分解し定量した（図1）.

酸化試薬は三酸化クロム 3.0 g を水 10 m*l* に溶解し濃硫酸にて 100 m*l* に定容し調製した.

PCB の定量法は鵜川ら[5]の方法に従い数値化した. 定量に使用した数値および標準ガスクロマトグラムは図2に示した.

PCT は和光純薬の PCT (KC. C に相当する) を標準として，主ピークのピーク高の和をもって検量線を作製し PCT を数値化した.

3, 結果および考察

試料採集地点，魚類中の PCB 蓄積量および各種 PCB 化合物の含有率（%）を図3および表2に示した. 表2に示すように PCB 蓄積量は上流（採集地点 No. 1～4）では，tr～0.6 ppm中流 (No. 5～9) では，0.7～1.8 ppm，下流(No. 10～12) では0.6～7.3 ppm と下流に下るに従い増加する傾向を示した. 脂肪中の PCB 含量についても同様の傾向がみられた. 本調査での最高値は湿重量当りではボラの7.3 ppm，脂肪当りではスズキの 90 ppm であった. 前報[3]の東京湾汚染調査においてもボラ，サッパ，スズキの蓄積量は多く，その範囲は湿重量当り 1.1～19 ppm であった.

東京都の47年度 PCB 総合調査[6]によれば，多摩川河川中の水質には検出限界 0.5 ppb で検出されず，底質では上流で，不検出～0.47 ppm，中流で，0.03～2.3 ppm，下流で，0.7～5.8 ppm で底質についても下流水域では高い蓄積量を示した.

また上流，中流，下流における魚類のGC パターンを比較すると，上流水域の魚類は KC—500 に類似のパターンを示し，中流，下流水域の魚類では，これにさらに KC—300 および KC— 400 を加えたパターンに変化した. これを各種 PCB の含有率で示すならば，表2に示されるように5塩化物の含有率は上流の魚類では45～50%と残留 PCB のほぼ半量が5塩化物であるのに対し，下流では22～33%と減少した. 6塩化物の含有率も上流で27%ほどから下流で10%程度と減少し，上流水域の魚類の残留 PCB は主として5塩化物および6塩化物より構成されていることが認められた.

これに対し，3塩化物の含有率は上流において2%前後と低く中下流域で10～20%と増加傾向を示した. KC—300 の主要構成物である3塩化物は，高塩化物に比べ蒸気圧が高く[7]水圏に流出しても比較的速やかにガス化し[8~9]，大気中に移行することが知られている. また魚体中に取り込まれても比較的代謝され易いことが報告されており[10]，このような3塩化物が中，下流域の魚類から検出されたことは，これら水域に絶えず PCB が供給されていることを示すものと解釈される.

上流での魚類中の PCB 蓄積量の低いこと，および低塩化ビフェニルがほとんど含まれていないことは，それら水域において，生活用水や工場廃水などによる直接汚染はほとんどないか，あっても量的に中下流に

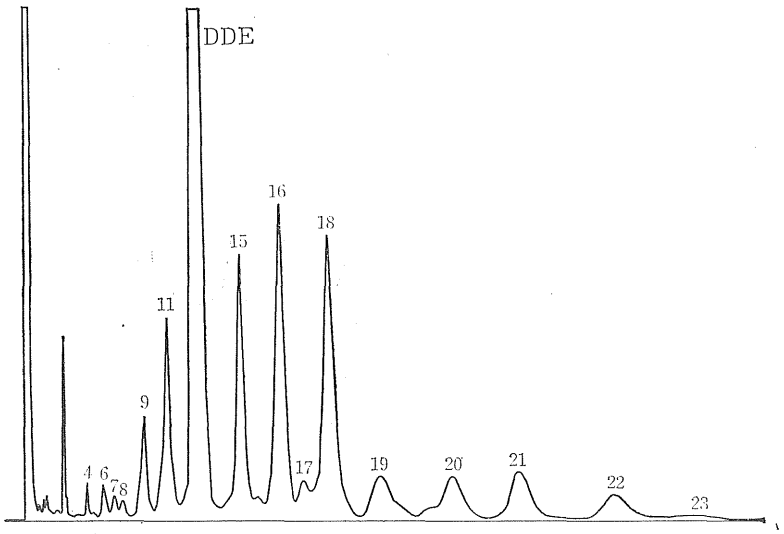


Fig. 4 Gas chromatogram of PCB in *Tribolodon hakonensis* (Ugui) at Sawato Brige

Table 2 PCB and PCT in fish from the Tama River

Site	Species	No.	Weight (g)	Fat (%)	PCB_1	PCB_2	% of total amount of PCB compounds						PCT_1	PCT_2
							Cl_2	Cl_3	Cl_4	Cl_5	Cl_6	Cl_{17}	Cl_{18}	
1-a	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	4-14	6.6	tr	tr								tr. tr.
2-a	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	8-13	3.8	0.6	16.1	—	0.7	12.7	50.0	27.3	9.1	0.2	tr. tr.
3-a	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	7-10	5.0	0.2	4.8	—	1.7	26.9	46.1	16.6	8.7	—	tr. tr.
4-a	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	4- 6	3.2	0.3	9.5	—	1.0	18.6	45.5	26.0	8.7	0.3	tr. tr.
4-b	Zacco platypus (Oikawa)	5	9-10	1.4	0.2	10.7	0.2	0.9	18.0	46.2	26.3	8.1	0.3	tr. tr.
5-a	Carassius carassius (Funa)	5	15-20	3.1	0.7	23.0	—	0.8	32.6	41.8	18.2	6.3	0.3	1.4 45
5-b	Gnathocogon elongatus (Tamoroko)	5	7-11	6.2	1.2	19.3	0.6	5.3	39.2	35.1	14.2	5.1	0.6	1.5 24
6-a	Gnathopogon elongatus (Tamoroko)	5	6-13	6.4	1.2	18.3	0.5	5.2	43.5	30.8	13.0	6.8	0.3	2.1 33
6-b	Pseudorasbora parva (Motsgo)	5	5-11	5.4	0.8	15.3	0.7	8.6	49.5	27.6	10.2	3.3	0.2	0.5 9
7-a	Pseudorasbora parva (Motsgo)	5	7-12	6.5	0.7	11.4	1.1	10.1	41.6	30.7	11.6	4.4	0.5	3.6 55
7-b	Carassius carassius (Funa)	3	56-73	2.7	0.9	31.9	1.0	6.4	42.5	32.7	12.9	4.1	0.4	13 160
8-a	Carassius carassius (Funa)	3	43-59	4.1	0.7	16.0	0.7	9.7	52.3	24.9	9.1	3.1	0.3	1.1 28
8-b	Pseudorasbora parva (Motsugo)	5	9-12	6.8	1.0	15.1	0.9	16.6	49.5	21.1	8.9	3.1	—	1.8 27
9-a	Pseudorasbora parva (Motsugo)	5	8-12	6.4	1.6	22.8	1.2	15.2	37.8	29.9	12.1	3.5	—	4.0 63
9-b	Zacco platypus (Oikawa)	5	17-25	7.6	1.8	23.7	0.8	15.1	36.9	31.2	11.9	3.9	0.2	14 190
9-c	Zacco platypus (Oikawa)	5	15-23	7.1	1.6	25.3	0.8	14.1	29.4	39.0	12.7	4.1	—	7.9 110
9-d	Carassius crassius (Funa)	3	37-66	2.8	1.0	34.9	0.9	10.1	35.7	34.5	14.2	4.3	0.3	1.6 59
10-a	Carassius carassius (Funa)	3	72-105	5.2	1.1	20.6	1.1	17.7	35.3	28.1	13.6	3.9	0.4	— —
10-b	Pseudorasbora parva (Motsgo)	5	7-12	7.6	1.6	21.2	1.2	20.6	34.2	26.4	13.4	3.9	0.3	3.0 40
11-a	Konosirus punctatus (Konoshiro)	3	35-41	8.6	2.0	23.5	0.7	17.5	52.1	21.9	6.0	1.8	0.1	1.4 17
11-b	Harenguala zunashi (Sattupa)	4	14-27	9.0	3.9	44.0	1.1	13.3	40.7	30.3	11.0	3.4	0.3	2.4 27
12-a	Acanthogobius flavimanus (Haze)	5	9-14	0.9	0.6	66.9	1.0	11.5	37.8	31.9	13.9	3.7	0.1	0.3 35
12-b	Konosirus punctatus (Konoshiro)	5	14-17	3.0	1.8	60.0	0.6	11.6	46.2	29.6	9.2	2.7	0.1	0.9 29
12-c	Mugil cephalus (Bora)	1	940	12.5	7.3	58.7	0.4	13.7	38.7	32.7	10.9	3.4	0.2	3.6 29
12-d	Mugil cephalus (Bora)	1	710	10.0	5.0	50.4	0.5	12.5	35.6	32.5	14.1	4.6	0.3	2.1 21
12-e	Lateolabrax japonicus (Suzuki)	1	390	3.2	2.9	90.0	0.4	10.4	45.7	29.5	10.6	3.1	0.3	0.9 29

No : Number of samples, PCB_1 : ppm/wet base, PCB_2 : ppm/fat base, PCT_1 : ppb/wet base, PCT_2 : ppb/fat base, Cl_2 : dichlorobiphenyl, Cl_3 : trichlorobiphenyl,……

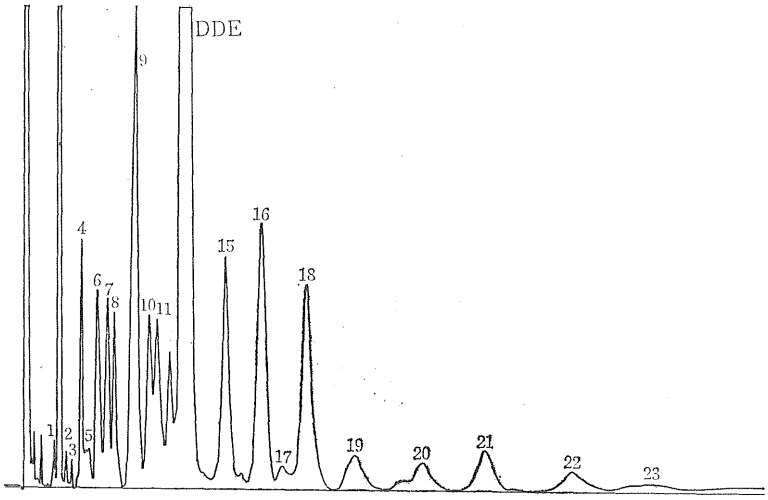


Fig. 5 Gas chromatogram of PCB in *Carassius Carassius*(Funa)at Koremasa

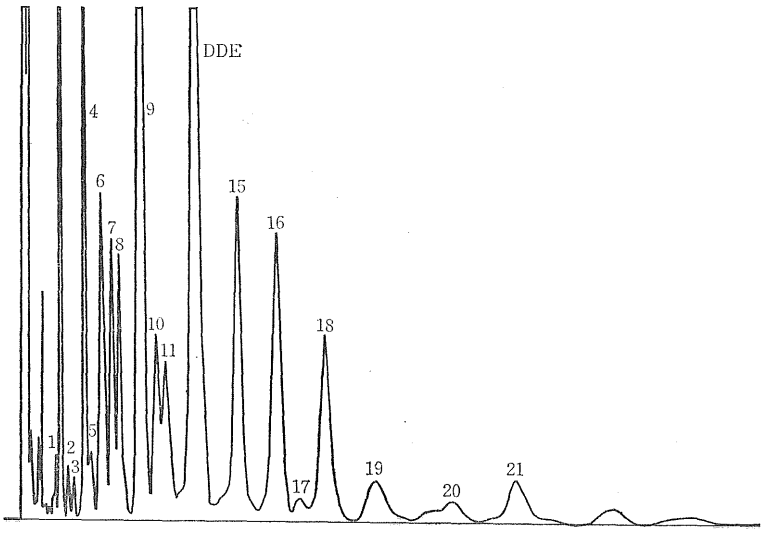


Fig. 6 Gas Chromatogram of PCB in *Harengula zunashi* (Sattupa) at Taisihi Brige

比較して著しく少ないことを示唆するものと考えられる

魚類中の PCB 量は，魚種，魚齢，脂肪含量などにより影響されることが知られており，魚体中の PCB 濃度が必ずしもその生息環境の PCB 汚染の絶対量を表わすとはいえないが，本調査の結果(魚類中の PCB 蓄積量および構成 PCB 含有比の差異) 並びに多摩川底質中の PCB 含量についての資料に基いて考察すれば，下流向うに従い多摩川の PCB 汚染は増加すると解釈され得る．

PCT 蓄積量の平均値は 0.0025 ppm でその範囲は不検出～0.014 ppm であった．上流水域の魚類ではいずれも痕跡であり，PCT が検出されたのは採集地点 No. 5 以降の中，下流水域の試料についてであった．魚類中に検出された残留 PCT の絶対量は非常に低く，また残留 PCB の平均値の約 1/600程度であった．これに対し人体脂中の残留 PCT は，魚類とは著しく異なり，残留 PCB の数分の１程度であることが

Table 3 Pesticide residues in fish collected from the Tama River. (ppm on fresh tissue basis)

Site	Species	No. of samples	Weight (%)	Fat (%)	α-BHC	β-BHC	γ-BHC	δ-BHC	Total BHC	p, p′-DDT	p, p′-DDE	p, p′-DDD	o, p′-DDT	Total DDT
1	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	4- 14	6.6	0.004	0.002	0.002	0.004	0.013	0.050	2.500	0.103	0.073	2.730
2	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	8- 13	3.8	0.003	0.001	0.004	—	0.008	0.002	0.087	0.006	0.004	0.098
3	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	7- 10	5.0	0.001	0.004	0.001	0.001	0.009	0.010	0.393	0.015	0.013	0.430
4	Tribolodon hakonensis (Ugui)	5	4- 6	3.2	0.002	0.001	0.004	0.001	0.008	0.001	0.116	0.011	0.009	0.140
	Zacco platypus (Oikawa)	5	9- 10	1.4	0.001	—	0.002	—	0.003	0.003	0.062	0.004	0.003	0.071
5	Carassius carassius (Funa)	5	15- 20	3.1	0.005	0.002	0.008	0.002	0.016	0.012	0.152	0.043	0.005	0.210
	Gnathopogon elongatus (Tamoroko)	5	7- 11	6.2	0.002	0.011	0.007	0.002	0.022	0.007	0.166	0.061	0.009	0.240
6	Gnathopogon elongatus (Tamoroko)	5	6- 13	6.4	0.003	0.006	0.006	0.003	0.017	0.016	0.226	0.137	0.004	0.380
	Pseudorabora parva (Motsugo)	5	5- 11	5.4	0.002	0.005	0.004	0.001	0.012	0.008	0.166	0.062	0.003	0.240
7	Pseudorabora parva (Motsugo)	5	7- 12	6.5	0.012	0.022	0.009	0.002	0.044	0.017	0.099	0.167	0.011	0.290
	Carassius carassius	3	56- 73	2.7	0.000	0.011	0.003	0.001	0.022	0.019	0.153	0.127	0.013	0.310
8	Carassius carassius	3	43- 59	4.1	0.009	0.017	0.006	0.001	0.033	0.022	0.080	0.156	0.013	0.270
	Pseudorasbora parva	5	9- 12	6.8	0.018	0.025	0.009	0.002	0.053	0.015	0.133	0.193	0.021	0.360
9	Pseudorasbora parva	5	8- 12	6.4	0.015	0.020	0.008	0.002	0.045	0.018	0.125	0.190	0.013	0.350
	Zacco platypus	5	17- 25	7.6	0.009	0.020	0.008	0.004	0.041	0.010	0.081	0.076	0.003	0.170
	Zacco platypus	5	15- 23	7.1	0.007	0.008	0.008	0.002	0.025	0.010	0.039	0.077	0.004	0.130
	Carassius carassius	3	37- 66	2.8	0.007	0.004	0.003	0.001	0.015	0.008	0.119	0.103	0.007	0.240
10	Carassius carassius	3	72-105	5.2	0.008	0.008	0.010	0.002	0.027	0.010	0.040	0.076	0.009	0.130
	Pseudorasbora parva	5	7- 12	7.6	0.016	0.014	0.016	0.003	0.049	0.013	0.108	0.107	0.017	0.240
11	Konosirus punctatus (Konoshiro)	3	35- 41	8.6	0.016	0.009	0.013	0.002	0.040	0.016	0.022	0.030	—	0.069
	Harengula zunashi	4	14- 27	9.0	0.014	0.014	0.016	0.005	0.048	0.051	0.159	0.102	0.004	0.320
12	Anathogobins fiavimanus	5	9- 14	0.9	0.002	0.001	0.004	0.001	0.008	0.007	0.006	0.021	0.002	0.036
	Konosirus punctatus	5	14- 17	3.0	0.005	0.009	0.007	0.002	0.023	0.019	0.025	0.038	—	0.082
	Mugil cephalus	1	940	12.5	0.020	0.035	0.023	0.009	0.087	0.066	0.069	0.172	0.016	0.320
	Mugil cephalus	1	710	10.0	0.013	0.024	0.013	0.005	0.055	0.042	0.080	0.098	0.009	0.230
	Lateolabrax japonicus (Suzuki)	1	390	3.2	0.006	0.006	0.005	0.001	0.018	0.022	0.060	0.053	0.005	0.140

知られている[11~13]. 首都圏, 特に工場および人口密集地域を流域とする多摩川, 中, 下流域の魚類において, PCB に対する PCT の含有比が人体に比べ著しく低いことは, PCT の人体汚染経路を考察する上で興味ある資料を提供しよう.

BHC および DDT 蓄積量は表3に示す通りである. 最上流採集地点で得られたウグイに 2.5 ppm という高い *p,p'*-DDE 蓄積量が認められた以外は, いずれも総 DDT 蓄積量は 0.5 ppm 以下であり, その平均値は 0.32 ppm (標準偏差, $\sigma=0.50$ ppm), その内63%ほどが *p,p'*-DDE (平均値 0.2 ppm, $\sigma=0.4$ ppm) であった.

総 BHC の平均値は 0.028 ppm ($\sigma=0.02$ ppm)でそのうちの40%ほどが β-BHC (平均値 0.011 ppm, $\sigma=0.009$ ppm) であり, α および γ-BHC がそれぞれほ30%どであった. BHC 異性体のこれら構成比は立川[14]や皆川[15]らの報告とよく一致し, 魚食性鳥類の残留 BHC の大部分が β-BHC である[11]のと比べ著しく相違した. PCB 蓄積量は下流に下るにつれ増加するのに比較し, BHC, DDT ともにそのような地域差は特に認められなかった.

魚類中の PCB, DDT, BHC および PCT 蓄積量比は平均値で, 今回の調査では500 : 100 : 10 : 1程度であり, PCB 汚染が最も高いことを認めた. BHC および DDT の日本における自然環境中への投入量はそれぞれ40万トンおよび3万トンといわれているが[16], 魚類中の蓄積量は逆転している. このことは自然環境中における DDT の残留性が BHC 優るといわれている[17]一つの根拠となろう.

4. 要 約

東京都で行なった PCB 合調査の一環として昭和47年8月より11月までに, 氷川大橋より羽田河口に至る多摩川上, 中, 下流計12地点において採集した魚類について, PCB, PCT, BHC および DDT 蓄積量を測定した.

1) PCB 蓄積量は上流水域の魚類では低く, 中流, 下流と下降するにつれ増加する傾向が認められた. すなわち上流水域では, 湿重量当り, 痕跡~0.6 ppm であったが, 府中, 調布周辺では 1 ppm を越えるものが検出され, 河口付近ではサッパ 3.9 ppm, ボラ 7.3 ppm と沿岸魚の暫定許容量を越えるものが認められた.

試料の PCB パターンは, 上流では KC—500 に類似するが, 下流に降るにつた低塩化ビフェニールが検出され, KC—500 に KC—300 および KC—400 が加わったパターンに変化した.

全水域を通じて特に明確な汚染源は見出されなかった.

2) PCT 蓄積量の平均値は 0.0025 ppm, 範囲は不検出~0.014 pdm ときわめて低い値を示し, 平均値で比較すると PCB のそれの 1/600 にすぎなかった. 上流採集地点 No. 1~No. 4 の魚類には痕跡程度しか検出されなかったが, その他検出された8地点において特に明確な地域差は認められなかった.

3) 総 DDT の平均値は 0.3 ppm で, その内60%強が *p,p'*-DDE であり, 総 BHC の平均は0.03 ppm その内40%ほどが β-BHC であった. また PCB のような地域による蓄積量の差は認められなかった.

4) 今回の調査では, PCB, DDT, BHC および PCT 蓄積量比は, 平均値で 500 : 100 : 10 : 1程度となり, PCB による汚染が最も高いことを認めた.

5. 付 記

(本研究は昭和47年度東京都 PCB 総合調査の一環として実施したものである. また報告の大要は日本生態学会昭和48年度大会において発表した.)

文 献

1) Hamond, A.L. : *Science*, 175, 155—156(1972)
2) 厚生省食品衛生調査会：環境保健レポート, 14 3—7 (1972)
3) 道口正雄, 牛尾房雄, 阿部 学：都衛研年報, 23, 271~276 (1971)
4) Jensen, S., Johnels, A. G., Olsson, M. and Otterlind, G. : *Ambio Special Report*, No. 1, 71—85 (1972)
5) 鵜川晶弘, 中村彰夫, 樫本 隆：食衛誌, 14, 415—424 (1973)
6) 東京都：昭和47年ＰＣＢ度総合調査結果報告, 36 (1973)
7) Monsanto Company : *Aroclor Plasticizers*, 三菱モンサント化成株式会社, (1976)
8) 立川 涼, 渡辺 功, 脇本忠明：昭和47年度海洋学会春季大会講演, (1972)
9) 立川 涼, 脇本忠明, 薬師寺積：昭和47年度海洋学会春季大会講演, (1972)
10) 若林明子, 津久井公昭, et al. : 都公害研年報, 5, 80—87 (1974)
11) Doguchi, M., Fukano, S., and Ushio, F. : *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 11, No. 2, 157—159 (1974)
12) 皆川興栄, 滝沢行雄, et al. : 日衛誌, 28, 543

—547 (1974)
13) 西本考男，上田雅彦，田植　栄，近沢紘史，西山　保：医学のあゆみ，87，No. 5，264—265 (1973)
14) 立川　涼，脇本忠明，小川恒彦：食衛誌，11，1—8 (1970)
15) 皆川興栄，et al.：*ibid.*, 13, 317—325 (1972)
16) 立川　涼，et al.：第3回水質汚濁研究に関するシンポジウム講演集，日本水質汚濁研究会，東京，(1972)
17) 立川　涼，田辺信介，脇本忠明：昭和48年度海洋学会春季大会講演，(1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 307 — 312, 1974

日常食事中の残留性有害物質含量

牛尾房雄* 深野駿一* 西田甲子*
可児利朗* 道口正雄*

Some Attempt to Estimate the Tatal Daily Intake of Pesticide and PCB Residues AND Trace Heavy Metals

FUSAO USHIO*, SHUNICHI FUKANO*, KOUKO NISHIDA*,
TOSHIRO KANI* AND MASAO DOGUCHI*

The etimation of dietary intake of pesticide and PCB residues and total Hg, Cd and Pb was made on the average diet of 20-29 years old male. Food materials representing 4-day diet were collected at the retail and department stores in Tokyo. Food items without cooking were divided into 4 food groups, such as cereals, fish and shellfish, meat and dairy products, vegetables and seasoning and subjected to the analysis.

The average daily intake of these substances calculated from the results with the meals prepared for this study were as follows : PCB 8μg, total BHC 3.5μg, total DDT 4.7μg, dieldrin 1.7μg, total Hg 35μg, Cd 38μg and Pb 250μg.

緒　言

重金属および残留性塩素化炭化水素化合物による環境汚染が世の注目を受けるようになってからすでに久しい．この間，環境試料，食品および人体におけるこれら物質の蓄積量に関する報告が多数提出され，その結果これら物質による汚染状況がある程度はあくされるにいたっている．

しかし，環境汚染を考える上で最も重要なことは，その結果人体にいかなる影響を与えるかということであり，そのためには人体への汚染の主経路である日々の食事を通して，どの位の量を摂取しているかを正確にはあくしておかねばならない．

この目的を達成するには，全国的規模で国民の各季節における調理された平均的献立について残留性汚染物質を測定し，国民の平均的な一日摂取量を求め，ＡＤＩと対比する全食事調査が必要である．米国においてはＦＤＡ[2]が中心となり，10代の最も食物摂取量の多い男子の12週間分の調理された平均献立についての調査が行なわれており，また英国では1966年に広範な食事調査[2,3]が遂行されている．

しかるにわが国においては，日常の食事についての国家的調査は行なわれておらず，各機関または研究者が個別に行なった調査[4~7]例が散見されるにとどまる．

本調査は日本人の普通労作の男子を対象とし，都内の一般家庭で簡単に入手出来る食品材料に基き，夏冬各２日計４日分の献立を試験的に作成し，それらを通じての重金属，ＰＣＢおよび有機塩素系農薬の一日摂取量を測定し，また献立内容による差異を検討したものである．ただし食品を群別する都合上，購入した食品材料を調理することなく，献立に従って一人分の原材料を取り分け，４群に分類し，そのまま分析に供した．すなわち一人一日当りの食事原材料中の上記物質の残留量を調査したものである．

献立作成および実験方法

1)　献立作成

夏季献立　栄養所要量は日本人の普通労作の男子（20～29歳）を対象とした．

* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表 1. 作 成 献 立 内 容

	夏 (1973. 7月)		冬 (1974. 2月)	
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
朝	米飯 みそ汁(しじみ) ひじき煮付け 小松菜ひたし なす漬物	トースト(バター) ハムエッグ フレンチサラダ 果物(バナナ)	トースト(マーガリン) ピーナツサラダ (鳥肉入り) 牛乳 果物(りんご)	米飯 みそ汁(大根, わかめ) 五目豆 あじ干物 白菜漬物
昼	米飯 あじフライ 鳥肉野菜煮付け きゅうり漬物	米飯 みそ汁 (とうふ, わかめ) 豚肉しょうが焼 中華風あえもの	米飯 豚肉ソテー 野菜煮付け 小松菜辛子あえ 白菜漬物	パン シチュー (牛乳, チーズ入) ひらめムニエル 生野菜 果物(みかん)
夕	米飯 茶碗蒸し マグロ刺身 なすしぎ焼 きゅうり漬物	冷麦 天ぷら (いか, さくらえび, みつば, なす) 煮豆(そら豆)	米飯 すき焼(卵付き) 大根刻み漬 果物(みかん)	米飯 かき鍋 なます (大根, にんじん, 油揚) たらこあえ
タンパク	84.1 g	79.4 g	109.9 g	110.5 g
脂肪	45.6〃	69.0〃	70.0〃	44.7〃
糖質	472.0〃	364.1〃	361.0〃	367.4〃
カロリー	2,468カロリー	2,409カロリー	2,490カロリー	2,410カロリー
1日分材料費	686円	666円	1,100円	960円

すなわちカロリー所要量2,500カロリーとし，たんぱく質は70 gでこのうち40%を動物性たんぱく質とした．

献立Ⅰの主食は3食とも米飯とし，副食の主材料に魚貝類を用いた．朝食には貝を，昼食には近海魚，夕食には遠海魚を用い，これに野菜類を組み合わせた，いわゆる米飯に魚という日本食の典型的献立とした．献立Ⅱでは，主食をパン，米飯，ひやむぎと変え，副食の主材料には肉類とその加工品，魚類は甲殻類と頭足類を用いた．一人分の食品材料費は1973年7月の時点において，献立Ⅰで686円，献立Ⅱで666円であった．

冬季献立　夏季献立は，献立作成上の慣例に従った標準的なものであったが，冬季においては，いささか異例の献立を作成した．すなわち，献立Ⅲの副食主材料は獣鳥肉のみ，献立Ⅳは魚類を主とし，その使用量も食品群別摂取量に関係なく，2,500カロリーの範囲内で食しうる限りの量とした．

献立Ⅲの主食は米250 g，パン120 gとし，これは夏季より少量である．副食主材料は朝食に鳥肉，昼食に豚肉，夕食に牛肉とし，全量280 gそれに牛乳を加えた．献立Ⅳの主食はⅢと同じであるが，副食主材料は魚肉，貝，魚卵など370 gを用い，この他に少量の牛乳およびチーズが加わる．

冬季は鍋物，煮込み料理としたため野菜類の使用量は夏季より多量となった．献立ⅢおよびⅣの一人分の食品原材料費は1974年2月の時点で，1,100円および960円であった．

4日分の献立内容は第1表に示されるとおりである．

2) 食品材料および試料調製

1973年7月および1974年2月，都内デパートおよび小売店より夏冬それぞれ2日分の食品材料を購入した．各材料の不可食部分を除去後水洗し，水切りした後献立に示される数量を秤取し，A) 穀類，B) 植物性食品(調味料，植物性油脂，海草を含む)，C) 魚介類，D) 畜産製品の4群に群別し，粉砕またはミキサーを用い混合し均一なペースト状とし分析に供した．各食品群の総量は第2表に記載する．

3) 重金属分析

総水銀 試料10～30gに硫酸5ml および硝酸25ml を加え淡黄色澄明な液となるまで加熱分解した．冷後1～2ml の過塩素酸を加え再度加熱分解後，水を加えて100ml としその全量を検液とした．検液に18N硫酸5ml，20%塩酸ヒドロキシルアミン5ml および10%塩化第1スズを5ml 加え還元気化法で紫外部吸収を測定した．使用装置は島津UV—201型分光光度計である．

カドミウムおよび鉛 試料10～30gを秤取し赤外ランプで乾燥炭化した後，電気炉を用い450°Cで灰化した．灰分を希硝酸に溶解，沪過した後0.5N硝酸で100ml に定容しその全量を検液とした．検液に30%クエン酸アンモニウム5ml，硫酸アンモニウム13gを加え，強アンモニア水でpH4.0～4.5に調整し，5%DDTC 1ml を加え混和，次いでMIBK 5ml を加え5分間振とうし，静置後分離したMIBK層をとり原子吸光法によりカドミウム並びに鉛の測定を行なった．

使用装置はパーキンエルマー403型原子吸光分光光度計である．

4) PCBおよび有機塩素系農薬分析

a) 抽出 試料40～150gに100～150ml のアセトン・n-ヘキサン(2：1)混液を加え攪拌し遠心分離後液層を分取し，残渣に100ml のn-ヘキサン・エチルエーテル(15：5)混液を加え再度攪拌抽出し，液層を合した．抽出液を静置し分離した水層を2回50ml のn-ヘキサンで抽出，これを有機溶媒層に合した．次いでこの溶媒層を2%食塩水100ml で2回洗浄し，無水硫酸ナトリウムで脱水後濃縮し目的に応じて下記のClean-up を行なった．

b) 発煙硫酸 Clean-up 法 PCB，BHCおよびDDT分析は主としてこの方法によった．抽出液の適当量をとりこれにn-ヘキサンを加え7ml とする．次いで等量の発煙硫酸(10% SO_3)を加えおだやかに振とうする．

静置し二層に分離後容器をドライアイスにつけ硫酸層を凍結しn-ヘキサン層を分取する．

このn-ヘキサン層をシリカゲルS—1，2gおよびフロリジル2gをつめた積層カラムに注ぎ，n-ヘキサンにて溶出その120ml を集めた．

この区分にPCBおよびDDEが溶出してくる．次いで15%エチルエテール・n-ヘキサン混液で溶出し初めの100ml を集めた．この区分にはBHCおよびDDT，DDDが含まれる．

C) ドライカラム Clean-up 法 環状ジエン化合物の Clean-up は主としてこの方法を用いた．ドライカラムの操作は立川[8]の方法に従い，カラムより15%含水アセトニトリルで溶出後，微アルカリ性としn-ヘキサンに転溶させた．n-ヘキサン層を濃縮し，前記したシリカゲルーフロリジル積層カラムを用いクロマトし15%エチルエーテル・n-ヘキサン溶出区分を集めこれを検液とした．

d) ECDガスクロマトグラフィーによる定性・定量 農薬の同定定量は，2%OV—17および2%DEGS—5%リン酸の2種のカラム，PCBは2%OV—1カラムを用いた．使用装置は島津GC—5A型ガスクロマトグラフ，検出器は電子捕獲型検出器，線源はTrおよび ^{63}Ni であった．

結果および考察

各献立の食品群別摂取量，重金属，PCB並びに有機塩素系農薬の食品群別濃度およびそれらの物質の一日取込量を第2表に示す．

PCBおよび農薬取込量 PCBの一日取込量は不検出～17μg の範囲にあり，平均8μg，食品群別にみると献立ⅡのDの63ppb が最高であり，特に献立内容による著しい特徴というものは認められなかった．都衛生局の1973年夏秋各5日計10日分の食事調査[7]の結果では一日平均約3μg となっている．本調査における最高値17μg と厚生省の暫定許容量250μg/50kg/日と比較しても，その1/15であり，実際の食事からのPCBの取込みは意外に少ない．

1972年までに報告された各食品についてのPCB濃度と国民栄養調査(昭和43年度)による食品別摂取量に基いて，PCBの一日取込量を計算[9]した結果では40～72μg，平均48μg ほどである．この場合取込量の90%ほどが魚介類に由来し，それ以外の食事からは約2～7μg，平均5μg ほどである．この計算に用いた魚介類の平均PCB濃度は0.5ppm であり，この時点において報告された魚介類の分析試料は汚染地域のものが多いとみられるので実際はこれより低いと考えられる．しかしこの計算値でも暫定許容量の1/5である．

総BHCの取込量は3.0～3.9μg，平均3.5μg であり，そのうちγ-BHCは平均2.0μg (1.7～2.5μg)，β-BHCは平均1.1μg (0.8～2.5μg) であった．都衛生局[7]の調査では総BHC一日平均約3μg と近似の値がえられている．WHO[10]の基準によればBHC異性体混合物の摂取許容量は2.5μg/kg/日(125μg/50kg/日)であり，これに比較して本調査の平均値はその

表 2. PCB, 有機塩素系農薬および重金属の食品群別含量並びに一日取込量

献立 No.	食品群	食品摂取量	Hg		Cd		Pb		PCB		Total BHC		Total DDT		Dieldrin		Heptachlor epoxide	
			ppc	μg	ppb	μg	ppb	μg	ppb	μg	ppb	μg	ppb	μg	ppb	μg	ppb	μg
Ⅰ	A	420 g	10	4	42	18	200	84	6	3	1.0	0.4	0.1	—	1.1	0.5	ND	—
	B	582	8	4	ND	—	60	35	4	2	4.3	2.5	0.3	0.2	2.7	1.6	1.4	0.8
	C	196	360	70	19	4	90	18	23	5	2.5	0.5	2.3	0.5	ND	—	ND	
	D	45	50	2	7	—	120	5	20	1	1.3	0.1	13.1	0.6	1.4	0.1	0.3	—
	計		80	80		22		142		11		3.5		1.3		2.2		0.8
Ⅱ	A	390*	10	4	27	10	170	68	6	2	1.3	0.5	0.5	0.2	1.3	0.5	ND	
	B	698	16	11	ND		80	56	5	3	1.2	0.8	0.3	0.2	2.9	2.0	0.8	0.6
	C	67	40	3	13	1	150	10	21	1	1.7	0.1	0.3		0.7		ND	
	D	175	30	5	11	2	180	32	63	11	11.3	2.0	48.7	8.5	ND		1.6	0.3
	計			23		13		166		17		3.4		8.9		2.5		0.9
Ⅲ	A	370**	12	4	97	36	190	72	ND		3.8	1.4	0.1	—	ND		ND	
	B	1,090	5	5	8	8	130	142	〃		2.3	2.5	ND		1.0	1.1	〃	
	D	450	10	5	6	3	160	72	〃		ND		6.1	2.7	1·1	0.5	〃	
	計			14		47		286		—		3.9		2.7		1.6		
Ⅳ	A	370	12	4	97	36	190	72	ND		3.8	1.4	0.1	—	ND		ND	
	B	983	6	6	5	5	80	79	〃		3.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.2	〃	
	C	300	43	13	95	29	220	66	9	3	2.6	0.8	16.3	4.9	0.4	0.1	〃	
	D	40	ND		5		230	9	2		8.9	0.4	7.4	0.3	ND		〃	
	計			23		70		226		3		3.0		5.6		0.3		

* 米 150 g, パン冷麦 240 g
** 米 250 g, パン 120 g
A；穀類　B；植物性食品（調味料，植物性油脂，海草を含む）
C；魚介類　D；畜産製品

1/30ほどに当る．立川[5]らが1970年に松山市の市場より購入した食品を用いて作成した食事献立の分析結果では，一日当りの総ＢＨＣ量は60～370μg であった．また1971年高知衛研[4]でおこなった都市の成人10日間の食事については，総ＢＨＣの一日取込量 67μg と報告されている．上田[4]らは農薬規制の効果として1969年から1971年の２年間に牛乳中ＢＨＣが約1/10，牛肉中では約 1/8 に減少したと述べている．1972年１月にＢＨＣおよびＤＤＴの使用が禁止され，それからほぼ２年後に行なわれた本調査の結果が立川や上田らの分析値より著しく低いことは，規制および禁止の効果の反映であると解釈される．

本調査における一日総ＤＤＴ取込量は 1.3～8.9μg，平均4.6μg であり，そのうち pp′-DDE は0.8～5.0μg，平均2.8μg で，総ＤＤＴの約 60% ほどがＤＤＥである．都衛生局[7]の調査でも一日平均4.8μg と報告されている．ＷＨＯ[10]の定めたＤＤＴの摂取許容量は 5μg /kg/日（250μg/50kg/日）であり上記の値はその1/50ほどに過ぎない．第２表に示されるように，主食および野菜類のＤＤＴ濃度は低く，取込量の90%またはそれ以上は畜産製品（献立Ⅱ，Ⅲ）または魚介類（献立Ⅳ）に含まれる．上田[4]らの調査ではＤＤＴの一日取込量は 23.2μg であり，本調査の結果の５倍ほどに当る．

ディルドリンの一日取込量は0.3～2.5μg，平均 1.7 μg であり，そのうち 70%ほどは植物性食品に含まれる．ＷＨＯ[10]のディルドリンの摂取許容量は 0.1μg /kg/日（５μg/50kg/1日）であり，その 1/3ほどの量を取込んでいることになる．１週間の患者給食を分析した松島[6]（1971年）の報告では 2.7μg，上田[4]らによると4.8μg である．1971年４月にディルドリンは樹木（果樹を除く）を害する昆虫の殺虫以外に使用せぬよう規制[11]されたが，食事中のディルドリンの減少率はＢＨＣやＤＤＴより低いようにみうけられる．

献立ⅠおよびⅡの食品群BおよびDよりヘプタクロルエポキサイドが検出されたが一日取込量はWHO[10]の規準0.5μg/kg/日をはるかに下まわる量である.

重金属取込量　総水銀の一日取込量は14～80 μg, 平均35μg であった. 最高値を示した食事はマグロの刺身を配した献立Ⅰであり, この献立の総水銀の90%ほどがC群に含まれる. 現在までに報告された各種食品中の水銀含有量の平均値に国民栄養調査による食品の摂取量を乗じ, 一般的日本人の一日当りの総水銀取込量を試算した場合, 44.5μg となるという報告[12]がある.

カドミウムは13～70μg, 平均38μg であり, 献立Ⅳを除きその80%またはそれ以上が穀類に含まれる. カキ鍋を配した献立Ⅳではその40%がC群に検出されたが, その大部分はカキに由来するものと思われる. WHOの報告[13]によれば, 各国における食事を通してのカドミウム取込量は50μg 以下～150μg/日と推定されており, またWHOの提案するカドミウムの暫定基準は, 400～500 μg/週/人 とされているがこの値は本調査の平均値の約2倍に当る.

鉛の一日取込量は142～286μg, 平均205μg であった. 先進工業国における全食事調査の結果, これらの国では200～300μg/日/人の鉛を取込んでいると報告[13]されているが, 本調査の結果はこの範囲に入る. WHOの鉛についての暫定基準[13]は3mg/週/人であり, この値は本調査の平均値の約2倍に当る.

以上のごとく, 夏冬各2日計4日分の試験的献立を作成し分析した結果, PCB, 総BHCおよび総DDTの一日取込量は数 μg, ディルドリン1～2μg, 総水銀およびカドミウムは約40μg, 鉛200μg となることを認めた. これらの分析値は都衛生局の行なった日常食10日分の分析結果とよく一致した.

このような少数例の結果から, 一般都民のこれら物質に対する安全性を論ずることは問題であるが, 少なくとも本調査に使用した食品材料および献立に関する限り, 人の健康に直接影響を与えるほどの量の有害性物質は検出されなかったということになる.

マグロを含む献立に総水銀が比較的多く認められた他は, 献立内容の変化による明らかな特徴というものは特に認められなかった.

前記したように, 本調査では調理した食事を供試したものではなく, 食品材料を献立に従って分取し分析した, すなわち一日分の食事原材料中の汚染物質含量を測定したものである. 食品によっては, 調理によってこれら物質の一部が除去される[14,15]ことが知られているが, そうであるならば第2表に示された数値より低い値となるはずである. しかしppb レベルの塩化素炭化水素の分析精度を考慮すれば, その差異が重要な意味を生ずるほどのものとは思われない.

要　約

日本人の普通労作の男子を対象とした夏冬各2日計4日分の食事献立を作成し, それに従って食品材料を一人一日当りの摂取量に別け, 調理することなく原材料のまま重金属, PCBおよび有機塩素系農薬の分析に供した.

一日分の食事材料中に含まれる上記物質の平均値は, PCB 8 μg (N.D～17μg), 総BHC 3.5μg (3.0～5.9μg), 総DDT 4.7μg (1.2～9.0μg), ディルドリン 1.7μg (0.3～2.6μg), 総水銀35μg (14～80μg), Cd 38μg (13～70μg), Pb 205μg (142～286μg) であり, 一部試料に少量のヘプタクロルエポキサイドが検出された. これらの値はいずれもADIを下まり, 特に指摘すべき問題点は認められなかった.

〔付　記〕

本研究は昭和48年度都立衛生研究所研究課題「日常食事中の残留性有害物質含有量調査」として実施したものである.

文　献

1) Dugan, R.E., Lipsscomb, G.Q., Cox, E.L., Heatwole, R. E. and Kling, R. C. : *Rest. Monit.* 5, 73 (1971)
2) Harries, J.M., Jones, C. M. and Tatton, J. O'G. : *J. Sci. Ed. Agric.*, 20, 242—245 (1969)
3) Abbott, D.C., Holmes, D.C. and Tatton, J. O'G. : *ibid*, 20, 245—249 (1969)
4) 上田雅彦, 田幡栄, 近沢紘史, 西本考男 : 食衛誌, 12, 445—449 (1971)
5) 立川涼, 薬師寺積, 川北啓子 : 日本農芸化学会, シンポジウム食品と公害講演要旨 11—12 (1970)
6) 松島松翠 : 臨床栄養, 39, 19—25 (1971)
7) 東京都衛生局公衆衛生部栄養課 : 昭和48年度食生活有害物質実態調査結果, (1974)
8) 千葉幹雄 : PCB汚染とその分析法, ラティス刊 p 134, (1973)
9) 上田雅彦 : 食の科学, No. 8, 78—82 (1972)
10) WHO *Technical Report Series* : No. 458, 19—28 (1970)
11) 農林省令第26号, 1971年4月

12) 近藤雅臣：衛生化学，20，47—66 (1974)
13) WHO *Technical Report Series*, : No.505, 11—24 (1972)
14) 武田明治，大槻久美子，関田寛，田辺弘也，岡島幸子，酒井陽子：食衛誌，14，142—148 (1973)
15) Ritchey, S.J., Young, R.W. and Essary, E. O. : *J. Agr. Food Chem.*, 20, 219—293 (1972)

東京衛研年報
Aaa. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 313 — 320, 1974

ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅲ）
—一時尿中の鉛と 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 (Ⅲ)
Relations Between Lead Contents and the Concentration of δ-Aminolevulinic Acid, Coproporphyrin and Urobilinogen in a Temporary Urine

KUNIO BUSHIMATA*, SATOKO SHIMODA*, KIMI OGASAWARA* AND HIROSHI YAGYU**

Tokyo Metropolitan Health Bureau is performing the health examination as to the lead poisoning against the inhabitants, since an event of lead pollution by the exhaust gas of a car and another engines happened in May 1970. However, the typical lead poisoned person is not found so far as the result of the health examination, for the medical technologic data on urinary output lead and δ-aminolevulinic acid were low level, and it was announced from officially and searchingly.

But in latest reports are reveal a suspicion on the diagnosis of lead poisoning according to the medical technologic data on a sample of urine, because it is low relationship between analytical data and clinical manifestations at the mild poisoning condition.

So it is attempted to calculate the coefficient of correlation between the gradational classified urinary output lead, i. e., Group(A): all subjects, Group (B) : subjects of more than the mean value, Group (C) : subjects of more than the rejection limit on 1 % level of significance, and the medical technologic data, to make it clear that actual reliability.

The following results were obtained :

Coefficients of correlation of lead to the δ-aminolevulinic acid are : (A) 0.2238, (B) 0.0865, (C) −0.3685 in the men and (A) 0.2403, (B) 0.1042, (C) 0.1843 in the women ; to the coproporphyrin are : (A) 0.3169, (B) 0.1750, (C) 0.1769 in the men and (A) 0.2723, (B) 0.2251, (C) −0.4078 in the women ; to the urobilinogen are : (A) 0.2817, (B) 0.2092, (C)−0.1466 in the men and (A) 0.2464, (B) 0.2397, (C) 0.0686 in the women.

Coefficients of correlation of lead and each of item were very small, and then the urinary output lead was increased gradationally, but none the less relationships were reversely tend to decrease.

Thus, these results suggest that the reliability of practical value with early findings of impediment by lead is generally deficient on the screening test of Tokyoites.

はじめに

昭和45年に自動車エンジンなどの排気ガスによる大気の鉛汚染問題が提起されて以来，交通量の多い地域住民（以下住民と記す）に対して鉛害検診が行なわれているが，一時尿を用いたスクリーニングテストの結果では，尿中に排泄される鉛およびポルフィリン代謝系成分ともに低水準であり，労働基準法施行規則第35条第14号[1]（以下労基法施則と記す）に掲げられている鉛中毒認定基準に該当するような典型的鉛中毒患者は発見されていない実状である．

報告[2]によれば，尿中鉛は中等度の吸収でかなり早期から排泄増加が見られ，一般には 150μg/l が危険値

* 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
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

の最低と考えられ，400μg/l 以上では，いずれ鉛害症状を呈するようになるとされている．また，鉛関係作業のような労働環境による高濃度の鉛暴露者ではポルフィリン代謝系成分の尿中排泄量が増加し，鉛との相関度が高いことが報告[3-7]されている．しかし，一般住民のような低鉛排泄状態では，尿中 δ-Aminolevulinic Acid（以下 δ-ALA と記す）および Coproporphyrin（以下 Cp と記す）との特異的関係については明らかにされていない．それゆえに，一般環境汚染程度でも高濃度鉛暴露者と同様の傾向が見られるか，また，どの程度の尿中鉛排泄水準からポルフィリン代謝系尿成分との相関が現われるのかを明らかにするために，機会があって得られた住民の一時尿を用いて，尿中排泄鉛とポルフィリン代謝系成分（δ-ALA, Cp）ならびにヘム代謝終末産物である尿中 Urobilinogen（以下 Ug と記す）の定量測定を行ない，尿中鉛と各代謝成分との関連性について吟味をしたので報告する．

検査方法

1. 調査対象について

東京都衛生局が，都内の交通量が多い主要道路交叉点近辺に居住する住民に対して実施している鉛害検診の受診を希望した18歳以上の成人，男性286名，女性400名の午後2時前後の一時尿によった．

2. 検査期間について

昭和46年9月～47年3月（15保健所）および昭和47年10月～48年2月（5保健所）．

3. 検査項目と定量分析方法について

1) 尿中鉛の定量分析方法[8-9]

脱鉛キールダールコルベンに試料を取り，湿式灰化後にアンモニアでpH9.8程度に修正をなし，ジチゾン・メチルイソブチルケトン(MIBK)で鉛を抽出して，原子吸光分析法によって定量測定を環境衛生研究科が担当した．

2) 尿中代謝成分の定量分析方法

i）尿中デルタ・アミノレブリン酸

和田ら[10]の方法を一部改良[11]して分析を行なった．

ii）尿中コプロポルフィリン

栄養研究科生化学研究室で開発した微量けい光法[12-13]に従って分析を行なった．

iii）尿中ウロビリノーゲン[14-15]

採尿当日に試料の還元操作をなし，約15時間経過後（翌日），佐藤法にもとづいて分析を行なった．

4. 推測統計手法について[16-17]

尿中鉛濃度の変化に従って，尿中 δ-ALA, Cp および Ug 濃度との相関係数がどのように変化するかを求める鉛濃度変化の区切りの目安とするために，尿中鉛測定値を次のように推測統計処理を行なった．尿中鉛測定値につき，分析方法による誤差などを考慮して3μg/l 以下のデータは対象から除外し，ついで鉛測定値を性別に分け，Smirnov の方法にもとづいて危険率1％水準における棄却限界値を，棄却データを全く含まなくなるまで繰り返して演算を行ない（異常データ削除），信頼限界範囲内のデータのみについて平均値および棄却限界値を求めた．

以上のようにして求められた数値をもとに，尿中鉛濃度と尿中 δ-ALA, Cp および Ug 濃度の関係がどのような鉛濃度水準から絶対的因果関係として観察されるようになるのか，その変曲鉛水準を発見する基礎資料とするために次のような試みを行なった．

まず，性別に分けた尿中鉛分析値を，(A)全体の群，(B)平均値以上の群，(C)棄却限界値以上の群，のように三つの階級群に分け，各々尿中 δ-ALA, Cp および Ug の分析値と対応させて，各項目について三つの相関係数を算出するとともに，その係数の有意性についてF検定を行なった．

結果および考察

1. 尿中鉛分析値の推測統計処理結果

前記の推測統計手法にもとづいて得られた尿中鉛濃度関連数値を Table 1. に示す．

Table 1. Results of Statistical Analyses on the Cases having more than 3μg Urinary Lead/Liter

Item		Men	Women
Number of All Subjects		233	286
Number of Objects		212	272
Mean Value (μg/l)		6.5	5.9
Rejection Limit (μg/l)	upper	13.3	13.1
	lower	−0.2	−1.4

この表から明らかなように，平均値および棄却限界上限値ともに男性に高く女性は低い実態であった．これは他の報告[18]にも見受けられることで，生理代謝の違いや労務の相違などにも基因していると考えられる．

平均値あるいは正常値などについて多くの報告[4) 6) 19)]があるが，それらに比べると鉛濃度3μg/l 以下の分析値を除外した統計数値であるにもかかわらず，今回調査対象となった住民の尿中鉛濃度は低い結果であった．

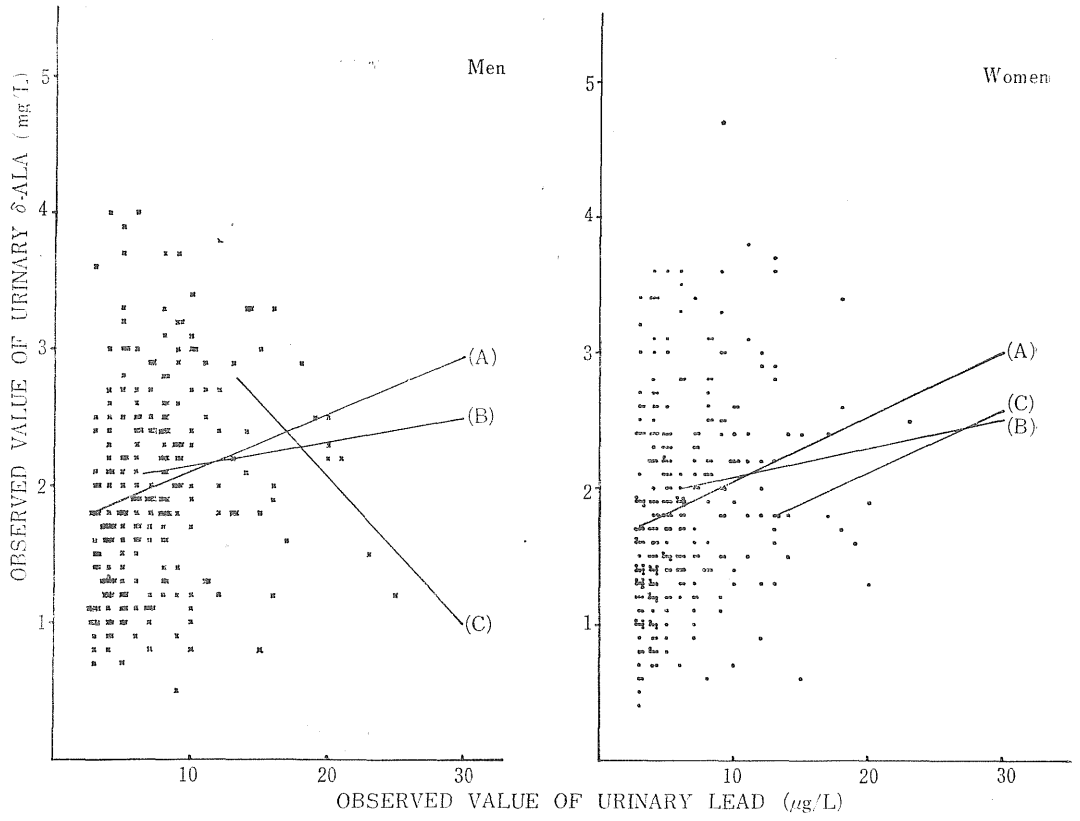


Fig. 1. Urinary Levels of δ-ALA Plotted against Those of Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	233	0.2238	$P<0.01$	0.042	1.681
	(B)	122	0.0865	N. S.	0.017	1.972
	(C)	23	−0.3681	N. S.	−0.108	4.214
Women	(A)	286	0.2403	$P<0.01$	0.048	1.569
	(B)	128	0.1042	N. S.	0.022	1.863
	(C)	14	0.1843	N. S.	0.047	1.186

Group (A) : All subjects of urinary lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of urinary lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of urinary lead,
N. S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

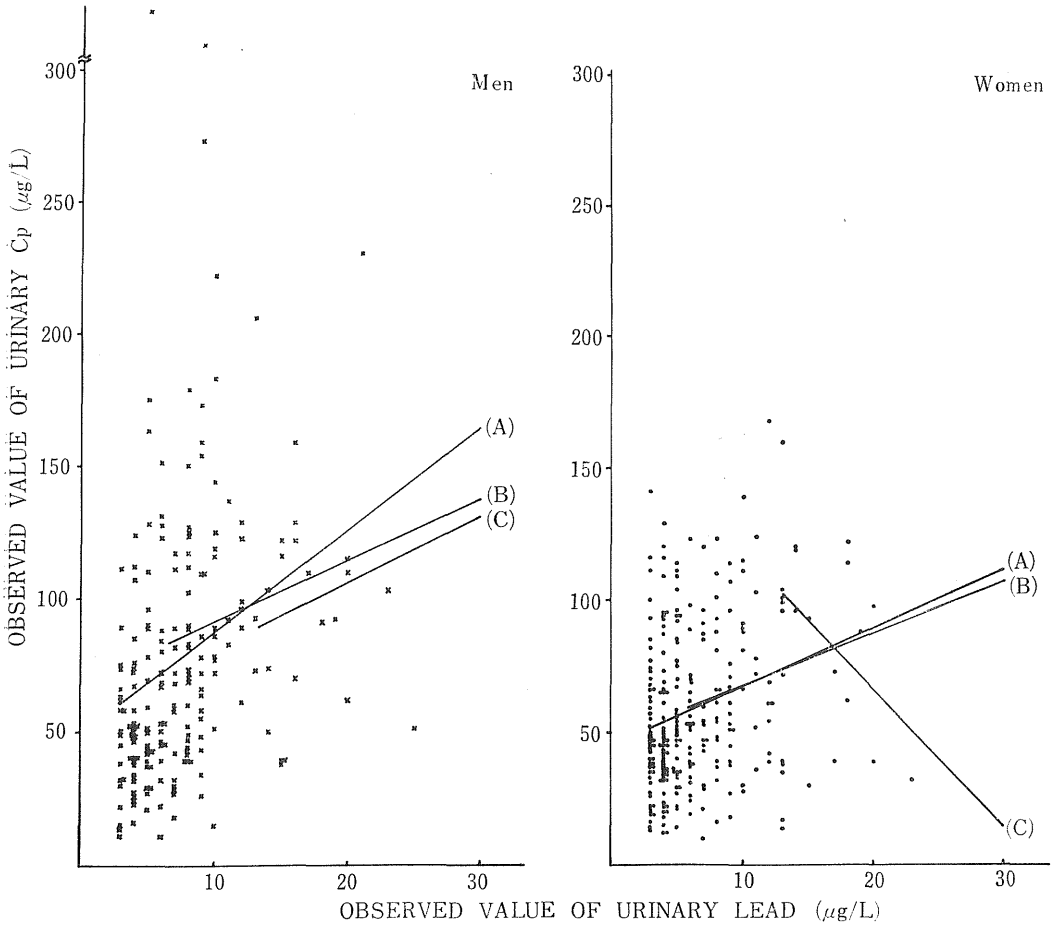


Fig. 2. Urinary Levels of Cp Plotted against Those of Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	197	0.3169	$P<0.01$	3.868	48.70
	(B)	103	0.1750	N. S.	2.330	67.96
	(C)	20	0.1769	N. S.	2.468	56.37
Women	(A)	267	0.2723	$P<0.01$	2.232	44.58
	(B)	121	0.2251	N. S.	2.035	46.72
	(C)	14	−0.4079	N. S.	−5.196	170.18

Group (A) : All subjects of urinary lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of urinary lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of urinary lead,
N. S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

2. 尿中排泄鉛と δ-ALA の関係

尿中鉛分析値に対応する δ-ALA 分析値のバラツキかたについて，分布の型を表わす直線を加えた散布図を Fig. 1. に示す．

Fig 1. に示した相関係数のF検定の結果についてみると，鉛分析値の全体の群（以下(A)群と記す）では男性 r =0.2238, 女性 r =0.2403, ともに危険率1％以下で有意であったが，鉛分析値の平均値以上の群（以下(B)群と記す）と鉛分析値の棄却限界値以上の群（以下(C)群と記す）では男女ともに5％以上の危険率で有意でなかった．また，男性(C)群においては相関係数がマイナスとなった．

Fig. 1. にプロットされた尿中 δ-ALA の分布の実態を見ると，労基法施則に掲げられている，尿中 δ-ALA の鉛中毒認定基準値[1]（6mg/l 以上の検出）以上の被検例は見受けられない．

さらに，尿中 δ-ALA の正常値については，Nakao ら[20]の2.9±1.4mg/l, Kasahara[21]の4.0mg/l（統計上限値）あるいは田口ら[18]の職業的鉛暴露のない男女からのスポット尿について，男性2.05±0.96mg/l, 女性1.59±0.90mg/l などの報告があり，また，栄養研究科生化学研究室では鉛害および公害検診を受けた都民の一時尿について，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％における統計的棄却限界上限値，男性4.50 mg/l, 女性3.95mg/l を得て報告[22]を行なっている．Fig. 1. に示されているプロットを見ると，尿中δ-ALA がこれらの数値をこえる例は少ないとはいえ，尿中鉛濃度の低い場合においても棄却限界上限値程度の排泄濃度に達する例もある．このことを，散布図と相関係数で総合的に解析すると，尿中排泄 δ-ALA の増加が鉛の Haem 代謝障害のみによって起こると仮定すれば，低鉛濃度の被検者尿状態ではこれを否定し，鉛による直接的な障害だけではなく，ほかの原因が加わっていると考える．ゆえに，低いながら鉛が尿に排泄されていることや，測定範囲内における鉛濃度の段階的上昇にもかかわらずその相関係数が低下し無相関となることから，一般生活環境下の低水準尿中鉛排泄の段階では，尿中鉛と δ-ALA との直接的因果関係は結論づけられないと考える．

3. 尿中排泄鉛と Cp の関係

尿中鉛分析値に対応する Cp 分析値のバラツキかたについて δ-ALA の場合と同じく散布図を Fig. 2. に示す．

相関係数のF検定の結果についてみると，

男性(A)群 r =0.3169, 女性(A)群 r =0.2723, は危険率1％以下で，女性(B)群 r =0.2251では危険率5％以下で有意であったが，男性(B)(C)群および女性(C)群では危険率5％以上で有意性が得られなかった．なお，女性(C)群において相関係数がマイナスとなった．

労基法施則の鉛中毒認定基準[1]にともなった尿中Cp濃度は 150μg/l 以上の検出とされているが，Fig. 2. のプロットが示すように，基準値以上の測定例は，男性16名，女性2名であった．

また，尿中 Cp の正常値については，Nakao ら[20]の 70±40 μg/l, Kasahara[21] の 110μg/l（統計上限値）や50～200 μg/l[23] などの報告がある．

筆者の研究室では，鉛害および公害検診の検査成績から，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％における棄却限界値について，男性162.1μg/l, 女性152.7 μg/l という結果を得て報告[22]を行なった．これらの数値を基準にすると尿中 Cp 濃度の分析値が高いにもかかわらず，尿中鉛濃度が鉛中毒認定基準値[1]（150 μg/l 以上の検出）には達していないことが Fig. 1. のプロットの分布状態からわかる．また，Fig. 2. のプロットを見ると，低い尿中鉛濃度水準の住民からも尿中 Cp 濃度の異常者が検出されている．このようなことから，δ-ALA の場合と同じく尿中鉛濃度の上昇にもかかわらずその相関係数が低くなったり無相関となることから，都住民のような低鉛濃度段階では，尿中の鉛と δ-ALA とは直接的因果関係があると見なすことは出来ない．

4. 尿中排泄鉛と Ug の関係

尿中鉛分析値に対応する Ug の分析値のバラツキかたについて，散布図を Fig. 3. に示す．

相関係数の検定を行なってみると，男性の(A)群 r =0.2817, および女性の(A)群 r =0.2464, (B)群 r =0.2397 は危険率1％以下で，また，男性(B)群 r =0.2092は危険率5％以下で有意であったが，男女とも(C)群では危険率5％以上で有意ではなかった．男性(C)群では相関係数がマイナスとなった．

尿中 Ug の正常値の報告は0～4.0 mg/day,[24] 0.5～2.0mg/day[25] などと一日単位で示されている．

筆者の研究室では，都住民の鉛害および公害検診受診者の一時尿を用いて，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％における棄却限界上限値，男性3.81 mg/l 女性3.49mg/l を得て報告[11]を行なった．

今回においてこの数値以上の測定例の出現は男女ともに15名であった．

Fig. 3. の散布図が示すように，尿中鉛濃度が低いにもかかわらず高い Ug 濃度を示すプロットが見られ

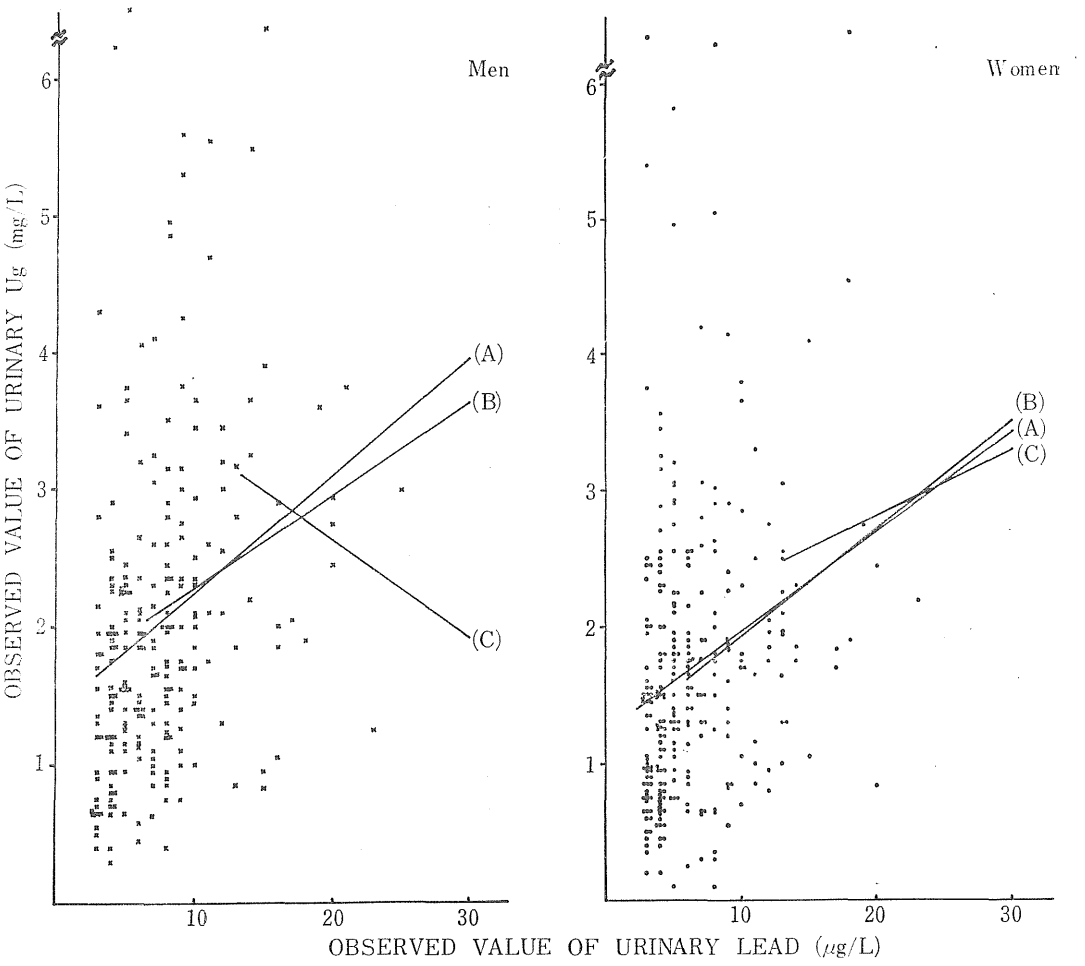


Fig. 3. Urinary Levels of Ug Plotted against Those of Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	233	0.2817	$P<0.01$	0.086	1.386
	(B)	121	0.2092	$P<0.05$	0.068	1.605
	(C)	21	−0.1466	N. S.	−0.147	4.036
Women	(A)	285	0.2464	$P<0.01$	0.074	0.220
	(B)	127	0.2397	$P<0.01$	0.079	1.147
	(C)	14	0.0686	N. S.	0.049	1.846

Group (A) : All Subjects of urinary lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of urinary lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of urinary lead,
N. S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

考　按

鉛作業従事者とは異なる一般環境下の住民の一時尿中鉛と尿中 δ-ALA, Cp および Ug の各々の相互関係をここにまとめて考按する.

まず，尿中鉛の全体の群(A)における相関係数の大きさを順番に並べると，

男性：Cp, r= 0.3169($p<0.01$)>Ug, r=0.2817($p<0.01$)>δ-ALA, r=0.2238($p<0.01$)

女性：Cp, r=0.2723($p<0.01$)>Ug, r=0.2464($p<0.01$)>δ-ALA, r=0.2403($p<0.01$)

の順序で男女ともに Cp の相関係数がもっとも大きかった．このことは，尿中 δ-ALA は Cp よりも鉛障害に対して敏感であるがゆえに早期に影響が現われるということから意義が高いという報告があるにもかかわらず，ここにおけるわれわれの調査研究結果からは，住民検診における Cp の測定意義を無視することが出来ないことを意味している．しかし，尿中鉛濃度が高い場合でも，尿成分との相関係数は性別を問わずいずれの成分ともに低下またはマイナスとなっていることから，低濃度鉛暴露住民のように尿中鉛濃度および代謝成分ともに低水準では，鉛作業従事者のような高濃度暴露にみられる状態とは趣を異にし，絶対的因果関係を示すものでないことがわかった．

被検尿中の鉛水準では，鉛分析値の全体の群よりも平均値以上の群において相関係数が低くなり棄却限界上限値以上では全部が無相関であったことから，その絶対的因果関係を示す尿中鉛濃度はもっと高い水準にあることを意味している．

なお，尿中代謝成分の異常値出現状況は，男女ともに Ug＞Cp＞δ-ALA であった．このことは，鉛以外の因子に直接的な影響を受けにくいのが δ-ALA であると考えられる．

また，低鉛暴露下の住民がこのような結果を示したことは，尿中 δ-ALA, Cp および Ug の排泄状態は鉛による直接的な影響を受けるよりも，他の疾患や種々の因子によって隠蔽され，一般生活環境程度の鉛暴露では生体の防御機能に守られ，直接的障害として現われないのであろう．さらに，鉛取り扱い労働環境で起こりうる鉛中毒が生活環境の鉛暴露状況下では起こりえない報告があり，住民の鉛障害が労基法施則の基準段階まで進行しなくても，鉛の人体におよぼす影響が調べられるような，より効果的な臨床検査種目の開発研究，あるいはすでに行なわれているスクリーニング検査種目の選択が望まれる．

さらに，早期に鉛障害を検索するためには，尿中鉛濃度のみでなく血中鉛濃度との関係を合わせて吟味する必要がある．

まとめ

交通量の多い地域住民の一時尿について，尿中鉛とヘム代謝中間尿成分（δ-ALA, Cp）および代謝終末尿成分（Ug）との相互関係をしらべた．

1) 尿中鉛と尿中の δ-ALA, Cp および Ug との相関度はいずれも低かった．また，鉛中毒認定基準値や正常値などをこえる尿中 δ-ALA および Cp の測定被検例は，尿中鉛濃度の低い場合にも見受けられた．

2) 尿中鉛濃度の段階的な上昇に従った各尿成分との相関関係を吟味しても，各相関係数は大きくならず，反対にマイナスになる場合は高濃度鉛の区分群に見られた．

3) 尿中鉛分析値の全体の群から見た各尿成分との相関係数の順序は，

男性：Cp, r=0.3169($p<0.01$)>Ug, r=0.2817($p<0.01$)>δ-ALA, r=0.2238($p<0.01$)

女性：Cp, r=0.2723($p<0.01$)>Ug, r=0.2464($p<0.01$)>δ-ALA, r=0.2403($p<0.01$)

であった．しかし，異常値出現の順序は男女とも Ug＞Cp＞δ-ALA であり，尿中鉛との相関係数が一番小さいのが δ-ALA であったが，異常値出現が最も小さかったことから，鉛害のスクリーニングには今回対象とした尿中成分の中では δ-ALA が最もよいと思われる結果であった．

本研究の要旨は日本衛生検査学会第22回大会：昭和48年5月12日で発表した．

なお，本研究を述べるに当って，尿中鉛の分析を担当された，当所環境衛生研究科，秋山和幸，高橋利恵子両氏に謝意を表します．

文　献

1) 労働省労働基準局長通達：労働の科学，26，54—67 (1971)

2) 和田　攻：公害による疾患，初版，　192—198 (1971) 南山堂，東京

3) Davis, Joseph R., Abrahams, Ronald, H., Fishbein, William I. and Fabrega, Enrique A.,: Arch. Environ. Health, 17, 164—171 (1968)

4) 久保田重孝，北山孝允：労働の科学，22，19—24 (1967)

5) 山本丈夫，祐田泰延，青木稔，高橋亮司：産業医学，12，5—10 (1970)

6) 和田攻，矢野雄三，小野哲，長橋捷，豊川行平

：日衛誌，29，143 (1974)
7) 松本久男：臨床病理，19，56—62 (1971)
8) 野牛弘：衛生検査，20，581—587 (1971)
9) 野牛弘，秋山和幸，高橋利恵子，長崎護：日衛誌，26，137 (1971)
10) Wada O., Toyokawa K., Urata G., Yano Y. and Nakao K. : British J. of Industrial Medicine, 26, 240—243 (1969)
11) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公，野牛弘：東京都立衛生研究所研究年報，24，303—310 (1973)
12) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：衛生検査，21，318 (1972)
13) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：東京都立衛生研究所研究年報，24，297—302 (1973)
14) 陳敏馨：臨床検査，6，497—499 (1972)
15) 陳敏馨：臨床病理，11，207—210 (1963)
16) 鳥居敏雄，高橋晄正，土肥一郎：医学・生物学のための推計学，第4版 (1962) 東京大学出版会
17) 農林省家畜衛生試験場，農林省畜産局衛生課監修：家畜衛生に必要な調査，統計の知識(1970) 日本獣医師会発行
18) 田口徹也，鈴木庄亮，横橋五郎：産業医学，12 18～19 (1970)
19) Goldwaster, Leonard J. and Walter, Hoover A. : Arch. Environ. Health, 15, 60—63, (1967)
20) Nakao, K., Wada, O. and Yano, Y.:Clinica. Chim. Acta, 19, 319—325 (1968)
21) Kasahara, A. : Osaka City Medical Journal, 11, 99—117 (1965)
22) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：東京都衛生局学会誌，53，66—67 (1974)
23) 高久史麿：血液・尿化学検査—その数値をどう読むか—：日本臨床，364，180—191 (1973)
24) 柴田進，高橋浩：臨床化学の技術，38年版，186～190，金原出版K.K.，東京
25) 金井泉：臨床検査法提要，金原出版，東京

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 321 — 329, 1974

ポルフィリン体の生化学的研究（Ⅳ）
血中鉛と一時尿中の鉛，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 (Ⅳ)
Rlations on the Lead, δ-Aminolevulinic Acid, Coproporphyrin and Urobilinogen Values in a Temporary Urine Corresponds to the Bloody Lead Values

KUNIO BUSHIMATA*, SATOKO SHIMODA*, KIMI OGASAWARA* AND HIROSHI YAGYU**

It was described in the previous report that the reliability with early findings of lead impediment on the medical technologic data of urinary output lead, δ-ALA and Cp were relatively little value on Tokyoites.

Increase of δ-aminolevulinic acid and coproporphyrin is induced in the consequence of interference for haem-metabolism by an inhibitor of enzyme reaction, for example wellknown lead.

The analysis of lead in red blood cell is reliable than the lead in urine.

The observed value of lead in blood were also low level on the health examination, being analogous to the case of lead in urine.

In this time, therefore, it was attempted to calculate the coefficient of correlation between the lead in blood and output components in urine on the same purpose and means as the previous reports.

The bloody lead value was classified as follows, (A) all subjects, (B) subjects of more than the mean value and (C) subjects of more than the rejection limit.

The results were obtained as follows :

Coefficients of correlation of lead to the δ-aminolevulinic acid are : (A) 0.0772, (B) 0.0863, (C) −0.1184 in the men and (A) 0.0725, (B) 0.0204, (C) 0.1421 in the women ; to the coproporphyrin are : (A) 0.0304, (B) 0.0377, (C) −0.2006 in the men and (A) 0.0262, (B) −0.0489, (C) 0.2518 in the women ; to the urobilinogen are : (A) 0.0247, (B) −0.0125, (C) −0.1282 in the men and (A) 0.0992, (B) 0.0984, (C) 0.0338 in the women ; to the urinary lead are : (A) 0.2914, (B)0.2490 (C) −0.6067 in the men and (A) 0.1588, (B) 0.1586, (C) 0.5395 in the women.

Coefficients of correlation of lead to the items were vesy small or reversed on the actual circumstances of inhabitants. Therefore, these results suggest that the selection of more suitable medical technologic item to the early findings is necessary for health examination.

* 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
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

はじめに

都市では環境汚染の一つに鉛害問題があり，住民の健康を守るために，生活環境上の鉛汚染が人体にいかなる影響をおよぼすかについての解明が重要である．

われわれは，都居住民についての鉛害に関する調査研究として，ポルフィリン体に関する生化学的研究[1-2]を続け，都居住民の尿中 δ-Aminolevulinic Acid（以下 δ-ALA と記す），Coproporphyrin（以下 Cp と記す）および Urobilinogen（以下 Ug と記す）の実態を明らかにしてきた．

また前報[2]において，都居住民の一時尿中鉛と尿中 δ-ALA, Cp および Ug との関係について解析を行ない，現在の都居住民にみられるような尿中鉛濃度の低い水準範囲では，尿中鉛濃度の上昇変化にともなって尿中 δ-ALA, Cp および Ug の尿中排泄増加が起こらないこと，あるいは鉛濃度が低くてもこれら三者に異常値が出現することなどから，人体が一般環境程度の鉛汚染を受けた場合の直接的因果関係が尿中 δ-ALA, Cp および Ug に現われないことを述べた．また，山賀[3]らは低濃度気中鉛に短時間暴露されるような作業では，血液一般所見，尿中 δ-ALA などの生体反応には影響が現われがたく，低濃度鉛暴露の評価は難かしいことを認めたと報告している．

鉛中毒は，鉛が赤血球中においてヘム合成代謝系のほぼ全過程を抑制的に乱し，その結果として尿中に δ-ALA および Cp の排泄が増加する代謝的中毒症状として発現するのであると報告されている．しかし，以上のような特異的生体反応を引きおこす鉛中毒は，鉛取り扱い業務労働環境下において見受けられるが，一般環境下の鉛汚染程度の微量暴露状況下では，典型的鉛中毒症状として出現する可能性はきわめて乏しいと考えられている[5-7]．このことは，大量の鉛暴露を受けても血中鉛はあまり上昇せず，一般に 70～80μg/100g は非障害性鉛吸収，80～150 μg/100g は危険性鉛吸収を示すという報告[8]によっても説明される．

しかし，東京衛生局が実施している鉛害検診の結果では，血中鉛量は非常に低く，はたしてこのような低い血中鉛水準から典型的鉛中毒者にみられるようなヘム合成代謝系の阻害があったとして臨床検査成績に現われるのか，また如何なる血中鉛水準から尿中 δ-ALA および Cp との関連性が強くなるのかを検討する必要がある．そのため，今回は尿よりも分析再現性がよいとされている血中鉛と尿中の鉛，δ-ALA, Cp および肝機能指標とされている Ug との相関関係について解析を試みたので報告する．

検査方法

1. 調査対象について

東京都衛生局が，都内の交通量の多い主要道路交叉点近辺に居住する都住民に対して実施している鉛害検診の受診を希望した18歳以上の住民，男性515名，女性779名を対象とした．

2. 検査期間について

昭和46年9月～48年2月（36保健所）である．

3. 試料の採取について

1) 採尿

脱鉛ビーカーに採り，脱鉛ポリびんに移して運搬および保存し分析に供した．

2) 採血

10ml 用ディスポーザブル注射器を使用し，ヘパリンコーティング脱鉛試験管に取って分析に供した．

4. 検査項目と定量分析方法について

1) 血中および尿中鉛の定量分析

既法[9-10]に従って，環境衛生研究科が分析担当したものである．

2) 尿中の代謝成分定量分析

i) 尿中デルタアミノレブリン酸

和田ら[11]の方法を一部改良[1]して分析を行なった．

ii) 尿中コプロポルフィリン

栄養研究科生化学研究室で開発した微量けい光法[1]に従って分析を行なった．

iii) 尿中ウロビリノーゲン[12-13]

採尿当日に試料の還元操作をなし，約15時間経過後（翌日），佐藤法にもとづいて分析を行なった．

5. 推測統計手法について[14-15]

血中鉛濃度の上昇変化にともなって，尿中 δ-ALA, Cp および Ug との相関係数がどのような動態を示すのかを求明するための，血中鉛濃度の区切りの目安とするために，血中鉛についても尿中鉛と同じく分析方法による測定誤差などを考慮して 3μg/100g 以下のデータは対象から除外して次のように処理した．鉛分析値を性別に分け，前報[2]における尿中鉛と同様に異常値削除をしたデータで，平均値および Smirnov の方法にもとづいた危険率1％水準での棄却限界上限値を求めた．

以上のようにして得られた数値をもとにして，血中鉛と尿中の鉛，δ-ALA, Cp および Ug の関係がどのような血中鉛濃度から絶対的因果関係として観察されるのか，その変曲水準を発見するためにつぎのような試みを行なった．

まず，性別に分けた血中鉛分析値を，(A)全体の群，

(B)平均値以上の群，(C)棄却限界値以上の群，の三つの階級群に分け，尿中の δ-ALA, Cp および Ug の分析値と対応させて，おのおのについて三つの相関係数を算出するとともに，その係数の有意性についてF検定を行なった．

結果および考察

1. 血中鉛分析値の推測統計処理結果

前記の推測統計手法にもとづいて得られた血中鉛濃度に関した数値を Table 1. に示す．

Table 1. Results of statistical Analyses on the Cases having more than 3μg Bloody Lead/100g

Item		Men	Women
Number of All Subjects		505	734
Number of Objects		478	706
Mean Value (μg/100g)		10.8	7.9
Rejection Limit (μg/100g)	upper	19.3	14.7
	lower	2.3	1.

この表から明らかなように，平均値および棄却限界上限値ともに男性に高く女性に低い結果であった．これは前報[2]の尿中鉛の場合にもみられたし，他の報告[16]にも見受けられることで，尿中鉛と同じように生理代謝あるいは労務の相違などに基因していると考えられる．

平均値および正常値などについても多くの報告[17-20]があるが，都住民の血中鉛濃度をそれらに比べてみると，3μg/100g 以下のデータを除外した統計数値であるにもかかわらず低い結果であった．

また，統計処理上において除外されたデータの中には，労働基準法施行規則第35条第14号[21]（以下労基法施則と記す）に掲げられている鉛中毒認定基準値（30 μg/100g 以上の検出）をこえた被検例は，男性 2/505 名（34および36 μg/100g），女性 1/738 名（34μg/100 g)の計3名であった．

2. 血中鉛と尿中鉛の関係

血中鉛と尿中鉛の相関について Table 2. に示す．

相関係数のF検定の結果は，血中鉛濃度をもとにした(A)全体の群(以下(A)群と記す)の男性 $r=0.2910$ および女性 $r=0.1588$においては危険率1％以下で有意であり，男性の(B)平均値以上の群(以下(B)群と記す) $r=0.2490$および(C)棄却限界上限値以上の群（以下(C)群と記す） $r=-0.6067$では危険率5％以下で有意であったが，男性(C)群は負の相関であった．また，女性の(B)(C)群では危険率5％以上で有意性は示されなかった．

3. 血中鉛と尿中 δ-ALA との関係

血中鉛分析値に対応する尿中 δ-ALA 分析値のバラツキかたについて，分布の型を表わす直線を加えた散布図を Fig. 1. に示す．

Fig. 1. に示したように両者間の相関係数は非常に小さく，F検定の結果によると，女性における(A)群 $r=0.0725$が危険率5％以下で有意であった．しかし，男性(A)群および男女とも(B)(C)群では危険率5％以上で有意でなかった．男性(C)群では相関係数がマイナスになった．女性(C)群では他の群に比べて相関係数が大きくなった．

Fig. 1. に示すプロットの実態を見ると，労基法施則に掲げられている，尿中 δ-ALA の鉛中毒認定基準値[21]（6mg/l 以上の検出）をこえる被検例は，女性に

Table 2. Relationships between Bloody Lead and Urinary Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	229	0.2910	$P<0.01$	0.268	4.682
	(B)	105	0.2490	$P<0.05$	0.287	4.477
	(C)	11	−0.6067	$P<0.05$	−0.896	34.005
Women	(A)	265	0.1588	$P<0.01$	0.188	4.960
	(B)	126	0.1586	N. S.	0.249	4.355
	(C)	9	0.5395	N. S.	1.159	−12.750

Group (A) : All subjects of bloody lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of bloody lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of bloody lead,
N. S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

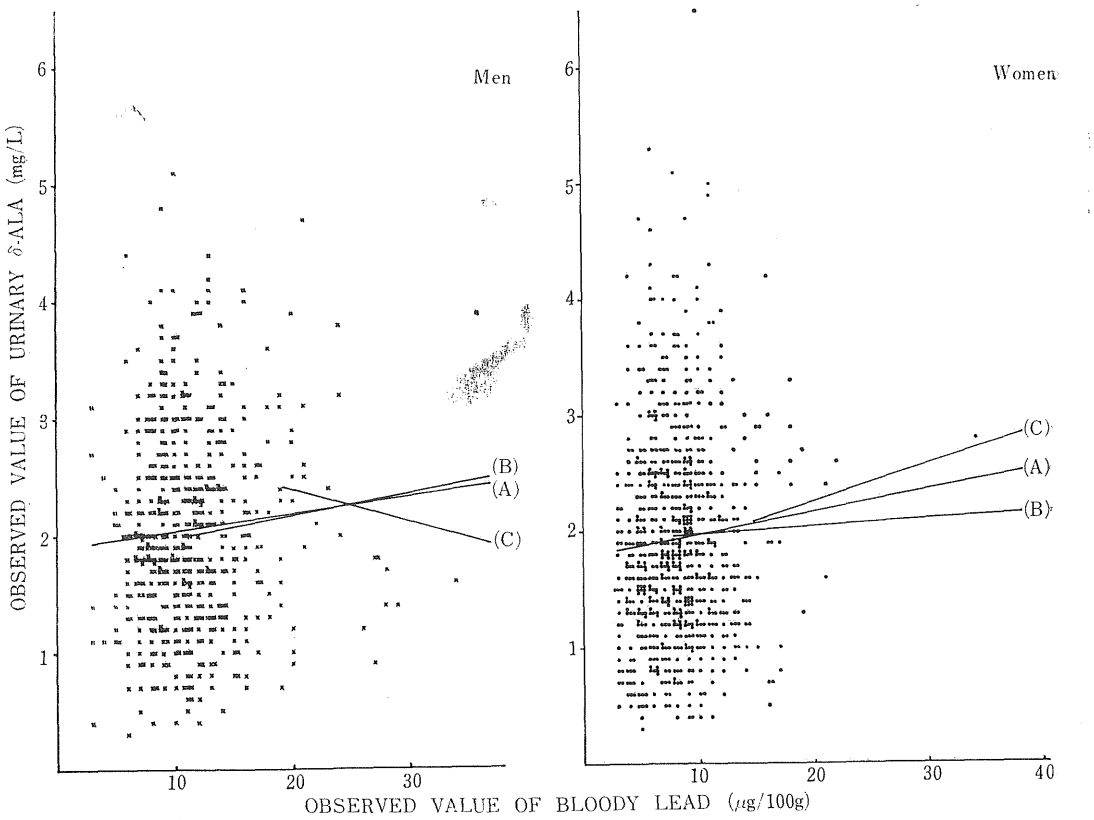


Fig 1. Urinary Levels of δ-ALA Plotted against the Bloody Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	503	0.0772	N.S.	0.015	1.878
	(B)	271	0.0863	N.S.	0.019	1.787
	(C)	27	−0.1184	N.S.	−0.027	2.924
Women	(A)	735	0.0725	$P<0.05$	0.020	1.774
	(B)	410	0.0204	N.S.	0.007	1.907
	(C)	27	0.1421	N.S.	0.033	1.599

Group (A) : All subjects of bloody lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of bloody lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of bloody lead,
N.S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

1/734名見られたがその血中鉛濃度は 10μg/100g であった．男性には 6mg/l 以上の被検例は見受けられなかった．

また，血中鉛濃度について，男性は散布が連続的であるのに対し，女性にはかけ離れたデータが一例あるために，女性群の相関係数が大きな影響を受けている．

さらに，尿中 δ-ALA の正常値に関しては，Nakao ら[22]の2.9±1.4mg/l，Kasahara の 4.0mg/l（統計上限値）[21] や田口らの職業的鉛暴露のない男女からのスポット尿について，男性0.25±0.96 mg/l および女性1.59±0.90 mg/l などの報告[24]がある．

なお，当生化学研究室では鉛害および公害検診を受けた都住民尿について，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％における統計的棄却限界値として，男性4.50mg/l および女性3.95mg/l を得て報告[25]を行なった．都住民の尿中 δ-ALA が正常値および棄却限界値をこえる被検例は Fig. 1. のプロットが示すように女性に多く見られる．またこれらの数値をこえる例は鉛濃度が低いにもかかわらず男女ともに見受けられる．このように，血中鉛濃度が低くても尿中 δ-ALA の異常高値が見受けられることならびに相関関係が認みられなかったことから，都住民の尿中排泄 δ-ALA は，生体防御機能に守られた生理代謝範囲程度の排泄状態と考えられる．

さらに，前報[2] で述べた尿中鉛分析値の全体から見た群の尿中 δ-ALA 鉛と尿中との相関係数，男性 r＝0.2238 (p<0.01)，n＝233，および女性 r＝0.2403 (p<0.01)，n＝286 に比べ，血中鉛と尿中 δ-ALA の相関係数は，男性 r＝0.0702(N.S.)，n＝503 および女性 r＝0.0725(N.S.)，n＝735 となり，尿の分析値同士では相関性があったのに，尿と血液ではその係数の有意性は示されなくなった．

血中鉛濃度70～80μg/100g は非障害性鉛吸収，また80～150 μg/100g は危険性鉛吸収という報告[8] から考えると，一般生活環境下にある都住民の血中鉛濃度が危険鉛吸収濃度に近くならないでも，早期に鉛害の疑似者をスクリーニングするためには，試料性質の異なる血液中鉛と尿中 δ-ALA の濃度比較のみでは非障害性鉛吸収範囲の不顕性鉛障害者の検索は不可能と考えられる．鉛障害によって尿中に δ-ALA が増加するのは，赤血球中の δ-ALA dehydratase の活性阻害などにもとづいていることから，鉛中毒者の早期検索にはこの酵素の活性測定は非常に意義があるという多くの報告[22,26-29] がある．ゆえに，不顕性鉛障害者の検索には，血液中鉛と対照させる臨床検査種目としては δ-ALA dehydratase を選ぶことが望ましい．

4. 血中鉛と尿中 Cp の関係

血中鉛分析値に対応する尿中 Cp の分析値のバラツキかたについて，分布の型を表わす直線を加えた散布図を Fig. 2. に示す．

Fig. 2. に示したように相関係数は小さく，F検定の結果についてみると，男女とも(A)(B)(C)群のすべてが危険率5％以上で有意ではなかった．男性(C)群および女性(B)群では，相関係数がマイナスとなった．女性(C)群では，δ-ALA の場合と同じように相関係数が急に大きくなっている．

Fig. 2. のプロットの散布の状態を見ると，労基法施則に掲げられている，尿中 Cp の鉛中毒認定基準値（150 μg/l 以上の検出）[21]をこえる被検例は，男性48/457名および女性45/699名であった．

しかし，女性におけるかけ離れた血中鉛濃度例の場合，血中鉛34μg/100g および尿中 Cp 150.6 μg/l で鉛中毒認定基準値（血中鉛 30 μg/100g 以上，尿中 Cp 150μg/l）[21]に合致していたが，尿中の δ-ALA は 2.8 mg/l と鉛中毒認定基準値 6mg/l に比べ低い値であった．

尿中 Cp の正常値については，Nakao ら[22] の70±40μg/l，Kasahara の110μg/l（統計上限値）[23]や 50～200 μg/l[30] および 田口ら[24] の職業的鉛暴露のない男女からのスポット尿について，男性73.3±35.4 μg/l，女性44.1±21.3 μg/l などの報告がある．

なお，当生化学研究室では，鉛害および公害検診を受けた都住民の一時尿について，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％における統計的棄却限界上限値，男性 162.1 μg/l および女性 152.7 μg/l を得て報告[25]を行なった．都居住民の尿中 Cp が前述の正常値および棄却限界上限値をこえる被検例は，Fig. 2. のプロットに示されているように男女ともほぼ同数であった．しかし，それらの異常値例は血中鉛濃度の低いところにも現われている．

以上のことから，通常鉛中毒のスクリーニングに尿中 Cp の測定が行なわれているが，低い血中鉛濃度の水準から因果関係が見られるものでなく，生体防御機能や鉛以外の関連因子などにも左右されて排泄量の変動が起こると考えられる．

5. 血中鉛と尿中 Ug の関係

血中鉛分析値に対応する尿中 Ug の分析値のバラツキかたについて，分布の型を表わす直線を加えた散布図を Fig. 3. に示す．

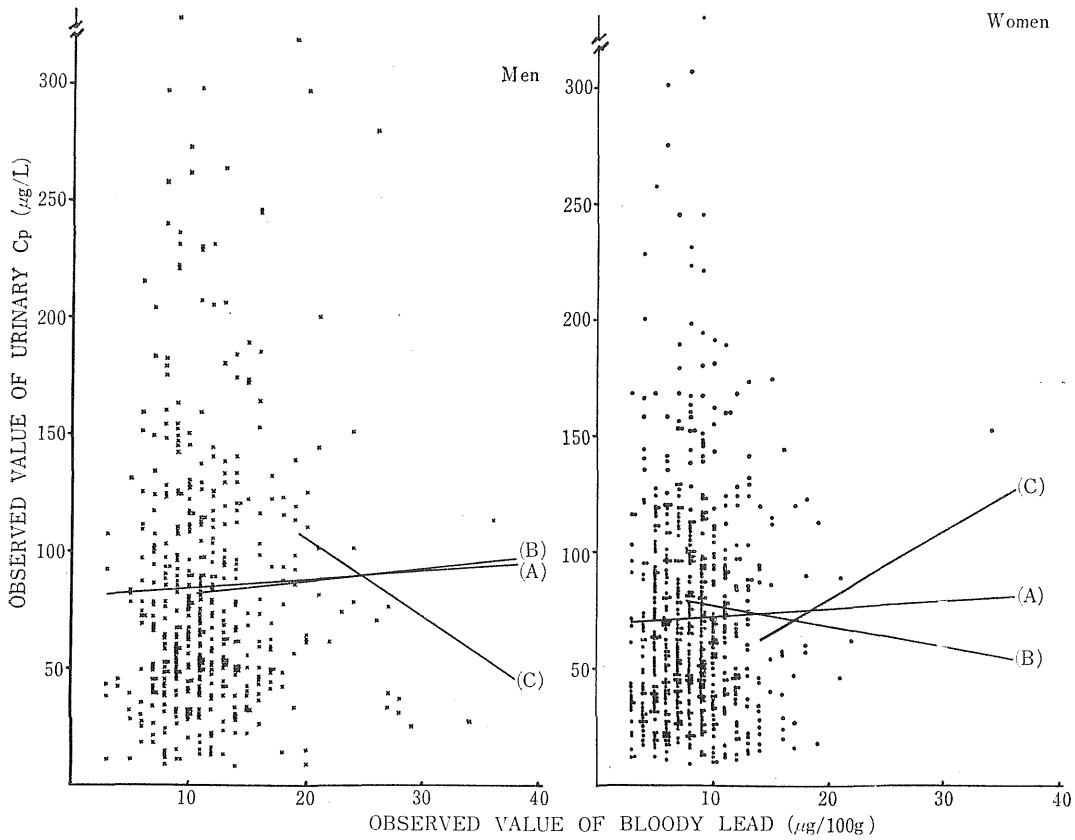


Fig 2. Urinary Levels of Cp Plotted against the Bloody Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	457	0.0304	N.S.	0.378	79.89
	(B)	246	0.0377	N.S.	0.507	76.39
	(C)	27	−0.2006	N.S.	−3.301	170.78
Women	(A)	699	0.0262	N.S.	0.376	68.19
	(B)	390	−0.0489	N.S.	−0.858	85.24
	(C)	27	0.2518	N.S.	2.980	20.17

Group (A) : All subjects of bloody lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of bloody lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of bloody lead,
NS : None Significance,
$Y=ax+b$,

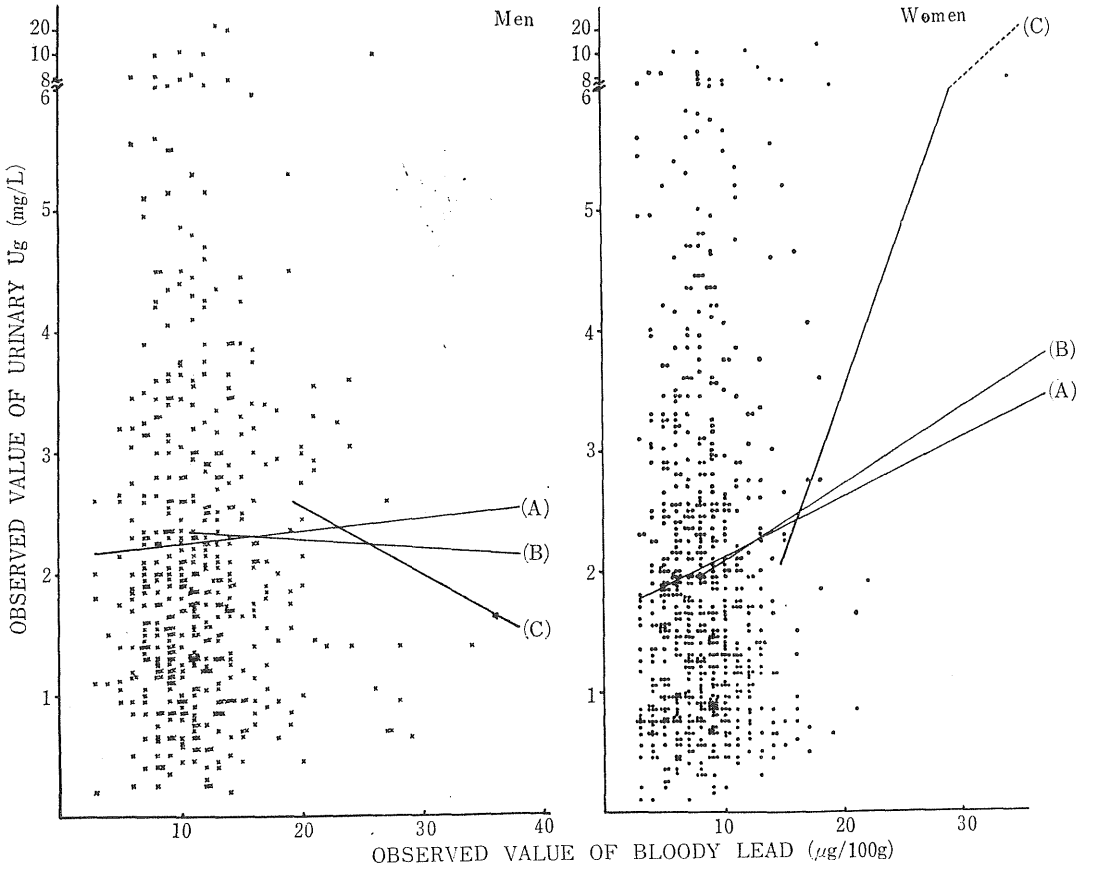


Fig 3. Urinary Levels of Ug Plotted against the Bloody Lead

Sex	Group	Number of Subjects	Coefficient of Correlation	Levels of Significance	a	b
Men	(A)	495	0.0247	N.S.	0.011	2.138
	(B)	268	−0.0125	N.S.	−0.007	2.415
	(C)	27	−0.1281	N.S.	−0.056	3.674
Women	(A)	730	0.0992	$P<0.01$	0.049	1.623
	(B)	406	0.0984	$P<0.05$	0.064	1.442
	(C)	27	0.3338	N.S.	0.274	−2.003

Group (A) : All subjects of bloody lead,
Group (B) : Subjects of more than the mean value of bloody lead,
Group (C) : Subjects of more than the rejection limit of bloody lead,
N.S. : None Significance,
$Y=ax+b$,

Fig. 3. に示したように相関係数は，δ-ALA および Cp の場合と同じく非常に小さい．

相関係数のF検定の結果は，女性(A)群 r＝0.0992は危険率1％以下で，女性(B)群 r＝0.0984は危険率5％以下で有意であったが，男性(A)(B)(C)群および女性(C)群では危険率5％以上で有意でなかった．男性(B)(C)群では相関係数がマイナスとなった．

Fig. 3. のプロットの散布状態を見ると，血中鉛濃度が低い場合においても，尿中 Ug 濃度が非常に高い値を示している例が多く存在している．

また，尿中 Ug の正常値については，0～4.0 mg/day[31]，0.2～3.0mg/day[32]，0.5～2.0mg/day[33]などがあるが，いずれも一日あたりの排泄量で記述されている．なお，当生化学研究室では，鉛害および公害検診を受けた都居住民の一時尿について，Smirnov の方法にもとづいた危険率1％の棄却限界上限値，男性3.81mg/l および女性3.49 mg/l を得て報告[1]した．この値をこえた被検例は，男性52/495名および女性92/730名という結果であり，これらの異常例は血中鉛濃の低い人でも見受けられ，両者間の直接的因果関係は認められなかった．

まとめ

交通量の多い地域に居住する都住民の一時尿中鉛濃度とポルフィリン代謝系の尿成分との関連性の研究に引き続き，血中鉛と尿中の鉛，δALA，Cp および Ug との相関性について詳細な検討を行なった．

1) 血中鉛と尿中鉛との相関係数は，血中鉛の全測定例を対象にした場合，男性 r＝0.2910（p＜0.01）および女性 r＝0.1588（p＜0.01）で有意であった．

男性における血中鉛濃度の棄却限界値以上を対象にした場合は r＝−0.6067（p＜0.05）の関係が得られ負相関となった．また，女性では血中鉛濃度の平均値以上の範囲では相関性が認められなかった．

2) 血中鉛と尿中の代謝成分（δ-ALA，Cp，Ug）との相関係数は，血中鉛全測定例を対象とした女性のδ-ALA，r＝0.0725（p＜0.05）および Ug，r＝0.0992（p＜0.01）と，血中鉛濃度の平均値以上を対象とした女性のUg，r＝0.0984（p＜0.05）が有意となったのみで，男性においてはすべてについて有意性が認められなかった．

以上のようなうな結果であったが，直接的因果関係となって現われる推測統計的水準を求める基礎資料にし，今後さらに機会を得て検討を行ないたい．

本研究の要旨は日本衛生検査学会第22回大会：昭和48年5月12日で発表した．

なお，本研究を述べるに当って血中鉛および尿中鉛の分析を担当された当所環境衛生研究科，秋山和幸，高橋利恵子両氏に謝意を表します．

文　献

1) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：東京都立衛生研究所研究年報，24，297—310（1973）
2) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公，野牛弘：東京都立衛生研究所研究年報，25，投稿中
3) 山賀岑朗，大森薫，戸沢隆，安倍和則：産業医学，15，157—158（1973）
4) 金子兼三，常山秀夫，佐々木英夫：臨床科学，9，863—874（1973）
5) 堀口俊一：現代医学，20，291—297（1973）
6) 金子兼三：日血会誌，33，857—877（1970）
7) 土屋健三郎：からだの科学，No. 38，132—136（1971）
8) 和田攻：公害による疾患，初版，192—198（1973）南山堂，東京
9) 野牛弘：衛生検査，20，581—587（1971）
10) 野牛弘，秋山和幸，高橋利恵子，長崎護：日衛誌，26，137（1971）
11) Wada, O., Toyokawa, K., Urata, G., Yano, Y. and Nakao, K.: Brit. J. Industr. Med., 26, 240—243 (1969)
12) 陳敏馨：臨床検査，6，497—499（1972）
13) 陳敏馨：臨床病理，11，207—210（1963）
14) 鳥居敏雄，高橋晄正，土肥一郎：医学・生物学のための推計学，第4版（1962）東京大学出版会
15) 農林省家蓄衛生試験場，農林省蓄産局衛生課監修：家蓄衛生に必要な調査・統計の知識，（1970）日本獣医師会発行
16) 日向美幸，中川喜幹，服部大明，野牛弘，大八木重郎，竹蓋荘一郎，関　幸雄：日本公衆衛生誌，17，784（1970）
17) 久保田重孝，北山孝允：労働の科学，22，19—24（1967）
18) 松本久男：臨床病理，19，56～62（1971）
19) 堀内一弥，堀口俊一，石井順太郎：日衛誌，23 134（1968）
20) Goldwaster, Lonard J. and Waltor Hoover, A.: Arch. Environ. Health, 15, 60—63 (1967)
21) 労働省労働基準局長通達：労働の科学，26，54—66（1971）

22) Nakao, K., Wada, O. and Yano, Y. : Clinica. Chim. Acta, 19, 319—325 (1968)
23) Kasahara, A. : Osaka City Medical J., 11, 99—117 (1965)
24) 田口徹也，鈴木庄亮，横橋五郎：産業医学，12, 18—19 (1970)
25) 武士俣邦雄，霜田さと子，小笠原公：東京都衛生局学会誌，No.53, 66—67 (1974)
26) 正和朗，佐野晴洋：日衛誌，24, 142 (1969)
27) 大場康寛，磯貝元男，栄井 富士子，大原 みつる，段原紀美子：臨床病理，19, 187 (1971)
28) 和田攻，矢野雄三，小野哲，長橋捷，豊川行平：日衛誌，29, 143 (1974)
29) 山村恵彦，吉田稔，安宅勉子，山村行夫：日衛誌，29, 142 (1974)
30) 高久史麿：日本臨床，No. 364, 180—191(1973)
31) 柴田進，高橋浩：臨床化学の技術，第1版，186—189，金原出版，東京
32) 斉藤正行：光電比色計による臨床化学検査，第3版，89—94 (1952) 南山堂，東京
33) 金井泉：臨床検査法提要，第21—23版，(Ⅱ)36—39 (1964) 金原出版，東京

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 331 — 335, 1974

空気浄化に関する研究——空調機器による粉塵，ならびに重金属類の捕集率——

両角 清* 狩野文雄* 青木 実*
大城賢吾**

Studies on Air Cleaning Efficiency of Collecting Dusts and Heavy Metals with Air Conditioning Apparatus

KIYOSHI MOROZUMI*, FUMIO KANOH*, MINORU AOKI* AND
KENGO OHSHIRO**

Dusts and Heavy metals in air are caught by the filters of air conditioning apparatus. For the air cleaning, it is necessary that filters have high collection efficiency.

We studied air conditioning apparatus at the Building in Tokyo seasonally.

As a result, we found the difference of Dusts and Heavy metals concentrations depended on the place of air inlet. And we recognized high dust concentrations had an effect on collection efficiency of filters.

It is necessary that the optimum place of air inlet should be considered to control the air conditioning apparatus.

序 言

近年大気の汚染ははなはだしく増大し，公害防止のためにその浄化が問題となっている．空気浄化の必要性を大別してみると，1）大気汚染防止，2）室内の衛生環境（作業環境）の維持，3）機器の保全，4）資源の回収等であるが，特に室内の衛生環境の維持については先に施行された「ビル衛生管理法」及び「労働基準法の事務室の衛生基準」等があり，そこで働く人間の健康管理の面ばかりでなく，作業能率ともかなり密接な関係があるので，室内外の空気を浄化して常に清浄な状態に保つことはいろいろの意味で重要視されている．

（2） 実験方法

今回の実験は日常使用されている某ビルの空気調和機を使用して，外気取入口（計11ヶ所）の立地条件の異った取入口3ヶ所（A取入口は地上3m，B取入口は地上8m，C取入口は地上25m）を選定して外気及び沪材通過後の給気の温，湿度（アスマン通風乾湿計），風速（アネモメーター），空中細菌（落下法，5分間露出37°，48時間培養），粉塵量及び粉塵捕集率（労研式沪紙塵埃計，粒径は散乱光式粒子計数装置），有害ガス（一酸化炭素は非分散型赤外分析計，鉛は原子吸光分析法）等について，各種の測定器を取入口及びダクト内に設置して，午前9時より午後5時まで毎時計測を行い，1ヶ年（四季について）継続して試験を行った．

（3） 結果及び考察

各取入口における一酸化炭素，二酸化炭素，細菌，塵埃量の月別変化は Fig 1～3. の通りである．

1） 温，湿度．

各取入口における温，湿度は取入口の立地条件並に気象条件により差異があるが，各取入口の気温並に湿度はA取入口では気温は10.4（最低）－18.9（平均）－27.9°（最高），湿度は27.3（最低）－55.8（平均）－70.0%（最高），B取入口では気温は9.6－18.6－25·5°，湿度は27.5－48.9－69.0%で，またC取入口では気温は10.3－19.2－27.9°，湿度は27.8－50.6－62.7% となり，各取入口の気温は余り差異はなく，A取入口及びB取入口では略同様であるが，C取入口ではA・B

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 北里大学衛生学科

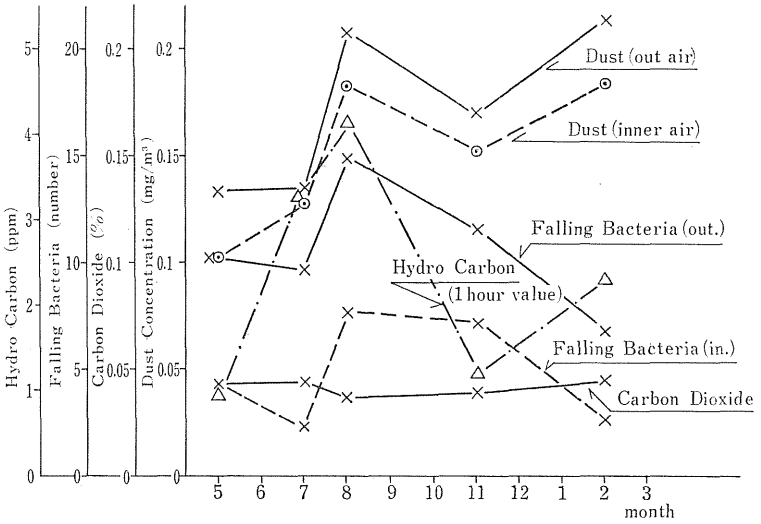


Fig 1. Seasonable Variation of Gas, Bacteria and Dust Concentration at Air Inlet (B point) Height 8m.

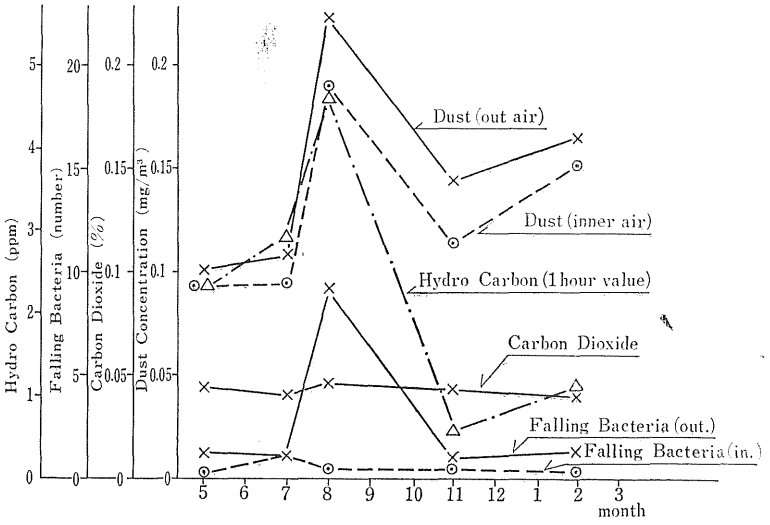


Fig 2. Seasonable Variation of Gas, Bacteria and Dust Concentration at Air Inlet (A point) Height 4m

取入口に比較して気温は若干高くなっていた．また湿度は取入口の立地条件及び天候，季節等により差異はあるが，下層地上附近の取入口では湿度は同様の傾向を示したが，上層取入口では秋が高く，冬季は全般的に低いが，年間の平均ではA取入口が最も高く，次はC取入口でB取入口では全般的に低くなっていた．

2) 風速．

沪材面の風速は沪材の粉塵捕集率とも関係があり面速が大きければ大きいほど捕集率は一般に低下するものである．各取入口の沪材面の風速はA取入口では0.12 (最低) −0.158 (平均) −0.22 m/sec (最高)，B取入口は0.55−0.898−2.40 m/sec で，またc取入口では0.28−0.945−1.20 m/sec であるが，各取入口の風速は空調機の稼動状態により異なるもA取入口では常時一定であるが，B及びC取入口では空調機の稼動が断続的なため沪材面の風速は絶えず変動していた．

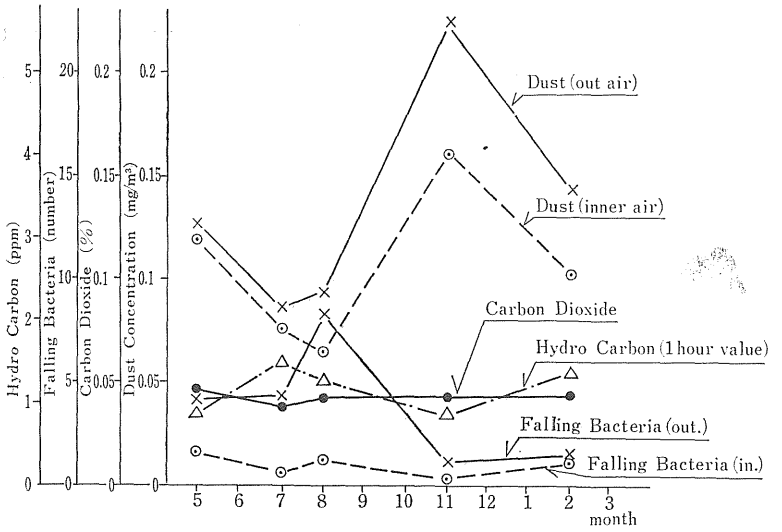


Fig 3. Seasonable Variation of Gas, Bacteria and Dust Concentration at Air Inlet (C point) Height 25m

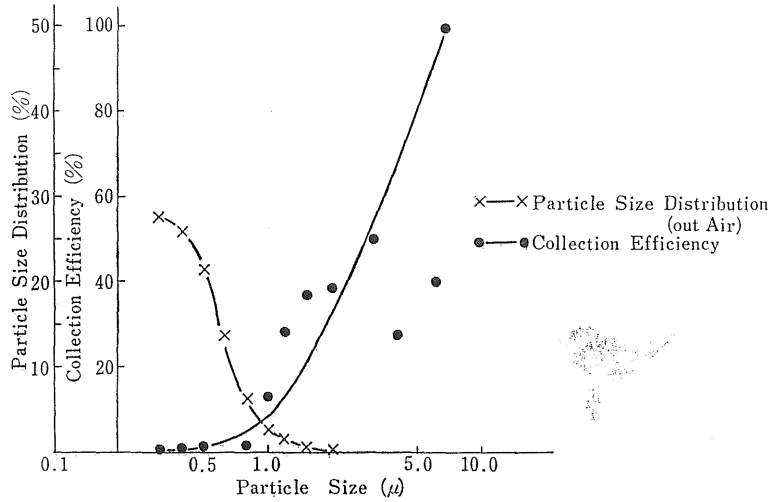


Fig 4. Distribution of Particle Size and Collection Efficiency of Dust (C point)

3) 二酸化炭素並に一酸化炭素.

大気中の二酸化炭素は0.03～0.04%であり，各取入口とも差異はなかった．次に外気中の一酸化炭素は自動車排気ガスやビル，工場等の排気（煙）とも関係があり，その濃度は「環境基準」及び「ビル衛生管理基準」ではともに10ppm（特別の場合は20ppm）とされている．各取入口の一酸化炭素濃度はA取入口では0.6（最低）－2.1（平均）－4.6ppm（最高），B取入口では1.0－2.3－3.9ppmで，またC取入口では0.9－1.2－1.5ppmとなり，各取入口ともに濃度は全般的に低いが，A及びB取入口は高さが比較的低く，また駐車場及び道路に近接しているため濃度は比較的高いが，C取入口では取入口の位置が高いため濃度はA，B取入口に比較して低くなっていた．また一酸化炭素の季節的な変動はA，B取入口では夏季が比較的高く，次は冬季の順となり，春・秋では濃度は低いが，C取入口では季節の変動は少なかった．

4) 粉塵量及び粉塵粒子の大きさ.

各取入口の粉塵量は取入口の立地条件並に気象条件等により異なるが，各取入口の粉塵量はFig 1～3. の

通りである．各取入口の粉塵量についてみると，A取入口では外気は0.101（最低）－0.148（平均）－0.222 mg/m³（最高），給気側では0.092－0.127－0.188 mg/m³，B取入口では外気は0.115－0.168－0.212 mg/m³ 給気側では0.101－0.148－0.182 mg/m³ で，またC取入口では外気は0.094－0.135 －0.224 mg/m³，給気側では 0.065—0.105—0.160 mg/m³ となり，取入口の位置，気象条件等により差異はあるが，地上並に中間部位（A・B取入口）では粉塵量は比較的多いが，上層部位（C取入口）の取入口では少なく，また粉塵量の季節的変動はA・B取入口は夏・冬に多く，春・秋には少ないが，C取入口では秋・冬に多く，春・夏は少なくなっていた．なお給気側の粉塵量を労働基準法の事務室の衛生基準と対応してみると，沪材（エアフィルタ）通過後の空気が室内に給気されるものとしたら衛生基準以下で余り問題はない．次に粉塵粒子の大きさの分布をC取入口について見てみると Fig 4. の通りである．各取入口における粉塵粒子の大きさは，季節的な差異はあるが，各取入口ともに0.3ミクロン以上1.0ミクロン以下の粉塵が98%以上を占め，1.0ミクロン以上10ミクロン以下の粉塵が２～３%，10ミクロン以上の粒子はほとんどないと言って良い．

5) 沪材（エアフィルタ）の粉塵捕集率．

沪材の粉塵捕集率は沪材の材質，密度，風速及び清浄度等により違いがあるが，通常使用されているエアフィルターの捕集率は乾式では20%～65%(大気塵)，粘着式は 20%～30%（大気塵），高性能用は 1μ 以下で99.9%，電気集塵器では95%～99.9%であるが，大気塵に対しては各沪材ともに捕集率は全般的に低下して通常用のもので20～40%，高性能用（又は電気集塵器）でも85%前後と云われている[1)-3)]．各取入口沪材の粉塵捕集率は同一沪材を使用しているが差異が大きく，A取入口では7.9(最低) —13.5（平均）—21.7%

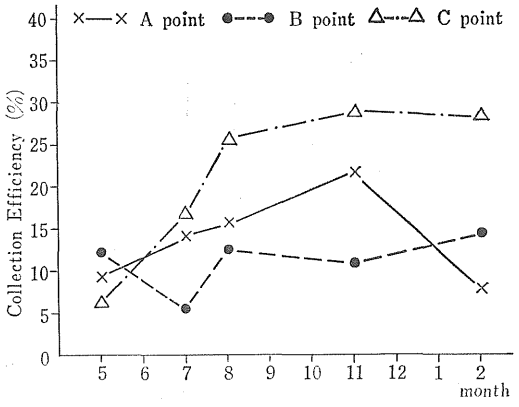


Fig 5. Collection Efficiency of Dust in the Air Inlets

（最高），B取入口は5.2—11.0—14.2%，C取入口では6.3—21.0—28.6%で，C取入口は平均21% で比較的高かったが，A・B取入口では粉塵捕集率は11～13%で全般的に捕集率は低く，同一沪材でも捕集効率は空調機器の使用状態及び粉塵の種類等により差異が認められた．

6) 気中微量重金属（鉛）の捕集について．

各取入口における気中重金属（鉛）の外気側及び給気側の濃度は Table 1. の通りである．空気調和機に使用されている普通乾式沪材では，気中の微量重金属の捕集率は一般的に低いと言われているが，今回の実験では，鉛については，外気側で，A取入口では0.033（最低）—0.400（平均）—0.730 μg/m³（最高），B取入口では，0.280—0.812—2.020 μg/m³ C取入口では，0.033—0.557—1.668 μg/m³ となり，これに対して沪材通過後の給気側では，A取入口では，0.056—0.238—0.577 μg/m³, B取入口では，0.200—0.548—1.214μg/m³，C取入口では，0.033—0.516—1.644μg

Table 1. Heavy Metal (Pb) Concentration in Air

	Outer Air (μg/m³)			Inner Air (μg/m³)		
	A Inlet	B Inlet	C Inlet	A Inlet	B Inlet	C Inlet
month						
47. 5	0.240	0.280	0.460	0.087	—	0.310
7	0.033	0.330	0.033	0.067	0.200	0.067
8	0.430	0.350	0.033	0.056	0.370	0.033
11	0.567	1.080	1.668	0.403	0.958	1.644
48. 2	0.730	2.020	0.593	0.577	1.214	0.524
Mean	0.400	0.812	0.557	0.238	0.548	0.516

/m³ となり，各取入口の沪材の重金属捕集率は，A取入口で平均40.5%，B取入口で39.0%，C取入口で7.36%となった．

7) 空気調和機系統における粉塵濃度の変化．

粉塵濃度の変化については Fig. 6. に示す．空調機器より室内に供給される気中の粉塵量は外気及び還気等にかなり左右され，これに室内での発塵が加わり室内の粉塵量は全般的に増加は免かれず，したがって外気（還気）中の粉塵浄化の良否は室内粉塵量の多少に関係があるので，沪材の捕集率は高いことが望ましい．今回の実験に使用した沪材は中級のものである

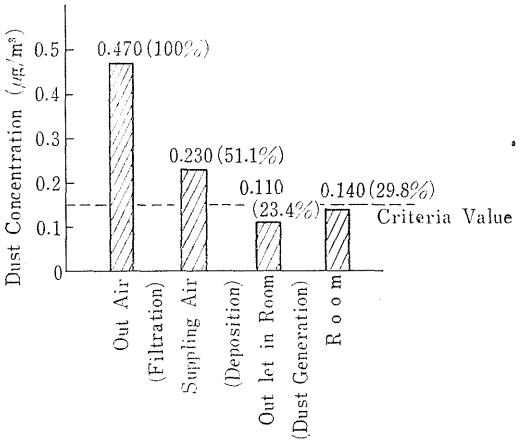


Fig 6. Change of Dust Concentration in Air Conditioning System

が，外気塵埃に対して捕集率は51.1%で捕集率は良好であるが，沪材で浄化された給気がダクト内を通り室内に供給されるまでには，ダクト内での沈降及び附着等により粉塵はさらに減少して室内吹出口（室内給気口）では外気量の約1/4（23.4%）に低減したが，これら給気が室内に供給されるものとすれば，ビル衛生管理法及び労働基準法の衛生基準（0.15mg/m³）以下となるので現在使用されている沪材でも十分であるが，外気（還気）中の粉塵量は変動が大きく，また沪材の清浄度，風速及び機器の使用状態により異なるから，沪材の選定には注意することが必要である．

（4） 結 語

以上のことを要約してみると，次のようになる．各取入口の温湿状態は，外気温に関係し，外気取入口の位置条件に左右される．また一酸化炭素，塵埃量は，季節によって多少変動するとしても，取入口の位置による差異が顕著であった．また同一沪材にもかかわらず，捕集率においても，取入口の位置による差が見られ，沪材の保守管理の面からも，取入口設置に対する考慮が必要である．

今回の沪材の粉塵，重金属等の捕集率についての調査は，外気側，給気側の両者の濃度差のみに着目したものであり，沪材の密度，面速等の条件による差については新しい調査を待たなければならない．

付 記

本研究は昭和47年度当研究所研究課題「大気中の浮遊粉塵に関する調査研究」として実施したものである．

文 献

1) 空気調和・衛生工学便覧，I，623—653(1967)
2) 井伊谷鋼一，八木進共著，集塵装置（1956）日刊工業新聞社
3) 井上宇市著，空気調和ハンドブック(1956)丸善

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 337 — 339, 1974

東京都内における大気中多環芳香族炭化水素の測定

秋山和幸* 長嶋親治* 高橋利恵子*
藤谷和正* 野牛弘* 長崎護**

Gas Chromatographic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Particulates in Tokyo Air

KAZUYUKI AKIYAMA*, CHIKAHARU NAGASHIMA*, RIEKO TAKAHASHI*
KAZUMASA FUJITANI*, HIROSHI YAGYU* AND MAMORU NAGASAKI**

Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulates in Tokyo air were determined by gas chromatography. Samples were collected at f4 sites in urban Tokyo from July through December 1973.

According to the results of 22 samples, the monthly average of Bap was 28.6 and B(ghi)p was 11.5 $\mu g/1,000\ m^3$ air. It was demonstrated that Bap as well as B(ghi)p levels of Omori H. C. were somewhat higher than others and that levels in October and November were generally higher than in other seasons.

1. 緒　言

大気浮遊粉じん中には，多種類の多環境芳香族炭化水素とその類縁化合物が存在し，その中には，Benzo〔a〕pyrene（以下 Bap と略す）のように動物に対して強い発癌性を示すものがあることはよく知られ，肺癌との関連性が注目されてきた．これらは，一般的に石油，石炭やたばこなどの燃焼にともなって発生し，その発生原因としては，もともと多環芳香族炭化水素が含まれている物質を加熱することにより，そのままあるいは，若干の変化により発生する場合と有機物の熱分解にもとづく化学変化により発生する場合がある．その大気汚染源としては，各種の工場，事業場の燃料（石油，石炭）の消費，自動車の排気，アスファルトなどがあり，その他に体内摂取源としてタバコ，コーヒー，くん製品等があげられてきた．

一方，東京都内は各種産業，事業所が集中する大都会で，また都内における1972年の自動車保有台数は230万台と超過密であり，種々の公害対策が進められて来たが，これら芳香族炭化水素による都内の汚染状況の調査例[1-3]は非常に少なく，われわれは都内4個所において調査を行なった．ここに1973年7月より12月までの結果を報告する．

2. 実　験

大気浮遊粉じん中の多環芳香族炭化水素の測定は，集じん後溶媒抽出または真空昇華法により抽出し，必要に応じて液々分配や各種クロマトグラフィーにより精製，分離，測定，あるいは紫外部吸収，螢光スペクトル法によることが多く[4-6]それらの手技は詳細な検討が重ねられ，それにより充分目的を達することが可能であろう．著者らは種々の条件から松下らの真空昇華法[4]により抽出後，ガスクロマトグラフィーにより測定を行なった．

2・1 試　料

1973年7月から13月の期間毎月1回24時間，大森，江戸川，練馬，世田谷，各保健所の都内4個所においてハイボリュームエアサンプラー（Staplex）を用いてガラス繊維フィルター（Gelman type A）上に浮遊粉じんを採取し，（空気吸引量，約$1,700 m^3/24hr$）その$1/2$を用いて測定した．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都衛生局医療福祉部公害保健課

2・2 試薬 装置

炭化水素類標品：東京化成製品

ベンゼン：螢光測定用（ドータイト）

ガスクロマトグラフ：島津GC5AFID）

2・3 分析操作

試料の1/2を用いて松下らの真空昇華抽出法の操作に従い，（0.02*mmHg*, 300°, 40*min*）昇華物をベンゼン200*μl* に溶かして検液としガスクロマトグラフィーにより測定した．

ガスクロマトグラフィーの条件

検出器：FID，温度270°，水素流量 35*ml/min* 空気流量0.56*l/min*，感度$10^3 M\Omega$，レンジ0.016*V*

カラム：2%OV-1 on Gas Chrom Q，3*mm*×2*m*（ガラス） 温度230°，キャリアガスN_2 38*ml/min*，

試料注入：原則として島津 AOC-5 自動サンプラーにより検液を注入し（2 *μl*, 270°）必要あればより大量の検液をマイクロシリンジで注入した．

定量は絶対検量線法（ピーク高法）による．

3. 結果および考察

3・1 測定法の検討

実験に採用したガスクロマトグラムおよびいくつかの多環芳香族炭化水素の保持時間を Fig 1. に示す．

クロマトグラムは必ずしも良好ではないが，多成分についてモニターする目的に利用することは十分可能である．しかしこの条件では Bap と benzo(*e*)pyrene（以下 Bep と略す）の区別は出来ない．

次にガラス繊維フィルターに炭化水素を添加して本法により測定したところ，ほぼ満足すべき回収率が得られた．(Table 1.)

3・2 測定結果と考察

東京都内4個所における1973年4月から12月の結果を Table 1. Feg 2. 3. に示す．

4個所の総平均値は Bap (Bep を含む，以下同様) 28.6$\mu g/m^3$ benzo(*ghi*)perylene（以下 B(ghi)p と略す）11.5 $\mu g/m^3$ であった．

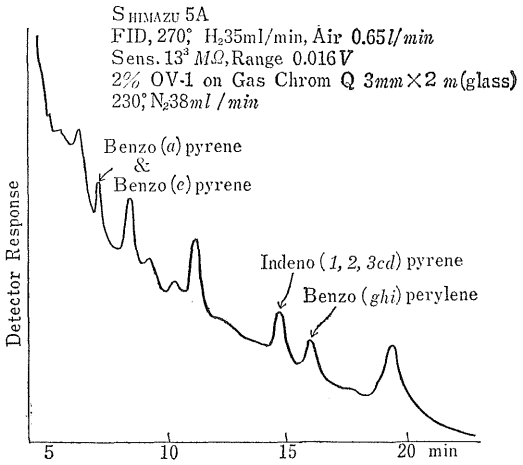


Fig 1. Gaschromatogram of Typical Sample

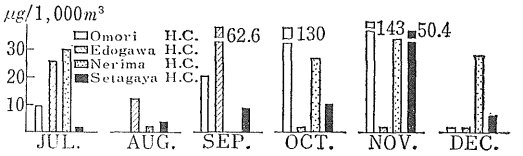


Fig 2. Atmospheric Bap* Concentration in Tokyo (1973)

* containing Bep

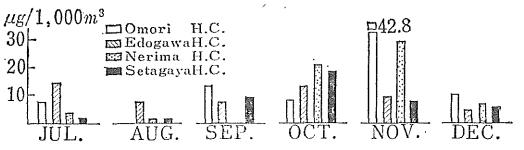


Fig 3. Atomospheric B(ghi)p Concentration in Tokyo (1973)

地区別では大森保健所が高値を示し，月別では10，11月が増加傾向にある．これらの原因は大森地区が工

Table 1. Recovery of Bap and B(ghi)p from Glass-fiber Filters

Sample	Bap			B(ghi)p			Average (%)
	Added (*ng*)	Found (*ng*)	Recovery (%)	Added (*ng*)	Found (*ng*)	Recovery (%)	
1	256	315.6	123.3	98	82.1	83.8	103.8
2	256	344.1	134.4	98	109.5	111.7	123.1
3	256	234.0	91.4	98	68.4	69.8	80.6
Average (%)	116.5			88.4			102.5

Table 2. Atmospheric Concentration of Bap and B(ghi) in Tokyo(1973)

($\mu g/1,000\ m^3$)

Location		JUL.	AUG.	SEP.	OCT.	NOV.	DEC.	Average
Omori H.C.	Bap*	9.6	—	21.4	130	143	Tr.	60.7
	B(ghi)p	7.6		13.6	9.3	42.8	10.8	16.8
Edogawa H.C.	Bap*	25.6	12.5	62.6	Tr.	Tr.	Tr.	16.8
	B(ghi)p	14.9	7.5	7.5	13.3	10.4	5.0	9.8
Nerima H.C.	Bap*	30.0	Tr.	—	26.6	33.8	27.6	23.6
	B(ghi)p	4.0	Tr.		21.6	29.8	6.6	12.3
Setagaya H.C.	Bap*	Tr.	3.9	8.9	9.6	50.4	6.1	13.2
	B(ghi)p	Tr.	Tr.	9.4	1.1	8.1	4.1	7.2
Average	Bap*	16.3	5.5	31.0	41.6	56.8	8.4	28.6
	B(ghi)p	6.6	2.5	10.2	15.7	22.8	7.2	11.5

* containing Bep

業地域であること，冬期に向い燃料消費の増加，逆転層形成等の気象的要因，あるいはサンプリング日時の違いとか種々の解釈があり得るが，詳細については今後のデータの集積が必要である．

さてここに得られた値をこれまでの報告と比べてみると松下ら[8]の1973年1～3月における測定値 Bap 約10～15$\mu g/1,000m^3$，（江東，糀谷および板橋地区）西井[2]による約10年前の測定値13～66（街路上）あるいは富田ら[7]による大阪市の値 4～107，（1969～1972）等とほぼ同程度の値と言えよう．この間の事情は，わずかな程度の違いはあっても都市問題における世界的な傾向と考えることが出来る[8]．

WHOの報告[9]によれば，ここに明らかにされた汚染レベルでは直ちに健康への影響は考えられないにしても，東京都においてはこの10年間に濃度の低下は認められない事実をもふまえて，今後のモニタリングが必要とされよう．

謝　辞

測定に御協力いただいた，大森，江戸川，練馬，世田谷，各保健所の方々に深謝いたします．

（本研究の概要は第33回日本公衆衛生学会総会，1974年10月18日で発表した．）

文　献

1) 松下秀鶴，鈴木康友：産業医学，7，250—251（1965）
2) 西井俊治：医学のあゆみ，55，305—310(1965)
3) 松下秀鶴，嵐谷奎一，朝来野国彦，大平俊男：大気汚染研究，8，553（1973）
4) 松下秀鶴：公害分析指針，大気編2C，31—64（1972）共立出版(日本分析化学会関東支部編)
5) 長谷川利雄，桑田一弘：化学の領域，25，905—920（1971）
6) 松下秀鶴：化学の領域，28，118—127（1974）
7) 富田絹子，瓦家敏男，春木孝祐：日本公衛誌，20，525—532（1973）
8) 渡辺弘，富田絹子，瓦家敏男：大阪市衛研報告 28，80—87（1965）
9) 原島進訳：WHO専門委員会報告，都市の大気汚染——自動車を中心として——36（1969）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 341 — 346, 1974

血液と毛髪の総水銀量について

二島太一郎* 池田真悟* 多田宇宏*
野牛弘* 長崎護**

Total Mercury Levels in Human Blood and Hair

TAICHIRO NISHIMA*, SHINGO IKEDA*, TAKAHIRO TADA*,
HIROSHI YAGU* AND MAMORU NAGASAKI**

Total mercuy levels in human blood and hair of 3 areas, AG : Izu Oshima, BG : Nishitamagun, CG : Tokyoto Ku and DG : fisheaters were determined.

1. The concentrations of total mercury in whole blood were as followed. (μg/100g)

AG : $2.8 \overset{\times}{\div} 1.55$ **M** : $3.2 \overset{\times}{\div} 1.57$ **F** : $2.6 \overset{\times}{\div} 1.56$

BG : $2.0 \overset{\times}{\div} 1.46$ **M** : $2.4 \overset{\times}{\div} 1.32$ **F** : $1.5 \overset{\times}{\div} 1.20$

CG : $2.6 \overset{\times}{\div} 1.42$ **M** : $2.6 \overset{\times}{\div} 1.40$ **F** : $2.6 \overset{\times}{\div} 1.37$

DG : $7.6 \overset{\times}{\div} 1.55$(**M**)

Male blood contained more mercury than females, but CG on marked difference was noted. DG were greater than control group.

2. The concentrations of total mercury in hair were as followed. (ppm)

AG : $5.4 \overset{\times}{\div} 1.68$ **M** : $7.9 \overset{\times}{\div} 1.42$ **F** : $3.9 \overset{\times}{\div} 1.50$

BG : $4.7 \overset{\times}{\div} 1.57$ **M** : $5.8 \overset{\times}{\div} 1.40$ **F** : $3.3 \overset{\times}{\div} 1.40$

CG : $4.6 \overset{\times}{\div} 1.57$ **M** : $5.8 \overset{\times}{\div} 1.45$ **F** : $3.3 \overset{\times}{\div} 1.46$

DG : $19.1 \overset{\times}{\div} 1.58$(**M**)

Male hair contained more mercury than females.

3. The quotients between the concentration in hair and blood were as followed. (Hair/Whole blood)

Control group M : 251.8 ± 82.8 **F** : 178.8 ± 64.5
DG **M** : 254.2 ± 80.4

4. Correlation between total mercury concentration in blood and hair was found a highly significant correlation.

5. Total mercury concentration in blood of general population on normal values was determinated. Median values 2.0 μg/100g, 95% & 99% confidence limits (upper), 3.6 μg/100g, 4.7 μg/100g were obtained by Bliss's Method.

The findings of this study would suggest that fish-eater is grater than general population on total mercury concentration in blood and hair.

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都衛生局公害保健課

緒　言

わが国における環境汚染，特に水銀による汚染の問題は水俣病事件以来多大の関心を惹起して来た．これを契機として，生体における水銀の挙動とその生体に与える諸影響が最近明らかになりつつあるが，そのなかで水銀の長期微量摂取についての問題が表面化してきた．

水俣病は，有機水銀を多量に摂取した場合の亜急性中毒である．これに対して第3水俣病は，長期微量水銀摂取という全国民に共通する水銀汚染の生体影響への注目を喚起した．このことから，消費者のあいだにつのる魚介類喫食に対する不安に応えるものとして，昨年6月厚生省は魚介類に含まれる水銀の暫定許容基準を公表した．しかし水銀の長期微量摂取によるdose-response にかかわる問題は，水銀の環境→人体への一連の転移機構が極めて複雑な関係にあり，現在までの研究が明確に答える部分は少なく今後の解明が待れている．このような現状を踏まえて，著者等は前報[1]において一般健康人の毛髪中総水銀量から，統計的にこれらの正常範囲を算出し報告したが，本研究においては，いまだ詳細な報告が見当らない一般健康人の血液と毛髪の相関関係と，血液中総水銀量のバックグランド並びに正常範囲を把握し，今後の汚染対策の資料とするために解析を試みた．さらに魚介類を多食している者について同様の調査を実施し，コントロールグループと数量的な比較を行ない，魚介類喫食量の血液と毛髪に与える影響を解析し若干の知見を得たので報告する．

実験方法

1　試料採取

コントロールグループについて地域差の有無をあわせて検討するために，伊豆大島，都下西多摩郡及び都区内の3地域を設定した．

それに魚介類喫食による影響を見るために，築地魚市場従業員を魚介類多食者グループとし，同一集団に3年以上生活している満16歳～60歳の男女208名から同一人の毛髪と血液を採取した．

2　被検者

1　Aグループ　伊豆大島々民93名（男性17名，女性20名）……AGと略記する．

2　Bグループ　都下西多摩郡日ノ出村，檜原村住民39名（男性23名，女性16名）……BGと略記する．

3　Cグループ　都内各区在住者91名（男性48名，女性43名）……CGと略記する．

4　Dグループ　魚介類多食者集団，築地魚市場従業員41名（男性）……DGと略記する．

3　試料の調整

1　毛髪の洗浄：前報の方法に準ずる．

2　血液：ヘパリナイズした試験管に約 10ml 採血しよく攪拌して試験に供した．

4　定量方法

前報[1]の方法に準じ，毛髪および血液は硫硝酸および過塩素酸で湿式疎解し，還元気化原子吸光法で測定した．

実験結果

1　血液中総水銀量

Table 1. に示したとおり，各グループの算術平均値と標準偏差(μg/100g)は，AG3.1±1.50，BG2.1±0.76，CG2.8±1.00，DG8.4±3.58 であるが，各グル

Table 1. Total mercury concentration in hair and blood of each group

Group	n			Whole Blood (μg/100g) Arithmetic Mean	Whole Blood (μg/100g) Geometric Mean & SD	Hair (ppm) Arithmetic Mean	Hair (ppm) Geometric Mean & SD
AG	37	M	17	3.1	$2.8\overset{\times}{\div}1.55$	6.2	$5.4\overset{\times}{\div}1.68$
		F					
BG	39	M	23	2.1	$2.0\overset{\times}{\div}1.46$	5.2	$4.7\overset{\times}{\div}1.56$
		F	16				
CG	91	M	48	2.8	$2.6\overset{\times}{\div}1.42$	5.0	$4.6\overset{\times}{\div}1.57$
		F	43				
DG	41	M	41	8.4	$7.6\overset{\times}{\div}1.55$	21.2	$19.1\overset{\times}{\div}1.58$

Group			Whole Blood (μg/100g) Geometric Mean & SD	Hair (ppm) Geometric Mean & SD
AG	M	3.5	$3.2\overset{\times}{\div}1.57$	$7.9\overset{\times}{\div}1.42$
	F	2.8	$2.6\overset{\times}{\div}1.50$	$3.9\overset{\times}{\div}1.50$
BG	M	2.5	$2.4\overset{\times}{\div}1.23$	$5.8\overset{\times}{\div}1.40$
	F	1.5	$1.5\overset{\times}{\div}1.20$	$3.3\overset{\times}{\div}1.40$
CG	M	2.9	$2.6\overset{\times}{\div}1.40$	$5.8\overset{\times}{\div}1.45$
	F	2.7	$2.6\overset{\times}{\div}1.37$	$3.5\overset{\times}{\div}1.46$
AG	M	8.4	$7.9\overset{\times}{\div}1.42$	
	F	4.2	$3.9\overset{\times}{\div}1.50$	
BG	M	6.1	$5.8\overset{\times}{\div}1.40$	
	F	3.5	$3.3\overset{\times}{\div}1.40$	
CG	M	6.2	$5.8\overset{\times}{\div}1.45$	
	F	3.8	$3.5\overset{\times}{\div}1.46$	

ープの水銀量は近似的に対数正規分布をしている．したがって水銀量を対数に変換し，幾何平均値（μg/100g）×÷偏差を求めた．

AG 2.8×÷1.55，BG 2.0×÷1.46，CG 2.6×÷1.42
Dグループ 7.6×÷1.55である．

Welch 方法により平均値の差の検定を行なえば，t検定により1％以下で有意なのは「BGが他グループより低く，DGがコントロールグループ（AG，BG，CG）に比較して約3倍程度高い」ことであった．

同様に男女間の平均値の差を検定すると，AGとBGに危険率1％以下で有意の差が認められ，男性が高い傾向にあることが推測されるが，都区内在住男女間には有意の差を認めない．

なお年齢別平均値について検討を加えたが，各年代の例数が少なく統計的にこれらについて言及することはできない．

2　毛髪中総水銀量

Tabel 1. に示したとおり，各グループの算術平均値と標準偏差(ppm)はAG6.2±3.17，BG5.2±2.20 CG5.0±2.29，DG21.2± 9.74 であるが，各グループの水銀量は血液同様近似的に対数正規分布をしているので，幾何平均値（ppm）×÷偏差を求めた．

AG 4.5×÷1.68，BG 4.7×÷1.56，CG 4.6×÷1.57
DG 19.1×÷2.58

血液同様に平均値の差の検定をしたが，コントロールグループ間には有意の差が認められない．一方男女間の平均値の差を検定すると，AG，BG，CGとも危険率1％以下で有意の差があり，男性の毛髪中総水銀量は女性のそれより高いことが推測される．なお年齢別平均値について検討を加えたが，各年代の例数が少なく統計的にこれらについて言及することはできない．

3　毛髪と血液の水銀濃度比率

被検者一人一人について，毛髪中総水銀量を血液中総水銀量で割り濃度比率を算出し，グループの総平均値と男女別の平均値を Table 2. に示す．

平均値の差の検定を行なえば，性差を考慮しない場合，AG，BG，CGではBGが危険率1％以下で有意の差があり，DGのそれと同様の結果を示している．性差を考慮した場合，AG，BG，CGの男性間には危険率5％で有意の差を認めず，女性のそれは危険率1％でBGの女性が有意に高い値を示している．

Table 2. Ratio of total mercury concentration and blood (Hair/Whole blood)

Group	n	$\bar{X}\pm\sigma$	$\bar{X}\pm\sigma$
AG	37 M17 F20	207.2±73.6	255.7±55.7 166.0±60.8
BG	36 M23 F16	243.7±91.6	251.9±92.8 227.6±81.9
CG	91 M47 F43	184.4±68.3	229.3±54.7 142.8±50.8
DG	41M41	254.2±80.4	

コントロールグループ全体から，正常人の毛髪と血液の濃度比率を算出すれば，男性 251.8 ± 82.8，女性178.8±64.5である．

4　血液と毛髪の総水銀量の相関性

血液毛髪中の総水銀量の関係は，各グループとも危険率1％以下で有意の正相関関係が認められる．その相関係数は，AG r=0.641，BG r=0.623，CG r=0.512，DG r=0.635である．

図—1にBGの毛髪と血液の総水銀量の相関図を示す．

5　血液中総水銀量の正常範囲

前報[1]において毛髪中総水銀量の正常範囲を求めた方法，すなわち Bliss の方法[2]により，BGより算出した．BGの血液中濃度を対数に変換し，累積度数を求めてProbit 表より Probit 変換を行ない，両者から回帰直線を求め，この回帰直線より求められた期待値から測定値の修正値を推定し，これについて回帰直線を再び求める．

Table 3. Total mercury concentration in blood determination by Bliss's Method

Median	2.0 μg/100g
95% Upper limit	3.6 μg/100g
95% Lower limit	1.1 μg/100g
99% Upper limit	4.7 μg/100g
99% Lower limit	1.2 μg/100g

この回帰直線より理論中央値つまり50％値を求めると，1.95μg/100g となる．95％上限値は3.63 μg/100g となり，99％上限値は4.69μg/100gとなる． Table 3. に示したとおりである．

6　高値検出者と魚介類喫食量

厚生省設定の「水銀による環境汚染暫定対策要領」によると，「頭髪中の総水銀量が50ppm を越えるものについては診断検査を行うこと」としているが，東

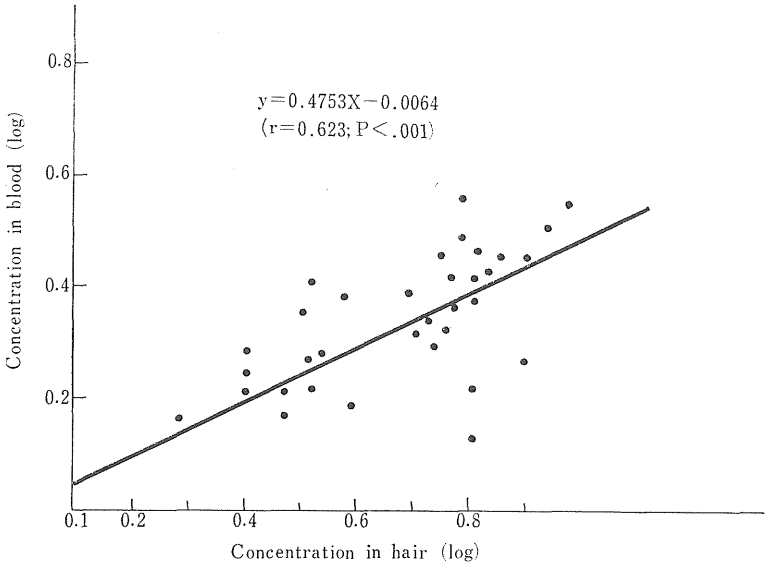


Fig 1. Correlation between total mercury concentration in hair and blood

Table 4. Reration between total mercury concantration in blood, hair and one week intakes of fish

Case No.	Age	Total mercury concentration		Intakes of Tuna (g)	fish/One week
		Hair (ppm)	Blood (μg/100g)		Another fish(g)
1	35	44.4	4.9	200	610
2	59	41.2	11.2	950	1,200
3	43	38.8	19.4	865	440
4	47	38.6	11.0	1,200	300
5	31	34.5	15.6	485	840
6	46	34.4	10.0	930	660
7	61	32.5	10.5	1,800	1,730
8	32	31.0	10.1	800	1,040
9	59	29.2	9.8	660	320
10	57	28.7	13.7	610	50
11	65	28.5	14.3	340	490
12	39	28.3	8.3	1,070	910
13	70	26.7	12.8	750	0
14	52	26.5	6.9	230	80
15	43	25.3	8.1	640	0
16	35	23.6	5.7	200	660
17	52	22.8	9.7	230	450
18	34	22.7	4.5	125	1,460
19	44	21.7	8.0	480	450
20	33	21.2	8.1	40	0
21	30	20.7	8.6	700	100

京都においては安全をみて，毛髪20ppm以上，血液10μg/100g以上の者について検診を実施している．

今回調査した魚介類多食者は，総数41名でそのうち毛髪中総水銀量20ppm以上が20名，全体の約48%に当り，血液中総水銀量10μg/100g 以上が10名で全体の約24%をしめた．

魚介類喫食量は面接調査によって得られたもので，マグロは1週間当り最大量で1,800g，最小量40gで1日平均1人約91gのマグロを喫食している．その他の魚介類は最大量1,730g，最小量0gで1日平均1人当り約80gを喫食している．個人間の成績を Table 4. に示した．

考　察

水銀汚染の指標として，毛髪中総水銀量を測定した報告[1~3/4~5]は内外共に多数ある．また動物実験で他の臓器をも含めて，体毛血液についての報告[6]もあるが人間について同一人の毛髪と血液中の総水銀量の相互関係と，魚介類喫食量を解析した報告は，マグロ魚船員についての山中等[7]の報告を見るだけである．

そのなかで，同一人の血液と毛髪の総水銀量を測定し，その平均値は，血液17.6μg/100g，毛髪 12.1ppm とし，魚介類喫食量および血液と毛髪のメチル水銀量についても調査を実施している．

血液中総水銀量について得られた成績は，コントロールグループ間で，西多摩郡の住民が有意に低い結果

を示したが，性差を考慮してみると，ＢＧの女性のそれが他のグループＡＧ，ＣＧの女性のそれよりも低い値を示していた．

おそらくＢＧの女性は，体重当りの魚介類喫食量が他の女性に比較して少ないのではないかと考えられる．しかし毛髪中の総水銀量を見た場合，ＡＧ，ＢＧ，ＣＧ間の女性のそれは有意の差が認められなかった．外に何か関与する因子が存在するのであろうか．

なおＡＧ，ＢＧは女性に対し有意に男性が高い値を示し，ＣＧは男女間に差を認めなかった．

地域差を考慮しないで，ＡＢＣグループから正常人の男女の血液中総水銀量の平均値を算出すると，男性2.7μg/100g 女性2.2μg/100g である．

血液中総水銀量については，1966年のＷＨＯの大規模な報告[8]がある．15ヵ国812名について分析した結果，全体の77%が0.5μg/100ml 以下，85%が1μg/100ml 以下，95%が3μg/100ml で，年齢性別地域差はなかったとしている．日本人に関する成績は，被検者40名の80%が0.5μg/100ml 以下で，最高値が4μg/100ml である．

この報告の成績と著者らの調査結果を比較してみると，都民の血液中総水銀量は外国人の約5倍．この報告での日本人の成績と比較するとそれ以上の水準にあることになる．この分析は1964年に実施されているから，1972年実施の本調査の結果と比べて増加の傾向にあるのであろうか？

1970年 Tejning[9] はスウェーデン人について，ＷＨＯ報告と同様の値を報告しており，両者の報告を比較するかぎり年代増の傾向は認められない．

水銀蓄積量の年代増については，著者等も古い臓器，毛髪等によって現在分析を進めている．

1971年Suzuki 等[10] は9人の日本人母親について総水銀量を測定し，血球中 2.3μg/100ml，血漿中1.2μg/100g と著者等の女性の値より若干高い結果を報告している．最近の Magos 等[11]の報告によると，例数は少ないが10人のアメリカ人の血液中総水銀量は 0.5μg/100ml である．

このように，一般的な食生活をしている日本人でも，魚介類喫食量がアメリカ人，スウェーデン人よりも多いことから，4～5倍程度高い水銀を血液中に含有している．

さらに魚介類多食者グループは高い傾向にあり，魚介類喫食量の影響の大きさを明らかにしている．なお毛髪中総水銀量は，コントロールグループ間に危険率1%以下で有意の差がなく，また男性のそれが女性よりも有意に高いことは前報[1]と同様の成績である．

毛髪と血液の濃度比率は，喜田村等[12]によれば250：1，Lofroth[13]によれば同様に250：1であるとしている．Sumari 等[6] はフィンランド人の魚介類を食べる人のそれは174：1，食べない人は50：1～121：1であると報告している．

著者等の結果は，コントロールグループにおけるそれは，ＡＧ207：1，ＢＧ244：1，ＣＧ188：1で，ＢＧが有意に高い値を示したが，これは，男女別に算出した濃度比率から見てみると，ＢＧの女性の比率が他のグループの女性よりも有意に高いことに起因している．すなわちＢＧ女性被検者16名の血液中総水銀量が1.5μg/100g とＡＧ，ＣＧの女性の平均値2.6μg/100g に比較して低いことに原因がある．

このことから，山村の女性の食生活が，大島，区内女性に比較して内容量共に違いがあるのでわないかと考えられる．しかし，毛髪中の総水銀量には有意差が認められないので，この点に関してはさらに喫食調査を含めて例数を増し解析したいと考えている．

毛髪と血液の濃度比率は，男女間の差が明らかで，コントロールグループより算出した正常男性のそれは251.8±8.28，女性178.8±64.5であった．したがって，魚介類多食者のそれが254.2±80.4で，コントロールの男性と変らないところから，この程度の魚介類喫食量では濃度比率は変らないことが明らかとなった．さらに喫食量が多くなると，この比率はくずれ山中等のマグロ魚船員の成績から濃度比率を算出すると，69：1となり毛髪中の総水銀量に対して，血液中の総水銀量は極めて高い量となる．

血液と毛髪の総水銀量の相関関係は，各グループとも高い有意の正相関関性が認められた．

同様な結果は Birke 等[6]，Berglund 等[6]も一般人，魚介類多食者を含めて相関関係が成立すると報告している．喜田村等[12]は，水俣病罹患ネコ，不知火海沿岸健康ネコにおける調査で，体毛中の総水銀は両者とも著明な差を認めないが，血液中のそれは明らかに発症ネコが高かったとしている．

このことは山中等[7]のマグロ魚船員の例にも明らかなように，魚介類喫食量に応じて毛髪よりも血液中総水銀量が著明に高くなることを示唆している．

一般的に考えて，経口的に摂取する水銀化合物の違いによることも考えられる．

前記の事例は多量のメチル水銀量を経口的に摂取したことにより起ったもので，メチル水銀は脂溶性有機重金属であるから腸管吸収率が高い．したがって一部

は分解されるにしても無機水銀よりは血液中に取りこまれる量は多いと考えられるので，正常な食生活者とは異なった様相を血中濃度において呈するのであろう．次報告において，毛髪および血液の総水銀量とメチル水銀量の関係を解析しこれらの体内代謝に言及してみたいと考えている．

血液中総水銀量の正常範囲を算出したが，95%上限値 3.6μg/100g に対して，DGの被検者はほとんど越えている．また1968年ストックホルムで開かれた水銀化合物の許容濃度についての国際会議の勧告値，血液中総水銀濃度10μg/100g を越える者がDG41名中10名24%にも達する．

動物蛋白質源を魚介類に求める魚食民族としてのわが国は，白木[1]が指摘している次世代への悪影響の問題も含めて，さらに多食者の追跡調査の必要性が考えられる．

結　論

一般的な食生活者167名（男性88名，女性79名）を東京都の条件の異なる3地域，伊豆大島，西多摩郡，区から抽出し，これに魚介類多食者41名（男子のみ）を加えた計208名について同一人の血液と毛髪の総水銀量を測定した．

1　血液中総水銀量は対数正規分布をしていたので各グループとも幾何平均値(μg/100g) $\overset{\times}{\div}$ 偏差を求めた．

AG：$2.8\overset{\times}{\div}1.55$（男 $3.2\overset{\times}{\div}1.57$，女 $2.6\overset{\times}{\div}1.56$）

BG：$2.0\overset{\times}{\div}1.46$（男 $2.4\overset{\times}{\div}1.32$，女 $1.5\overset{\times}{\div}1.20$）

CG：$2.6\overset{\times}{\div}1.42$（男 $2.6\overset{\times}{\div}1.40$，女 $2.6\overset{\times}{\div}1.37$）

DG：$7.6\overset{\times}{\div}1.55$（男子のみ）

性差はAG，BGにおいて危険率1%以下で明らかであるが，都心の男女間には差が認められなかった．なお多食者グループのそれは，喫食量の影響によりコントロールグループに比較して約3倍程度高値を示した．

2　毛髪中総水銀量は血液中総水銀量同様対数正規分布をしたので，幾何平均値(ppm) $\overset{\times}{\div}$ 偏差を求めた．

AG：$5.4\overset{\times}{\div}1.68$（男 $7.9\overset{\times}{\div}1.42$，女 $3.9\overset{\times}{\div}1.50$）

BG：$4.7\overset{\times}{\div}1.56$（男 $5.8\overset{\times}{\div}1.40$，女 $3.3\overset{\times}{\div}1.40$）

CG：$4.6\overset{\times}{\div}1.57$（男 $5.8\overset{\times}{\div}1.45$，女 $3.5\overset{\times}{\div}1.46$）

DG：$19.1\overset{\times}{\div}1.58$（男性のみ）

性差は危険率1%以下で有意に男性が高い傾向にあることを認めた．

3　毛髪と血液の総水銀濃度比率（毛髪／血液）AG，BG，CGのコントロールグループより算出した一般的な食生活者の濃度比率は，男性：251.8±82.8 女性：178.8±64.5であり，明らかな性差が認められた．DGのそれは254.2±80.4でコントロールグループの男性と同じ値であった．

4　血液と毛髪の総水銀量の相関関係は，各グループ共に危険率1%以下で有意の正相関関係が認められた．

5　血液中総水銀量の正常範囲は，東京都民において，3.63μg/100g であった．

文　献

1) 二島太一郎，池田真悟，多田宇宏，野牛弘，長崎護，有働亮二，上条宏：東京都立衛生研究所研究年報，23，277—282 (1971)
2) Bliss, C.I. : *Quart. I. Pharm. Pharmacol.*, 11, 192 (1938)
3) Perkons, A.K., : *Dissertation Thesis (Dr. of Philosophy) of University of Toronto.* (1965)
4) Coleman, R.F., Crippss, F.H., Stimson, A., and Scott, H.D. : *Atomic Weapons Research Establishment.*, 12—22 (1966)
5) 狐塚寛，磯野秀夫，角田紀子，丹羽瀬竪：衛生化学，18(1)1—6 (1972)
6) Robert, C.W.,: *Mercury in the Enrrorment*, 46—68 (1972), CRC Ppess, Ohio.
7) 山中すみへ，西村正雄，矢崎武，上田喜一：日衛誌，26(1)124 (1971)
8) WHO : *WHO. Occ. Health.*, 66, 39(1966)
9) Tejning, S., *Report* 700520 *from Department of Occupational Medicine, University Hospital*, 1970
10) Suzuki, T. and Katsunuma, H., : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 5, 502—505 (1971)
11) Magos, L., and Clankson, T.W. : *J. of the AOAC* 55(5), 966—971 (1972)
12) 喜田村正次：水俣病，熊本大学医学部水俣病研究班 (1966)
13) *Lofroth, G.*, : *Methylmercury, Report of University of stockholm and The Swedish Natural Science Research Council* (1969)
14) 白木博次：公害研究，2(3)1—27 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 347 — 354, 1974

大気中の有機化合物の分析（第1報）塩素系有機溶剤について

太田与洋* 牧野国義* 溝口 勲*

Analysis of Organic Compounds in Air (I)
Analysis of Chlorinated Hydrocarbons

TOMOHIRO OHTA*, KUNIYOSHI MAKINO*, AND ISAO MIZOGUCHI*

I 序

いわゆる東京光化学スモッグの被害者数がオキシダント濃度によく相関することは，オゾン，PANその他の過酸化物が，光化学スモッグの現象に重要な役割を果たしていることを示唆しているのと同様に，光化学反応性が強く，かつ，酸化性物質の存在下で，一段と反応が進行する物質の反応生成物による寄与を否定は出来ない．この観点からするならば，大気中に存在する有機物質を充分に把握し，その中から，ある程度に高濃度に存在する物質のうち，光化学反応性が大きいとされるもの，または，大気中光化学反応の結果，生成されると推測されるもので，それ自体が充分毒性を持つもの，あるいは，それにいたる中間体で，充分な毒性を持つと考えられるものを予測し，それを制御された反応系の中で，観察するという方法は，光化学スモッグの一層の解明の目的にとって充分に意義のあることである．

労働環境管理の目的で，特定空間域に高濃度に存在する特定化学物質の検出定量を目的にする分析法が古くから整備されている．しかし，都市大気中に混在する有機物全般を分析の対象にするとき，それらの分析法によるならば，それらは検出限界以下であり，かつ，性格の似た物質を一度に可能なだけ簡便に分析したいとする要求に充分には合致しえない．従って，分析の前段階に濃縮操作が必要である．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

著者らは，加藤[1]の臭気濃縮装置を用いて，大気50 l を濃縮し，水素炎イオン化検出器（FID）付きのガス・クロマトグラフと，ガスクロマトーマススペクトル（GC—MS）法を用いて，大気中成分の分析をおこなってきたが，今回，塩素系有機溶剤としして使用されているクロロホルム（以下 $CHCl_3$ と記す），1.1.1—トリクロルエタン（以下 CH_3CCl_3 と記す），四塩化炭素（以下 CCl_4 と記す），トリクロルエチレン（以下 C_2HCl_3 と記す），テトラクロルエチレン（以下 C_2Cl_4 と記す），塩化メチレン（以下 CH_2Cl_2 と記す），ジクロルエタン（以下 $C_2H_4Cl_2$ と記す）を都内大気中から検出した．塩素系有機化合物の電子捕獲性の大きいことを利用して，それに最適の検出器である電子捕獲型検出器（ECD）の付いたガスクロマトグラフを用いて，簡便で，かつ分析精度のいい方法を使い，都内数ケ所の大気分析を行なった．

II 分析方法及び結果

(1) 定 性

(1-1) 定性分析方法

大気 50 l を加藤の臭気濃縮装置を用いて GC 管に濃縮サンプリングし，これをガスクロマトーマススペクトル法により定性分析した．分析条件は下の通り．

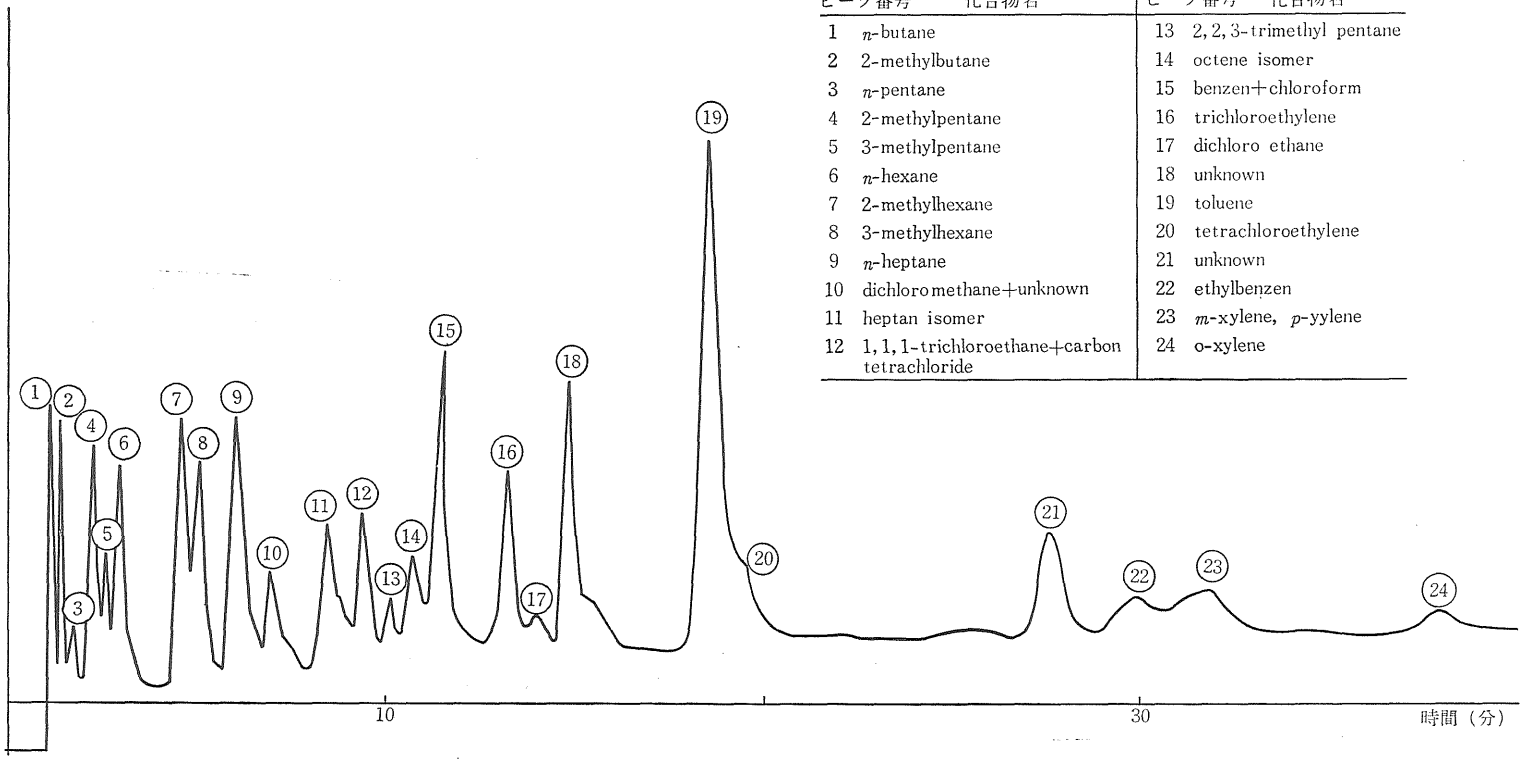
装置 島津 LKB 9000

(a) ガスクロマトグラフ部

カラム：ガラスカラム 300 cm×0.3 cm

充塡剤：25%トリクレジルオスフェイト（TCP）chromosorb (60/80)mesh

温 度：サンプル注入部 150°C
カラムオブン 25°C—100°C 6°C/min
セパレーター，200°C



ピーク番号	化合物名	ピーク番号	化合物名
1	*n*-butane	13	2, 2, 3-trimethyl pentane
2	2-methylbutane	14	octene isomer
3	*n*-pentane	15	benzen+chloroform
4	2-methylpentane	16	trichloroethylene
5	3-methylpentane	17	dichloro ethane
6	*n*-hexane	18	unknown
7	2-methylhexane	19	toluene
8	3-methylhexane	20	tetrachloroethylene
9	*n*-heptane	21	unknown
10	dichloro methane+unknown	22	ethylbenzen
11	heptan isomer	23	*m*-xylene, *p*-yylene
12	1, 1, 1-trichloroethane+carbon tetrachloride	24	o-xylene

図1　都内濃縮大気成分のＴＩＭＣによるガスクロマトグラム（例）

キャリヤーガス：ヘリウム 30 ml/min
検出器：全イオン電流モニター（TICM）20 eV

(b) マススペクトロメータ部

加速電圧：35 kV
イオン化室温度：300°C
トラップ電流：60 μA
励起エネルギー：70 eV
スキャンスピード：7
マルチプルゲイン：3

(1—2) 結果

1973年8月29日，11：50 AM 新井小学校での採取サンプルの TICM によるガスクロマトグラムを図1に示した．

同定は標準マススペクトル集[2]によった．同定結果は図中に示してある．

(2)定 量

(2—1) 定量分析方法

今回は，$CHCl_3$, CH_3CCl_3, CCl_4, C_2Cl_4, C_2HCl_3 を定量分析の対象とした．

液相を TCP とするカラムでは CH_3CCl_3 と CCl_4 の保持容量がほとんど同じため分離されず，定量には使用できなかった．

サンプリグは，よく洗浄した容量 10 cc のガラス注射器を，その地点の空気で10数回よく洗った後，金属製のふたをして持ち帰った．サンプリングは，1974年の5月1, 2, 7, 8日，6月4, 6, 7日，7月9, 16日，9月5日，各々5～7地点で行なった．なお6月20日に都内鉄道沿線24地点でサンプリングを行なった．

10 cc のうち 2 cc をガスクロマトグラフに注入した．定量の際のガスクロマトグラフ条件は以下の通り

表1 各測定日における塩素系有機溶剤の濃度（ppb） (1)

測定日	時刻	場所	$CHCl_3$	CH_3Cl_3	CCl_4	C_2HCl_3	C_2Cl_4
49年5月1日	11：00	小石川HC	39	0.8	2.1	1.0	1.3
	11：20	神田HC	26	0.7	2.1	5	1.0
	11：40	麹町HC	36	1.0	1.7	tr.	1.4
	11：55	中央HC	36	0.5	2.0	2	1.2
	13：05	城東HC	39	1.0	2.0	1	1.3
	13：30	江戸川社会福祉センター	33	1.0	2.1	2	1.3
	14：15	台東機械センター	37	0.8	2.1	1	1.2
49年5月2日	10：50	麻布支所	33	0.6	2.1	1	1.0
	11：30	糀谷HC	36	0.8	2.2	1	1.2
	12：10	大崎中学校	33	0.6	2.1	1	0.9
	12：15	碑文谷HC	25	2.1	1.7	1	1.2
	13：50	母子保健院	37	1.1	2.2	1	1.2
	14：35	渋谷HC	18	2.3	1.2	1	1.4
49年5月7日	10：20	中野税務所	32	0.7	2.0	1	0.8
	10：50	練馬清掃工場	29	0.7	1.4	1	9.4
	12：15	青梅HC	36	1.7	2.2	tr.	8.2
	13：30	八王子第1小学校	34	0.7	2.1	3	15.6
	14：05	立川HC	33	0.7	1.9	tr.	9.7
	15：30	杉並西HC	29	0.8	1.6	1	1.0
49年5月8日	10：30	池袋HC	27	0.8	2.9	tr.	1.1
	11：25	大日本インキ	30	1.1	2.5	1	1.8
	12：00	赤羽HC	33	1.7	24.1	1	1.6
	13：00	足立農協	30	1.7	2.9	1	1.8
	13：40	葛飾区民会館	22	1.0	2.2	5	1.0
	14：30	向島支所	22	1.4	2.3	2	1.0
	15：00	荒川科学館	23	1·5	2.5	2	1.2

注：HC は Hcalth Center（保健所）の略　tr. は trace の略　— はデータなし

表2　49年6月20日の塩素系有機溶剤の濃度（ppb）　(3)

測定日	時刻	場所	$CHCl_3$	CH_3CCl_3	CCl_4	C_2HCl_3	C_2Cl_4
49年6月20日	12：48	東京駅	—	1.1	2.0	検出せず	1.7
	12：40	お茶の水駅	—	0.7	1.4	〃	1.1
	13：00	浜松町駅	—	0.7	1.6	tr.	1.1
	13：05	品川駅	—	0.7	1.9	検出せず	4.4
	13：09	五反田駅	—	0.9	1.5	tr.	1.1
	13：17	渋谷駅	—	1.1	1.6	検出せず	1.1
	13：25	新宿駅	—	1.1	2.0	〃	1.1
	13：28	高田馬場駅	—	0.7	1.4	〃	1.3
	13：33	池袋駅	—	1.1	1.9	tr.	1.7
	13：37	巣鴨駅	71	1.1	2.7	検出せず	1.7
	13：44	日暮里駅	59	1.5	3.6	tr.	1.3
	13：38	上野駅	96	1.8	2.0	tr.	1.3
	14：00	錦糸町駅	—	2.1	2.6	検出せず	1.5
	14：05	平井駅	79	0.9	3.0	〃	1.5
	12：35	四谷駅	—	0.9	1.6	tr.	1.2
	12：52	新宿駅	69	1.2	1.4	tr.	1.4
	12：56	中野駅	71	1.1	1.5	tr.	1.5
	13：04	荻窪駅	67	1.1	1.6	tr.	1.5
	13：09	吉祥寺駅	57	0.9	1.3	tr.	5.9
	13：20	武蔵小金井駅	—	1.5	1.4	検出せず	1.4
	13：35	国立駅	—	2.1	—	tr.	1.3
	13：46	日野駅	—	2.0	1.8	tr.	1.7
	13：58	八王子駅	—	1.2	1.1	検出せず	1.7
	14：04	高尾駅	—	5.5	2.2	tr.	3.4

表3　各測定日における塩素系有機溶剤濃度（ppb）　(2)

測定日	時刻	場所	$CHCl_3$	CH_3CCl_3	CCl_3	C_2HCl_3	C_3Cl_4
49年6月4日	10：40	練馬HC	115	0.4	1.3	検出せず	1.0
	11：10	中野税務所	176	0.6	1.6	〃	1.2
	12：05	青梅HC	93	0.4	1.2	〃	0.9
	13：40	八王子第1小学校	105	0.4	0.9	〃	0.8
	14：15	立川HC	124	0.4	1.2	〃	1.0
49年6月6日	10：05	池袋HC	15	0.5	2.0	3	1.5
	10：40	大日本インキ	13	0.5	1.7	3	1.5
	11：00	赤羽HC	233	1.0	1.9	tr.	1.9
	11：35	足立農協	97	0.9	2.4	3	2.3
	12：30	葛飾区民会館	19	0.5	3.2	tr.	2.0
	12：55	向島支所	15	0.9	2.9	検出せず	1.5
	13：55	荒川科学館	120	0.5	1.3	tr.	1.2
49年6月7日	10：00	麻布支所	65	3.5	1.8	3	1.4
	10：45	糀谷HC	60	3.5	—	検出せず	1.2
	11：30	大崎中学校	56	3.1	1.6	〃	1.1
	13：10	碑文谷HC	42	2.3	1.6	〃	1.1
	13：30	母子保健院	79	3.4	1.0	〃	1.5
	14：10	渋谷HC	57	2.6	2.0	〃	0.9

表4　各測定日における塩素系有機溶剤濃（ppb）　(4)

測定日	時刻	場所	$CHCl_3$	CH_3CCl_3	CCl_4	C_2HCl_3	C_2Cl_4
49年9月5日	10：05	池袋HC	26	1	2.6	1.1	0.9
	10：50	大日本インキ	17	1	2.7	0.4	0.7
	11：15	赤羽HC	26	1	2.8	0.7	0.7
	11：50	足立農協	25	1	2.7	1.9	0.7
	12：50	葛飾区民会館	22	1	2.7	—	0.7
	13：10	向島支所	22	1	2.7	0.7	0.7
	13：40	荒川科学館	13	0.8	2.7	0.7	0.5
49年7月8日	10：20	中野税務所	14	0.6	0.8	tr.	2.3
	10：45	練馬HC	11	0.6	1.0	5	1.9
	12：20	青梅HC	13	0.8	1.4	検出せず	4.3
	13：40	八王子第1小学校	3.0	—	0.3	検出せず	0.6
	14：00	立川HC	7.2	1.6	—	5	5.2
49年7月16日	10：35	渋谷HC	55	4.0	4.1	21	3.4
	11：15	麻布支所	51	2.1	2.9	13	2.6
	11：45	大崎中学校	73	2.9	—	20	3.1
	12：40	糀谷HC	56	3.0	3.5	20	3.0
	14：15	碑文谷HC	46	3.0	2.5	13	2.3
	14：40	世田谷母子保健院	77	2.4	3.3	14	2.1

である．

装　置：島津　GC—5A，GC—3BE

カラム：120 cm×0.3 cm ガラスカラム

充填剤：30%*n*-Hexadecane on Chromosrb (60/80) mesh

サンプル注入口温度：70°C

カラム温度：40°C

検出器温度ECD：150°C

感　度：10^2

レンジ：2～8

線　源：^{63}N

キャリヤーガス：N_2 60 ml/min

検量線は，蒸留精製したエーテルを溶媒とし，これらの塩素化合物を混合した標準液によった．

ガス・クロマトグラフへの注入の際に生ずるガラス注射器のもれを知るために，ガスタイトシリジに対するこれらの注入率を求めた．95%であった．ガラス注射器のよごれや，注入もれのそれらの個々の差を知るために，任意の2組の注射器をテフロン管で接続し，両者の空気を移動させて混合し，それぞれのクロマトグラフを比較したが，差はほとんど見られなかった．このことは同時に再現性のいいことを示している．

(2—2)　結　果

結果は表1～表4に示した．

検出器のよごれとか，レンジの違いのために，C_2HCl_3 検出限界は表1～表4の測定日で，順に，1.0，3.3，1.5，2.7 ppb であった．

ガスクロマトグラムの一般的なものとして，7月16日の世田谷区の母子保健院前の大気分析例を図2に示す．

今回の著者らの結果の平均は，$CHCl_3$ は 48 ppb，σ=38，CH_3CCl_3 は 1.4 ppb σ=0.9，CCl_4 は 3.2 ppb，σ=5.2，C_2HCl_3 は 1.9 ppb C_2Cl_4 は 2.1ppb，σ=2.2であった．

なお，測定日の天候は以下の通りであった．

測定日	天候	最高温度	備考
5月1日	くもり一時晴れ	24.4°	
2日	晴れ	20.1°	
7日	晴れ一時くもり	20.4°	
8日	晴れ一時くもり	21.5°	
6月4日	くもり時々雨	19.9°	
6日	くもり時々晴れ	26.1°	
7日	晴れ	27.2°	光化学スモッグ注意報発令
20日	晴れ	26.4°	
7月3日	くもり	26.1°	
9日	くもり後晴れ	31.0°	晴れ光化学スモッグ注意報発令
11日	くもり後雨	27.5°	

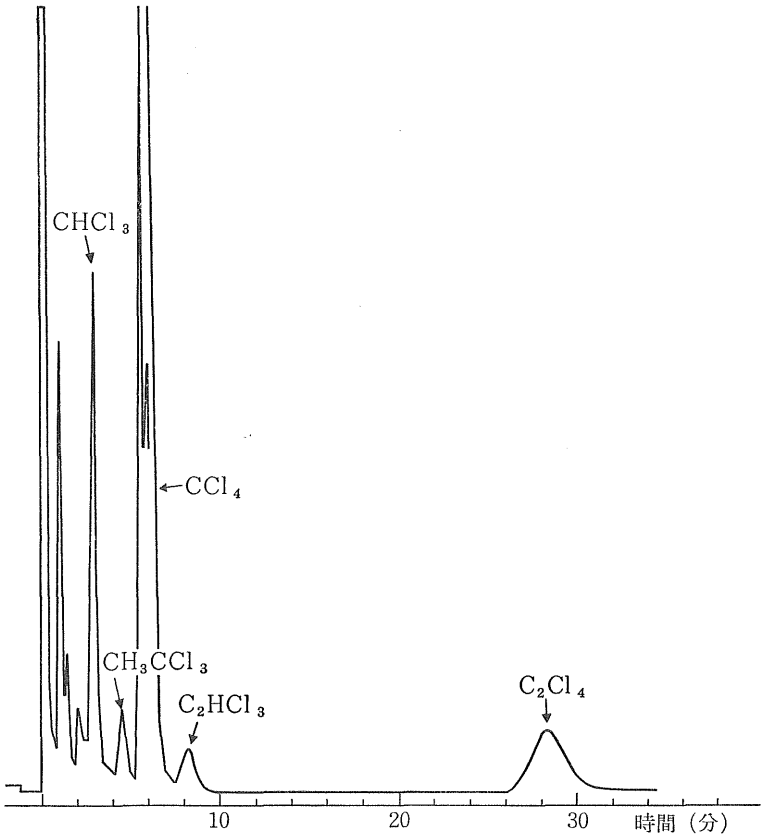


Fig. 2 *n*-Hexadecane カラムによる大気のガスクロマトグラム（1974年7月16日，世田谷母子保健院屋上）

Ⅲ 考 察

(1) 分析方法の考察

C_2～C_6 程度の大気中に比較的多量に存在する物質の分析を目的として大気 200 m*l* を簡便な濃縮を経てガスクロマトグラフ析を行う方法は渡辺[3]らにより確定されている．

しかし，C_5 程度以上の大気中有機化合物の総分析を行なう際には，検出限界以上の濃度を得るための濃縮法と，分離同定するための手段の考察を避けることは出来ない．

濃縮法には大別して常温で吸着濃縮する方法と，ドライアイス，液体酸素などの寒剤を用いる冷却吸着濃縮法とがある．

前者の場合には活性炭の様に固体にそのまま吸着させるか，不活性な担体に適当な液体をコーティングしたものに濃縮し，加熱をして分析器にサンプルを導入する方法が，従来よく使われてきた．Bellar[4]らは，空気100 cc を10%Carbowax に濃縮し，FID を用いて，ppb 程度の物質を分析している．活性炭の場合には，加熱による脱着が，吸着力の大きいために不充分であるという欠点を持っている．適当な溶媒を用いて抽出し，さらに必要な場合は，抽出液を濃縮した後に分析する方法がそれを補ってきた．Grob[5]らはチューリッヒの大気 25 m^3 を活性炭 25 mg で吸着濃縮し，二硫化炭素で抽出し，C_6～C_{20} の有機化合物を 100 個以上キャピラリーカラム付きのガスマスで同定し，報告している．

一方，それよりすぐれた方法として，吸着剤に高分子化合物を用いての分析例の報告が最近とみに提出される様になった．常温での吸着濃縮するための吸着剤として好ましいものは，水と二酸化炭素をほとんど吸着せずに，大気中有機化合物を多種にわたり吸着し，その吸着率と脱着率がすぐれていることである．これを満たすものとして，Chromosorb 102，Porapak と

か，Tenax GC の使用例が報告されている．Dravnieks[6]らは，styrene-divinyl の共重合体(Chromosorb 102) を用いて，臭気分析のために必要とされる 10^{-10} gr/l までの物質を吸着濃縮している．吸着濃縮する前に充分に充てん剤の極性基を除外しておけば，ほとんど水の妨害はないとしている．また Bertsch[7]らは 2.4-diphenyl paraphenylene oxide のポリマー(Tenax GC) を用い，ヒューストンの大気を吸着濃縮し，キャピラリーカラムを用いて分析し，C_5～C_{16} までの100種ほどの大気成分を報告している．Tenax GC は水の妨害はほとんどなく，捕集効率もよく，定量性も極めてよいとしている．しかしアルコールなどの強い極性を持つものは捕集出来ないと考えられる．

後者の例，すなわち冷却吸着濃縮法には，今回著者らの使用した加藤[1]の臭気濃縮装置を用いる方法がある．それはケイソウ土と耐火レンガを吸着剤とした濃縮管を液体酸素で冷却し，濃縮捕集するものである．この方法でも明らかなように，後者にすべて共通に見られる欠点は，大気中に数%含まれる水と，数百 ppm 含まれる二酸化炭素[8]による分析の妨害を未然に防ぐために，脱水剤，脱炭酸剤を用いる必要のあることである．加藤は通常は脱水剤に無水炭酸カリウム，脱炭酸剤にソーダライムが最適としているが，これらの物質に吸収される大気中有機物のあることを，配慮しておく必要がある．著者らはこの方法を用いて濃縮し，TCP 液相カラムを用いてガス・マスを用いて大気を分析した．ガスクロマトグライー条件による制約ももちろんあるが，キシレンまでの30種以下が同定されているにすぎず，総分析の目的に使用するには，さらに検討を加える必要がある．

以上のことから，C_5 程度以上の大気中有機化合物を総分析する方法としては，高分子化合物に常温吸着し，キャピラリカラムを使用する方法が，ある制約はあるが，最も好ましいものだと考えられる．著者らは，必後この方法の検討を加えていきたい．

(2) 結果の考察

従来塩素系有機溶剤を使用する工場では，労働衛生上の観点からの検出例，分析例が出されているが，環境科学的な観点からの報告は少ない．

Lovelock[9]らは，大西洋上での CCl_4 の濃度を71.2 ppt と報告している．Murray[10]らは英国田園地帯及び北大西洋上のうち，$CHCl_3$，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4，をそれぞれ，陸上部で0.8，0.06，2.0，2.8 ppt，海上部で0.34，0.047，1.1，0.72 ppt と報告している．Simmonds[11]らは，またロスアンゼルスの大気中の分布を調査し，それらの平均値は，CCl_4，CH_3CCl_3，C_2Cl_4 の順に，0.22，0.37，1.25 ppb，$CHCl_3$ は trace と報告している．

今回の著者らの結果をこれらの結果と比べれば，バックグラウンド汚染に対し，100倍～1000倍程度大きく，ロスアンゼルスの結果と比較しても，$CHCl_3$ は数段に濃く存在し，他の物質も2倍～11倍程度濃く存在している．

48年度の日本国内での $CHCl_3$，CH_3CCl_3，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4 の需要はそれぞれ，1.5万トン，5万トン，6.2万トン，11万トンン，5.7万トンである[12]．CH_3CCl_3，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4 の化合物は脱脂剤としてメッキ工場などで使用され，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4 はドライクリーニングによく使用されている．$CHCl_3$ は麻酔剤や溶剤に使用され，工業的には CCl_4 と C_2Cl_6 などと同様にフレオンガス製造の原料として使用されている．

CH_3CCl_3，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4 については7月の結果のうち一部に高濃度が見られるが，5月6月の結果では変化はそれほど見られない．しかし $CHCl_3$ の濃度が他の化合物より格段に高く，その測定日場所による濃度変化の大きいことには注目する必要がある．濃度の高いことはその他の四物質よりも少ない需要量から考えても，その最終段階でより開放的に使用されているか，又は，他の物質が何らかの反応を経て $CHCl_3$ になることが考えられる．濃度変化の大きいことは，多地点での同時サンプリングなど，発生源を推測できる様な調査の結果を待たねばならない．なお，溝口[13]らにより，他の大気中炭化水素と塩素系有機溶剤の濃度における相関はないことは報告されている．

森田[14]らによれば都内水道水中から平均値で $CHCl_3$ 41 ppb，C_2Cl_4 は 1 ppb，C_2HCl_3 は 1 ppb 未満で検出している．

我が国の労働衛生上の許容濃度[15]は，$CHCl_3$，CH_3CCl_3，CCl_4，C_2HCl_3，C_2Cl_4 の順に 50，350，10，100，100 ppm であり，$CHCl_3$ を除いて他の物質が人体に直接的な被害を与えることはないだろうと推測されるが，$CHCl_3$ は許容濃度の100分の1近くに達するときも見られている．環境中のこの程度の濃度が人体生物に与える影響の研究はほとんどなされてなく今後にまたれる．

これらの塩素化合物の光化学反応について物理化学的見地からはよく知られている．Rinzena[16]らは，各種塩素系有機溶剤の溶接工場内での反応を知るために，各物質を環境衛生上の許容濃度付近にして，600l

アルミ製箱の中で，タングステンアークなど三種のエネルギー源を用いて，その結果生成するホスゲン，塩素，塩化水素量を報告している．熱反応であるか，光化学反応であるか，明確に区別された方法ではないが，$CHCl_3$，CH_3CCl_3 については安定であるが，C_2HCl_3 と C_2Cl_4 は反応し，塩素と塩化水素とホスゲンがかなり急速に生成し，ある場合は，溶接工に被害を生じる可能性があるまでに発生すると報告している．

Altshuller[17]の総説によれば，Kopczynski らは C_2HCl_3，プロピレン，エチレンをそれぞれ個別に光照射したとき，照射後は眼への刺激度がプロピレンとか，エチレンの場合よりも C_2HCl_3 の場合が大きいことを報告しており，ホルムアルデヒドの生成の認められないことからも，これはホスゲンか，他の未知物質による可能性を考えるのは合理的だと思われる．

著者らは現在大気中からホスゲンを検出し，さらに細部にわたり検討を加えている．これは，これらの塩素有機溶剤の大気中での挙動の承握とともに別の機会に報告したい．

Ⅳ 結　論

(1) 都内大気中から，クロロホルム，1.1.1.-トリクロルエタン，四塩化炭素，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレン，塩化メチレン，ジクロルエタンを検出した．

(2) 平均的な濃度は以下の通りである．$CHCl_3$, CH_3, CCl_3, CCl_4, C_2Cl_4 の順に平均値は 48, 1.4, 3.2, 2.2 ppb であり，C_2HCl_3 は 1.9 ppb 以上である．

Ⅴ 謝　辞

今回の調査研究を行なうにあたり，当研究所水質研究科の森田昌敏研究員から適切な助言をいただいた．御礼を申し述べたい．またサンプリングに御協力いただいた，当研究室の方々にあわせて御礼を申し述べたい．

文　献

1) 加藤龍夫：安全工学，10，97—104 (1971)
2) Cornu, A and Massot. R : Compilation of Mass Spectral Data, Heyden & Son Limited.
3) 渡辺征夫，清野　茂，大喜多敏一：空気清浄 9，2‘23 (1971)
4) Bellar T. A., Brown M. F., and Sigsby J.E, : *Anal. Chem.* 35, 1924—1927 (1963)
5) Grob K. and Grob. G. : *J. Chromatogr.* 62. 1—13 (1971)
6) Dravnieks A. Krotoszynski B.K., Whitfield J., O'Donnell A. and Burgwsald T. : *Enoiron Sci. Technol.* 5, 1220—1222 (1971)
7) Bertsch W., Chang R. C. and Zlatkis A : *J. Chromatog. Sci.* 12, 175—182 (1974)
8) 原田　朗：大気のバックグラウンド汚染，6，(1973)共立出版
9) Lovelock J. E., Maggs R. J. and Wade R.J. : *Nature* 241, 194—196 (1973)
10) Murray A. J.an d Riley J. P. : *Nature*, 242, 37—38 (1973)
11) Simmonds P. G., Kerrin S. L., Lovelock. J.E. and Shair F.H. : *Atmosphenic Enmronment* 8, 209—216 (1974)
12) 化学工業日報社調査課：私信
13) 溝口勲，佐藤泰仁，牧野国義，野牛弘：都立衛生研究所年報，25，
14) 森田昌敏，中村弘，三村秀一：昭和48年度プロジェクト研究中間報告，37 (1974) 東京都研究調整室
15) 多田　治：有機物管理のための測定法，77 (1970) 労働科学研究所出版部
16) Rinzema L. C. and Silverstein L. G. : *Amer. Ind. Hyg. Assoc.*, 35—40 (1971)
17) Altshuller A. P. and Bufalini J.J. : *Environ. Sci. Technol.* 5, 39—64 (1971)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 355 — 369, 1974

光化学スモッグによる眼刺激作用の実験的研究（第2報）

牧野国義* 溝口 勲* 佐藤泰仁*
大沢誠喜* 福田雅夫* 野牛 弘*

Experimental Studies on Eye Irritation due to Photochemical Smog (2)

KUNIYOSHI MAKINO*, ISAO MIZOGUCHI*, YASUHITO SATO*,
MASANOBU OSAWA*, MASAO FUKUDA* AND HIROSHI YAGYU*

Stimulative effects of photochemical smog on human health is studied by observing the threshold of eye iritation and measuring simultaneous galvanic skin response (GSR).

The smog was generated in a smog chamber, composed of aluminium frame and Teflon panel, by ultra-violet irradiation of autoexhaust and concentrations of pollutants (ozone, oxidants, nitric oxides, aerosol, total hydrocarbon and so on) and weather factors (temperature and humidity) were monitored during the experiment.

As the results from the experiment, ozone, oxidized with photochemical reaction, shows the most significant correlation to the development of eye irritation and elevation of temperature tends to decrease the irritation threshold. The correlation is present only among males and is not observed with females group.

緒　言

さきに，我々はいかなる物質により眼刺激作用がひき起こされるかについて，いくつかの汚染物質を用いて検討した[1]．ここで，用いた汚染物質とは，オゾン，アクロレイン，フォルムアルデヒド，硝酸エチルの紫外線照射により生成したPANおよび二種モードの自動車排気ガスである．その結果，アクロレイン，フォルムアルデヒド，PANについて，眼刺激と顕著な相関性を示した．しかし，オゾンと自動車排気ガスのうちアイドリングモードのものについては全く相関を示さなかった．そして定速モードの排気ガスについては眼刺激に関与すると思われる因子を総合することにより有意な相関が得られた[2]．

しかし，各物質におけるデータ量は充分なものでなく，とりわけ定速モードの排気ガスについてはこれを一次結合させて統計処理に付したので標本数の少ないことは欠点として留意すべきであり，さらにこれを検討する必要があった．

2　目　的

光化学スモッグの主汚染源は自動車排気ガスを主とすると考えられ，これを紫外線照射したときに生成する光化学スモッグの各汚染質及び温熱条件と眼刺激との関連について，実験的に明らかにし，併せて眼刺激に関して男女に差があるか否かを検討した．

3　実験方法

(1)　装　置

オキシダント発生装置は堀場製作所製で，内容積2.66m³の照射室スモッグキャンバー（アルミニウムフレームからなり，両サイドにテフロン膜があり，これを通して60本の紫外線灯により照射することが出来る。）及び外気浄化装置，冷却装置，紫外線灯調光装置（照射装置安定器）から成り立っている（オキシダント発生装置の詳細な説明は前報に表示した）．

スモッグチャンバー内空気は8種類の分析器（Oxidant, O_3, SO_2, NOx, CO, HC. Aerosol 温・湿度）によりモニターされる．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160　東京都新宿区百人町 3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

更に，本実験に於て GSR (Galuvanic Skin Response，皮膚電気反射）を使用した．ＧＳＲは皮膚抵抗反射型で，電極として銀板及びガーゼに食塩水を含ませたものを重ねて使用した．

(2) 実験方法

スモッグチャンバー内に汚染ガス（40km/h 定速モードの自動車排気ガス）を入れ，紫外線照射し，一定時間経過後被験者に曝露した．曝露時間は前回と同じく２分間とし，眼刺激を２種類（異和感，眼の痛み）に分け，各々について到達時間を測定し，同時に各分析器により汚染質濃度及び温熱条件を測定した．そして結果を統計処理に付す為，眼刺激の状況を Table 1. の様に配点した．配点の根拠は経験的であり，これが最良であるとは断言出来ない．しかし，通常眼刺激に到る時間が早い程その度合いが強いものと考えられ，更に，異和感と眼の痛みとでは当然後者の方が眼刺激の度度合いが強いと考えられる．ただし，被験者によれば異和感と眼の痛みとのいずれであるか判断が困難の場合が多いとの発言より両刺激の配点に明確な差を設定することを止め，到達時間を30秒毎に刻み，順次加点し表１の如くした．

Table 1. Mark of eye irritation

Step / Time(sec)	Light eye irritation	Eye ache
1 ～ 30	4	8
31 ～ 60	3	7
61 ～ 90	2	6
91 ～ 120	1	5

(3) 被験者

被験者として，視機能正常な男子大学生(20～22歳) 12人と女子大学生（20～21歳）10人が参加とした．なお，眼鏡をかけている者は男子４人，女子４人で，うち男子１人，女子３人が適宜使用している．又男子３人のみが喫煙している（１日10～20本)．

なお，女子について曝露実験は初めてなので，実験は男子と別にした．

(4) ＧＳＲ

眼刺激実験は飽く迄被験者の主観に依拠するものであるから，その結果が客観性に乏しいことは不可避である．後述する統計的手法は，客観性に乏しい事実が多量存在する場合に客観性を高める為に採られる一般的手法であるが，他に客観要素を含む事実が認識出来る場合にはこれを援用するのは意味があるものと考えられる．ＧＳＲは客観要素を含む事実を具体的に認識出来る方法の一つとして，本実験に於てＧＳＲの分析を試みた．

ＧＳＲは感覚刺激により皮膚の電気抵抗が減少することをその測定原理としている．感覚刺激により精神発汗が生じ，これにより電気抵抗が減少する．ＧＳＲの測定には通電法によるものと電位法によるものとがあるが[3]，我々は通電法により測定した．測定には薬指と小指のつけ根に電極（銀板に食塩水を含ませたガーゼを重ねたもの）をつけて，これをテープで固定した．そしてこれに通電し，1mm/sec の速度でチャート紙に記録させ，電気抵抗の変化を測定した．

⑤ 解析方法

本実験の結果を単純集計及び相関係数等統計的手法により解析した．上記眼刺激の配点により，眼刺激の状態が数量化されるので，被験者全員が一回り曝露した時これを一群とし，眼刺激発現の割合と配点による眼刺激の程度の二種類について各汚染質と対比し解析した．

ＧＳＲの解析方法として，電気抵抗の急激な変化で生ずるチャート上の山の頻度数を測定し，それに加えて２分間のＧＳＲの変化を Tabel 2. の如くパターン化した．

他にＧＳＲの抵抗値を測定する方法があるが，抵抗値はテープで電極を固定する際の圧着の程度により変化し，本実験に於てはこれを一定にすることが困難であったので除外した．

(6) 濃度範囲

実験総数は男子264回，女子243回である．使用した自動車排気ガスの各汚染質濃度及び温熱条件の範囲を表３に示す．

Table 3. 中，Ox，HC について女子の方が低濃度

Table 2. GSR Pattern

Sign	A	B	C	D	E
Pattern	Right down	Level	Right up	Down and up	Up and down

Table 3. Concentration ranges of factors on eye irritation

Sex	Range	Ox.(ppm)	O_3(ppm)	NO(ppm)	NO_2(ppm)	HC(ppm)
Males	Max.	0.39	0.42	0.86	2.47	65
	Min.	0	0	0	0	5
Females	Max.	0.15	—	—	—	41.5
	Min.	0	—	—	—	4
Sex	Range	CO(ppm)	Aerosol	Temp.(°C)	Hum.(%)	
Males	Max.	above 50	14,130	35.0	51	
	Min.	2	970	21.5	28	
Females	Max.	above 50	45,500	33.5	98	
	Min.	2	2,630	22.1	32	

であるのは被験者が女性であることを考慮し，排気ガス量を少なくした為で，よって機械の故障等により測定出来なかった O_3, NO 及び NO_2 についても女子の方が低濃度であると思われる．又浮遊粒子，温度が女子の方に高いのは一部加湿した効果による．

4 結果および考察

(1) 眼刺激と各汚染質等との相関

眼刺激と各汚染質濃度及び温熱条件との相関についてに Table 4. に示す．

Table 4. より，眼刺激にはオキシダント又はオゾン及び温度が寄与することが判る．しかし我々はオゾン単一では，少なくとも 0.5ppm 以下の濃度では眼刺激に寄与することが少ないことを知っている[1]．したがって，オゾンが眼刺激に寄与するのでなく，オゾンが全て光化学反応の進行により眼刺激物質が生じるものと考えられる．又 NO, NO_2 については，これらは一次汚染質であり，眼刺激をひきおこす物質の生成に一定の役割を果たしても，直接眼刺激に寄与することは少ないと思われる．なお，男子の方がいくつか因子について有意な相関を示すのに比し，女子の方は有意な相関を示していない．このことは実験条件の相違，測定の出来なかった物質のあることを考慮しても，後述する様に，女子の眼刺激についての反応の仕方が男子とかなり異なる．即ち，性差の現われであると思われる．更に，眼刺激発生率と眼刺激得点率とを比較すると，大体後者の方が相関が低い．

本実験では眼の痛みの段階に至った者は非常に少なく，よって配点に問題はないと思われ，寧ろ被験者にとって異和感の判断が困難であることの結果である様に思われる．このことは実験後の被験者の感想からも窺われた．しかし，この様に，発生率に眼刺激到達時間を加味した得点率が単相関に於ては低下傾向を示したが，重相関に於ては逆により高い相関を示している．Teble 4. は眼刺激とこれに関与する各因子との単相関について示しているが，眼刺激が単一の因子のみで

Teble 4. Correlation between eye irritation and its factor

(1) Occurrence rate on eye irritation

Sex	Males		Females	
Factor	Cor.coef.	Judgement	Cor.coef.	Jadgement
Ox.	0.443	B	0.226	
O_3	0.515	C	—	—
NO	−0.171		—	—
NO_2	−0.033		—	—
HC	−0.018		0.177	
Aerosol	−0.069		−0.339	
Temp.	0.420	C	0.304	
Hum.	0.122		−0.070	

(2) Mark rate on eye irritation

Sex	Males		Females	
Factor	Cor.coef.	Judgement	Cor.coef.	Judgement
Ox.	0.461	C	0.272	
O_3	0.487	B	—	—
NO	−0.181		—	—
NO_2	−0.153		—	—
HC	−0.262		0.105	
Aerosol	0.111		0.044	
Temp.	0.362	D	0.229	
Hum.	−0.058		−0.122	

cor. coef. : Correlation coefficient
A : 1%, B : 2%, C : 5%, D : 10% more than significant level of correlation coefficient

Table 5. Multiple correlation among eye irritation and its factors

(1) Occurrence rate on eye irritation

Sex	Males		Females	
Factors	Mul.cor. coef.	Judgement	Mul.cor. coef.	Judgement
Ox. NOx>	0.483	D	—	—
Ox. HC >	0.483	D	0.274	
Ox. Temp.>	0.319		0.305	
O_3 NOx>	0.547	C	—	—
O_3 HC>	0.530	C	—	—
O_3 Temp.>	0.531	C	—	—
NOx HC >	0.083		—	—
NOx Temp.>	0.423		—	—
HC Temp.>	0.386		0.335	

(2) Mark rate on eye irritation

Sex	Males		Female	
Factors	Mul.cor. coef.	Judhement	Mul.cor. coef.	Judgement
Ox. NOx.>	0.465	D	—	—
Ox. HC >	0.547	C	0.284	
Temp. Ox >	0.499	D	0.279	
O_3 NOx>	0.599	B	—	—
O_3 HC>	0.542	C	—	—
O_3 Temp.>	0.502	C	—	—
NOx HC >	0.217		—	—
NOx Temp.>	0.470	D	—	—
HC Temp.>	0.464	D	0.240	

Mul. cor. coef : Multiple correlation coefficient
A : 1%, B : 2.5%, C : 5%, D : 10% more than significant level of multiple correlation coeffi cient

Table 6. Correlation betweeu factors on eye irritation

(1) In experiments of males group

Factor / Factor	Ox.	O_3	NO	NO_2	HC	Aerosol	Temp.	Hum.
Ox.		A 0.920	B−0.548	D−0.427	−0.157	−0.106	A 0.576	0.285
O_3			C−0.489	−0.344	0.086	−0.130	C 0.446	0.234
NO				A 0.882	−0.095	−0.197	0.315	−0.317
NO_2					0.091	−0.067	0.115	−0.324
HC						−0.108	0.208	D 0.393
Aerosol							0.117	D−0.389
Temp.								−0.191
Hum.								

(2) In experiments of females group

Factor / Factor	Ox.	HC	Aerosol	Temp.	Hum.
Ox.		0.070	−0.235	A 0.618	0.005
HC			−0.058	0.111	−0.003
Aerosol				0.000	A 0.532
Temp.					0.296
Hum.					

A : 1%, B : 2%, C : 5%, D : 10% more thou significant level of correlation coefficient

ひきおこされると考えるよりは，複数の因子によるものと考える方が光化学スモッグ時では妥当であろう．

Table 5. は眼刺激に関与する主要な因子の重相関について示している．NOx ($NO+NO_2$) は単相関では有意な相関を示さないが，重相関で NOx と Ox. について高い相関を示している．HC も又 Ox. 又は O_3 について有意な相関を示している．但し，女子については単相関同様有意な相関を示さない．

Table 6. に眼刺激をひきおこす因子間の相関関係を示す．

以上から眼刺激とこれをひきおこす因子との相関図を Fig 1. に示す．

図より明らかな様に，眼刺激に対してオキシダント（オゾンで示される光化学反応の進行）がかなり寄与することが判る．しかし，オキシダントのほか温度や炭化水素も又眼刺激に寄与している．オキシダントが炭化水素や窒素酸化物の存在下で生成することから，オキシダントと温度を結合させることにより，眼刺激作用について総合指標を設定することも充分可能であると思われる．

(3) 総合指標の試み

眼刺激作用の総合指標というのはその値によりどの程度眼刺激がひきおこされるかを示す状態量であり，総合指標は眼刺激に関与する因子の結合により定められる．結合の方法としては，各因子の単位が異なるので，特定値との比を各についてとり，これを結合させる方法と各因子の値自体を順位化していくつかのブロックに分け，これを結合する方法がある．

Tabel 7. に総合指標としての結合された因子と眼

Table 7. Correlation between eye irritation and combination of its factors

(1) Occurrence rate on eye irritation

Sex	Males		Females	
Combination of factors	Cor. coef.	Judgement	Cor. coef.	Judgement
① O_3(Ox.)+Temp.	0.491	B	0.276	
② O_3(Ox.)×Temp.	0.485	B	0.234	
③ HC/NOx	0.083		—	—
④ ①+③	0.473	C	—	—
⑤ ①+Aerosol	0.392	D	—	—
⑥ ②+⑤	0.397	D	—	—
⑦ Temp+Aerosol	0.110		−0.025	
⑧ F(O,T)	0.533	A	0.317	

(2) Mark rate on eye irritation

Sex	Males		Femnles	
Combination of factors	Cor. coef.	Judgement	Cor. coef.	Judgement
① O_3(Ox.)+Temp.	0.490	B	0.274	
② O_3(Ox.)×Temp.	0.478	B	0.260	
③ HC/NOx	0.014		—	—
④ ①+③	0.493	C	—	—
⑤ ①+Aerosol	0.448	C	—	—
⑥ ③+⑤	0.428	C	—	—
⑦ Temp.+Aerosol	0.184		−0.102	
⑧ F(O,T)	0.505	B	0.283	

$$F(O,T);\frac{O_3(Ox.)}{0.06}+\frac{|T-22|}{6}$$

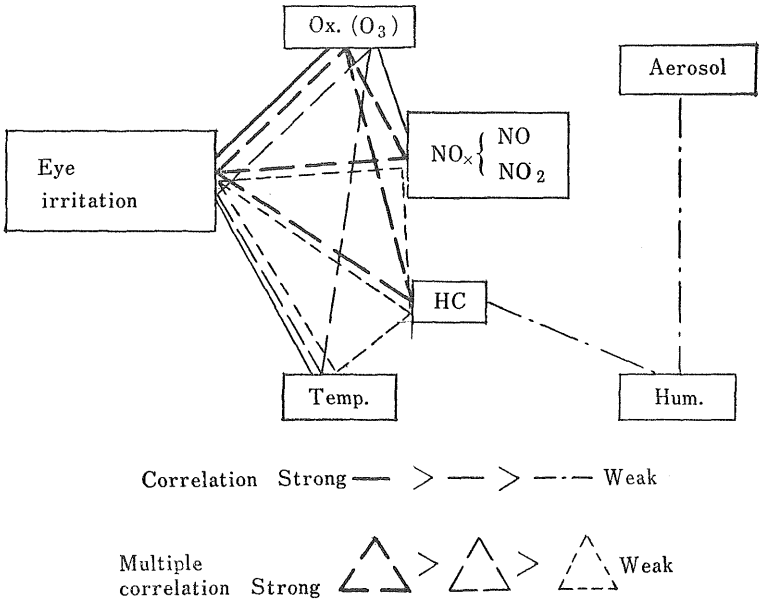


Fig 1. Diagram of correlations and multiple correlations

刺激との相関を示す．①～⑦は後者の方法により，⑧は前者の方法による．オゾンとオキシダントについて，男子の場合，相関の高さよりオゾンを代表させたが，女子の場合にはオゾンの測定がなされていないので，オキシダントに換えている．具体的には，①～⑦については実験中の最大値を10等分して1～10の数を付し，⑧については，オキシダントの環境基準値である0.06ppmでオゾン値を除し，これと，チャンバー内温度と室内温度との差をとり，感覚的に温寒をはっきり見分けられると思われる温度差±3°＝6°で除したものを和した．

なお，オゾンはオキシダントの大部分を占め，当然その傾向も類似する（表6参照）が，測定法が異なる（オゾンはケミルミ法，オキシダントは中性KI法）ので，これを分けて検討した．Table 7. より⑧が最も相関が高いことが判る．22° は感覚的にも適した温度であるから，フィールドに於ても⑧は総合指標として有効であると推定される．Fig 2. に眼刺激と（$O_3/0.06+|T-22|/6$）との分布及び回帰方程式を示す．③は，HC, NOx 比が眼刺激に関係するとの Korth らの報告[4,5]により検討した．Table 7. によると，眼刺激との関係はみられないが，Tabel 7. は単相関のみを示すものであり，Fig 3. により，HC, NOx 比が眼刺激と一定の関係を有することが判る．

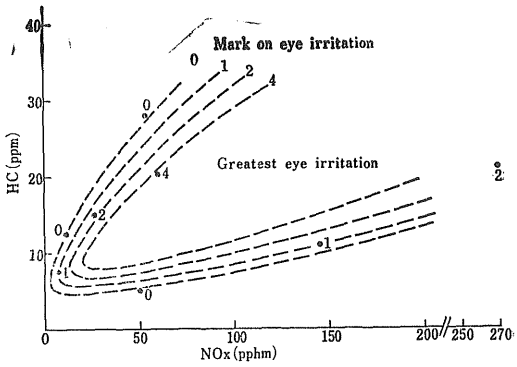
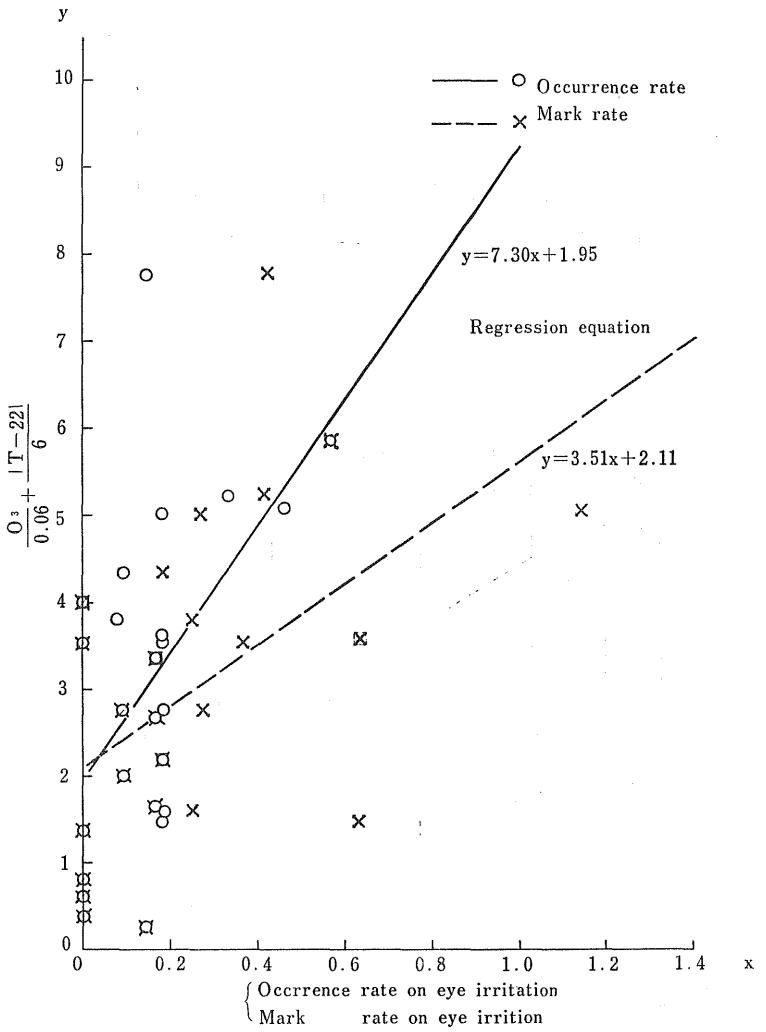


Fig 3. Contour line on eye irritation

② 個人差及び性差

眼刺激は各人の主観により判断されるものであるから，個人差が生じるのは当然といえる．しかし，性別によっては，眼刺激の反応性が異なる可能性がある．Fig 4. に眼刺激をうけた時の被験者の個人差を示す．ここで，男子の被験者J．Kは一度も眼刺激をうけていないことを示している．なお，この図から性差を述べることは，実験条件が異なることから出来ない．コントロール条件下（排気ガス無）で，男子で眼刺激を感じた者は延被験者数18人のうち1人も居なかったのに対し，女子は延被験者数50人のうち24人が眼刺激を感じている（勿論コントロールであることを当人に



Dig 2. Distribution of $\left(\frac{O_3}{0.06}+\frac{|T-22|}{6}\right)$ on eye irritation in males group

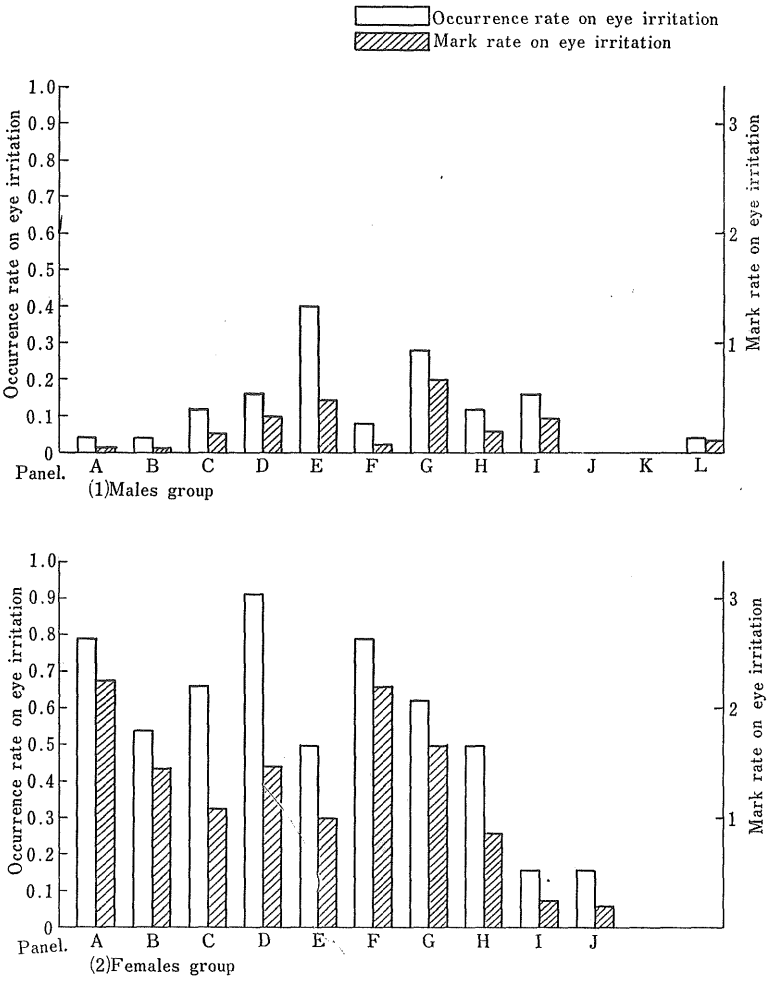


Fig 4. Individual difference among panels when eye irritated

は知らせていない).

これより女子の眼刺激の感じ方が心理性の強いものであることが判る. 又実験中コントロール回数の割合は女子の方が多いにもかかわらず, そして表より使用汚染質の最大値は女子の方が低いにもかかわらず, Fig 4. より50%以上眼刺激を感じた被験者の割合は, 男子は12人中1人もいないのに対し, 女子は10人中7人であり, 実験条件が異なることを考慮しても性差が明確にある様に思われる. 後述する様にGSR測定に於ても性差のあることは充分推測出来る.

更に, 眼鏡の有無, 喫煙の有無については, 眼刺激発生率で Table 8, 9. に示す様に顕著な差はみられない.

(4) GSR

前に, GSR分析に於て二種類の方法を採用することを述べた. よって, 各々について分けて述べる.

Table 8. Mean and standard deviation of occurrence rate on eye irritation by sex and wearing glasses

Sex	Males		Females	
	Mean	σ	Mean	σ
Glasses	0.09	0.05	0.45	0.17
Nonglasses	0.14	0.13	0.64	0.24

σ : standard deviation

(I) GSR頻度数の分析

Table 10, Fig 5, 6 図に曝露時間(2分間)内の被験者別のGSR頻度数平均値を, コントロール, コントロール以外で眼刺激のないとき, 眼刺激をうけた

Tabel 9. Mean and standard deviation of Occurrence ratc on eye irritation by Smoking history in males group

	Mean	σ
Smokers	0.15	0.11
Nonsmokers	0.13	0.11

Table 11. Mean and standard deviation of GSR frequency

Sex		n	Mean	σ
Males	Control	16	9.6	9.2
	No-eye irritation	182	10.8	7.5
	eye irritatlon	27	16.9	5.0
Females	Control	50	5.4	4.0
	No-eye irritation	56	4.4	2.9
	eye irritation	128	6.4	4.5

Table 10. Mean of individuals of GSR frequency for exposed time (2 min)

Sex	Panel	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Males	Control	1.0	5.0	6.5	8.0	32.5	3.0	18.0	13.0	8.0	—	1.0	0.5
	No-eye irritation	5.3	3.4	7.5	9.3	27.4	5.2	15.1	19.9	11.3	7.8	3.9	3.4
	Eye irritation	15.0	9.0	19.5	19.3	27.0	7.3	17.3	24.3	12.3	—	—	18.0
Females	Control	10.4	13.6	5.6	5.6	1.6	8.8	1.6	2.6	2.2	1.8		
	No-eye irritation	7.7	11.2	3.7	1.7	1.8	6.0	2.4	3.3	3.1	3.0		
	Eye irritation	11.3	15.9	7.0	5.7	2.6	10.4	2.8	3.9	2.0	2.5		

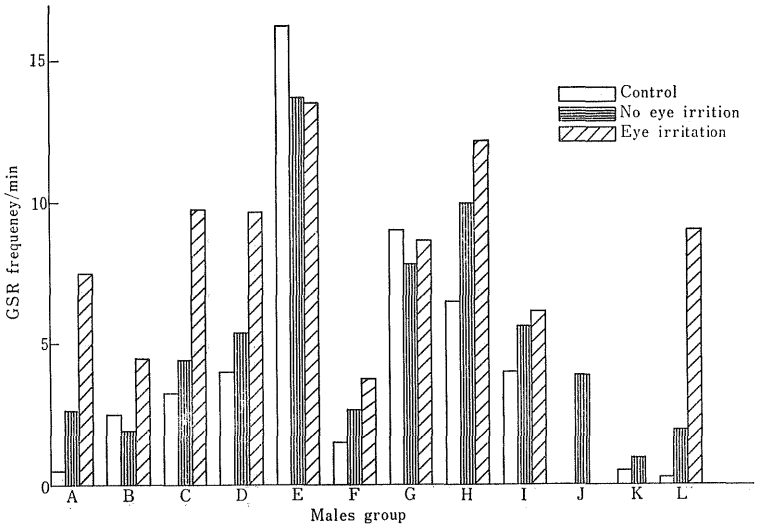


Fig 5. Mean of individuals of GSR frequency in males group

ときに分けて示す．そして Tabel 11. に，これらの実験回数，平均値，標準偏差を示す．

Tabel 10. より，被験者の個人差が大きいことそして Fig 5, 6. より，眼刺激をうけた時程ＧＳＲ頻度数が多くなる傾向のあることが判る．更に，男女を比較すると，一般に男子の方が頻度数が多い．Tabl 11. から，ｔ検定により，実験時の状態別にＧＳＲの差の検定を行なうことが出来る．その結果をTable 12. に示す．

ここで値は，

$$t=(\bar{x}-\bar{y})/\sqrt{(\sigma_x^2/n_x)+(\sigma_y^2/n_y)}$$

により求められる．そして x, y は各々の状態の平均値，σ_x, σ_y はその時の各々の標準偏差，n_x, n_y はサンプル数を示す．Table 12. より，男子に於て眼刺

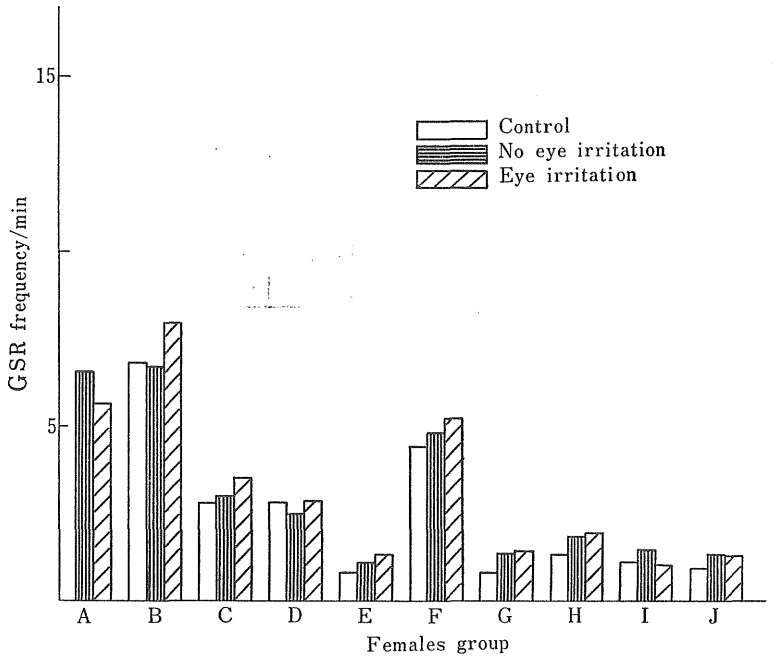


Fig 6. Mean of individuals of GSR frequency in females group

Tabel 12. significance test among means of GSR frequency in following states with t test

Sex	Males		Females	
States	t value	Significance	t value	Significance
Control / No-eye irritation	$0.41 < t_{0.05}=1.06$	No	$0.32 < t_{0.05}=1.96$	No
No-eye irritation / Eye irritation	$5.87 > t_{0.05}=1.64$	Yes	$0.78 < t_{0.25}=0.67$	No
Control / Eye irritation	$2.97 > t_{0.05}=1.68$	Yes	$0.38 < t_{0.05}=1.64$	No

$t_{0.05}$: t value at critical region, 5%

激をうけたときには他の状態とＧＳＲの頻度数が変化することが判る．然し，女子に於ては定かでない．

次に，ＧＳＲ頻度数が眼刺激及びこれに関与する因子と関係があるかについて検討した．但し，ＧＳＲ頻度数は個人差が大きく（Table 10, Fig 5, 6.参照），実験中多少被験者の不在があったので，一群の平均ＧＲＳ頻度数を使用するのは危険であり，よって，$X=(1/n_j)\sum_j(x_{ij}/\bar{x}_i)$の値を使用した．ここで，$n_j$ は j 番目（j 群目）の実験時の被験者数，x_{ij} は j 番目の被験者 i のＧＳＲ頻度数で，x_i は被験者 i の全実験における平均ＧＳＲ頻度数である．このＸと眼刺激及びこれに関与する因子との相関を Table 13. に示す．

ＧＳＲ頻度数が温熱条件と特に関係が深いことが判る．男子の場合には眼刺激と一定の相関を有するのに対し，女子に於ては全く相関が見られない．このことからも，女子の場合には心理的影響がかなり強いことを推定させている．温度に関し，男女が正負逆に相関を示している．矛盾する様に思えるが，Table 6. に示す様に，女子に於ては加温の効果が影響し，男子に於ては照射による乾燥が効いていると思われる．

眼刺激とこれに関与する重要因子 O_3（女子にあってはOx.）とＧＳＲ頻度数との重相関を Table 14. に示す．

Table 14. を Table 5. と比較すると，ＧＳＲ頻度

Table 13. Correlation between X $\left(=(1/n_j)\sum_i(x_{ij}/\bar{x}_i)\right)$ and eye irritation of its facter

Sex	Males		Females	
Eye irritation its factor	Cor. coef.	Judgement	Cor. coef.	Judgement
Occurrence rate on eye irritation	0.346	D	0.036	
Mark rate on eye irritation	0.448	C	−0.020	
Ox.	0.197		0.031	
O_3	0.123		—	
NO	0.256		—	
NO_2	0.247		—	
HC	−0.196		−0.048	
Aerosol	0.484	C	0.170	
Temp.	0.447	C	0.500	C
Hum.	−0.382	D	0.451	B

cf. Table 4.

Table 14 Multiple correlataon among X, eye irritation and its factor

Sex	Males		Females	
Eye irritation and its faotor	Mul. cor. coef.	Judgement	Mul. cor. coef.	Judgement
Occ.rate on eye irr. > O_3(Ox.)	0.588	A	0.231	
Mark rate on eye irr. > O_3(Ox.)	0.594	A	0.303	
Occ.rate on eyr irr. > Temp.	0.428	D	0.352	D
Mark rate on eye irr. > Temp.	0.448	D	0.339	D

cf. Table 5.

Table 15. The number of GSR pattern in following states

Sex	Males						Females					
Pattem / State	A	B	C	D	E	Total	A	B	C	D	E	Total
Control	8	2	2	1	4	17	34	2	6	4	3	49
No eye irritation	99	22	45	17	28	211	57	3	9	6	2	77
Eye irritation	1	2	5	16	15	39	62	14	23	14	9	122

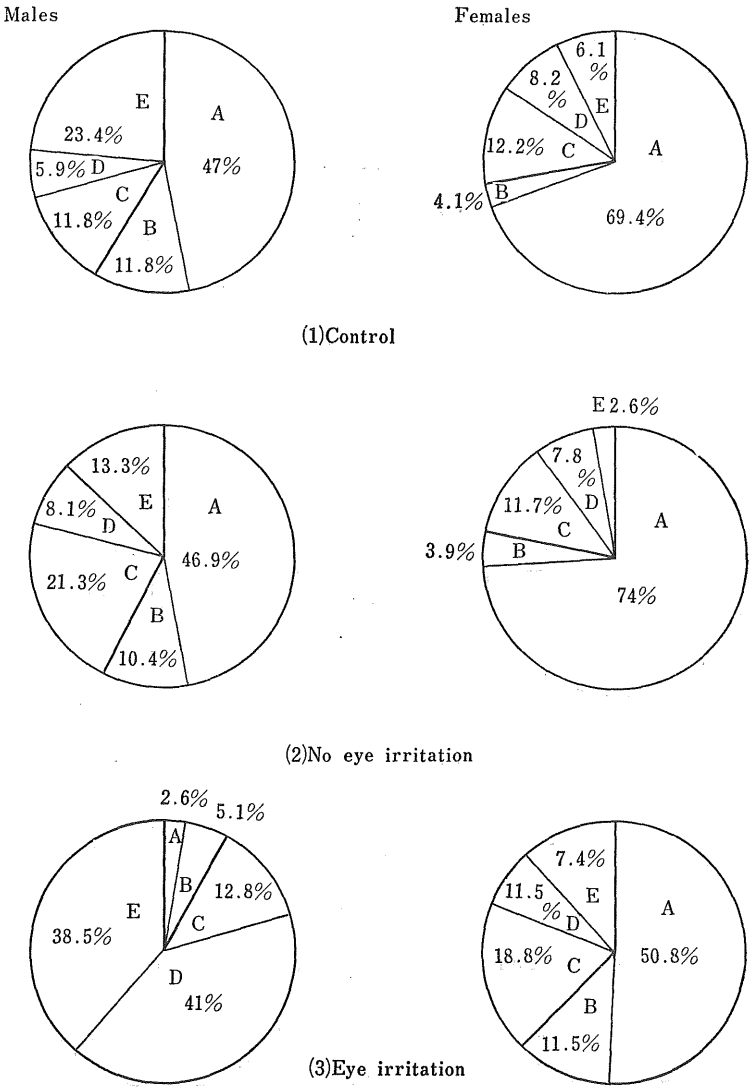


Fig 7. Percentage of GSR patterns in control, no eye irritation and eye irritation state

数に関する相関の方が高く，これが眼刺激作用に関する研究に有効な手段となりうることを示している．

（Ⅱ） ＧＳＲパターン分類による分析

Table 2. で示した様にＧＳＲパターンを分類し，各状態別に回数を Table 15. に示し，Fig 7. にその百分率を示した．

Table 15. より各々の状態，即ち，コントロール，眼刺激のないとき及び眼刺激をうけたときの間に有意な差があるか否かを x^2 検定により検討した．これを Table 16. に示す．

ここで χ^2 値は，例えばコントロールと眼刺激をうけたときに於て，前者のパターンの回数を，c_i (i=A,B,C,D,E)，後者のパターンの回数を，e_i （i は同上）とすると，

今，$(c_i+e_i)/\sum_i(c_i+e_i)=a_i$ とおくと，

$$\chi^2=\sum_i\left[\{c_i-a_i(\sum_i c_i)\}^2/a_i(\sum_i c_i)+\{e_i-a_i(\sum_i e_i)\}^2/a_i(\sum_i e_i)\right]$$

で求められる（詳細は基本書参照）．

Table 16. 表より眼刺激をうけたときと眼刺激のないとき及びコントロールとが有意の差があることそしてコントロールと眼刺激のないときとが有意な差を示さないのは首肯出来る結果と思われる．

更に，ＧＳＲパターンは精神的発汗作用に基づくものであるから，これを落ち着きのパターン（A，C→Ⅰ）と緊張のそれ（B，D，E→Ⅱ）とに分け，ⅠとⅡに有意な差があるかを検討した．Table 17. により，両者に有意な差がみられ，眼刺激をうけたとき，ＧＳＲパターンに変化がおこることがわかった．そして，ＧＳＲパターンの変化については性差がみられない．Fig 6. の様に，男女共眼刺激をうけたときのパターンが減少する．このことはⅠを落ち着き，Ⅱを緊張のパターンとした仮定が正しいことを実証している．

以上の様に，ＧＳＲ分析は，これが精神感応性である為の制約は不可避であるとしても，眼刺激作用の研究に有効な手段であると思われる．

5 結　論

以上から，光化学スモッグによる眼刺激がどの様な因子によりひきおこされるかについて，次の様に述べることが出来る．

先ず第一に，眼刺激はオキシダント又はオゾンの生成と深い関係があり，温度も又この生成に補助的役割をなすと共に体感からも眼刺激の発現に寄与するものであると思われる．そしてオゾンは単独として眼刺激に寄与するよりも化学反応性を示すものと考えられ，Yeungらの報告[6]にある相対化学反応性と同様，眼刺激に寄与するものと思われる．なお，照射時間と眼刺激との関連について，第13回大気汚染研究全国協議会

Table 16. Significance test among GSR patterns in following states with χ^2 test

Sex	Males		Females	
States	χ^2 value	Significance	χ^2 value	Significance
Cortrol / Eye irr.	$20.92 > \chi^2_{0.05}=0.49$	Yes	$5.53 > \chi^2_{0.03}=4.88$	—
Control / No eye irr	$1.56 < \chi^2_{0.90}=1.61$	No	$1.04 < \chi^2_{0.95}=1.15$	No
No eye irr / Eye irr.	$57.59 < \chi^2_{0.05}=9.49$	Yes	$11.52 > \chi^2_{0.05}=9.49$	Yes

$\chi^2_{0.05}$: x^2 value at critical region, 5%,

Table 17. Significance test between GSR Patterns of I and Ⅱ

Sex	Males		Females	
	χ^2 value	Significance	χ^2 value	Significance
A＋C＝Ⅰ / B＋D＋E＝Ⅱ	$17.36 > \chi^2_{0.05}=4.48$	Yes	$4.85 > \chi^2_{0.05}=4.48$	Yes

GSR pattern of Ⅰ (=A+B) indicates composure, and one of Ⅱ = (B+D+E) does tension

Table 18. Correlation between eye irritation (eye ach, tear) and combination index (Ox./0.06+|T−22|/6) with symptoms data and for refference, correlation between eye irritation and Ox. or Temp. with the index

Com. index	Ox./0.06+|T−22|/6			Ox.		Temp.	
eye. irr.	①Eye ache	②Tear	①+②	①Eye ache	②Tear	①Eye achc	②Tear
Cor. coef.	0.646	0.407	0.623	0.595	0.396	0.366	0.173
Judgement	A	C	A	A	C	C	

Com. index : Combination index

大会で報告* した様な NOx との２次関数的関係は明確でなく，又，Hamming らの報告にある眼刺激と時間変化との関係[7] もそれ程顕著ではなかった．

第二に，眼刺激作用に，オゾン（オキシダント）濃度及び温度が重要な因子であるので，これらを組み合わせた，光化学スモッグによりひきおこされる眼刺激のための総合指標が定められるか試みた．その結果，Table 7.⑧に示す様により高い相関が得られた．

第三に，実験結果を被験者の面から眺めると，予想されたことであるが個人差が大きい．そして，実験条件が同一でないため，万全の確信があるとはいえないけれども，性差は顕著にあると思われる．特にFig 4. で示される様に，女子の方が圧倒的に眼刺激をうけた割合が高く，コントロール条件下で，男子０％に対し，女子48％が眼刺激をうけたと報告しているのは，女子の眼刺激に於ては心理的影響がかなり強いことを示唆するものと思われる．このことは，他が必ずしもそうではなかったのに，Tabel 17. のＧＳＲパターン変化が男女同様の傾向を示し，理論に合致した結果であることから，女子の眼刺激における心理的影響の強さを裏付けていると考えられる．

第四に，ＧＳＲは元来情動の指標として生理学を中心とした分野で使用された．光化学スモッグによる眼刺激は決して情動のみによるものではないけれども，情動の要素が一定程度にあるのは確かである．Tabel 10～17に二種の方法によるＧＳＲ分析の結果を示したが，これよりＧＳＲが光化学スモッグに関する眼刺激作用の研究に有用であると思われる．

第五に，本実験はチャンバーを使用した実験であり，フィールドにおける曝露とは異なる．その相違点は，チャンバー実験ではフィールドと異なり，①発生源が連続でない．②曝露されるのは曝露実験であることを認識した被験者であること．③曝露は身体全体でなく眼の周辺のみである．したがって，本実験の結果をフィールドにそのまま適用することは出来ない．しかし，眼刺激が生じる原因は本質的には同一であるから，定量的にこれを把握することは困難であるとしても，定性的には充分可能である．また，定量的な面でも総合指標として試みた O_3 (Ox.)/0.06 +|T−22|/6 は，オキシダント環境基準値が0.06ppmであること，体感最適温度は季節により異なるとしても，夏季における至適温度が22° 付近であることそして至適温度から暑さ，寒さを感じる温度差が約6° である[8] ことから，フィールドに於ても意味があるものと思われる．Tabel 18.に，昭和47年月の目黒区内の児童生徒を対象にした自覚症調査[9] にこれを応用して相関を求めた結果を示す．

これより，眼刺激実験における総合指標がフィールドに於ても有用であることが判る．

本実験に於て以上の如く知見を得た．しかし，今後に残された問題も決して少なくない．本実験に於ても，眼刺激原因物質の解明をガスクロマトグラフィー（ＥＣＤ使用）により若干試みたが，ＰＡＮ等検出出来ず，報告すべき結果は得られなかった．また，本実験でエアロゾルは，Table 4, 7. の様に眼刺激と相関を有せず，Fig 3. の様な特殊な関係を有するとも思われなかったが，チャンバー内エアロゾルは水蒸気が主で必ずしもフィールドと一致しないので，これもまた今後に残されている．

附　記

（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「オキシダントの人体および生物影響調査研究」として実施したものである，）

参考文献

1) 溝口勲，牧野国義，佐藤泰仁，大沢誠喜，千種翠，野牛弘：都衛研年報，23, 309—313 (1971)
2) 溝口勲，牧野国義，佐藤泰仁，大沢誠喜，千種翠，野牛弘：大気汚染研究第13回大会号，7, (2), 157 (1972)
3) Starch, D. : *Psycohl. Rev.*, 17, 19—36

(1970)
4) Korth, M.W., Rcse, A. H. and Stahman, R.C. : *J, Air Pollut. Cont., Assos.*, 14, 168—175 (1964)
5) Nicsic, S.W., Harkins, J. and Mueller, P. K. : *Air & Wat. Pollut. J.*, 10, 713—721 (1966)
6) Yeung, C.K.K. and Phillips, C. R. : *Atmos. Environ.*, 7, 551—559 (1973)
7) Hamming, W.J. and Macphee. R.D. *Atmos. Environ.*, 1, 577—584 (1967)
8) 材路顕，豊川行平，佐藤徳郎，重松逸造：衛生公衆衛生学，気候と温熱条件（三浦豊彦）23—31，医学書院 (1958)
9) 溝口勲，牧野国義，佐藤泰仁，大沢誠喜，千種翠，野牛弘：日本公衛誌，第32回総会講演集，20(10)，556 (1963)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 371 — 379, 1974

都内大気中の炭化水素および塩素系有機溶剤と他の汚染物質との相関

佐藤泰仁* 溝口 勲* 牧野国義* 野牛 弘*

On the Correlation between light and chlorinaued Hydrocarbons and other pollutants in Tokyo Atmosphere

YASUHITO SATO*, ISAO MIZOGUCHI*, KUNIYOSHI MAKINO* AND HIROSHI YAGYU*

This study attempted to obtain the tendency of individual hydrocarbons in Summer, 1973 and 1974. At four sampling points in Tokyo, about 100 samples using air sample concentrater were analyzed by FID gaschromatography, but we did not detect Acrolein and Methylnitrate in this survey.

The concentration ranges of noticeable pollutants were showed in Table. 2. Besides ,we investigated individual pollutants with correlation analysis of their concentrations. Chlorinated hydrocarbons had no correlation with other pollutants.

It was found that each pollutant was made arrangement and grouping by differences of sources.

はじめに

1970年の夏に光化学スモッグ事件が発生して以来，現在までに野外および実験室での調査研究が数多くなされ，光化学スモッグ状態が発生しやすい条件等が浮き彫りにされてきている．その中でも炭化水素類は大気中での光化学反応の原料物質として極めて重要な意味をもち，大気中に存在する炭化水素の種類および濃度は共存する窒素酸化物の濃度との関連において，光化学スモッグの形成および被害に著しい影響をもち，したがって光化学スモッグ対策として炭化水素の減少が急がれている．

光化学スモッグにおける被害は，その症状および発生場所よりから，何らかの汚染物質が介入しているのではないかということで，今までにアクロレインであるとか，硝酸メチル，シアン，ジェット機の排ガスであるというような，いろいろな説がとなえられたが結論がでないまま，現在でもその方向での調査研究がなされている．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

著者らは都内大気中の炭化水素類の全体的な組成の動態を把握し，あわせて大気汚染物質との関連性を検討する目的で昨年および本年の夏期に都内の4地点において調査を行なっているが，今回48年度に行なった結果について報告する．

測定場所および方法

1) 新宿区立原町小学校：都心部より西北西約4kmに位置し，鉛公害事件で問題となった柳町交差点より西に200mのところにある．

2) 中野区立新井小学校：都心部より西北西約12kmに位置し，交通量が中程度の道路に面している．ここには衛生局の大気汚染測定所がある．

3) 世田ヶ谷区立太子堂中学校：都心部より南西10kmに位置し，比較的交通量の多い玉川通りと環状七号線に囲まれている．

4) 東京都石神井保健所：都心部より約17km離れ田園地帯に位置し，交通量の少ない道路に面している．

以上の4地点が測定場所である．

炭化水素の測定方法には，炭化水素類全体の動きを連続的に測定する方法と，炭化水素類の個々の組成を把握する方法があるが，われわれは後者の方法によりその分析をガスクロマトグラフィーで行なった．

分析条件

Detecter : FID
Column : glass column 3 m
Stationary Phase : chromosorbW(AW)60～80 mesh.
Liquid Phase : 25%T.C.P.(Tricresyl phosphate)
Column Temp : 40°C→100°C, elevating temp 6°C/min.
Detecter Temp : 130°C
Carrier Current : N_2 40 m*l*/min.

なお，物質の同定には島津 LKB—9000 型のガスクロマト質量分析計を用いた．

試料の捕集

試料の捕集にあたっては極微量成分の捕捉であるため，低温に冷却された充てん物表面の吸着作用を利用した大気濃縮装置（Fig—1）を用いて行なった．

濃縮管には20～50 mesh の珪藻土耐火レンガ粒が充てんされおり，液体酸素による－183°C の冷却と珪藻土耐火レンガ表面の条件で，空気中酸素を捕捉せず，エチレン，沸点－103°C 以上の成分が捕捉される．また，試料導入口のところには，脱水，脱炭酸ガス管があり，無水炭酸カリウム，ソーダライムがつめてあり，空気中の H_2O および CO_2 が除去される．サンプリングにあたっては4ヵ所とも同じ操作で行なうように，一定の手順をきめておいた．吸引試料 50 *l* を標準として，毎分 4 *l* の流速で，液体酸素により冷却された濃縮管に吸引する．吸引後冷却をやめ，Heater により濃縮管を7分間加熱する．その後そのままの状態で cock を切り換え濃縮管より冷却された GC 試料管へ試料空気を移行させる．その移行時間を5分間とした．移行されたGC試料管を joint よりはずし，更にGC試料管を加熱しながらガスクロマトグラフィーにかけ定性，定量を行なった．

検量操作

前もって窒素で洗浄した 500 m*l* の真空瓶に，クロロホルム，*n*-ヘキサン，ベンゼン，トルエン，キシレンの標準液（精密分析用）をそれぞれの既知濃度分をマイクロシリンジで注入し，真空瓶をドライヤーで加熱し気化させた後，注射器により数 m*l* ずつとりガスクロマトグラフィーにかけ検量線を作成した．更に当所にある 2.66 m^3 のスモッグチャンバーを使用して，前述の大気濃縮装置により同様の方法による検量線作成も平行して行なった．この方法は真空瓶によるものより若干のバラツキを示したが，これは外気の状況および捕集効率などによるものと思われる．

結果および考察

A. 大気分析について

前述のように大気濃縮装置により捕集された試料をガスクロマトグラフィーにかけ分析を行なった結果，32個のピークが測定された．その測定例を Fig. 2 に示した．それらについて標準試料によるガスクロの Retention Time および GC—MASS 分析により各ピークの物質を同定し，Table. 1 にそれぞれのピーク番号と物質名を示した．

①のピークには，Methane. Ethane. Ethylene が混在しているのでC_1～C_3と表示した．②の C_3～C_4 には Propane, Prophylene, Butane, Butene, Butadiene が混在している．C_1～C_4 のピークの分離については，われわれの見方が全体的な組成の把握にあったため特に問題としなかった．⑤は Hexane の異性体としての 2 methyl-pentane であり，⑥は 3 methyl-pentane である．更に⑨および⑩は Heptane の異性体としての 2 methyl-Hexane であり，3 methyl-Hexane である．⑪のピークには Acrolein と *n*-Heptane, Aceton の3物質が混在しておりこれらの分離についても今回は行なわなかった．⑬は Octane の異性体

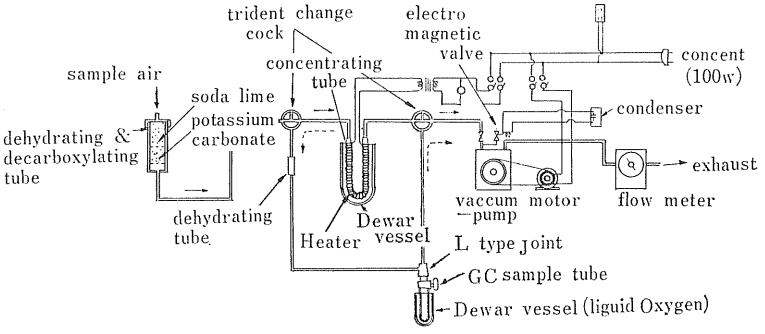


Fig. 1 System of Air sample concentrator.

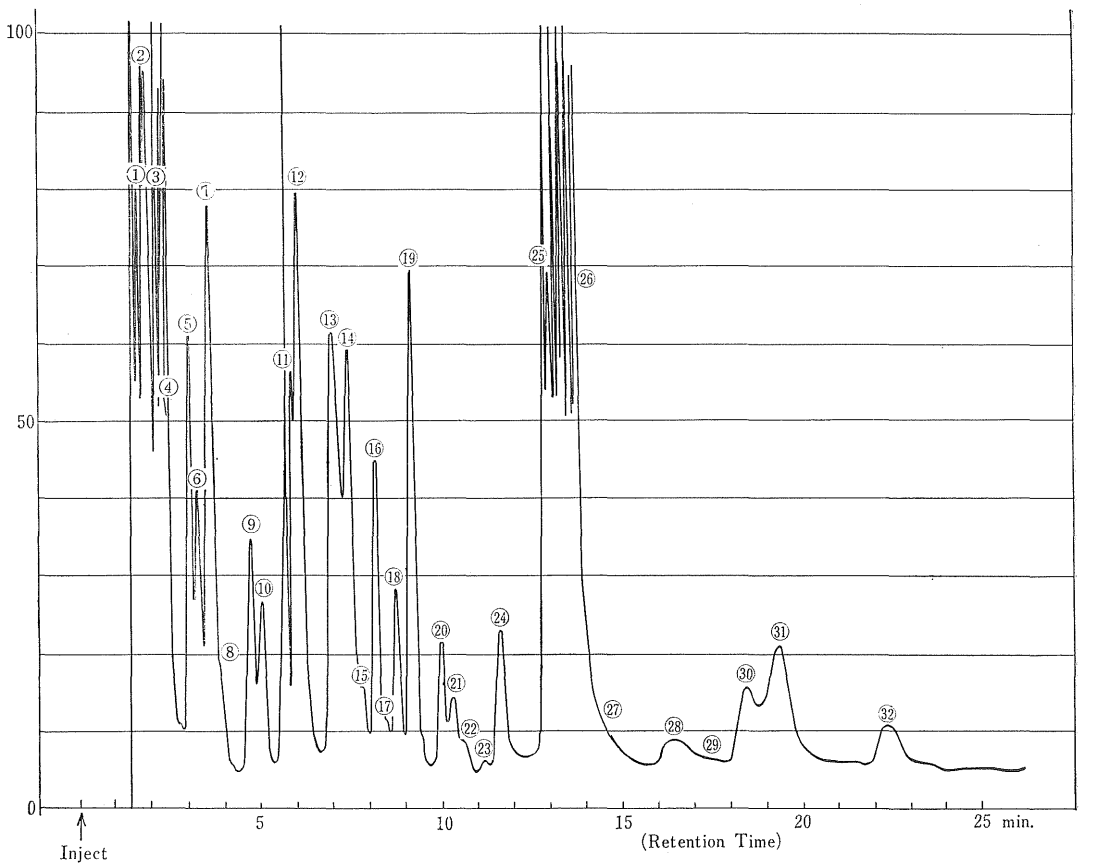


Fig. 2 Sample analysis deta of Hydrocarbons.

Table. 1 Meterials of peak number

1 $C_1 \sim C_3$	17 *n*-Octane
2 $C_3 \sim C_4$	18 Octene
3 Pentene	19 Benzene, Chloroform
4 Pentane etc	20 Unknown
5 Hexane etc	21 Trichloroethylene
6 Hexane etc	22 Dichloroethane
7 *n*-Hexane	23 Nonane
8 *iso*-Hexane	24 Nonane
9 *iso*-Heptane	25 Toluene
10 *iso*-Heptane	26 Unknown
11 Acrolein, *n*-Heptane, Aceton	27 Perchloroethylene
12 Dichloromethane	28 Decane
13 *iso*-Octane	29 Unknown
14 *iso*-Octane	30 Ethylbenzene
15 Trichloroethane, Carbontetrachloride	31 *m*-Xylene *p*-Xylene
16 Trichloroethane	32 *o*-Xylene

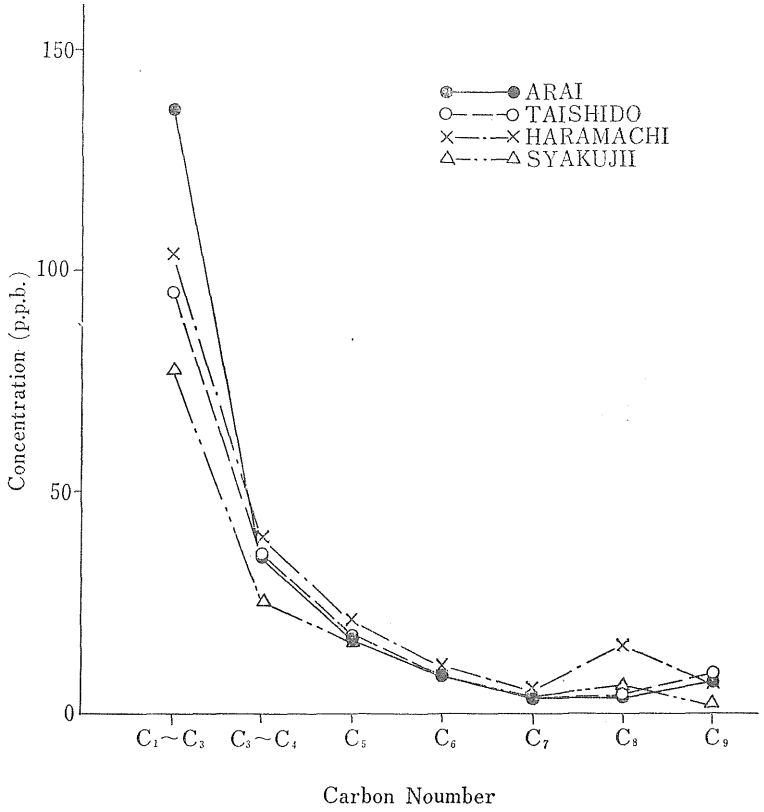


Fig. 3 Compound ratio of Hydrocarbons at four sampling points.

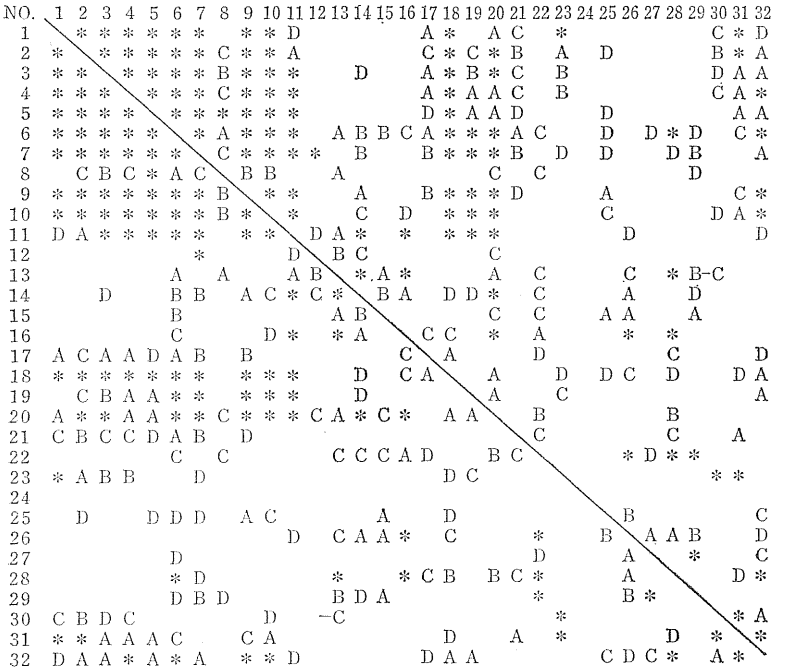
Table. 2 Concentration range noticeable pollutants at each sampling point (UNIT : ppb)

PLACE / RANGE / Hydrocarbons	ARAI Elementary School			TAISHIDO Junior High School			HARAMACHI Elementary School			SYAKUJII Health Center		
	$\bar{X}$	σ	Max	$\bar{X}$	σ	Max	$\bar{X}$	σ	Max	$\bar{X}$	σ	Max
$C_1 \sim C_3$	145	68	392	128	153	649	123	50	208	86	14	106
Trichloroethane	3	2	8	7	4	17	—	—	34	2	1	3
Trichloroethylene	4	5	36	4	3	14	6	3	10	1	0.3	2
Dichloroethane	2	2	8	2	2	6	2	1	2	0.6	0.1	0.8
Toluene	31	25	131	54	46	222	128	144	410	15	6	24
Xylene	23	14	64	33	17	79	18	12	39	—	—	—

としての 2.2.3. Trimethyl butane であり，⑮は Trichloroethane と Corbontetrachloride の混合ピークである．更に⑲は Benzene と Chloroform の混合ピークであるが，GC—MS 分析からみるとそのピークが小さい時には，fragment の強弱から判断して Benzene の占める割合が大きいが，ピークが大きい時には Chloroform が占めていることが認められた．

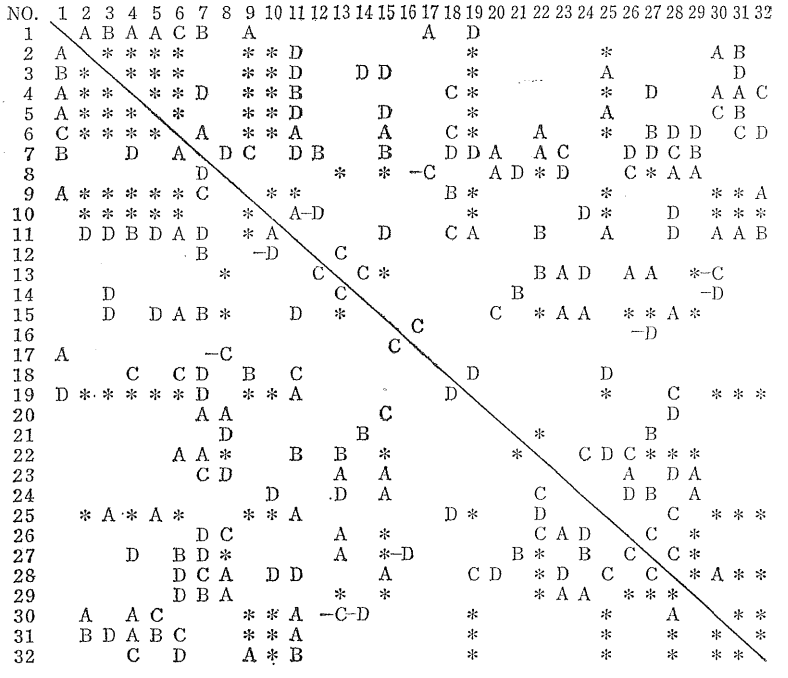
㉓，㉔は Nonane の異性体であるが，はっきりした分類ができないので Nonane として表示した．最後に⑳，㉖，㉙は物質が同定できないので Unknown peak として示した．

次にわれわれはこのように測定，分類された炭化水素類が大気環境中でどのような構成をしているかにつ



Significant Level. ＊0.1% A 1% B 2% C 5% D10%
Sample number n=97

Fig. 4 Distribution of correlation at Total Sampling Points



Significant Level. ＊0.1% A 1% B 2% C 5% D10%
Sample number n=54

Fig. 5 Distribution of correlation at ARAI Elementary School.

いてみるため，各測定点毎の濃度を求めグラフに示したのが Fig. 3 である．

図からわかるように C_1～C_4 までの炭化水素が70～80%約を占めており，これは他の測定例と類似の傾向を示している．また，測定点毎の構成比をみてもその違いはみられなかった．更に測定された物質の中から注目すべき汚染質の濃度範囲を Table. 2 に示した．

ハロゲン系炭化水素の Trichloroethylene Dichloroethane，芳香族系の Toluene などは分析チャートおよび変動係数から判断しても，存在変化の著しい物質といえる．野外におけるこれらの物質は，常在物質としての C_1～C_3（メタン，エタン，プロパン）等と異なり，その発生源が不規則かつ気象的要素等によって左右されやすいために，このように激しい存在変化を示すものと思われる．Table. 2 の中から Toluene をとって測定点毎の違いをみてみると，その地点の交通量の違いが推察される．

B. 汚染物質の相互関係について

われわれは測定された物質の相互関係をみることにより，その発生源の推定を行なうべく，32のピークについて，それぞれの相関係数を求め，記号によりその相関の強さを Fig. 4 および Fig. 5 に示した．Fig. 4 は測定点全部についてみたものであり，Fig. 5 は新井小学校においてのものである．表中，※印は有意水準0.1%において，Aは1%，Bは2%，Cは5%，Dは10%において相関があることを示している．Fig. 4 の方が Fig. 5 より相関のある組み合わせが多くみられるが，これはサンプル数が多いためであり，同じ※印であっても Fig. 4 においては相関係数が 0.33 以上，Fig. 5 においては相関係数が0.57以上であれば※印がついてしまうことになる．しかし実際にそれらの相互関係を論ずるには，相関係数の高いものをみなければならないので，相関係数が 0.7 以上の物質の組み合わせをとり出したものが Table. 3 である．相関係数が0.9以上のものについては，新井小学校で3通り，全測定点では2通りみられ，新井小学校においては Pentane と *iso*-Heptane (2 methyl-Hexane) の組み合わせが一つ多いが，全測定点の 0.8 以上の方にこ

Table. 3 Pollutant combination with correlation coefficient.

Correlation Coefficient	ARAI Elementary School	TOTAL Monitoring Point
more than 0.9	Pentene-Pentane Pentane-*iso*-Heptane *iso*-Heptane-*iso*-Heptane	Pentene-Pentane *iso*-Heptane-*iso*-Heptane
more than 0.8	pentene-Hexane C_3～C_4-pentene C_3～C_4-pfntane Pentene-*iso*-Heptane Pentane-*iso*-Heptane Pentane-*iso*-Heptane Hexane-*iso*-Heptane	C_1～C_3-C_3～C_4 C_1～C_3-Pentene C_1～C_3-Pentane C_3～C_4-Pentene C_3～C_4-Pentane Pentene-Hexane Pentene-*iso*-Heptane Pentane-Hexane Pentane-*iso*-Heptane Hexane-*iso*-Heptane
more than 0.7	C_3～C_4-Hexane Pentane-Hexane *iso*-Heptane-Hexane Pentane-Hexane Hexane-*iso*-Heptane	C_3～C_4-Hexane C_3～C_4-*iso*-Heptane Pentene-Hexane Pentene-*iso*-Heptane Pentane-Hexane Pentane-*n*-Hexane Pentane-*iso*-Heptane Hexane-*iso*-Heptane Hexane-*iso*-Heptane *n*-Hexane-*iso*-Hepatne

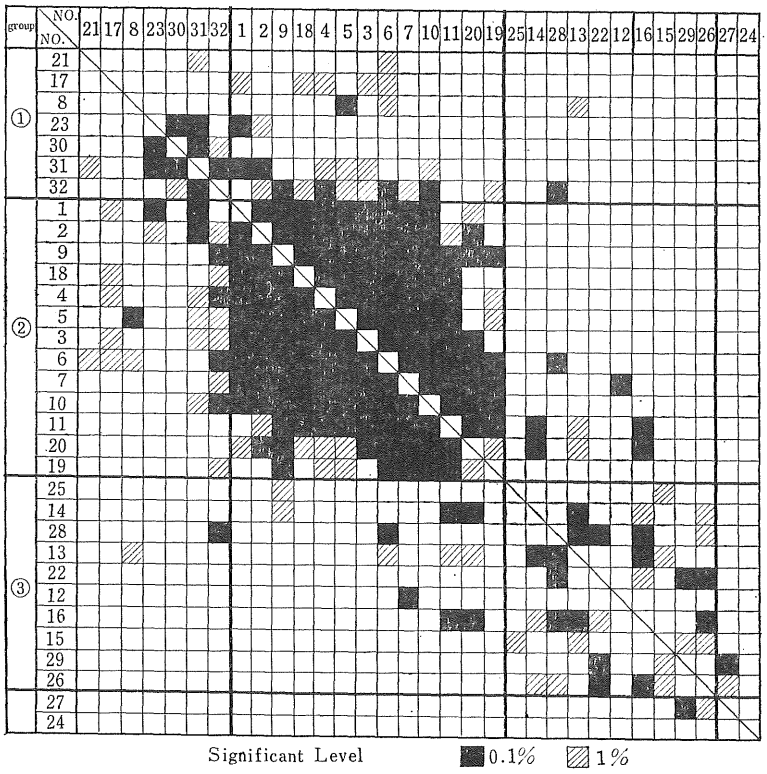


Fig. 6 Distribution of correlation at Total Sampling Points

の組み合わせがあり問題とすべきことではない．また，相関係数が0.8および0.7以上においては，全測定点の方がその組み合わせが多くなっているが，組み合わせの数が多いからどうであるということではなく，これらはほとんでがパラコィン系炭化水素同志の組みわ合せであり，単に相互の変動が似ていることを示すものであり当然の結果といえ，発生源を推定してもこれらはすべて，自動車の排気ガスおよび燃焼施設からの排ガスに寄因していることがうかがわれる．

次にわれわれは Fig. 4 および Fig. 5 で示した相関図表をもとに，群化配列という統計的手法を用いて解析を行なった．つまり群化配列をすることにより，より似たような挙動を示す物質を近くに集めて，同じような物質を一つの群とみなすための方法である．

このようにして得られた図表に有意水準 0.1% および 1%についてのみ図示したものが Fig. 6, Fig. 7 である．Fig. 6 は全体の測定点においての相関図であるが，図中太線で区別したような，21番より32番までの①グループと，1番より19番までの②グループと，25番から24番までの③グループの３三つに分けられ，中でも②グループは明うかに独立した群と評価される．また，Teble. 1により番号より汚染物質をみると，①グループには芳香族系炭化水素が，②グループにはパラフィン系炭化水素が，③グループにはハロゲン系炭化水素が属しているように群化された．

同じような方法で新井小学校で測定したものについてみたものが Fig. 7 である．

これについても群化配列されたものをみると，12番から１番までの①グループ，７番から28番までの②グループ，14番から８番までの③グループに分けられ，図からもわかるように②および③グループは，はっきりとした二つの群として評価される．しかし，グループ内の汚染物質をみてみると，全体の測定点の時のような同じ系統の炭化水素類には群化されず，①はパラフィン系と芳香族系の混合グループ，②も①と同じような混合グループ，③はハロゲン系炭化水素というように群化配列された．

次に，測定点のうち大気汚染測定として他の汚染物等のデータがそろっている新井小学校について，通常の大気汚染測定項目としてのオゾン（O_3），総酸化物

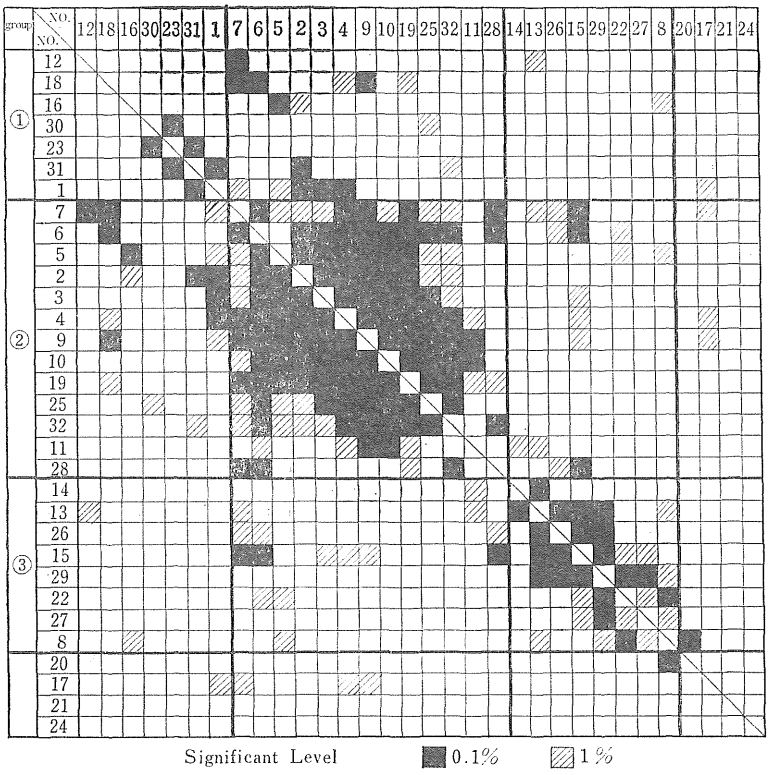


Fig. 7 Distribution of correlation at ARAI Elementary School.

Table. 4 Correlation coefficient between Pollutants in Atmosphere.

	O_3	Oxidant	T.H.C.	NO_2	NO	SO_2	Dust	Temp.	Humi.	W.V.	U.V.	Trichloro ethylene	Toluene	Dichloro-ethane	n-Hexane	Benzen Chloroform
O_3		** 0.909	** 0.669	* 0.498	0.203	** 0.506	** 0.743	0.083	0.128	−0.231	** −0.645	0.089	* 0.434	−0.084	0.263	** 0.592
Oxidant			* 0.539	** 0.545	−0.215	** 0.680	** 0.616	* 0.378	−0.267	** −0.525	** −0.565	0.026	** 0.630	0.224	* 0.383	** 0.575
T.H.C.				** 0.633	0.058	* 0.506	** 0.868	−0.051	0.137	−0.353	** −0.647	0.017	** 0.565	0.016	* 0.437	** 0.592
NO_2					* 0.393	** 0.676	** 0.606	−0.183	−0.127	−0.250	** −0.483	0.164	0.347	0.213	0.302	* 0.475
NO						0.097	−0.067	−0.309	0.360	−0.103	−0.145	0.107	0.060	−0.084	−0.138	−0.072
SO_2							0.390	−0.141	−0.120	* −0.428	* −0.426	0.184	0.159	0.239	0.128	0.263
Dust								0.217	−0.082	* −0.434	** −0.539	−0.004	** 0.575	0.039	* 0.431	** 0.642
Temp.									** −0.490	−0.250	0.124	−0.162	* 0.404	0.150	0.245	0.188
Humi.										* 0.406	−0.220	0.086	−0.176	−0.283	−0.239	0.071
W.V.											0.294	0.297	−0.333	−0.283	−0.239	−0.210
U.V.												−0.220	* −0.422	0.063	−0.244	* −0.510
Trichloro ethylene													0.070	** 0.594	0.147	0.151
Toluene														0.224	** 0.529	** 0.712
Dichloro-ethane															0.232	0.095
n-Hexane																* 0.514
Benzen Chloroform																

n=51. Significant Level ** 0.1% * 1%

(Oxidant), 総炭化水素 (T.H.C), 二酸化窒素(NO_2), 一酸化窒素 (NO), 亜硫酸ガス (SO_2), 浮遊粉じん (Dust), 温度 (Temp), 湿度 (Humi), 風速(W.V.) 紫外線量 (U.V.)と, さきほど群化配列された汚染物質の中から, 代表さすべき汚染物質として, *n*-Hexane, Toluene, Dichloroethane, Trichloroethylene を選び, その間の相関分析を行なったものが Tabl. 4 であり, 表中**印は0.1%, *印は1%の有意水準において相関があることを示す.

これから判断して特徴的なことを述べると, ①オゾン, オキシダント, 総炭化水素, 二酸化窒素および浮遊粉じんが紫外線量に対して負の相関であること, ②ベンゼン, トルエンなどの芳香族系炭化水素が浮遊粉じんと高い相関にあること, ③トリクロルエチレン, ジクロルエタンなどのハロゲン系炭化水素は他の要素と相関を示さないことなどがあげられる. ①について考察してみると, 野外調査においては, 実験室におけるような関係が明確にでるとは限らず, 大気拡散の程度と関係して, 逆転層および気流等の要素においては紫外線が極度に高くない状態においてもオキシダントの生成はあり得, このようなことも推定できる. また, ②においても, 大気拡散の程度において, 浮遊粉塵が高い時にトルエン, ベンゼンが高くなることがある. ③においてはトリクロルエチレン, ジクロルエタンなどは, その発生源が異なることからも言えるものである. つまり, これらの発生源は, 印刷工場, 塗装工場, 洗濯屋などと考えられ, 常時一定量を放散しているとは限らず, 独自の動向を示していることによると思われる.

〈結　語〉

今回の調査の結果をまとめてみると次のようなことがあげられる.

1) 硝酸メチルは GC-MS でその存在を確認できなかった.

3) アクロレインについても, この分析方法ではアセトンおよびペンタンと分離できないが, 異常な高濃度はつかめなかった.

3) しかし現在までにあまり注目されていなかった有機系塩素化合物の存在が確認された.

4) 4地点における地域差については, サンプル数の関係で結論できなかった.

5) 群化配列の結果および他の汚染質との相関からみると, 有機系塩素化合物の大気中での挙動は, 他の炭化水素とは別個の存在であるといえ, 発生源の違いを推定できた.

謝　辞

終りにあたり, 今回の調査に多大のご協力をいただいた, 衛生局公害保健課人見達雄氏, 世田ヶ谷保健所三橋睦美氏, 前牛込保健所川本伸幸氏, 石神井保健所天宮章氏に厚く謝意をのべる次第である.

なお, 本報告の一部は昭和49年11月に千葉市で行なわれた第15回大気汚染研究全国協議会において発表を行なった.

参考文献

- 加藤竜夫：光化学スモッグの原因物質の調査研究 安全工学 Vol. 11 No. 5 p. 271～275 (1972)
- 加藤竜夫：ガスクロマトグラフ法による悪臭の環境分析 安全工学 Vol. 10 No. 2 p. 97～104(1971)
- 村田武, 高橋誠二, 斉藤武嗣, 加藤竜夫：GC—MSによる大気中極微量成分の分析 島津評論 Vol. 28 p. 21～23 (1971)
- 渡辺征夫, 大喜多敏一：ガス状含酸素有機化合物のガスクロマトグラフィーによる分析 大気汚染研究 Vol. 8 No. 3 p. 138 (1973)
- 渡辺征夫, 大喜多敏一：大気中低級炭化水素各成分濃度の時刻変動相互関係および各成分の発生源の推定 大気汚染研究 Vol. 8 No. 5 p. 8～17 (1973)
- 中野欣嗣：環境大気中炭化水素の測定 東京スモッグに関する調査研究（第3報）p. 395～405 (1974)
- 野牛弘, 倉科周介, 鈴木重任, 佐藤泰仁：大気汚染物質の相関性について 空気清浄 Vol. 8 No. 5 (1970)
- Altshuller, A. P. Lonneman, W. A. Sutterfield, F. D. and Kopczynski, S. L.: "Hydrocarbon composition of the Atmosphere of the Los Angeles Basin—1967" *Environ. Sci Technol*, 5, 1009—1016 (1971)
- Stephens, E. R. and Burleson, F. R. "Distribution of Light Hydrocarbons in Ambient air" *J. Air. Pol. Cont Assoc.* 19, 929-936 (1963)
- Altshuller, A. P. and Bellar, T. A: "Gas chromatographyic Analysis of Hydrocarbons in the Los Angeles Atmosphere" *J. Air. Pol. Cont. Assoc.* 13(2)81—87(1963)
- Pilar, S. and Graydon, W. F. "Benzene and Toluene Distribution in Toronto Atmosphere" *Environ. Sci. Technol*, 7(7) 628—631 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 381 — 384, 1974

鉛のラット学習能力に及ぼす影響

関　比呂伸* 前田ヒロ子* 大井　玄* 野牛　弘*

Effect of Lead Acetate on Learning and Memory in Rats

HIRONOBU SEKI*, HIROKO MAEDA*, GEN OHI* AND HIROSHI YAGYU*

Adult wister rats were fed lead acetate through their pregnant and lactating stage for 6 weeks. Nine week old male rats of their litter were examined as to learning and memory ability.
No significant deterioration which might be caused by expose to lead in their early life stage was noted, though the maximal dose of lead, which pregnant rats and their fetuses could tolerate, was given.

緒　言

最近，産業内における重症の鉛中毒の減少にともなって，自動車の排気ガスに含まれる鉛による大気汚染，すなわちわれわれの生活，自然環境の汚染が問題となっている[1-4]．

無機鉛・有機鉛の中毒症状としては種々あげられているが[5]，なかでもガソリンに添加されている四エチル鉛は，生体への蓄積個所が脳に集中されやすく[6~9]，脳神経症状を[5,10-12]呈する．

ヒトにおいて，知能，注意力の低下がみられた小児には，異常に高濃度の血中鉛を含んでいたとの報告もある[13-15]

このことから，発生，成長の初期に過剰の鉛が生体に侵入してくることは，知的能力，情緒的側面におもわしくない影響を与えるのではないかと危ぐせしめるものである．

そこで，妊娠したラットに出産可能な範囲で，できるだけ大量の鉛を投与し，この胎生期の鉛侵襲がラット学習能力，情緒性にいかなる影響を及ぼすかを観察した．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Jaoan

方法・材料

1. 出産可能な最大投与量の決定

予備実験として酢酸鉛 50mg Pb/kg を約6週間強制的経口投与し学習能力への影響をみた．その結果，やや対称群の方が劣っていたが有意の差は認められなかった．そこで投与量を酢酸鉛 100—700 mg Pb/kg と増加して，出産離乳が可能な限界量を求めた．この実験より，最大耐量は 500 mg Pb/kg であった．そこで強制経口投与による悪影響を考慮してエサの中に鉛を含ませて同様の効果をみたところ，700 mg Pb/kg (175 mg Pb/30 g Food) 投与群では離乳不可能であった．したがって離乳可能な 500 mg Pb/kg(125 mg Pb/30 g Food) 群を鉛投与群とした．

2. 投与法

約3ヵ月齢のウィスター系，妊娠3日目の雌ラット28匹を2群に分け，鉛投与群は12匹，酢酸鉛 125 mg Pb/30 g Food を含む飼料を妊娠3日目より出産後3週目まで約6週間与えた．対称群は16匹で普通飼料を投与群と同期間投与した．

3. 動　物

出産し離乳したラットは，投与群：親2匹・仔11匹，対称群：親7匹・仔26匹でした．生後3週目で離乳して普通飼料にて飼育し，生後60日目に投与群雄ラット11匹 (210±14 g 体重)，対称群雄ラット15匹 (215±24 g 体重)を個別ケージに移した．そして学習能力実

験準備として体重が1割減るように摂餌量を調節した．実験中も同様にコントロールした．

4. 学習能力実験

情緒性テストのために Open Field Test（東大文学部心理学教室の変法）を用いた．この装置は高さ30 cm，90 cm 四方の箱で3分間自由歩行させ①内部滞在時間，②内部 Unit 数，③内部 Unit 率，④内部速度，⑤排糞回数，⑥放尿回数を観察した．

知能テストのために逆転学習（上記同変法）を行なった．この装置はT迷路で，予備訓練の後に左右どちらかの目標箱を選択させ，翌日逆方向の目標箱に10回行くまで試行させる．次の日，また逆方向をプラスにして連続5試行プラスになるまでくり返して行なう—R1．これを R5まで行なう．もう一つのテストは，Rabinovitch-Rosvold Test[16]（R-R-T）で，予備訓練の後に12種の迷路問題を遂行させて，①各テスト問題の合計失点数，②各テスト問題の合計走行時間数，③1失点当りの秒数，④各テスト問題の合計無失点回数を調べた．

5. 統計処理方法

得られた結果は，T検定：Open Field Test と R.—R.T，カイ2乗検定：逆転学習，により統計処理した．

結　果

1) Open Field Test

	投与群	対称群	危険率
①内部滞在時間：	166±70[a]	102±38	P＜0.05
②内部 Unit 数：	45±14	54±26	N. S.[b]
③内部 Unit 率：	0.26±0.08	0.25±0.09	N. S.
④内部速度	：0.30±0.12	0.50±0.15	P＜0.01
⑤排糞回数	： 0.8±2.3	0.6±1.8	N. S.
⑥放尿回数	： 17±8	17±10	N. S.

a)：mean±S.D.

b)：No Significant difference

2) 逆転学習

R 1：	投与群	6 ： 5	11	
	対称群	6 ： 8	14	$X^2=0.97$
		12 : 13	25	

R 2：	投与群	6 ： 5	11	
	対称群	7 ： 7	14	$X^2=0.40$
		13 : 12	25	

R 3：	投与群	7 ： 4	11	
	対称群	7 ： 7	14	$X^2=1.18$
		14 : 11	25	

R 4：	投与群	7 ： 4	11	
	対称群	7 ： 7	14	$X^2=1.18$
		14 : 11	25	

R 5：	投与群	7 ： 4	11	
	対称群	4 ：10	14	$X^2=4.66$
		11 : 14	25	

$X^2(1, 0.05)=3.84$ より，R 5のみ有意差あり

3) R—R—T

	投与群	対称群	危険率
①合計失点数	：114±28[a]	130±23	N. S.
②合計歩行時間数：	636±79	586±129	N. S.
③失点当りの秒数：	5.8±1.0	4.6±1.3	P＜0.05
④合計無失点回数：	17.2±7.2	16.0±4.7	N. S.

考　察

500 mg Pb/kg という胎仔が耐えうる多量の鉛を投与したにもかかわらず，学習能力実験において投与群と対称群との間に有意の差は認められなかった．

これより考えられるのは，第1に実際，鉛が母親より仔へ移行したかどうかである．

ヒトにおける鉛の胎盤移行について初期の研究は，Kehoe 等[17]や Thompsett 等[18]によってなされている．最近では，Barltrop 等は妊娠期に胎児へ移行することを確認したが，妊娠期の各時期により胎児への蓄積部位が異なるのではないかと指摘している[19]．更に McClain 等は，ラットとマウスを用いて無機鉛が胎盤通過することを認め[20]，そして有機鉛についても同様の知見が得られたと報告している[21]．また，Michaelson は，分娩直後の母ラットに酢酸鉛を与えたところ，ミルクを通して生後21日齢仔の脳に対称群の90倍の蓄積があることを認めている[22]．一方，大森は，四エチル鉛と酢酸鉛を同量投与した結果，脳への蓄積量は四エチル鉛の方が約1.4倍多いことを示した[6]．

更にわれわれのデータでは，100，200，500 mg Pb /kg と各投与量に対応して，血中鉛，δALA-D の活性度は変化しており，確実に仔へ移行していることが認められた．

第2番目に，脳の病理組織学的変化はどうであろう

か.

学習能力実験終了後，断頭して脳を摘出して病理組織標本作製中で，したがってわれわれの実験に使用したラットについては不明である.

文献によれば，Rosenblum 等は，炭酸鉛1％含むエサを出産直後に親マウスに与えたならば，新生仔に種々の神経病理学的変化を生じたと報告している[23]. また，Pentschew 等も同様にして，脳疾患を認めている[24].

Brown 等は，酢酸鉛100 mg Pb/kg を生後8日目，3・5週目に3～4日間連続投与して，Water-Maze と Shuttle-Box を使い学習記憶能力を調べたが，運動機能傷害を示したにもかかわらず有意の差は認められなかった[25]. また，四エチル鉛を成長したラットに5, 10, 15, 20 mg/kg 投与し簡単な T 迷路の実験を行なったが，運動機能失調や情緒不安定という明らかな神経症状にもかかわらず，学習能，記憶力などに代表される大脳機能に影響は認められなかった[26].

一方，病理組織学的変化が認められないが，塩化メチル水銀投与ラットに情緒性の変化，学習能力の低下がみられたという Post 等の報告もある[27].

以上の結果から，病織組理学的な脳変化と実際の学習記憶能力とは必ずしも一致しないことを示唆している.

第3番目に，これ等の心理学実験において，ラットが鋭敏な変化を示す動物であるかどうかの問題がある.

実験動物として，習慣上ラットやマウスが多く使われている. しかし，ラットという動物種は，あまりにも頑強な生命体のために多少の脳損傷をうけても行動や学習能力に変化がないという前記の報告を信ずれば，敏感な機能試験には不適当ではあるまいか. また，実験動物としての行動の均一性の点からも疑問がある. すなわち，われわれの一連の4回にわたる実験に使用した対称群のラットの成績を比較した結果，F 検定で有意の差が認められた. つまり，同じ対称群でさえもかなりのバラツキがあることは，行動の解析を行なう対象としての価値を疑しめるものではあるまいか.

要　約

妊娠期・哺乳期の約6週間通じて妊娠ラットに酢酸鉛を投与し，仔の学習能，情緒性への影響を観察した.

投与された鉛の量は，母ラットが出産を行ない離乳まで育仔するほぼ上限の量であるにもかかわらず，有意の学習能力の低下ないしは情緒性の変化は認められなかった. このことから，ラットの心理学実験動物としての性格について論じた.

付　記

（本研究は昭和48年度当研究所研究課題「鉛中毒に関する臨床検査および研究」として実施したものである）

文　献

1) Goldsmith, J. R. and Hexter, A. C. : *Science*, 158, 132—134 (1967)
2) Cholak, J. : *Arch. Envirn. Health*, 8, 312—324 (1964)
3) Hofreuter, D. H., Catcott, E. J., Keenan, R. G. and Xintaras, C. : *Archiv. Envirn. Health*, 3, 568—574 (1961)
4) Patterson, C. C. and Salvia, J. D. : 自然, 24 (6), 28—35 (1969)
5) Sanders, L. W. : *Archiv. Environ. Health*, 8, 270—277 (1964)
6) 大森　薫：日衛誌, 20, 340—346 (1965)
7) 市川康夫：横浜医学, 12, 704—721 (1961)
8) Stewart, C. P. and Stolman, A. : *Toxicology, Mechanism and Analytical Methods*, 1, 216 (1960), Academic Press, New York
9) 丸茂義輝，及川智正，丹羽口徹吉：衛生化学, 20, 24—28 (1974)
10) Kehoe, R. A. : J. A. M. A., 85, 108—110(1925)
11) Eldridge, W. A. : *Chemical Warfare Service, Edgewood Arsenal, Medical Research Division*, Report, 29 (1924)
12) 赤羽京治，吉川春寿，他：労働科学, 17. 979—993 (1940)
13) Moncrieff, A. A., Koumides, O. P., Clayton, B. E. et al. : *Arch. Dis. Childh.*, 39, 1—13 (1964)
14) Byers, R. K. and Lord, E. E. : *Amer. J. Dis. Child.*, 66, 471—494 (1943)
15) Mellins, R. B. and Jenkins, C. D. : J. A. M. A., 158, 15—20 (1955)
16) Rabinovitch, M. S. and Rosvold, H. E. : *Canadian J. Psychology*, 5, 122—128 (1951)
17) Kehoe, R. A., Thamman, F. and Cholak, J. : *J. Ind. Hyg.*, 15, 301—305 (1933)
18) Thompsett, S. L. and Anderson, A. B. : *Biochem. J.*, 29, 1851—1864 (1935)

19) Barltrop : *Mineral Metabolism in Pediatrics* 135—151 (1969), F. A. Davis Co, Philadelphia
20) Mcclain, R. M. and Becker, B. A. : *Fed. Proc.*, 29, 347 (1970)
21) Mcclain, R. M. and Becker, B. A. : *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 21, 265—274 (1972)
22) Michaelson, I. A. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 26, 539—548 (1973)
23) Rosenblum, W. I. and Johnson, M. G. : *Arch. Path.*, 85, 640—648 (1968)
24) Pentschew, A. and Garro, F. : *Acta Neuropath.*, 6, 266—278 (1966)
25) Brown, S., Dragann, N. and Vogel, W. H. : *Arch. Environ. Health*, 22, 370—372(1971)
26) Bullock, J. D., Wey, R. J., et al. : *Arch. Environ. Health*, 13, 21—22 (1966)
27) Post, E. M., Yang, M. G., King, J. A. and Sanger, V. L. : P. S. E. B. M., 143, 1113—1116 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 385 — 392, 1974

DDT のマウス液性免疫機構への影響

瀬戸　博* 大井　玄* 湯目邦雄* 福田雅夫* 野牛　弘*

Effect of DDT on Humoral Immune Responses in Mice

HIROSHI SETO*, GEN OHI*, KUNIO YUNOME*, MASAO FUKUDA* AND HIROSHI YAGYU*

Effects of *p-p'* DDT on the mouse humoral immune response were studied by means of hemolytic plaque forming cell assay. A short-term oral administration (2.75 mg/kg/day, 27.5 mg/kg/day for 5 days) suppressed development of indirect PFCs in the primary response.

On the other hand a long-term administration (5 ppm, 50 ppm for 12 weeks) caused rather distinct reduction in both direct and indirect PFCs in the 50 ppm group.

Possible mechanisms for this observation were discussed.

1. 緒　言

DDT (dichlorodiphenyl trichloro ethane) は，BHC(1, 2, 3, 4, 5, 6-Hexachlorocyclohexane) とともに有機塩素系農薬の代表的環境汚染物質である．その生体影響については，肝の薬物代謝を促進すること[1]，中枢神経系を障害すること[2,3]，第二次性微の抑制[4]などが知られているが免疫学的影響はほとんど調べられていない．Wassermann ら[5]は，ウサギを用いて飲水の中に200 ppm の *p-p'* DDT〔1, 1, 1-trichloro-2, 2 bis(*p*-chlorophenyl) ethane〕を38日間与えたところ *Sarmonella typhi* に対する 7S gammaglobulin が有意に減少すること，また Gabliks ら[6]は，DDT を 10～20 mg/kg 前もって投与しておいたモルモットはジフテリア毒素に対するアナフィラキシーショックが有意に減少することを報告した．液性免疫機構への DDT 干渉に関する Wassermann らの観察は比較的非特異的であり，かつ感度の低いものである．われわれは *p-p'* DDT を短期間および長期間マウスに投与し，抗原接種後，脾臓中に出現する抗体産生細胞を直接的に観察し結果を得たのでここに報告する．

* 東京都立衛生研究所環境保健部環境衛生研究科
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

2. 材料および方法

1) **動物**，6週齢 ICR 雄性マウス，㈱日本クレアより4～5週齢のマウスを購入し1～2週間馴化させたもの

2) **抗原**，ヒツジ赤血球（以下 SRBC と略す），Alsever 液で処理したヒツジ保存血液（日本バイオテスト研究所）製を生食で3回洗浄し，約1/10の生食懸濁液とした．

3) **p-p' DDT**　㈱東京化成工業　試薬特級

4) **p-p' DDT の投与方法**

a. 短期投与実験　*p-p'* DDT をサラダ油に溶解し，0 mg/kg/day，2.75 mg/kg/day，27.5 mg/kg/day の3種類の量を連続5日間経口投与した．

b. 長期投与実験　*p-p'* DDT を飼料中に均一に混入させ，0 ppm，5 ppm，50 ppm の添加量となるよう調製した実験飼料を12週間マウスに投与した．

5) **免疫**　短期経口投与実験では，5日間投与後，翌日に，また長期投与実験では12週目に 4×10^8 個の SRBC を腹腔内 (*i. p*) に接種した．二次反応を観察するため第2回目の接種を同様の方法で10日後に行なった．

Table. 1 Effect of *p-p'* DDT administration

Short-term (5 days)	Bodyweight (g)[a]	spleen (mg)[a]	Thymus (mg)[b]
0 mg/kg/day	33.3±1.6[c]	147.2±24.6	68.5±11.0
2.75 mg/kg/day	32.3±1.9	145.7±19.5	42.4±8.5
27.5 mg/kg/day	33.2±1.9	151.2±24.8	84.5±16.8
Long-term (12 weeks)			
0 ppm	43.1±1.9	190.3±40.1	50.0±11.6
5 ppm	43.2±3.2	176.1±21.5	45.1±9.3
50 ppm	42.1±3.9	183.0±39.2	48.1±6.6

a : n=20 mice, b : n=10 mice, c : Mean ± Standard deviation

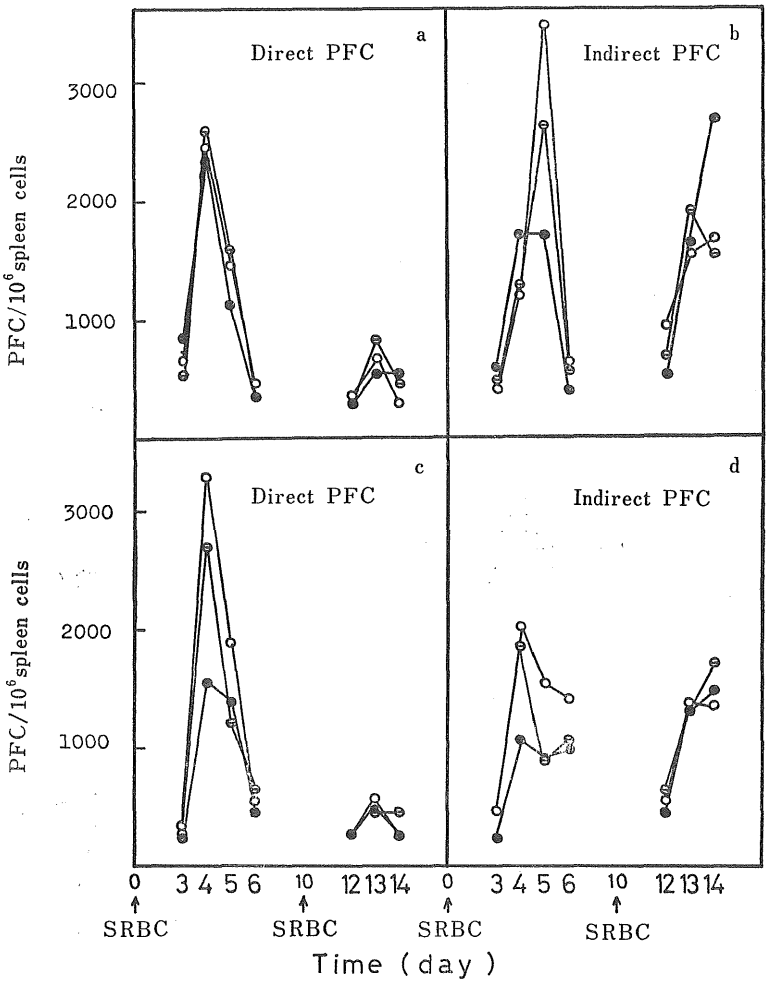


Fig. 1 Primary and secondary responses in the spleen of ICR mice injected with SRBC on day 0 and 10.
a, b : Effect of short-term *p-p'* DDT administration (5 days)
○—○ 0 mg/kg/day, ⊖—⊖ 2.75 mg/kg/day, ●—● 27.5 mg/kg/day
c, d : Effect of long-term *p-p'* DDT administration (12 weeks)
○—○ 0 ppm, ⊖—⊖ 5 ppm, ●—● 50 ppm

Table. 2 Effect of short-term *p-p'* DDT administration on the humoral immune responses

I. Direct PFC

Days after antigen	No. of Plaque-forming Cells/1×10^6 Spleen Cells					
	p-p' DDT Dose×5 days					
	0 mg/kg/day		2.75 mg/kg/day		27.5 mg/kg/day	
Primary response	545	[a]	500		929	
	1127		276		1152	
	535		956		613	
	403		438		625	
3	653	±280[b]	542	±252	830	±225
	1947		2369		2578	
	2174		2739		2623	
	2972		2389		2342	
	2686		2900		1886	
4	2445	±405	2599	±278	2357	±292
	1147		1852		1189	
	1865		1644		1165	
	1623		1294		1333	
	1088		1540		827	
5	1431	±325	1583	±201	1129	±186
	397		271		262	
	498		403		545	
	331		189		374	
	502		494		337	
6	432	±72	339	±117	379	±104
	278		325		382	
Secondary response	330		333		335	
	526		294		201	
	358		255		304	
12	373	±93	302	±31	306	±67
	946		675		551	
	434		1000		603	
	590		975		240	
	578		566		868	
13	637	±189	804	±188	566	±223
	218		260		610	
	269		1059		440	
	382		298		837	
	309		255		335	
14	295	±60	468	± 342	555	±190

a : Each value represents a pool of five spleens.

b : Mean ± Standard deviation

Table. 3 Effect of short-term *p-p'* DDT administration on the humoral immune responses
II. Indirect PFC

Days after antigen	No. of Plaque-forming Cells/1×10^6 Spleen Cells *p-p'* DDT Dose×5 days 0 mg/kg/day		2.75 mg/kg/day		27.5 mg/kg/day	
Primary response	401	[a]	393		757	
	417		398		706	
	419		701		517	
	378		338		389	
3	404	±16[b]	458	±143	592	±148
	962		817		1536	
	639		1083		1940	
	1361		1059		1899	
	1809		2046		1452	
4	1193	±438	1251	±471	1707	±225
	3434		3422		2127	
	4667		3155		1551	
	2744		1507		1631	
	2971		2325		1529	
5	3454	±743	2602	±751	1709	±244
	556		594		279	
	699		444		425	
	542		455		557	
	681		810		329	
6	620	±71	576	±148	397	±106[*2]
	856		683		699	
Secondary response	857		690		427	
	1023		730		481	
	983		553		617	
12	930	±75	664	±67[*1]	532	±108[*1]
	2644		1483		1695	
	885		2325		1752	
	968		1923		817	
	1772		1838		2248	
13	1567	±711	1892	±299	1628	±515
	1747		1646		3037	
	1375		1762		2764	
	2029		1786		2904	
	1393		907		2083	
14	1636	±271	1525	±361	2697	±367[*1]

a : Each value represents a pool of five spleens
b : Mean ±Standard deviation
[*1] : Significant $p \leqq 0.01$
[*2] : Significant $p \leqq 0.05$

Table. 4 Effect of long-term *p-p'* DDT administration on the humorl immune responses

Ⅰ. Direct PFC

Days after antigen	No. of Plaque forming Cells/1×10^6 Spleen Cells Addition of *p-p'* DDT in diet 0 ppm		5 ppm		50 ppm	
Primary response 3	248[a]		421		273	
	387		539		166	
	328		245		144	
	201		199		287	
	291	±72[b]	351	±137	218	±63
4	3091		3577		980	
	3340		2301		2469	
	3503		1814		1141	
	3247		3116		1682	
	3295	±149	2702	±687	1568	±582[*1]
5	2476		1678		1429	
	1500		580		942	
	2173		1143		1884	
	1421		1387		1326	
	1892	±446	1197	±403	1395	±336
6	813		697		392	
	524		692		328	
	301		439		710	
	526		650		374	
	541	±182	620	±106	451	±151
Secondary respone 12	166		319		268	
	197		260		309	
	445		180		172	
	339		396		385	
	287	±113	289	±79	283	±77
13	513		442		727	
	534		502		766	
	648		668		330	
	610		160		169	
	576	±55	448	±183	498	±255
14	266		473		254	
	203		371		332	
	210		513		318	
	348		498		225	
	257	±58	464	±55	282	±44

a : Each value represents a pool of five spleens

b : Mean ± Standard deviation

*1 : Significant $P \leqq 0.01$

Table. 5 Effect of long-term *p-p'* DDT administration on the humoral immune responses

Ⅱ. Indirect PFC

Days after antigen	No. of Plaque-forming Cells/1×10^6 Spleen Cells Addition of *p-p'* DDT in diet					
	0 ppm		5 ppm		50 ppm	
Primary response 3	88[a]		260		231	
	226		489		177	
	287		438		269	
	266		647		230	
	217	±77[b]	458	±138	227	±33
4	1828		1827		474	
	2090		1200		1781	
	2230		1509		891	
	1883		2892		1048	
	2008	±161	1857	±637	1048	±472[*1]
5	2103		1318		754	
	1654		357		1117	
	1379		869		1424	
	989		970		1411	
	1531	±406	879	±344	926	±540
6	1831		1114		1117	
	1622		990		932	
	1687		1030		1017	
	504		1123		924	
	1411	±529	1064	±56	998	±78
Secondary response 12	392		901		438	
	676		335		441	
	604		418		227	
	618		873		585	
	573	±108	632	±257	423	±128
13	1679		832		1797	
	1318		806		1554	
	1505		1558		—	
	1042		1026		675	
	1386	±236	1305	±409	1342	±482
14	2371		1652		645	
	1026		479		1850	
	1052		3494		1932	
	991		1183		1513	
	1360	±584	1702	±1116	1485	±510

a : Each value represents a pool of five spleens

b : Mean ± Standard deviation

*1 : Significant $p \leqq 0.05$

6) 抗体産生細胞の検出方法　この目的のために Hemolytic plaque formation technique[7]の改良法[8]を用いた．免疫後3日目，4日目，5日目，6日目，12日目，13日目，14日目にそれぞれ毎日1群20匹ずつ殺し（cervical dislocation）脾をとり出し5個ずつまとめた（$n=4$），脾細胞をていねいにほぐしだしメッシュを通してイーグル MEM 培地に懸濁し遠沈洗浄した．細胞数を測定して適当な濃度に調整し，Cunninghan 法[8]により溶血斑形成細胞（以下 PFC と略す）を算定した．(Direct 19S PFC) 別に7S抗体産生細胞を観察するために山羊抗マウス 7S γ グロブリン血清（HYLAND, CALIF, U.S.A）を1：50の希釈液として用いた．(Indirect PFC)

脾細胞懸濁液 0.40 m*l* (Indirect 法では，上記の抗血清を 0.04 m*l* 含む）と SRBC の1：1イーグル MEM 培地懸濁液0.05 m*l* と1：1希釈の補体（モルモット・東芝化学工業製）0.05 m*l* を 37°C 10分間加温し，よく混合してからカニンガムチェンバー（高橋技研製）に注入し，37°C 1時間 Incubate した．

PFC の算定は，肉眼的に行ない2枚のプレートの平均値を計算し脾細胞10^6個あたりの PFC 数として表現した．

3. 実験結果

1) *p-p′* DDT 投与による体重およびリンパ系臓器への影響

Table. 1 に示すように，短期投与および長期投与とも体重，脾，胸腺の重量に *p-p′* DDT の影響はみられなかった．

2) *p-p′* DDT の短期経口投与による一次および二次免疫反応への影響

p-p′ DDT の LD_{50} の 1/10量および 1/100 量を毎日5日間投与した後の抗体産生能を調べた結果をFig. 1および Table 2, 3 に示す．19S抗体を産生しているとみられる Direct PFC 値は，いずれの投与群においても有意差がない．しかし7S抗体の産生をも含めた Indirect PFC (Fig. 1, Table. 3) においては，5日目に DDT 投与により抑制される傾向が認められた．($p \leqq 0.05$)

3) *p-p′* DDT の長期経口投与による一次および二次免疫反応への影響

p-p′ DDT を飼料中に 5 ppm および50 ppm 添加し12週間与え続けた後，抗体産生能を調べた結果を Fig. 2 および Table. 4, 5 に示した．短期経口投与の結果と異なり，Direct PFC においても顕著に抑制が認められた．(50 ppm 投与群のみ4日目にコントロールに対して47.6%　$p \leqq 0.01$ で有意)

Indirect PFC においても同様の傾向がみられたが，5 ppm 投与群では，いずれの場合においても影響がみられなかった．また二次免疫反応においては，*p-p′* DDT の影響は観察されなかった．

4. 考　察

p-p′ DDT の投与により SRBC に対するマウスの液性免疫反応が低下することを脾細胞中の PFC を算定することにより直接的に観察した．われわれのこの実験結果は，200 ppm の *p-p′* DDT を飲水中に混入させ38日間飼育したウサギが *Sarmonella typhi* に対する 7S gammaglobulin と血清抗体価が有意に減少し[5]，またラットで卵アルブミンに対する血清抗体価と gammaglobulin 分画が有意に減少する[9]という Wassermann の報告と一致する．

一方，Gabliks[6]らはアナフィラキシーの発現は，DDT により抑制されるがジフテリア毒素に対する血球凝集素価には，有差の差がみられなかったと報告している．

このような対立は，異なった動物種や実験条件によるものと考えられるが，一つには DDT 投与による副腎皮質ホルモンの代謝が相異する結果，免疫反応にもそれが影響を及ぼすことも推察される．

副腎皮質ホルモンは，リンパ球に直接的障害作用があり[10]，ライソゾーム膜を安定化させ，細胞の反応性を低下させるなどの働きがあり[11]，これらの作用機序によってリンパ球の機能抑制[12,13]があると考えられ抗体の産生を抑制することが知られている．

DDT およびその誘導体は，肝中のステロイド加水分解酵素に作用し[14,15]，副腎皮質ホルモンの代謝を促進する[16]ことが知られている．なかでも *p-p′* DDT〔1, 1-dichloro-2-(*p*-chlorophenyl)-2-(*o*-chlorophenyl)ethane〕は副腎の腫瘍のための化学療法剤として用いられてきた[17-18]ものである．

この面から，DDT により抗体産生への抑制が少なくなると考えられるが，我々の成績は，そのような機構が必らずしも優勢的ではない事を示唆している．

この他，DDT による発ガン性の議論についても対立した見解がある[19,22]．

われわれの得たわずかな実験結果からだけでは，DDT の免疫機構への干渉について確定したことはいえないが少なくとも微量の DDT を長期間摂取することにより生体防御機構をも含めた生理機能のバランスを乱すことが大いに懸念されるのである．

文　献

1) Hart, L. G., Fourts, J. R. : *Proc. Soc. Exp. Biol & Med*, 114, 388—392 (1963)
2) Hrdina, P. D., Singhal, R. L., Peters, D.A., Ling, G. M. : *Toxic & Appl Pharmacol*, 25, 276—288 (1973)
3) Matsumura, F. Bratkowski, T. A., Patil, K. C. : *Bull. Envir. Contam & Tox*, 4, 262—270 (1969)
4) Burlington, H, Lindeman, V. F., : *Proc. Soc. Exp. Biol & Med*, 74, 48 (1950)
5) Wassermann, M. Wassermann, D, Kedar, E and Djavaherian, M. : *Bull. Envir. Cont am & Tox*, 6, 426—435 (1971)
6) Gabliks, J. Askari, E. M., Yolen, N. : *Arch Environ Health*, 26, 305—308 (1973)
7) Jerne, N. K., Nordin, A. A. : *Science*, 140, 405 (1963)
8) Cunningham, A. J., Szenberg, A. : *Immunology*, 14, 599—601 (1968)
9) Wassermann, M., Wassermann, D., Gershon, Z. and Zellermayer, L. : *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 160, 396 (1969)
10) Doughety, T. F. : *Phsiol. Rev.*, 87, 49(1961)
11) Lurie, M. B. : *Arch Environ Health*, 11, 235—241 (1965)
12) Strader, H., : *Immunology*, 10, 45 (1965)
13) Fagreus, A., Berglund, K. : *J. Immunol.*, 87, 49 (1961)
14) Welch, R. M., Levin, W. Conney, A. H. : *J. Pharmaco & Exp Ther*, 155, 167—173 (1967)
15) Conney, A. H., Welch, R. M., Kuntzsman, R and Burns, J. J. : *Clin. Pharmacol. Ther.*, 8, 2—10 (1967)
16) Kupfer, D., Peets, L. : *Biochem. Pharmco.*, 15, 573—581 (1966)
17) Sakurauchi, N. Kumaoka, S, Naruke, T. et. al. : *Endocr. Jap.* 16, 287—290 (1969)
18) Sauthren, M. L., Tochimoto, S, Stron, L, et. al. : *J. Clin. Endocr.*, 26, 268—278 (1968)
19) Bennison, B. E, Mostofi, F. K. : *J. Nat. Concer. Inst.*, 10, 989—992 (1950)
20) Innes, J. R. N, Ulland, B. M, Valerio, M.G, et. al : *J. Nat. Cancer Inst*, 42, 1101—1114 (1969)
21) Jukes, T.H. : *Int. J. Environ. Stud*, 1, 43—46 (1970)
22) Laws, E. R. Jr. : *Arch. Environ. Health*, 23, 181—184 (1971)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 393 — 397, 1974

河川および井戸水中の有機物の分析法ならびにその含有量に関する研究「第Ⅱ報」GC—MS 法による水道水中の有機物の同定

森田昌敏* 中村 弘* 三村秀一*

An Investigation on Analytical Method and Evaluation of Organic Matters in River and Well Water(Part Ⅱ)Indentification of Organic Materials in Tap Water by Gaschromatography Mass spectrometry

MASATOSHI MORITA*, HIROSHI NAKAMURA* AND SHUICHI MIMURA*

Organic materials were searched in tap water and analysed by means of gaschromatography-mass spectroscopy. 25 chemical species were identified. Methodology is discussed in detail especially on the contamination during the condensation.

Ⅰ 緒 論

水道水中に溶存する有機物についてはほとんど未知のまま残されてきた．水道水の原水である河川水の汚染はますます激化し，水道水自身の有機物による汚染は激しくなっているものと推定される．実際，最近になって異臭水などが給水されているし，また溶存有機物に消費されてしまうために塩素添加量は著しく増大している．にもかかわらず，有機物の分析がほとんど行なわれてこなかった理由は主として，適当な濃縮法と高能率の分離手段が開発されていなかったためである．最近になってガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリーによる分離同定が一般化し，これにより，かなりの道が広けてきたことは事実である[1~4]．しかしながら，下水等の高濃度の汚染水ならばともかく，水道水のように比較的清浄な水については，操作上の汚染が極めて深刻な問題であり，その方法については未解決の状態にある．本研究は水道水中の未知物質を同定するための基本的な方法を確立しようとしたものである．

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Ⅱ 試薬と機器

Ⅱ—1 試 薬

エーテル　特級試薬（18 *l* 缶入り）を1回目は水酸化ナトリウムと共に蒸留し，次いで2回目は，リチウムアルミニウムハイドライドと共に蒸留した．

活性炭　ガスクロ用充てん剤として販売されている Carboshieb ® を使用

塩　酸　特級塩酸を蒸留して使用

無水硫酸ナトリウム　市販特級試薬を 200 °C 2時間焼成

硫　酸　特級試薬をそのまま使用

Ⅱ—2 質量分析器

ガスクロマトグラフィーマススペクトロメーター島津 LKB 9000

Ⅲ 実験と結果

Ⅲ—(1)水道水中の低沸点化合物の検索

Ⅲ—1—(1)濃縮法

水 1 *l* をフラスコに入れ 40°C に加温しながら純窒素ガスをバブリングさせる．（装置は図1に示す。）純窒素ガスはあらかじめドライアイス—エタノールで冷却された活性炭カラムを通過させることにより，不純

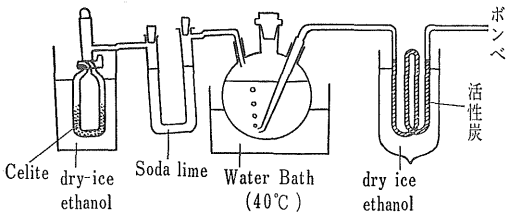


図1　気化濃縮法

物の混入を防ぐ．窒素ガスと共に揮発してきた成分は途中 Soda lime 管で水分を除去され，ガスサンプラーに導かれる．ガスサンプラーはドライアイス—エタノールまたは液体酸素で冷却され，水道水中の低沸点化合物はここでトラップされる．次いでガスサンプラーを加熱しガスクロマトグラフィーマススペクトロメーターに導入された．

Ⅲ—1—(2) GC—MS 条件

カ　ラ　ム　TCP 25% on Chromosorb WAW D MCS (80/100)，3 m×3 ϕ

カラム温度　40°→90°（毎分5°昇温）

検　出　器　全イオン検出器（ＴＩＣ）

キャリヤーガス　ヘリウム

キャリヤーガス流量　30 ml/min

質量スペクトルは70 eV のイオン化電圧で測定．

Ⅲ—1—(3) 結　果

得られたガスクロマトグラムとそのピークの同定を図2に示す．カラムは分離は十分良好であり，いくつかの物質が同定可能であった．興味深いのは塩素系溶剤が多く観察されていることであり，これについては次報で詳しく検討している．またクロマトグラムは，大気のクロマトグラムと，No. 9, No. 11 のピークを除いてかなりよく一致しており，水質汚濁と大気汚染は揮発性物質に関しては密接な関係があることが示された．

Ⅲ—2　中沸点化合物

Ⅲ—2—(1)　濃縮法

試水 500 ml に蒸留塩酸 2 ml を加え，これに再留エーテル150 ml，100 ml，100 ml で3回抽出し，抽出液を合わせて，無水硫酸ナトリウムで脱水する．この液を 30 μl まで KD 濃縮器で濃縮し，GC—MS に打込む．

Ⅲ—2—(2)　GC—MS 条件

カ　ラ　ム　Tenax GC® (60180) 2 m×3 ϕ,

カラム温度　50°→200°C 毎分 7°C 昇温,

検　出　器　ＴＩＣ

キャリヤーガス　ヘリウム

キャリヤーガス流量　30 ml/min.

質量スペクトルは 70 eV のイオン化電圧で測定

Ⅲ—2—(3)　結　果

この成分は水道水中には最も多く含まれており，ガスクロマトグラフィーによる分離が不十分であった．図3には，マススペクトル中の分離し易い成分だけが固定され記載されている．低沸点成分の一部が重複してクロマトグラム上にみられる．

Ⅲ—3　高沸点成分

Ⅲ—3—(1)　濃縮法

中沸点成分と同様な溶媒抽出法によった．

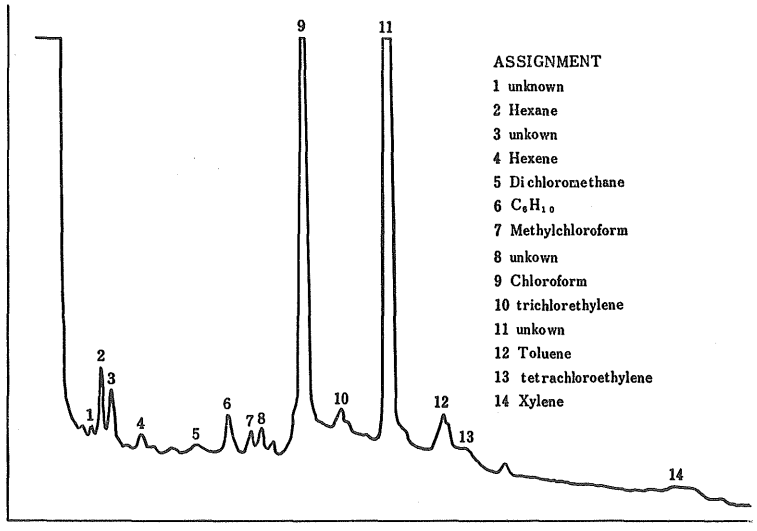


図2　水道水中の揮発性成分

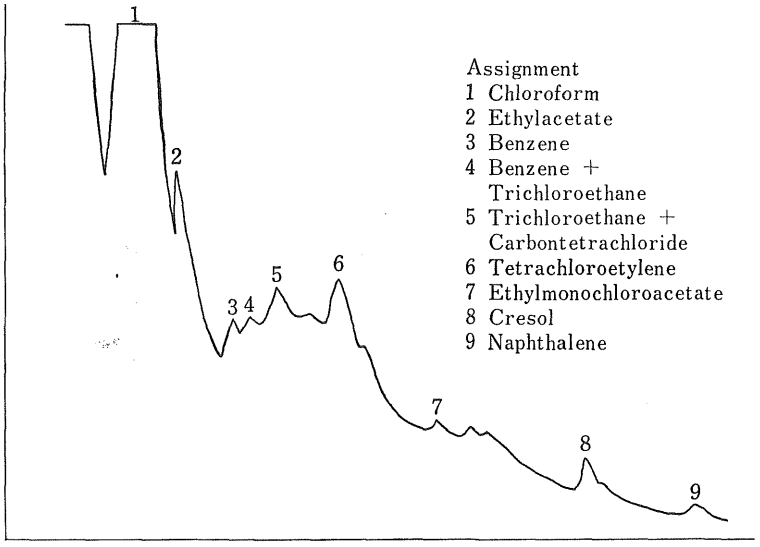


図3 水道水中の中沸点成分

Ⅲ—3—(2) GC—MS 条件

カラム OV—1 (2%) on Chromosorb WA W DMCS (60/80) 2m×3φ

カラム温度 150°C→250°C 毎分 5°C 昇温

その他の条件はⅢ—2—2と同じ

Ⅲ—3—(3) 結果

この成分は比較的単純で主なピークは四つしかない．このうち二つはフタル酸エステルである．Peak 1 は m/e=220 に基準ピークをもちジブチルヒドロキシトルエンと推定された．混入源は不明である．Peak 4はスクワレンであり，本物質は天然物として自然界に遍く存在している．ガスクロマトグラフィーでフタル酸エステルの分析を行なうと，水試料では通常観測される成分である．(図4)

Ⅲ—4 イオン交換樹脂吸着成分

Ⅲ—4—(1) 濃縮法

アンバーライト IR 120 B (20倍量の 2N 塩酸で洗浄) をつめたカラムに水道水を通し，2N 塩酸で溶出させる．溶離液をエバポレーターで蒸発乾固し，これにアルカリ液 (6N NaOH) を加えてエーテルで抽出．抽出液を濃縮し，GC—MS に打込む．

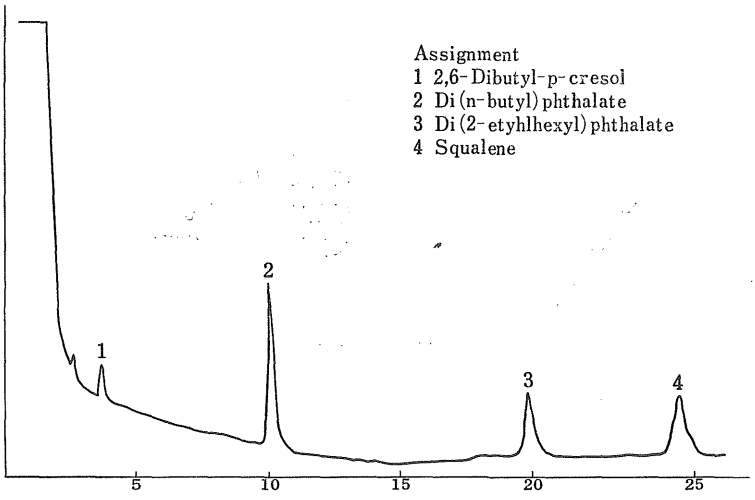


図4 水道水中の高沸点成分

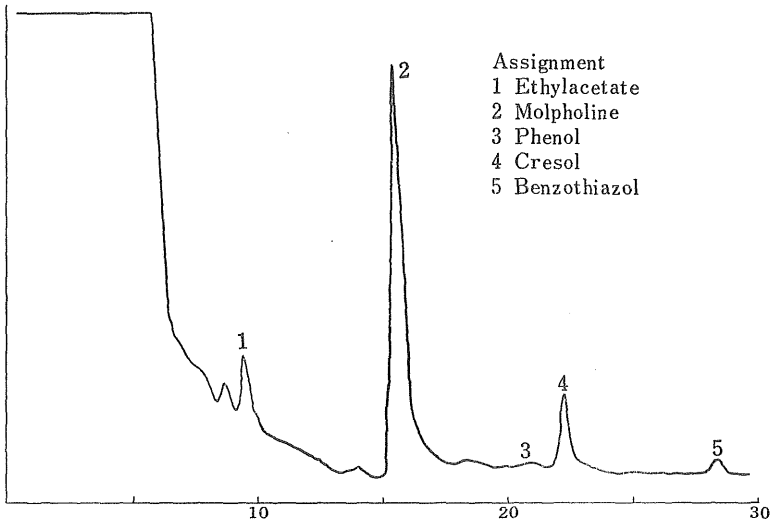


図5　水道水道のイオン交換樹脂濃縮成分

Ⅲ—4—(2)　GC—MS 条件

GC—MS 条件はⅢ—2—2と同じ

Ⅲ—4—(3)　結　果

得られたクロマトグラムをその物質の同定と共に図5に示す．いくつかの化合物が同定されたが，これらが全て水道水に由来するものであるかは不明である．たとえばモルフォリンはイオン交換樹脂からの Contamination である可能性が強い．本濃縮法のこの欠点はイオン交換樹脂の精製困難さにある．

Ⅳ　考　察

GC—MS を用いて飲料水中の未知有機物質を把握していこうという試みは最近急速に一般化してきた．この方法の困難さは試料の濃縮法とガスクロマトグラフィーの分離効率の悪さにあり，特に水道水のように清浄な水については困難さが大きい．

マススペクルメトリーは高感度ではあるが，GC—MS 導入により明確なスペクトルを得るためには 0.1 μg の試料が必要である．試料溶液 10 μl を投入するとして，試料溶液は最低 10 ppm の濃度をもたねばならないことになる．水道水は極めて不純物は少なく，フタル酸エステルの如き一般的な汚染物質でも数 ppb の order である．今実験計画として 1 ppb 以上含有されている有機物を追跡同定しようとすると（これは1日摂取量として 2 μg 程度に相当する），1万倍の濃縮が必要となる．この濃縮を操作上の汚染なくして行なわせることは極めて困難である．濃縮法として最も一般的な方法は吸着剤[1-2]を利用する方法と溶媒抽出法[3]である．

吸着剤としては，活性炭[1]，アルミナ，シリカゲル，イオン交換樹脂，合成高分子[2-4]などが知られている．実際例として報告されている例では，ジュネーブ湖の水を活性炭吸着により濃縮し GC—MS で70数種の有機物を同定している．この実験の Blank についての記述はない．著者らはこの方法を追試したが，実験は失敗した．すなわち Blank 実験で30数種の，Peak が確認され，実際の水道水を通して得られたクロマトグラムはこの他にわずかに 5 Peak しか確認されなかった．この操作上での汚染は主として活性炭からくるものと考えられたが，活性炭の精製は困難であった．

またわれわれのイオン交換樹脂を用いた濃縮法の結果も分析に不正確な情報を与えている．すなわちイオン交換樹脂の精製困難さから，得られたクロマトグラム上の Peak が水道水由来のものであるか，途中の汚染の結果であるかがはっきりしない．したがって吸着剤を用いて濃縮する場合，吸着剤の徹底的な精製が必要であり，これはしばしば最も困難である．また吸着剤は大気からも速やかに汚染物質を吸着していくので清浄な空気の実験室の設計が必要となる．

これに対して溶媒抽出法は溶媒が精製しやすいという利点がある．溶媒類は蒸留をくり返すことによりかなりきれいになる．たとえば特級エーテル中にはしばしば 10 ppm を超えるフタル酸ジブチルが含まれているが，ヴィグリュウ精留管をつけての1回蒸留により，100 ppb 以下にまた再蒸留により 0.1 ppb 程度にまで下げることができる．もう少し沸点の近い化合物の除去は困難になるが，1 ppb 以下に押えることは

多くの場合可能である．この種の汚染の影響は抽出溶媒の量を水の量に対して少なくすることにより低下させられ，水に1ppb以上含まれている物質はこの方法で濃縮できよう．この場合も大気成分からの混入は重要な問題であり，実験を精密化するためには完全な清浄空気室が必要である．

揮発性物質の同定のための基本的方法は本報で記述した方法でよいと思われる．本法において最も重要なことは，市販の窒素純ガスがかなり汚染されていることである．この汚染物質はドライアイス温度(−78°C)または液体酸素温度（−183°C）に冷却された活性炭層を通過させることにより取り除くことができる．

ガスクロマトグラフィーの分離能を上げることは特に中沸点化合物の検索には必要であった．今回の実験ではGCの分離の悪さのために有意義な結果は得られていない．今後キャピラリカラムを用いた実験が必要である．

同定された物質群の水質汚濁についての意味は現在のところ不明である．これらは今後一つ一つの各物質の定量実験を通じて明らかにされていくであろう．

付　記

（本研究は昭和48年，当研究所の研究課題「河川および井戸水中の有機物の分析法ならびにその含有量に関する研究」として実施したものである．本研究費の一部は研究企画調整室から載いたものである．

文　献

1) Grob, K. and Grob, G. : *J. Chromatogr.*, 62, 1—13 (1971)

2) Mieure, J. P. and Dietrich, M. W. : *J. Chromato. Sci.* 11, 559 (1973)

3) Hites, R. A. : *J. Chromato. Sci.* 11, 570 (1973)

4) Burnham, A. K., Calder, G. V., Fritz, J.S., Junk, G. A. Svec and H. J. vick, R. : *JAWWA* Nov, 722 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 399 — 403, 1974

河川水および井戸水中の有機物の分析法ならびにその含有量に関する研究「第Ⅲ報」—塩素化脂肪族炭化水素による環境汚染

森田昌敏* 中村 弘* 三村秀一*

An Investigation on Analytical Method and Evaluation of Organic Matters in River and Well Water (Part III) Environmental Pollution by Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons

MASATOSHI MORITA*, HIROSHI NAKAMURA* AND SHUICHI MIMURA*

Chlorinated aliphatic hydrocarbons were surveyed in several kinds of waters collected at Tokyo metropolitan area. A new convinient method was presented for the microanalysis of these materials. Tap water contained higher level of chloroform than its precurser. Chlorinated hydrocarbons were detected in the rain and snow falled in Tokyo area suggesting a close correlation between water pollution and air pollution.

Ⅰ 緒 論

前報において塩素系炭化水素類が比較的高濃度に水道水中に含有されていることが明らかになった．これらの物質の環境汚染の実態を明確にするため，東京都内の水，大気について分析を行なった．

Ⅱ 実 験

Ⅱ—1 試 薬

標準物質となるクロロホルム，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンはいずれも特級試薬をそのまま使用．溶媒のエーテルは特級試薬に $LiAlH_4$ を添加して再留．メタノールは特級試薬をそのまま使用．

Ⅱ—2 大気の分析

注射器に 5 ml の空気を吸入し，これを直接ガスクロマトグラフィーに打ち込む．検量線はクロロホルム，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンそれぞれ 0.1 $\mu l/l$ 含有せるエーテル溶液を作製し，これをＧＣに注入して作製した．

Ⅱ—3 水の分析

試水 5 μl または 10 μl をガスクロマトグラフィーに直接注入する．検量線は以下に述べる標準液を用いて作製した．

標準原液特級メタノールにクロロホルム，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンを溶かし，50 $\mu l/l$ の濃度の溶液を作製する．

標準液蒸留水をゆるやかに沸騰させ，ガスクロマトグラフィーに注入して，クロロホルム等に相当するピークがなくなったのを確かめた後 100 ml の酸素ビンにとり，冷蔵庫で冷却する．冷却後，これに 20 μl の標準原液をマイクロシリンジで注入し，ふたをしてよく振り混ぜあわせる．本溶液は 0.1 $\mu l/l$ のクロロホルム，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンを含有する．

Ⅱ—4 ガスクロマトグラフィー

ガスクロマトグラフィーは島津 4 BMPFE の機種を使用し，使用条件は以下の通り．

カラム	Tenax GC (60/80) 2 m×3 ϕ
カラム温度	135°
キャリヤーガス	N_2
流速	60 ml/min
	250°
検出器温度	250°

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

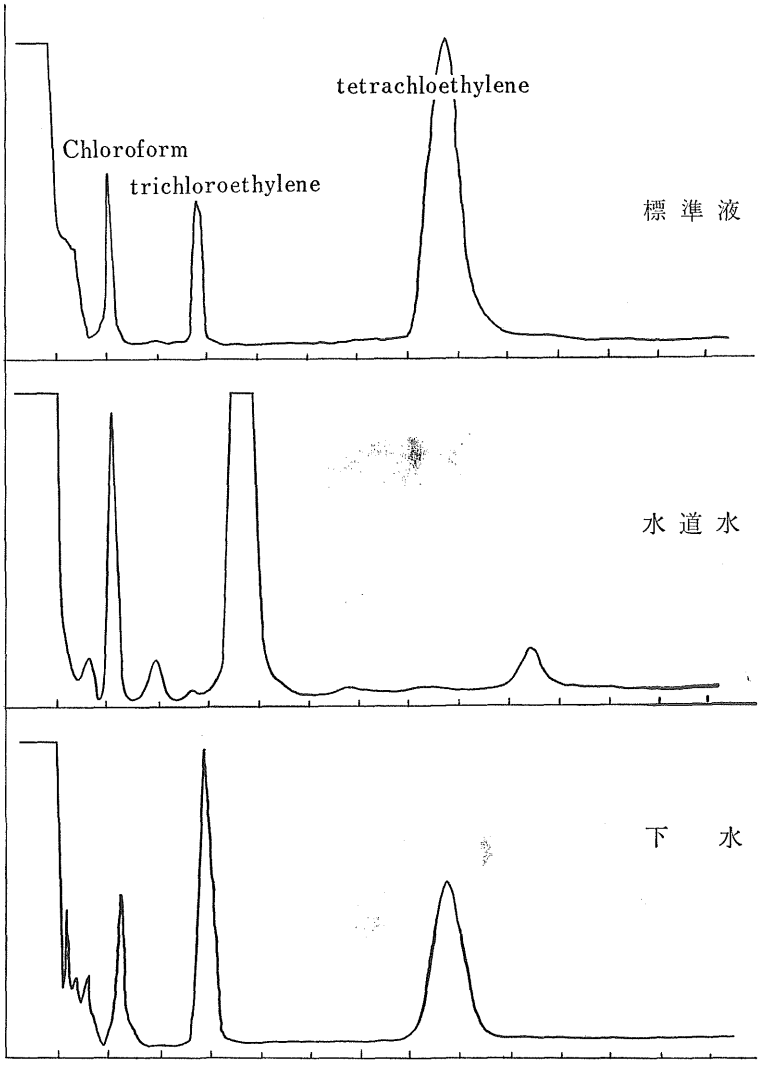


図1 水試料のガスクロマトグラム

検出器 Ni^{63} を用いた ECD
検出器感度 1×10^{2}
レコーダー速度 5 mm/min

Ⅲ 結果

図1に典型的なガスクロマトグラムを示す.

Ⅲ—1 大気試料

衛研戸外の大気は1974年2月で表1の結果を与えた. 一般的にはクロロホルムが高い値を示している.

Ⅲ—2 雨水, 雪

衛研の屋上に1973年10月から1974年3月までに降った雨および雪について分析した結果は表1に示されている. 都心に降った雨や雪の中に微量ではあるがクロロホルムが検出されたことは興味深い.

表1 空気, 雨水, 雪の中の塩素化炭化水素類
＊検出限界は各成分とも 1 $\mu l/l$

試料	クロロホルム	トリクロルエチレン	テトラクロルエチレン
空気 ($\mu g/m^3$)	6	2.3	1.2
雨水 ($\mu l/l$)	6	1	1
雪 ($\mu l/l$)	3	1	検出せず

Ⅲ—3 井戸水

井戸水の分析結果を表2に示す. 深井戸および非汚染地域の井戸水にはこれらの物質は検出されない. 浅井戸の多くからは雨水と同程度のクロロホルムが検出

表2　井戸水中の塩素化炭化水素類

井戸水	クロロホルム (μl/l)	トリクロルエチレン (μl/l)	テトラクロルエチレン (μl/l)
三宅島井戸水	検出せず	検出せず	検出せず
都心深井戸水	検出せず	検出せず	検出せず
都心浅井戸水	10	検出せず	検出せず
汚染井戸水	77	459	1220

された．工場の近辺の井戸からは極めて高い値がいくつか検出された．これらの場合，工場使用量の多いトリクロルエチレン，テトラクロルエチレンが異常値を示し，クロロホルムはほとんど変らなかった．またメチルクロロホルムの異常値を示し（1 ppm 以上）た井戸水（メッキ工場付近）もあった．

Ⅲ—4 河川水

多摩川の3地点での水の分析結果を表3に示す．上

表3　多摩川の河川水中の塩素化炭化水素

地点	クロロホルム (μl/l)	トリクロエチレン (μl/l)	テトラクロルエチレン (μl/l)
大丹波	1	1	検出せず
是政	11	11	8
関戸	6	6	4

流では水は大変清浄であるが是政橋，関戸橋付近ではかなり汚染されてきていることがわかる．

Ⅲ—5 水道水（家庭蛇口水）

地下水系水道水からは未検出．都水道局供給の他の蛇口水からはかなり高濃度のクロロホルムが検出された．（表4）トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンの濃度は最大 2 μl/l であり，河川水の汚染に比較して，かなり低い値である．

表4　水道水中の塩素化炭化水素

水系別	クロロホルム (μl/l)	トリクロルエチレン (μl/l)	テトラクロルエチレン (μl/l)
地下水系	検出せず	検出せず	検出せず
K浄水場系	79	〃	1
H　〃	56	〃	1
A　〃	90	〃	検出せず
N　〃	50	〃	2
平均	41	〃	1

Ⅲ—6 下水

都内各下水処理場の流入下水と処理下水中の塩素系溶剤についても調査した．（表5）処理下水中の含有

表5　下水中の塩素化炭化水素

下水の種類	クロロホルム (μl/l)	トリクロルエチレン (μl/l)	テトラクロルエチレン (μl/l)
S処理場生下水	24	10	9
S……処理水	13	検出せず	6
U……生下水	39	15	26
U……処理・	24	21	4
M……生下水	39	12	4
M……処理水	43	6	5

量は処理前に比べて減少しており，これは特にテトラクロルエチレン，トリクロルエチレンについて著しかった．

Ⅳ 考察

塩素化炭化水素溶剤の生産高は1972年度においてクロロホルム1.5万トン，トリクロルエチレン11万トン，テトラクロルエチレン8万トンであり，この他にメチルクロロホルム，四塩化炭素，塩化メチレン，ジクロルエタン等が総計10万トン以上生産されている．これらの溶剤類は溶剤を使用する労働者に健康阻害の影響を与え，第Ⅰ種の有機溶媒として分類せられている．

比較的高濃度の汚染による生物影響については多数の報告[1~21]がある．低濃度の生物影響についても抗体産生の観点[22~23]から，あるいは新生動物への影響[24]という観点から検討されている．またこれらの化合物の代謝や排出についてもよく調べられており，ヒトについての報告も多い[25~27]．更にまた工場での暴露による実際の症例も報告されている[28~29]．これらの毒性から労働衛生上の基準が設定されており，その規制値は引き下げられる傾向にある．

労働環境の問題からはなれて，これらの溶剤が環境汚染物質として認識されはじめたのは極く最近のことである．1973年に Lovelock[30] および Murray[31] 等により独立にこれら溶剤が全世界的に拡散した汚染物質であることが明らかにされた．彼等の成果が非汚染地域においても検出可能であったという点にあったのに対し本研究の成果は都市環境においてどのような汚染形態をもつかを明らかにしたことにある．

都市環境中において，これらの溶剤は大小の工場から排出され，大気，水，生物体の中で見いだされる．この分布形態を模式的にかくと図2のようになる．これらの分布形態に関する知識は完全なものではないので，現在太田氏により大気が，人体組織については森田が調査を続行中である．

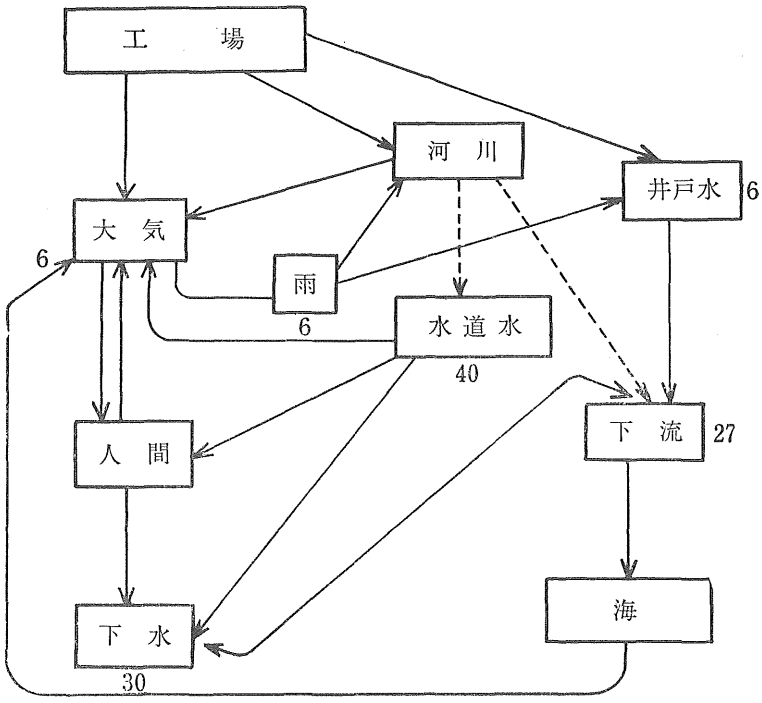


図2　クロロホルムの都市における分布
単位：$\mu l/m^3$（空気）　$\mu l/l$（水）

これ等溶剤類の東京都における濃度は十分低く，その生理学的意義はほとんどないように思われる．Krasovitskaya 等は大気汚染物質としてトリクロルエチレンの空気中の一日最大許容濃度を 1 mg/m³ とするよう提案している．現実の東京の空気はこの値の 1/100 以下の濃度しか含んでいない．またソ連の規準によれば飲料水は 5 ppm 以上の四塩化炭素を含んではならないことになっているが，実際の東京都の水道水中には四塩化炭素は検出されないし，またそれより毒性の低いクロロホルムにしても最大 0.1 ppm 程度であり，事実上単独では無害といってよかろう．もちろん，複合汚染の一構成物として考えたときには，この濃度でも生理的な影響をもつ可能性は否定できない．

水の分析を通じて興味深い第一点は，大気汚染と水質汚濁の密接な関連性である．雨水も都心の雨水は高濃度に汚染されている．第二点は，水道水において特にクロロホルム濃度が高いことである．この原因としては，殺菌用に添加された塩素が溶存有機物と反応してクロロホルムを生成することが考えられる．

この機構については，したしながらまだ明解にはされていない．

井戸水の一部に異常に高い値を示すものが見られたが，工場排出物からの直接的な汚染の結果によるものとみなされる．このような汚染の場合，数 ppm 以上の汚染になるのもまれではないだけに，飲料水の適否の検査として独自の調査の必要もあろう．この場合，臭気が感じられる場合もあるので，官能試験が重要なチェックポイントとなる．

環境中でのこれらの化合物の分解については完全に明らかになっていない．空気中の成分はおそらく紫外線により分解をうけるであろう．われわれの下水処理場での分析結果は，トリクロルエチレン，テトラクロルエチレンが活性汚泥により分解されることを暗示している．したがって生物による分解も大きな役割を果しているかもしれない．

他　記

本研究は，昭和48年当研究所における研究課題「河川および井戸水中の有機物の分析法ならびに含有量に関する研究」として実施したものである．なお，研究企画調整室から研究費の一部を負担して載きました．

文　献

1) Borghetti, A and Ferdinando, G. : *G. Clin. Med.* 1969, 50(6), 464—87

2) Georgescu : *Ileana* 1969, 20(6), 425—6
3) Stepanishuili, V. G. : *Sist. Vedineya Pchelovod Razlichnykh Prir-Klim Zonakh*, 1968, 196—203
4) Biagio., Nistco, G., Fongi, S., Pengue, L. and Marzano, G. : *Lav. Um.*, 19(12), 78—81 (1967)
5) Gehring, P. J. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 13(3), 287—98(1968)
6) Stewart, R. D. : *Ann. Occup. Hyg.* : 11 (2), 71—9, (1968)
7) Osanai, H. : 労働科学 43(10), 567—84, (1967)
8) Winters, W. D. : *Recent Adv. Biol. Psychiay.*, 9, 313—45, (1966)
9) Stopps, G. J. and Malaughlin. M. : *Amer. Ind. Hyg. Ass. J.*, 28(1), 43—50, (1967)
10) Raymond, F. B. and Kenny, G. E, : *Anesthetiology*, 29(3), 505—16, (1968)
11) Clnuberg, G. : *Aneasthesist* 19(10), 387—92, (1970)
12) Bartonicek, V. J. and Brun, A. : *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, 28(5), 359—69, (1970)
13) Horton, J. N. : Sussman, M. and Mushin, W. W. : *Bri. J. Anaesth.*, 42(6), 483—7(1970)
14) Lee, B. B. : *J. Physiol.* 1970, 207, 74—75
15) 池田敏子：医学と生物学 79(3), 123—9, (1967)
16) Boettler, E. A. and Muranko, H. J. : *Amer. Ind. Hyg. Asso, J.*, 30(5), 437—42, (1969)
17) Smyth, H. F. Jr., Carpenter, C. P., Weil, C. S., Pozzani, U. C., Striegel, J. A. and Nyccum, T. S. : *Amer. Ind. Hyg. Ass. J.*, 30 (5), 470—6, (1966)
18) Toda, O. : *J. Sci. Labour*, Part 2, (1969)
19) Noji, T. : 横浜医学 21(2), 173—186, (1970)
20) Salvini, M., Binaschi. S, and Riva. M. : *Brit. J. Ind. Med.*, 28(3), 286—92, (1971)
21) Kramer, M. F. : *Biochem. Phermacol.* 21(4) 441—7, (1972)
22) Shmuter, L. M. : *Gig. Sanit.* 37(2), 36—40, (1972)
23) Fonzi. S. and Pengue, L. : *Lav. Um.*, 19 (12), 111—17, (1967)
24) Beppu, K. 慶応医学 17, 81—107, (1968)
25) Sukhanova, V. A. and Burdygina, M. Y. : *Gig. Tr. Prof. Zabol.* 15(7), 52—3, (1971)
26) Karel, B. and Ruzena, J. : *Proc. Lekl*, 22 (7), 233—41, (1970)
27) 多田 治 労働研究 45(10), 588—93 (1969)
28) Lilis. R., Stanescu, D., Muica, N. and Roventa, A. : *Med. Lav.* 60(10), 595—601, (1969)
29) Richard, W. C., Esther, B. and Tomas, M. H. : *J. Occup. Med.* 12(1), 1—5, (1970)
30) Lovelock, J. E., Maggs, R. J. and Wade, W. E. : *Nature*, 241, 194—196, (1973)
31) Murray, A. J. and Riley, J. B. : *Nature*,242, 37—38 (1973)
32) Krasovitskaya, M. L. and Malyarova, L. K. : *Gig. Sanit.*, 33(5), 7—10, (1968)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 405 — 409, 1974

水中の極微量水銀の除去法に関する研究

高橋保雄* 森田昌敏* 山崎堅吉* 三村秀一*

Studies on Removal Extremely Low Mercury in Water

YASUO TAKAHASHI*, MASATOSHI MORITA*, KENKICHI YAMAZAKI* AND SHUICHI MIMURA*

For the removal of extremely low mercury in water, a new methed, adsorption by mercaptance coated on porous beads, was investigated and compared with a conventional procedure using chelating resins.

Removal experiments were undertaken on the combination of several mercaptanes involving lauryl melcaptane, dithizone and thiocrsol and several kinds of retainers involving celite 545, acid washed celite 545, alumina and silica gel. The highest adsorption capacity was obtained in the system of laurymercaptane and celite 545 washed with concentrated sulfuric acid which capacity was about one half of that of chelating resin. Since this system is fairly cheap, it seemed to be comparable to chelating resin in commercial base.

1. 緒　言

水銀含有濃度の比較的高い（2～10 ppm）の廃水の水銀除去について，多数の報告がある．これらの除去法としては硫化水素を用いた沈殿法，電気透析法，生物処理法，凝集沈殿法，活性炭，イオン交換樹脂等による吸着法などがあり，大体数＋ppb 程度にまで水銀含有濃度を除去することができる．しかしながら，2 ppm 以下の水銀濃度の処理法としては適当な方法が少なく，実際に使用されている方法としてはキレート樹脂，ジチゾン吸着活性炭などによる吸着法が利用されており，この他の吸着剤としてジチゾン類似構造をもつ水銀吸着樹脂，熊本大学の開発したセルローズにチオール基を導入したもの，スウェーデンで開発されたQ—13(パルプ廃液をフェノール樹脂で固めたもの)などが知られている．これらの吸着剤は一般に高価であったり，また処理能が不十分であったりして，その工業的な利用価値はキレート樹脂に比較し劣っている．

そこで筆者等は比較的安価な吸着剤として，水に不溶性のチオールを担体にコーティングしたものを作製し，その処理能力をキレート樹脂と比較検討したので報告する．

2. 実　験

(1) 試　薬

セライト545（和光純薬），アルミナ（薄層用 300 メッシュ和光純薬），シリカゲル（ワコーゲル100～200 メッシュ和光純薬），リン酸一水素ナトリウム，リン酸二水素ナトリウム，水酸化ナトリウム，硫酸銅，硫酸第一スズ，硫酸，過マンガン酸カリウム，塩化第一スズ．クロロホルム，塩化パラフィン以上いずれも特級，*n*-ヘキサン（残農用），ジチゾン（特級），ラウリルメルカプタン，チオクレゾール

(2) 機　器

島津高感度水銀分析計 UV—201

ダイヤフラムポンプ

(3) 吸着剤の作製

(3)—1　セライト545と吸着剤

セライト545を 10 g 濃硫酸 250 m*l* に溶かし，約 2 時間直火で加熱し，冷却後中性になるまで蒸留水で洗

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

浄，凍結乾燥する．以下これを硫酸処理セライト 545 と略す．一方，ただ蒸留水 3 l で洗浄，凍結乾燥する．以下これを無処理セライト545と略す．

(3)-2 ラウリルメルカプタンをコーティングした吸着剤

ラウリルメルカプタン 1 ml を n-ヘキサン 100 ml に溶解し，担体10 g を入れ，2～3 時間放置し，エバポレーターでヘキサンを除去し，密栓し，光を遮断し，デシケーターに保存した．このようにしてラウリルメルカプタンを硫酸処理セライト 545，無処理セライト545，シリカゲル，アルミナにコーティングした吸着剤を作製した．

(3)—3 ジチゾンをコーティグした吸着剤

ジチゾン 1 g をクロロホルム約 200 ml に溶かし，更に塩化パラフィンを適当量溶かし，硫酸処理セライト545を 10 g 入れ，攪拌し，これを一晩湯せんに入れ乾燥させ，光を遮断し保存した．

(3)-4 吸着等温線の作製

吸着等温線はバッチ法で測定した．すなわち，おのおのの所定濃度の水銀溶液 100 ml を共栓三角フラスコに作り，pH はリン酸緩衝液注)（pH 6.8）で調節した．おのおの溶液に吸着剤（乾燥重量） 100 mg を入れ，水流ポンプで吸引しても気泡が生じないので吸引は省略し，密栓し，光を遮断し，平衡に達するまで随時振とうし，恒温槽（20°C）に 3～4 日間放置した．そして，ロ紙で溶液と吸着剤とをロ過分離し，溶液について疎解し，水銀濃度を還元気化法で測定した．それから，平衡吸着量 Hg mg／乾燥重量 g－吸着剤を求めた．

この実験での平衡に達する時間のチェックはある濃度の溶液について，振とう，放置日数等を変化させて同一の値を得れば，平衡に達していると見なした．

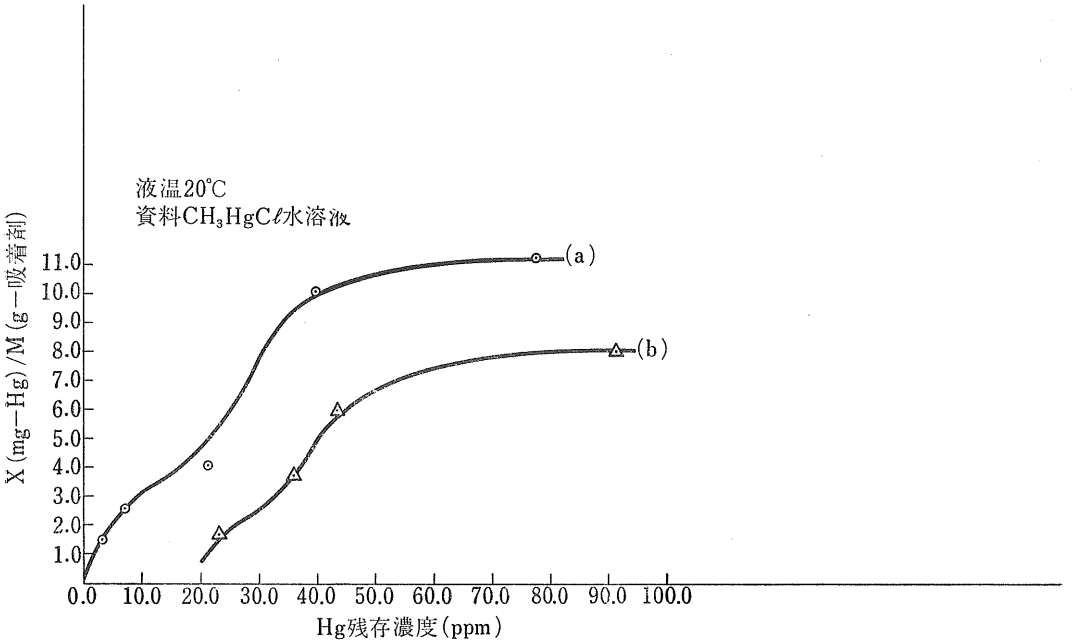
吸着剤の粒径の違いは，平衡吸着量に無関係であるという報告がある[1]．

また，希薄な水銀溶液は放置するだけで，水銀濃度が低下する[2,3]という報告があるが，実際に 1 ppm の水銀溶液を 4 日間放置した実験では．水銀濃度の低下は見られなかった．したがって，4 日間放置は水銀濃度の低下がないと見なし，実験を行なった．

注）緩衝液はリン酸一水素ナトリウム，リン酸二水素ナトリウムを等グラム等量ずつ混合し，共栓三角フラスコにそれぞれが0.06グラム等量／100 ml になるように入れた．リン酸緩衝液は原子吸光法（すなわち，還元気化法）を妨害しなかった．

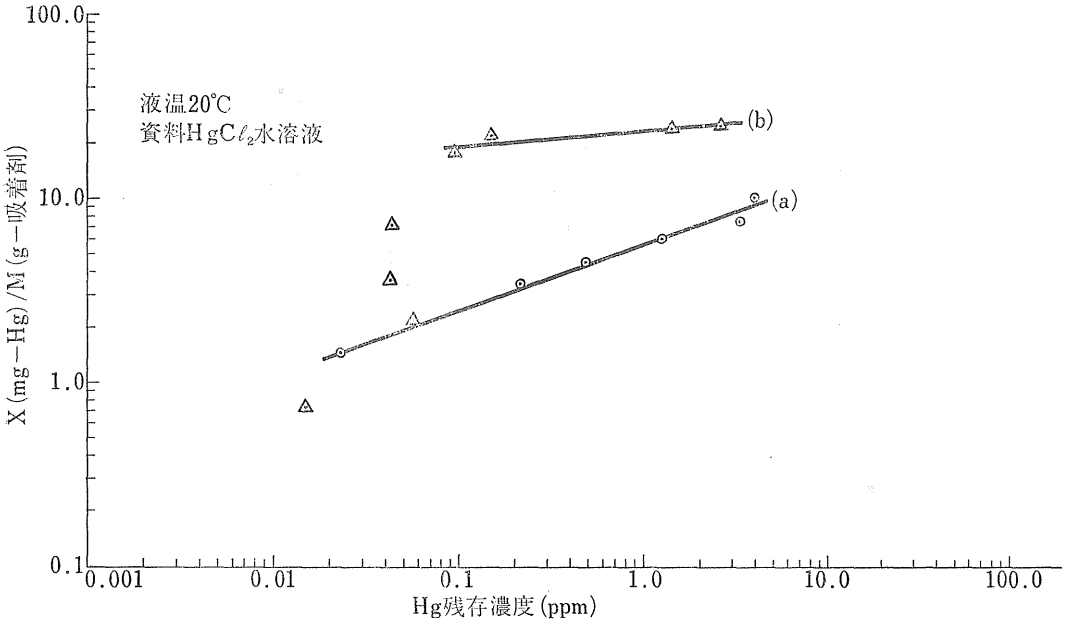
3. 結　果

（1） 吸着液相として三つの硫黄化合物（チオクレ



チオクレゾールをコーティングした吸着剤の塩化メチル水銀水溶液との平衡曲線。
⊙(a)平衡に達するまでの時間(4日間)放置　この間光をしゃへいした。
△(b)平衡に達するまでの時間(4日間)放置　この間光をしゃへいしなかった。

図1　チオクレゾールの光分解性についての吸着等温線による比較



⊙(a)ジチゾンをコーティングした硫酸処理セライト545の塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
△(b)ジチゾンをコーティングした硫酸処理セライト545の緩衝液(PH6.8)を添加した塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。

図2　硫酸処理セライト545にジチゾンをコーティングした吸着剤の吸着等温線

ゾール，ジチゾン，ラウリルメルカプタン）を選んだ．これらの化合物はいずれも水銀と強い共有結合を作る．チオクレゾールは光分解を受けやすく，平衡に達するまでの間（4日間），光を遮断しないと吸着容量は半分以下となった．ジチゾン錯体は比較的水に溶けやすく，溶液は橙色に着色（色度50～300）する．したがって，低濃度水銀溶液の吸着容量は非常に小さい．

（2）　したがって，吸着液相として最も良好であったのはラウリルメルカプタンであった．塩化第二水銀はラウリルメルカプタンと反応して次のような錯体を生成した．

$$2\,C_{12}H_{25}SH + HgCl_2 \longrightarrow C_{12}H_{25}S{-}Hg{-}SC_{12}H_{25}\ (\text{白色沈殿})$$

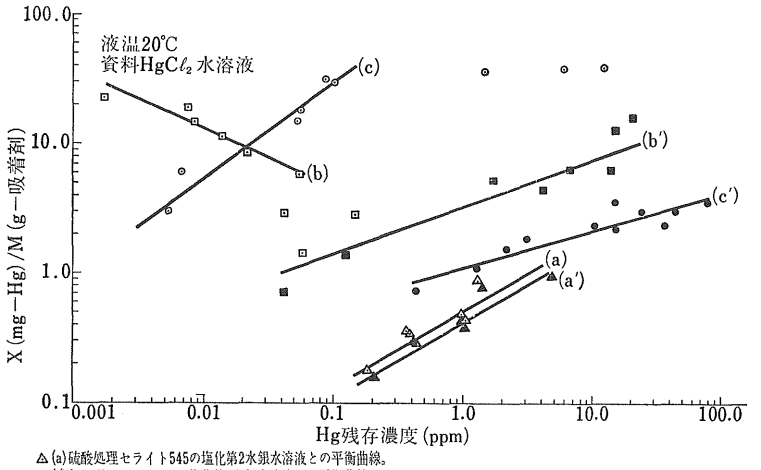
なお，使用したメルカプタンはC—12に中心をもつアルキルメルカプタンの混合物であり，単一の結晶として得られなかった．

（3）　ラウリルメルカプタンを吸着液相としたときの担体としてのセライト545の処理の有無，pHの影響を調べた．セライト545自体でも僅かな吸着能を示すが，ラウリルメルカプタンのコーティングにより吸着能は飛躍的に増大した．また，セライト545はあらかじめ硫酸処理をしておいた方が明らかに高い吸着能を示した．図3の(b)の吸着等温線は異常な勾配を示しているが，現在のところその理由は不明である．

（4）　ラウリルメルカプタンを吸着液相とし，担体をいくつか変えて吸着等温線を作製した．最も良好な担体は図3，図4より硫酸処理セライト545であった．比較のためキレート樹脂の吸着等温線を示してある[4]．キレート樹脂の1/8～1/2の吸着容量を示している．

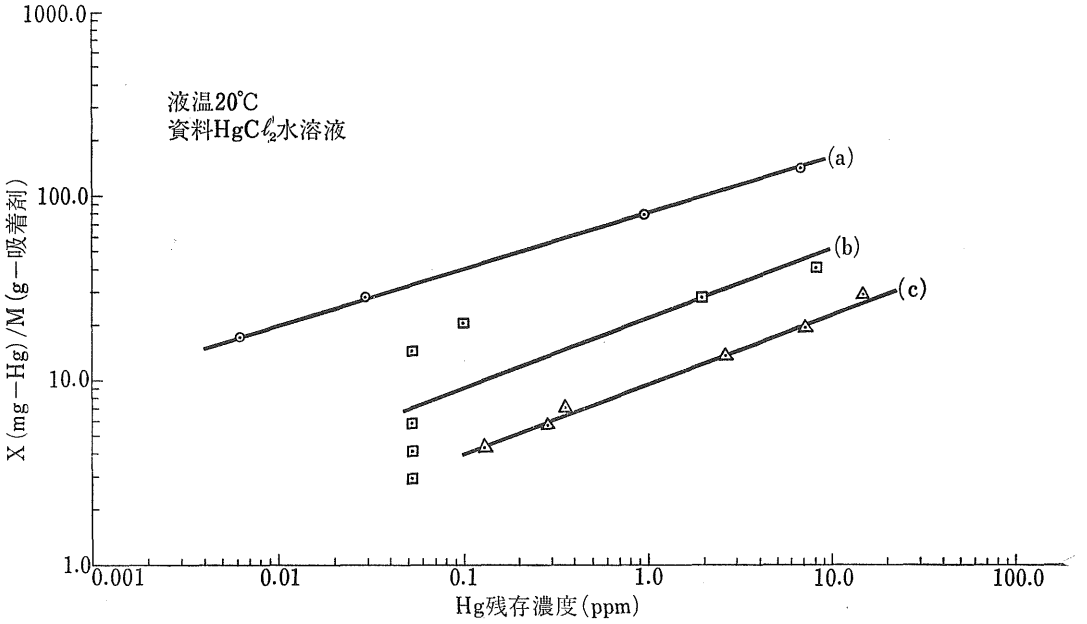
4. 考　察

S—H原子団を持つ化合物が重金属，特に親銅元素に対し強い親和力を有することは既知の事実である．生成した錯化合物は通常難溶性であり，したがって，これらの硫黄化合物を水銀イオン沈殿剤として利用することができる．したし，一般に工業的な処理として，濾過（バッチ法）は不利な単位操作であり，流通法で取り除くほうが有利である．本研究は液体のメルカプタンをコーティングした吸着剤を作製することによ



△(a)硫酸処理セライト545の塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
▲(a)無処理セライト545の塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
⊡(b)ラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト545の塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
■(b)ラウリルメルカプタンをコーティングした無処理セライト545の塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
⊙(c)ラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト545の緩衝液(PH6.8)を添加した塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
●(c)ラウリルメルカプタンをコーティングした無処理セライト545の緩衝液(PH6.8)を添加した塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。

図3　セライト545についての吸着等温線による比較



⊙(a)キレート樹脂の緩衝液を添加した塩化第2水銀溶液との平衡曲線。
⊡(b)ラウリルメルカプタンをコーティングしたシリカゲルの緩衝液(PH6.8)を添加した塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。
△(c)ラウリルメルカプタンをコーティングしたアルミナの緩衝液(PH6.8)を添加した塩化第2水銀水溶液との平衡曲線。

図4　各種担体にラウリルメルカプタンをコーティングした吸着剤の吸着等温線による比較

り，流通法で水銀が除去できないかを検討したものである．吸着現象の動的な研究を行なっていないが，平衡論的に得られた吸着剤はキレート樹脂の $1/8$～$1/2$ 程度の性能のものであった．

ラウリルメルカプタンは塩化第二水銀と反応し以下の化学平衡にある．

$$2\,C_{12}H_{25}SH+HgCl_2 \rightleftarrows (C_{12}H_{25}S)_2Hg+2\,HCl$$

反応により生成した塩酸は pH を下げる．実際に緩衝液を添加しないとき，pH は6.8から 4.1～5.0 付近まで下る．メルカプチド生成のためにはメルカプタンの有効な解離が必要であり，pH は高い程有利である．しかし，図3の(b′)，(c′)の吸着等温線では緩衝液 (pH 6.8)を添加したほうが吸着容量が小さくなっている．これは緩衝液のナトリウムイオンと水銀イオンのメルカプタンへの競合反応の影響のためである．したがって，緩衝液の添加量も考慮せねばならない．

担体を変えた場合に吸着容量が変化する理由は不明である．セライト 545 の場合，硫酸処理により吸着容量が大きくなる．これはセライト 545 中に含有される他の重金属（たとえば鉄イオン）が除去されるためであるかもしれない．担体としての良否は硫酸処理セライト545＞シリカゲル＞アルミナ＞無処理セライト545の順であった．

キレート樹脂とラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト 545 の比較を表1に示す．ラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト 545 は価格，吸着能を勘案すればキレート樹脂にせまるものであろう．今後，物質移動係数，分離係数等を測定することにより，その有効性を確かめていきたいと考えている．

表1　キレート樹脂とラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト545の比較

吸着剤 ＼ 塩化第2水銀水溶液	キレート樹脂	ラウリルメルカプタンをコーティングした硫酸処理セライト545
吸着容量 mg-Hg/g-吸着剤	10～110	2～40
除去対象濃度 ppm	0.001～	0.003～
ラングシュア吸着剤の度合	20	30
再生	不能	不能
フロインドリッヒ吸着剤に関する定数	0.286	0.567
通液法[5]	容易	かなり容易
臭気	無	有（悪臭）
価格 kg—吸着剤の価格	キレート樹脂 2,500円/l	ラウリルメルカプタン 2000円/l セライト 100円/kg 担体処理費 30円/kg
	約4,000円	約600円

付記

（本研究は，昭和48年度当研究所研究課題「公害に関する調査研空」の一環として，実施したものである）

文献

1) 浦野紘平，清浦雷作：工化，73，1921—1927 (1970)
2) Cyrus, F.: *Anal. Chem.*, 46, 99—102(1974)
3) Robert, V. C. and James, A.C.: *Anal. Chem.*, 44, 1093—1096 (1972)
4) 鈴木千秋：環境公害文献集，5，8—10(1973)，日本科学技術情報センター
5) 河添邦太郎：「吸着」新化学工業講座 Ⅳ—36，(1958)，日刊工業

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 411 — 416, 1974

下水処理場における PCB, PCT の汚染調査

小輪瀬勉* 土屋悦輝* 岡本 寛*
山崎堅吉* 三村秀一*

Research on Pollution with Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Terphenyls in Sewage Plants.

TSUTOMU KOWASE*, YOSHITERU TSUCHIYA*, YUTAKA OKAMOTO*
KENKICHI YAMAZAKI* AND SHUICHI MIMURA*

PCBs, PCTs and coprostanol in influents, effluents and activated sludges of some sewage plants were examined in order to reveal the environmental pollutant levels. The results were as follows ; PCBs was detected in all the above-mentioned materials. Especially, the maximum value of PCBs was detected in Ukima plant where industrial waste water is treated.

As for PCTs, it was detected in influents and activated sludges, but not in effluents. The PCTs/PCBs ratio in activated sludges obtained the average value of 1/17. The correlation between coprostanol and PCBs couldn't be shown, but a very slight correlation between coprostanol and PCTs could be shown.

1. 緒 言

有機塩素系化合物による広範囲な環境汚染が指摘されている今日，中でもポリ塩化ビフェニール（以下PCBと略す）は，主として閉鎖系に用いられ，使用工場附近の河川，底質[1]，魚類[2]および鳥類[3]等から比較的高値が検出され報告されている．また PCB と同族の化合物である，ポリ塩化ターフェニール（以下PCTと略す）は，その用途は，工場製品[4]，および家庭用品[5]などに多く，その使用方法も開放系においても広く用いられ，人体脂肪中[6]，血液中から比較的高値が検出された報告があるが，魚，鳥[7]等からはほとんど検出されていない．今回筆者らは，これらの物質の環境汚染調査，ならびに，汚染経路について解明するために，家庭排水，工場排水など各種排水の処理を行なっている都内各下水処理場における流入生下水，放流水，活性汚泥中の PCB, PCT 濃度を測定し，特に家庭排水と関係ある動物排泄物中に含まれるコレステロールの代謝物，コプロスタノール[8,9]の濃度（活性汚泥のみ）を測定し，PCB, PCT との相関性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
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

2. 実験方法

(1) 試 料

都内の下水処理場，Fig. 1に示す7ヵ所を選び，ここの流入生下水，放流水，活性汚泥をガラスビンに採取し試料とした．

(2) 試 薬

1) *n*-ヘキサン （PCB分析用）
2) アセトン （〃）
3) 無水硫酸ナトリウム （〃）
4) 水酸化カリウム （試薬特級）
5) エチルアルコール （残留農薬試験用）
6) 水酸化カリウムのエチルアルコール溶液（1M）：水酸化カリウム 70 g をエチルアルコールに溶かし全量を1 *l* とする．
7) フロリジル （PR）

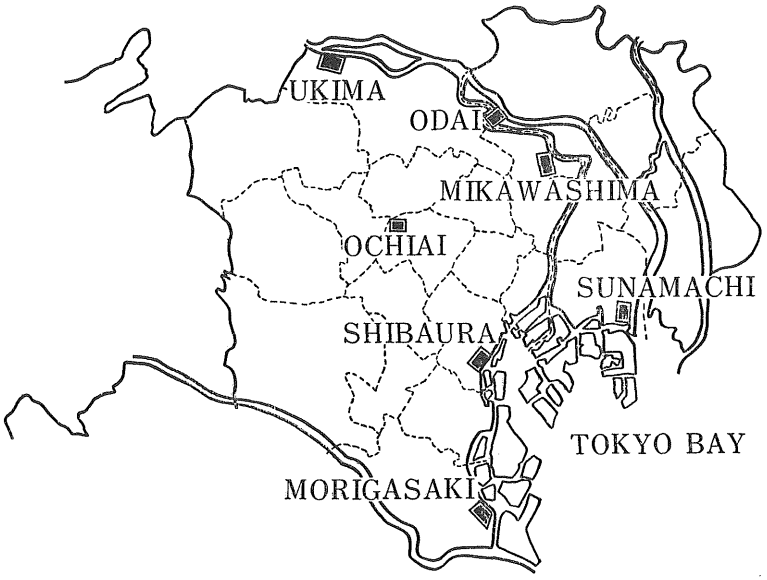


Fig. 1 The Distribution Map of Sewage Plants

8) ベンゼン (PCB分析用)
9) 酢酸エチルエステル (残留農薬試験用)
10) PCB 標準液：カネクロール (以下 KC と略す) KC—300, KC—400, KC—500, KC—600 の各標準品 1 mg を *n*-ヘキサンに溶かし全量を 1 *l* とする．(必要に応じ適宜希釈する)
11) PCT 標準液：KC—C の標準品 1 mg を *n*-ヘキサンに溶かし全量を 1 *l* とする．(必要に応じ適宜希釈する)
12) コプロスタノール標準液：5 β-cholestan-3 β-0 *l* の標準品 1 mg を *n*-ヘキサンに溶かし 1 *l* とする．

(3) 試料の前処理

(3)—1 PCB, PCT 測定用試料の前処理

生下水，処理水は，5 *l* を分液ロートに入れ，*n*-ヘキサン200m*l* また，必要に応じアセトン 200 m*l* を加え，30分間振とう抽出を行なう，この操作を 2 回行ない抽出液を分取し，無水硫酸ナトリウムで脱水した後，クデルナダニッシュ濃縮器 (以下K．Dと略す) に入れ，沸とう水浴中で 5 m*l* 以下に濃縮する．濃縮液は 300 m*l* の丸底フラスコに入れ，水酸化カリウムのエチルアルコール溶液(1M) 100 m*l* を加え，還流冷却器を付けて水浴上で 1 時間アルカリ分解を行なう．分解液は 50°まで冷却しついで 300 m*l* の分液ロートに移し，フラスコ内を *n*-ヘキサンエタノール(1 : 1)溶液20 m*l* を用いて洗い，分液ロートに入れ，さらに水25 m*l* を加えて振り混ぜる，しばらく静置した後，下層を別の分液ロートに移し，再び *n*-ヘキサン 50 m*l* で振とう抽出する．上記同様な操作を 2 回くり返し，各 *n*-ヘキサン抽出液をあらかじめ *n*-ヘキサンで洗浄した水 100 m*l* ずつで 3 回洗う，ついで *n*-ヘキサン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後，K.D で 5 m*l* 以下に濃縮する．

活性汚泥は遠心分離 (3,000 rpm) した後，その30～50 g を丸底フラスコに入れ，水酸化カリウムのエチルアルコール溶液 (1 M) 100 m*l* を加え，上記同様に分解および前処理を行なった後に，抽出液は，無水硫酸ナトリウムで，脱水し，K.D で 5 m*l* 以下に濃縮する．(別に試料を同量取り，風乾して乾燥重量を求める)

(3)—2 コプロスタノール測定用試料の前処理

活性汚泥は遠心分離 (3,000 rpm) した後，その50 g を 500 m*l* の丸底フラスコに入れ，水 30 m*l*，エチルアルコール150 m*l*，水酸化カリウム10 g を加えて，還流冷却器を付け，水浴上で 5 時間アルカリ分解を行なう．分解液は上記と同様の操作で処理し，抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水した後，K.D で 5 m*l* 以下に濃縮する．(別に試料と同量を取り，風乾した後，乾燥重量を求める)

(4) クリンアップ

内径 1 cm，高さ 30 cm のカラムクロマト管にフロリジル (130°，13時間活性化) 5 g を，*n*-ヘキサン

と共に気泡が入らないように充塡しその上部に，無水硫酸ナトリウムを 1 cm の高さにつめ，カラムを 25 m*l* の *n*-ヘキサンで洗浄する．

(4)—1 PCB, PCT

流入生下水，放流水，活性汚泥とも，(3)—1で得た濃縮液を，上記のカラムに入れ，*n*-ヘキサンを展開溶剤として毎秒2滴の割合で溶出をおこない，はじめの 5 m*l* を捨て，次の溶出液 80 m*l* を分取し 5 m*l* 以下に濃縮する．

(4)—2 コプロスタノール

上記のカラムに2の(3)の(2)で得た濃縮液を入れ毎秒2滴の割合で *n*-ヘキサン 100 m*l*，ベンゼン 80 m*l* を流した後，ベンゼン 20 m*l*，酢酸エチルエステル 75 m*l* でコプロスタノールを溶出し濃縮する．

(5) ガスクロマトグラフの分析操作および条件

(5)—1 操 作

(4)—1,2 で得た濃縮液の適量 (1～10 μl) をマイクロシリンジを用いてガスクロマトグラフに注入し，同一のガスクロマトグラフ操作条件下で得られた，PCB PCT，コプロスタノールの標準液のパターンと比較して相似性があるかを確認する．

試料より抽出した PCT と KC—C のパターンを

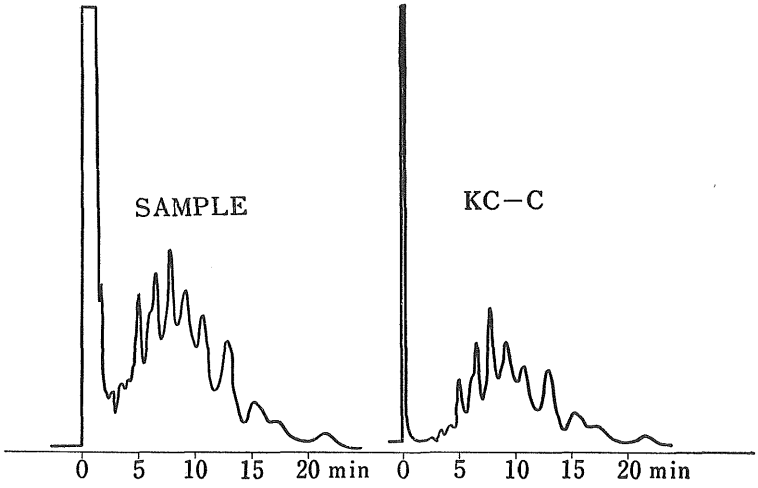


Chart. 1 Gas chromatograms of Polychlorinated Terphnyls

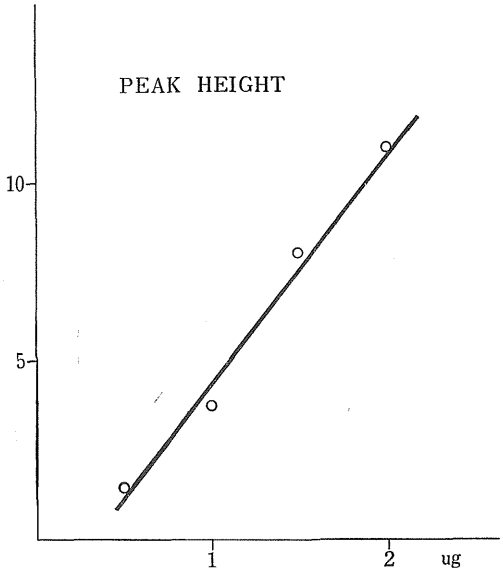


Fig. 2 Calibration Curve of Polychlorinated Terphnyls

Char. 1に示した.

(5)—2 ガスクロマトグラフの条件

PCB：検出器：ECD^{3}H，カラム：1.95% QF—1+1.5%OV—17，1.0 m，カラム温度：190°

PCT：検出器：ECD^{63}Ni，カラム：2%SE—30，1.2 m，カラム温度：245°

コプロスタノール：検出器：FID，カラム：5%SE—30，1.5 m，カラム温度：235°

(6) 定量法

(6)—1 PCB：PCB標準液を適当に組合せ（今回の調査の平均組合せ，KC—300：KC—400：KC—500：KC—600＝5：11：6：1）試料と類似のパターンを求めピークの高さの総和あるいは面積の総和から検量線を作成し測定する．なお検出限界は，流入生下水，放流水とも0.02 ppb 活性汚泥は 0.01 ppm である．

(6)—2 PCT：PCT 標準液のピークの高さあるいは面積の総和から検量線を作成し測定する．ピークの高さからの検量線を Fig. 2 に示した．検出限界は，流入生下水，放流水とも 0.02 ppb 活性汚泥は 0.01 ppm である．

(6)—3 コプロスタノール

コプロスタノール標準液のピークの高さから検量線を作成し測定する．

Table. 1 Concentration of PCBs and PCTs in Sewage Plants

PLACE		PCB	PCT
OCHIAI	influent	0.30 ppb	0.02 ppb
	effluent	0.03 〃	ND
	sludge	1.32 ppm	0.14 ppm
SUNAMA-CHI	influent	0.47 ppb	Tr
	effluent	0.02 〃	ND
	sludge	3.01 ppm	0.09 ppm
ODAI	influent	0.40 ppb	0.02 ppb
	effluent	0.07 〃	ND
	sludge	11.50 ppm	0.19 ppm
MIKAWA-SHIMA	influent	0.22 ppb	Tr
	effluent	Tr	ND
	sludge	0.88 ppm	0.17 ppm
UKIMA	influent	9.60 ppb	0.26 ppb
	effluent	0.84 〃	ND
	sludge	13.84 ppm	0.11 ppm
SHIBAU-RA	influent	0.26 ppb	Tr
	effluent	0.04 〃	ND
	sludge	10.04 ppm	0.23 ppm
MORIGA-SAKI	influent	0.26 ppb	0.02 ppb
	effluent	0.02 〃	ND
	sludge	3.88 ppm	0.15 ppm

3. 結果および考察

(1) PCB 濃度の測定結果は Table. 1 に示す如くである．すなわち，流入生下水は 0.22～9.60 ppb，放流水は Trace～0.84 ppb，活性汚泥は 0.88～13.84 ppm の範囲に検出された．各処理場の有意差では，浮間処理場が，各試料ともに最高値を示している．これは，本処理場が工場排水を主体に処理している特殊性によるものと考えられる．

(2) PCT 濃度の測定結果は Table. 1 に示す如くである．すなわち流入生下水では，Trace～0.26 ppb，放流水では全部が検出限界以下，活性汚泥は 0.09～0.23 ppm の範囲に検出された．処理場別では流入生下水において PCB 濃度の高い浮間処理場が最も高く，活性汚泥の濃度では，各処理場の有意差はほとんど認められなかった．

(3) PCT と PCB の濃度の比率は，流入生下水で平均1/16，活性汚泥で平均1/17と，生産量の比率約1/10あるいは今までに報告されている．人体脂肪中の比率約1/10とほぼ近い値を示している．

(4) コプロスタノール濃度は活性汚泥のみについて測定したが，その結果は次表に示す如くである．(値は乾燥重量として表わしてある)

下水処理場	コプロスタノール濃度
落合	1,107 ppm
砂町	1,288 〃
小台	1,158 〃
三河島	488 〃
浮間	87 〃
芝浦	1,021 〃
森ヶ崎	515 〃

この表から，浮間処理場が最も低い値を示している．これは前述の如く，本処理場は，家庭排水の流入が少なく，工場排水を主体とした処理場の特殊性に起因するものと考えられる．

(5) PCB, PCT とコプロスタノールとの相関性を見るために，濃度を棒グラフに表わしたものがFig. 3である．この図から PCB とコプロスタノールとは相関性はほとんど認められないが，PCT とコプロスタノールとの相関性については，浮間処理場を除いて一部あるように見られるが，今回の調査では，試料不

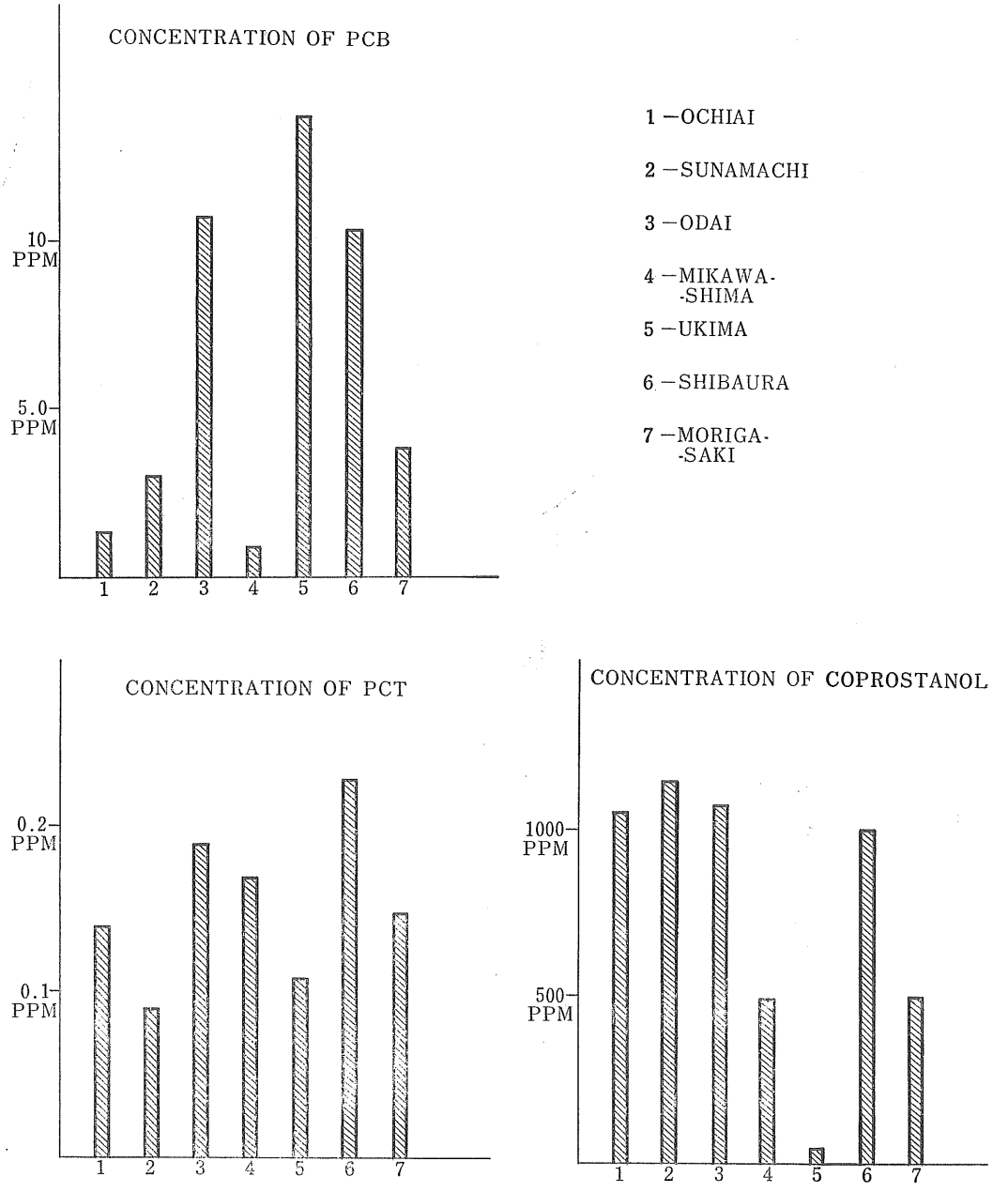


Fig. 3 Bar-graphs of PCBs, PCTs and Coprostanol in Sludgs

足のため充分な解析はできなかった.

4. あとがき

今回の調査で，下水処理場における，PCB, PCT, コプロスタノールの濃度が判明した. PCB については，昨年度実施した結果と比較すると，数値が全体的に低くなっており，環境汚染が改善の傾向を示していると思われる.

PCT については，48年度初めて測定したため比較できない. また特に汚染経路の解明は，試料不足のため充分に解析することができなかったので，今後も調査を継続する計画である.

附　記

（本研究は昭和48年度当研究所研究課題 PCB による環境汚染に関する調査研究として実施し，概要は日本薬学会第94年会1974年4月5日で発表した）

文　献

1) 立川　涼：PPM, 8, 43—52 (1972)
2) 千葉幹雄：*Now Food Industry*., 14, 17—24 (1972)
3) Koeman, J. H.：*Nature*., 221, 1126—1128 (1969)
4) 滝沢行雄，皆川興栄，北島永一，尾崎邦雄：日衛誌，29, 81 (1974)
5) Tomas, G. H. and Reynols, L. M.：*Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 10, 108—111 (1973)
6) Freudenthal, J. and Greve, P. A.：*Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*., 10, 108—111 (1973)
7) 滝沢行雄，倉山令子，皆川興栄：日衛誌，29, 91 (1974)
8) Murtaugy, J. J. and Bunch, L. R.：*Journal. WPCF*., 39, 404—409(1967)
9) Ogura Kazuko：*Jap. J. Limnol*., 34, 129—135 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 417 — 425, 1974

シアンの分析における妨害物質とその妨害機構

樋口育子* 会田朋子* 森田昌敏* 三村秀一*

Detailed Examination on the Interference during the Determination of Cyanide ion in Water

YASUKO HIGUCHI*, TOMOKO AIDA*, MASATOSHI MORITA* AND SHUICHI MIMURA*

Interferences by several compounds were investigated on the official analysis of cyanide ion in water. Ethylenediaminetetraacetic acid and *n*-butyl amine reacted with nitrous acid to yield hydrogen cyanide and thus gave a positive error to the analysis. Some of aliphatic amines also reacted with nitrous acid to give a detectable amount of cyanide while aromatic amines did not. An oxidation of nitrous acid by permanganate was effective to eliminate this kind of positive error as well as the addition of sulphamic acid. An oxidation of *n*-butyl amine by permanganate was found to bring out the cyanide formation and therefore an oxidation appeared to be employed with deliberate care. Both organic and inorganic reductants interfered the colour development in the pyridine-pyrazolone method by consuming effective chloramine-T. An oxidation by permanganate gave a fairly good recovery of cyanide for the elimination of reductants. Interferences by other materials are also described and discussed in detail.

1. 緒　言

水中のシアンの定量法としては，過去に数多くの報告がされている．主な方法とその適用濃度を表1に示す．これらの方法のうち，感度の良さ，妨害物質の少なさ等の点から，ピリジン・ピラゾロン法が最も広く用いられている．実際に水を分析する場合，ピリジン・ピラゾロン法に限らず蒸留による前処理が必要であり，この他にもエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩（以下 EDTA と略す）添加（全シアン分析法），過マンガン酸カリウム酸化（還元性物質の除去）等の処理が必要である場合が多い[11-13]．本研究はこれらの前処理過程で，シアンが生成，もしくは消失，あるいはまたピリジン・ピラゾロンの発色を助長，または妨害する物質とその反応機構を明らかにすることにより，現在の試験法の問題点を解決するために行なったものである．

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

表1 シアン定量法

	定量範囲 (ppm)	相対標準偏差(%)	妨害物質
硝酸銀法[1]	3—100	10—3	ハロゲン，酸化還元性物質
ピリジン・ピラゾロン法[2]	0.05—0.5	10—2	酸化還元性物質亜硝酸
チオシアン酸第二水銀法[3]	0.5—10	10—3	酸化還元性物質亜硝酸
中和滴定法[4]	26—	0.8	
ポーラログラフ法[5]	0.0025—		界面活性剤，塩素
ピクリン酸変法[6]	0.5—50	±1	
原子吸光法(鉄)[7]	0.06—5	2.2	
(銀)[7]	0.3—21	1.5	
電極法[8]	1—1500		チオシアン酸塩塩素，硫酸塩，石炭酸，アンモニア
イソニコチン酸ピラゾロン法[9]	0.05—2.5		酸化還元性物質チオシアン酸塩
ピリジン・バルビツール酸法[10]	0.01—30	10	チオシアン酸塩

2. 試薬および機器

(1) 試　薬

1—フェニル—3—メチル—5—ピラゾロン，ビス（1

—フェニル—3—メチル—5—ピラゾロン）はシアン測定用又は特級品をそのまま用いた．1/10N硝酸銀溶液および1/10N 過マンガン酸カリウム溶液は定量分析用試薬（和光）を用いた．クロラミンT，ピリジン，水酸化ナトリウム，フェノールフタレイン，エチルアルコール，リン酸，酢酸，エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩，リン酸一カリウム，リン酸二ナトリウム，P-ジメチルアミノベンジリデンローダニン，アセトン，シアン化カリウム，亜硝酸ナトリウム，アンモニア水，*n*-ブチルアルコール，1,2-シクロヘキサンジアミン-N, N, N′, N′-テトラ酢酸，*n*-プロピルアミン，イソプロピルアミン，ヘプチルアミン，*n*-ブチルアミン，ジエチルアミン，トリエチルアミン，ジエタノールアミンは，特級品をそのまま用いた．
アニリン，スルファミン酸，メチルアミン，シクロヘシルアミン，ジメチルアミン，トリメチルアミン，モノエタノールアミン，グリシン，グルタミン酸，アラニン，バリン，アスパラギン酸，ロイシン，イソロイシン，トリプトファン，リジン塩酸塩，プロリン，尿素は一級品をそのまま用いた．

（2） 機　　器

赤外分光器　日立ＥＰＩ—3
分光光度計　日立ＭＰＳ　デジタル　スペクトロフォトメーター102
pH メーター　堀場Ｆ５pH メーター
操　　作　実験操作は，JIS 0102（工場排水試験法）に準じて行った．

3. EDTAと亜硝酸の反応にもとずくシアンの生成

全シアンの分析法として，金属シアン錯体の分解を容易にするために，キレート剤の添加が考えられる．JIS法[11]ではEDTA，米国標準法[12]では酒石酸またはクエン酸，衛生試験法[13]では酒石酸が示されている．最近，亜硝酸を含む排水をJIS法で分析するとシアンが正の誤差として観察されることが報告された[11]．そこで筆者らはEDTAと亜硝酸の反応について，反応機構へのアプローチを試みた．

（1） シアンの生成の確認

実験操作　蒸留水（イオン交換樹脂を通し石英製の蒸留装置で蒸留したもの）1.5*l* に EDTA 10% 溶液 100 m*l*，亜硝酸ナトリウム 700 mg を加え，リン酸を添加して pH を2.0 とし蒸留する．留出液うけ器に 0.1 N 硝酸銀溶液 30 m*l* をいれて，全量 100 m*l* になるまで蒸留した．途中で液は白濁し，最終的に得られた白色沈でんを沪過して集め赤外吸収スペクトルをとった．（図1）

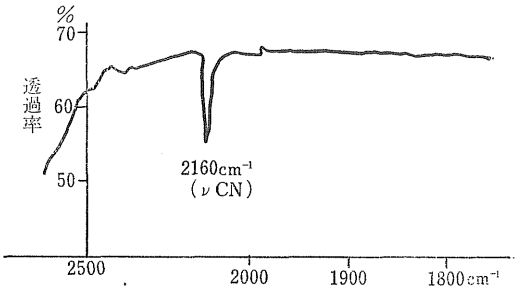


図1　銀シアン化物の赤外吸収スペクトル

結果および考察　2,160 cm^{-1} に C≡N 伸縮振動にもとずく吸収があり，この白色沈でんは AgCN であると同定された．従って EDTA—HNO_2 系で HCN が生成したことは確実である．また生成した AgCN の量は数 mg であり，これはピリジン・ピラゾロン法での測定値から計算される約 3 mg と大体一致する．従って EDTA-HNO_2 系でのピリジン・ピラゾロン法での妨害物質は，実はシアンそのものであることが明らかとなった．

（2） 亜硝酸と EDTA からのシアンの生成機構

(2)—1　反応温度の影響

実験操作は JIS 0102 により蒸留法と通気法を比較した．蒸留法ではシアン 125 μg を生成したが通気法(40°)では0.4 μg であり，温度が低いとほとんどシアンは生成しないことは明らかである．従って本反応は直火加熱という過酷な条件下で進行するものである．

2）反応の pH 依存性

実験操作　還流冷却管を備えつけた三つ口フラスコ(1*l*)に蒸留水 250 m*l*，EDTA 1.00 g，亜硝酸ナトリウム 70 mg を加え，これにリン酸を添加して pH 1.0，2.0，3.0，4.0，5.0，6.0，7.0，8.0，9.0 の溶液を作り，この溶液を40分間加熱還流する．反応後，残存する亜硝酸を10%スルファミン酸溶液 5 m*l* を加えて分解し，リン酸酸性にした後蒸留し，ピリジン・ピラゾロン法で定量した．

結果および考察　結果を図2に示す．反応は酸性下で進行し，pH 7 以上では殆んどシアンを生成しない．従って反応に関与するものは亜硝酸イオン（NO_2^-）ではなくて，亜硝酸（HNO_2）であると思われる．

3）EDTA と亜硝酸のモル比

実験操作　EDTA と HNO_2 がどのようなモル比のときにこの反応が最も収率がよく進行するかを検討した．反応条件は蒸留水 250 m*l* 中に EDTA 1 g，亜硝酸ナトリウムを加え，リン酸酸性下 pH 2.0 で反応させ，10%スルファミン酸溶液 5 m*l* を加えて残存

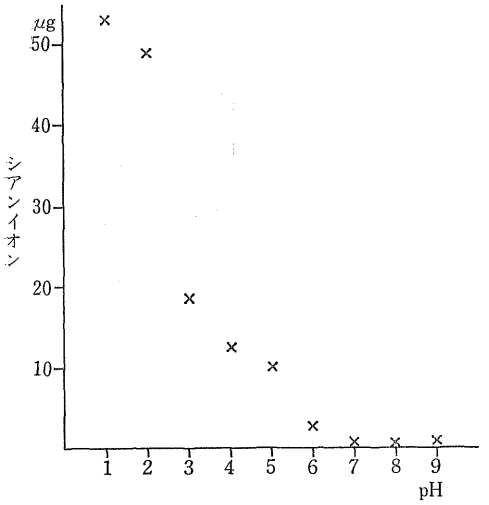


図2 亜硝酸と EDTA による CN^- 生成反応の pH 依存性

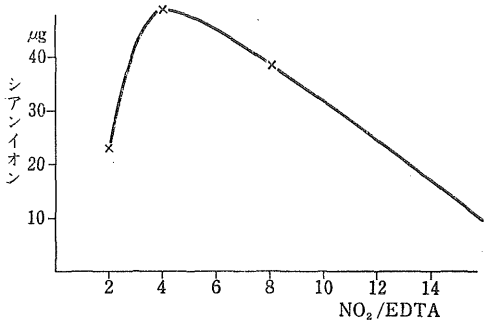
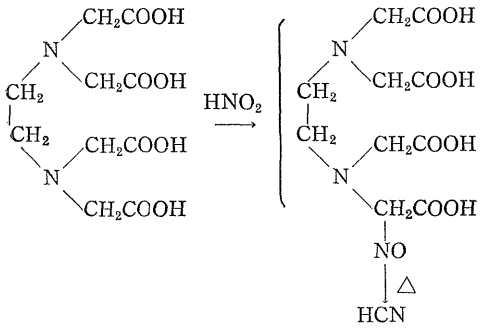


図3 亜硝酸と EDTA のモル比を変化させた時の CN^- 生成

する HNO_2 を分解した後蒸留し，ピリジン・ピラゾロン法で定量した．

結果および考察 結果は図3に示す．反応にはシアンの極大生成点が認められ，HNO_2 の量が多くても少なくても生成量が低下する．以上の結果から EDTA と亜硝酸との反応は次の様に進行すると推定されるが，詳細は今後の研究にまたねばならない．



4）妨害の除去法

亜硝酸を除去する有効な添加剤としては，スルファミン酸，スルファミン酸アンモニウム（JIS 法）が有効であるとされていた．筆者らは過マンガン酸カリウム酸化について検討した．

実験操作 10%亜硝酸溶液 3 m*l*，シアン標準液（25 μg……CN^-として），EDTA 10 m*l*，リン酸 10 m*l* を蒸留水 250 m*l* に添加する．この液に1/10過マンガン酸カリウム溶液を滴下し，ピンク色が残ったところで滴下をやめ，そのまま蒸留したものと，スルファミン酸によって亜硝酸を分解したものをそれぞれピリジンピラゾロン法により発色させ比較した．

結果および考察 CN の回収率については有意差は認められない．

以上の結果より過マンガン酸カリリウム酸化は有効であると思われる．

4. アミン類と亜硝酸との反応によるシアンの生成

各種の脂肪族，芳香族アミンと亜硝酸の反応を調べた．

実験操作 シアン蒸留装置（JIS 法規格）に蒸留水

表2 アミン誘導体と亜硝酸との反応によるシアンの生成

実験法	アミン	アミン量	生成CN (μg)*
蒸留法	メチルアミン	30%水溶液 2 m*l*	0.4
	n-プロピルアミン	2 m*l*	—
	イソプロピルアミン	2 m*l*	(0.2)
	n-ブチルアミン	2 g	26.5
	シクロヘキシルアミン	2 m*l*	1.0
	ヘプチルアミン	2 m*l*	1.9
	ジメチルアミン	2 m*l*	0.5
	ジエチルアミン	2 m*l*	—
	トリメチルアミン	2 m*l*	0.6
	トリエチルアミン	2 m*l*	(0.2)
	モノエタノールアミン	2 m*l*	0.4
	ジエタノールアミン	2 m*l*	—
	グリシン	2 g	—
	EDTA	2 g	125
	CyDTA	2 g	31
	ピリジン	2 m*l*	(0.3)
	アニリン	2 m*l*	—**
	α-ナフチルアミン	2 g	—**
通気法	*n*-ブチルアミン	2 m*l*	0.4
	EDTA	2 g	0.4

* 検出限界 0.4 ppm
** 他の発色性物質を生成
$NaNO_2$ 70 mg 添加

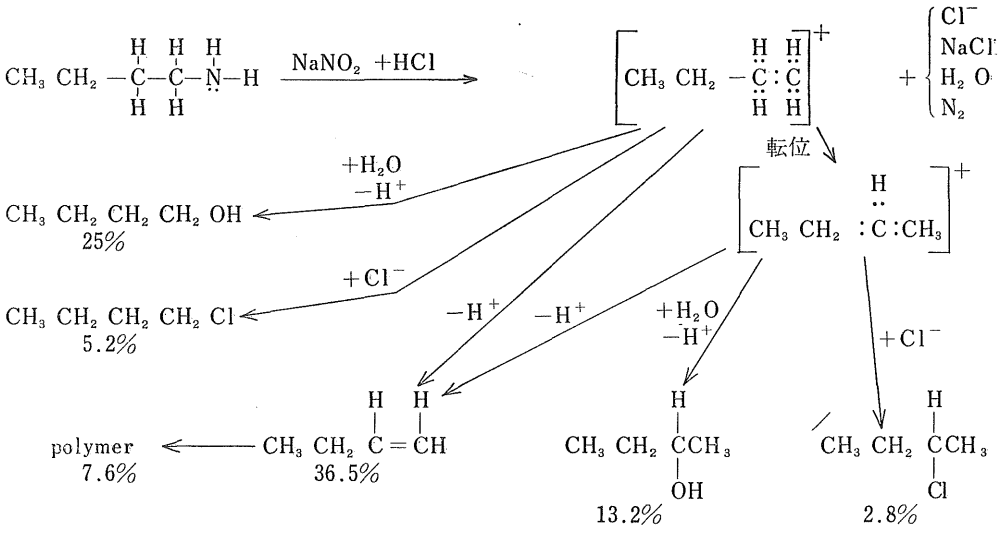


図4 *n*-ブチルアミンと亜硝酸との反応による生成物

250 m*l*に2 g（又は 2 m*l*）のアミンを溶解し，これに亜硝酸ナトリウム70 mg，リン酸 10 m*l* を加えて蒸留する．留出液を2％水酸化ナトリウム溶液に捕集し，pH 調整後ピリジン・ピラゾロン法で発色させた．

結果および考察 結果を表2に示す．

（1） 脂肪族第一級アミンのうち，もっとも多くシアンを生成したのは*n*-ブチルアミンであった．シクロヘキシルアミンは少量のシアンを認めたが，その他の多くのアミン類は，こん跡程度であった．*n*-ブチルアミンは EDTA の時と同様に AgCN の白色沈でんを生成したので，HCN が生成されたことは明らかである．他のアミン類については，赤外吸収スペクトルによる同定は HCN の生成が微量であるため不可能であった．脂肪族第一級アミンと亜硝酸との反応は，まず最初にジアゾニウム塩を生成し，これを分解しカルボニウムイオンを生する．カルボニウムイオンは転移や再結合によって安定な生成物となるが，その反応は極めて複雑である．*n*-ブチルアミンと亜硝酸の反応は比較的よく調べられており[14]，次の反応生成物が得られているが（図4）その中の未知の生成物 10% の中に HCN が含まれていた訳である．従って反応機構については明確に出来ないが，ただ一つ明らかになったことは，反応が加熱下で進行することである．通気法（40°）条件下では殆んどその反応は進行しなかった．

（2） 脂肪族二級アミンは亜硝酸とニトロソアミンを生成するが，酸性条件下では原物質に分解しており，加熱によるシアンの生成はほとんど認められなかった．また三級アミンもシアンを生成しなかった．

（3） 芳香族アミンは亜硝酸と反応して比較的安定なジアゾニウム塩をつくるが，筆者らの用いた加熱条件下では，これは直ちに分解しフェノールを生成する．多量のフェノールの存在はピリジン・ピラゾロンの発色を妨害するので過マンガン酸カルウムにより酸化して再蒸留した結果，正の妨害はほとんど示さなかった．菅野ら[15]はアニリンから CN が生成されるとしているが，筆者らの実験条件では認められなかった．

（4） 亜硝酸とアミンが共存する場合，それによるシアンの生成を除去するためには，スルファミン酸の添加，又は過マンガン酸カリウムによる酸化が有効と思われる．

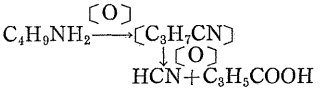
（5） アミンの過マンガン酸カリウム酸化によるシアンの生成

表3 アミンの過マンガン酸カリウム酸化によるシアンの生成

アミン	試料量 (mg)	生成シアン
n-ブチルアミン	90	4.5γ
アニリン	90	—*
n-メチルアミン	30	—

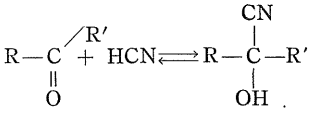
* 黒緑色の色素を生成
** 反応条件は JIS 法による

有機，無機の還元性物質を除去するため，通常過マンガン酸カリウムによる酸化が推奨されている．しかし試料を直接酸化すると HCN を生成することが判った．(表3)アニリン，メチルアミンはシアンを生成しないが，nブチルアミンはかなりの収率でシアンを生成した．反応機構としては次の如くと考えられる．



5. 有機シアン化合物

(1) シアンヒドリン類は通常水溶液中では次のごとく平衡であり，酸性条件下では平衡は左側に傾いている．従ってリン酸酸性で蒸留すれば HCN が生成される．

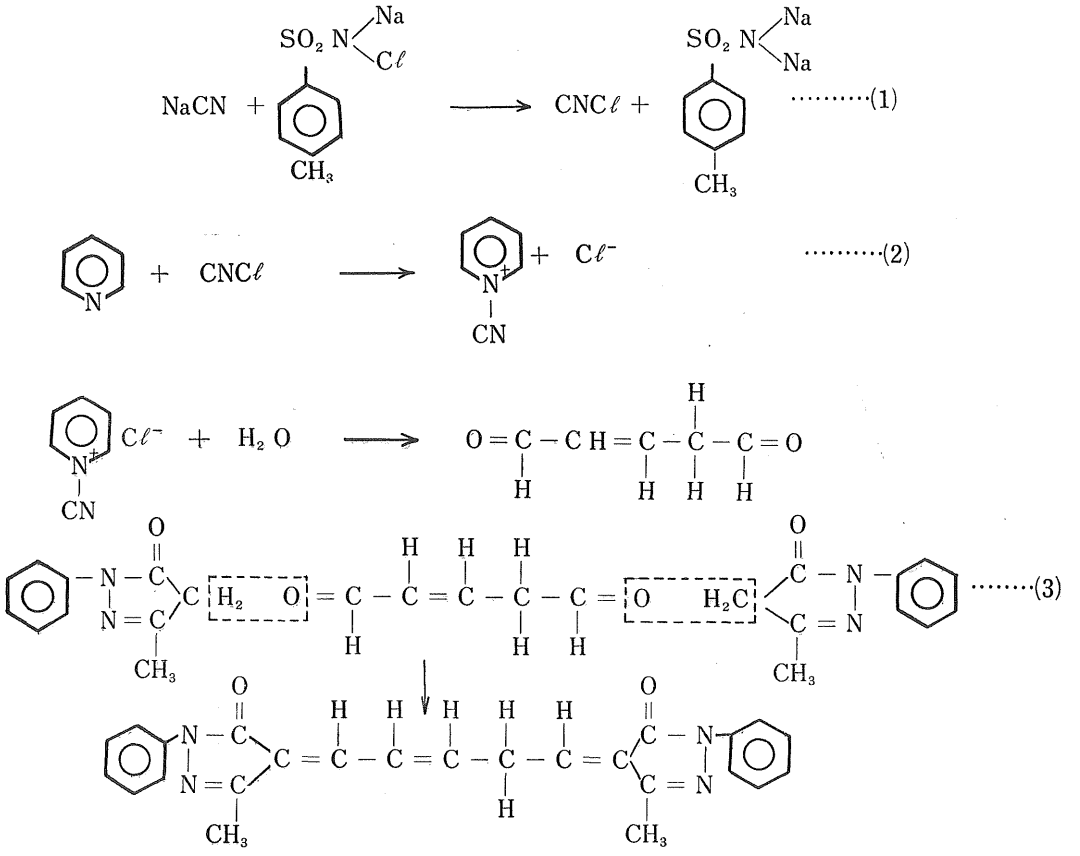


シアンヒドリンの毒性は HCN と類似したものであり，又生体内で HCN を容易に生成すると思われるので，正の妨害と考えるよりも全シアンの一部と考えるべきものかも知れない．

(2) アクリルニトリルは酸化されると HCN を生成する．実際にアクリルニトリルの定量法として過マンガン酸カリウム酸化後，生成した HCN を測定する方法がある[16]．山崎ら[17]は過マンガン酸カリウム酸化処理でアクリルニトリルからほとんど定量的に HCN が生成することを報告している．アクリルニトリルの毒性は HCN と幾分異なり，生体内で加水分解をうけ誘導されたアクリルアミドが重要であるとの説もある．したがって筆者らはアクリルニトリルは CN とは別個に定量すべきものと考える．現在高感度の定量法を開発中である．

6. ピリジン・ピラゾロン法における妨害

本法は König reaction (図5) に基づいて，620



(2−Pentene 1,5−diylidene Bis(1−phenyl 3−methyl 5 pyrazolone)

図5　ピリジン・ピラゾロン法の発色機構

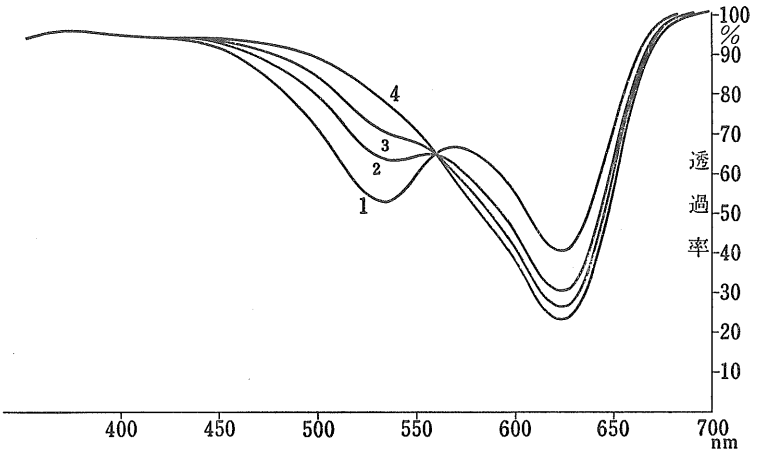


図6 -1 ピリジン・ピラゾロン法におけるシアンイオン発色色素の色調変化の吸収スペクトル
発色後経過時間 1) 6分 2) 10分 3) 14分 4) 30分

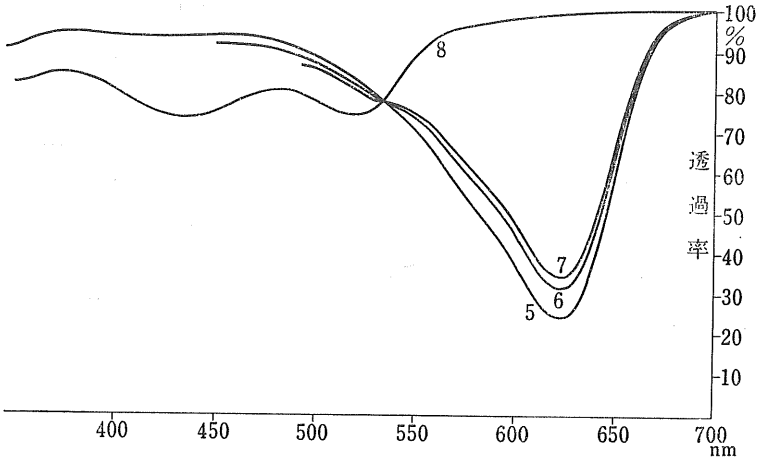


図6—2 ピリジン・ピラゾロン法におけるシアンイオン発色色素の色調変化の吸収スペクトル
発色後経過時間 5) 1時間14分 6) 4時間6分 7) 4時間46分 8) 21時間46分

nm に極大吸収をもつ青色色素の生成を利用したものである．生成した青色色素の分子吸光係数は $\varepsilon=5.5\times10^4$, $\lambda=620$ nm(H_2O), $\varepsilon=1.23\times10^5$, $\lambda=640$ nm (*n*-ブチルアルコール) であり少量の *n*-ブチルアルコールで抽出することにより，感度を高めることができる．青色色素は常温で徐々に分解し赤色色素を生成する（図6）．本法における妨害は，反応(1)に関するものが多い．

(1) 正の誤差を与える場合

チオシアンイオンおよびシアン酸イオンは，クロラミンTと反応して塩化シアンを生成する．したがってこの両方のイオンは正の誤差を与える．チオシアンイオンとクロラミンTとの反応は，シアンイオンに比較して遅いのでこの速度差を利用してチオシアンイオンとシアンイオンと分離定量しようという試みが行なわれているが[18]，分離は余り良くない．シアン酸イオンも正の誤差を与えるが，その影響は軽微であり，10 mg のシアン酸カリウムが 0.5 μg あるいはそれ以下のシアンイオンに相当する[18]．ピリジン・ピラゾロン法でこれらのイオンの除去は困難である．

(1)—1 アミノ酸，尿素，アンモニアによる妨害

実験操作 グリシン，グルタミン酸，アラニン，バリン，アスパラギン酸，ロイシン，イソロイシン，トリプトファン，リジン塩酸塩，プロリン，尿素をそれ

それ10 mg，アンモニア 0.01 mg を蒸留水20 ml に溶解し，JIS 法におけるピリジン・ピラゾロン法で発色を行なわせた．

結果および考察　結果は表2に示す．

グリシン 10 mg はシアン 0.2 μg の発色を示し生成した色素はシアンと同様なものであった（表4）．

表4　ピリジン・ピラゾロン法におけるアミノ酸の発色

アミノ酸	極大吸収 (nm) (*n*-ブタノール抽出)	CN^-相当
グリシン	640	0.2 μg
グルタミン酸	—	—
アラニン	—	—
バリン	—	—
アスパラギン酸	—	—
ロイシン	—	—
イソロイシン	—	—
トリプトファン	551	測定不能*
リジン塩酸塩	—	—
プロリン	—	—
尿素	550	測定不能*
アンモニア	550	測定不能*

* 他の波長にある吸収帯が 640 nm 付近にまでかぶってくるため

他の脂肪族アミノ酸は呈色しなかった．反応は(2)式に関与しているものと推定されるが詳細は不明である．トリプトファンも呈色するが，これはシアンの呈色と異なる（図7）．Ludzack 等[19]はグリシン 10 mg がシアン0.5 μg に相当するとしているが，筆者等の値より可成低い．この差の原因は不明である．尿素もトリプトファンと同様に妨害をするが生成する色素は，シアンのそれではなく，アンモニアも赤色の物質を生成するが，尿素による発色と類似している．アンモニアはpH 3, 4, 5, において生成する赤色はリン酸二ナトリウム添加，*n*-ブタノール抽出の操作により分解するが，pH 6.8 における呈色は，これらの処理によっても分解せず抽出できた．アミノ酸類，尿素およびアンモニアによる妨害は蒸留により除去できた．

（2）　負の誤差を与える場合

(2)-1 無機還元剤

実験操作　シアン 5 μg 並びに還元剤を蒸留水 20 ml に添加し，ピリジン・ピラゾロン法にて，発色させた．

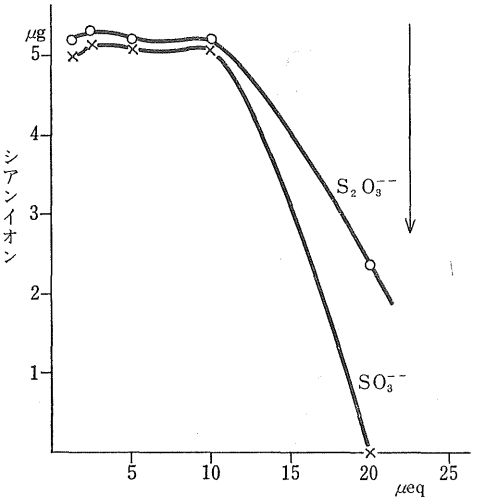


図8　還元性物質の量的変化による妨害

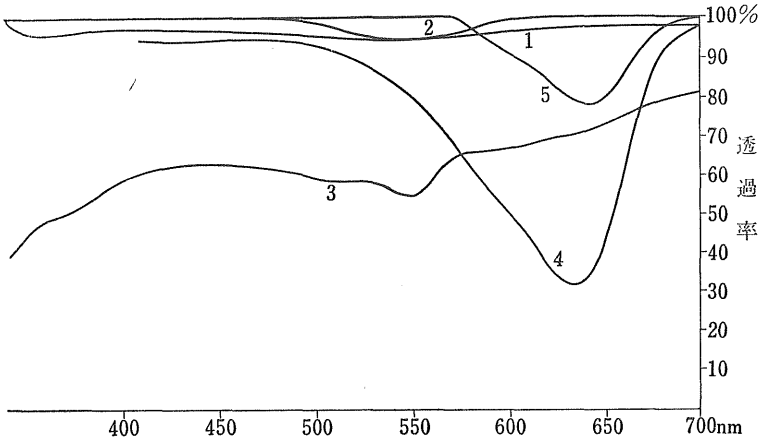


図7　ピリジン・ピラゾロン法への直接的妨害
1) アンモニア　2) 尿　素　3) トリプトファン　4) CN^-　5) グリシン

結果および考察 還元剤はクロラミンTを消費するため，塩化シアンの生成を阻害する．亜硫酸イオンおよびチオ硫酸イオンで調べた阻害を図8に示す．クロラミンTは通常11マイクロモル使用されており，したがって22マイクロ当量の還元剤により完全に失活する．実験結果ではそれ以下の量の還元剤によっても，10マイクロ当量を過ぎたあたりから妨害を受けるようである．亜硝酸イオンも同様な機構により妨害を与える．これらのイオンは蒸留法により十分に除去できない．蒸留によりどの程度除去できるか，またどの程度なら妨害しないかを検討した．結果を図9に示す．硫化水素は酸性下での蒸留によって，90% 以上回収され，除去できない．チオ硫酸は，pH 2 のリン酸酸性下で蒸留すると還元能力の80%を失うが，これを pH 5.5に調節して再蒸留しても，これ以下にはほとんどならない．亜硫酸は pH 5.5 での蒸留で約1/3に減少する．この方法では硫黄系の還元性物質は完全には除去できない．無機還元性物質は，過マンガン酸カリウム酸化により効果的に除去できた．他の酸化剤として過硫酸アンモニウム添加を試みたが，有効ではなかった．

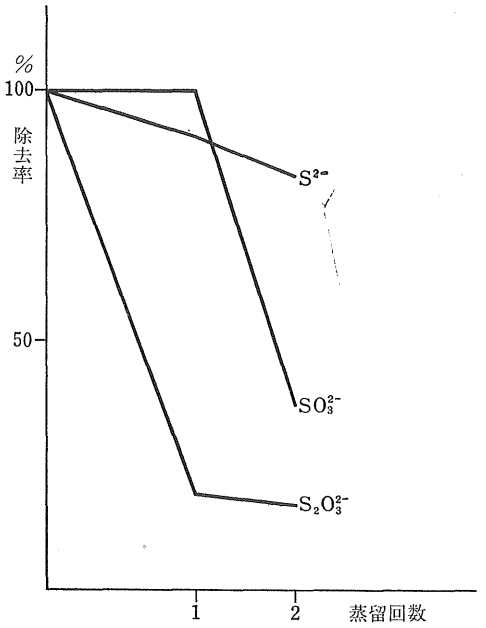


図9 無機還元性物質の蒸留による除去率

(2)—2 有機化合物による妨害

フェノールは 4000 ppm で完全に妨害した．80 ppm では，やや妨害（回収率92%）することが知られており，阻害機構はクロラミンTの消費であろう．

(2)—3 他の有機還元剤 (Hdrazine, Furfral, Formaline, Formic acid) いずれも，50 ppm の存在でシアンの回収率を0にする．この濃度は100マイクロ当量以上の還元性を持ち，したがってクロラミンTの通常使用量の22マイクロ当量を約5倍程度うわまわっている．したがって，クロラミンTは完全に消費されてしまう．

(2)—4 還元性質の許容量

以上の実験より無機並びに有機還元性物質の許容量が決定できる．還元性物質は11マイクロ当量のクロラミンTは消費しても良いがそれ以上は好ましくない．11マイクロ当量のクロラミンTは過マンガン酸カリウム消費量 1.4 ppm の蒸留水 250 m*l* に対応する．いくつかの還元性物質の許容存在量の計算値を表5に示す．還元性物質の妨害の除去は過マンガン酸カリウム酸化によりシアンの損失なく除去できる．

表5 還元性物質の最大許容濃度（計算値）

化学種	最大許容濃度 (ppm)	化学種	最大許容濃度 (ppm)
SO_3^{2-}	1.7	HCHO	0.3
$S_2O_3^{2-}$	0.5	HCOOH	1.0
S^{2-}	0.15	$H_2N\text{-}NH_2$	0.4
NO_2^-	1.0		

7. あとがき

本実験の結果，次のことが明らかとなった．

（1） EDTA, CyDTA は亜硝酸と反応して高濃度のシアンを生成した．

（2） 脂肪族アミンの中には亜硝酸と反応してシアンを生成するものがあった．

（3） 芳香族アミンは亜硝酸と反応するが，シアンは生成しなかった．

（4） 亜硝酸の妨害除去にはスルファミン酸添加が有効であり，また過マンガン酸カリウムによる酸化も有効であった．

（5） 脂肪族アミンのある種のものは過マンガン酸カリウム酸化によりシアンを生成した．

（6） 有機および無機還元性物質はクロラミンTを消費することにより，ピリジンピラゾロン法における発色を妨害した．この妨害はクロラミンTの約半量が消費された後に出現した．

（7） 還元性物質の共存許容量は，過マンガン酸カリウム消費量として 1.4 ppm であった．

（8） 還元性物質による妨害除去としては過マンガン酸カリウム酸化が有効であり，シアンはほとんど定量的に回収された．

(9) pH 5.5 調節後に再蒸留という方法は余り有効ではなかった.

(10) 尿素, グリシン, トリプトファン, アニリン等のピリジン・ピラゾロン法への直接の妨害は, 蒸留により除去できた.

文 献

1) Liebig, J. : *J. Chem. Soc.*, 4, 219 (1952)
2) Epstein, J. : *Anal. Chem.*, 19, 272—4(1947)
3) 田中善正, 山本セツ : 分析化学, 9, 6—12(1960)
4) Ikeda, S., Hirata, J. and Satake, H. : *Nippon Kagaku Zasshi*, 91, 1184—6 (1970)
5) Bark, L. S., Lim, B. S. : *Watter Research*, 7, 1209—13 (1973)
6) Bosch, S. F. : *Asr. Pharm*, 9, 435—7(1968)
7) Danchik, R. S. and Boltz. D. F., : *Anal. Chem. Acta.*, 49,567—9 (1970)
8) Kogan, L. A., Kuzovatova, V. N., Gagarinova, L. M. and Zavorokhin, L. I. : *Koks Khim*, 3, 42—5 (1970)
4) 石井恵一郎, 岩本武治, 山西一彦 : 分析化学, 22, 448—50 (1973)
10) Weiner, R. and Leiss, Chr. : *Matalloberflaeche*, 25, 185—90 (1971)
11) 日本工業規格 : K 0102 (1971)
12) A. P. H. A. : *Standerd Method for the Examination of Water and Wastewater*, 13th Ed., 397—406 (1972)
13) 衛生試験法注解 : 日本薬学会編 (1973)
14) Brewster, R. Q. : *Organic Chemistry*, 3, 313 (1961)
15) 輿水敏子, 井脇淑子, 高松和幸, 関口祐太郎, 福井昭三, 菅野三郎 : 日本薬学会第94年会講演要旨集, 3, 142
16) Gisclard, J. B., Robinson, D. B., Kuczo, P. J., : *Amer. Ind. Hyg. Associ. J*, 19, 43(1958)
17) 山崎 : 堺市水道管理課, 私信
18) Kruse, J. M., Mellon, M. G. : *Anal. Chem.*, 25, 1784—92 (1953)
19) Ludzack, F. J., Moore, W. A. and Ruchhoff, C. C. : *ibid.*, 26, 1784—92 (1954)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 427 — 443, 1974

水道の原水に関する調査研究（第一報）
小笠原父島，母島における地下水および地表水の水質

中村　弘* 山崎洋子* 松本浩一*

Studies on Raw Waters of Water Supplies (I)
Chemical and Bacteriological Characterization of Surface and Subteranean Waters of the Ogasawara Islands

HIROSHI NAKAMURA*, YOKO YAMAZAKI* AND KOICHI MATSUMOTO*

The Ogasawara Islands, which have a population of about 1,300, are located on the Pacific Ocean about 1,000km south of Tokyo.

Chemical components and Coli-form bacteria of the surface and subeteranean waters on these islands were examined from the geochemical and hygienical points of view.

(1) The subteranean waters at the Okumura area (Chichi-jima Isl.) are classified into NaCl or $Ca(HCO_3)_2$ type (Fig. 3) which is characterized by having a large amount of Na^+, Ca^{++}, Cl^- and HCO_3^-, and contains comparatively large amount of ammonia, manganese and zinc with slight alkalinity.

The presence of all the above noted materials except zinc seems to be due to the intrusion of sea water and affected by the topographycal and geological factors. But zinc seems to be entirely originated to the colligate tubes used as well cribs.

(2) The subteranean waters at the Okimura area (Haha-jima Isl.) are classified into NaCl or $Ca(HCO_3)_2$ type (Fig.5) which is characterized by having less amount of Na^+, Ca^{++}, Cl^- and HCO_3^- than that at the Okumura, and contains nitrate and zinc with slight acidity.

Zinc seems to be entirely originated to colligate tubes as well as the Okumra wells.

(3) All of the surface waters (dam and stream waters) on the Ogasawara Islands are classified into NaCl type (Fig. 6 & 9) which is characterized with high turbidity, color, $KMnO_4$-consumed, iron, Na^+ and Cl^- contents.

Above noted facts seem to be originated to climate of high temperature and high humibity, erosion of rock and soil materials and dissolution of windborne salt.

The composition of the surface waters on these islands seems to have many similarities as compared with that of the river waters in Southeast Asia.

(4) On the whole surface and subteranean waters were found to be contaminated with a large number of Coli-form (2-900/25ml) and other bacteria (55-300,000/25ml).

(5) Twenty-eigth strains of Coli-form bacteria isolated from the above waters were classified according to the INViC tests and 46.4% of them is comprised in *Escherichia Coli I* and *E. Coli II*. The presence of these types indicates the responsibility of fecal contamination by mammals.

(6) From the results, the origin of fecal contamination of the surface waters seems to be due to the excreta of wild goats that inhabit mountain area in large number. That of the wells owe to incomplete construction of the wells and the fairly permeable stratum.

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

まえがき

小笠原諸島の父島，母島は東京から南へおよそ1,000kmの海上にあり，父島は面積約24km²，周囲約51km，人口1,054人（昭和49年3月現在），母島は面積約21km²，周囲約58km，人口203人（昭和49年3月現在）である．現在，小笠原諸島ではこの二島にのみ一般住民が生活している．

わが国の領土として長い歴史をもつ小笠原諸島は昭和21年から米軍の直接統治下におかれていた．しかし，昭和43年にわが国に返還され，現在は東京都に属する数少ない村の一つとなっている．これら島々の返還前の水道施設は米軍の管理する取水堰堤2ヵ所および井戸2ヵ所がその給水源となっていた．返還後は父島で取水井9ヵ所，取水堰2ヵ所，ダム4ヵ所に拡充され，将来は，1日1,100m³の給水能力となるように計画されている．また，母島では取水井3ヵ所の他にダム1ヵ所が建設され，日量400m³の給水能力となっている．両島とも大きな川はなく，長1～4kmの小さな川を堰止めたダムや取水堰と共に，塩類濃度の高い地下水が主な給水源となっている．

これらの島々の水道では全体的な水量不足に加えて，地下水の塩味，井戸わくからの亜鉛の溶出，地質からくる鉄，マンガン，有機物，濁り，あるいは臭いの問題等，水質上の問題も多かった．しかし，水源となる水の分析は過去に充分に行なわれていなかったのが実情である．このため，筆者らは昭和48年6月に約2週間現地に滞在し，主として，水道原水として利用されている地下水，ダム水，沢水等の理化学的分析および大腸菌群などの細菌検査を行なった．本編では，これらの結果について，陸水学的および衛生学的見地

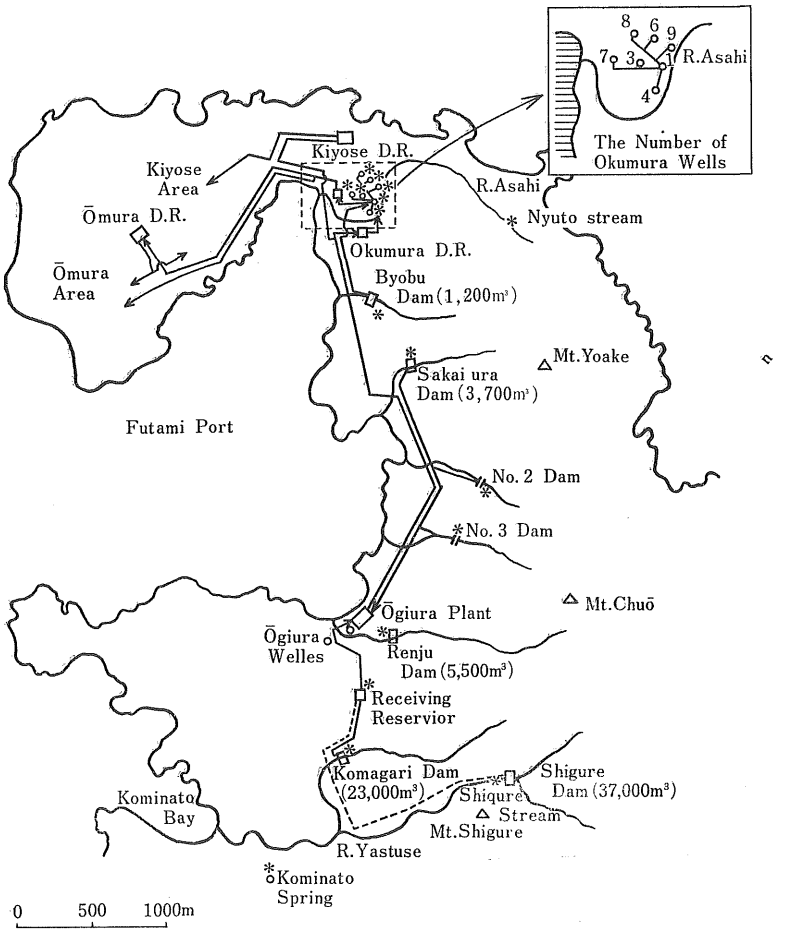


Fig. 1 Water Supply System and Sampling Station on Chichi-jima Island

より検討を加えた．

地質[1-3] および気候[2,4]

小笠原諸島のうち，聟島，父島，母島の3列島は伊豆諸島から西之島，硫黄島に至る一連の列島と並行して走り，その外側弧にあたる．これら2系列の列島の構成地質はおのおの極めて異なる．内側弧に属する伊豆諸島，硫黄島は活動中の火山を含む第四紀火山岩類から成るのに対し，外側弧の小笠原諸島は古第三紀の海成堆積層を主体としている．後者は火山活動の終了後の基盤の上に石灰殻を有する各種の下等動物あるいはプランクトン等の遺体が堆積してできた石灰岩が隆起して海上に頭を出したものといえる．地質は主に玄武岩石英粗面岩を含む安山岩の熔岩と集塊岩，凝灰岩などから成り，これらの岩石が風化した土壌のラテライト性赤色土壌 *red lateritic soil* に広くおおわれている．この土壌は最も広く各島に分布しており，赤色～赤黄色の粘土質下層土と表層付近の団塊状構造を有する堅牢なクラスト *clast*（酸化鉄，酸化アルミニウムの集積物）が特徴的層位である．この種の土壌は高温多湿の所産であり，主に，段丘面の平坦部に分布し，この土層全体の厚さは数m以内で，1m以内のところもある．

気候的には，これら島々は海洋性の亜熱帯地域に属しているが，丁度，北赤道海流の北辺にあたり，黒潮と北赤道海流の複雑な影響を受けているため，同緯度の他地方に較べて気温は比較的高くむしろ熱帯的気候を示している．そして，年平均気温はほぼ23°，月平均最高気温は28°，同最低気温は17°である．雨量は年間1,600mmで南西諸島や伊豆諸島の3,000mm以上に較べて，はるかに少なく，ほぼ東京と同量である．し

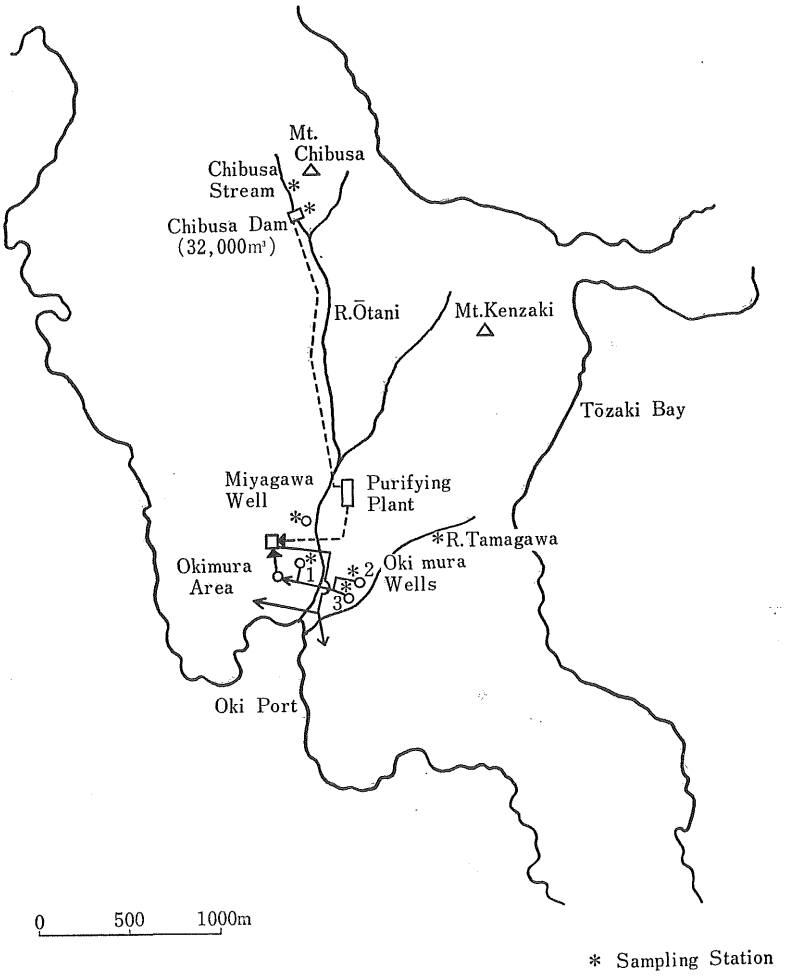


Fig. 2　Water Supplly System and Sampling Stations on Haha-jima Island

Table 1. The Result of Physiochemical Analysis of the Surface and

Sampling Station	Date (1973)	W.T. (°C)	pH	Turbidity (deg.)	Color (deg.)	NH_4-N	NO_2-N	NO_3-N	$KMnO_4$-consumed (mg/l)	Total Hardness (mg/l)
Subteranean Waters (Chichi-jima Isl.)										
Okumura Well No.1	Jun.11	22.5	7.2	1	5	Tr	Tr	Tr	6.9	324
Okumura Well No.3	Jun.11	23.5	7.2	2	5	Tr	N	Tr	7.7	380
Okumura Well No.4	Jun.11	22.5	7.3	2	7	Tr	N	Tr	6.0	420
Okumura Well No.6	Jun.11	23.0	7.6	4	12	Tr	N	Tr	7.6	228
Okumura Well No.7	Jun.11	23.5	7.5	5	9	VS	Tr	Tr	9.0	948
Okumura Well No.8	Jun.11	23.2	7.3	4	5	VS	Tr	Tr	5.1	468
Okumura Well No.9	Jun.11	23.0	6.8	0.5	8	Tr	N	Tr	7.1	268
Kominato Spring	Jun.11	24.0	6.7	0	0	Tr	Tr	—	1.8	186
Subteranean Waters (Haha-jima Isl.)										
Okimura Well No.1	Jun.13	21.5	6.5	3.5	5	Tr	Tr	VS	3.5	184
Okimura Well No.2	Jun.13	22.7	6.6	1	12	N	VS	VS	2.7	164
Okimura Well No.3	Jun.13	22.5	6.7	1	2	Tr	VS	VS	3.1	230
Miyagawa Well	Jun.13	24.5	6.7	0.5	5	Tr	N	VS	3.9	102
Surface Waters (Chichi-jima Isl.)										
Komagari Dam (surf.)	Jun. 9	28.4	7.2	45	80	Tr	N	N	54.8	88
Komagari Dam (5m)	Jun. 9	19.0	6.6	65	80	VS	N	N	30.6	102
KomagariDam(10.7m)	Jun. 9	18.2	6.5	51	50	S	N	N	27.4	116
Komagari Dam (outlet)	Jun. 9	20.0	6.6	55	75	S	N	N	27.4	102
Sakaiura Dam(surf.)	Jun.12	26.5	7.4	40	50	VS	N	N	19.3	44
Sakaiura Dam (5m)	Jun.12	19.6	6.3	42	50	VS	N	N	23.3	36
Sakaiura Dam (9m)	Jun.12	19.5	6.4	56	120	S	N	N	24.9	100
Renju Dam (surf.)	Jun. 9	26.4	—	29	40	VS	N	N	26.6	78
Byobu Dam (surf.)	Jun.11	27.0	8.1	40	80	VS	N	N	23.3	70
No. 2 Dam	Jun.12	23.5	7.4	17	35	Tr	Tr	—	10.9	130
No. 3 Dam	Jun.12	23.8	7.4	24	40	Tr	Tr	—	13.3	82
Nyuto Stream	Jun.12	20.4	8.4	20	50	VS	N	—	20.9	88
Shigure Stream	Jun.12	25.5	7.0	40	80	VS	Tr	—	24.9	60
Surface Waters (Haha-jima Isl.)										
Chibusa Dam	Jun.13	26.0	7.5	16	40	VS	Tr	—	9.8	72
Chibusa Stream	Jun.13	—	—	—	—	Tr	Tr	—	12.2	74
Tamagawa Stream	Jun.13	25.0	7.7	40	70	Tr	Tr	—	15.1	104

N : Negative, Tr : Trace, VS : Extremely Small Amount, S : Small Amouut

Subteranean Waters on the Ogasawara Islands

SiO_2 (mg/l)	PO_4 (mg/l)	Total Residue (mg/l)	Total Fe (mg/l)	Mn (mg/l)	Zn (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Na (mg/l)	K (mg/l)	Cl (mg/l)	SO_4 (mg/l)	HCO_3 (mg/l)	HCO_3 (meq/l)
25	—	759	0.04	0.02	0.1	65.7	83.9	122	5.3	202	42.2	305	50.0
25	—	752	0.16	0.11	0.4	99.3	32.1	117	9.3	167	38.4	463	7.60
22	—	871	0.06	0.01	0.2	86.5	49.6	162	11.1	218	68.6	478	7.84
31	—	628	0.14	0.50	1.9	76.9	8.7	172	9.6	176	28.8	451	7.40
25	—	2,700	0.10	0.00	6.3	293	52.5	396	13.5	1,004	139	410	6.72
47	—	1,026	0.20	0.28	1.6	133	33.0	126	10.0	242	64.3	264	4.32
42	—	575	0.04	0.07	0.2	65.1	31.0	108	3.3	172	28.3	254	4.16
48	0.16	200	0.10	0.00	0.0	41.6	19.9	115	7.8	202	43.9	93	1.52
37	—	438	0.06	0.16	0.9	44.0	15.6	720	4.0	125	25.1	171	2.80
39	—	461	0.04	0.01	1.9	30.4	21.4	102	4.2	145	35.5	159	2.60
40	—	516	0.04	0.06	0.6	53.7	23.3	87.5	6.6	131	31.7	227	3.72
40	—	311	0.10	0.01	0.3	22.8	10.9	610	2.3	99.7	16.9	88	1.44
19	0.08	336	0.80	0.06	0.0	12.0	14.1	60	3.3	92.7	15.4	85.4	1.40
19	0.11	333	1.80	0.70	0.0	13.6	16.5	60	4.0	107	4.8	87.8	1.44
22	0.17	364	2.60	0.76	0.0	15.6	18.7	60	4.7	110	1.9	80.5	1.32
18.5	0.15	351	2.22	0.56	0.0	14.8	15.8	60	4.5	107	2.9	92.7	1.52
34	0.00	273	0.60	0.01	0.0	4.8	7.8	49	2.5	77.2	17.3	19.5	0.32
32	0.00	235	2.40	0.08	0.0	4.0	6.3	41	2.4	71.6	15.4	22.0	0.36
31	0.00	263	5.80	0.80	0.0	8.4	19.2	43	4.1	74.4	5.3	56.1	0.92
27	0.12	311	1.00	0.30	0.0	8.4	13.9	57	3.9	94.5	14.4	58.6	0.96
46	0.00	300	0.06	0.04	0.0	8.8	11.7	59	3.5	95.5	17.3	41.5	0.68
60	0.03	411	0.20	0.01	0.0	26.8	15.3	70	3.0	54.8	16.8	117	1.92
50	0.01	309	0.60	0.02	0.0	11.2	13.1	56	4.1	87.1	13.9	63.4	1.04
41	0.005	459	0.40	0.03	0.0	12.0	14.1	86	3.5	160	17.8	43.9	0.72
47	0.14	339	1.20	0.01	0.0	8.4	9.5	62	3.9	101	19.7	31.7	0.52
48	1.00	273	0.02	0.03	0.0	13.2	9.5	51	3.0	34.3	84.4	51.2	0.84
48	1.10	269	0.30	0.02	0.0	13.6	9.7	52	3.4	84.3	14.9	53.7	0.88
47	0.15	411	0.70	0.06	0.0	16.8	22.4	90	4.0	135	37.0	87.8	1.44

かし，冬季にも平均して雨量があり，台風や低気圧による集中豪雨をみることもある．

水道施設の概要

1. 父島の水道

現在計画中のものも含めダム関係（2ヵ所の取水壌を含む）7ヵ所，井戸関係9ヵ所が水源となっている（Fig. 1）．

ダム関係7ヵ所は全長1～4km の小さな川を堰止めたもので，そのうちダム5ヵ所の貯水量はそれぞれ1,200m³ から37,000m³ と規模は小さい（ただし，時雨ダム37,000m³ は未完成）．他の2ヵ所は取水堰（第二水源，第三水源）である．これらダム関係の水はいずれも，降雨時に激しく濁り，また，小曲ダムにおいては，建設時に木の伐採を行なっていないため，ダム内で立木が腐敗し，有機物が多く，硫化水素臭が激しくなっている．これらの水は扇浦浄水場にて凝集沈でん処理後，沪過され給水されている．

井戸関係では奥村地区に7ヵ所，扇浦地区に2ヵ所あり，共に直径3m程度の亜鉛引きコルゲート管が井戸わくとして使われている．いずれも開放式井戸で深さは3～5mである．奥村地区の井戸では，1号井に他の井水を集め，沪過機を通した後，主として大村地区に配水している．これらの井水は，海に近く，塩分濃度が高いため，通常，屏風ダムの水を加えて，給水しているが，降雨時には濁度が上がるため，混入は中止される．

2. 母島の水道

取水井3ヵ所，ダム1ヵ所により，日量400m³ の給水量が計画されている（Fig. 2）．採水当時はダムが未完成であったため，取水井3ヵ所の水が沪過機を通して給水されていた．いずれも，父島における取水井と同様に，直径3m位の亜鉛引きコルゲート管を井戸わくとして使った深さ7m程の開放式井戸である．

試料水の採取および分析方法

1. 試料水の採取

昭和49年6月9日から6月13日にかけて，父島および母島のダム水，取水堰水，井戸水および水源として利用予定の沢水等を採取した（Fig. 1 および Fig. 2. *印）．

採水はダム水，井戸水は主としてバンドン採水器を用い，取水堰水，沢水および湧水については直接2lのポリビン（化学分析用）および100ml の滅菌ポリ容器（細菌試験用）にそれぞれ採取した．

2. 分析時期および分析方法

水温，pH，硫化水素，溶存酸素，透明度は採水時に，濁度，色度，アンモニア性窒素，亜硝酸性窒素，硝酸性窒素，M-アルカリ度，大腸菌群，一般細菌数は採水後6時間以内に，現地試験室にて，その他，Table 1. に示す分析項目および大腸菌群の INViC 試験は東京の研究室に持帰ったのち試験した．

分析は主に上水試験法[5]に従い，次に示す方法で行なった．

濁度：光電光度法（散乱光），色度：肉眼比色，pH：比色法，アンモニア性窒素：ネスラー法，亜硝酸性窒素および硝酸性窒素：GR法，過マンガン酸カリウム消費量：酸性法，総硬度および Ca^{++} および Mg^{++}：EDTA法，溶性ケイ酸：モリブデン酸青法，リン酸イオン：モリブデン酸法，総鉄：硫シアンカリウム法[6]，マンガン：過硫酸アンモニウム法，亜鉛：原子吸光法，ナトリウムおよびカリウム：炎光光度法，塩素イオン：モール法，硫酸イオン：比濁法，硫化水素：パラフェニレンジアミン法，溶存酸素：ウインクラー法，重炭酸イオン：M-アルカリ度より算出，大腸菌群および培地上の全コロニー数（一般細菌数）：メンブラン・フィルター・Endo 培地・MTGE培地フィールドラボセット（ミリポア社製，ϕ45mm，0.45μ フィルター）により37°C で24時間培養，INViC 試験：上水試験法による．

結果および考察

1. 化学的試験

1. 1. 父島の地下水

奥村地区の7本の取水井（ただし，1号井は他の6本の井水との混合水）および小湊湧水について調べた．分析結果は Table 1. に示す．奥村地区の取水井の水温は22.5～23.5°を示し，平均23.2°を示した．この温度は本土関東地方の浅層地下水温[7] 15～17° に比べ高いが，沖縄宮古島あるいは石垣島の地下水温[8] 23.6～26.0° に比較すれば，僅かに低い．一般に，浅層地下水の水温は，その土地の年平均気温よりやや高い値を示す[7]といわれることから，妥当な水温と考えられる．色度および濁度は，それぞれ5～12度，0.5～4.7度を示した．これらは溶存するあるいは懸濁するマンガンおよび亜鉛が多いためと思われるが，前者は地質によるもの，後者は井戸わくに使われたコルゲート管から溶出したものと考えられる．pH は6.8～7.6を示し，9号井を除く他の井戸はすべて7.2～7.6の微アルカリ性を示した．これらの井戸は沖積低地にあり[2]，アンモニア性窒素が検出され，硝酸性窒素がほとんど検出されないことより，還元的地層にあるものと考えられる[9]．また，地形，地質から海水の浸透[3,10]も考えられること

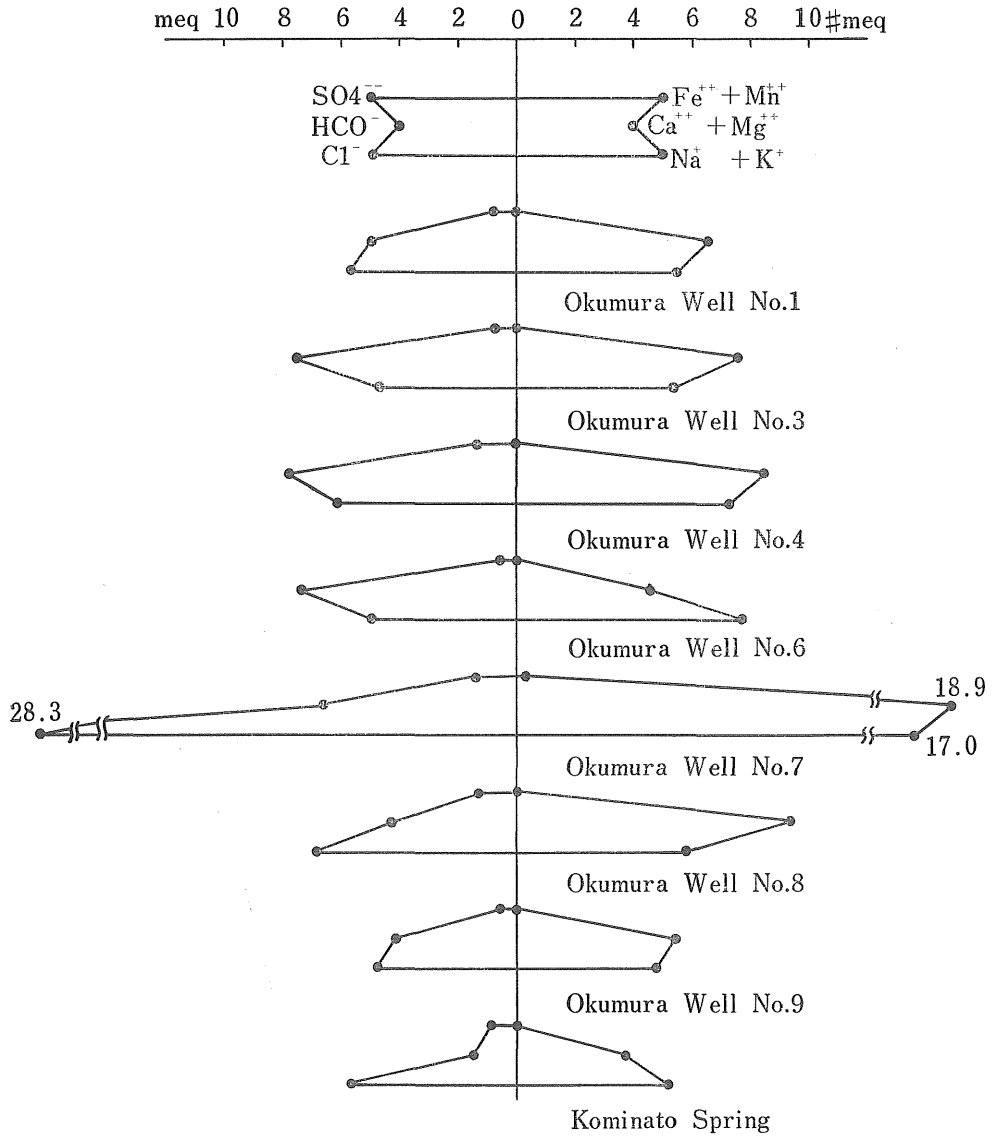


Fig. 3 Hexadiagrams of the Subteranean Waters on Chichi-jima Island

から，これらの井水は微アルカリ性を示すものと思われる．過マンガン酸カリウム消費量は比較的多く，5.1～9.0mg/l を示し，平均6.4mg/l であった．これは関東地方の武蔵野台地の非汚染地下水の2mg/l 以下，あるいは沖縄宮古島，石垣島における地下水の平均値1.7mg/l およびに比べてもかなり高いようである．しかし，地形，地質を異にする伊豆諸島の島々では，0.4～45mg/l と著しく幅があり，特に高い過マンガン酸カリウム消費量を示すのは，海岸に近い塩分濃度の高い井水である．蒸発残留物は600～2,700 mg/l を示し，平均1,000mg/l であった．また，塩素イオンは167～1,004mg/l を示し，平均 311mg/l を示した．これらの井戸のある沖積低地は旭川の扇状地であり，この川に沿って海水の浸入がみられるといわれる[2]．これら井水の主成分は Na^+, Ca^{++}, および HCO_3^-, Cl^- であり，Fig. 3 の Hexadiagram[13] に示すように NaCl 型または $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示している．

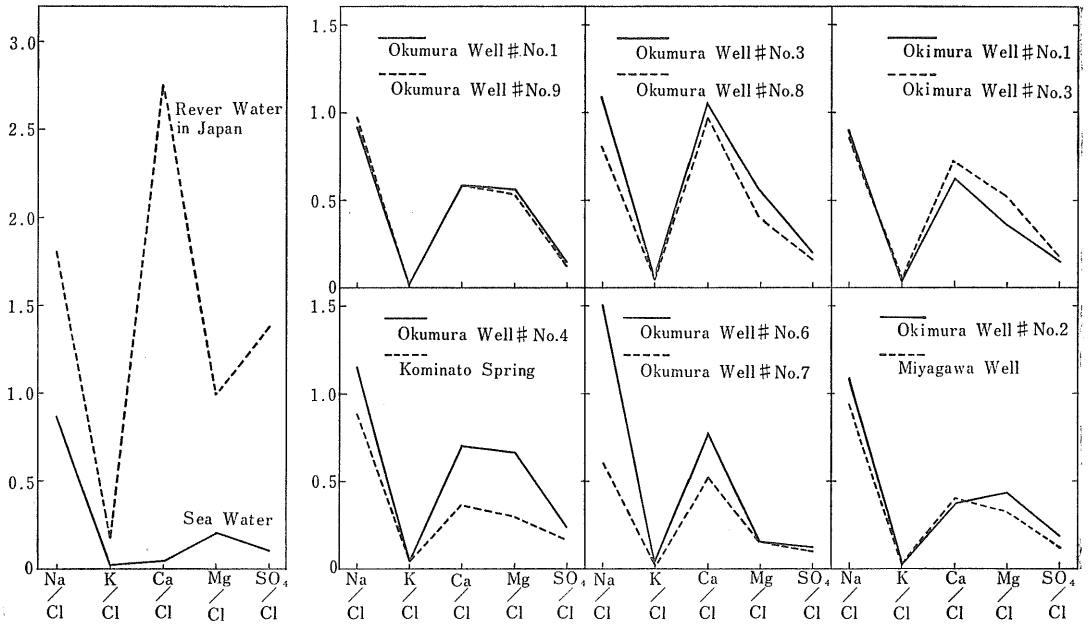


Fig. 4 Equivalent Ratio of Each Element to Chlorine in Subteranean Waters

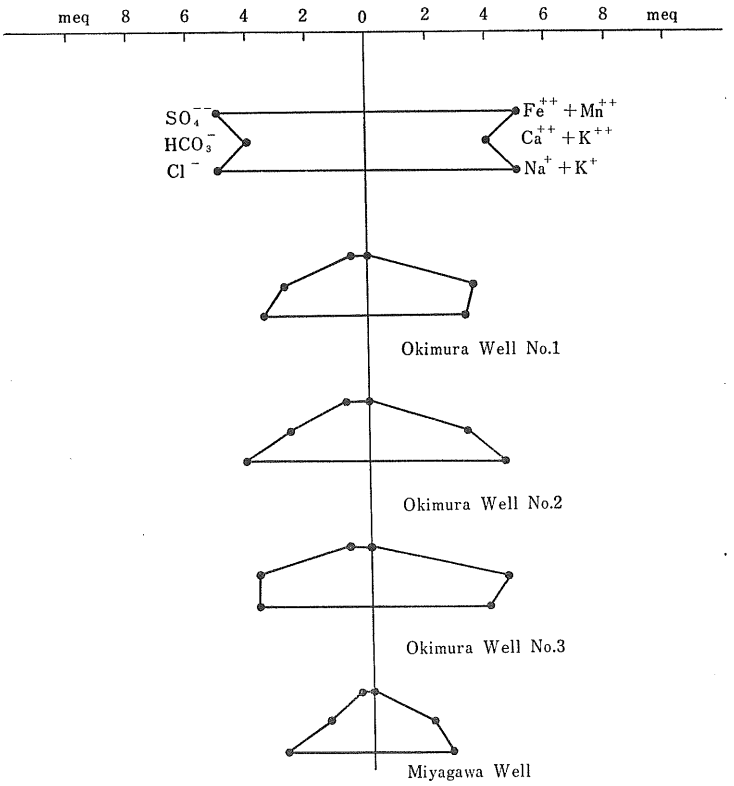


Fig. 5 Hexadiagrams of the Subteranean Waters or Haha-jima Island

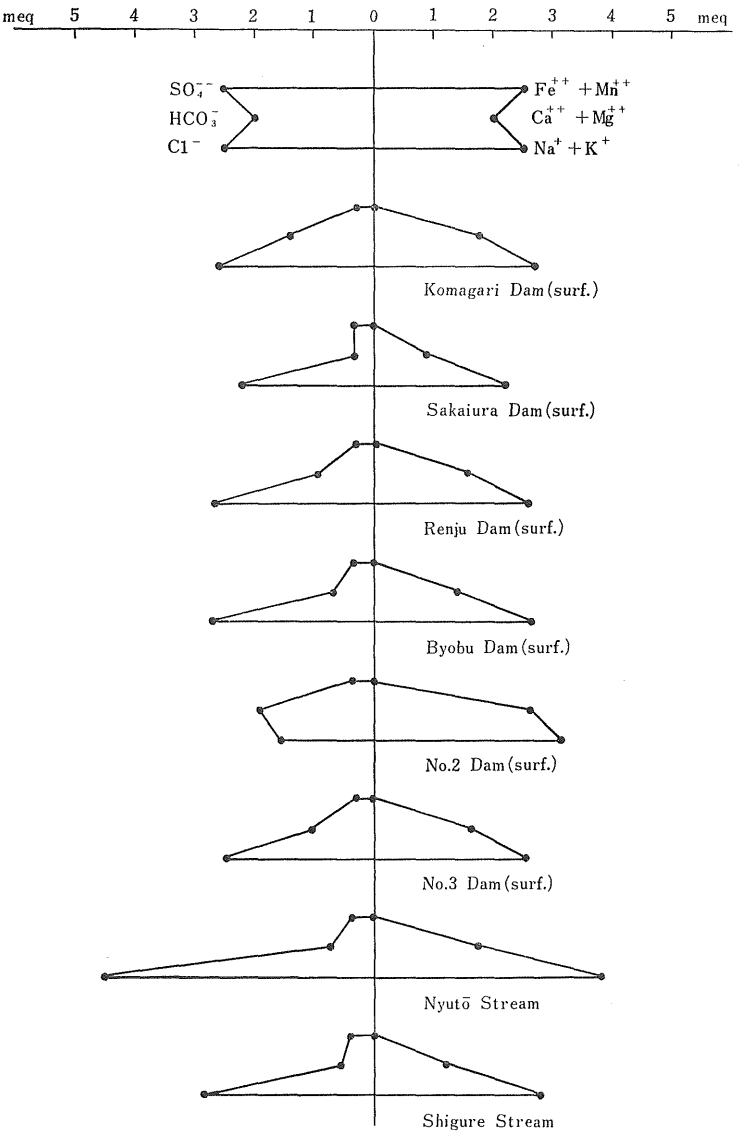


Fig. 6 Hexadiagrams of the Dam and Stream Waters on Chichi-jima Island

塩素イオンに対する各元素の当量比[14]を海水および本土の河川水と比較した．父島奥村井戸は，Fig. 4に示すように，Ca/Cl 当量比に対して，Mg/Cl 当量比が比較的近い1号井，4号井および9号井とその差の大きい3号井，6号井，7号井および8号井に分けられる．これは前者が旭川に近いため，その影響を強くうけているためと考えられ，後者ではむしろ地質の影響[14]を強くうけているものと考えられる．しかし，いずれも Ca/Cl>Mg/Cl を示す．これは小笠原の地表水（後述）あるいは海水と比較した場合，地層からの Ca^{++} の溶出が多いためと考えられるが，この地域の沖積層にはサンゴ混りの細砂層があり，この部分が主な帯水層になっている[8]ことが，Ca^{++} の溶出を多くしているものと思われる．

ちなみに，火山岩類を主体とした伊豆諸島の地下水[15]はいずれも NaCl 型の水質型を示しCa^{++}，HCl_0^-の濃度は低い．また，Ca/Cl と Mg/Cl の当量比は，いずれも Mg/Cl>Ca/Cl を示す．

小湊湧水は奥村井戸の水質と比較すると，濁度，色度はほとんどなく，微酸性を呈し，過マンガン酸カリ

ウム消費量も少ない．しかし，Na^+ および Cl^- 濃度は高く，水質型は NaCl 型を示す（Fig. 3）．また，Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比はその差の少ない Ca/Cl ＞Mg/Cl を示した(Fig. 4)．この小湊湧水は岩山の山麓より湧出するものであるが，地質的原因，すなわち，古い海成堆積層[1]の影響により，このような水質型を示すものと考えられる．

1．2．母島の地下水

母島における取水井3ヵ所および民家の井戸1ヵ所について調べた（Fig. 2）．

これら4本の井水の水温は 21.5～24.5° を示し，平均 22.8° 父島奥村井戸に比べ，やや低い値を示した．これは奥村井戸と比べやや深い 7 m付近に帯水層[17]があるためと考えられる．色度は 2～12 度，平均 6 度を，濁度は0.5～3.6度で平均 1.5 度を示した．これらも奥村井戸と同じく，マンガン，亜鉛がその主な原因となっているものと思われる．pH は6.5～6.7の微酸性を示し，アンモニア性窒素はほとんど認められないのに対し，硝酸性窒素が認められることより，この地層は酸化的地層と考えられる[9]．過マンガン酸カリウム消費量は2.7～3.9 mg/l，平均 3.3 mg/l で，父島奥村井戸の半量程度であった．蒸発残留物をはじめとして，他の成分も少ないが，武蔵野台地の地下水[18]に比べれば2倍以上の溶存物質を含有する．

沖村地区における地下水は Fig. 2 からわかるように，大谷川の伏流水と考えられる沖村1号井および宮川井戸と，前者に比べ塩類濃度の高い玉川の伏流水と考えられる沖村2号井および3号井に分けられる．これらの井水は成分的にも蒸発残留物，Na^+，Cl^- および SO_4^{--} などにその差が見られる．各井水の Hexa-diagram を Fig. 5 に示す．水質型は奥村井戸と同じく NaCl 型または $Ca(HCO_3)_2$ 型である．Fig. 4 に示す各元素の塩素イオンに対する当量比 Ca/Cl および Mg/Cl から，その差の接近している宮川井戸と沖村2号井がより河川水の影響を強く受けているものと思われる．Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比は沖村2号井を除き Ca/Cl＞Mg/Cl を示す．

1．3．父島の地表水

(1) ダム水：小曲，境浦，連珠，屏風の4ダムの表面水および小曲，境浦ダムの中層，下層の水質ならびに小曲ダム接合井（取水口）の水質を調べた（Table 1. および Fig. 1)．

四つのダムの表面水の水温の平均は 27° で，色度は 40～80度を，濁度は29～45度を示し，濁色度が非常に高い．また，過マンガン酸カリウム消費量の平均値は 31mg/l，総鉄の平均値 0.60mg/l とこれらも高く，アンモニア性窒素も多量に検出される．これらのことは，これらダムの集水域の地質が極めて保水性が悪く[3]，流出が早いこと，年平均気温が高いため，有機物の生産量が多く，腐敗分解が早いこと[7]，また山地

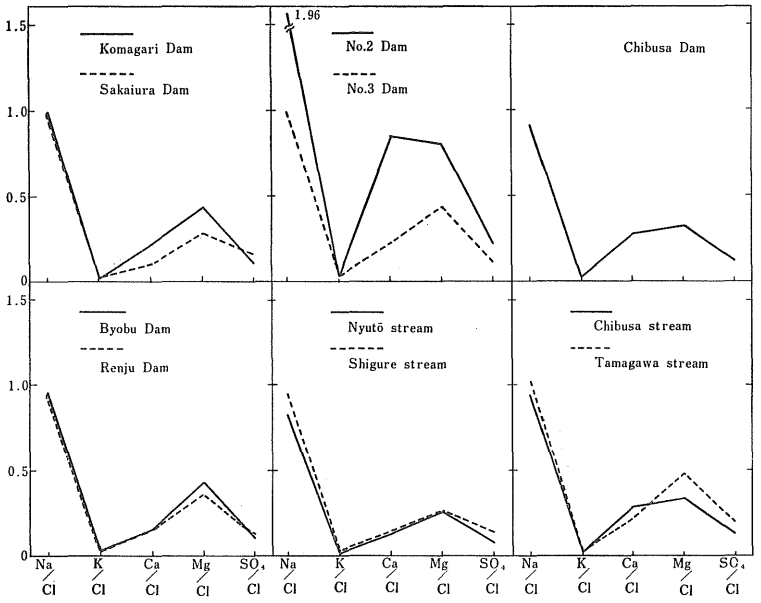


Fig 7. Equivalent Ratio of Each Element to Chlorine in the Surface Waters

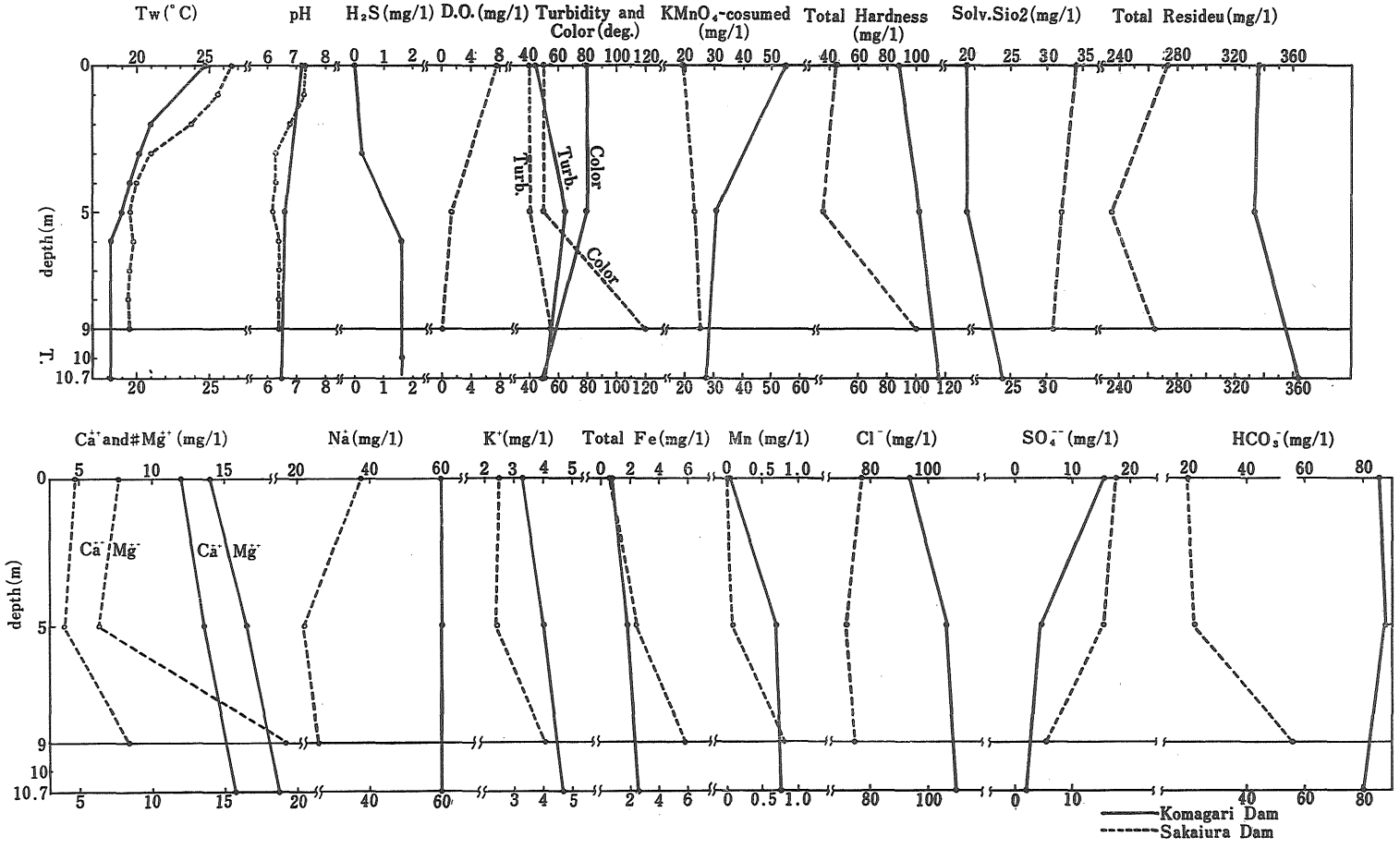


Fig. 8 Virtical Distribution of Chemical Components in Komagari and Sakaiura Dams

に多数生息する野生化した山羊等[4]の排泄物の影響などが考えられる．また，これらの水に鉄分の多いことは酸化鉄，酸化アルミニウムを主成分とするラテライト性赤色土壌が広くこれらのダムの集水域に分布している[3]ことに起因するのであろう．以上のことは，東南アジアの河川水[19]が高濁度で，有機物含量の多いことと類似している．蒸発残留物の平均は 305mg/l で，これらの水の主成分は Na^+ と Cl^- であり，Fig. 6 の Hexadiagram に示すように，その水質型は NaCl 型であった．

塩素イオンに対する各成分の当量比は Fig. 7 に示す．前記の地下水に比し，むしろ海水に近いパターンを示し，Mg/Cl>Ca/Cl である．これらの理由としては，海成堆積層[2,3]の影響および風送海塩[7]の影響が考えられる．

火山岩類を主体とした伊豆諸島では土の透水性が極めて大きい[16]ため表流水はほとんど存在しないが，沖縄本島などの河川水[8]を含め，本土の河川水[20]は一般に $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示し，Ca/Cl>Mg/Cl の当量比を示すことから，小笠原の表流水は特徴的といえる．

小曲ダムおよび境浦ダムの全層における水温および pH の測定，ならびに表面水，中層水および下層水の三層における各成分の分析を行なった (Table 1. および Fig. 8)．調査時が6月であったため，これらのダム水は成層しており，特に下層においては嫌気的還元状態となって，境浦ダムにおいては7m以深で，小曲ダムにおいては1m以深で硫化水素臭が感じられた．小曲ダムにおける硫化水素の測定値では，3mで 0.26mg/l，6mおよび9mで 1.60mg/l であった．これは成層が発達しているためと，特に，小曲ダムにおいては水中に未伐採の樹木が多く，これらが腐敗しているためと考えられた．なお，これら二つのダムの水質を異にするのは，集水域の広さ[3]，地質の相違なども影響しているものと思われる．

(2) 取水堰および沢水：第二水源，第三水源とも急峻な小さな沢を堰止めた僅か数 $10m^3$ の水をためた取水堰である．乳頭沢水は旭川の上流の乳頭山の中腹で採水した．また，時雨沢水は父島最大の川，八瀬川の上流の時雨ダム建設予定地で採水した (Fig. 1)．

水温は，比較的標高が高く，樹木でおおわれた地点で採水した乳頭沢水が20.4°と低かったが，他は 23.5～25.0°を示した．色度は 35～80 度，平均52度を，濁度は17～40度，平均25度であったが，いずれも，上流域の最も大きい[2]時雨沢水が高い値を示した．pH は乳頭沢水で8.4とかなり高い pH を示した．他は7.0～7.4 の中性～微アルカリ性であった．過マンガン酸カリウム消費量は平均で17.5 mg/l，総鉄は平均で 0.60 mg/l であった．これらの値においても時雨沢水が最も高い値を示した．また，蒸発残留物は309～459mg/l で，平均380mg/l とこれはダム表面水に比べれば，やや高い値を示している．

Fig. 6 に Hexadiagram を示す．これらの水はいずれも NaCl 型であったが，第二水源は特に Ca^{++}，

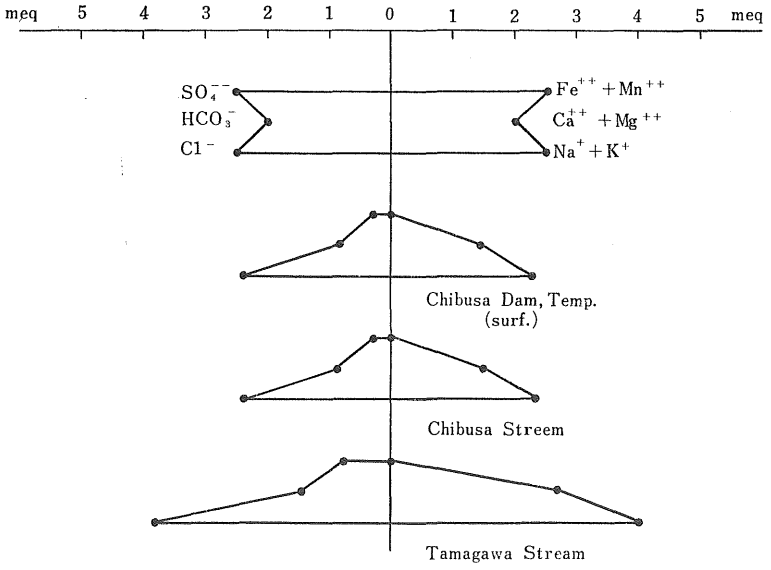


Fig. 9 Hexadiagrams of the Dam and Stream Waters on Haha-jima Island

HCO_3^- の含量が多かった．塩素イオンに対する各成分の当量比は第二水源を除き，いずれもMg/Cl>Ca/Clであり，ダム水と同様に，海水に近いパターンを示した(Fig. 7).

1. 4. 母島の地表水

乳房ダム仮えん堤およびその上流の乳房沢および玉川沢の3ヵ所を調べた (Fig. 2).

Table 1. に示すように，成分的に乳房沢水（大谷川系）と玉川沢水（玉川系）に違いが見られ，玉川系の方が全般に塩類濃度が高い．しかし，乳房沢水においてはリン酸イオン濃度が高いことが目立った．大谷川系と玉川系の表流水がそれぞれ伏流水として地下水に影響を及ぼしていたことは前述した．しかし，全体的に父島の表流水とほとんど同じ傾向を示し，高濁度，高色度，高有機物，高鉄分の水質であった．

各水の Hexadiagram を Fig. 9 に示す．いずれもNaCl 型である．また，塩素イオンに対する各成分の当量比は Mg/Cl>Ca/Cl を示し，父島の地表水と同様に，海水に近いパターンを示した(Fig. 7).

なお，全体の水質の把握を容易にするため Fig. 10 に各水の key-diagram を示す.

2. 細菌学的試験

2. 1. 大腸菌群および一般細菌数

メンブランフィルター・Endo 培地・MTGE培地・フィールドラボセット（ミリポア社製）により大腸菌群および一般細菌数を調べた．父島，母島における水道原水24検体の他に，海水浴場8検体についても検査した．結果を Table 2. に示す.

父島，母島における地下水にはいずれも大腸菌群および一般細菌数が多数検出されている．これらの結果を化学的試験の結果と比較すると，汚染度の高いところに細菌数も多い傾向が見られた．しかし，これはこ

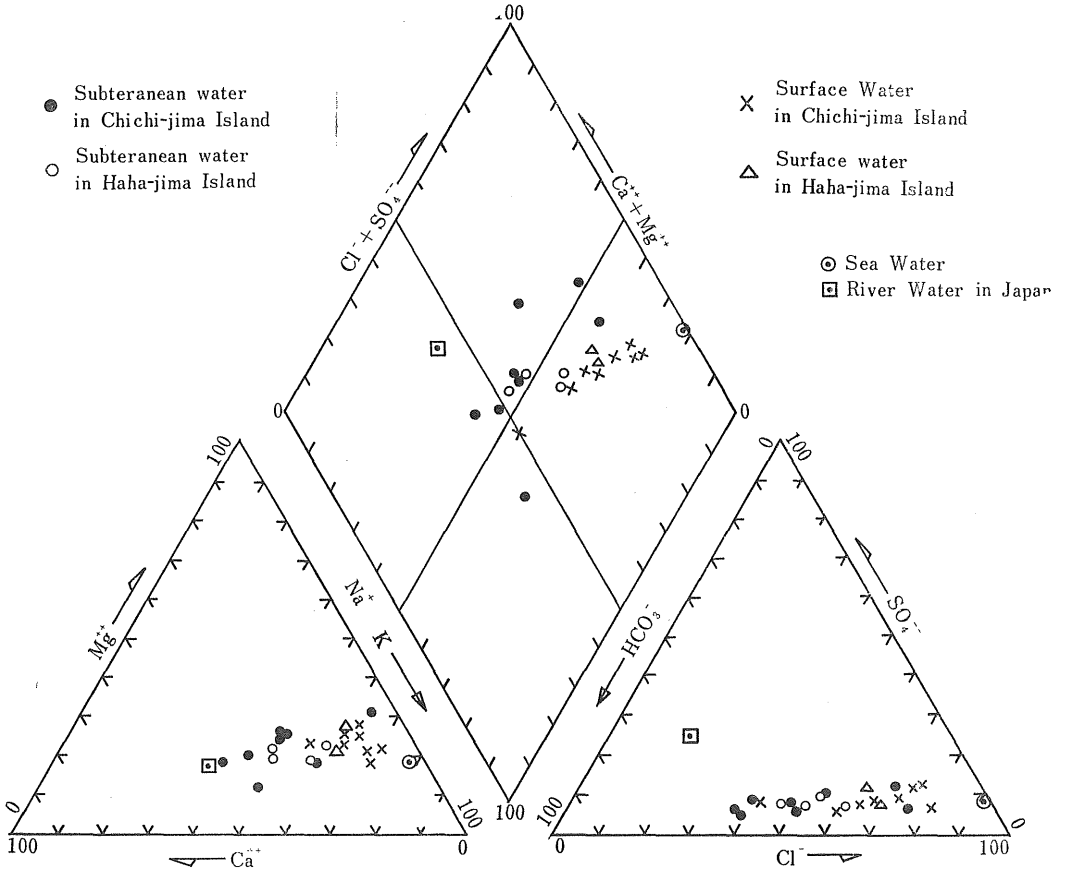


Fig. 10 Key-diagrams of the Surface and Subteranean Waters on the Ogasawara Islands

Table 2. Coli-form Bacteria and Viable Cell Counts of the Surface and Subteranean Waters and Sea Water on the Ogasawara Islands
(Tested by Membrane Filter, Field-Labo set)

Sampling Station	Number of Coli-form Group (per 25m*l*)	Viable Cell Counts (per 25m*l*)
Subteranean Water (Chichi-jima)		
Okumkra Well No. 1	40	350
〃 No. 3	3	14,000
〃 No. 4	72	140
〃 No. 6	31	3,400
〃 No. 7	640	40,000
〃 No 8	27	4,500
〃 No. 9	12	7,900
Kominato Spring	2	200
Subteranean Water (Haha-jima)		
Okimura Well No. 2	5	12,000
〃 No. 3	480	20,000
Miyagawa Well	75	>250,000
Surface Water (Chichi-jima)		
Komagari Dam (surf.)	3	3,400
Sakaiura Dam (surf.)	90	28,000
〃 (9 m)	10	700
Renju Dam (surf.)	3	3,400
〃 (2.5m)	7	2,300
〃 (5 m)	2	3,400
〃 (outlet)	3	2,300
No. 2 Dam	330	11,000
No 3 Dam	310	28,000
Nyuto Stream	280	8,500
Shigure Stream	900	12,000
Surface Water (Haha-jima)		
Chibusa Dam	80	>250,000
Sea Water (Bathing-Place)		
Reverse of Elementary School (Chichi-jima)	4	450
Futami Pier (〃)	12	790
Kiyose Estuary (〃)	80	>300,000
Okumura Estuary (〃)	270	>300,000
Ougiura Bay (〃)	7	55
Kominato Bay (〃)	5	2,300
Yastuse Estuary (〃)	19	> 30,000
Oki Port (Haha-jima)	250	>250,000

れらの取水井がいずれも口径の大きな開放式の浅井戸で，その上に簡単な小屋がけがしてある程度であることに加えて，地形，地質的にも，細菌的汚染を非常に受けやすい環境にあるためと考えられる．また，ダム水，取水堰水，沢水等においては，特に，上流の沢水や取水堰水に多い傾向がみられた．さらに，海水浴場においては，特に河口付近に細菌数が多く検出された．

Table 3. Result of INViC tests

Species of Coli-form Groups	Sampling Station of Isolated Strain	Number of Strains	%
Escherichia coli I	Okumura Well No.4, Sakaiura Dam, Byōbu Dam, No. 2 Dam, No. 3 Dam, Kominato Bay, Yastuse Estuary and Oki Port	9	32.1
Escherichia coli II	Okumura Well No. 3, Renju Dam (2.5m), Nyūtō Stream and Chibusa Dam	4	14.3
Citrobacter freundii I		0	0
Citrobacter freundii II	Renju Dam (outlet)	1	3.6
Klebsiella aerogenes I	Okumura Well No.1, Okimura Well No.3, Miyagawa Well (3), Futami Pier and Oki port	8	28.6
Klebsiella aerogenes II		0	0
Irregular types	Okumura Well No.7, Nyūtō Stream, Shigure stream (2), Reverse of Elementary School and Ougiura Bay.	6	21.4
Total		28	100

2. 2. 大腸菌群の INViC 試験による分類

上記，メンブラン・フィルター・Endo 培地・フィールドラボセットによって検出された大腸菌群のコロニーを INViC 試験により，その分類を行なった．

メンブラン・フィルター上の大腸菌群コロニーをＢＧＬＢはっ酵管に移植，37° で48時間培養後，ガス発生をみたものを培地に画線培養（37°, 24時間）した．この培地上の定型的，亜定型的コロニーを斜面寒天培地およびＬＢはっ酵管に移植し，37°, 48時間培養し，ガス発生の再確認をしたのち，この斜面寒天培地上のコロニーを INViC 試験に供した．この方法により，28株を分離し，上水試験法に基づく INViC 試験を行なった．結果は Table 3. に示す．

この結果，大腸菌群の型は *Escherichia Coli I* が最も多く，以下，*Klebsiella aerogenes I*, *E. Coli II*, *Citrobactor freundii II* の順で同定された．この試験において，どの型にも該当しないイレギュラー型は21.4%であった．これらイレギュラー型の多くは，メチルレッド試験とフォーゲス・プロスカウエル試験は陽性，インドフェノール試験とクエン酸ナトリウム試験は陰性という性状を示した．哺乳動物の排泄物に起因すると考えられる *E. Coli I* および *II* 型が全体の46.4%も占めているが，これらは人のあまり踏込まない沢水からも検出されている．これらの原因は，山地に多数生息する野生化した山羊に由来するものと考えられる．

要　約

(1) 小笠原父島，母島は亜熱帯に属する太平洋上の島々であるため，地形，地質，気候などの影響をうけ，水道原水として得られる水は良質とはいえない．このため，筆者らは，昭和48年６月に約２週間現地に滞在し，地下水，ダム水，沢水等24ヵ所28検体の理化学的分析および大腸菌などの細菌検査を行なった．また，同時に海水浴場８ヵ所の細菌検査を行なった．

(2) 父島奥村地区の取水井７本は海に近い沖積低地にあり，塩類濃度が高い．Na^+, Ca^{++} および Cl^-, HCO_3^- が主成分で NaCl 型または $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示す．また，Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比を比較すると Ca/Cl>Mg/Cl を示す．なお，井戸わくに使われたコルゲート管より亜鉛の溶出がみられ濁りを生じるものもあった．

小湊湧水は Na^+ および Cl^- を主成分とする NaCl 型の水質型を示し，Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比を比較すると Ca/Cl>Mg/Cl を示す．

(3) 母島沖村地区の地下水は父島奥村地区の地下水に比べ塩類濃度は低いが，Na^+, Ca^{++} および Cl^-, HCO_3^- を主成分とする NaCl 型または $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示した．Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比を比較すると Ca/Cl>Mg/Cl を示した．また，父島の取水井と同様に，井戸わくからの亜鉛の溶出がみられた．

(4) 父島のダム水，取水堰水，沢水などの地表水は濁度，色度，過マンガン酸カリウム消費量，総鉄，Na^+ および Cl^- 濃度の高い NaCl 型の水質型を示した．塩素イオンに対する各成分の当量比は本土の河川水に比べ海水に近く，Mg/Cl>Ca/Cl を示した．また，ダム水においては成層がみられ下層は還元状態であった．特に，小曲ダムにおいては水面下１ｍで硫化水素臭が感じられた．

母島の地表水も父島の地表水とほとんど同じ水質を示したが，乳房沢水でリン酸イオンが多く検出された．

(5) 火山岩類を主体とする伊豆諸島の地下水の水質は NaCl 型の水質型を示し，Ca/Cl 当量比と Mg/Cl 当量比はいずれも Mg/Cl>Ca/Cl を示すのに対し，小笠原父島，母島の地下水の水質は成分比では，本土地下水と伊豆諸島の地下水の中間的性質を有するといえる．

また，伊豆諸島の土はきわめて透水係数が大きいため，地表水はほとんど存在しないが，沖縄本島を含め，本土の河川水は $Ca(HCO_3)_2$ 型の水質型を示し，Ca/Cl>Mg/Cl を示すのに対し，小笠原父島，母島の地表水は NaCl 型を示し，Mg/Cl>Ca/Cl であるのできわめて特徴的といえる．

(6) 父島，母島の地下水には多数の細菌および大腸菌が検出された．これらを化学試験の結果と比較すると汚染度の高いところに細菌数も多い傾向を示した．また，地表水においても多数の細菌が検出されたが，特に，上流の沢水，取水堰等に多数検出された．また海水浴場では河口付近に細菌数が多い傾向がみられた．

(7) 各水から検出された培地上の大腸菌群をINViC試験により，その型を分類した結果，哺乳動物の排泄物に起因すると考えられる *Escherichia Coli I* および *II* 型が全体の46.4%を占めた．これらは人のあまり踏み込まない沢水などにむしろ多数検出されていることより，山地に多数生息する野生化した山羊に由来するものであると考えられる．

謝　辞　本調査に当り，水道局水質センター（当時小笠原支庁開発課）前出繁次氏，小笠原村村民課白坂康郎氏，小笠原支庁上下水道課の皆様および衛生局環

境衛生部水道課の皆様に多大なご協力をいただいたことを，深く感謝いたします．

（本研究の一部は第10回水処理生物学会および第33回日本公衆衛生学会総会に発表いたしました）

参考文献

1) 東京都建設局公園緑地部：小笠原諸島自然景観調査報告書（1969）
2) 日本工営株式会社：昭和44年度小笠原村父島水道水源およびダムサイト地質調査報告書，144 pp.，(1969)
3) 東京都建設局公園緑地部：続・小笠原諸島自然景観調査報告書（1960）
4) 小笠原総合事務所，東京都小笠原支庁，東京都小笠原村：小笠原諸島の概要（1973）
5) 日本水道協会：上水試験方法，(1970年版) 661 pp.，(1971) 東京
6) 水道協会：飲料水の判定標準とその試験方法，(1950年版)，240 pp.，(1951) 東京
7) 半谷高久：水質調査法，399pp.，(1960) 丸善，東京
8) 兼島清：工業用水，81，31—32 (1965)
9) 木村康夫．山崎堅吉，中村弘：東京都立衛生研究所年報，20，123—130 (1969)
10) Todd, K.D.：*Jour. AWWA*, 66 (3)，180—187 (1973)
11) 中村弘，樋口育子，会田朋子：水道協会誌，456，4—13 (1972)
12) 東京都立衛生研究所所蔵データ（未発表）
13) 永井茂：工業用水，114，66—74 (1964)
14) 菅原健：陸水誌，22，49—65 (1961)
15) 岩崎文嗣：工業用水，55，31—44 (1963)
16) 東洋大学工学部工業技術研究会：三宅島の水道水源調査報告書，66pp.，(1973) 東京
17) 日本工営株式会社：昭和44年度東京都小笠原村母島水資源基本調査報告書，84pp.，(1970)
18) 東京都立衛生研究所所蔵データ（未発表）
19) 小林純：農学研究，46，63—112 (1958)
20) 小林純：用水と廃水，2，(1)，9—24 (1958)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 445 — 451, 1974

水の臭気に関する基礎的研究（Ⅰ）三宅島大路池の臭気成分について

土屋悦輝*

The Basic Research on the Causes of odors in the water. (Ⅰ) Studies on Odorous Materials in the water of the Pond of Tairo at Miyakejima

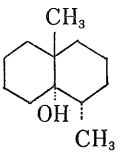
YOSHITERU TSUCHIYA*

Earthy-must odors and tastes came from the water of the Pond of Tairo which is a raw water source of water supply of Miyakejima. Threshold odor in water of the Pond of Tairo revealed about 71°～125°. Earthy-musty-smelling Streptomyces were isolated from the sediments in the Pond of Tairo.

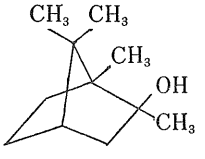
Also the same odors were isolated from the water by means of carbon adsorption. Gas chromatographic examination of these odorous materials in which two different colums (10% SE-30, 10% PEG 20M) was used indicated the presence of materials having the same retention time as 2-methylisoborneol and Geosmin. Furthermore 2-methylisoborneol and Geosmin were identified by each mass spectrum by means of gaschromatograph combind with mass spectrometer (GC-MS).

1 緒　言

近年河川，湖沼等が水質汚濁によって富栄養化現象を示し，そのために，藻類，放線菌等の異常発生や増殖をみている．その結果，これらの生物の代謝物が原因と思われるカビ臭が発生し，これらを水源としている上水道にも影響し，社会的問題として提起されているそこでカビ臭を発生する物質の同定，性状，またその発生機構を究明することが今後の重要な課題と考えられる．現在までにカビ臭を発生する代謝産物として，Gerber[1-3] らによって放線菌，藻類から Geosmin（Ⅰ），2-methylisoborneol（Ⅱ）などが確認されている．



（Ⅰ）



（Ⅱ）

日本では菊池[4,5] らが琵琶湖の底泥より分離した放線菌，湖水から Geosmin，2-methylisoborneol を検出している．また印幡沼[6] の水からも Geosmin，を検出している．今回筆者らは，三宅島の水道水源として利用している大路池において，カビ臭が発生し始めたので，その原因を究明するために水質，生物など環境調査を総合的に実施した．本報はそのカビ臭気物質の同定，確認を行なったものについてのみ報告する．

2 大路池の概要

三宅島は伊豆七島の一部で，島には大路池，新澪池とがあり，大路池は水道源水として多く利用されているが年間を通じてカビ臭を発生している．新井[7] らによって観測された池の水深図は Fig 1. に示す如くである．これによると，面積約 98,000m² で池の最深部は 9.4m で平均約 6.4m である．またこの池からは約 2,000t/day を水道源水として利用されている以外は，流入流出口がなく人為的汚染の全く考えられない閉鎖系の池で，周囲はシイの木等の樹木によって囲れている．

3 臭気濃度（T.O）の測定

年間を通じてカビ臭を発生していることから1972年8月，11月，1973年2月，5月，に現場で池の表層水について臭気濃度（以下T．Oと略す）を測定した．測定法は活性炭に水を通して無臭水を作り，池の表層水

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

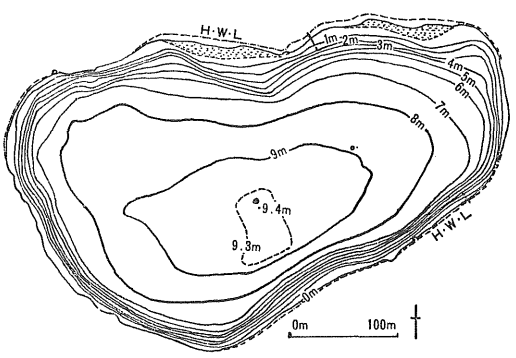


Fig 1. Bathymetric map of the Pond of Tairo.

を取りそれに無臭水を加え全量200mlとしその臭気をかぎ臭気が感じられる池の表層水の最小量を求めその希釈率からT.Oを求めた．その結果1972年8月，T.O 91°，11月，T.O 125°，1973年2月，T.O 77°，5月，T.O 71°を示し，夏から冬にかけ臭気が強く感じられ11月が最高値を示した．

4　臭気物質の分離，確認

（1）臭気物質の分離

カビ臭の原因物質を同定，確認するために池の底質から分離した放線菌の培養物と，池水から臭気成分の分離を行なった．

（1）—1　放線菌 Strain-7 からの臭気成分の分離．

池の底質を，Krainsky 培地アクチジオン100ppmを添加したもので培養して得られた放線菌の中から特にカビ臭の強い Strain-7 を Krainsky 培地平板80枚で30°C 7日間培養した．

この培養物を培地を含めフラスコに入れ，蒸留水を加え注意深く蒸留し留液をジクロルメタンで3回抽出し無水硫酸ナトリウムで脱水，これを常圧で加温し約1mlに濃縮した．

（1）—2　活性炭吸着法による臭気成分の分離．

1972年8月，11月，1973年2月に現場で池の表層水を粒状活性炭500gに流量約 1l/min で約1,000l通し吸着させた．（2月ではポンプ故障のため通過水量不明）．また1973年5月は水道水を活性炭500gに約1ヵ月通した．この活性炭にジクロルメタンを入れ浸漬し，一夜放置後溶媒を沪過した．上記浸漬操作を4～5回くり返し行ない約3lの溶媒を集めこれを無水硫酸ナトリウムで脱水し，常圧でゆるやかに加温し約1mlに濃縮した．

（1）—3　池水からの直接抽出分離．

特に臭気の強い8月底層の水（水深8m），約1lについてジクロルメタン約 50mlで直接抽出し，無水硫酸ナトリウムで脱水し，ゆるやかに加温し，約1mlに濃縮した．

（2）ガスクロマトグラフィーによる臭気成分の検出．

（1）で濃縮した試料について下記の条件でガスクロマトグラフィー（以下G．Cと略す）を行なった．

カラム；10% SE—30 Chromosorb W.AW. HMDS（80～100メッシュ），
10% PEG 20M Chromosorb W.AW. HMDS（80～100メッシュ）
ガラスカラム　2m×3mmϕ

検出器；FID検出器

カラム温度；140°

検出器温度；250°

キャリアーガス；窒素ガス 40ml/min

（3）ガスクロマトグラフ—質量分析計による臭気成分の確認．

GCで得られたピークについてガスクロマトグラフ—質量分析計（以下GC—MSと略す）によって確認を行なった．GC—MSは島津 LKB—9,000 を用い下記の条件で行なった．

GCカラム；10%　SE—30 Chromosorb W.AW.（80～100メッシュ）
ガラスカラム　1m×3mmϕ

検出器；TIC検出器

カラム温度；120°～140°

セパレータ温度；280°

イオン源温度；290°

Electron. Energg；70eV

Trap, Curr；60μA

Acc, Vol；3.5KV,

また明白なGCのピークが得られないものについてはマスフラグメントグラフィー（以下M. Fと略す）を用い上記と同じ条件で，2-methylisoborneol は m/e 95, 96, 97, Geosmin は m/e 111, 112, 113, を用いてそのマスクラグメントピークの保持時間と各スペクトルの相対強比を求めた．

（4）M. Fによる2-methylisoborneol の定量．

カビ臭を T.O で測定する場合，測定者の感覚には個人差があり測定値がばらつくことが考えられる．また 2-methylisoborneol, Geosmin のGCはECD検出器では検出できず，FID検出器では感度が悪く，

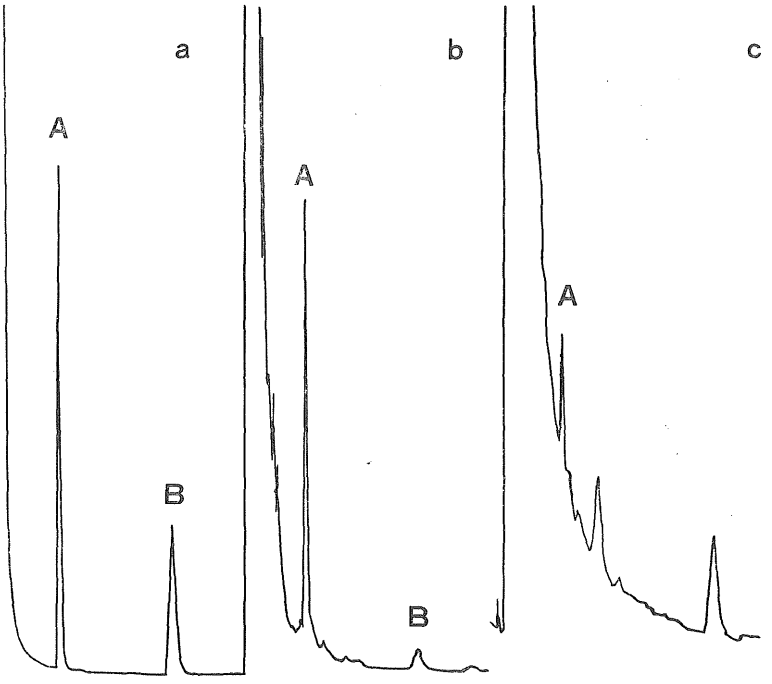


Fig 2. a) Gas Chromatogram of the Odorous Compounds as 2-methylisoborneol (a) and Geosmin. (B).
b) Gas Chromatogram of the Odorous Compounds of Strain-7 from the Pond of Tairo.
c) Gas Chromatogram of the Odorous Compounds from the Water in the Pond of Tairo.

さらにGCで得られたピークは保持時間の一致だけでは必ずしも同一物質と断定できない．そこでGC—MSのMFを利用して定量することを試みた．試料は定量的に分離抽出した8月の底層水（水深8m）を用いた．MFは m/e 95, 135, 150, を用いた．

5 結果および考察

（1） strain-7 の培養抽出物

strain-7 の培養抽出物からカビ臭が感じられた．この抽出物についてGCを行なった．その結果得られたガスクロマトグラムから，2-methylisoborneol, Geosmin と同一保持時間を示すピークが得られた．(Fig 2.) 2種のカラムで同一結果を示したことからカビ臭物質として 2-methylisoborneol と Geosmin が推定された．次にGC—MSで確認を行なった．2-methylisoborneol と推定されるピークのマススペクトルは基準ピーク m/e 95，分子イオンピーク m/e 168 を示し，その他のスペクトルも標準 2-methylisoborneol のマススペクトルと一致した．また Goesmin と推定されるピークのマススペクトルは，基準ピーク m/e 112，分子イオンピーク m/e 182 を示し，その他のスペクトルも標準 Geosmin のマススペクトルと一致した．Fig 3, 4. に標準 2-methylisoboneol, Geosmin, strain-7 の抽出物のマススペクトルを示した．以上の結果から放線菌 strain-7 のカビ臭気物質は 2-methylisoborneol と Geosmin によるものと確認された．

（2） 活性炭吸着抽出物

1972年8月，11月，1973年5月の試料ではカビ臭が感じられた．しかし1973年2月の試料では明白なカビ臭は感じられなかった．GCではいずれも同時に抽出された物質が多く相当数のピークが得られ，臭気物質と同一保持時間に重なるものも同時に多く抽出されたために，明白なピークは得られなかった．また更に，GC—MSピークについてマススペクトルを取ったが，標準臭気物質と同じマススペクトルは得られなかった．そこでさらに確認を行なうために多重イオン検出器を用いMFを行なった．その結果，1972年8月，11月の試料から2-methylisoborneol で m/e 95, 96,

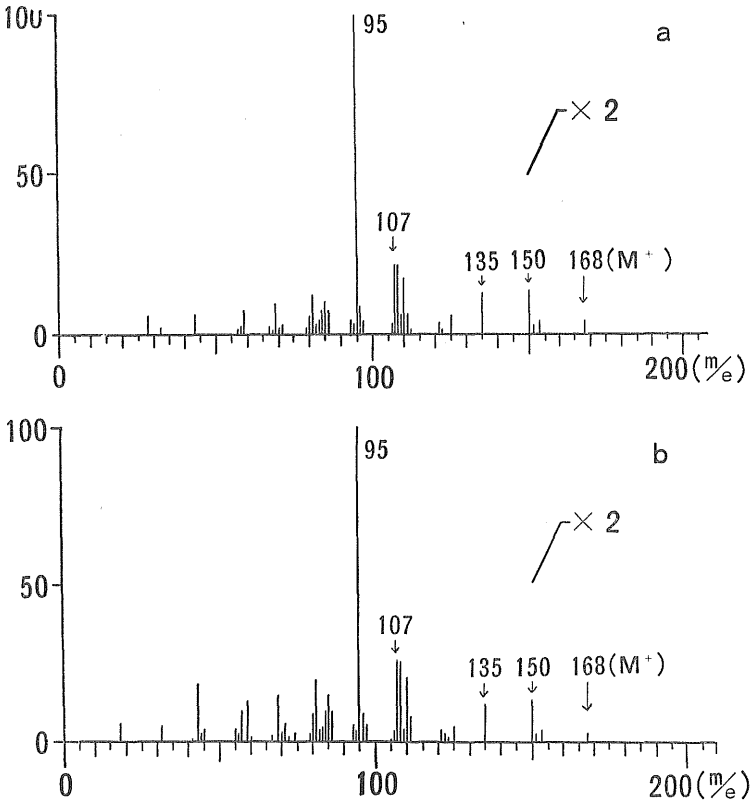


Fig 3. a) Mass Spectrum of Standard 2-methylisoborneol
b) Mass Spectrum of the Odorous Compound of Strain-7 (Peak A).

97, の相対強比が試料で21：1.3：1, 標準物質で21：1.25：1とほとんど一致し, MFの保持時間も一致した.

また Geosmin では1972年8月, 11月, 1973年5月の試料で保持時間および m/e 111, 112, 113, の相対強比3：10：1を得て標準物質と一致した. (Fig 5, 6.) しかし1973年2月の試料ではMFによっても臭気物質は確認できなかった. これはTO値も低く, 水中の臭気物質が低濃度であった上に活性炭への吸着が不足したことに起因するものと思われる. また1973年5月の試料で Geosmin だけ検出されたが 2-methylisoborneol は検出されなかった. これは TO値が低い時期でも長期間活性炭を通したことで多量の臭気物質が吸着したものと考えられる. しかし 2-methylisoborneol は構造的に不安定なため分解したものと考えられる. 以上のことから水の臭気物質として, 2-methylisoborneol, Geosmin の存在が確認された.

(3) 池の直接抽出物

試料にカビ臭が感じられた. GC では 2-methylisoborneol と同一保持時間を示すピークが得られたが, Geosmin のピークは得られなかった. GS-MS で 2-methylisoborneol と推定されるーピクのマススペクトルは標準と基準ピークm/l 95, 分子イオンピーク m/e 168, その他のスペクトルも一致した. Geosmin についてはMFによって確認を行なったが検出できなかった.

(4) MFによる 2-methylisoborneol の定量

標準 2-methylisobornoel 0～2,0 ng を段階的に取り m/e 95, 135, 150, のMFを取り検量線を作った. (Fig 7, 8.) 0.5ng ～ 2.0ng についてそれぞれ直線性が認められた. これによって試料を定量したところ, m/e 95 の検量線で, 1.05 ppb, m/e 135で1.03ppd m/e 150 で 0.85ppb, を示した. また GC-FID で測定したもので1.09ppb とほぼ近い値を示した. 特に m/e 95の基準ピークを用いた場合は 0.1 ng の測定が可能である.

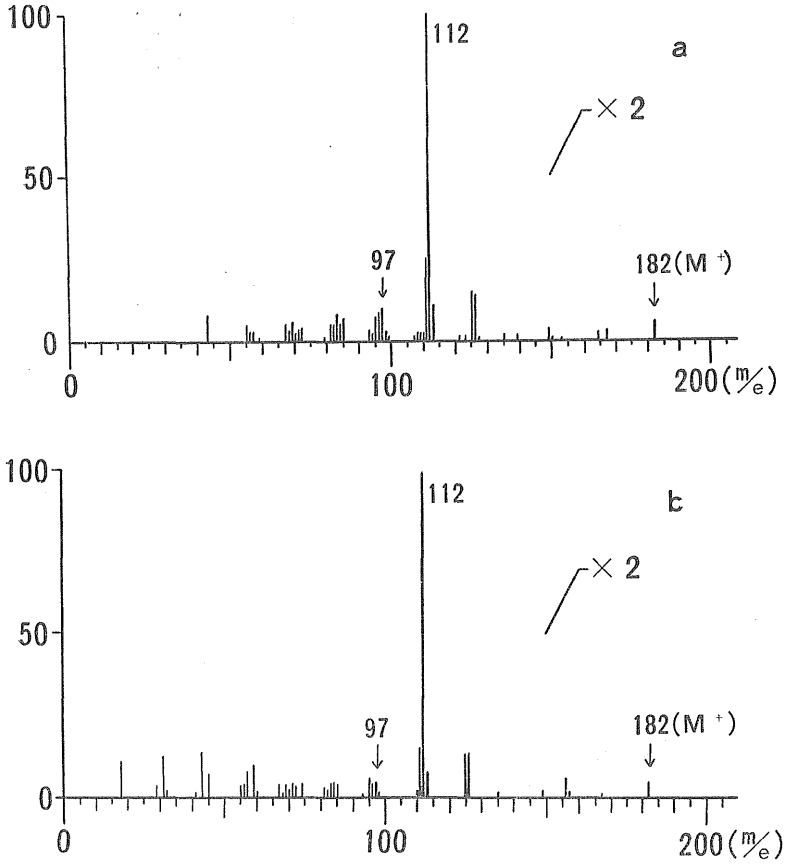
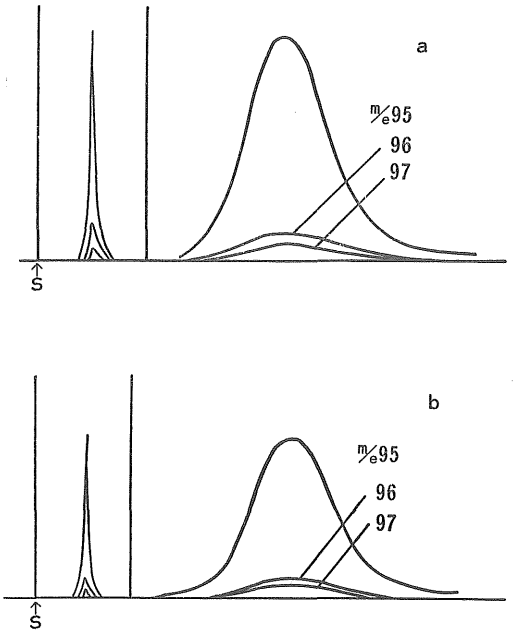


Fig 4. a) Mass Spectrum of Standard Geosmin.
b) Mass Spectrum of the Odorous Compound of Strain-7 (Peak B).



Feg 5. a) Mass Fragmentgram of Standard 2-methylisoborneol.
b) Mass Fragmentgram of the Odorous Compound from the Water in the Pond of Tairo.

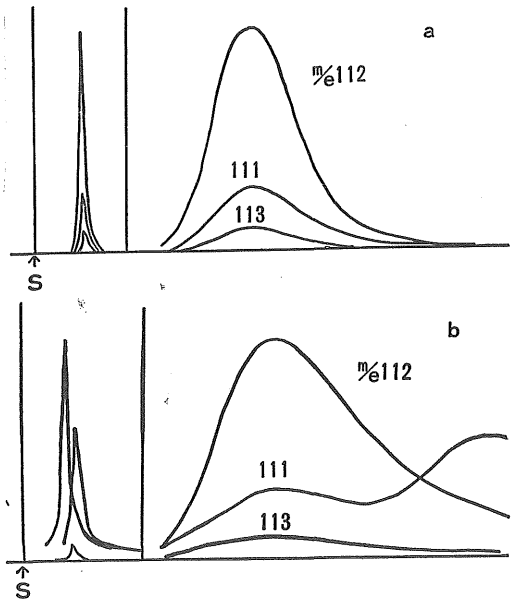


Fig 6. a) Mass Fragmentgram of Standard Geosmin.
b) Mass Fragmentgram of the Odorous Compound from the Water in the Pond of Tairo.

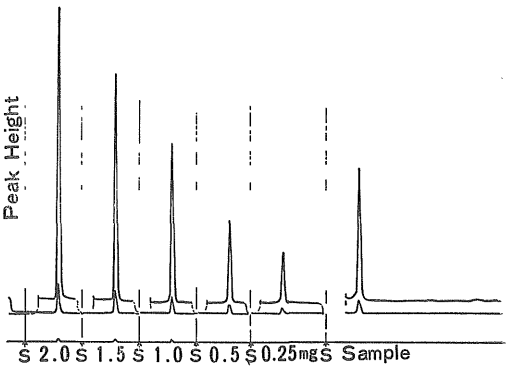


Fig 7. Mass Fragmentgram of Standard 2-methylisoborneol (m/e 95).

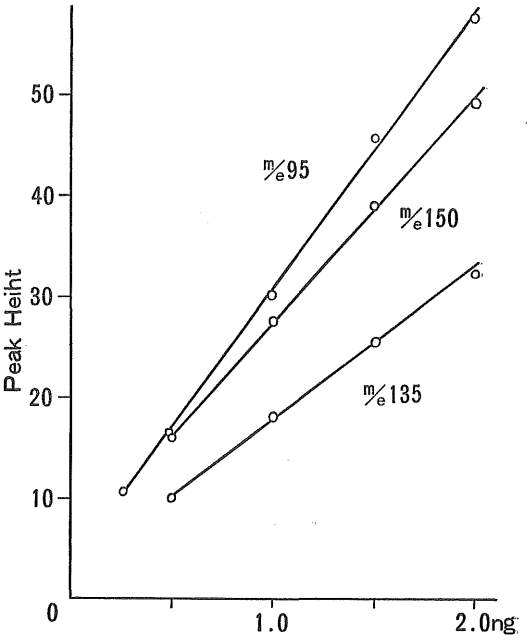


Fig 8. Calibration Curve of Standard 2-methlisoborneol by Mass Fragmentgraphy.

6 結　論

今回の調査の結果から年間を通じて感じられるカビ臭は 2-methylisoborneol, Geosmin が関与していると思われる. Strain-7 のガスクロマトグラムの 2-methylisoborneol, Geosmin のピーク面積を比較すると 2-methylisoborneol のほうが広く, また月 8 底層水からは 2-methylisoborneol, のピークが得られたことから大路池の臭気はこれに起因するものが多いと考えられる. また現在まで臭気物質を定量することが不可能であったがMFを利用することによって水中の微量

の臭気物質を確認定量することができた．今後は臭気の発生機構について究明する計画である．

謝辞：本研究に際し標準 2-methylisoborneol Geosmin を提供していただき，ご指導を得た京都大学薬学部菊池徹助教授，三村鉄太郎氏に深謝します．また Strain-7 の培養をしていただいた当所水質研究科松本淳彦主任研究員，総合調査における山崎堅吉主任研究員，松本浩一専門副参事，三村秀一水質研究科長，三宅村役場水道課各位のご指導に深謝いたします．

付記：（本研究の概要は日本薬学会第94年会昭和49年4月 日で発表した）

文 献

1) Lechevalier, H.A, and Gerber N.N.; *Appl, Microbiol* 13, 934—938 (1965)

2) Gerber, N.Nt *Tetrahedron Lellers*, 25, 2971—2974 (1968)

3) Gerber N.N; *Antibiotics* 22, 508—509 (1963)

4) 菊池徹，三村鉄太郎，森脇祥寿，根来健一郎，中沢昭三，小野尚子：薬 誌，93, 658—663 (1973)

5) 菊池徹，三村鉄太郎，森脇祥寿：薬誌， 92, 1441—1442 (1972)

6) Kikuchi, T. Mimura. T, Masada. Y, and Inoue, T; *Chem, Pharm, Bull.* 21, 1847—1848 (1973)

7) 東洋大学工学部工業技術研究会：三宅島の水道水源調査報告書，昭和48年3月

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25. 453 — 471, 1974

三宅島湖沼の陸水学的研究(I)
大路池および新澪の基礎調査

松本淳彦*

Limnological Studies on the Lakes of Miyake Island (I)
Fundamental Investigation of Two Lakes, Tairo and Shinmyo

ATSUHIKO MATSUMOTO*

In February, May, August and November 1972 and February 1973, the plankton communities and water qualities of Lakes Tairo and Shinmyo were surveyed fundamentally. Both lakes are located on Miyake Island about 180km south of Tokyo. Each of the two lake receive neither domestic sewages nor streams and has been kept natural for long times. However, the problem of musty odor occured in Lake Tairo.

(1) The morphological values of these two lake basins are shown in Table 1. The Lake Tairo is a fresh-water lake and has the maximum depth of 9.3m. The Lake Shinmyo, which is connected with the sea through the permeable stratum, is a brackish-water lake and has the maximum depth of 35.9m. The deep layer contains a larger amount of saline than the upper layer.

(2) The water colour of Lake Tairo was dark green and the occurrence of water-bloom was not obeserved during four seasons. However, in Lake Shinmyo, the water colour varied conspicuously to pale green, green, brown, and dark brown. The water-bloom of a blue-green alga, *Anabaena*, was observed to grow like a mat in August.

(3) Vertical distribution of water temperature, pH and dissolved oxygen saturation in the two lakes are shown in Figures 5, 8 and 9. Water temperature of Lake Shinmyo changed complicatedly and some abnormal thermoclines were observed in the upper layer above the 15m depth in each month (Fig. 8). The dissolved oxygen exceeded 100% of saturation and it was 124.4% at 4m depth in Lake Tairo and 176.2% at the surface water of Lake Shinmyo in august (Fig. 5, Fig. 9). However, dissolved oxygen in the deep layer below 10m depth of Lake Shinmyo was seldom or never detected during four seasons.

(4) Seasonal and vertical distributions of phytoplankton are shown in Tables 3, 7 and Figures 6, 10. Seasonal variations of zooplankton are also shown in Tables 4 and 8.

These populations of plankton in Lake Tairo were large. But, in Lake Shinmyo, the number of taxa was comparatively few, which grew in large populations in August.

The twenty-one taxa of phytoplankton and twenty-seven taxa of zooplankton were found in Lake Tairo, and only six taxa of the former and eleven taxa of the latter were found in Lake Shinmyo.

(5) Seasonal succession of the dominant plankton in Lake Tairo were *Synedra acus* and *Pomphoolyx complanata* in February, *Ankistrodesmus falcatus* var. *mirabilis*, *Dinobryon sertularia* and *Bosmina longirostris* in May, *Mougeotia* sp., *Ceratium hirundinella* and *Euglena* spp. in August, *Mougeotia* sp. and *Peridinium* sp. in November 1972, and *Synedra acus* and *Brachionus angularis* var. *bidens* in February, respectively.

(6) In Lake Shinmyo, Seasonal succession of the dominant plankton were *Chroococcus dispersus*,

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Ankistrodesmus falcatus var. and *Keratella varga monstrosa* in February, *Chaetoceros Muelleri*, *Brachionus plicatilis* and *Karatella valga monstrosa* in May, *Anabaena* sp. and *Peridinium* sp. in August, *Chroococcus dispersus* and *Peridinium* sp. in Novemder 1972, and in February 1973, respectively.

1. まえがき

数年前に，利根川[1]，江戸川[2]，多摩川[3,4]など河川水域で異臭発生問題が起こった．また，湖沼，貯水池では，琵琶湖をはじめとして水道水の異臭とくにカビ臭の発生が多方面で大きくクローズアップされつつある．わが国においては，1951年に神戸市の千苅貯水池[5]で発生をみたのが最初のようであり，その後，長崎市[6]，宇部市[7]，京都市[8~10]，千葉市[11]など各地で発生するようになってきた．最近では神奈川県の相模湖で発生したという報告[12,13]がみられた．これら水系における異臭発生原因は，いずれも都市廃水や工場排水によって汚染された河川水が流入し，その水域が富栄養化されたためである．そして藻類や放線菌類などが異常増殖する結果，発臭代謝物が産生されるためであろうというのが通説となっている．この発臭原因物質も，Geosmin, 2-Methylisoborneol, Diethyl Sulfide などが証明されたという報告[14-16]がみられている．

今回，著者が調査する機会を得た三宅島の湖沼についても，その発端となったのは異臭発生であった．前述のように，異臭発生はいずれも汚濁河川等の流入による水域の汚濁が原因となっている．ところが，三宅島の湖沼は，その富栄養化の進行過程がまったく異なっている．すなわち，湖には流入，流出する河川がなく，周囲は椎を主体とした常緑樹で覆われ，人為的な汚染がなく自然状態が保たれている．しかしながら，これら喬木の枯枝や落葉が多量に水中へ落下しているため，有機物はかなり供給されているものと推察される．

三宅島には，大路池，新澪の二つの大きな湖があるが，大路池は水道水源として使用されている．異臭が発生しているのは，本池の表層水を取水して塩素処理，急速沪過を行なって給水している系統の水道水である．島民の話では，臭いばかりでなく金属などに白い斑点がついたり，腐蝕がはやいなどの苦情が多く，飲用にはほとんど使用されていないのが実状である．

1971年に三宅村簡易水道の水質改善計画がなされたおり，都衛生局および三宅村役場から調査依頼を受けた．三宅島の湖沼については，1932年に吉村，宮地[17,18]が学術的に調査したのが最初であり，その後，福島らの多くの報告[19~21]がみられている．著者らが水道水源として大路池を調査した結果はすでに報告[22]したが，本報は大路池，新澪の陸水学的な基礎調査の結果である．

2. 大路池と新澪の湖盆形態

三宅島は図1に示したように東京の南方約 180km に位置し，伊豆七島の中の一つで周囲約 40km のほぼ円形の島である．二つの湖は島の南側海岸寄りにあり（図2），大路池は淡水湖であるが新澪は汽水湖である．そしてともに火口湖である．堀江[23]，新井[24]らの報告によると，両湖の位置および湖盆形態は表1のようになり，その測深図は図3，図4のとおりである．これによると，新澪は面積が大路池の約$^1/_2$であるが，水深は約4倍あり，容積は約2倍となっている．遷移的な湖沼型からみると新澪は貧栄養型であり，大路池

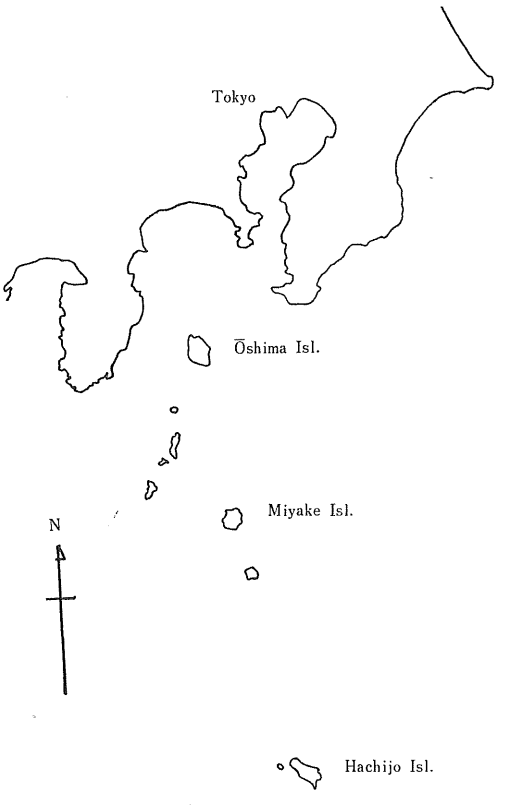


Fig 1. Location of Seven Izu Islands
Miyake Island is situated 176 Km south of Tokyo.

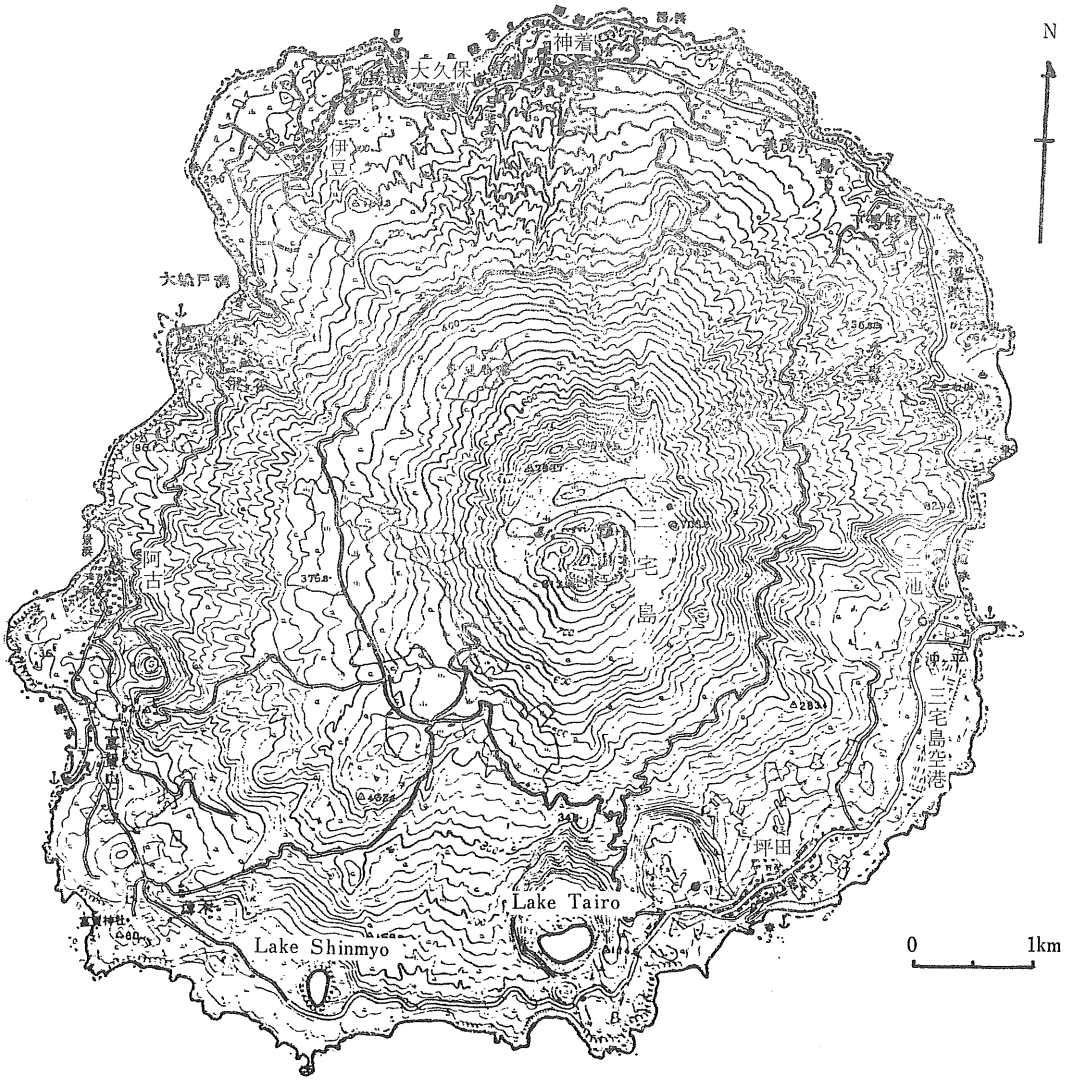


Fig 2. Map of Miyake Island
Two Lakes, Tairo and Shinmyo, are situated about 500m and 300m from coast, respectively.

は富栄養型であるといえる.

3. 調査時期と調査方法

調査は1972年2月15, 16日, 5月22, 23日, 8月28 29日, 11月27, 28日および1973年2月18, 19日の計5回にわたって実施した. 調査地点は, 両湖とも最深部に一点をおき, ブイを浮かべて定点とした. そして5 l 容のバンドーン採水器を使用して, 大路池については2mごとに, 新澪については5mごとに採水を行なった. 底泥はエクマンバージ採泥器を使用して採泥した. 水温, 電気伝導度は電気水質計（東邦電探製, EST—3型, コード40m）を使用して1mごとに測定を行なった. pHは比色法, 溶存酸素はウインクラーアジ化ナトリウム法により, 現場測定を行なった. その他, 化学分析, 細菌学的試験は, 実験室へ持帰り, 主に上水試験法[25]に準じて分析, 培養を行なった.

4. 調査結果

4—1 大路池について

湖岸の水底は小砂利, 小石大の火山石であり, 堆積物は少ない. しかし, 湖心に進むほどプランクトン等の骸泥が厚く堆積している. 硫化水素臭は強いが緑褐

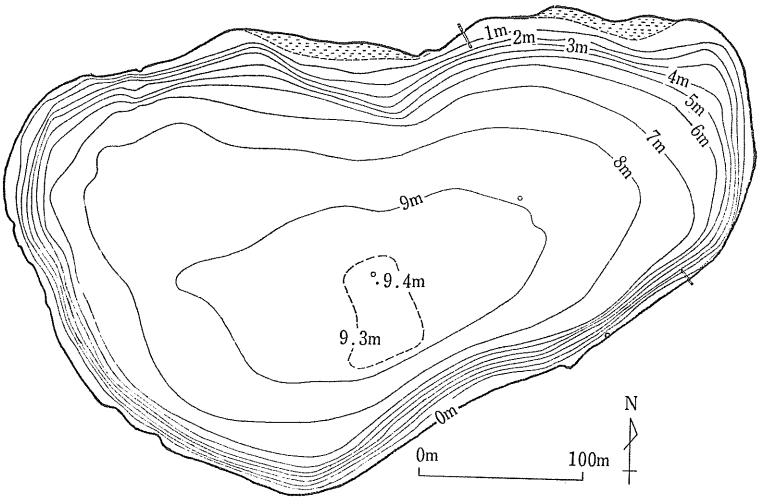


Fig 3. Contour Map of Lake Tairo

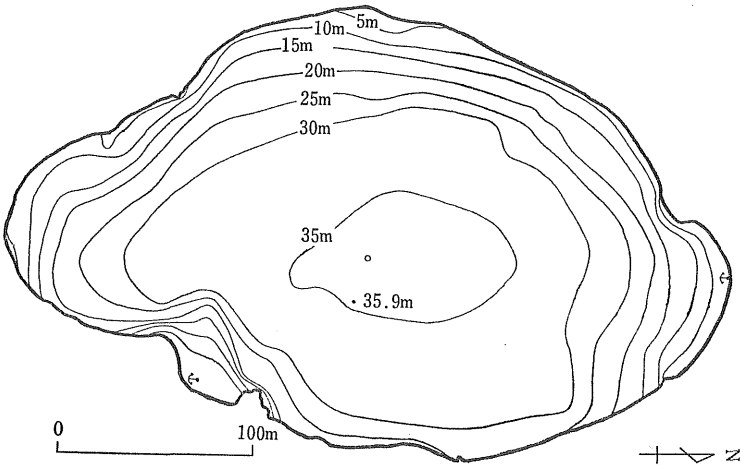


Fig 4. Contour Map of Lake Shinmyo
∘ : Sampling Station

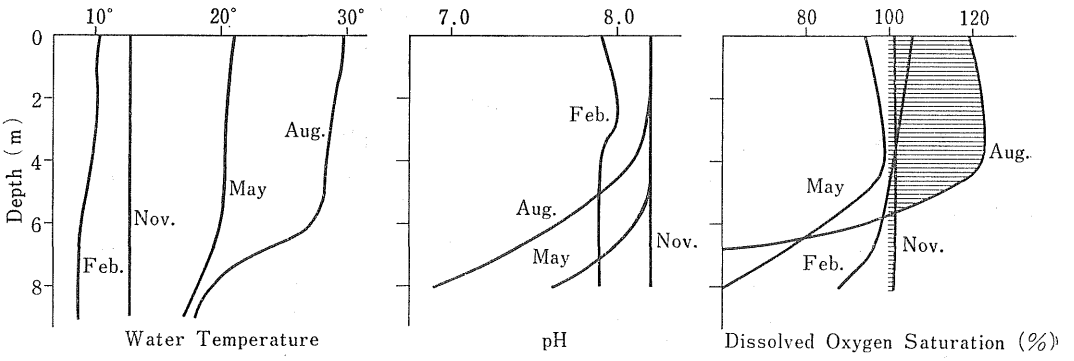


Fig 5. Vertical Distribution of Water temperature, pH and Dissolved Oxygen Saturation in Lake Tairo

Table 1. Morphometry of Lake Basin of Two Lakes, Tairo and Shinmyo

Morphometrical values		Lake Tairo	Lake Shinmyo
Longitude (E)	*	137°32′	137°30′
Latitude (N)	*	34°03′	34°03′
Altitude (m)	*	0	0
Length (m)	*	500	400
Breadth (m)	*	300	200
Length of Shore Line(m)	*	1,300	1,000
Area(m^2)	**	98,806	57,640
Maximum Depth(m)	**	9.25	35.9
Mean Depth (m)	**	6.34	25.32
Volume (m^3)	**	645,843	1,459,217

* Horie, S. (1956) ** Arai, T. (1972)

色を呈している．沿岸部には天然記念物のタイロモのほか，ホザキノフサモ，エビモの水草とくにホザキノフサモ（*Myriophyllum spicatum* L.）が多く繁茂している．北側の岸辺には，ガマ，アシ等の挺水植物もかなり繁茂している．また本湖には，鯉，ワカサギ，スジエビ，スッポンの生息が確認され，とくにワカサギが多いようである．

(a) 水色と透明度

本湖の水色は，黄緑色，緑色，濃緑色と周年緑色系の色を呈している．調査期間中の透明度は，1.0～2.3 mで，もっとも高かったのが8月の2.3mであり，最小は11月の1.0mであった．これはプランクトンの増殖が，8月に少なく，11月に多かったためであり，多くの富栄養湖とは違ったプランクトンの消長があるものと考えられる．

(b) 水温

本湖では周年水温が4°以下には降下せず，最低水温でも7.2°（1974年1月の表面水温）であった．図5に四季における水温の垂直分布を示したが，11月は完全循環期であり，表層から底層まで等温となっていた．2月から5月にかけてやや成層がはじまり，6m付近で小さな躍層がみられるようになった．8月の停滞期になると，5～7m層に明瞭な変水層が生じている．この時の表層水と底層水との温度差は10.6°にもなっている．年間の水温較差は表面水で19.4°，底層水では10.5°であった．水温から，また地理的にも本湖は熱帯湖に該当[20]している．

(c) pH

表層水のpHは，四季とも7.9～8.2のアルカリ性を保っている．2月，11月の循環期には，水温と同様に全層ほとんど同じ垂直分布であった．しかし，5月になると4m層で，8月には2m層で急に低くなり，表層と底層とではそれぞれ0.6，1.3の差が生じており，8月のみ pH 6.9と微酸性側に傾いていた．

(d) 溶存酸素

2月，8月，11月の表層水の溶存酸素は過飽和状態を示しており，特に11月は底層まで過飽和となっていた．この観測時は風が非常に強かったことも影響していると思われる．停滞期の8月における垂直分布は顕著であり，水深4mでもっとも高い127.4%の過飽和率を示し，表層，2m層よりも飽和率が高くなっていた．これは，停滞期に入りつつある5月においても同様な傾向がみられている．そして4m以深に至ると急に減少し，8月の底層水は無酸素状態を呈し，硫化水素の発生が認められた．

(e) 化学成分

電気伝導度は 520～740μv/cm の範囲にある．2月が520～535μv/cm ともっとも低く，8月は710～740 μv/cm と高くなり，多少季節によって変動がみられている．水深による差はほとんど認められない．

1964年に本池水の化学分析が行なわれているが，10年前には塩素イオンが135.1mg/l，総硬度が372mg/lとかなり高濃度であった．今回の調査では前者が76.5～91.7mg/l，後者が216～268mg/l といずれも低下していた．しかし，琵琶湖水などと比較すると10倍ほど高くなっているが，これは地質や塩風の影響が強いためと考えられる．その他の成分については表2に示した．

(f) プランクトン

植物プランクトンの季節的な消長と，深度2mごとの出現個体数を表3に示した．藍藻類2，珪藻類7，緑藻類12の計21taxaがみられた．このうち表には示

Tabel 2. Results of Chemical Analyses of Lake Tairo

Date		Depth (m)	W. T. (°C)	Specific Conduct. (μv/cm)	pH	DO (%)	Cl^- (mg/l)	$KMnO^4$ Consumed (mg/l)	Total Hardness (mg/l)	SiO^2 (mg/l)	PO_4^{--} (mg/l)	NH_3-N (mg/l)	NO_2-N (mg/l)	NO_3-N (mg/l)
1972	Feb. 15	0	12.0	—	8.0	103.5	85.3	6.2	240	20.9	0.026	—	—	—
		2	12.0	—	8.0	101.6	85.3	10.0	244	20.2	0.038	—	—	—
		4	11.9	—	8.0	101.4	85.3	9.4	240	19.9	0.038	—	—	—
		6	11.2	—	8.0	99.8	82.5	8.5	244	20.2	0.032	—	—	—
		8	11.8	—	8.0	92.5	86.7	8.0	244	20.4	0.042	—	—	—
	May 22	0	21.1	630	8.2	94.5	82.0	5.6	224	16.1	0.015	—	—	—
		2	20.6	640	8.2	97.1	79.2	4.5	220	15.6	0.018	—	—	—
		4	20.4	630	8.2	99.1	82.0	5.9	224	20.0	0.012	—	—	—
		6	20.0	620	8.1	83.7	80.6	5.2	228	16.4	0.012	—	—	—
		8	18.2	630	7.6	60.1	43.4	5.3	228	16.5	0.012	—	—	—
	Aug. 29	0	29.8	730	8.2	119.2	76.5	7.6	216	20.9	0.022	0	0	0
		2	29.1	720	8.2	123.3	76.5	7.7	220	21.3	0.022	0	0.11	6.11
		4	28.5	710	8.1	127.4	76.5	7.9	224	20.7	0.024	0	0	0.3
		6	27.3	740	7.6	91.9	82.0	10.3	232	22.5	0.087	0	0	2.0
		8	19.2	730	6.9	0	91.7	23.7	268	30.0	0.141	1.8	0.02	2.0
	Nov. 28	0	12.7	550	8.2	101.2	86.2	12.1	244	27.2	0.048	0	0	0
		2	12.8	550	8.2	101.5	84.8	12.9	252	26.4	0.053	0	0	0
		4	12.8	550	8.2	101.5	87.6	13.8	252	27.7	0.053	0	0	0
		6	12.7	550	8.2	101.2	87.6	11.2	260	26.1	0.049	0	0	0
		8	12.7	550	8.2	101.2	86.2	11.9	264	26.4	0.049	0	0	0
1973	Feb. 18	0	10.4	530	7.9	106.2	83.4	4.4	248	17.6	0.053	0	0	0.02
		2	10.2	535	8.0	103.0	86.2	4.4	248	14.9	0.053	0	0	0.02
		4	9.8	530	7.9	100.1	86.2	4.4	252	14.9	0.050	0	0	0.02
		6	9.0	520	7.9	98.3	87.6	4.2	260	14.7	0.041	0	0	0.02
		8	8.7	530	7.9	88.7	87.6	4.7	252	14.7	0.036	0	0	0.02

Table 3. Seasonal Variation of Phytoplankton in Lake Tairo

Name of Phytoplankton. \ Date / Depth(m)	1972																				1973				
	Feb. 15					May 22					Aug. 29					Nov. 28					Feb. 18				
	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
Cyanophyceae																									
Chroococcus sp.	500	590	340	440	530	1,200	920	1,000	1,400	1,200	1,000	540	500	540	520	40	160	60	180	220	50	130	86	80	80
Oscillatoria sp.	160	100	60	50	50	300	260	80	120	140	780	540	600	520	300	640	480	420	520	420	80	76	40	76	60
Bacillariophyceae																									
Cyclotella kützingiana	140	150	230	130	230	60	100	40	140	40						340	140	220	160	140	3		3	3	6
Fragilaria sp.		30			10		20							20											
Synedra acus	7,300	7,400	8,300	5,700	9,000	2,400	2,200	2,200	3,200	2,800	20	80	60	40	10	3,200	2,200	3,000	3,200	3,500	8,000	8,800	7,900	11,000	15,000
Synedra ulna	40	50	50	50	80	200	180	200	260	240						480	260	260	440	460	26	26	23	20	40
Achnanthes sp.			150		20	20																			
Navicula sp.		90	10				20	20					20												
Gomphonema sp.	10								20												3	3		3	
Chlorophyceae																									
Dictyosphaerium pulchellum											40					20	20		40						
Tetraedron minimum	120	100	60	110	90	220	340	260	540	420	60	20	20	20	100	60	60	40	20	60	65	56	40	50	40
Kirchneriella sp.	190	130	140	100	200	100	40		60	140	20						100				20		20	10	10
Ankistrodesmus falcatus	50	30	30	20	50	280	320	220	280	320	20	20	20	20	120	20					10	10	10	10	20
Ank. falcatus var *mirabilis* (a)	680	590	940	440	1,200	2,700	2,300	2,400	2,300	3,300						20	20	60	20	20	140	140	130	130	170
Ank. falcatus var. *mirabilis* (b)																					60	50	30	50	40
Scenedesmus quadricauda	20	20			10																				
Scenedesmus spp.	40	20	10	20	10			20								40		60	20	100	3	30	10	7	20
Mougeotia sp.	4,200	2,700	2,800	2,200	2,900	380	540	480	460	400	2,900	2,800	3,200	3,100	820	25,000	23,000	22,000	24,000	24,000	20	30	40	30	60
Cosmarium sp.	70	30	50	30	40	40									20				20						
Staurastrum tetracerum	230	60	110	40	70	560	740	800	940	560		20	60			100	200	180	180	80	10	13	17	3	20
Total Number of Phytoplankton (No./ml)	13,800	12,100	13,200	9,300	14,400	8,500	8,000	7,800	9,700	9,500	4,900	4,000	4,500	4,300	1,900	29,900	26,600	26,300	28,800	29,000	8,500	9,300	8,400	11,000	16,000

していないが，プランクトンネット（口径20cm）による採集では *Spirogyra* sp. が少量みられ，四季を通じて出現しており，*Mougeotia* sp. と同様に11月に多いようであった．優占的に出現しているのは，珪藻類の *Synedra acus*，緑藻類の *Ankistrodesmus falcatus* var. *mirabilis* および *Mougeotia* sp. の三種であり，いずれも季節的な消長（図6）が顕著にみられている．*Synedra acus* は2月がもっとも個体数が多く，1972年2月に5,700～9,000/m*l* を数えたが，5月には減少しはじめ 2,200～3,200/m*l* となり，8月に至ってもっとも少なくなり，わずかに 10～80/m*l* にすぎなかった．しかし11月に入るとふたたび増加をはじめて3,000～3,500/m*l* となり，2月になって前年の同月とほぼ同じ個体数の 7,900～15,000/m*l* を数えるまでに増加し，一年の消長サイクルがみられていた．*An. falcatus* var. *mirabilis* は，1972年2月には440～1,200/m*l* であったが，5月に入って最大となり2,300～3,300/m*l* に増加した．しかし8月になって急減し，

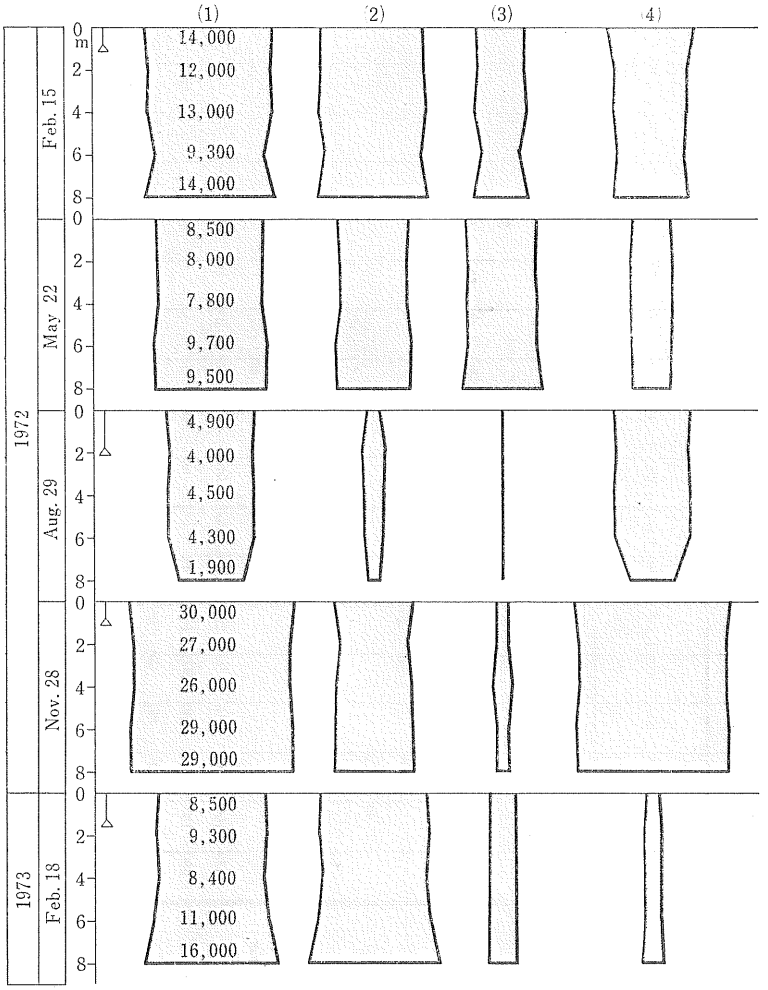


Fig. 6. Vertical Distribution of Total Phytoplankton and Three Dominant Species in Lake Tairo

(1) Total Number of Phytoplankton (No./ml)
(2) *Synedra acus*
(3) *Ankistrodesmus falcatus* var. *mirabilis*
(4) *Mougeotia* sp.
: Transparency

1mℓ中には認められないほどになった．そして11月にはふたたび出現しはじめて20～60/mℓとなり，2月に130～170/mℓにまで増加したが，これは前年の2月に比べて多少少ないようであった．大路池の本種は，長さが80～110μの弓状に彎曲した形態である．接合藻類である *Mougeotia* sp. は本池の代表的プランクトンである．1972年2月は2,200～4,200/mℓとかなり多かったが，5月になって一旦400～540/mℓに減少した．しかし8月に820～3,200/mℓとふたたび増加し，さらに11月に至って大増殖がみられ22,000～25,000/mℓと著しい個体数となった．この時の透明度は四季のうちでもっとも低く1.0mであり，水は濃緑色を呈していた．これも翌年2月には急激に減少してしまい，わずかに20～60/mℓとなり，透明度も1.5mと多少良好となった．これら優占種の季節的な垂直分布を図6に示した．大路池は水深が比較的浅いうえに，風が強いので水の攪拌がよいためか，深度ごとのプランクトンの個体数分布には大きな差はみられなかった．なお，珪藻類のなかで，採取試料水中にはみられなかったが，骸泥中にはこれらの他に，*Melosira varians*, *Coconeis*

Table 4. Seasonal Variation of Zooplankton in Lake Tairo

Name of Zooplankton \ Date	1972				1973
	Feb. 15	May 22	Aug. 29	Nov. 28	Feb. 18
Chromonadea					
Dinobryon sertularia	+++	+++++			++
Peridinium sp.	+	+	+++	+++	++
Ceratium hirundinella	+++	+++	+++++	++	
Euglena acus		+	+++++	+	
Euglena sp.			+++++		
Chlamydomonas sp.	+++	++	++	+	+
Rhizopodea					
Difflugia acuminata	+				
Arcella vulgaris		+	+	++	
Centropyxis acureata	+			+	
Euglypha tuberculata	+	+		+	+
Rotatoria					
Synchaeta sp.			+	+	
Polyarthra trigla					+
Trichocerca sp.				+	
Asplanchna priodonta	+	+++	+		+
Brachionus angularis	+				
B. angularis var. *bidens*	+				+++++
Brachionus forficula			+		
Keratella cochlearis var. *tecta*		+		+	++
Keratella varga monstrosa			+	++	++
Lepadella oblonga	+				
Lepadella sp.				++	++
Filinia longiseta	++			+	
Pompholyx complanata	+++++				+
Crustaceae					
Bosmina longirostris	++	+++++	++	++	+
Alona sp.	+	+	+	++	+
Chydorus sp.		+		+	+
Copepoda sp.			++	++	

sp., *Diploneis* sp., *Gomphonema acuminata*, *G. olivaceum*, *Amphora ovalis*, *Cymbella* sp., *Epithemia sorex*, *Rhopalodia gibba* および *Rhoicosphenia curvata* などが認められ，プランクトンあるいは付着藻として出現しているものと思われる．

本池の植物プランクトンは季節的に *Synedra acus* →*Ankistrodesmus falcatus* var. *mirabilis*→*Mougeotia* sp.→*Synedra acus* という遷移を示していた．以上のように本池における植物プランクトンの生産は種類数，個体数とも豊富であった．

次に動物プランクトンであるが，定量的な採水ではほとんど認められないほど少なかった．しかし，プランクトンネットによる採集（口径20cm のものを使用して底層から3回引網した）では，表4に示したように鞭毛虫類6，根足虫類4，輪虫類13，甲殻類4の計27taxa が見出された．これらの季節的な消長を＋の記号（＋：稀，＋＋：少ない，＋＋＋：普通，＋＋＋＋：多い，＋＋＋＋＋：非常に多い）によって表示した．季節別による優占種は，2月は輪虫類の *Pompholyx complanata* であり，5月には黄緑鞭毛虫類の *Dinobryon sertularia* および甲殻類の *Bosmina longirostris* が多くなった．8月になると2月，5月にも普通にみられていた *Ceratium hirundinella* が非常に多くなった．また *Euglena acus* および小型の *Euglena* sp. が底層に著しく多くみとめられた．8月から11月にかけては渦鞭毛虫類の *Peridinium* sp. がかなりみうけられたが，11月においては特に動物プランクトンの著しい増殖はなかった．翌年2月に入ると前年の同月にのみ稀れにみられた *Brachionus angularis* var. *bidens* が非常に多く出現した．本池の動物プランクトンは，季節的に *Pompholyx complanata* →*Dinobryon sertularia* および *Bosmina longirostris* →*Ceratium hirundinella* および *Euglena* spp. → *Peridinium* sp. →*Brachionus angularis* var. *bidens* と変化していた．

なお，大路池においては約2年（1972年10月～1974年3月）の観測期間中に“水の華,, の発生は認められていない．

(g) 細菌類

一般細菌および従属栄養細菌の菌数は概して少なく，最高菌数がみられたのは1972年2月で，前者が水深4mで6,400/m*l*，後者は水深2mおよび4mで9,200/m*l* であった．しかし水温が上昇する季節ほど菌数が減少している傾向が認められている．また深度による分布状況は，表層水中には少なくて，水深2m，4mに最大菌数分布層が存在している傾向にある．両者の季節的な垂直分布を表5および図7に示したが，両菌数の間には大きな差はなく，同じようなパターンがみられている．

(h) カビ臭

大路池が三宅島の水道水源として使用されはじめたのは1964年であるが，その当時からすでに異臭が発生していたかは定かではない．1972年の調査時における表層水の臭気度は，8月が91，11月125，翌年2月が77となっており，さらに1973年の毎月の観測でも9月～11月にかけて臭気が特に強いようであった．現在のところ，本池のカビ臭発生は放線菌類による可能性が強いが，単独の発臭か，藻類や他の条件との複合的な発臭であるのかは検討中の段階である．放線菌類は，水中はもとより，底泥中，挺水植物や沈水植物の付着

Table 5. Seasonal and Vertical Distributions of Number of Bacteria in Lake Tairo

Date / Depth	1972																1973			
	Feb. 15				May 22				Aug. 29				Nov. 28				Feb. 18			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)
0m	390	380	0	3	200	1,300	0	4	200	180	1	—	170	510	1	5	28	240	1	1
2	5,900	9,200	1	7	94	1,300	0	2	67	120	3	—	160	420	1	5	3,400	4,500	0	2
4	6,400	9,200	0	5	460	1,500	0	2	410	480	2	—	540	950	0	5	1,100	1,500	0	0
6	1,600	5,700	2	2	1,100	1,500	0	2	32	95	0	—	170	400	1	5	600	780	0	0
8	970	160	1	1	1,200	1,500	0	1	24	98	0	—	140	400	1	3	400	510	0	0

(1) Number of Total Colonies (No./ml)
(2) Number of Heterotrophic Bacteria (No./ml)
(3) Number of Coli-aerogenes Group (No./ml)
(4) Number of Actinomyces (No./ml)

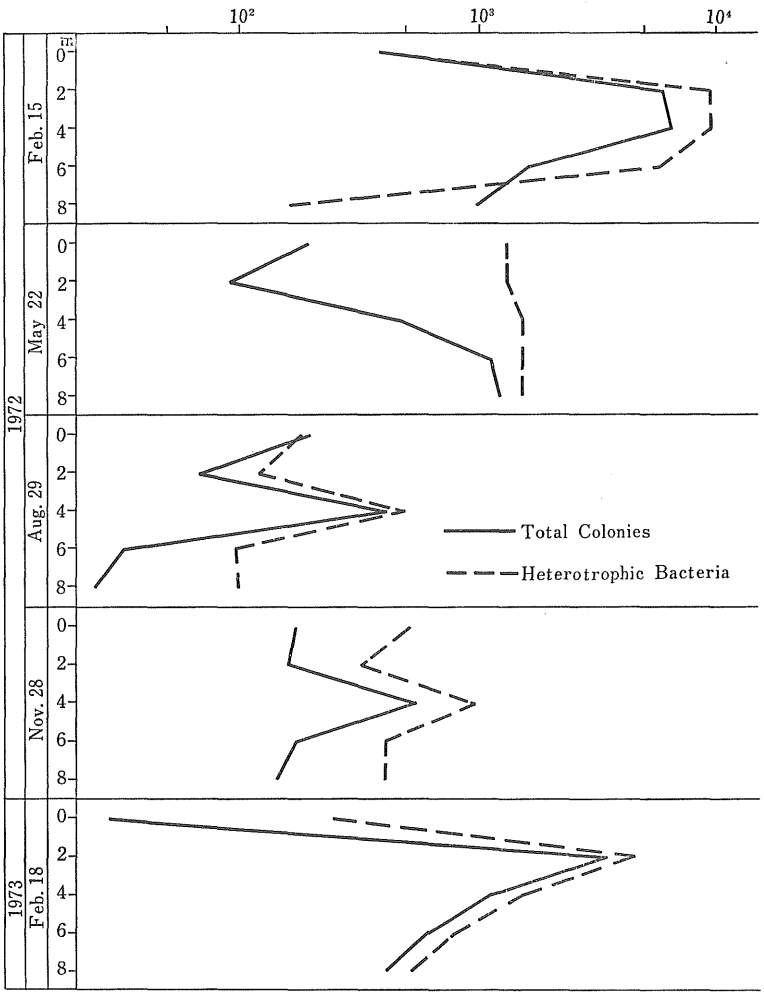


Fig. 7. Relation between the Number of Total Coloniese and Heterotrophic Bacteria in Lake Tairo

物中，あるいは沿岸の石の付着物中などから多く分離されている．なかには臭気を発しないものもあるが，その多くはカビ臭の他，カビ臭と藻臭との混合臭気，藻臭と生ぐさ臭の混合臭気，藻臭などさまざまな臭気を発している．発臭放線菌は水中から分離されたものがほとんどであるが，そのうちの1株(Strain No.7)の発する臭気は水道水のそれと酷似している．そして本株を2週間培養した寒天培地の留液から Geosmin および 2-Methylisoborneol が検出されている．また，約1,000ℓ の表層水を粒状活性炭500 gに通して臭気成分を吸着させ，この濃縮抽出物からも両物質が検出された．

4—2 新澪について

本湖は海岸からおよそ 300m の距離にあるが，砂岩層を通して海と連絡しているため潮汐の影響を受けており，水位が1日2回，50～60cm の振幅で変動している[27]．湖岸は垂直に切立った絶壁であり，流入，流出河川がないのは大路池と同様である．本湖のネクトンとしては，ワカサギ，スジエビが生息しており，後者はとくに多いようである．水草や海藻類は認められていない．湖心部の底質は黒褐色であり，ときには硫黄細菌と思われる白色の粘膜質をみることがある．しかし堆積物は意外に浅く，暗茶褐色の火山灰が採取されるほどである．10m以深になると硫化水素臭が著しく感じられる．

(a) 水色と透明度

本湖の水色は，淡緑色，灰緑色，褐色，濃茶褐色とその変化が著しく，7色に変わるとまでいわれている．したがって透明度は低く，0.2mから最高でも2.5mであった．もっもと低い0.2mを記録したのは“水の華”の発生が著しい8月であった．

(b) 水温

季節的な水温の垂直分布を図8に示した．これは湖心の最深地点で水深1mごとに測定したものである．この水温分布図から季節によってそれぞれ非常に特異的な分布状態を呈していることがわかった．水深5～7mおよび9～10mの二個所に顕著な躍層がみられている．2月，5月は4mおよび2m付近の小さな躍層をすぎると，一旦急に水温が降下し，4～8m深度の大きな躍層に至る．これより水深を増すと徐々に温度が上昇していき，底層に至るまでつづく．一方，8月と11月の水温分布は非常に特徴的である．11月は，深度6mまではほとんど等温であるが，6mで第一の躍層がみられ，これを過ぎると水深10mまで急激に温度

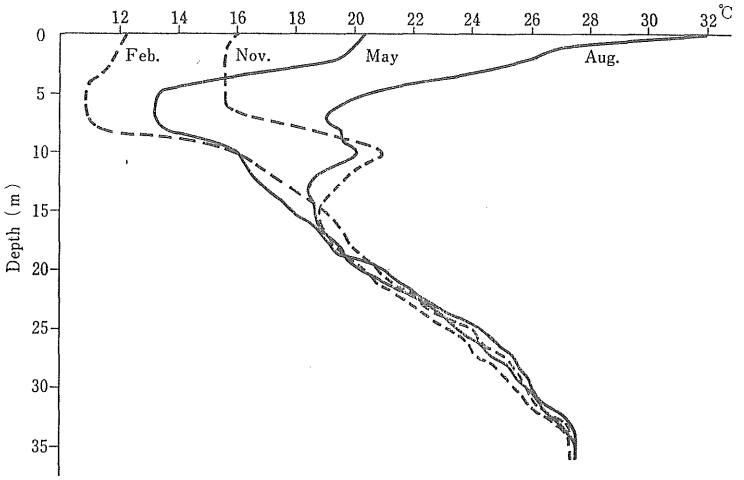


Fig. 8. Vertical Distribution of Water Temperature at the Central Sampling Station in Lake Shinmyo

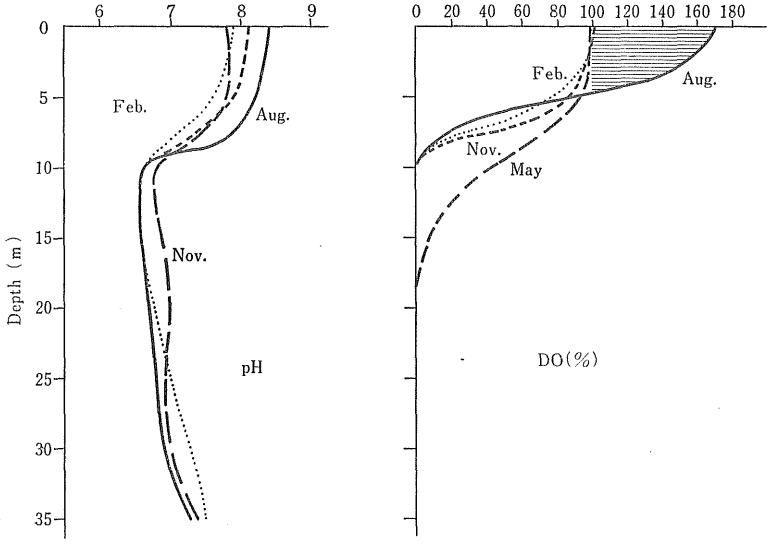


Fig. 9. Vertical Distribution of pH and Dissolved Oxygen Saturation in Lake Shinmyo

が高くなり，10m層で第二の躍層に至る．そしてここで水温が逆転して降下しはじめ，15～16m層で第三の躍層に至り，今度は深度を増すごとに昇温していく．

8月の分布は特に異常である．すなわち表面水が32.0°に対して，水深7mに至る間に13.0°もの水温差で急降温し，7m付近の躍層となる．これより8m，9m層で小さな躍層を二個所過ぎてから10m層で逆転し，ふたたびゆるやかな水温降下がみられる．そして13m付近で三回目の大きな躍層に至って再度逆転がみられ，その後は徐々に温度が高くなりながら底層に至る．このような種々の異常水温成層が現われるのは，吉村[26]の報告では海岸の汽水湖でよくみられるようである．

しかし，これらの水温分布が変動するのも水深20m以浅の層のみであり，これより深度を増すと，その水温は周年ほとんど変化していないということが明白である．水温の四季変化からその水温較差をみると，表面水では19.8°と大きいが，水深10mでは7.5°，20mに至っては0.6°と最小となり，底層の35mでは1.2°となっており，もっとも較差の小さい深度は20mに存在している．

(c) pH

図9にpHの垂直分布曲線を示したが，表層水はpH 7.8～8.4と周年アルカリ性を呈しており，特に8月はプランクトン生産が多かったので8.4を示していた．しかし水深10mに至る間に1.8も急激に降下し，無酸素層に入る前の9m付近で酸性側に傾き，10m層に至ってpHは最小の6.6を示した．これより深度を増すと徐々に上昇していき，底層では7.3～7.5と微アルカリ性を呈した．このような深層におけるpHの逆転は，無酸素層の還元作用のためと考えられるが，四季とも10m以深では大きな差がなく，同様な傾向を示していた．

(d) 溶存酸素

溶存酸素の垂直分布も非常に極端に変化していた．5月，11月の表面水では98.3～99.9%と飽和状態に近いが，2月は106.9%と過飽和であった．さらに植物プランクトンの著しい増殖期であった8月には176.2%と著しい過飽和率を示した．しかし飽和率が高いのも表層水に限られており，水深5mに至ると急減してしまい，10m層ではすでに無酸素状態となってしまう（図9）．5月のみは水深15mまで酸素の溶存が認められた．

(e) 化学成分

塩素イオンの含有量は非常に高く，これも深度を増すほど増加し，30～35mの深水層では海水濃度とほぼ近似の高濃度の16,000mg/lとなっている．しかし10m以浅の表水層では比較的濃度が低く，2,800mg/l以下となっている．この塩素イオンの垂直分布は，導電率のそれと同じような曲線を示し，季節による変化も

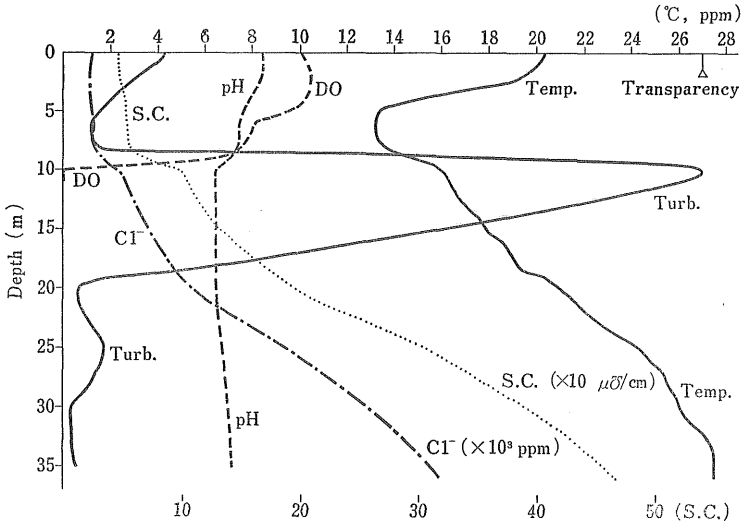


Fig. 10. Vertical Distribution of Water Temperature, pH, Dissolved Oxygen, Salinity, Turbidity and Specific Conductance at the Central Sampling Station of Lake Shinmyo on April 28, 1973.

Table 6. Results of Chemical Analyses of Lake Shinmyo

Date		Depth (m)	W.T. (°C)	Specific Conduct. (μv/cm)	pH	DO (%)	Cl^- (mg/l)	$KMnO_4$ Consumed (mg/l)	Total Hardness (mg/l)	SiO_2 (mg/l)	PO_4^{--} (mg/l)	NH_3-N (mg/l)	NO_2-N (mg/l)	NO_3-N (mg/l)
1972	Feb. 16	0	12.5	—	7.8	96.0	1,200	10.2	780	50.2	0.018	—	—	—
		5	11.9	—	7.8	92.8	1,200	11.2	780	50.2	0.024	—	—	—
		10	13.5	—	6.8	41.6	1,850	11.5	1,190	62.0	0.029	—	—	—
		15	17.6	—	6.7	9.7	3,850	19.6	2,040	73.0	0.137	—	—	—
		20	20.2	—	6.8	0	7,040	29.5	2,940	72.6	0.208	—	—	—
		25	22.3	—	6.9	0	11,000	46.9	4,160	65.2	0.224	—	—	—
		30	23.6	—	7.1	0	13,750	60.4	5,050	61.5	0.294	—	—	—
		35	26.3	—	7.3	0	16,160	166.2	5,900	64·2	1.560	—	—	—
	May 23	0	21.3	4,100	8.1	98.3	1,160	7.8	730	45.5	0.012	—	—	—
		5	18.5	4,300	7.9	93.4	1,310	22.7	780	51.0	0.014	—	—	—
		10	17.6	8,150	6.6	43.2	2,840	19.5	1,640	74.5	0.012	—	—	—
		15	17.6	11,500	6.6	8.6	3,870	25.8	1,950	78.4	0.024	—	—	—
		20	20.7	19,500	6.8	0	10,040	30.4	3,150	72.1	0.192	—	—	—
		25	23.2	35,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		30	25.6	50,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		35	26.2	50,000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Aug. 28	0	32.0	3,850	8.4	176.2	860	13.2	530	47.4	0.083	3.7	0	0
		5	20.6	4,700	8.2	93.7	930	10.0	630	48.5	0.042	2.4	0	0
		10	20.1	9,100	6.6	0	2,670	13.0	1,600	81.5	0.069	0	0	0
		15	18.7	12,200	6.6	0	4,240	7.0	2,060	80.2	0.180	0	0	0
		20	20.4	18,900	6.7	0	6,770	28.3	2,980	75.0	0.399	0	0	0.5
		25	23.5	33,000	6.8	0	11,120	22.6	4,000	68.5	0.322	0	0.88	20.0
		30	25.9	43,000	6.9	0	13,900	31.4	4,850	65.0	0.356	0	1.08	17.5
		35	27.5	50,000	7.3	0	16,680	96.4	5,800	67.9	1.683	0	0	0
	Nov. 27	0	16.0	3,350	7.8	99.9	1,060	10.9	710	51.1	0.095	0	0	0
		5	15.6	3,350	7.8	87.1	1,060	9.3	710	51.1	0.035	0	0	0
		10	21.0	8,600	6.8	0	2,470	10.9	1,600	78.8	0.049	0.09	0	0
		15	18.8	11,100	6.9	0	3,920	15.8	2,040	80.3	0.183	0.36	0	0
		20	20.4	16,800	7.0	0	5,840	8.4	2,600	76.6	0.324	0.85	0	0
		25	23.2	29,400	6.9	0	9,280	12.4	3,700	68.9	0.370	1.17	0	0
		30	25.4	38,500	7.0	0	13,070	9.3	4,650	63.9	0.503	0.43	0	0
		35	27.3	50,000	7.4	0	16,160	459.1	5,850	72.6	0.670	12.0	0	0
1973	Feb. 21	0	12.2	3,550	7.9	106.9	1,240	5.3	830	51.0	0.046	—	—	—
		5	10.9	3,530	7.6	77.5	1,310	5.0	830	52.6	0.022	—	—	—
		10	16.0	7,650	6.6	2.0	2,730	4.3	1,620	74.0	0.113	—	—	—
		15	19.0	11,200	6.6	0	3,900	4.3	2,020	75.1	0.214	—	—	—
		20	20.8	16,600	6.8	0	6,380	10.2	2,600	75.7	0.309	—	—	—
		25	24.0	25,500	7.0	0	10,630	24.2	3,800	67.7	0.251	—	—	—
		30	25.8	39,000	7.3	0	13,820	24.2	4,800	64.0	0.199	—	—	—
		35	27.3	47,000	7.5	0	16,670	24.2	5,750	67.7	2.030	—	—	—

表層から底層までほとんどみられていない．また総硬度の値でも同様な傾向にあった．過マンガン酸カリウム消費量は四季別，深度別ともかなりのバラツキがみられているが，その他の成分と同様に深水層ほど高い値となっており，栄養塩類が底層ほど多く蓄積されているようであった（表6）．図10は1974年4月の観測時における値を示した．この時の濁度の値をみると，水深10mで異常に高いピーク（27度）が認められ，その上下5mでは急に低くなっている．また15m以深の水は非常に澄明であった．

汽水性の上層循環湖である新湊においては，10m以浅の表水層のみが風や気温の影響を受けており，また生物の生産，死滅をくり返す．しかしこれ以深の深水層では，底層ほど水温が高いにもかかわらず水が周年停滞している．このことは塩分濃度が高いという水の密度差によるためもあるが，生物生産あるいは栄養塩類の循環は，10m以浅の表水層のみで行なわれている．そして，深水層中に栄養塩類が多量に蓄積されてはいるが，これらが表水層での生物生産に回帰補給されているかについては疑問であり，今後の課題として検討したいと思う．

(f)　プランクトン

本湖の植物プランクトンは，種類数は貧弱であるが，個体数は非常に多くなっている．今回の調査では藍藻類2，珪藻類2，緑藻類2の計 6 taxa がみられたにすぎなかった．表には示していないが，プランクトンネットによる採集では *Synedra ulna* が2月時のみ多少みられていた．これらの季節的な消長を表7に，垂直分布を図11にそれぞれ示した．なかでも優占的に出現しているのは藍藻類の *Chroococcus dispersus*, *Anabaena* sp. そして緑藻類の *Ankistrodesmus falcatus* var. であり，その季節的，垂直的な消長が顕著に現われている．*Chroococcus dispersus* は水温の低い2月に多く出現しており，1972年2月には12,000/m*l* を数えて水は灰緑色であった．しかし5月になると80/m*l* と急減していた．8月には300/m*l* と多少の増加がみられ，11月に1,100/m*l*，さらに翌年2月になって4,000/m*l* とふたたび増加していた．

Anabaena sp. は2月，5月には非常に少なかったが，8月に入ってから異常増殖が起こり，濃茶褐色の“水の華”を形成し，風下の水面ではあたかもペンキを流したような様相を呈した．その時の個体数は24,000/m*l* を数え，透明度（湖心部）は0.2mと極端に低くかった．しかし，11月になると 1,000/m*l* に減少し，透明度も 0.7m と多少よくなったが水色はほと

Table 7.　Seasonal Variation of Phytoplankton in Lake Shinmyo

Name of Phytoplankton \ Date / Depth (m)	1972 Feb. 16 0	5	10	15	20	May 23 0	5	10	15	20	Aug. 28 0	5	10	15	20	Nov. 27 0	5	10	15	20	1973 Feb. 21 0	5	10	15	20
Cyanophyceae																									
Chroococcus dispersus	12,000	9,200	6,700	1,200	360	80	80	70	30	24	300	260	24	8		1,100	760	33	7		4,000	3,600	1,700	66	15
Anabaena sp.						72	80	4			24,000	8,200				990	830				80	7	3		
Bacillariophyceae																									
Chaetoceros Muelleri	80	20	12	10		380	150	4													20	13	20	3	
Chlorophyceae																									
Ankistrodesmus falcatus var.	1,600	1,300	2,500	280	60	200	210	1,600	200	48			16	72			7	16	3	100	170	140	20	3	3
Scenedesmus sp.	370	300	170	14	10	8	4	4									23	20			990	990	130	3	3
Total Number of Phytoplankton (No./m*l*)	14,000	10,800	9,380	1,500	430	560	550	1,680	320	72	24,300	8,460	40	80		2,120	1,630	36	110		5,260	4,750	1,870	75	21

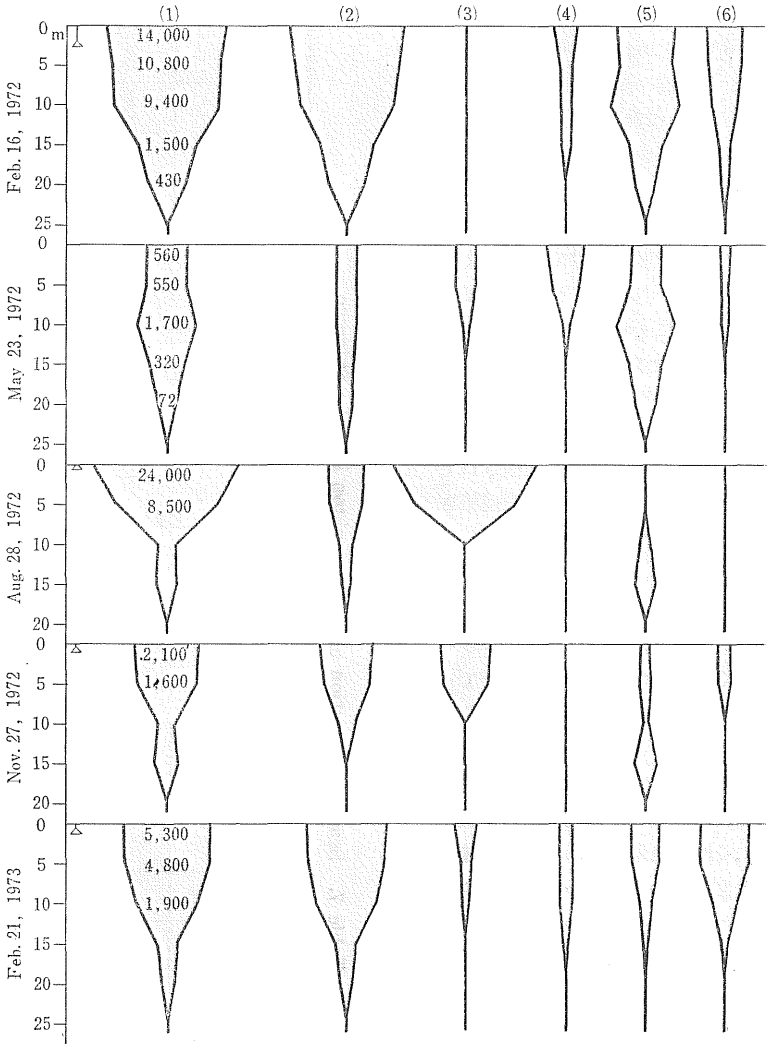


Fig. 11. Vertical Distribution of Phytoplankton in Lake Shinmyo
(1) Number of Total Phytoplankton (No./ml)
(2) *Chroococcus dispersus*
(3) *Anabaena* sp.
(4) *Chaetoceros Muelleri*
(5) *Ankistrodesmus falcatus* var.
(6) *Selenastrum* sp.
| : Transparency
△

Table 8. Seasonal Variation of Zooplankton in Lake Shinmyo

Name of Zooplankton \ Date	1972 Feb. 16	1972 May 23	1972 Aug. 28	1972 Nov. 27	1973 Feb. 21
Chromonadea					
Peridinium sp.	+	+	++++	+++++	++++
Chlamydomonas sp.	+	++	+	+++	+++
Rotatoria					
Brachionus plicatilis		+++++			
Keratella valga monstrosa	+++	+++++			
Crustaceae					
Copepoda sp.		++	+++	+	

Table 9. Seasonal and Vertical Distributions of Number of Bacteria in Lake Shinmyo

Depth \ Date	1972 Feb. 16 (1)	(2)	(3)	(4)	May 23 (1)	(2)	(3)	(4)	Aug. 28 (1)	(2)	(3)	(4)	Nov. 27 (1)	(2)	(3)	(4)	1973 Feb. 21 (1)	(2)	(3)	(4)
0m	710	1,000	0	1	1	28	0	0	670	3,800	1	0	60	200	1	0	24	560	1	0
5	660	3,300	2	0	1	200	0	0	36,000	40,000	5	0	480	770	1	0	320	560	1	0
10	200	80	0	0	6	2,200	0	0	15	50	4	0	600	730	0	0	320	380	0	0
15	18,000	12,000	5	0	1	240	0	0	5	33	1	0	480	550	0	0	320	450	0	0
20	42	9	0	0	0	90	0	0	22	6	0	0	360	410	0	0	210	200	0	0
25	20,000	4,600	0	0	—	—	—	—	5	4	0	0	120	120	0	0	220	320	0	0
30	30,000	36,000	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	66	92	0	0	200	280	0	0
35	0	0	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(1) Number of Total Colonies (No./ml)
(2) Number of Heterotrophic Bacteria (No./ml)
(3) Number of Coli-aerogenes Group (No./ml)
(4) Number of Actinomyces (No./ml)

んど変わらなかった．汽水性の珪藻類である *Chaetoceros Muelleri* は，5月に380/m*l* を数えたのがもっとも多かったほかは，2月が20～80/m*l* にすぎず，8月，11月には1 m*l* 中には認められないほど減少していた．緑藻類の *Ankistrodesmus falcatus* var. は2月の1,600/m*l* を数えたのがもっとも多く，5，8，11月には減少し，翌年同月に至るとふたたび増加して170/m*l* となった．この種は大路池のそれが彎曲した形態であったのとは違って，直線状で非常に細く，*An. falcatus* var. *acicularis* に類似しているようであった．これらプランクトンの垂直分布をみると，水深20mから25mに至るとほとんど認められなくなっていた．本湖における植物プランクトンは季節的に *Chroococcus dispersus* → *Ankistrodesmus falcatus* var. → *Anabaena* sp. → *Chroococcus dispersus* という変化がみられた．

つぎに動物プランクトンは，植物プランクトンと同様に貧弱であった．表8に示したように鞭毛虫類2，輪虫類2，甲殻類1の計5 taxa がみられただけである．輪虫類の *Keratella valga monstrosa* は2月，5月に多く出現しており，また5月にのみ *Brachionus plicatilis* が多かった．*Peridinium* sp. は8月頃から多く出現しており，11月，2月になっても量的には大差はなかった．これは1973年11月および翌年3月の調査時に，湖の一部分に赤褐色の帯状の水の華を形成していたのが観察されている．

(g) 細菌類

一般細菌，従属栄養細菌の季節別菌数を表9に示し

た．これによると表層水中には概して少なく5m，10m層に至ってもっとも多く検出されている．これ以深になると減少し35mの底層水にはまったく検出されていない．ことに8月の分布は顕著で，一般細菌数では表面水中に670/m*l* であるものが，5m層では36,000/ml と50倍強の菌数となり，これが10m深度に至るとわずかに15/m*l* と急減している．これは従属栄養細菌の菌数分布においても同様な傾向を示している．11月，翌年2月の分布は30m以浅の各層とも大きなバラツキはみられず，両者の菌数間にも大きなひらきもなく平均的に分布していた．ただ，1972年の2月は，採取試料の貯蔵法や培養までの時間が長かったためか菌数が異常であった．

5. まとめ

1972年の2，5，8，11月および1973年2月の計5回にわたって三宅島の大路池，新澪の基礎調査を行ない，次のような知見を得た．

(1) 人工汚染による湖沼，貯水池等の富栄養化現象が広がっている現在，三宅島にある二つの湖はこれら汚染のない閉鎖水域であり，自然環境が保たれている．

(2) 大路池は浅い淡水湖であり，新澪は深い汽水湖で，両湖の湖盆形態は対照的である．前者の最大水深は9.25m，後者は35.9mであり，遷移的な湖沼型からみると前者は富栄養型，後者は貧栄養型である．

(3) 水色は，大路池では周年緑色系であり水の華の発生は認められなかった．一方の新澪はその変化がはげしく，季節によって異なった生物による水の華が発生している．

(4) 循環期において，大路池は全層循環するが，新澪は水深15m以浅だけが循環し，20m以深の深水層は周年停滞している．また表水層で水温の異常成層がみとめられた．

(5) pHは，大路池では5月，8月時に深度が増すごとに低下するが，酸性に傾くのは8月の底層水のみである．新澪では水深10mの無酸素層に至るとpHが最小（pH 6.6）となるが，深層水はふたたび微アルカリ性になるというpHの逆転が観測された．

(6) 溶存酸素は，大池路では8月の停滞期のみ底層で無酸素となる．新澪では10～15m以深で周年無酸素状態となっており，多量の硫化水素の発生がみられた．最高飽和率を呈するのは両湖とも8月時であり，前者は127.4％（4m層）であるが，後者は176.2％（表層）という著しい飽和率を呈した．

(7) 栄養塩類は，大路池では深度によってその含有量はほとんど差がないが，新澪では深水層ほど多量に蓄積されている傾向を示していた．

(8) 両湖のプランクトン相は著しく異なっている．大路池では種類数，個体数とも豊富に出現していたが，新澪では種類数は貧弱であるが個体数は非常に多い．前者では植物プランクトン21，動物プランクトン27の計48taxaがみとめられた．優占的に出現するのは，*Synedra acus*, *Ankistrodesmus falcatus* var. *mirabilis*, *Mougeotia* sp., *Dinobryon sertularia*, *Ceratium hirundinella*, *Euglena* spp., *Brachionus angularis* var. *bidens*, *Pompholyx complanata*, *Bosmina longirostris* などで，特に *Mougeotia* sp. は本湖の代表的プランクトンである．

新澪では植物プランクトン6，動物プランクトン5，計11taxaの出現が認められたにすぎない．優占種は *Chroococcus dispersus*, *Anabaena* sp., *Ankistrodesmus falcatus* var., *Peridinium* sp., *Brachionus plicatilis*, *Keratella valga monstrosa* などであり，これらはいずれも季節的消長が顕著であった．

(9) 両湖には流入河川がないため，細菌数は概して少なく，一般細菌，従属栄養細菌の菌数間のひらきが小さかった．

(10) 上記のごとく，両湖のプランクトン生産は大きく，富栄養化が進んでいると考えられた．

謝辞

両湖の化学分析値は，当所山崎堅吉主任研究員，土屋悦輝研究員から心よく提供されたものである．また本稿の執筆にあたっては東京都水道局水質センターの乙幡恵氏に甚大なるご助言をいただいた．ここに深謝の意を表します．

（本研究の概要は日本陸水学会第37回大会1972年9月15日，および同学会第38回大会1973年10月18日で発表した．）

参考文献

1) 読売新聞：公害の内幕，くさい水飲まされた，№1—10，昭和46年7月14日～25日．
2) 平田綾子，佐野茂：関東水道衛生協議会研究発表概要集，33—36．昭和47年度
3) 萩原光子：日本水処理生物学会誌，1，2，6—8，(1964)
4) 萩原光子，末吉和美：水協誌，386，61—66 (1966)
5) 矢野洋，有本敏之，塩路秀男，岩田兼佐久，針間矢研二：用水と廃水，14，8 (1972)
6) 日高一：水協誌，362，60—75 (1964)

7) 時山幸美：水協誌，363，31—43 (1964)
8) 京都市水道局臭い水対策研究会：臭い水対策に関する報告書，昭和46年12月
9) 京都市水道局：水協誌，462，10—23 (1972)
10) 根来健一郎：水，14，1，31—35 (1972)
11) 菊地徹：Japan Analyst，22，1530—1538 (1973)
12) 赤沢寛，橋本徳蔵：水協誌，477，13—26 (1974)
13) 川崎市水道局：水，新年増巻号，30—34(1974)
14) 菊地徹，三村鉄太郎：ファルマシア，8，9，578—579 (1972)
15) 針間矢研二，矢野洋，有本敏之，菊地徹，三村鉄太郎：日本水処理生物学会要旨集 (1972)
16) 菊地徹，三村鉄太郎，森脇祥寿：水協誌，476，2—6 (1974)
17) Yoshimura, S. and Miyaji, D.D. : *Jap. Jour. Geol. & Geogr.*, 13, 339—352 (1936)
18) 堀江正治：日本の湖 (1964) 日本経済新聞社
19) 福島博：横浜市立大学論叢，13，1，7—57 (1961)
20) 丸山晃，一戸正憲，高田継男：横浜市立大学学生論集，8，173—210 (1961)
21) 東京都水産試験場大島分場：やしお速報，20，(1966)
22) 東洋大学工学部工業技術研究会：三宅島の水道水源調査報告書，昭和48年3月
23) 堀江正治：陸水誌，18，1，1—27 (1956)
24) 新井正，高山茂美，関根清，瀬戸隆文，石川与吉：地理学評論，45，5，364—367 (1972)
25) 日本水道協会：上水試験方法 (1970)
26) 吉村信吉：湖沼学 (1942) 三省堂
27) 新井正，森和紀：第38回日本陸水学会講演要旨集 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 473 — 487, 1974

多摩川の水質汚濁に関する研究
Ⅰ 多摩川の細菌学的試験結果について
Ⅱ 多摩川の流下物について

山崎洋子*

Studies on The Water Pollution of the Tama River
Ⅰ On The Result of the Bacteriological Examination of the Tama River
Ⅱ On The Drift in the Tama River

YOKO YAMAZAKI*

The authers surveyed the Tama River concerning to its pollution during the period from May 1973 to February 1974.

Eighty-two water samples collected seasonally from 29 stations covering almost whole stream from Hikawa to the estuary were examined bacreriologically.

Further, at the same time, 36 samples for drift examination were collected from 11 stations. The benthic animals in the drift were also classified. The results obtained are summarized as follows;

1) The results of the bacteriological examination revealed that the waters from the upper stream above the Ome City was fairly clean. However, there after the water pollution increases markedly as flow dewn.

2) Station 7 (Nagata-Bridge), where the domestic sewages of some Cities, Ome, Fussa, Akishima ect. and industrial wastes of more than 200 factories inflow, showed the highest pollution throghout the whole course.

3) Along the middle course between St. 12 (Tama-Ohashi Bridge) and St. 27 (Maruko-Bridgi), the water pollution increase gradually toward the down stream. However, at St. 22 (Tamagawara-Bridge) and St. 24 (Futago-Bridge), above where the water stagnated by dam, is oozing out again after permeated into the river bed.

4) Near the estuary (St. 29), the number of bacteria is unstable to tidal effect.

5) In the upper course only a little amount of drift was obteined but in the middle course the drifts was collected in large amount and fragments of hydrophyta and Sphaerotilus were found in them.

6) On the whole, the total volume of the benthic animals in the drift were extremely small and mostly they were the exuviae of insects such as.

7) The content of the organic matter in the drift samples were between 43.8% and 76.6% except for the one from St. 6(Chôfu-Bridge).

1. 緒　言

河川，湖沼における富栄養化や汚濁が問題となっているが，多摩川もその例にもれず，1960年（昭和35年）頃から急速に汚濁が進行している[1,2]．多摩川の汚濁の進行は，三多摩地区の人口増加に伴う処理施設の整備がおいつかないためにおこったもので，汚濁の特徴としては，生活排水やその中に含まれるＡＢＳ洗剤，し尿処理場からの排水による NH_3-N による汚濁があげられる．

従来，河川などの水質汚濁の検査に対しては，理化

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

学分析がなされてきたが，今では，生物学的調査によって汚濁階級を知る方法が，理化学分析とあわせて実施されるようになった．

1973年5月から1974年2月にかけて，多摩川の水質汚濁状況を知るために，生物学的総合調査を実施した．その中で，われわれは，細菌学的試験と流下物を担当し，調査したので，ここにその結果を報告する．

2. 調査地点

多摩川の上流域から河口に至るまでに，29の調査地点を設け，1973年5月から1974年2月の間に，4回の調査を実施した．第1回調査（5月）・第3回調査（10—11月）は12地点について，第2回調査（8月）・第4回調査は29地点全ての調査を行なった．調査日時および各地点の環境要因を表1～4に示した．

3-Ⅰ 多摩川の細菌学的試験について

多摩川の流水について，一般細菌数，大腸菌群数，従属栄養細菌数，真菌類数，糞便性大腸菌群数，腸球菌数，硫酸塩還元菌数を得るために細菌学的試験を行ない，水質汚濁状況を考察した．100ml の滅菌ポリビンを用いて，流水を採水して ice box に保存し，実

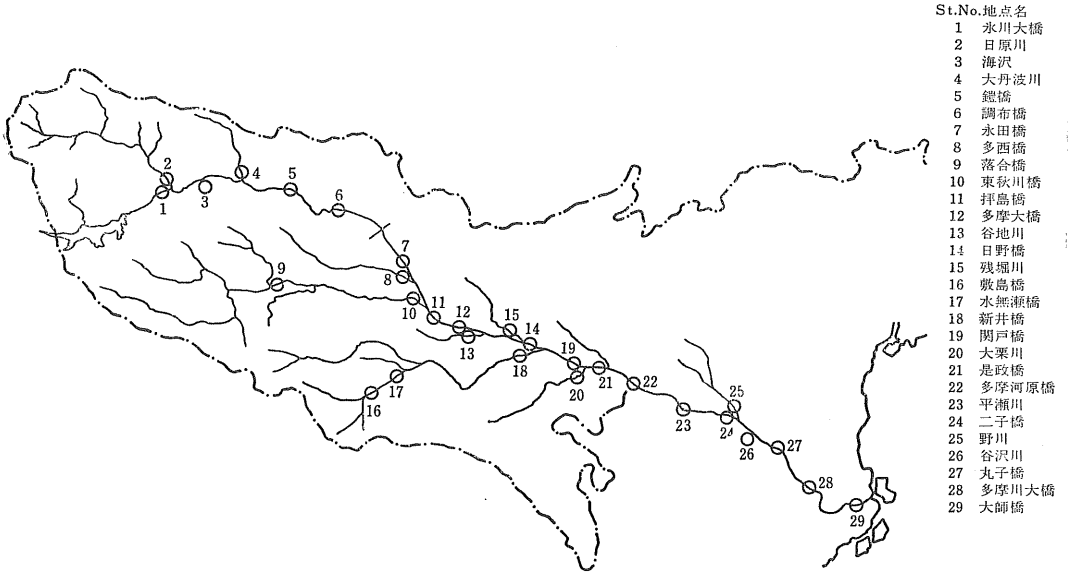


図1． 多摩川における調査地点図

表1． 第1回調査の環境要因（1973, 5.29～30）

St.No.	調査地名	調査日時	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	透視度 cm	流速 cm/sec	DO ppm	DO 飽和度%
6	調布橋	5/29 10.20	25.0	11.0	PR 8.4	>30.0	120.0	8.578	110.6
7	永田橋	〃 11.20	25.0	15.5	〃 8.4	30.0	115.0	6.563	95.3
(10)	東秋川橋	〃 13.20	24.5	19.0	BTB 7.0	>30.0	80.0	6.300	96.3
11	拝島橋	〃 14.40	24.0	18.5	PR 7.4	18.5	113.0	5.692	84.2
14	日野橋	〃 15.40	26.0	19.5	〃 8.2	22.0	96.0	5.375	82.9
(18)	新井橋	〃 16.30	26.0	21.0	〃 7.4	>30.0	113.0	5.069	80.5
21	是政橋	5/30 15.20	27.0	22.5	〃 7.4	11.0	63.0	5.576	90.9
22	多摩河原橋	〃 14.30	26.0	23.0	〃 7.4	15.0	85.0	5.292	87.0
24	二子橋	〃 12.40	27.0	23.0	〃 7.8	21.0	98.0	5.797	95.3
(25)	野川	〃 12.15	27.0	23.5	〃 7.4	13.0	—	1.616	26.8
27	丸子橋	〃 11.30	25.0	21.0	〃 7.0	17.5	—	1.286	20.4
29	大師橋	〃 9.50	28.0	22.0	〃 7.6	16.0	—	1.439	23.2

（ ）は支川

表2. 第2回調査の環境要因 (1973, 8.19～22)

St.No.	調査地名	調査日時	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	流速 cm/see	DO ppm	DO 飽和度%	海抜m
1	氷川大橋	8/21 12.30	30.2	11.0	7.3	105	7.969	102.2	340
(2)	日原川	〃 12.20	30.2	19.6	7.9	85	6.759	104.4	340
(3)	海沢	〃 11.25	30.5	18.7	7.2	94	6.608	100.4	310
(4)	大丹波川	〃 10.30	28.2	20.5	7.5	55	6.483	101.9	260
5	鐙橋	〃 9.30	28.0	12.5	7.5	75	7.419	98.9	220
6	調布橋	〃 8.40	23.0	13.0	7.9	130	7.384	101.3	150
7	永田橋	8/20 14.40	27.0	19.0	7.7	110	5.434	84.2	115
(8)	平井川多西橋	〃 15.40	29.0	26.0	7.9	80	5.547	99.0	110
(9)	秋川落合橋	8/21 15.00	31.0	25.5	7.7	100	5.323	108.8	200
(10)	秋川東秋川橋	〃 16.00	30.8	28.6	7.3	90	5.616	103.7	100
11	拝島橋	8/20 15.00	30.7	26.0	7.7	100	5.295	92.0	87
12	多摩大橋	〃 14.10	32.0	30.0	8.3	75	4.805	91.3	80
(13)	谷地川	〃 13.30	34.2	27.0	6.9	35	4.184	74.9	78
14	日野橋	〃 8.40	31.0	29.0	8.1	100	5.158	94.8	66
(15)	残堀川	〃 9.15	31.0	25.5	7.1	60	3.319	58.0	70
(16)	浅川敷島橋	〃 11.20	31.0	24.0	6.9	55	6.068	101.6	160
(17)	浅川水無瀬橋	〃 10.20	32.0	27.0	8.0	50	5.201	92.2	100
(18)	浅川新井橋	〃 8.05	30.0	23.0	6.5	35	5.584	91.8	66
19	関戸橋	8/19 15.45	34.5	29.0	8.0	85	5.231	96.1	55
(20)	大栗川	〃 16.15	33.5	30.5	8.2—8.3	50	5.159	97.5	50
21	是政橋	〃 14.40	35.0	28.0	7.3—7.4	80	5.242	94.6	40
22	多摩河原橋	〃 14.00	37.0	30.6	8.3	76	4,529	85.7	31
(23)	平瀬川	〃 13.15	37.0	29.0	7.7	77	5.152	84.7	10
24	二子橋	〃 11.30	34.5	29.5	8.2	110	5.094	94.5	9.5
(25)	野川	〃 11.10	35.5	29.0	8.3—3.4	77	3.05	56.0	9.5
(26)	谷沢川	〃 10.30	31.5	26.2	7.2—7.3	—	2.35	41.0	7.0
27	丸子橋	〃 9.45	33.0	26.0	7.1	—	1.305	22.7	5.0
28	多摩川大橋	〃 9.10	32.5	28.0	8.0	—	3.706	66.9	2.0
29	大師橋	〃 8.20	32.0	28.5	8.0	—	2.301	41.9	0.6

( ) は支川

験室にもち帰り，以下の方法によって，細菌を培養した．

3-Ⅰ-1 試験方法

上水試験法に基づいて，次の細菌試験を行なった．試料の希釈には，0.85%-Nacl 滅菌水を用いた．

1) 一般細菌数

試料1m*l* をシャーレにとり，普通寒天培地を用いて混しゃく培養し，37° で hr 培養後，発生したコロニーを数えた．

2) 大腸菌群数[5]

試料1m*l* をシャーレにとり，デソキシコーレート培地を用いて重層培養し，37° で 24hr 培養後，定形的コロニーを数えた．第3回調査から，BGLBはっ酵管を用い，最確数法も行なった．試料を接種後，ガス発生が認められたものを陽性とした．(37°，48 hr 培養)

3) 従属栄養細菌数

試料1m*l* をシャーレにとり，ヘンリッチ培地を用いて，25° で3日間培養後，発生したコロニーを数えた．

4) 真菌類数

試料1m*l* をシャーレにとり，ワックスマン培地を用いて，25° で4日間培養ののち，コロニーを計数した．

5) 糞便性大腸菌群数

EC培地はっ酵管を用い，最確数法によった．試料

表3． 第3回調査の環境要因（1973, 10. 27, 11. 4）

St.No.	調査地名	調査日時	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	RpH	透視度 cm	流速 cm/sec	DO ppm	DO 飽和度%
6	調布橋	11/4 9.00	14.2	12.1	8.2	8.0	>30.0	50.0	8.788	114.0
7	永田橋	〃 10.00	16.5	15.5	7.5	7.9	17.5	50.0	7.910	110.9
(10)	東秋川橋	〃 11.00	15.1	13.7	7.5	—	>30.0	65.0	7.952	107.6
11	拝島橋	〃 14.00	17.8	13.5	7.5	7.6	22.5	70.0	7.934	107.0
14	日野橋	10/27 16.30	13.0	15.0	7.3	7.4	>30.0	83.0	6.338	88.6
(18)	新井橋	〃 16.00	15.8	16.5	7.2	7.4	23.5	110.0	5.026	72.4
21	是政橋	〃 15.00	13.5	14.0	7.2	7.2	>30.0	75.0	5.624	77.0
22	多摩河原橋	〃 14.30	15.5	15.5	7.1	7.3	15.0	100.0	6.016	85.2
24	二子橋	〃 12.00	17.0	16.0	7.1	7.4	15.0	90.0	8.637	124.6
(25)	野川	〃 10.40	14.0	16.1	7.1	7.4	14.5	70.0	4.065	58.4
27	丸子橋	〃 9.30	14.0	16.0	6.8	7.2	13.5	—	1.737	24.9
29	大師橋	〃 9.00	14.6	19.0	6.8	—	15.0	—	3.220	49.2

（ ）は支川

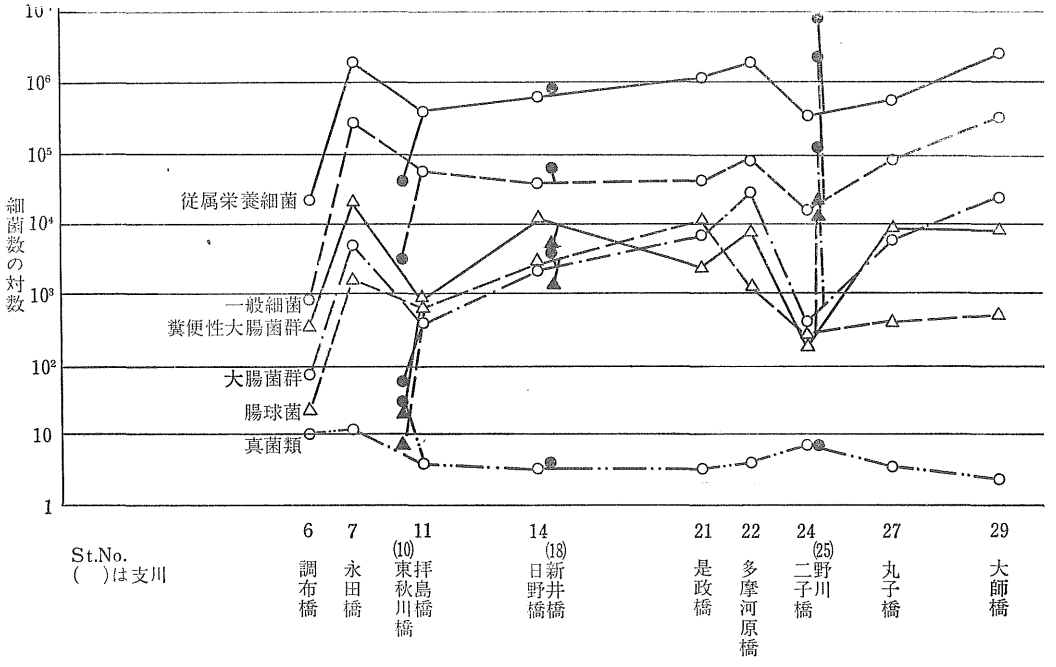


図2． 第1回調査の細菌学的試験結果（1973, 5.29～30）○●1m*l*中
△▲100m*l*中（中黒は支川）

接種後，44.5°の水浴槽で48 hr培養後，ガス発生をみたものを糞便性大腸菌群陽性とした．

6）腸球菌数

エチルヴァイオレットアザイドブイヨン培地を用い，最確数法で行なった．試料を培地接種後，紫色沈でんを生じたものを陽性とした．（37°, 48 hr 培養）

7）硫酸塩還元菌[6,7]

本菌は，還元状態の底泥に多く生活し，硫酸塩を還元して硫化物を生成する．ＩＳＡ培地に試料を接種し，表層を約 1cm の厚さになるように流動パラフィンで重層し，最確数を求めた．30°，14日培養ののち，培地の黒変したものを陽性とした．

試料は採水当日培養することが原則であるが，調査上やむをえない場合には，低温に保存して，１～４日

表4．第4回調査の環境要因（1974, 1. 31～2. 3）

St.No.	調査地名	調査日時	気温 (°C)	水温 (°C)	pH	透視度 cm	流速 cm/sec	DO ppm	DO 飽和度%
1	氷川大橋	2/2 15.00	6.0	1.3	8.2	>30.0	40	9.6	101.2
(2)	日原川	〃 14.35	5.6	4.0	>8.4	>30.0	90	9.6	108.8
(3)	海沢	〃 12.25	7.6	7.5	7.1	>30.0	35	6.6	101.1
(4)	大丹波川	〃 11.30	6.0	1.8	7.2	>30.0	70	9.9	104.7
5	鎧橋	〃 10.20	3.8	5.1	7.4	21.0	55	9.71	111.2
6	調布橋	〃 8.30	2.0	3.0	7.4	>30.0	87	9.43	102.0
7	永田橋	2/1 16.25	6.0	9.0	8.2	13.0	75	7.81	97.6
(8)	平井川多西橋	〃 15.40	7.6	8.0	8.4	>30.0	55	9.54	116.3
(9)	秋川落合橋	〃 13.20	8.3	1.9	7.2	>30.0	90	9.66	101.8
(10)	秋川東秋川橋	〃 14.20	10.0	6.0	8.4	>30.0	85	10.38	120.3
11	拝島橋	〃 11.25	11.0	4.5	7.3	17.0	75	8.92	97.3
12	多摩大橋	〃 10.40	6.2	3.1	7.1	20.0	65	8.07	86.6
(13)	谷地川	〃 10.05	5.5	2.5	6.9	23.0	50	7.57	79.9
14	日野橋	2/3 9.10	4.3	4.8	7.4	19.0	60	7.80	87.1
(15)	残堀川	〃 8.40	3.4	7.3	7.4	17.0	60	4.05	48.1
(16)	浅川敷島橋	2/1 8.40	0.8	4.2	6.9	>30.0	75	8.27	92.3
(17)	浅川水無瀬橋	〃 9.15	3.0	7.5	7.1	17.0	40	6.79	82.2
(18)	浅川新井橋	1/31 16.40	3.8	8.8	7.4	15.0	100	6.84	84.3
19	関戸橋	2/3 10.00	5.6	5.8	7.4	15.7	75	7.49	85.6
(20)	大栗川	〃 10.30	8.0	4.2	7.7	9.0	55	7.54	82.8
21	是政橋	1/31 15.00	4.0	7.0	7.2	15.0	73	7.89	92.7
22	多摩河原橋	〃 14.45	5.0	6.4	7.5	—	—	8.66	100.2
(23)	平瀬川	〃 14.00	6.0	8.0	7.3	11.0	—	4.32	51.9
24	二子橋	〃 12.40	6.0	6.2	7.1	17.0	75	6.47	74.4
(25)	野川	〃 12.15	5.5	7.5	7.0	8.0	60	3.75	44.5
(26)	谷沢川	〃 11.20	5.0	6.8	7.3	3.5	—	5.87	68.5
27	丸子橋	〃 10.35	2.2	6.0	6.9	—	130	2.53	28.9
28	多摩川大橋	〃 9.40	3.7	5.5	7.0	15.0	—	2.55	28.8
29	大師橋	〃 8.55	3.1	5.0	7.2	12.5	—	2.33	26.0

（ ）は支川

後に培養した．

第1回調査　S48, 5.29～30　採水当日培養
第2回調査　S48, 8.19～21　採水翌朝培養
第3回調査　S48, 10.27　10. 29　培養
　　11. 4　11. 5　培養
第4回調査　S49, 1.31～2.3　2. 4　培養

3-Ⅰ-2　結果と考察

3-Ⅰ-2-1　細菌数と水質

4回の調査結果を図2～5に示す．

第1回調査（5月）において（図2），St. 25（野川）は，いずれの細菌数も高い値をとり，特に人畜の排せつ物による汚染が著しい（一般細菌数 2.6×10^6/ml, 大腸菌群数 1.2×10^5/ml, 従属栄養細菌数 8.3×10^6/ml 真菌類数7/ml, 糞便性大腸菌群数 2.2×10^4/100ml, 腸球菌数 1.3×10^4/100ml）．St. 7（永田橋）も排せつ物による汚染指標菌数が多く，本流中最も汚染された水域である．逆に St. 6（調布橋）St. 7（東秋川橋）は，細菌数が比較的少なかった．（St. 6〔St. 7〕：一般細菌数 7.7×10^2/ml,〔2.9×10^3/ml〕, 大腸菌群数 8.1×10/ml〔5.5×10/ml〕, 従属栄養細菌数 1.9×10^4/ml〔4.2×10^4/ml〕, 真菌類数 10/ml〔13/ml〕, 糞便性大腸菌群数 3.3×10^2/100ml〔2.2×100ml〕, 腸球菌数 2.2×10/100ml〔8/100ml〕）

第2回調査（8月）において（図3），顕著なことは，流入支川の細菌数の多いことである．特に，排せつ物による指標細菌数が多く，流入支川は，まさに下

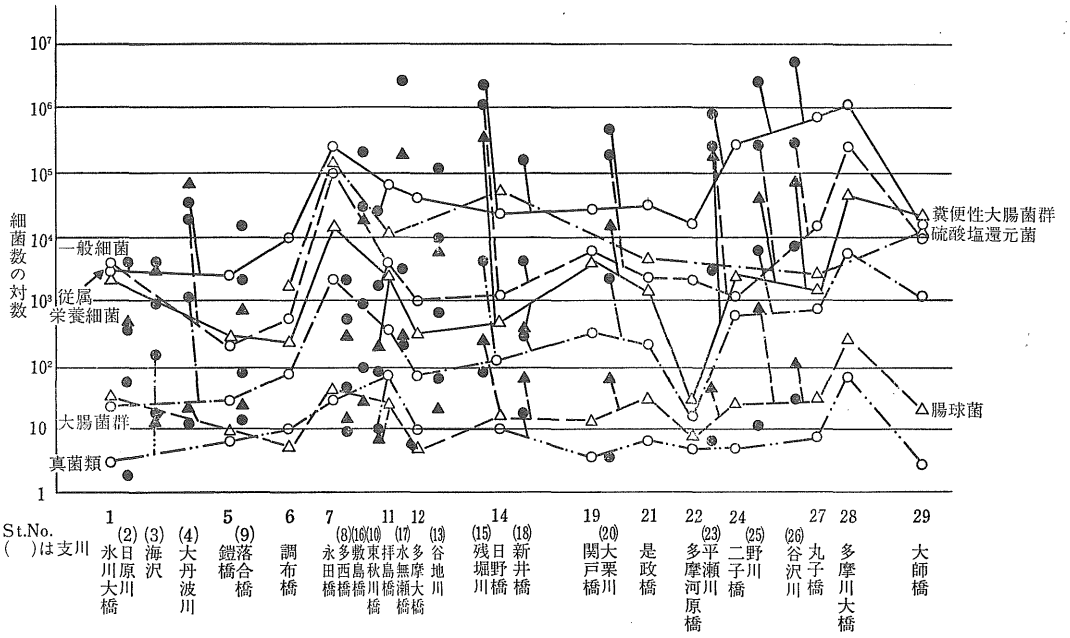


図3． 第2回調査の細菌学的試験結果（1973, 8. 19～21）○●1m*l* 中
△▲100m*l* 中（中黒は支川）

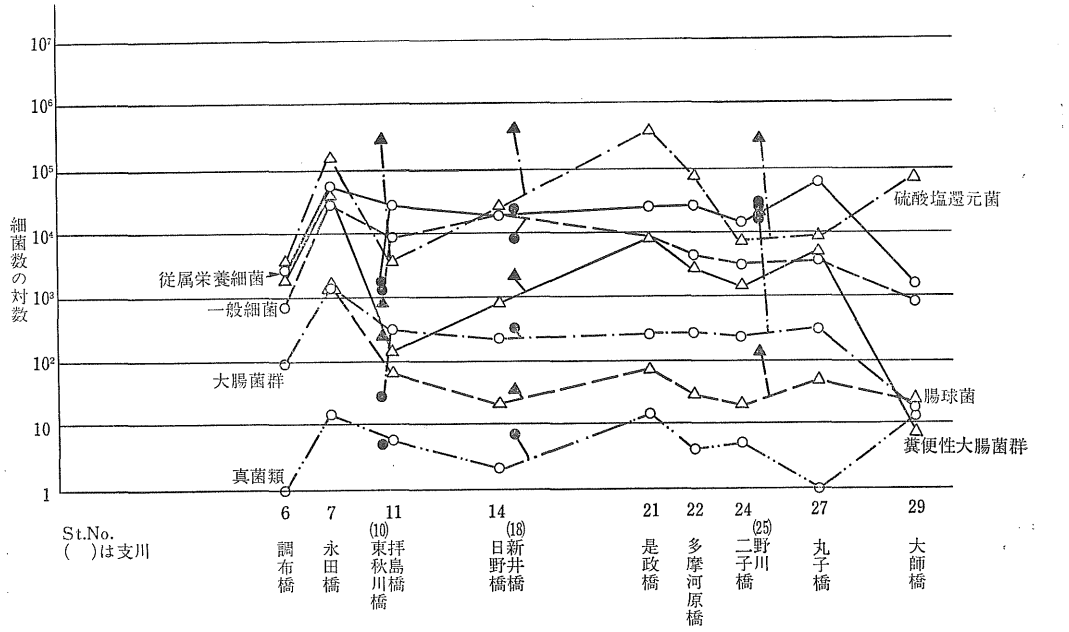


図4． 第3回調査の細菌学的試験結果（1973, 10. 27, 11. 4）○●1m*l* 中
△▲100m*l* 中（中黒は支川）

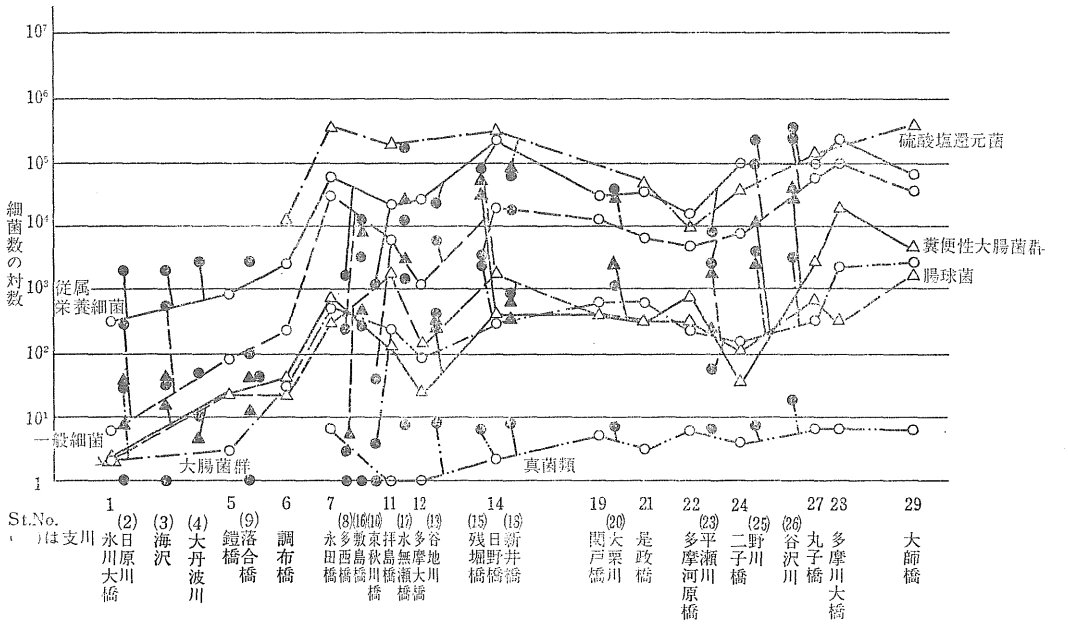


図5． 第4回調査の細菌学的試験結果（1974, 1.31～2.3）○●1ml中 △▲100ml中（中黒は支川）

水道と化している（例えばSt. 25野川と〔St. 26谷沢川〕：大腸菌群数 5.5×10^3/ml〔7.2×10^3/ml〕, 糞便性大腸菌群数4.9×10^4/100ml〔7.9×10^4/100ml〕). St. 4（大丹波川）において，大腸菌群数（1.0×10^3/ml），糞便性大腸菌群数（7.9×10^4/100ml）などが高い値を示したが，これは，上流にマス釣り場があるため，これらの行楽施設のタレ流しによる汚濁と考えられる．第2回調査の値は，前回に比べて低かった．とりわけ，大腸菌群数，糞便性大腸菌群数，腸球菌数は，5月の数十～百分の一であった．これは，第1回調査時は，前日から早朝まで，雨が降り続いたためと考えられる．

第3回調査（10—11月）において（図4），St. 29（大師橋）の全ての細菌数が比較的少ないが，本地点は感潮域のため，潮の干満によって，細菌数が大きく変動する．

還元状態の底泥に多く生活するといわれる硫酸塩還元菌が多いことは，流水中には，硫酸塩還元菌によらず，底泥由来の細菌が相当多くいることを示唆している．

第4回調査（1—2月）においても（図5），第2回調査と同様に，St. 12（多摩大橋）より下流域に流入する支川の汚濁が認められる．St. 4（大丹波川）は，夏とは異なり，すべての細菌数は少なかった．（大腸菌群数10/ml，糞便性大腸菌群数0/100ml…）

4回の調査を通して，本流中最も汚濁の著しいのは，St. 7（永田橋）であった．これは，羽村堰で大部分の水が村山・山口両貯水池に取水され，水量が減少したところへ，青梅市，福生市などの生活排水と200をこす工場の排水が流入するためである．しかし，St. 7（永田橋）の下流約 2km～4km の間に，比較的清浄な平井川と秋川が流入することと自浄作用によって，St. 11（拝島橋），St. 12（多摩大橋）では，かなり回復が認められる．St. 1（氷川大橋）～St. 6（調布橋）までの本流と支川，平井川（St. 8：多西橋）と秋川（St. 9：落合橋，St. 10：東秋川橋）そして浅川水系のSt. 16（敷島橋）は，比較的細菌数が少なく，清冽であるといえよう．しかし，夏季のSt. 2（日原川），St. 3（海沢），St. 4（大丹波川）は，行楽施設のタレ流しなどによって，多少の汚れが加わるものと思われる．St. 11（拝島橋）からSt. 24（二子橋）にかけての本流域では，上記の清冽な水域と比較すると，各細菌数とも1～2桁高い値を示した．概して，St. 12(多摩大橋）からSt. 21（是政橋）にかけては，細菌数が増加する傾向にあり，St. 22（多摩河原橋）あるいはSt. 24（二子橋）では，再びSt. 11（拝島橋）程度まで，細菌数が減少している．同様の現象が，底生生物相などの調査からも認められる[2,8,9]．これは，一旦地下へ

浸透した水が，上記地点付近で，再び湧き出るためである．St. 24 （二子橋）から下流域は，さらに汚濁の進行が認められるが，St. 27 （丸子橋）より下流域は感潮域なので，他と同等には扱えない．浅川水系の St. 17 （水無瀬橋）の汚濁は，浅川の水量が伏流などによって減少したところへ，八王子市の生活排水と工場排水が流れこむためである．しかし何といっても多摩川の汚濁の元凶は，中流域以降に流入する支川であろう．St. 13 （谷地川），St. 15 （残堀川），St. 20 （大栗川），St. 23 （平瀬川），St. 25 （野川），St. 26 （谷沢川）の大腸菌群数，糞便性大腸菌群数，腸球菌数といった人畜の排せつ物による汚染指標菌数は，本流の数十～数百倍にも達した．

St. 14 （日野橋）からSt. 27 （丸子橋）にかけて，上記の流入支川によるＢＯＤ負荷量は，約 20ton/day にも達するが，川の浄化能力，また，環境基準をみたすためには，ＢＯＤ負荷量を現在の半分の 10ton/day にしなくてはならないといわれている[2]．そのためには，流域の下水道を早急に完備して，下水道と化した支川の水質改善をはかるとともに，工場排水に対しても絶対量で規制することが，多摩川をその名にふさわしい川によみがえらす道であろう．

各細菌数は，汚濁の程度によってその菌数を増すが，真菌類は，全調査を通して，また，どの地点においても 1～10/ml と低いレベルで安定していた．真菌類は，汚濁の度合によって，生育する数も種属も異なるといわれているが，本調査では，真菌類数と汚濁との関係は認められなかった．腸球菌数も，本流では比較的低いレベルであった．

3-Ⅰ-2-2 従属栄養細菌数と BOD, COD, DO の関係

従属栄養細菌は，一般細菌数ほど水温によってその数が左右されることはなく，自然水の実態をよくあらわすといわれている．そこで，従属栄養細菌数とＢＯＤ，ＣＯＤ，ＤＯの関係を図に示した．（図６～７）

従属栄養細菌数の少ない地点では，ＢＤＯ，ＣＤＯの値も低く．多いところでは，ＢＯＤ，ＤＯの値も高い傾向が認められる．逆に，は，従属栄養細菌数の少ないところで高く，多いところでは低いという結果が得られた．

3-Ⅰ-2-3 大腸菌群数と一般細菌数の比，大腸菌群数と従属栄養細菌数の比について

一般細菌数と最も代表的なし尿汚染指標菌である大腸菌群数，そして従属栄養細菌数と大腸菌群数との比を求めたのが図８～９である．これらの値は，上流域，下流域の区別なく，汚濁程度の違いもなく，そしてまた，四季の変化にかかわりなくほぼ一定である．この安定性は，多摩川だけにいえることなのか．ま

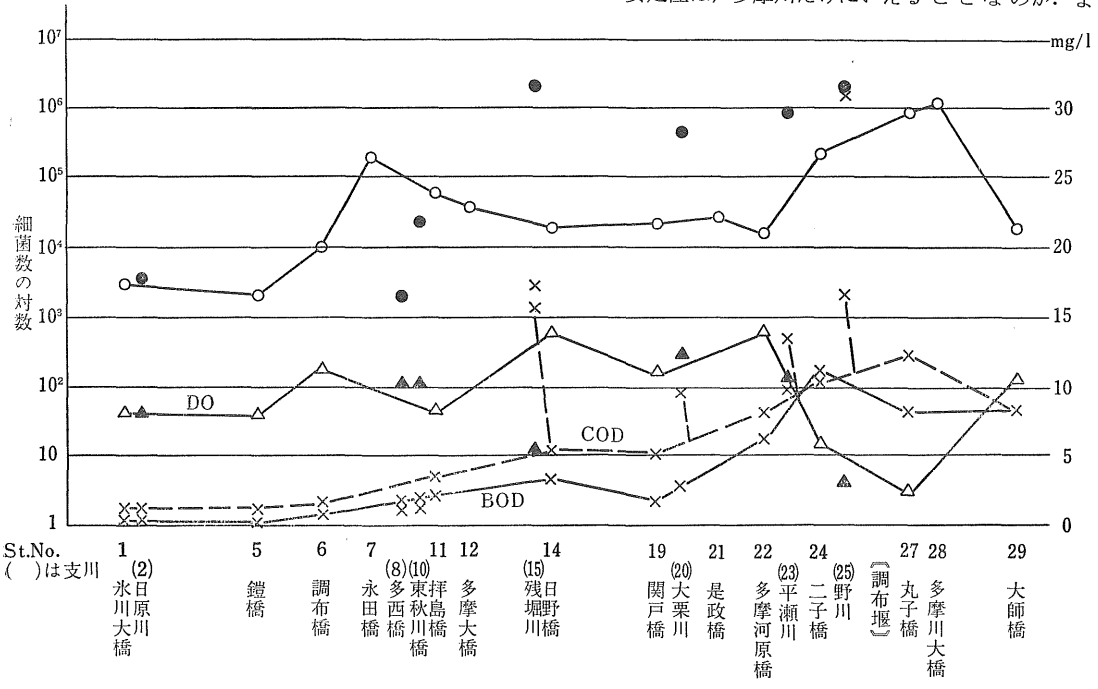


図６． 第２回調査における従属栄養細菌数と BOD, COD の関係 (1973, 8.19～21)
BOD, COD：1973, 8.20～21採水 ○●従属栄養細菌数/1ml (中黒は支川)

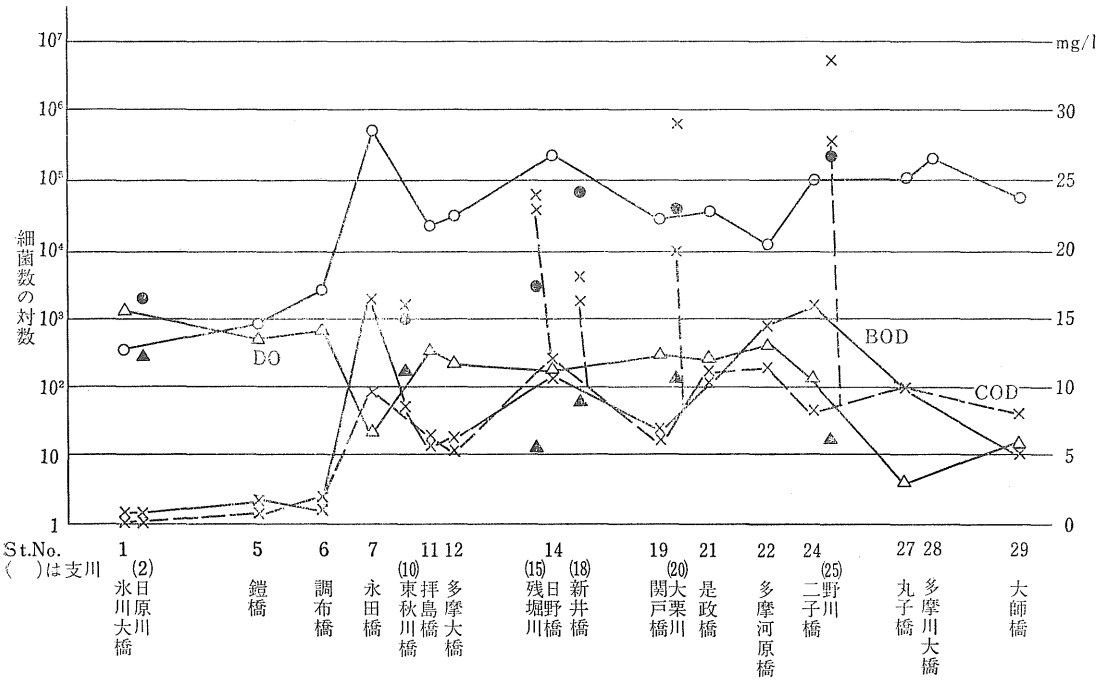


図7．　第4回調査における従属栄養細菌数と BOD, COD, DO の関係 (1974, 1.31～2.3)
BOD, COD：1974, 1.29～30採水　○●従属栄養細菌数/ml（中黒は支川）

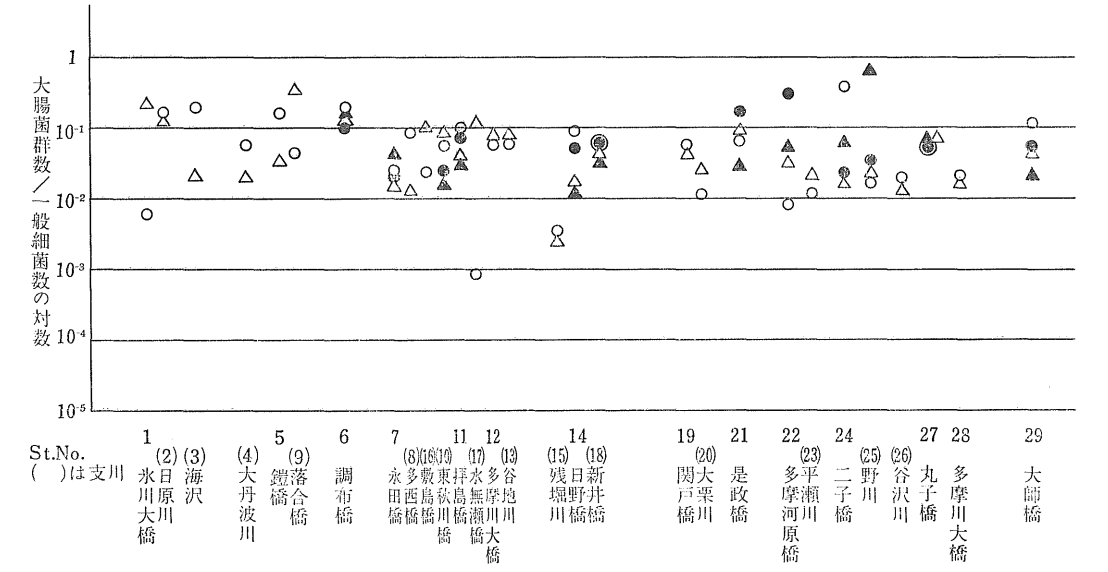


図8．　大腸菌群数と一般細菌数の比（●第1回調査，○第2回調査，▲第3回調査，△第4回調査）

た，どういう意味をもつことなのか，さらに検討が必要であろう．

4-Ⅱ多摩川の流下物について

多摩川水系における，流下物量および流下水生昆虫などの種類や量を知るために本調査を行なった．また，流下物は，石にかかったり，淀みに沈でんしたりし，それが二次汚染の原因ともなるので，有機物量としての灼熱減量を求めた．

4-Ⅱ-1　採集方法

末端に金属ロートをつけたミューラーガーゼ（GG 40：0.472mm）を25cm×25cmの枠付き方形枠に縫いつけ，これを流下物の捕集器とした(図10)．ロート

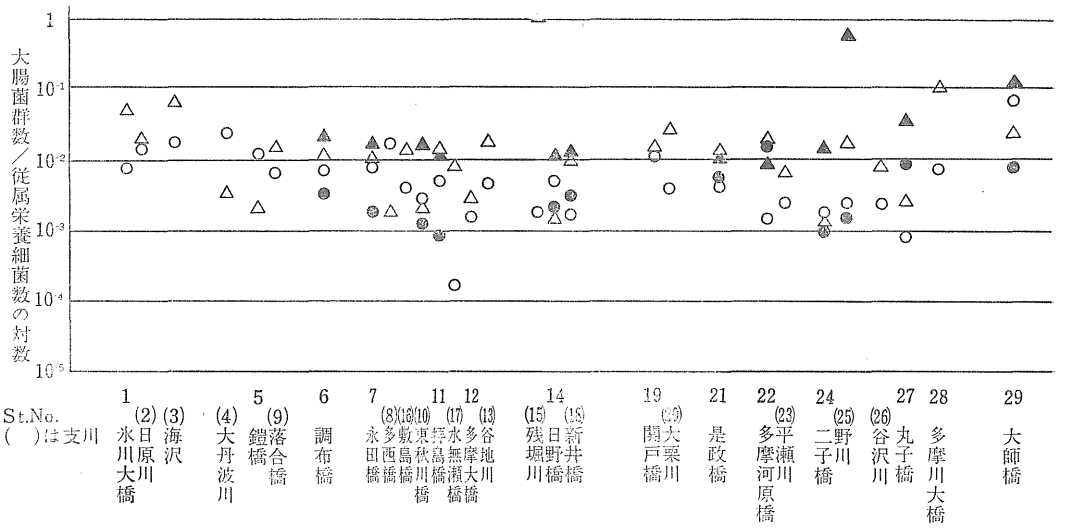


図９． 大腸菌群数と従属栄養細菌数の比（●第１回調査，○第２回調査，▲第３回調査，△第４回調査）

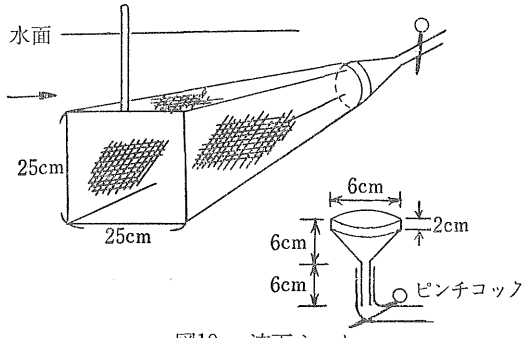


図10． 流下ネット

には，ピンチコックをつけ，捕集された流下物はここから容器に移した．捕集に際しては，流下ネットの方形枠を川上にむけ，流れに垂直に設置して，一定時間経過（３～５min）後，ネットを引き上げ，捕集物を250m*l* のポリビンに洗い込み，ホルマリンで固定した．流下物量の多い地点では，ろ過率が低下し，フローアウトする恐れがあるので，捕集時間を30secとした．（St. 25：野川）

4-Ⅱ-2 測定方法

250m*l* ポリビンに収めた採集物は，１週間以上静置の後，上澄をとり除き，メスシリンダーに移し，24hr静置後上澄を除き，沈でん物を容量の小さなメスシリンダーに移した．この操作をくり返し，最終的に48hr静置した後の沈でん物量を求め，これを流下物量とした．この流下物について×6～60の双眼実体顕微鏡下で，流下動物などの分別同定と[11,14-15]簡単な定量を行なった．また，流下物を100°で乾燥したのち，600°で灼熱し，灼熱減量を求めた．

4-Ⅱ-3 結果と考察

4-Ⅱ-3-1 流下物量について

流下物量を表５に示す．St. 7（永田橋）St. 25（野川を除いて，流下物量の多いところは，そのほとんど全部を流下藻類が占めていた．流下藻類の８～９割はヤナギモ（*Potamageton oxyphyllus* Miqvel[10,11]）エビモ（*P. crispus L.*[10,11]）クロモ（*Hydrilla verticillata* Caspi[10,11]），緑藻類の *Stigëoclonium*, *Spirogyra* spp.[11,12]などであった．St. 7（永田橋），St. 24（野川）の流下物は，大部分が *Sphaerotilus* であり，その量も比較的多いことから，これらの水域は，相当汚濁されているものと考えられる．St. 27（丸子橋）は，流下物が調査地点上流の渕に沈むため，その量が少ないものと思われる．

本調査から，流下物量の多少は，流下藻類あるいは流下 *Sphaerotilus* の量によって決まるものと考えられる．しかし，ある地点での流下物量は，上流からその地点までの流下藻類，流下 *Sphareotilus* の総和というわけではないようである（表５）[13]．二次汚染という観点からも，流下物の途中経過を知る必要があると思われる．

4-Ⅱ-3-2 流下物の灼熱減量について

藻類や *Sphaerotilus* が多量に流下することは，見た目にも汚なく，不快であるばかりでなく，途中，石にひっかかったり，沈でんしたりして，細菌などの生活の場となったり，あるいは分解されて栄養塩として流れへ供給されるなど，二次汚染の原因ともなる．そこで，流下物が完全に分解された場合の有機物量は，

表5. 流下物量

St.No.	第1回調査 1973, 5.29～30	第2回調査 1973, 8.19～21	第3回調査 1973, 10.27, 11.4	第4回調査 1974, 1.31～2.3
6	17.5	6.68	0.6	11.0
7	81.7	—	720.0	—
(10)	2.2	37.5	6.5	53.0
11	10.5	28.3	9.0	3.0
14	193.3	291.7	172.0	4.2
(18)	186.7	70.0	416.7	650.0
21	236.7	—	—	18.3
22	196.7	—	—	—
24	118.3	225.0	42.0	34.0
(25)	1650.0	3550.0	1260.0	600.0
27	—	80.0	0.75	0.6

単位：ml/5mim ( ) は支川

表6. 流下物の灼熱減量

St.No.	1)沈でん量 ml/5min	2)乾燥重量 mg	3)灼熱残渣 mg	4)灼熱減量 mg	4)/2)×100 (%)
6	6.65	345.1	258.25	86.85	25.17
11	17.0	126.0	70.8	55.2	43.81
14	45.0	402.0	94.1	30.79	76.59
(18)	15.0	215.4	71.05	144.35	67.01
24	21.5	257.1	92.2	164.9	64.14
(25)	34.0	270.8	97.3	173.5	64.07
(25)*	65.0	685.2	160.95	524.25	76.51

(第2回調査 *第4回調査)

表7. 下物量の灼熱減量換算値

St.No.	第1回調査 1973, 5.29～30	第2回調査 1973～8.19～21	第3回調査 1973, 10.27, 11.4	第4回調査 1974, 1.31～2.3
6	4.40	1.68	0.15	2.77
7	57.4	—	506.1	—
(10)	0.76	12.9	2.2	18.4
11	4.60	12.4	3.94	1.31
14	148.0	223.4	131.7	3.22
(18)	125.1	46.9	279.2	435.6
21	170.0	—	—	13.1
22	141.2	—	—	—
24	75.9	144.3	26.9	21.8
(25)	1159.8	2774.5	885.7	459.1
27	—	51.3	0.48	0.38

単位：mg/5min ( ) は支川

どのくらいになるのか求めてみた．7地点について，流下物量の全部，あるいは一部を100°で乾燥したのち，600°で灼熱し，灼熱減量を求めた．その結果を表6に示す．St. 6（調橋布）の流下物には，砂などが多く含まれているため，乾燥重量に対する灼熱減量が25.2%と低い．他の地点では，上の値は，64～76.6%であった．表7は表5を灼熱減量に換算したものである．しかしながら，これらの流下物が，多摩川の富栄養化にどの程度関与しているののかということは，今後の課題であろう．

4-Ⅱ-3-3 流下動物，流下脱皮ガラについて

流下動物および流下脱皮ガラ等[17-21]は，表8～11のとおりである．流下動物は多くても7ml/5minで，これらの流下物量に対する割合は，St. 6（調布橋），St. 10（東秋川橋），St. 11（拝島橋）で10数%，その他の地点では，わずか数%にすぎない．特に第4回調査では，St. 6（調布橋），St. 10（東秋川橋）を除いて，種類も量も極めて少ないものであった．

流下動物では，全調査を通して，ユスリカ類（Chironnmidae spp.）が，水域的にも量的にも最も多く得られ，次いでミズミミズ（Nais sp.）シロハラコカゲロウ（*Baëtis thermicus* Uéno）の順であった．

第2回調査では，St. 14（日野橋）において，ヤナギモに付いて大量のサカマキガイ（*Physa acta*）の流下がみられ，St. 27（丸子橋）ではミジンコ(*Daphmia* sp.）が多量に捕集された．St. 27（丸子橋）では，毎回ミジンコの流下が観察された．これは，調査地点の上流が渕になっているためと考えられる．

本調査では，流下動物よりも，その流下脱皮ガラと流下断片（*Hydropsyche ulmei* のキチン化した胸部など）の方が，かなり多く得られた．特にユスリカ類とシロハラコカゲロウの脱皮ガラは，上流域から中流域に至るまで多くみられた．ユスカリ類の脱皮ガラのほとんどは，蛹脱皮ガラであった．底生動物の流下は，21～0時頃ピークに達するとの報告があり[13,17-18]脱皮ガラの流下は，日中に多く夜間に少ない傾向がある．そして脱皮ガラの中でも蜉蝣目，特にコカゲロウ属 *Baëtis*，フタバコカゲロウ属 *Baëtiella* が多く，次いで双翅目ユスリカ科（Chironomidae）が多いといわれている[13]．われわれの調査でも，流下脱皮ガラは，ユスリカ類，シロハラコカゲロウ，チョウバエ（Psychodidea sp.）という順であり，上記報告とほぼ一致する．これらの底生生物は，いずれも汚濁耐忍性種で，流下され易い生活形のため，多く検出された

表8 第1回調査の流下動物および流下脱皮ガラ・断片（1973, 5.29～30）

	学名（和名） St.NO.	6	7	(10)	11	14	(18)	21	22	24	(25)
流下動物（生体）	*Ephemerella* sp.（マダラカゲロウ）		+								
	Baëtis thermicus Uéno（シロハラコカゲロウ）			+	++						
	Rhyacophilinae sp.（ナガレトビケラ）			+							
	Glossosomatinae sp.（ヤマトビケラ）			+							
	Psychodidae sp.（チョウバエ）		++								++
	Chironomidae spp.（ユスリカ）	+++	+++		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
	（双翅目成虫）		++			++	++	++	++	++	
	Nematoda sp.（線虫）		++	+++							
	Physa acta（サカマキガイ）					+	++			+	
	Nais sp.（ミズミミズ）	+++	+++		+++	+++	+++	+++	++	++++	
	Diaphanosoma sp.（オナガミジンコ）	++									
	Daphnia sp.（ミジンコ）	+++							+	++	
	Asellus hilgendorfii（アセルス）						+		++		
	（稚魚）	+			+				+	+	
流下脱皮ガラ・断片	*Ephemerella* sp.（マダラカゲロウ）		+++	++	++						
	Baëtiella japonica（フタバコカゲロウ）		+++	++	++						
	Baëtis thermicus Uéno（シロハラコカゲロウ）	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
	Isonychia japonica（チラカゲロウ）		++								
	Epeorus napaeus（タニヒラタカゲロウ）		++	++							
	Ecdyonuru sp.（タニガワカゲロウ）		++								
	Stenopsyche griseipennis MaLachlan（ヒゲナガカワト		++	+++							
	Hydropsyche ulmeri（シマトビケラ） ビケラ）	++	++	+++	+++						
	Mataeopsephenus japonicus Matsumura （ヒラタド			++							
	Tipulidae sp.（ガガンボ） ロムシ）			+++	+++				++		
	Psychodidae sp.（チョウバエ）	++	+++			++	++		+++	++	+++
	Chironomidae spp.（ユスリカ）	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++++	+++	++

＋極めて少ない，＋＋少ない，＋＋＋普通，＋＋＋＋多い，＋＋＋＋＋すこぶる多い
（ ）は支川

表 9　第 2 回調査の流下動物および流下脱皮ガラ・断片（1973, 8. 19～21）

	学名（和名） St. NO.		6	(10)	11	14	(18)	24	(25)	27
流下動物（生体）	*Ephemerellea* sp.	（マダラカゲロウ）	+							
	Baëtis thermicus Uéno	（シロハラコカゲロウ）	++	++	++	+		+		
	Hydropsyche ulmeri	（シマトビケラ）		++	+					
	Tipulidae sp.	（ガガンボ）	+							
	Chironomidae spp.	（ユスリカ）		++	++	+++		+++	+++	+++
		（双翅目成虫）						++	+	++
	Physa acta	（サカマキガイ）				+++				+
	Fossaria ollula	（ヒメモノアラガイ）	+							
	Nais sp.	（ミズミミズ）					++	+++		+++
	Erpobdella lineata	（ヒル）				+				
	Daphnia sp.	（ミジンコ）								++++
		（稚魚）			+			+		
流下脱皮ガラ・断片	*Ephemerella* sp.	（マダラカゲロウ）		++						
	Baëtiella japonica	（フタバコカゲロウ）	++							
	Baëtis thermicus Uéno	（シロハラコカゲロウ）	++	++	+++		++			
	Isonychia japonica	（チラカゲロウ）		+	++					
	Epeorus napaeus	（タニヒラタカゲロウ）			++					
	Gomphidae sp.	（トンボ）		+						
	Stenopsyche griseipennes McLachlan	（ヒゲナガカワトビケラ）	+++	++						
	Hydropsyche ulmeri	（シマトビケラ）		++	+++		+	++		
	Goera japonica Banks	（ニンギョウトビケラ）		+						
	Mataespsephenus japonicus Matsumura	（ヒラタドロムシ）		+						
	Tipulidae	（ガガンボ）	+++	++	+		+			
	Psychodidae sp.	（チョウバエ）						+++		+++
	Chironomidae spp.	（ユスリカ）	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++

+極めて少ない，++少ない，+++普通，++++多い，+++++すこぶる多い
（　）は支川

表10　第 3 回調査の流下動物および流下脱皮ガラ・断片（1973, 10. 27, 11. 4）

	学名（和名） St. NO.		6	7	(10)	11	14	(18)	24	(25)	27
流下動物（生体）	*Ephemerella* sp.（EC）	（マダラカゲロウ）			++						
	Baëtis thermicus Uéno	（シロハラコカゲロウ）	++			+	++		+		
	Epeorus napaeus	（タニヒラタカゲロウ）	++		++	+					
	Rhyacophilinae sp.	（ナガレトビケラ）			+						
	Hydropsyche ulmeri	（シマトビケラ）			++	++					
	Tipulidae sp.	（ガガンボ）			++						
	Psychodidae sp.	（チョウバエ）		+						+	
	Chironomidae spp.	（ユスリカ）	+	+++	+++	++	+++		+	++	+++
		（双翅目成虫）		++	++		++	++		+++	
	Nais sp.	（ミズミミズ）	+	++	+++		++	++			+
	Erpobadella lineata	（ヒル）					+				
	Daphnia sp.	（ミジンコ）									++
	Asellus hilgendorfii	（アセルス）						+	+		
流下脱皮ガラ・断片	*Ephemerella* sp.	（マダラカゲロウ）	++								
	Baëtiella japonica	（フタバコカゲロウ）	++		++	++					
	Baëtis thermicus Uéno	（シロハラコカゲロウ）	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++		
	Stenopsyche griseipennis MaLachlan	（ヒゲナガカワトビケ	++		+++						
	Hydropsyche ulmeri	（シマトビセラ）　ケラ）	++		+++	++					
	Mataeopsephenus japonicus Matsumura	（ヒラタドロムシ）			++	+					
	Tipulidae sp.	（ガガンボ）	++		++	+					
	Psychodidae sp.	（チョウバエ）		++						++	
	Chironomidae spp.	（ユスリカ）	++	+++	++	++	++	++	++	+++	+

+極めて少ない，++少ない，+++普通，++++多い，+++++すこぶる多い
（　）は支川

表11 第4回調査の流下動物および流下脱皮ガラ・断片(1974, 1. 31～2.3)

	学名(和名) St. NO.		6	(10)	11	14	(18)	21	24	(25)	27
流下動物(生体)	*Ephemerella* sp.	(マダラカゲロウ)	＋	＋							
	Caenis sp.	(ヒメカゲロウ)	＋	＋							
	Baëtis thermicus Uéno	(シロハラコカゲロウ)	＋	＋							
	Epeorus napaeus	(タニヒラタカゲロウ)	＋								
	Epeorus uenoi Matsumura	(ウエノヒラタカゲロウ)		＋							
	Perlidae sp.	(カワゲラ)	＋								
	Hydropsy che ulmeri	(シマトビケラ)	＋	＋							
	Tipulidae sp.	(ガガンボ)	＋	＋							
	Psychodidae sp.	(チョウバエ)							＋	＋	
	Simulium sp.	(ブユ)		＋							
	Chironomidae spp.	(ユスリカ)		＋			＋		＋	＋	
		(ボーフラ)								1	
		(双翅目成虫)								＋	
	Physa acta	(サカマキガイ)				1					
	Nais sp.	(ミズミミズ)	＋	＋		3	＋	2	＋	＋	2
	Erpobdella lineata	(ヒル)					＋	2			
	Daphnia sp.	(ミジンコ)						4	2		
		(ケンミジンコ)									3
流下脱皮ガラ・断片	*Ephemerella* sp.	(マダラカゲロウ)	＋	＋							
	Baëtiella japonica	(フタバカゲロウ)	＋								
	Baëtis thermicus Uéno	(シロハラコカゲロウ)	＋	＋							
	Epeorus napaeus	(タニヒラタカゲロウ)	＋	＋							
	Epeorus latifolium	(エルモンヒラタカゲロウ)	＋								
	Stenopsyche griseipennis MaLachlan	(ヒゲナガカワトビケラ)	＋								
	Glossosomatinae sp.	(ヤマトビケラ) ケラ)	＋								
	Hydropsyche ulmeri	(シマトビケラ)	＋	＋				＋			
	Tipulidae sp.	(ガガンボ)	＋								
	Psychodidae sp.	(チョウバエ)							＋	＋	
	Chironomidae spp.	(ユスリカ)	＋	＋			＋	＋	＋	＋	

＋極めて少ない, ＋少ない, ＋＋普通, ＋＋＋多い, ＋＋＋すこぶる多い
( )は支川

ものと考えられる. 流下容易な生活形は, 掘潜型>游泳型>固着型>携巣型>匍匐型>網型の順といわれている[13]. ちなみに, ユスリカ類, チョウバエは掘潜型でシロハラコカゲロウは游泳型である. ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche griseipennis*, Mc Lachlan), シマトビケラ (*Hydropsyche ulmeri*), ガガンボ (Tipulidae sp.) は, キチン化した胸部背面などが流下断片として得られた.

ある地点の流下藻類および流下動物の量は, 上流からその地点までの総和ではない[10]ので, 流下動物や流下脱皮ガラからも, ある程度の汚濁状況を知ることもできようが, むしろ, 底生生物の分布や羽化量などを知る手がかりとして, 重要性があると思われる.

5. 摘 要

1973年5月から1974年2月までに, 氷川から河口に至るまでの本流, 支川に29地点を設け, 4回の調査を行ない, 多摩川の水質汚濁状況をみた.

細菌学的試験結果からは, 次のことがいえよう.

1. 羽村堰より上流域の本流と流入支川 (St. 1～6) と平井川 (St. 8) および秋川 (St. 9, 10) の全域と浅川の上流域 (St. 16：敷島橋) は, 比較的細菌数が少なく, 清水域と考えられる. St. 11 (拝島橋) より下流域は, 流入支川の汚染も手伝って. 流下するに従って, 汚濁が進行している.

2. St. 22 (多摩河原橋) あるいは St. 24 (二子橋) では, 細菌数が St. 11 (拝島橋) 程度まで減少することが認められた. これは, 一旦地下に浸透した水が, この付近で再び湧き出すためである.

3. 本流中最も汚濁していたのは St. 7 (永田橋) であり, 流入支川 St. 13 (谷地川), St. 15 (残堀川), St. 20 (大栗川), St. 23 (平瀬川), St. 25 (野川), St. 26 (谷沢川) は, St. 7 (永田橋) と同じかそれ以上に汚染されていた.

4, St. 27 (丸子橋) より下流域は感潮域なので, 本方法による結果では, 参考としてしか扱えないであろう.

5. 従属栄養細菌数は, BOD, COD, とは同じ傾向がみられ, DOとは, 逆の関係が認められた.

6. 大腸菌群数／一般細菌数, 大腸菌群数／従属栄養細菌数は, ほぼ一定であった.

流下物の調査結果からは, 次のことがいえよう.

1. 流下物量は, St. 6 (調布橋), St. 10 (東秋川橋), St. 11 (拝島橋), St. 27 (丸子橋) で比較的少なかった.

2. 流下物量の大部分は，流下藻類が占めていた．しかし，汚濁水域では，藻類にかわって *Sphaerotilus* がほとんどであった．

3. 流下物の有機物量は，ほぼ64～76.6%であった．

日中に行なった調査のため，流下動物より流下脱皮ガラが多く得られた．特にユスリカ類の蛹脱皮ガラが多く，次いで，シロハラコカゲロウ，チョウバエの順であった．流下動物では，ユスリカ類，ミズミミズ，シロハラコカゲロウが多かった．

文　献

1) 加藤辿：都市が滅ぼした川，207pp，(1973)
2) アーバンクボタ：7，November，64pp，(1972) 久保田鉄工㈱，大阪
3) 日本水道協会：上水試験法347—547 (1971) 東京
4) American Public Health Assosiation, Standard Methods, 633—678 (1971)
6) 桑原驎児：用水と廃水，4，2，1—8 (1970)
6) 松本淳彦：東京都立衛生研究所年報，22，221—229 (1970)
7) 松本淳彦：東京都立衛生研究所年報，23，319—326 (1971)
8) 日本環境衛生センター：環境汚染と生物相の生態学的研究，79pp，(1972) 東京
9) 東京都公害研究所報 (1973未発表)
10) 牧野富太郎：牧野新日本植物図鑑，695—696，701 (1969) 北隆館，東京
11) 上野益三：日本淡水生物学 (1973) 北隆館，東京
12) 水野寿彦：日本淡水プランクトン図鑑，73—75 219—228 (1973) 保育社，東京
13) 水野信彦，御勢久右衛門：河川の生態学，245 pp，(1972) 築地書館，東京
14) 津田松苗：水生昆虫学，269 pp，(1972) 北隆館，東京
15) 新日本動物図(上)，537—540，567—573(1965) 北鑑館，東京
16) 新日本動物図鑑(中)：190—191 (1967) 北隆館東京
17) 大河原玄沖，塩田朋子：奈良女大生物学誌，20 1—4 (1970)
18) 田中光：淡水区水産研究所年報，9，2，13—25 (1960)
19) 塩田朋子：奈良女大生物学誌，19，1—2(1969)
20) 田辺知子，伊藤春子：奈良女大生物学誌，19，3—6 (1969)
21) 大島みさ子，河村恵美子：奈良女大生物学誌，20，7—9 (1970)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 489 — 495, 1974

東京都立衛生研究所毒性研究用小実験動物飼育施設とその細菌学的管理成績について

水尾昭江* 池田虎雄* 平賀興吾* 新関治男**

New Housing Facilities for Laboratory Aminals and Control of Bacterial Environment

AKIE MIZUO* TORAO IKEDA* KOGO HIRAGA* AND HARUO NIIZEKI*

精度の高い動物実験は良質の実験動物とよい飼育管理があってはじめて可能である．よい飼育管理とは実験動物が試験に対して，いつも均一な反応性を確保し，健康に生存できるよう飼育環境を調整することであると考える．

これに関与する因子は極めて多く，環境の温度変化は反応の均一性に影響を与え，感染による発症は試験自体の反応を妨げたり，実験途中において死亡させたりして，成績の読みとりを困難にする．

東京都立衛生研究所においては毒性試験研究に用いる実験動物のよりよい飼育管理を目ざして，温度，湿度等所謂物理化学的因子と微生物の影響をコントロールすることに主眼を置いた実験動物飼育施設が完成した．

本施設の使用を開始して丁度一年が経過するのを機に，小実験動物用施設の概略を紹介し，細菌学的環境管理のために行なった作業と調査について報告する．

Ⅰ 施設：ラットおよびマウスを中心とした実験動物飼育施設は研究所3号館1階にあり，平面図（Fig. 1）に示すように洗浄室をはさんで，北側に長期間の動物実験を行なうための飼育室およびその関連設施（**バリア飼育区域**）と南側に短期の動物実験のための飼育室および実験室（**一般飼育区域**）があり，東側には動物受入室，南北を結ぶ廊下と2階に通じる階段，2階と地下を結ぶエレベーターがあり，西側は荷受け室（器材の受入れと，動物・器材・汚物の搬出），動物死体・汚物冷凍室，地下の犬・サル飼育室，地下2階汚物処理室を結ぶエレベーターと作業者控室がある．

バリア飼育区域は人の出入のためのシャワー室，動物搬入のためのパスボックス2基，大型器材搬入，動物・汚物・器材搬出のための消毒装置付きパスルーム2室と殺菌とその器材搬入のオートクレーブ2基（うち一基はガス滅菌可能）により他区域より遮断されラット飼育室4，マウス飼育室2，処置室1および作業廊下よりなっている．一般飼育区域はラット飼育室2，マウス飼育室1，ウサギ飼育室1，兼用飼育室2実験・解剖室2よりなり，微生物研究室，宿直室と飼料倉庫が付属している．飼育室の面積，飼育方式，収容動物頭数，設定温湿度および換気回数は　頁の表の通りである．

空気はバリア，一般飼育区域を問わず全域に，効率85%および99.99%フィルターを通して供給され，飼育室は天井の多孔板より給気され，床の四方より排気されて内部が陽圧となっている．

水は，濾過精度 10 mμ～5 μのフィルターを通した水道水が供給される．

Ⅱ 細菌学的環境管理

1. 飼育開始前の処置

i）バリア飼育区域：天井を除く壁，床全域にわたって塵埃を除去し，洗剤を用いてブラッシングを行ない．汚れを除去し水洗後逆性石鹸500倍液および塩素剤を交互に動力噴霧機で散布，これと併行して，空気

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan.
** 日本クレア株式会社（動物飼育管理受託）

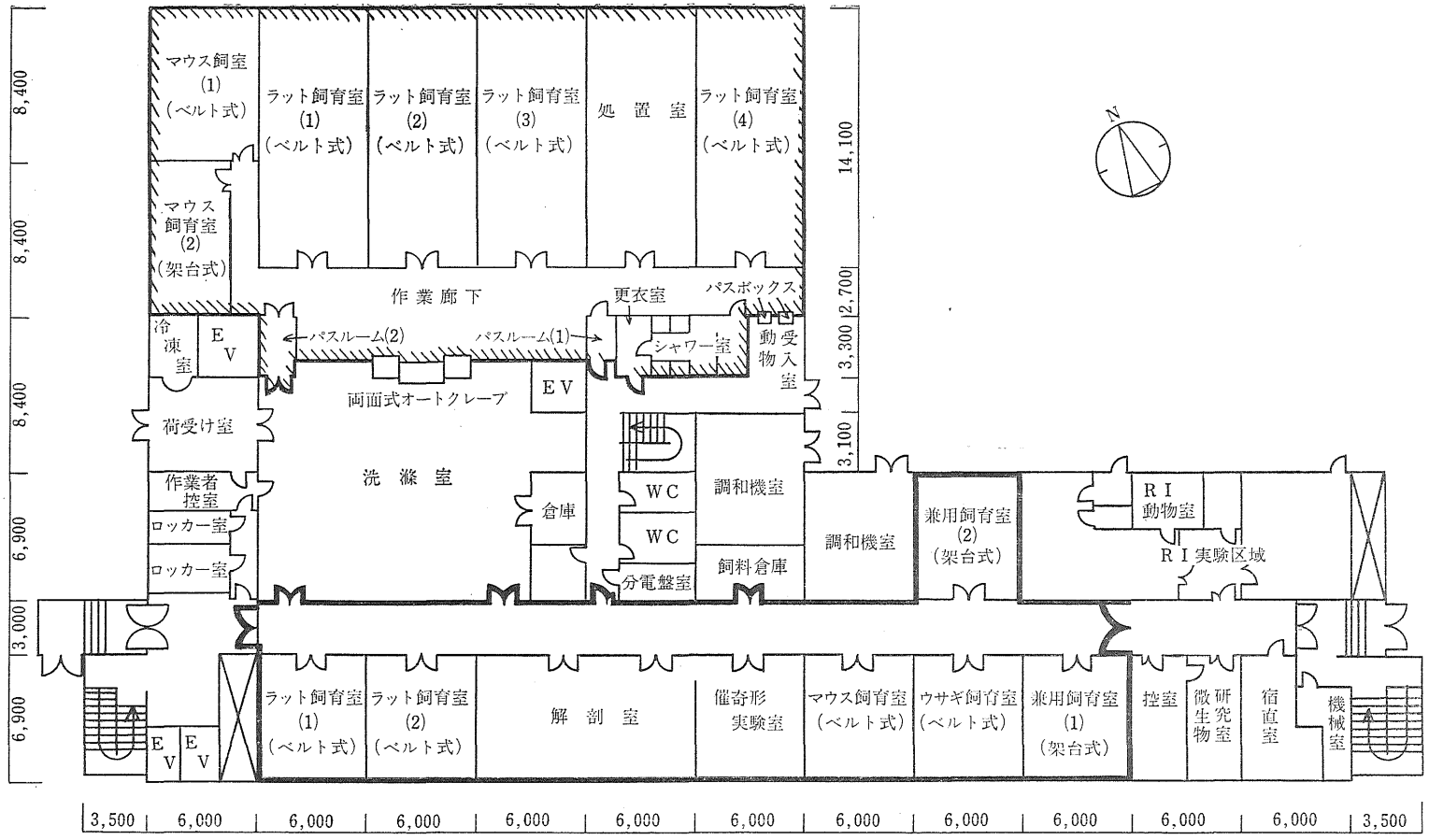


Fig. 1 小実験動物飼育施設平面図 ▨バリア飼育区域 □一般飼育区域

区域	飼育室	面積 m²	容積 m³	飼育方式	ケージ匹数	最大収容数	温度 °C	湿度 %	換気回数 回/時
バリア飼育	ラット（4室）	86[c]	240	ベルト式[a]	1（2連式）	800	25±1	50±5	10
	マウス	55	155	ベルト式	10	1.120			
	マウス	38	106	架台式[b]	5	1.000			
一般飼育	ラット（2室）	41[c]	115	ベルト式	5	560			
	マウス	41	115	ベルト式	10	1.120			
	兼用（2室）	41[c]	115	架台式	5（ラット）	600（ラット）			
	ウサギ	41	115	ベルト式	1	60	23±1		

a）ベルト式自動飼育機：国立衛試式，ベルトにより定時に糞便を処理，自動給水付ステンレス網ケージ使用
バリア室用は自動ベルト消毒装置付
b）ステンレス網ケージあるいはアルミ製またはポリエステル製箱型ケージ（床敷使用）給水は給水瓶による
c）1室について

調和機よりダクト内に逆性石鹸500倍液と塩素剤を交互に微粒子噴霧機で送風した．次に予めエチレンオキサイド・窒素混合ガスで3時間滅菌したフィルターを滅菌衣料着装の上，フィルターラックに取り付け，再びダタト内の消毒を行なった．消毒作業終了後空調和機扉を封印の上密閉した．この点で落下細菌検査を行ない再び滅菌衣料を着装して全域の消毒を行なった．また，固定されているベルト式飼育機を運転して細部にわたる消毒を行なった．この点で再び落下細菌検査を行なった．この前後2回の落下細菌検査で良好な成績を得た（後述）ので飼育関係器材および動物の搬入を開始した．

ii）一般飼育区域：床・壁の汚れをとり，逆性石鹸液で，床，壁およびベルト式飼育機の清掃を行なった．

2. 飼育に当っての処置

i）バリア飼育区域：a）飼育室への入出：飼育作業に当ってはシャワー室を介して入出し，入室の際は全身を薬用石鹸（ミツワミューズ石鹸）でよく洗いシャワー浴び，逆性石鹸で手指，足を消毒後高圧蒸気滅菌済みの帯電防止無塵衣製作業服（帽子，上衣，ズボン，足袋）および木綿製マスク，下着を着用し，バリア内サンダルをはき，更に手指の消毒を重ねてから入室することを原則とした．しかし女性の場合はシャワーを浴びず，手指，腕，足を洗い，同様消毒後作業衣を着用している．バリア内作業廊下から飼育室に入る時は，更に各飼育室専用のサンダルにはきかえ，作業中も適時手指を逆性石鹸で消毒する．

b）物品の搬入出：高圧蒸気滅菌機，ガス滅菌機，パスルームの三つの経路があるが経路別の物品の搬入方法は次頁の通りであり，搬出はパスルームによった．

c）動物の搬入出：動物（ラット・マウス）は，すべて barrier system 下に生育された所謂 SPF(Specific pathogen free) 動物で，ガス滅菌済みの除菌フィルター付段ボール箱で，更に硫酸紙で複包装されたものを，外装を逆性石鹸500倍液で清拭してパスボックスに入れ，扉を完全に閉じた後バリア室側扉を開き外装を切開し，内部の動物の入った段ボール箱を取り出す．パスボックスは使用後逆性石鹸で清拭し，内装の紫外線燈を点燈する．

動物の搬出はパスルームを使用する．

d）動物飼育飼料：飼料は，薬品添加飼料を使用するので滅菌せず，包装のみを Tego 51, 1,000倍液噴霧消毒を行ない搬入する．

e）飲料水：沪過水道水を，ベルト式飼育機飼育の場合は付属の自動給水装置を一般に用い，給水瓶使用の場合は給水瓶を毎回高圧蒸気滅菌したものを用いて与える．

f）飼育ケージ：高圧蒸気滅菌したケージを，金網式の場合2週に1回交換，箱型の場合週2回滅菌床敷と共に交換する．使用済みケージはパスルームより搬出する．

ベルト式飼育機は1日4回，運転時間を6分にセットして糞便の処理とベルト清掃が行なわれる．

g）清掃：飼育作業後退室時に逆性石鹸液を浸したモップで床面を，扉のノブ等を雑巾でそれぞれ清拭

高圧蒸気滅菌機	ガス滅菌機	パスルーム
2 kg/cm, 120°, 30 min	エチレンオキサイドガス, 3 hr	Tego 51, 1,000倍液を噴霧
金属ケージ	除菌フィルター	計器類
給水瓶	ビニール袋	樹脂製サンダル
飼料函	ゴム製品	金属戸棚
床敷（チップ）	事務机	ケージラック
作業衣	実験器材等	ワゴン
実験器材		飼料袋外装 等
清掃用具		
紙，沪紙		
事務用品		
工具		
スノコ 等		

し，シャワー室は塩素剤の散布を行なう．ベルト式飼育機，飼育架台も定期的に逆性石鹸液にて清拭する．

ii）一般飼育区域：この区域の管理は，飼育室への入出法，物品および動物の搬入出法以外はバリア飼育区域に準じて行なう．飼育室への入出は木綿製作業衣（帽子，上衣，ズボン）とマスク（合成樹脂性のものを使用）を着用し，飼室育専用サンダルにはき換え，手指を逆性石鹸で消毒する．飼育ケージは洗滌，薬液による消毒，水洗したものあるいは高圧蒸気滅菌したもののいずれかを使用し，床敷はすべて高圧蒸気滅菌したものを用い，動物のラットおよびマウスは，すべてＳＰＦ動物で輸送箱の外装を消毒して，直接飼育室に搬入する．ウサギ等ＳＰＦ化されていないものの使用数は極く小数に限定し，所定の飼育室へ直接搬入，その後他の飼育室との連繋を断つよう努力する．

Ⅲ 細菌学的検査

1. 飼料：試験の性質上，飼料を滅菌しないで使用するので，用いる市販固型飼料（CLEA CE—2）および使用検討中の自家製固型飼料について細菌検査を行なった．

一般細菌数は血液寒天，大腸菌群は寒天，ブドウ球菌はＤＨＬマンニット食塩，真菌はポテトデキストロ培地を用いた．

結果を Table Ⅰに示したが，市販飼料の菌数は 1 g 中$10^{4.0}$，自家製$10^{4.6}$であった．

市販飼料の場合検出された菌はほとんど全てが芽胞を形成する桿菌で占められ，大腸菌群，ブドウ球菌，真菌は検出されなかった．

自家製飼料は市販品と同一原料を使用したものであるが，一般細菌数もやや多く，ブドウ球菌が全例から検出され，大腸菌群，真菌も一部から検出された．

Table Ⅰ 固型飼料中の細菌数

	一般細菌数	大腸菌群	ブドー球菌	真菌
市販飼料	$10^{4.0}$a) (4)	Nb) (4)	N (4)	N (4)
自家製飼料	$10^{4.6}$ (14)	$10^{1.8}$c) (8)	$10^{3.4}$ (8)	$10^{1.7}$d) (8)

a) 1 g 中の菌数　b) 検出せず
c) 2×10^{-2}g 中，検出率3/8　d) 2×10^{-2}g 中，検出率1/8　（ ）検査数

2. 沪過水道水：一般細菌数を標準寒天混釈法で測定した．その結果，繁用している水道水は 1 ml 中 0 であったが，普段使用していない水道の開栓直後の水は 1 ml 中10,000以上の高い菌数を示すものがあった．しかし 5 分以上放流した場合はほとんど 0 になった．

また，使用しているベルト式飼育機に配備してある給水ノズルからの水について検査したところ，貯水タンク内の水からは菌を検出できず，タンクに近いノズルからの菌数は少なかったが，遠のく程菌数は多くなり，1 ml 中10,000以上の菌が検出された場合もあった．

そこで，飼育機の配水パイプの末端から常時水を少し流すようにしたところ菌数は 1 ml 中10以下に減らすことができた．

3. 手指：バリア飼育室に入った 5 人の手指について①入室前，②逆性石鹸液内でブラッシングし，水洗せずタオルで水分を拭きとった時点，③作業中随時逆性石鹸で消毒，④作業後の付着細菌のスタンプ検査を行なった．方法は 3 %馬血液加普通寒天培地に 5 本の

Table Ⅱ　手指の細菌数

研究員	手指	入室前	逆性石鹸でブラッシング	作業中[a)]	作業後
A	R	200	40	0	4
	L	200	100	4	6
B	R	40	11	0	0
	L	300	17	0	1
C	R	1.000	0	0	1
	L	1,000	0	0	1
D	R	26	2	2	0
	L	10	3	3	0
E	R	300	15	200	50
	L	300	15	200	50

a) 作業中随時逆性石鹸で消毒

指をスタンプし，37°，24時間培養後菌数を算定した．

検査成績はTable Ⅱの通りである．逆性石鹸によって菌数は明らかに減少しているが，人によって減り方に差があり，ブラッシングの訓練が必要である．また，作業中，作業後も菌数の増加はEを除いてみられなかったのは作業中随時逆性石鹸で洗った（消毒）ためで，Eは動物を扱う作業を行なった直後のため菌数が多かったものと思われる．作業中も手指の消毒を行なうことが必要である．

4．床およびサンダル：バリア飼育室内の環境チェックの目安として，床面およびサンダルの汚れの程度をラット400頭収容中の飼育室と作業廊下を検査した．床面は，消毒清掃前後の2回，100 cm^2 の面積を滅菌ガーゼで拭きとり，標準寒天で培養し，一般細菌数を求めた．また，サンダルについては裏のカガトの部分約 25 cm^2 について同様にして検査した．

結果は次のようで，床面の細菌数は飼育室の方が多かったが，いずれも逆性石鹸による清掃で 1/7～1/10 に減少した．次に，サンダルでも飼育室の方が圧倒的に菌数が高く，動物居住による汚れが示唆された．

	飼育室床面	作業廊下床面	サンダル	
清掃前	1,400	500	未使用	37
清掃後	500	52	飼育室	23,000
			作業廊下	400

5．落下細菌検査：バリア飼育区域および一般飼育区域の落下細菌検査を逐月的に行なった．

落下細菌用培地3％は馬血液加普通寒天培地(栄研)約20 ml を直径 9 cm のシャーレに分注し，24時間ふ卵器で無菌試験を行なったものを用いた．このシャーレを一室について四隅と中央の5ヵ所に2枚ずつ，廊下については適当間隔に2枚ずつ置き，30分間開放した後37°，48時間培養し，発育した集落数を落下細菌数とした．また，発育した集落のグラム染色を行ない，黄色ブドウ球菌が疑がわれる場合はコアグラーゼテストを行なった．

結果はTable Ⅲ（バリア飼育区域：上段，一般飼育区域：下段）に，シャーレ10枚当りの合計菌数で示した．

バリア飼育区域では更衣室，シャワー室を除き，一年間低い菌数であった．消毒前（表中0の項）と消毒後（表中1の項）との比較では，消毒後わずかに減ったが，大差はみられなかった．動物飼育室は動物の入室とともにやや増加の傾向がみられたが，作業廊下や処置室は平均した値を示した．外の影響を受け易い更衣室，シャワー室，パスルームは菌数のバラツキが大きかった．パスルーム(1)は使用しなかったが，使用しているパスルーム(2)より菌数が多い場合があった．これは，消毒回数の少ないことと排気設備のみで給気設備がないので，一般区域からのリークがあったのかもしれない．更衣室の場合，菌数が多いのは，むしろ当然と考えられ，更衣中に測定した場合384という高い値を示したが，数時間後の検査では9までに下がっていた．使用5ヵ月目よりは退出直後に検査した値である．

一般飼育区域では，バリア飼育区域よりやや高値を示した．

バリア飼育区域および一般飼育区域の12回にわたる落下細菌検査の結果を総合してシャーレ10枚当りの菌種による数とその比率を示すとTable Ⅳ（バリア飼育区域）およびTable Ⅴ（一般飼育区域）のようになり，バリア飼育区域では処置室を含む動物不在飼育室，作業廊下，シャワー室，動物在飼育室，パスルーム，更衣室の順に菌数が多くなった．一般飼育区域においても解剖室，廊下，動物在飼育室の順に菌数が増えた．

また，両飼育区域の飼育室と廊下の菌数を比較するとバリア飼育区域は一般飼育区域の約1/3であった．

次に菌種についてみると，両区域とも飼育室が他室と比べてグラム陽性桿菌，グラム陰性桿菌の率が高く，したがってグラム陽性球菌の率が低かった．パスルームを除き，飼育室以外の菌種の比率は極めて近似していた．

また，Table Ⅳ，Ⅴ中には示さなかったが，グラム

Table Ⅲ 落下細菌検査成績[a]（シャーレ10枚合計）

区域	室	検査（毎月1回） 0 消毒前	1 消毒後	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
バリア飼育	ラット飼育室(1)	1	0	3	11*	28*	22*	3*	10*	15*	8*	11*	14*	12*
	〃 (2)	1	8	2	0	11	38	7*	4*	3*	2*	9*	12*	3*
	〃 (3)	5	6	0	2	3	1	2	1	0	0	1	4*	2
	〃 (4)	0	1	2*	8*	13*	0	0	3	1	1	4	2	2
	処置室	2	2	0	2	7	1	0	1	0	2	3	9	6
	作業廊下[b]	4.5	4.5	1	3	4	2	2.5	2	3.5	4	3	9	4.5
	シャワー室[b]	14.3	2.9	0.7	7	7	1.4	2.1	9.3	12.1	2.9	14.3	37.1	12.1
	更衣室	14	384(9)	7	—	—	186	—	34	43	36	69	39	112
	パスルーム(1)	20	5	2	12	17	1	83	5	10	3	7	11	8
	〃 (2)	0	3	3	5	2	1	3	85	20	3	6	7	4
一般飼育	ラット飼育室(1)									38*	57*	24*	63*	51*
	〃 (2)									14*	7*	21*	153*	25*
	マウス飼育室									66*	61*	15*	89*	107*
	ウサギ飼育室									1	20	3	10	6*
	兼用飼育室(1)									4*	9*	6*	15*	7*
	〃 (2)									4*	3*	5*	10*	6*
	実験・解剖室(1)									4	10	5	15	2
	〃 (2)									4	3	2	10	10
	廊下[b]									21.2	16.7	17.5	34.6	21.3

a) 3％馬血液加普通寒天，30分開放，37°，48時間培養
* 動物在室を示す　　b) シャーレ10枚に換算

Table Ⅳ バリア飼育区域の菌種の分類（シャーレ10枚当りの平均菌数）

菌種	動物在飼育室	動物不在飼育室 処置室	作業廊下	シャワー室	更衣室	パスルーム
グラム(＋)球菌	6.8(66.0)	1.6(86.1)	6.1(81.3)	7.4(81.3)	63.6(87.6)	3.7(28.9)
グラム(＋)桿菌	2.8(27.2)	0.2(11.6)	1.2(16.1)	1.3(14.3)	9.0(12.4)	8.9(69.5)
グラム(－)桿菌	0.6(5.8)	0.1(2.3)	0.1(1.3)	0.4(4.3)	0 (0)	0.1(0.8)
真菌	0.1(1.0)	0 (0)	0.1(1.3)	0 (0)	0 (0)	0.1(0.8)
合計	10.3(100.0)	1.9(100.0)	7.5(100.0)	9.1(100.0)	72.6(100.0)	72.6(100.0)

（ ）内数字は比率％を示す

Table Ⅴ　一般飼育区域の菌種の分類
（シャーレ10枚当りの平均菌数）

菌種	動物在飼育室	実験・解剖室	廊下
グラム(+)球菌	22.4(68.8)	5.4(75.8)	16.7(87.4)
グラム(+)桿菌	9.5(29.2)	1.3(18.2)	2.3(11.8)
グラム(−)桿菌	0.6(1.9)	0.4(6.0)	0.1(0.4)
真菌	0.1(0.1)	0 (0)	0.1(0.4)
合計	32.6(100.0)	7.1(100.0)	19.2(100.0)

（ ）内数字は比率%を示す

陽性球菌中，α溶血を示すレンサ球菌が全体にわたって約1%弱の割合で検出されたが，バリア飼育室において検査3から6回目までの4ヵ月の間高率（40%）に検出され，以後減少したが原因はわからなかった．

飼育室においてのグラム陰性桿菌は動物由来，グラム陽性桿菌は飼料に由来するものと思われる．パスルームではグラム陽性桿菌が高い率を示したが，原因は明らかでない．今後の調査で明らかにしたい．

以上，1年にわたる細菌学的検査で，SPF の Specific pathogen に当る *Salmonella*, *Corynebacterium* は勿論，病原大腸菌，黄色ブドウ球菌，β溶血性レンサ球菌等は検出されず，またそれらによる動物の発病もみられなかった．

Ⅳ 考　按

温度・湿度等の動物の飼育環境は施設の改善によって，よりよくコントロールできるが，細菌学的環境の管理には施設のみでは解決できない問題がある．人と動物と施設の三者が一体となって，はじめてよい管理が達成される．これには，どこまでやればよいのか．管理法を厳重にすれば，それに比例して動物実験の遂行は困難となり，実験者と実験動物との距離が遠くなる感が強い．角を矯めて牛を殺しては意味がない．

以上報告した一年間の動物飼育室の細菌学的管理成績は一応良好であったといえよう．

しかし，実験遂行上の制約も少なくなかったようであり，また，今後この管理法を続ければよいという保証を得たわけではなく，動物はすべて Breeder に依存し，飼料は，薬物添加飼料を使用する関係上やむをえず殺菌操作を加えないものを使用しており，今後ますます検討をつづけ，よい管理とよい実験が調和する点を見出す努力が必要であろう．

Ⅴ まとめ

東京都立衛生研究所に新設された毒性研究用動物飼育施設特に小動物用施設を紹介し，ここで一年間行なった細菌学的環境管理とその成績を報告した．

（本施設における実験動物飼育管理は民間委託者に負うところ大で，ここに感謝の意を表します）

文　献

1) 田嶋嘉雄：実験動物学総論，（1970），朝倉書店，東京
2) 田嶋嘉雄：実験動物学各論，（1973）朝倉書店東京
3) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*, 4 th Ed., (1972) Churchill Livingstone, Edinburgh and London

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 497 — 504, 1974

東京都立衛生研究所毒性研究用犬飼育施設と犬飼育成績について

林田志信* 福田向江* 平賀興吾*

New Housing Facillties for Dogs and Management Results

SHINOBU HAYASHIDA*, HISAE FUKUDA* AND KOGO HIRAGA*

東京都立衛生研究所においては食品添加物等の毒性試験研究の目的で昭和48年2月実験動物飼育施設が完成した．この施設には犬の飼育室も設けられ，犬の飼育を開始して1年を経過するので，施設の概要を説明し，この間の飼育管理の実際と成育状態を記録して，今後毒性の試験研究の参考としたい．

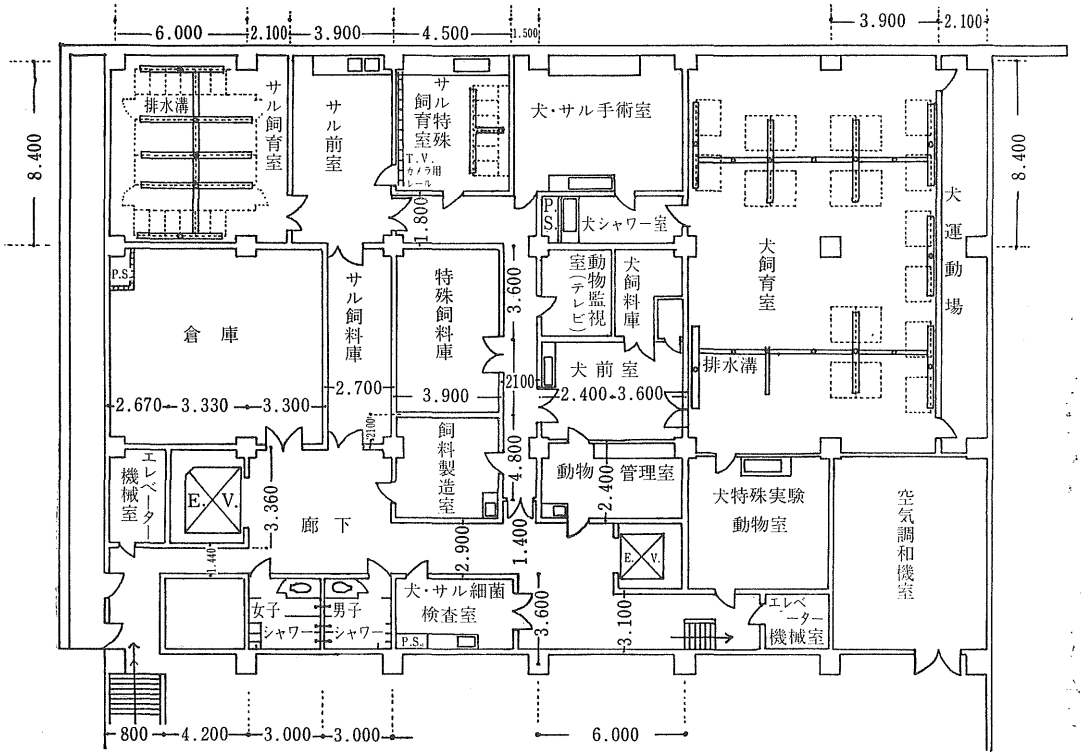


Fig. 1 犬飼育施設平面図

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

I 犬飼育施設の概要

犬飼育施設は地下にあり，その平面図は Fig. 1 に示す通りで，サル飼育室と接して設けられ，犬飼育室，特殊実験動物室，犬サル兼用手術解剖室，犬シャワー室，犬運動場，飼育作業と実験準備のための前

室，飼料庫，テレビによる動物監視室，犬サル兼用細菌検査室と管理室がある．また東西に2基のエレベーターがあり，西側エレベーターは1階の荷受室，洗浄室，死体汚物冷凍室に通じ，東側は1階動物受入室，洗浄室と2階の研究室に通じている．

全室とも効率85%と99.99%のフィルターを通したオールフレッシュの空気が，特に，飼育室，手術解剖室，運動場には天井の多孔板を通して供給され，換気回数1時間当り10回である．温度は飼育室と運動場が23±1°に，その他は25±1°に設定され，湿度はすべて50±5%となっている．飼育室の照明時間は自由に自動制御できるが現在は午前6時から午後7時としている．

飼育室は面積166 m², 容積466 m³ で，床に縦横に排水溝が設けられて地下の汚水処理槽に通じ，この溝に沿って Fig. 2 および3に示す飼育ケージが20架台80ケージ設置されている（最大104ケージ可能）．

ケージはステンレス製で，図に示す通り前面および天井は格子鋼，床はスノコ，側面および後面は板で，後面に自動給水用ノズルの孔があり，前面は約2/3が扉，1/3は固定で給餌用皿が固定できるようになっている．架台は，上下各2コのケージが懸架でき，各段にはケージ2コ共通の糞便の水洗板があり，後中央に排出溝に通ずる排水ダクトがある．背面には各ケージ用の給水ノズルが取り付けられている．また糞尿を採取するための受皿が水洗板上に挿入できるようになっている．

Ⅱ 飼育法

イヌ：日本EDM（株）にて生育した生後6ヵ月のAmerican Beagle の雌雄各8頭で，生後1ヵ月で鉤虫，コクシジウム，条虫，ミクロフィラリアを主に駆虫し検査，生後1ヵ月半と4ヵ月で3種ワクチン（イヌジステンパー，イヌ伝染性肝炎，狂犬病）を接種，血液培養，血清反応によってイヌブルセラ病の検査が行なわれたものを入舎した．

飼料：最初の17週間は日本クレア製イヌ飼料CD-5（顆粒）を与えたが，食品添加物の酸化防止剤ジブチルヒトロキシトルエンが含有されていることがわかった

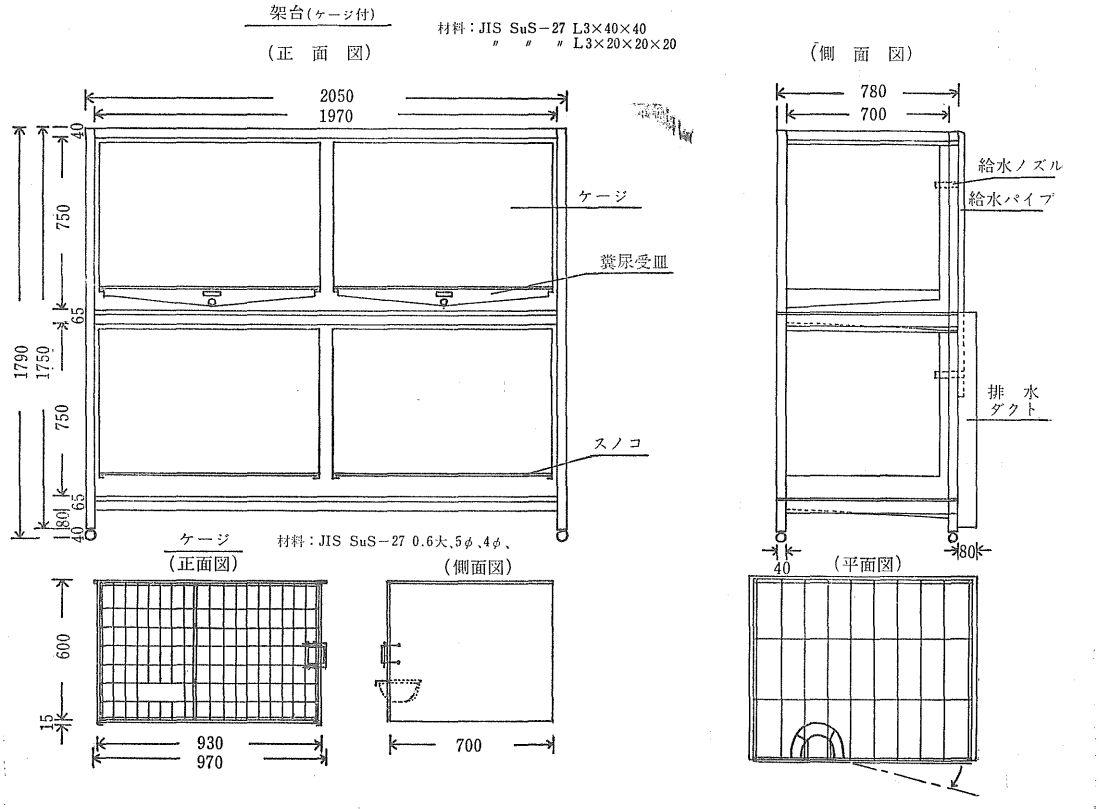


Fig. 2 犬 飼 育 ケ ー ジ (1)

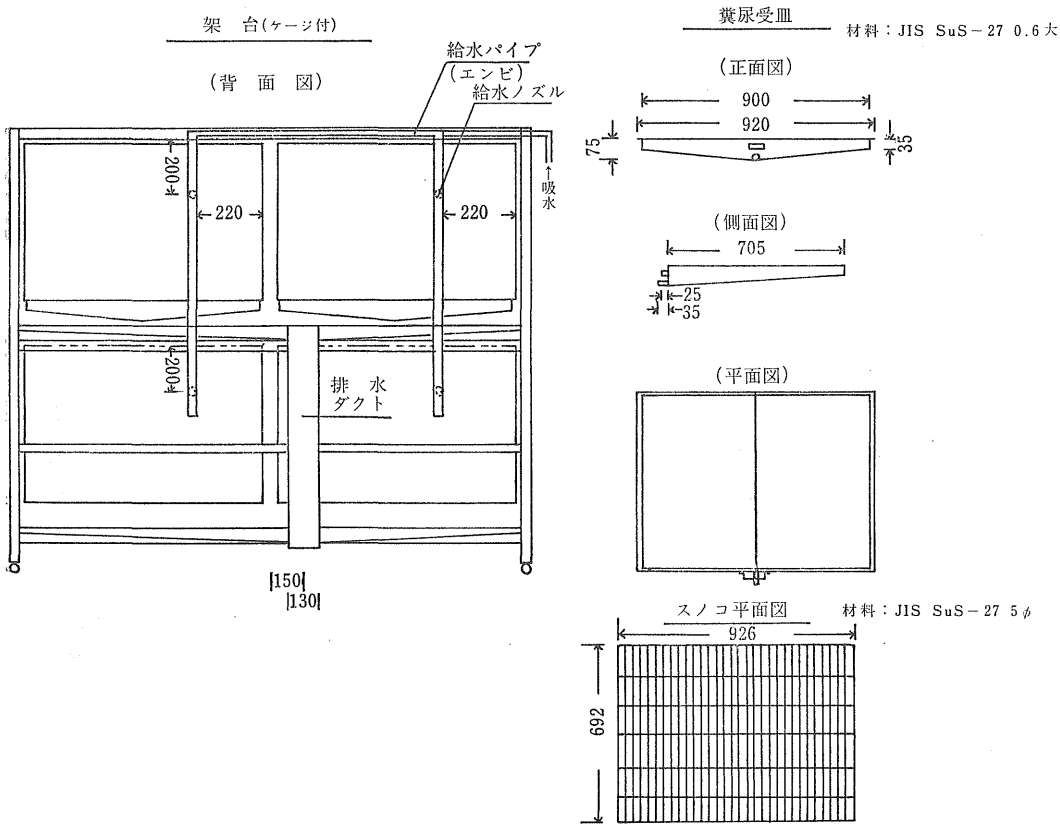


Fig. 3 犬 飼 育 ケ ー ジ (2)

ので以降は日本クレア製ドッグフード（ペレット）を使用した．それぞれの成分は次の通りである．

(100 g 中)	CD—5	ドッグフード
水　　分	4.4%	7.0%
粗 蛋 白	25.9	20.6
粗 脂 肪	7.6	5.1
粗 繊 維	5.1	2.7
粗 灰 分	7.8	6.7
可溶性無窒素物	45.2	57.9
(カ ロ リ ー)	(343.4 Cal)	(359.9 Cal)

飼料は午前10時に250 g (859～900 Cal) を与え，水は自動給水ノズルより自由に摂取させた．給飼皿は毎回洗浄高圧蒸気滅菌したものを使用した．

温度・湿度・照明・騒音：温湿度は施設の項で述べた通り23±1°，50±5%が維持した (Fig. 4)．照明は午前6時から午後7時までで，床上1mで 160 (半開)～370ルックス，騒音はイヌの安静時50フォーン以下であった．

清掃：午前9時より温湯で，ケージ内外および水洗板を，イヌに温湯がかからぬようブラッシングした．床面も同様清掃した．

なお清掃前水洗板上の糞便の性状を観察した．

飼育室はマイクロカット（主成分ベンザルコニウム）1,000倍液で月1回消毒洗浄した．

イヌは月2回，毎回15分程度運動場で運動させ，月1回以上犬体の温水洗浄を行なった．

作業者は，専用の作業衣，帽子，マスク，長靴を着用し，逆性石鹸にて手指を消毒して作業に当り，また，飼育室へ蚊，蝿等昆虫の侵入しないよう注意した．

Ⅲ　観察と検査

1. 一般状態：元気度，食欲，咳，鼻汁，鼻鏡，眼，嘔吐，流涎，外傷，糞便について観察した．

元気度は全経過を通じて良好であった．食欲は一般に旺盛で与えた飼料は直ちに摂取したが，4頭は随時摂取し，24時間中に全量を摂取した．

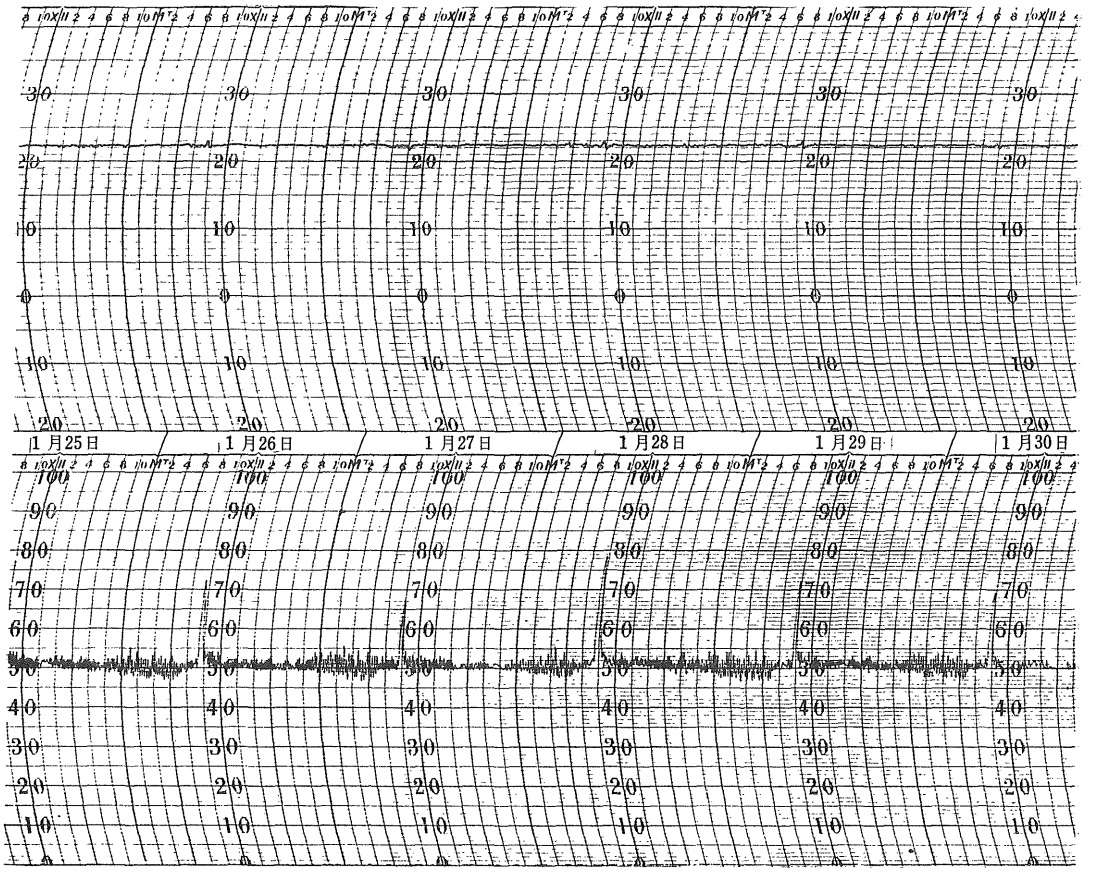


Fig. 4 犬飼育室の温度，湿度

咳，鼻汁，鼻鏡，眼には異常所見を認めることはなかった．

外傷としては，入舎後6ヵ月頃より4頭に趾間膿胞を認めるものがあった．これは，飼育ケージ床スノコと関連があるものと思われる．膿胞は切開排膿後ヨードチンキ塗布により治癒した．

糞便については，特に異常と考えられるものはなかったが，1頭に時々軟便がみられた．

2. 体重：体重は毎月2回測定した．結果は Fig. 5に示すようで，入舎時（生後6ヵ月）雄10.1±1.82 (7.4～10.5)kg，雌8.9±1.42 (6.8～9.5)kg であり，入舎前の生育場において，体重増加の大半は終り，入舎後は雌雄とも7ヵ月で2kg 前後増加したのみで(体重として12kg 前後）以降は多少の増減を示しながら推移した．

3. 体温：デジタル電子体温計を用い，そのプローブを肛門より 3～5cm 挿入し直腸温を，毎月2回，午後1時に測定した．

結果は Fig. 5 に示すようで，可成りの変動があり，成長その他との関連を推察できるような推移はみられなかったが，大半は39.5°～38.5°の間にあった．

4. 臨床血液学的および血漿生化学的検査：毎月前腕静脈より採血し，赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット（Ht），白血球数（WBC），(コールターカウンターSによる)，および血漿の GOT，GPT，アルカリフォスファターゼ（ALP），コリンエステラーゼ（ChE），コレステロール（CHO），グルコース（GLU），尿素窒素（UN），総蛋白量（TP）（日立自動分析機M400による）を測定した．

結果は Table Ⅰ～Ⅱに示す通りで，いずれも異常と考えられるものはなく，個体差も少なく，比較的安定した推移がみられた．

5. 糞便検査：細菌および虫卵検査を毎月行なった．細菌検査は SS 平板培地，BTB 平板培地により，37°，24 hr にて判定した．虫卵検査はガラス棒で1g～2g 位ずつ採取し，その中に硝酸ナトリウム 10

Table. I　血液学的検査成績の推移

検査項目		出生後の日数（日） 170～190	190～220	220～250	250～280	280～310	300～330	330～360	360～390
WBC×10^3/mm^3	M	9.06±1.52	9.07±1.08	8.96±2.12	9.95±2.12	8.73±2.19	9.42±2.63	9.02±2.84	7.96±1.99
	F	10.22±1.69	9.27±1.75	8.55±0.99	9.42±1.29	8.75±1.53	10.15±1.77	9.40±1.22	9.35±1.50
RBC×10^6/mm^3	M	6.36±0.50	6.78±0.46	6.82±0.64	6.86±0.46	6.38±0.33	5.77±0.83	6.72±0.42	6.45±0.72
	F	6.19±0.44	6.23±0.73	6.57±0.31	6.87±0.50	6.52±0.50	6.45±0.78	6.83±0.41	6.30±0.73
Hb g/d*l*	M	15.26±1.35	15.80±1.25	16.06±1.57	16.13±1.17	15.16±0.82	13.72±1.93	15.32±1.04	15.28±1.75
	F	14.92±0.97	14.97±1.58	15.77±0.71	16.53±1.21	15.55±1.08	15.21±1.57	15.73±1.06	15.17±1.67
Ht %	M	41.38±3.43	44.25±3.02	45.18±4.32	45.07±3.26	41.97±1.94	38.01±5.34	43,72±2.89	41.72±4.85
	F	40.21±2.31	41.20±4.34	44.16±2.01	45.70±2.95	42.95±2.52	42.43±4.58	44.71±2.61	41.02±4.46

Table. Ⅱ　血漿生化学的検査成績の推移

検査項目		出生後の日数（日）						
		170～190	190～220	220～250	250～280	280～310	300～330	330～360	360～390
ChE (⊿pH)	M	0.43±0.11	0.42±0.07	0.40±0.08	0.36±0.10	0.38±0.13	0.34±0.11	0.42±0.13	0.40±0.07
	F	0.44±0.14	0.39±0.10	0.42±0.10	0.38±0.08	0.34±0.11	0.34±0.06	0.43±0.11	0.39±0.09
TP (g/dl)	M	6.77±0.45	6.41±0.39	6.45±0.44	6.55±0.61	6.60±0.55	6.13±0.80	6.68±0.79	6.70±0.58
	F	6.76±0.39	6.46±0.55	6.21±0.41	6.37±0.47	6.38±0.35	6.25±0.63	6.62±0.41	6.87±0.14
GLU (mg/dl)	M	98.37±3.58	111.25±3.05	113.25±7.49	110.50±7.11	95.87±12.67	108.50±7.34	106.75±5.97	109.37±7.36
	F	99.87±6.31	106.62±8.95	107.25±6.25	109.37±3.24	97.12±8.82	105.75±6.98	103.87±7.10	115.87±3.02
UN (mg/dl)	M	11.12±2.16	10.11±1.64	8.75±1.16	9.25±1.75	8.87±2.58	8.75±2.18	9.37±2.50	11.87±2.58
	F	9.75±2.43	9.87±2.94	9.00±2.44	9.25±1.66	8.87±2.64	7.37±3.02	8.37±1.68	11.12±2.99
GPT(K.U./ml)	M	24.87±8.93	21.62±5.85	21.87±4.12	23.12±6.03	24.37±6.43	26.75±10.60	27.25±12.62	25.37±5.47
	F	19.50±6.90	18.87±4.38	19.75±4.13	24.12±6.85	21.00±6.69	21.37±4.37	17.75±5.57	21.00±4.98
GOT(K.U./ml)	M	34.00±11.38	26.87±7.16	31.12±6.72	39.25±8.92	28.37±8.29	31.50±7.50	28.75±7.53	25.75±7.97
	F	27.87±12.38	25.12±6.57	26.37±3.37	28.00±6.56	26.12±8.37	30.50±9.89	21.62±3.85	20.87±3.56
ALP(K.A.U/dl)	M	5.25±1.98	7.62±2.13	6.50±2.20	6.12±2.23	6.50±2.39	4.75±2.25	5.62±2.26	3.62±1.40
	F	7.37±2.56	8.12±3.35	7.37±3.15	8.62±4.77	8.12±2.79	6.75±3.00	7.25±2.60	5.75±1.58
CHO(mg/dl)	M		117.17±52.57	113.25±23.35		128.87±21.29	128.12±21.41	117.62±15.36	119.00±11.60
	F		143.28±40.37	129.62±26.02		138.37±17.73	146.62±22.06	141.12±21.32	170.62±46.27

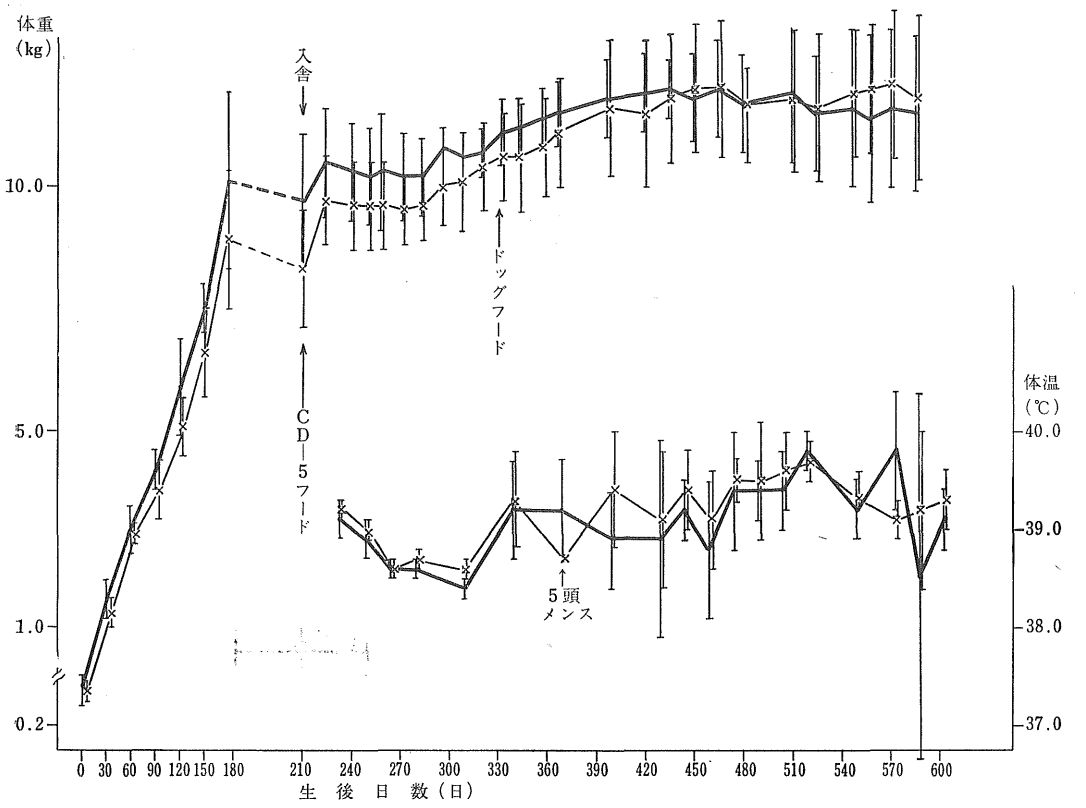


Fig. 5　体重および体温（直腸温）

%溶液を入れ，よく攪拌し，1時間放置後の上清をとり検鏡した．結果は各月とも異常を認めなかった．

6.　飼育室の落下細菌検査：飼育室の落下細菌数を犬前室のそれと比較した．3%馬血液加普通寒天培地入り17 cm シャーレを，1ヵ所2枚宛15ヵ所に置き，30分間開放後，37°48 hr 培養により判定した．

結果は Fig. 6 に示すようで，前室に比べると飼育室の菌数は多く，動物の前は勿論であるが前より後方の方が更に多かった．これは気流と関係があるものと考えられ，今後の飼育管理上の検討を要する問題であろう．

Ⅳ　総　括

東京都立衛生研究所に新設された実験動物飼育施設の犬飼育室について紹介し，その飼育室での American Beagle 一年間の飼育管理と育成成績を述べた．

飼育室は地下にあり，外界と隔離した人工環境である．空気は効率99.99%フィルターを通して供給され，換気：毎時10回，温度：23±1°，湿度：50±5%，照明：螢光燈370～160ルックス13時間，騒音：安静時50フォーン以下，飼育ケージ：床スノコ 0.64 m² (オールステンレス)，飼料：ペレット飼料 250 g (900 Cal) 1回給餌の条件下で生後6ヵ月の寄生虫その他の駆除された American Beagle を1年間飼育し，一部に趾間膿胞がみられた以外順調と考えられる成育が観察された．

（飼育管理は飼育管理委託者に負うところ大で，ここに感謝の意を表します）

Ⅴ　文　献

（犬飼育に当って参考としたもの）

1) 乃川　弘：犬の生物学，第1版，昭和44年，朝倉書店，東京

2) Andersen, A. C.: *The Beagle as an Experimental dog*, First Ed. (1970) The Iowa State University Press Ames. Ioma.

3) 田島嘉雄：実験動物学総論，第3版，昭和48年朝倉書店，東京

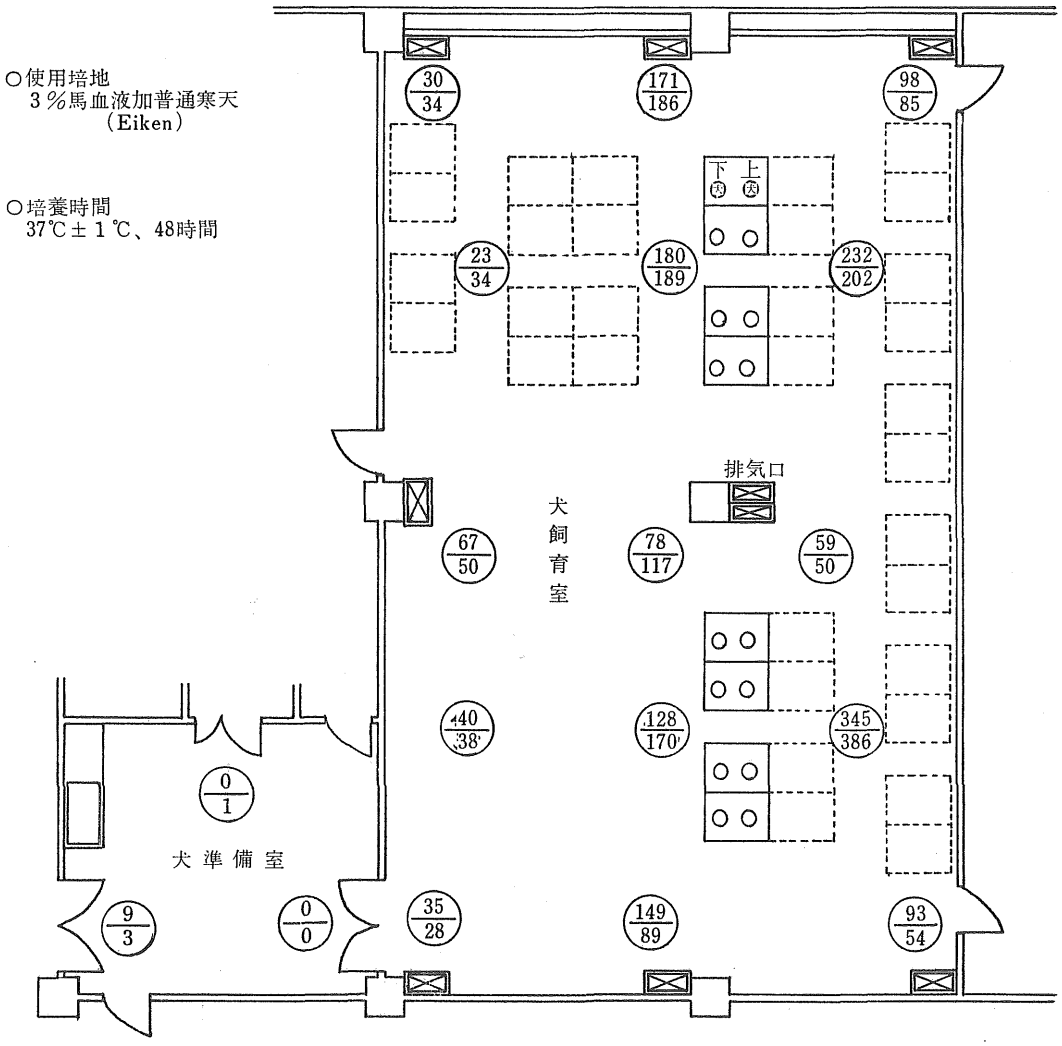


Fig. 6 犬飼育室落下細菌数

4) 田島嘉雄：実験動物学各論，第5版，昭和48年 朝倉書店，東京

5) Hume, C. W.: *The UFAW Handbook on the Care and* Management of Laboratory Animals 309—327 (1972) 4th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 505 — 515, 1974

東京都立衛生研究所毒性研究用サル飼育施設とサル飼育成績

井口重孝* 福田向江* 平賀興吾*

New Housing Facilities for Monkeys and the Management Results

SHIGETAKA IGUCHI*, HISAE FUKUDA* AND KOGO HIRAGA*

東京都立衛生研究所においては毒性研究用実験動物飼育の一環として，サル飼育施設が完成し，実際の飼育を開始して6ヵ月が経過するので，施設と飼育法の概要を紹介し，この間のサルの成育の状態と問題点を記載して，今後の毒性研究に当っての資としたい．

1. 飼育施設

サル飼育施設は地下に設置され，Fig. 1の図面に示すように，一般飼育室，（特殊飼育室テレビによる行動観察，入舎時の検疫），準備室，飼料器材室，サル・犬兼用手術解剖室，テレビ監視室（特殊飼育室テレビカメラのリモートコントロール，録画），細菌検査室の各室よりなっている．

飼育室は換気毎時10回で，フランダース高性能フィルター（効率99.99%）を経たオールフレッシェの空気が供給され，温度：26±1°，湿度：60±5%，照明時間：午前7時～午後10時（調節可能）に設定されている．

一般飼育室は64 m² で，ステンレス製個別ケージ24と集団ケージ4を収容（詳細は別に報告），特殊飼育室は29 m² で，Fig. 2, 3 および4に示すように2段6列にステンレス製個別ケージを配し，各ケージは，テレビカメラに面する前面を強化ガラス（扉）とし，背面には格子扉，給飼孔，自動給水ノズルがあり，天井および側面は板で遮蔽され，床はスノコ，その下が2ケージ共同の水洗板があり，その中央に飼育室排水溝に通ずるパイプがある．また，採尿等に利用される皿が前面より挿入できるようになっている．全ケージの後面は捕獲，処置，運動等に利用する共同の金網檻が設けられ中央が扉で仕切られている．

飼育室には温冷水が供給され，床には排水溝が二つあり排水処理槽に通じている．

2. サルおよび飼育管理

サルはインド産アカゲサル（*Macaca mulatta*）の推定年齢2.5～3.5年の雄雌各5頭で，厳重な検疫（結核，細菌性赤痢，寄生虫等）を経た後特殊飼育室飼育ケージに個別に入れた．

餌料としてはオリエンタル酵母製ビスケット（水7 粗蛋白質25.5，粗脂肪7.2，粗灰分4.7，粗繊維1.2，可溶性無窒素物54.4cal. 384.4/100g）100gまたは80gとバナナ（水75.5，粗蛋白質1.3，粗脂肪0.4，粗灰分0.9，糖質20.7，繊維1.2 cal. 92/100 g）100 g を午前10時に与え，1時間後に残餌をとり去るか，または24時間随時摂取せしめた．

水は水道水を自動給水ノズルより自由に摂取させた．

飼育室は前述の通り温度26±1°，湿度60±5%(Fig. 5）照度は午前7時～9時および午後8時～10時は床1 mで90ルクス，午前9時～午後8時は床上1 mで200ルクスとしたが，ケージ内は60～20ルクスであった．騒音は50ホーン以下であった．

飼育室およびケージのスノコ，水洗板の汚物清掃は毎日午前11時から12時の間に温湯とブラシをもって行ない，ケージ全体の清掃および消毒は毎週1回行なっ

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

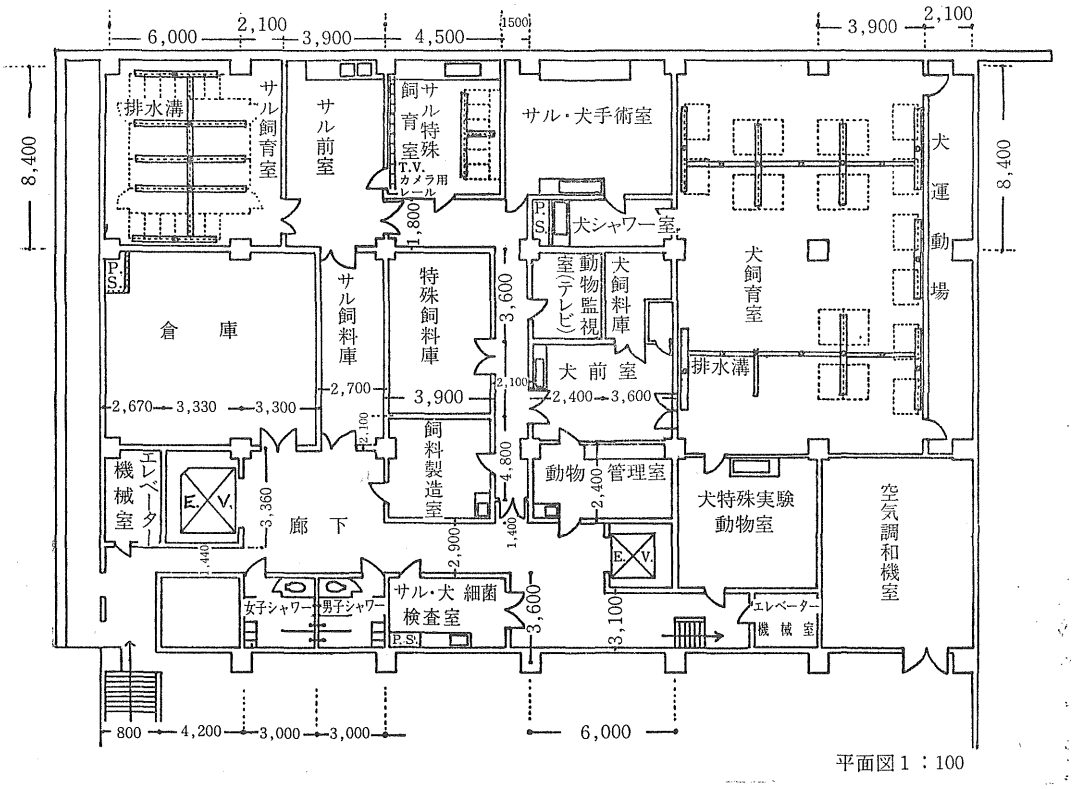


Fig. 1 サル飼育施設平面図

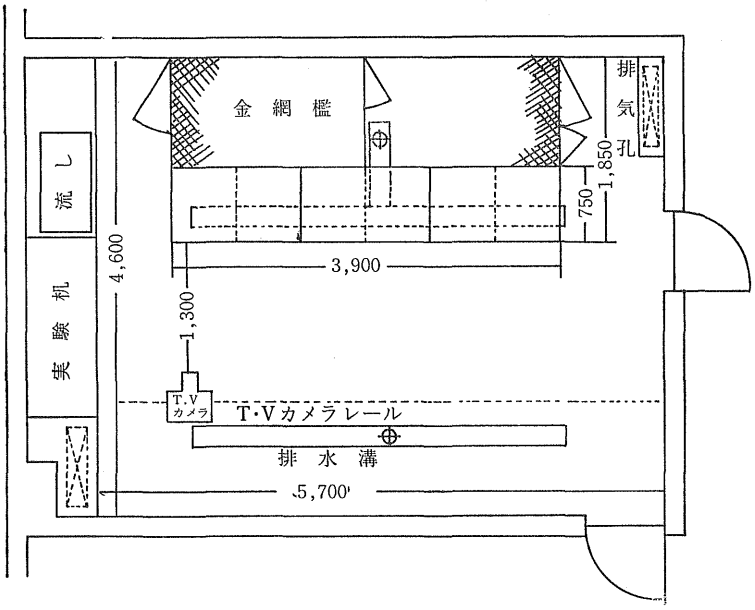


Fig. 2 サル特殊飼育室

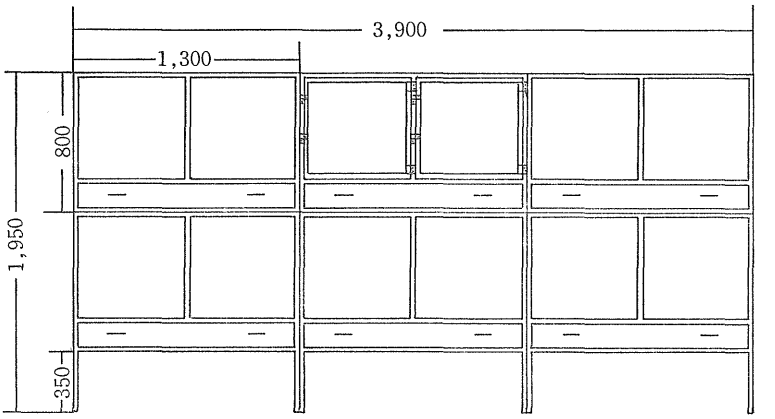


Fig. 3 サル特殊飼育室飼育ケージ前面図

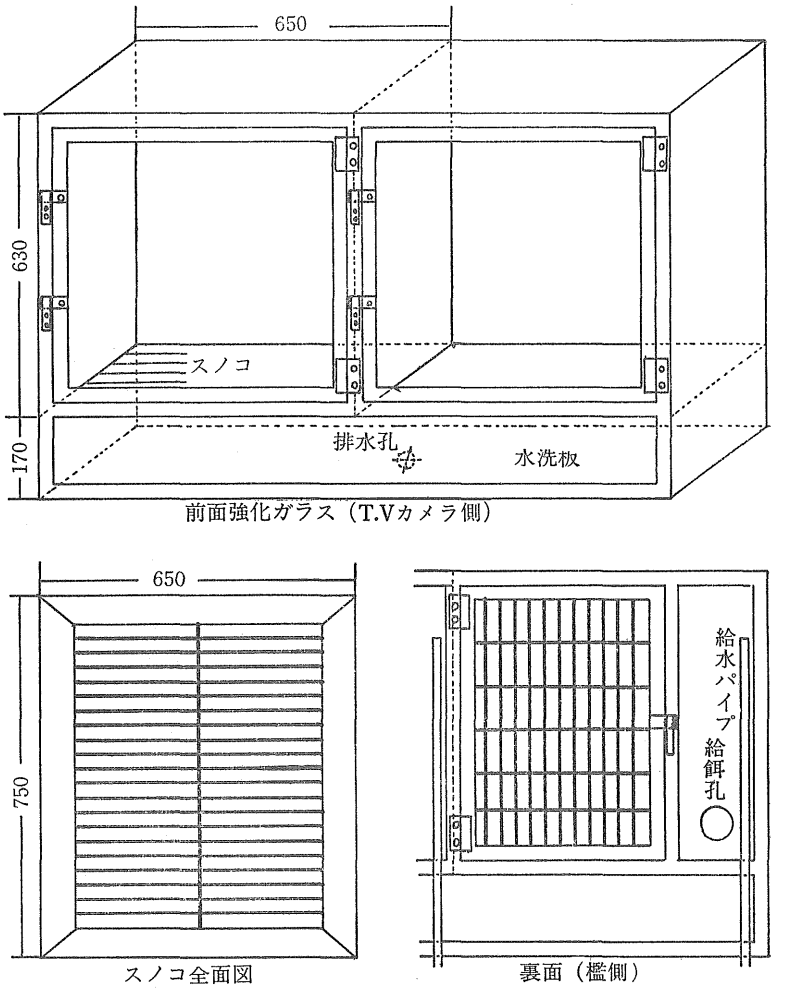


Fig. 4 サル特殊飼育室飼育ケージ

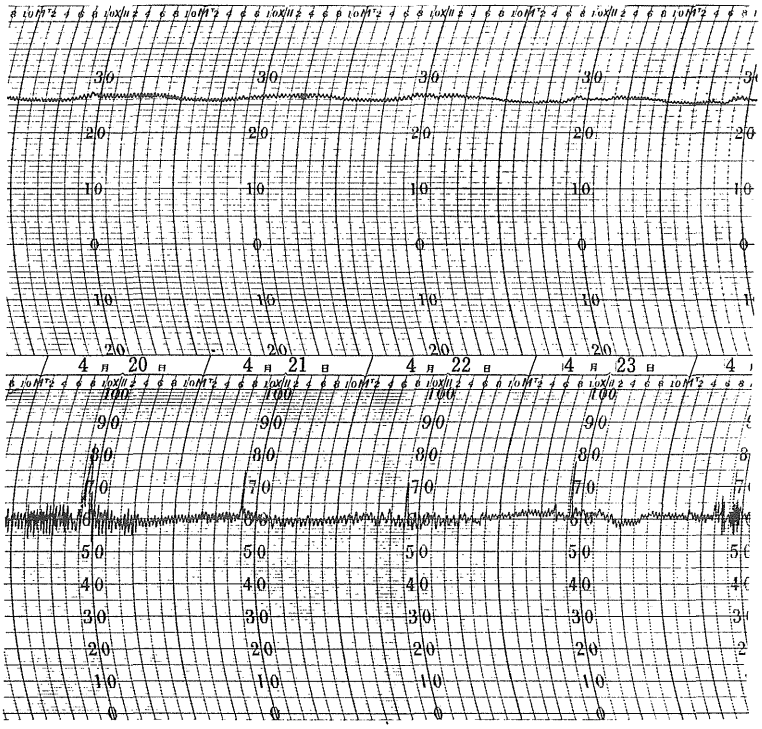


Fig. 5 サル特殊飼育室における温湿度

た.

消毒にはマイクロカット（主成分：ベンザルコニウム）の1,000倍液を用い，使用後はよく水洗した.

サルは，結核，細菌性赤痢，Bウイルス，寄生虫等多くのヒトと共通する伝染病があると考えられているので，ヒトとサル相互間における伝染病予防のためにサル室への出入り，サルとの接触には特に細心の注意を払わなければならない.

サル室への入室に際しては，作業着の交換，マスクと帽子の着用，サンダルの交換，手指の消毒を行ない，出舎時には更によく手指の消毒を行なった．また，ケージ清掃および捕獲等に使用したものはすべて，滅菌あるいは塩素系消毒液で消毒した．一般状態および排泄物の観察は毎日午前10時より11時の間に行ない，体重の測定は2週間に一度前後測定し，血液学的，血漿生化学的検査のための採血は毎月1回股静脈より行ない，糞便の細菌学的検査も毎月1回行なった.

血液学的検査としては赤血球数（RBC），ヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット（Ht），白血球数(WBC）をコールターカンターSにて測定し，血漿生化学的検査としてはGOT (Reitmen-Frankel 法)，GPT (Reitman-Frankel 法)，アルカリフォスファターゼ (AlP, Kind-King 法)，コリンエステラーゼ (ChE, ΔpH 法)，総蛋白量 (T. P., Biuret 法)，グルコース (Glu., glucose-oxidase 法)，尿素窒素(U. N., urease-indophenol 法)，コレステロール(Cho., Liberman-Burehard 法）を日立自動分析装置M-400にて測定した.

3. サルの成育の経過と考按

1) 飼料摂取：飼育開始後11週まではすべて1時間給餌としたが，最初は摂取量が多く，スノコ下にこぼしたもの以外はほとんど摂取した．しかし，バナナは好んで食べたが，ビスケット飼料の摂取は日の経過とともに低下の傾向を示した．11週以降雌2匹と雄3匹を24時間自由摂取に切り換えたところ次第に摂取量の増加がみられた．引き続き1時間給餌のものは，11週目の摂取レベルを維持するものと次第に増加を示すものがみられた．そこで，26週より逆に24時間自由摂取のものを1時間給餌にもどし，1時間給餌のものを24時間自由摂取としたところ前者では1時間給餌でも同

Table I 飼料摂取量(週間摂取量)

性		F					M				
サル番号		1	2	3	4	7	5	6	8	9	10
飼育日数(週)	1	689	474	576	616	482	368	465	661	521	700
	2	615	355	418	641	434	322	550	579	479	660
	3	531	349	391	669	380	306	485	529	452	561
	4	323	271	324	556	314	267	556	411	397	412
	5	364	326	363	494	377	320	379	357	389	435
	6	340	253	341	359	337	274	387	363	423	357
	7	236	246	327	245	313	248	331	340	387	297
	8	170	76	312	106	203	141	293	340	335	193
	9	217	137	308	173	299	209	287	376	393	263
	10	240	127	434	142	293	224	358	483	428	302
	11	167	75	415	149	224	186	316	420	414	254
	12	296	89	407	178	52	220	288	190	469	236
	13	241	146	460	208	277	241	365	464	483	302
	14	266	152	485	284	298	251	385	560	473	346
	15	270	204	549	327	306	301	292	560	459	346
	16	298	168	558	312	294	322	297	559	478	391
	17	375	100	560	430	254	405	345	552	485	401
	18	333	186	560	411	259	429	408	554	484	448
	19	340	161	560	492	303	475	378	559	501	430
	20	321	195	560	503	309	475	420	559	483	446
	21	237	159	560	528	247	519	456	560	522	482
	22		109	560	546	145	521	393		514	453
	32		73	560	546	121	539	376		498	443
	24		157	560	492	216	552	486		503	510
	52		252	560	546	255	551	473		533	446
	26		431	560	378	524	354	547		246	559
	27		314	560	375	532	325	559		475	560
	28		276	560	521	506	261	560		504	559
	29		340	560	372	557	250	559		454	558
	30		423	560	382	554	275	559		375	560

第1週目から第7週目までは 100 g/日給餌
第8週目から第30週目までは 80 g/日給餌
□内は時間自由摂取，その他は1時間給餌

単位：g

Table Ⅱ 体　　重

性		F					M				
サル番号		1	2	3	4	7	5	6	8	9	10
飼育日数（日）	1	4.55	4.00	3.85	3.10	3.45	3.15	3.50	3.90	3.45	4.00
	10	4.55 +0[a)]	3.90 −0.10	3.55 −0.30	3.00 −0.10	3.50 +0.05	3.00 −0.15	3.50 +0	3.70 −0.20	3.10 −0.35	3.90 −0.10
	24	4.75 +0.20	3.90 −0.10	3.60 −0.25	3.25 +0.15	3.55 +0.10	3.00 −0.15	3.50 +0	3.80 −0.10	3.20 −0.25	4.10 +0.10
	52	4.35 −0.20	3.70 −0.30	3.60 −0.25	3.45 +0.35	3.45 +0	5.15 +0	3.45 −0.05	3.55 −0.35	3.20 −0.25	4.05 +0.05
	79	4.25 −0.30	3.45 −0.55	3.60 −0.25	3.40 +0.30	3.30 −0.15	3.20 +0.05	3.50 +0	3.55 −0.35	3.10 −0.35	3.85 −0.15
	94	4.25 −0.30	3.35 −0.65	3.90 −0.05	3.35 +0.25	3.25 −0.20	3.15 +0	3.65 −0.15	3.55 −0.35	3.20 −0.25	3.85 −0.15
	107	4.15 −0.40	3.35 −0.65	3.95 +0.10	3.15 +0.05	3.30 −0.15	3.10 −0.05	3.65 +0.15	3.50 −0.40	3.05 −0.40	3.90 −0.20
	115	4.25 −0.30	3.25 −0.75	3.55 −0.30	3.35 +0.25	3.15 −0.30	3.20 +0.05	3.35 −0.15	3.65 −0.25	3.10 −0.35	3.70 −0.30
	134	4.20 −0.30	3.30 −0.70	4.00 +0.15	3.20 +0.10	3.30 −0.15	3.25 +0.10	3.55 +0.05	3.65 −0.25	3.05 −0.40	3.80 −0.10
	143	4.05 −0.50	3.20 −0.80	3.70 −0.05	3.45 +0.35	3.40 −0.05	3.20 +0.05	3.15 −0.35	3.70 −0.20	3.10 −0.35	3.75 −0.25
	171		3.20 −0.80	3.80 −0.05	3.60 +0.50	3.25 −0.20	3.25 +0.10	3.50 +0		3.10 −0.35	3.85 −0.15
	193		3.35 −0.65	4.25 +0.45	3.85 +0.75	3.45 +0	3.30 +0.15	3.55 +0.05		3.45 +0	4.20 +0.20
	200		3.30 −0.70	4.00 +0.15	3.60 +0.50	3.50 +0.05	3.20 +0.05	3.60 +0.10		3.20 −0.25	4.05 +0.05

a) 第1日目に対する体重の増減を表わす

□内は餌24料時間自由摂取，その他は1時間給餌

単位：kg

Table Ⅲ 血液学的検査成績（赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット）

	性	サル番号	飼育日数（日） 1	24	52	79	115	143	171	200	$\bar{x}$±SD
RBC ($\times 10^6$/mm^3)	F	1	6.0	5.2	5.1	5.5	4.0	—	—	—	5.1±0.73
		2	6.0	6.1	5.5	—	4.8	4.8	5.4	4.6	5.3±0.60
		3	6.2	6.4	6.2	6.4	5.4	5.2	5.8	5.4	5.8±0.48
		4	5.4	6.1	7.0	6.9	5.4	5.3	5.9	5.6	5.9±0.67
		5	6.0	6.3	6.2	5.9	5.2	—	5.3	5.5	5.7±0.43
		$\bar{x}$	5.9	6.0	6.0	6.1	4.9	5.1	5.6	5.2	
		SD	0.30	0.47	0.73	0.60	0.58	0.26	0.29	0.45	
	M	5	6.1	6.2	6.6	6.6	5.2	5.9	5.5	5.4	5.9±0.53
		6	5.6	4.2	6.3	5.8	5.3	4.9	5.4	5.2	5.3±0.62
		8	6.6	7.4	7.4	6.9	5.9	6.0	—	—	6.7±0.65
		9	6.0	5.6	5.8	5.4	4.9	—	5.0	4.6	5.3±0.51
		10	6.8	6.5	6.1	7.1	6.0	6.0	6.3	5.8	6.3±0.44
		$\bar{x}$	6.2	5.9	6.4	6.3	5.4	5.7	5.5	5.2	
		SD	0.48	1.18	0.61	0.73	0.47	0.53	0.54	0.50	
Hemoglobin (gm/dl)	F	1	15.8	13.8	13.7	14.2	10.7	—	—	—	13.6±1.84
		2	14.2	14.5	13.4	—	12.0	12.0	12.7	11.5	12.9±1.16
		3	14.4	15.2	15.1	15.4	13.2	12.9	13.3	13.1	14.0±1.06
		4	12.8	13.8	16.6	16.1	12.8	13.0	13.7	13.9	14.0±1.47
		7	15.1	15.3	15.4	14.8	13.2	—	13.3	14.4	14.5±0.91
		$\bar{x}$	14.4	14.5	14.8	15.1	12.3	12.6	13.2	13.2	
		SD	1.12	0.72	1.30	0.81	1.05	0.55	0.41	1.26	
	M	5	14.1	13.7	15.1	15.4	12.0	13.7	12.3	12.5	13.6±1.26
		6	13.3	11.4	14.9	13.8	12.7	12.2	12.6	12.6	12.9±1.06
		8	14.8	15.6	16.4	15.4	13.1	13.6	—	—	14.8±1.25
		9	14.3	12.9	13.7	12.9	11.8	—	11.9	11.3	12.6±1.08
		10	16.2	14.8	14.5	16.5	14.8	14.3	14.5	14.1	14.8±0.95
		$\bar{x}$	14.4	13.6	14.9	14.8	12.7	13.4	12.8	12.6	
		SD	1.07	1.63	0.98	1.43	0.88	0.88	1.15	1.14	
Hematocrit (%)	F	1	45.5	40.2	39.2	41.1	30.5	—	—	—	39.3±5.47
		2	41.9	42.6	38.9	—	33.9	33.7	37.1	32.4	37.2±4.08
		3	43.9	44.8	44.6	45.4	37.9	—	39.2	37.0	41.8±3.63
		4	38.3	42.7	49.2	47.5	37.2	36.9	40.4	38.7	41.3±4.71
		7	43.6	45.6	45.2	42.9	37.7	—	39.0	40.9	42.1±3.03
		$\bar{x}$	42.6	43.1	43.4	44.2	35.4	35.3	38.9	37.2	
		SD	2.74	2.11	4.36	2.80	3.20	2.26	1.36	3.60	
	M	5	40.8	40.8	44.2	44.4	34.4	39.5	36.6	35.5	39.5±3.77
		6	38.8	35.7	42.7	38.9	36.7	33.4	36.6	35.5	37.2±2.82
		8	43.6	47.8	49.1	45.2	39.4	39.8	—	—	44.1±4.01
		9	41.4	37.7	39.8	38.0	33.7	—	34.8	32.3	36.8±3.32
		10	47.2	44.1	41.9	47.5	40.1	40.4	42.1	39.8	42.8±3.08
		$\bar{x}$	42.3	41.2	43.5	42.8	36.8	38.2	37.5	35.7	
		SD	3.20	4.86	3.49	4.14	2.87	3.27	3.16	3.07	

Table Ⅳ 血液学的検査成績（白血球数）

	性	サル番号	飼育日数（日） 1	24	52	79	115	143	171	200	$\bar{x}$±SD
WBC ($\times 10^3/mm^3$)	F	1	8.2	8.0	7.7	11.5	10.6	—	—	—	9.2±1.72
		2	11.7	9.6	10.4	—	10.0	8.9	7.4	9.8	9.6±1.32
		3	6.4	8.2	9.8	16.8	6.5	7.1	8.0	8.5	8.9±3.37
		4	16.3	7.7	13.0	18.0	11.0	9.0	12.7	9.8	12.1±3.56
		7	6.3	7.8	10.8	7.2	8.2	—	8.2	9.9	8.3±1.54
		$\bar{x}$	9.7	8.2	10.3	13.3	9.2	8.3	9.0	9.5	
		SD	4.24	0.77	1.90	4.99	1.87	1.06	2.44	0.66	
	M	5	7.6	6.1	5.8	12.0	6.5	10.0	6.1	7.1	7.6±2.21
		6	11.7	10.7	10.5	11.4	7.5	6.8	8.1	10.0	9.5±1.86
		8	4.0	5.7	6.7	5.3	7.1	7.2	—	—	6.0±1.24
		9	5.0	5.1	5.1	9.3	7.2	—	5.4	4.7	5.9±1.68
		10	5.0	5.2	5.5	9.1	9.7	9.6	11.0	9.1	8.0±2.38
		$\bar{x}$	6.6	6.5	6.7	9.4	7.6	8.4	7.6	7.7	
		SD	3.11	2.34	2.19	2.63	1.22	1.63	2.50	2.35	

じ摂取量を維持するものと明らかに低下するものとがみられ，後者においては明らかに増加するものが多かったが，逆に減少を示すものがあった（Table. Ⅰ）。

以上の結果から，また次に述べる体重ののびから考えて果たして24時間自由摂取方法が，摂取量を増したのか，単に時間給餌でも摂取量の増加する流れに乗ったのか判然としないので，今後餌料そのものの吟味と合せて検討し，研究に適合するよりよい給飼法を確立する必要がある．

2) 体 重：飼育日数と体重の推移は Table. Ⅱに示すように，体重ののびは極めて悪く，途中経過では減少を示すものが多かった．ここに使用したサルはまだ幼弱で，もっと体重ののびがあるはずで，体重は，よく内的および外的コンデションを反映すると考えられ，体重ののびの悪い原因を追究する必要が大である．

3) 一般状態：全期間を通じて特記されることは，入舎後4週頃より前肢等の被毛をむしりとるものが雌雄ともにあらわれ，半数に及んだ．その他行動に異常はなく，糞便も正常で下痢を示したものはなく，細菌学的検査でも異常はなかった．

被毛をむしることの意味することは知らないが，収容ケージの構造および配置からサルは全く孤独であることに一つの原因があるのではないかと思われ，このことは前述の体重ののびについても関連があるのではないかと考えられる．

4) 血液学的および臨床生化学的検査：結果は Table Ⅲ～Ⅶの通りで，個々の成績と検査日による群の平均値および検査日を通した個々の平均値を併せ記載した．

全検査項目を通して一般に個体差が大きいが，個々の飼育日数による値の変動は意味ありと考えられるものはなかった．このうちコリンエステラーゼ(ChE)の個体差は特に注目された．

あとがき

新設のサル飼育施設設備，飼育管理法を紹介し，サルの育成成績を述べ，今後の研究応用に当っての問題点を指摘した．

（飼育管理については，飼育管理委託者に負うところ大で，ここに感謝の意を表します）

文 献

（サル飼育管理に当って参考としたもの）

1) 田嶋嘉雄編：実験動物学 総論，312—316 (1973) 朝倉書店 東京

2) 田嶋嘉雄編：実験動物学 各論，198—266 (1973) 朝倉書店，東京

3) 小山良修，今泉 清，鈴木 潔，田中利男：実験動物飼育管理の実際，66～89 (1972) 医学書院 東京

4) *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals* (4) 374—423(1972) Churchill Livingstone, Edinburgh

Table V 血漿生化学的検査成績 (GOT, GPT, アルカリフォスファターゼ)

	性	サル番号	飼育日数 (日) 1	24	52	79	115	143	171	200	$\bar{x}$±SD
GOT (K.U/ml)	F	1	33	30	52	47	40	39	—	—	40± 8.2
		2	33	25	35	—	33	49	27	37	34± 7.8
		3	50	31	39	51	38	72	38	41	45±12.7
		4	61	51	42	54	43	71	49	51	52± 9.5
		7	29	24	44	54	39	36	53	55	41±11.8
		$\bar{x}$	41	32	42	51	38	53	41	46	
		SD	13.7	10.9	6.3	3.3	3.6	17.2	11.7	8.4	
	M	5	60	34	47	45	39	48	51	44	46± 7.7
		6	64	36	50	47	50	63	45	54	51± 9.2
		8	46	36	45	63	47	49	—	—	47± 8.7
		9	35	15	19	24	18	36	25	32	25± 8.0
		10	44	30	54	43	37	37	47	41	41± 7.2
		$\bar{x}$	49	30	43	44	38	46	42	42	
		SD	11.9	8.8	13.8	13.8	12.5	10.9	11.6	9.0	
GPT (K.U/ml)	F	1	27	16	33	38	46	23	—	—	30±10.7
		2	23	17	21	—	37	41	19	25	26± 9.2
		3	23	17	18	24	24	25	18	28	22± 3.9
		4	106	73	25	26	27	35	49	31	46±28.9
		7	18	17	28	18	31	38	27	40	27± 9.0
		$\bar{x}$	39	28	25	26	33	32	28	31	
		SD	37.3	25.1	5.8	8.3	8.7	7.9	14.4	6.4	
	M	5	53	59	42	49	41	43	55	68	51± 9.4
		6	121	34	36	33	33	45	32	44	47±30.2
		8	45	42	34	54	30	29	—	—	39± 9.7
		9	26	20	14	41	17	18	17	23	22± 8.5
		10	23	18	24	23	17	29	25	25	23± 3.8
		$\bar{x}$	53	34	30	40	27	32	32	40	
		SD	39.7	16.8	11.0	12.4	10.4	11.1	16.3	20.9	
Alkaline phosphatase (K.A.U/dl)	F	1	52	47	46	45	46	40	—	—	46± 3.8
		2	25	28	24	—	28	32	27	20	26± 3.7
		3	32	60	54	46	48	41	35	40	44± 9.4
		4	17	24	31	47	60	52	44	45	40±14.6
		7	20	29	32	44	36	41	32	31	33± 7.4
		$\bar{x}$	29	37	37	45	43	41	34	34	
		SD	13.9	15.3	12.2	1.2	12.1	7.1	7.1	10.9	
	M	5	21	23	25	33	38	43	40	44	33± 9.2
		6	19	21	19	28	26	27	24	22	23± 3.5
		8	30	37	33	49	44	50	—	—	40± 8.4
		9	24	26	33	34	48	49	45	54	39±11.3
		10	31	44	49	59	58	58	51	42	49± 9.7
		$\bar{x}$	25	30	31	40	42	45	40	40	
		SD	5.3	9.8	11.2	12.9	11.8	11.5	11.5	13.4	

Table Ⅵ 血漿生化学的検査成績（総蛋白量，グルコース，コレステロール）

	性	サル番号	飼育日数（日） 1	24	52	79	115	143	171	200	$\bar{x}$±SD
Total Protrin (g/dl)	F	1	8.7	8.6	8.5	9.3	8.8	8.8	—	—	8.7±0.27
		2	8.8	8.2	8.2	—	7.9	8.2	7.9	7.5	8.1±0.40
		3	7.9	8.0	7.6	7.9	7.9	7.7	8.1	7.9	7.8±0.15
		4	6.0	9.0	8.5	7.9	8.0	8.1	7.7	8.5	7.9±0.89
		7	6.5	6.8	7.4	9.0	7.6	8.3	7.5	8.1	7.6±0.80
		$\bar{x}$	7.5	8.1	8.0	8.5	8.0	8.2	7.8	8.0	
		SD	1.27	0.83	0.51	0.73	0.45	0.39	0.25	0.41	
	M	5	8.4	8.5	8.4	8.0	7.8	8.5	7.9	7.7	8.1±0.33
		6	8.8	8.1	8.5	8.1	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2±0.22
		8	8.3	8.1	8.2	10.0	7.9	8.0	—	—	8.4±0.78
		9	7.6	7.4	7.3	7.7	7.2	7.2	6.9	7.5	7.3±0.25
		10	8.0	7.8	7.3	7.7	8.0	8.2	7.6	7.4	7.7±0.31
		$\bar{x}$	8.0	7.9	7.9	8.3	7.8	8.0	7.6	7.7	
		SD	0.33	0.40	0.59	0.96	0.43	0.51	0.59	0.40	
Glucose (mg/dl)	F	1	100	139	165	178	149	120	—	—	141±28.7
		2	146	156	143	—	127	122	105	96	127±22.0
		3	147	125	124	86	93	88	73	80	102±26.4
		4	72	113	129	133	111	117	133	111	114±19.7
		7	94	90	133	120	106	107	114	124	111±14.7
		$\bar{x}$	111	124	138	129	117	110	106	102	
		SD	33.3	25.1	16.2	38.0	21.5	13.9	25.0	18.9	
	M	5	109	105	105	117	94	108	103	111	106± 6.6
		6	98	114	127	122	130	82	93	148	114±21.9
		8	81	123	109	141	84	87	—	—	104±24.3
		9	66	63	71	73	74	54	74	59	66± 7.5
		10	112	91	102	106	89	57	55	74	85±21.7
		$\bar{x}$	93	99	102	111	94	77	81	98	
		SD	19.4	23.4	20.2	25.1	21.3	22.4	21.2	39.8	
Cholesterol (mg/dl)	F	1					163	173	—	—	168± 7.0
		2					153	160	145	130	147±12.8
		3					125	118	116	122	120± 4.0
		4					125	141	109	125	125±13.0
		7					144	163	135	157	149±12.6
		$\bar{x}$					142	151	126	133	
		SD					16.9	21.7	16.6	16.0	
	M	5					120	135	133	129	129± 6.6
		6					167	161	136	150	153±13.6
		8					176	187	—	—	181± 7.7
		9					155	162	135	130	145±15.4
		10					204	210	176	175	191±18.3
		$\bar{x}$					164	171	145	146	
		SD					30.6	28.5	20.7	21.6	

Table Ⅶ 血漿生化学的検査成績（コリンエステラーゼ，尿素窒素）

	性	サル番号	飼育日数（日） 1	24	52	79	115	143	171	200	$\bar{x}$±SD
Cholin esterase (ΔpH)	F	1	1.30	1.18	1.12	1.14	1.05	1.09	—	—	1.14±0.087
		2	1.16	1.00	1.02	—	1.05	1.11	1.10	1.00	1.06±0.061
		3	1.14	1.18	1.03	0.97	1.10	1.01	1.11	1.09	1.07±0.070
		4	0.54	0.67	0.63	0.60	0.64	0.69	0.71	0.77	0.65±0.070
		7	0.72	0.68	0.77	0.89	0.89	1.00	0.99	1.02	0.87±0.132
		$\bar{x}$	0.97	0.94	0.91	0.90	0.94	0.98	0.97	0.97	
		SD	0.324	0.254	0.205	0.225	0.188	0.169	0.186	0.138	
	M	5	1.02	0.84	0.81	0.79	0.80	0.91	0.92	0.91	0.87±0.079
		6	1.07	1.09	1.05	1.03	1.06	1.05	1.06	1.06	1.05±0.017
		8	1.11	1.04	1.07	1.01	1.05	1.08	—	—	1.06±0.034
		9	0.83	0.74	0.86	0.91	0.92	0.92	0.98	0.93	0.88±0.074
		10	0.36	0.25	0.23	0.28	0.28	0.33	0.35	0.34	0.30±0.048
		$\bar{x}$	0.87	0.79	0.80	0.80	0.82	0.85	0.82	0.81	
		SD	0.308	0.335	0.340	0.308	0.321	0.304	0.323	0.320	
Urea nitragen (mg/dl)	F	1	14	13	13	14	10	15	—	—	13±1.7
		2	16	21	26	—	23	20	21	22	21±3.0
		3	14	9	11	15	16	15	15	15	13±2.4
		4	20	16	11	10	4	8	12	13	11±4.8
		7	11	8	9	12	11	14	12	17	11±2.8
		$\bar{x}$	15	13	14	12	12	14	15	16	
		SD	3.3	5.3	6.8	2.1	7.1	4.2	4.2	3.8	
	M	5	12	15	12	14	13	20	14	18	14±2.8
		6	14	12	12	13	14	15	16	19	14±2.3
		8	15	16	18	22	18	18	—	—	17±2.4
		9	16	12	12	16	12	17	13	17	14±2.3
		10	15	11	10	13	13	14	17	19	14±2.9
		$\bar{x}$	14	13	12	15	14	16	15	18	
		SD	1.5	2.1	3.0	3.7	2.3	2.3	1.8	0.9	

and London

5) *Health Aspects of the Supply and Use of Non-Human Primates for Biological Purposse*

6) 日本実験動物研究会サル問題検討委員会：実験用サルの検疫，実験動物，21，29—34 (1972)

7) 国立予防衛生研究所獣疫部：実験用サルの管理

実験動物，21，29—34 (1972)

8) 川西康夫：世界の野生サルの需要の現況，実験動物，21，243—262 (1972)

9) *Nutrient Requirements of Domestic Animals*, No. 10(2)29—45 (1972), National Academy of Sciences, Washington, D. C.

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 517 — 525, 1974

都衛研—毒性試験システム

中川好男* 福田向江* 市川久次* 藤井 孝*
中尾順子* 平賀興吾*

Computer System used for Toxicological Study at Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Pubulic Health

YOSHIO NAKAGAWA*, HISAE FUKUDA*, HISATSUGU ICHIKAWA*, TAKASHI FUJII*, TOSHIKO NAKAO* AND KOGO HIRAGA*

1. 緒 言

食品添加物や残留農薬などの安全性評価や許容量の設定は，おもに動物における詳細な毒性研究の結果に基づいて行なわれる．一般的な毒性試験とは，毒性についてほとんど知られていない物質が，いかなる量でどんな種類の毒性を示すか認知することを目的とする．実際の一般毒性試験では膨大な数のラットやマウスなどを用い．これらに対して実験系に基づいた処置を施こし，その経過を経時的，長期的に観察しこれを管理しなければならない．これらの小動物を用いた実験において，結果の再現性および信頼性を高めるために，各動物へ加わる環境の諸因子を均等化させる必要がある．そのため例えば動物や環境因子の一定化を図るとともに，動物をランダムに配置しその上で動物ごとに処置が行なわれる．しかしこのランダムに配置された動物から，定期的に計量される体重や給餌量などの情報は実験期間とともに膨大化し，それらの情報を処置別に分類し，さらに集計処理することは困難を極め誤謬を生ずる機会が多い．また毒性試験では定期的に繰り返される解剖や血液検査の情報も集積し管理しなければならない．そしてこれらの処理や以後の統計演算には，かなりの人手と時間を要する．

このように実験結果の信頼性を高めるためにランダムに配置した動物の識別，多方面から経時的に集まる情報，そしてこれらの統計演算および報告書の作成については省力化して行くことが今後の毒性試験では必要であると思われる．

都衛研毒性試験システムは，これらの問題となる諸条件を少しでも満足させることを目的として企画された．現在運営は実験段階であり，今回はその中間報告とする．

2. 毒性試験への電子計算機の導入

一般的な毒性試験の検索法は，検体の投与期間により短期間の毒性について調べる急性毒性と長期間摂取の場合の毒性について調べる慢性毒性に大別される．前者は高濃度から低濃度まで各種の用量段階の検体を一回動物に投与して，中毒量，致死量および中毒現象などをとらえ，またこれらから次の長期試験の実験計画に有効な予備知識をも提供することを目的とする．後者はたとえ化学物質の毒性が弱くても蓄積性が大きければ，長期間の微量摂取により何らかの影響があらわれることが予想され，この見地から比較的低濃度の検体を動物に連続して投与し，その結果から検体の安全性の評価や許容量の設定などがなされる．

慢性毒性試験を行なう場合，実験動物として主にマウスやラットが使用され，必要に応じて犬や猿なども用いられる．特に小動物を多数使用する毒性試験では，同一飼育室において各動物へ作用する環境因子を平均化することを考慮しなければならない．そのため長期的な実験では，各動物を無作為に飼育室内に配置した上で検体を負荷させ，再現性と信頼性のある動物

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験を行なう必要がある．

食品添加物や残留農薬などは，主に経口的に人体へ摂取されるため，これら化学物質の毒性試験では検体を飼料に混入した上で動物へ投与される．そこで検体は数濃度に分けて飼料中に混入させ，化学物質添加飼料を調製する．化合物の一濃度につき雌雄各10匹程度の動物が用いられ，それに対して無添加飼料のいわゆる対照群を同程度もうける．そのため数濃度にわたる一実験では100匹程度，長期的な実験では4～5倍数の動物が必要となる．これらの動物は一匹ずつ，あるいはグループ別に飼育箱に入れ，飼料と水が与えられる．

このように多数の動物を検体の濃度とともに識別管理することは，以後の実験処置において煩雑さとともに動物相互間の情報のミスを起こすことにもなる．そこで各動物について実験企画上の位置関係を明らかにするため，簡単な記号で表現することを考慮しなければならない．

実験開始後，動物がとった餌の量や水の量を週2～3回，体重を週1回計量し，これから体重の増加率と化学物質の摂取量に関する情報などを得る．各動物の餌の摂取量は，給餌量からその残量とこぼし量を引いたものであり，飲水量は給水量からその残量を引いたものである．また検体の摂取量は，餌の摂取量と化合物の濃度から計算で求める．体重の増加率あるいは成長率は，実験開始時の体重値と開始後の各週における体重の比較である．

亜急性毒性試験では3ヵ月後に，また慢性毒性試験では3，6，12，18，24ヵ月等に，適当な間隔をおいて動物を解剖し，脳や肺など約20種の臓器重量を計量した後，これらは病理組織学的な検索に供される．また解剖の直前にとった血液は，血清生化学的検査と血液学的検査に供される．このように毒性試験では，一つの検体の毒性を調べる場合，百～数百匹の動物が用

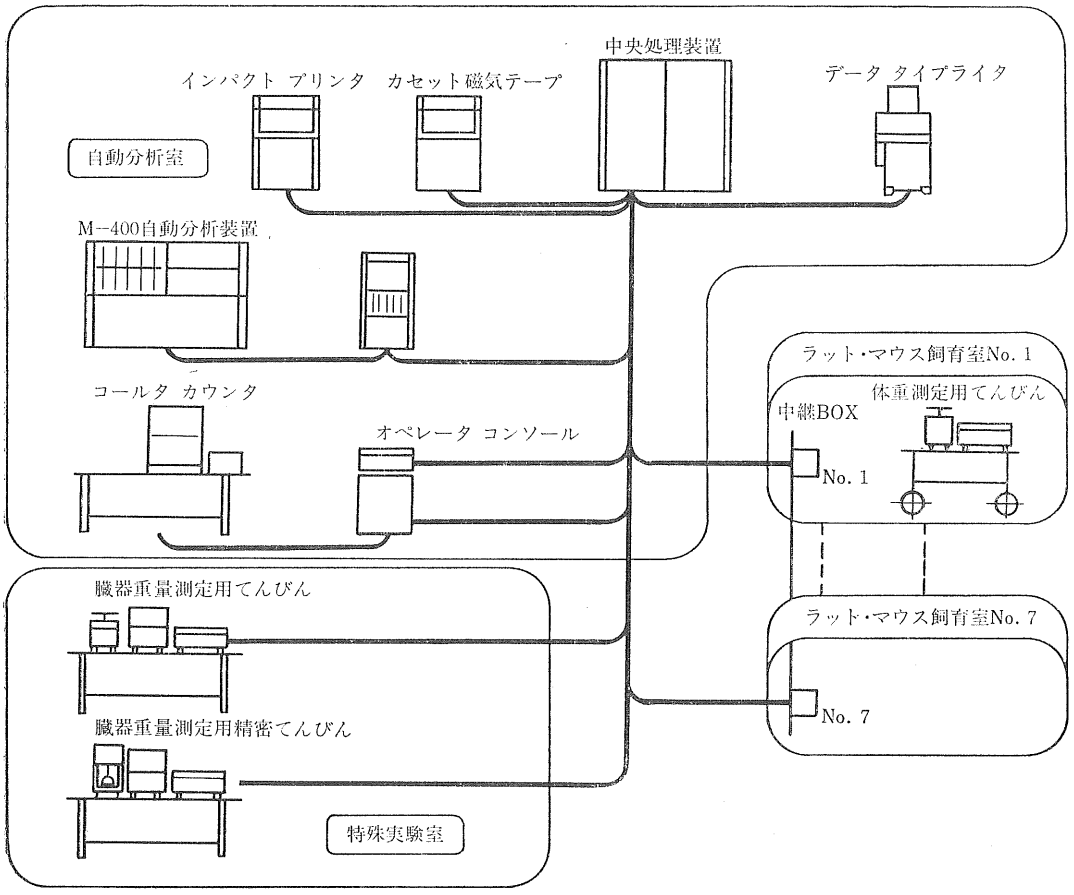
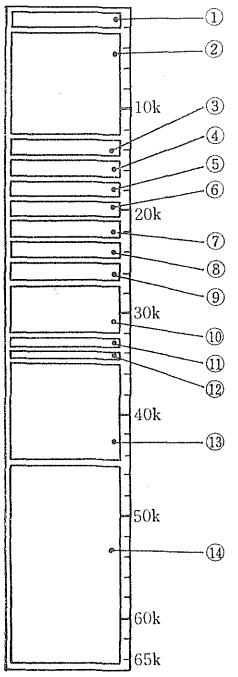


Fig. 1 都衛研—毒性試験システムの装置構成



① システム プログラム （2k）
オペレーティング システム，システム サブルーチン
② アプリケーション プログラム （11k）
データ取込みプログラム，報告書作成プログラム，その他
③ 体重値用データバッファ （2k）
2語（SEQNO＋測定データ）×1,000匹/日＝2k
④ 給餌量値用データ バッファ （2k）
⑤ 餌残量値用データ バッファ （2k）
⑥ 餌こぼし量値用データ バッファ （2k）
⑦ 給水量値用データ バッファ （2k）
⑧ 給水残量値用データ バッファ
⑨ 予備値用データ バッファ
⑩ 臓器重量値用データ バッファ （4.8k）
32語（SEQNO＋測定データ）×150匹/日＝4.8k
⑪ コールタ カウンタ測定値用データ バッファ （1.2k）
8語（SEQNO＋測定データ）×150匹/日＝1.2k
⑫ M−400分析値用データ バッファ （1.2k）
8語（SEQNO＋測定データ）×150匹/日＝1.2k
⑬ 体重初期値格納テーブル （10k）
1語（体重値）×10,000匹＝10k
⑭ ID登録用テーブル （20k）
2語（ID）×10,000＝20k

Fig. 2 磁気ドラム記憶装置の記憶領域一覧表

いられ，しかも3ヵ月から2ヵ年間にわたる長期のため，いくつかの実験が並行して行なわれる．以上述べたように慢性毒性試験では，多数の動物を用いて毒性の現われかたを体重，臓器重量，病理組織学，血液生化学および血液学などの各分野から観察し，これらの情報を長期的に集め，最終的に統計演算を行なってから毒性について解析しなければならない．しかしこれらの情報と処理をこれまでの方法で行なうことは，多数の人手と時間を要し，さらに各情報の正確性も問題となる．そこで従来人手により行なわれていた作業について可能な範囲で機器を導入してこれを自動化，さらに情報の収集と統計演算を流動的に処理する目的から電子計算機の導入を試みた．

3. 都衛研毒性試験システム

(1) システムの構成と情報の流れ

本システムの中心は，Fig. 1に示したように日立電子計算機（HIMECS—001）で，これに動物の体重や臓器重量を計量するために電子天秤をオンラインで結んでいる．また血清生化学検査用機器として日立自動分析装置M—400と血液学検査用機器としてコールターカウンターモデルS (Coulter Counter Model S) ともオンラインで結んでいる．これらの端末装置および分析装置からの情報の流れは Fig. 5に示した．

中央処理装置（HIMECS—001）はコア8K語と補助メモリーとして磁気ドラム記憶装置65K語からなる．処理能力は体重計量，給餌量関係の計量，飲水量関係の計量がそれぞれ一日1000検体，解剖時，各動物から分取される約20項目の臓器計量および8項目の血清生化学分析と7項目の血液学分析は，一日それぞれ150検体まで可能である．

磁気ドラム装置は多くの端末装置や分析装置から中央処理装置へ入ってくる諸情報を順次記憶し，一次的に一日分の計量や実験が終了するまで収納の目的で用いられる．なおこの装置には Fig. 2 に示したシステム用のプログラムや後で述べるが動物識別用のプログラムも登録される．

一日分の計量や実験が終了した後，それらの情報はカセット磁気テープ装置へ転送され，磁気テープに記憶される．この装置により情報は経時的，長期的に実験過程が終わるまで収集される．

各実験についての報告書は，まずカセット磁気テープから情報が磁気ドラム装置へ転送され中央処理装置

で分類，統計演算された後，高速タイプライター（インパクトプリンター）により作成される．これらの段階的な編集処理は，万能入力出タイプライター（データータイプライター）から指令することにより，磁気ドラム装置のプログラムが作業を段階的に処理し，自動的に報告書が作成される．

またデータータイプライターは，オフラインによる情報の追加，修正，および削除などの処理機能をも備えている．

オンラインシステムによる情報収集として，体重や臓器重量の計量用に7台の電子天秤と血液検査の目的で2台の自動分析装置がある．電子天秤には体重と給餌量関係を計量するものと（Fig. 3），臓器重量の計量に用いるもの（Fig. 4）とがある．計量データーとともに電子計算機が必要とする情報は，動物の識別番号と計量項目である．体重計量用の天秤からは，データーとともに動物の体重，給餌量，給餌残量，給餌こぼし量，給水量，および給水残量などを区別する計量項目と動物の識別番号をFig. 3 に示すオペレーターコンソール（入力端末装置）を介して計算機へ転送する．臓器計量用の天秤からも，各情報は同じ方式で計算機へ転送される（Fig. 4）．このオペレーターコンソールは，計量項目，計量値，動物識別番号などの修

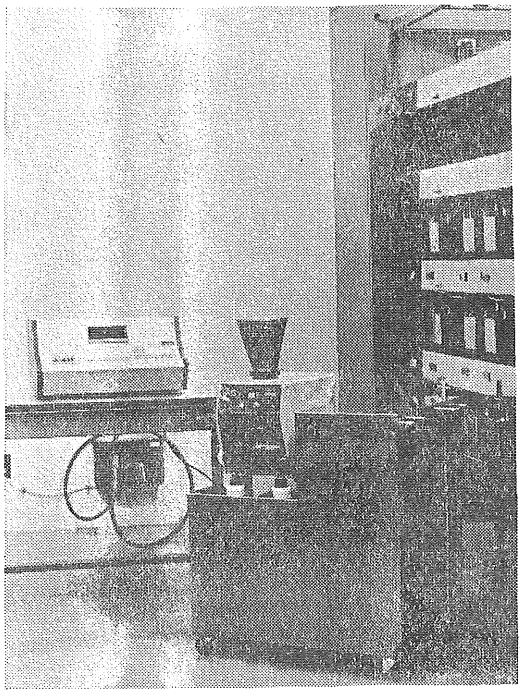


Fig. 3 体重計量用天秤とオペレーターコンソール 左よりオペコン，電子天秤，台車

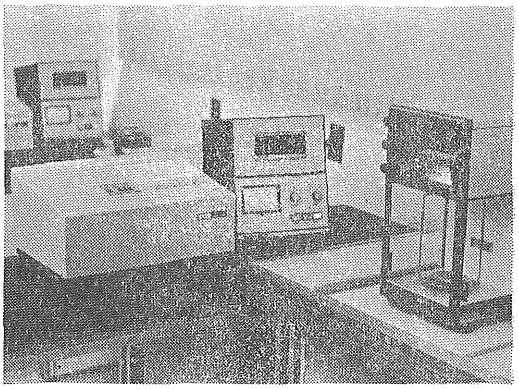


Fig. 4 臓器計量用天秤とオペレーターコンソール 左よりオペコン，天秤用デジボル，電子天秤

正や削除を計算機に対して指令する機能も備えている．

自動分析装置を毒性試験に導入することは，多数の検体を正確に分析し流動的に処理していく上で必要なことである．そこで血清生化学的検査用として6チャンネルの日立自動分析装置と血液学的検査用として7チャンネルのコールターカウンターをシステムに組み込み，両装置と計算機をオンラインで結び，検体の識別番号とともに分析データーを転送するようにした．各検体の識別については，日立自動分析装置では識別カード（ＩＤカード）(Fig. 6）を検体ごとに付け，分析装置の光電検出器で番号を読み取り，測定値とともに計算機へ転送する．コールターカウンターでは，オペレーターコンソールから識別番号を入力する．また測定値および検体を確認する目的で，日立自動分析装置では専用のプリンターを，コールターカウンターではインパクトプリンターをモニターとして使用している．

(2) システムの機能

前に述べたように毒性試験システムに電子計算機を導入した主旨は，毒性試験全体の省力化と情報の正確性を得ることにある．

毒性試験で省力化が行なえる個所は，手作業を自動機器装置に置換され得るところである．そして機器装置が計算機とオンラインで結ばれれば，電気的な信号に変換された情報は計算機へ転送され，その実験結果を即座に得ることができる．また機器を導入する以前の問題として，システムの目標に合わせたプログラムの企画も重要な省力化の一因である．そこで毒性試験の流れにそって実験の省力化と情報の正確性に基づいた当研究所のシステムについて以下に述べる．

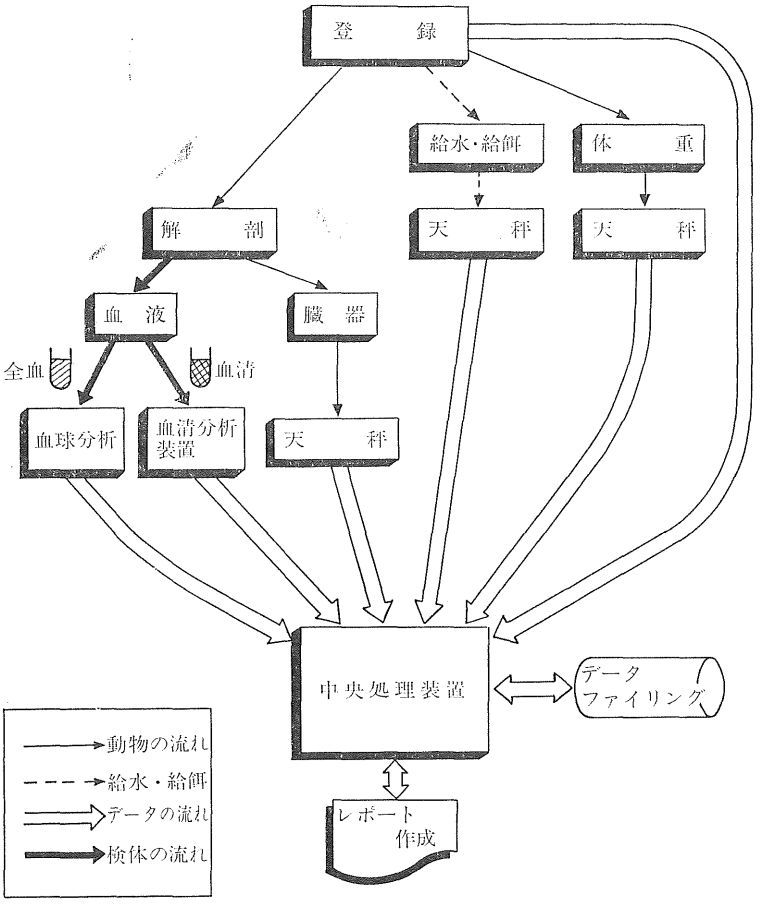


Fig. 5　実験処理とデーターの流れ

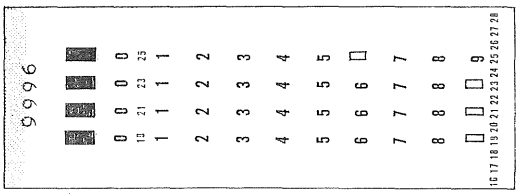


Fig. 6　ID Card（日立自動分析装置用）

① 実験動物の識別

体重や飼料摂取量などの計量は，日あるいは週単位で行なわれる．数百匹の動物を使用する慢性毒性試験では，作業的にまた時間的にもかなりの比重をこれに占める．ランダムに配置された動物から体重などを計量する場合，各動物の識別を確実にまた容易にすることは，情報の正確性を高めることになる．そこで毒性試験における各動物の位置関係を明確にするため，Fig. 7 に示すような識別記号 ID (Identification) を設け，さらに実際の計量操作などにおいて容易に動物が識別できるようにするため，ID を 4 ケタの連続番号 SEQ No. (Sequential number) で表現した．

ID は実験動物のグループ分けに使用される記号で，数字とアルファベットの13文字から成る．Fig. 7 に示すように ID の構成は，ⓐ短期試験：S，あるいは長期試験：L，ⓑ動物の種類，ラット：R，あるいはマ

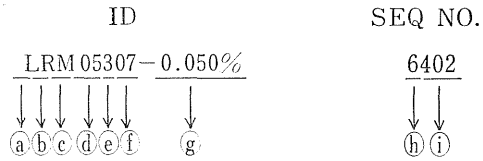


Fig. 7　動物識別記号 ID と SEQ No.

ウス：M，ⓒ動物の性別，雌：F，あるいは雄：M，ⓓ化学物質の種類，00～20まで21種類，ⓔある化学物質濃度群ⓔ内のグループ番号，0～9まで10グループ，ⓕそのグループ内の各動物の個体番号，00～60まで61匹，ⓖ飼料中に含まれている化合物の濃度，ppm：Pあるいは%，以上の7項目の情報から成っている．またIDをさらに簡略化したSEQ No.の構成は，ⓗ飼育室番号，0～9まで10室，ⓘ飼育箱番号，000～999までの1000ケージから成っている．このIDとSEQ No.は毒性試験の企画ができた時点で，上記の構成を組み立て，あらかじめデータータイプライターから磁気ドラム記憶装置に登録する．この装置には最大7000匹分のIDとSEQ No.が登録できる．実際に体重や血液分析の情報を計算機へ入力する場合，同時にSEQ No.必要であり入力後の情報処理では磁気ドラム装置に登録されているID-SEQ No.対応表によりIDが選択的に取り出され使用される．このようにIDとSEQ No.は本システムの性格をも決定する重要なものである．

② 計量システム

実験動物の体重や給餌量などは，電子計算機とオンラインされた電子天秤により計量される．この電子天秤からはアナログ信号が取れることが必要であり，これにより天秤とオペレーターコンソールとが細いケーブルで結ばれ天秤の移動が容易に行なわれる．計量作業は通常二人で行なわれる．一人が飼育棚にそって天秤を移動させながら検体を計量し，他の一人がオペレーターコンソールからSEQ No.と計量項目を計算機へ転送する．計量作業において問題となることは，生きた動物を扱うため正確な体重値がすみやかに得られないことである．そのため動物の運動が静止するまで待つか，あるいは天秤のデジタル表示の変動域から平均値を読み取り，計算機へ入力する方法とがある．また機器的に積分回路を導入することにより，平均的体重値を得る方法もあるが，いまだ当研究所のシステムには導入していない．長期毒性試験では平均して50～100匹程度の動物が定期的に解剖され，約20種類の臓器が取り出される．これらの各臓器は電子天秤により一個ずつ計量され，その情報は臓器名とSEQ No.とともにオペレーターコンソールから計算機へ転送される．

③ 自動分析装置の導入

解剖時，各動物からとった血液は血清あるいは全血のまま血清生化学検査と血液学検査に供される．そこでこれらの多項目の分析を同時に流動的に処理し，さらに各情報に対して正確性と信頼性をもたせる目的から自動分析装置を導入した．なおこれらの装置に対して，磁気ドラム記憶装置にはあらかじめ分析項目とその単位，および補正を必要とする分析に関しては8点の補正ができる検量線が登録される．

④ 情報の収集と統計演算

情報の収集，統計演算および報告書の作成は，電子計算機の基礎的，本質的な機能である．それゆえ，実験系に合ったシステムプログラムを組み立てることは，毒性試験への電子計算機の導入を一層生かすことになる．また一台の計算機に多くの実験者が接し，他人の情報をも利用するということから，可能なかぎり計算機にて行なう操作を簡略化する必要がある．

本システムの情報収集は，(1)給餌量，給餌残量，給餌こぼし量，(2)給水量，給水残量，(3)初期体重値，経時体重値，(4)臓器重量値，(5)血清生化学分析の結果，(6)血液学分析の結果，などについて通常オンラインで行なわれる．

次に収集されたこれらの情報をもとにシステムは，

(1) 実験動物と情報の識別
(2) 体重増加率：試験開始時体重との比較（%）
(3) 飼料摂取量：給餌量—給餌残量—給餌こぼし量
(4) 体重比飼料摂取量：飼料摂取量／体重
(5) 飲水量：給水量—給水残量
(6) 比体重飲水量：飲水量／体重
(7) 検体摂取量：飼料摂取量×検体含有率
(8) 比体重検体摂取量：検体摂取量／体重
(9) 臓器比重量：臓器重量／体重
(10) 自動分析装置からのデーター濃度と補正
(11) 以上の各項目についての統計演算，などを行なう．統計演算は情報の精度を管理するため，平均値，分散，標準偏差，平均値の標準偏差について計算し，さらに対照群に対する各濃度群の有意性を検定するため，F検定とt検定を行なう．(1)から(11)の情報は最終的に次の四項目の報告書に作成される．

(a)体重，飼料，水および検体摂取量の報告書（Fig. 8），(b)臓器重量の報告書（Fig. 9）(c)血清生化学的検査の報告書（Fig. 10）(d)血液学的検査の報告書（Fig. 10）．

4. システムの問題点

電子計算機は膨大な情報を収集し，それを整理しかつ必要な時にそれを引き出すという情報処理機能に期待するところが大きい．電子計算機を導入した毒性試験システムでは，各実験者が何んらかの形で計算機あるいは情報を入力する端末装置に接するため，簡単に

BODY ARTH-REPORT74.04.17.LRM02500-0020%

		G.R.(%)	FOOD(g)	FOOD-g/kg	WATR(g)	WATR-g/kg	CHE(mg)	CHE mg/kg	BODY-W(g)	TOTL-D(g)	REMN-D(g)	DROP-D(g)	TOTL-W(g)	REMN-W(g)	A(g)
02	102	607	19.8	31.9			3.9	6.2	620	299.0	257.6	1.7			
03	096	630	20.3	33.5			4.0	6.6	605	295.0	252.5	1.8			
05	113	398	15.6	34.6			3.1	6.8	450	307.0	274.8	0.9			
06	108	539	19.8	33.9			3.9	6.6	583	273.4	232.3	1.4			
07	100	657	14.7	22.3			2.9	4.4	657	279.8	248.3	2.1			
09	109	424	16.6	35.8			3.3	7.1	463	296.8	261.5	2.0			
10	100	597	19.7	32.9			3.9	6.5	597	297.8	256.3	2.1			
11	107	605	22.1	34.1			4.4	6.7	648	297.6	251.4	1.9			
12	108	533	20.0	34.7			4.0	6.9	576	276.4	235.2	1.1			
15	099	594	19.0	32.2			3.8	6.4	589	275.9	235.8	2.1			
N		10	10	10			10	10	10						
SX1		5584	187.6	325.9			37.2	64.2	5788						
X		558.4	18.76	32.59			3.72	6.42	578.8						
S2		7439.15	5.4782	14.4698			0.2173	0.5684	4860.84						
S		86.25	2.341	3.803			0.467	0.753	69.71						
SX2		27.27	0.741	1.203			0.147	0.239	22.05						
F															
t															

BODY ARTH-REPORT74.04.17.

Fig. 8 体重関係の報告書

G.R.：体重増加率，FOOD：飼料摂取量，FOOD/kg：体重比飼料摂取量，WATR：飲水量 WATR/kg：体重比飲水量 CHE：検体摂取量 CHE/kg：体重比検体摂取量，BODY—W：体重 TOTL—D：給餌量 REMN—D：給餌残量 DROP—D：給餌こぼし量，TOTL—W：給水量 REMN—W：給水残量 N：例数，Sx_1：合計値，X：平均値，S_2：分散，S：標準偏差，Sx_2：標準誤差，F：F検定値，t：t 検定値

ORGAN BODY REPORT 74.05.20.

LRM01600-0000%

		BRAIN(mg)	HEART(mg)	LUNG (mg)	LIVER (g)	KID-L(mg)	KID-R(mg)	SPLEN(mg)	THYM(mg)	HYPO (mg)	THYR (mg)
01	2330	2162	1221	1639	16.13	1193	1163	554	185.0	11.5	22.5
02	2320	2175	1021	2320	15.07	964	935	420	104.0	10.5	19.0
03	2306	2091	1283	1702	17.69	1077	1095	643	135.0	11.0	18.0
04	2303	1983	1010	1686	17.05	939	919	550	147.0	12.5	12.0
05	2328	2008	1064	1519	16.98	986	957	594	121.0	12.5	13.5
07	2288	2042	1007	1530	12.39	1033	1037	550	147.0	9.5	16.0
08	2305	2004	1287	2031	14.52	1232	1162	572	121.0	11.5	23.0
09	2314	2036	1181	1635	13.95	1205	1191	575	116.0	10.0	16.0
10	2285	1993	1061	1383	15.09	957	932	575	90.0	16.5	13.0
01	0451	479	270	363	3.57	264	257	122	41.0	2.5	4.9
02	0454	479	224	511	3.31	212	205	92	22.9	2.3	4.1
03	0431	485	297	394	4.10	249	254	149	31.3	2.5	4.1
04	0367	540	275	459	4.64	255	250	149	40.0	3.4	3.2
05	0412	487	258	368	4.12	239	232	144	29.3	3.0	3.2
07	0426	479	236	359	2.90	242	243	129	34.5	2.2	3.7
08	0511	392	251	397	2.84	241	227	111	23.6	2.2	4.5
09	0402	506	293	406	3.47	299	296	143	28.8	2.4	3.9
10	0421	473	252	328	3.58	227	221	136	21.3	3.9	3.0
N		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
SX1		18494	10135	15445	138.87	9586	9391	5033	1166.0	105.5	153.0
X		2054.8	1126.1	1716.1	15.430	1065.1	1043.4	559.2	129.55	11.72	17.00
S2		5189.11	13666.36	82740.11	2.891224	13627.86	12495.02	3558.69	782.5278	4.2569	15.8124
S		72.03	116.91	287.65	1.7003	116.73	111.79	59.65	27.973	2.063	3.977
SX2		24.01	38.97	95.89	0.5667	38.91	37.27	19.89	9.325	0.687	1.325
F											
t											
N		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
SX1		4320	2356	3585	32.53	2228	2185	1175	272.7	24.4	34.6
X		480.0	261.7	398.3	3.614	247.5	242.7	130.5	30.30	2.71	3.84
S2		1518.24	596.95	3139.50	0.346252	601.03	684.95	373.78	51.3899	0.3561	0.4052
S		38.97	24.43	56.03	0.5885	24.51	26.17	19.33	7.169	0.597	0.637
SX2		12.99	8.15	18.67	0.1961	8.17	8.73	6.45	2.389	0.199	0.213
F											
t											

		TES-L(mg)	TES-R(mg)	ADR-L(mg)	ADR-R(mg)	PROS (mg)	OVAR (mg)	UTERU(mg)	X (mg)	Y (mg)	Z (mg)
01	2330	1391	1338	27.5	24.0	174.0					
02	2320	1034	1376	15.5	13.5	414.0					
03	2306	1593	1435	23.5	23.5	252.0					
04	2303	1326	1300	19.0	22.5	277.0					
05	2328	1543	1489	18.0	17.0	211.0					
07	2288	1870	1809	26.0	24.0	266.0					
08	2305	1545	1486	24.5	21.0	425.0					
09	2314	1644	1584	19.5	19.5	353.0					
10	2285	1634	1636	26.5	24.0	299.0					
01	0451	308	296	6.0	5.3	38.5					
02	0454	227	303	3.4	2.9	91.1					
03	0431	369	332	5.4	5.4	58.4					
04	0367	361	354	5.1	6.1	75.4					
05	0412	374	361	4.3	4.1	51.2					

Fig. 9 臓器重量の報告書

BRAIN：脳，HEART：心，LUNG：肺，LIVER：肝，KID-L：腎左，KID-R：腎右．SPLEN：脾，THYM：胸腺，HYPO：脳下垂体，THYR：甲状腺，TES-L：睾丸左，TES-R：睾丸右，ADR-L：副腎左，ADR-R：副腎右，PROS：前立腺，OVAR：卵巣，UTERU：子宮 上段：絶対重量，下段：体重比重量

BIOCHEMICAL REPORT 74.09.11.

LRM02300-0000%	TP g/dl	GLU mg/dl	UN mg/dl	GPT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	GOT U/ml
01 1100	6.8	135	14	38	18	67	145
02 1089	6.7	130	18	55	30	61	80
03 1093	6.9	107	13	26	20	83	91
04 1088	6.7	139	16	30	11	56	84
05 1091	6.8	121	15	29	14	85	92
N	5	5	5	5	5	5	5
SX1	33.9	632	76	178	93	352	492
X	6.78	126.4	15.2	35.6	18.6	70.4	98.4
S2	0.0070	162.80	3.70	137.30	52.80	169.80	703.30
S	0.083	12.75	1.93	11.71	7.27	13.03	26.51
SX2	0.037	5.71	0.87	5.25	3.25	5.83	11.87

LRM02300-0020%	TP g/dl	GLU mg/dl	UN mg/dl	GPT U/ml	ALP U/dl	CHO mg/dl	GOT U/ml
01 1082	6.7	139	16	57	29	124	84
02 1084	7.1	134	14	22	33	73	62
03 1085	6.7	153	18	26	13	81	68
04 1097	7.1	118	16	50	15	64	87
05 1099	6.8	119	18	38	17	96	121
N	5	5	5	5	5	5	5
SX1	34.4	663	82	193	107	438	422
X	6.88	132.6	16.4	38.6	21.4	87.6	84.4
S2	0.0420	214.30	2.80	225.80	80.80	552.30	529.30
S	0.205	14.63	1.67	15.03	8.99	23.51	23.01
SX2	0.091	6.55	0.75	6.73	4.01	10.51	10.29
F	6.00	1.31	1.32	1.64	1.53	3.25	1.32
t	1.0	0.6	0.9	0.3	0.5	1.3	0.8

HEMATOLOGICAL REPORT 74.09.11.

LRM02300-0000%	WBC(10*3)	RBC(10*6)	HGB(g/dl)	HCT (%)	MCV(C.m)	MCH(mmg)	MCHC(%)
01 1100	9.5	7.98	17.5	44.7	56	22.9	38.3
02 1089	8.3	7.57	17.3	40.0	54	22.8	43.0
03 1093	8.6	6.71	15.4	34.9	53	22.9	44.1
04 1088	13.1	7.35	16.2	37.9	53	21.9	42.4
05 1091	9.6	5.37	12.0	29.4	55	22.2	40.7
N	5	5	5	5	5	5	5
SX1	49.1	34.98	78.4	186.9	271	112.7	208.5
X	9.82	6.996	15.68	37.38	54.2	22.54	41.70
S2	3.6770	1.037180	4.9570	32.6370	1.70	0.2130	5.1250
S	1.917	1.0185	2.227	5.713	1.31	0.461	2.263
SX2	0.857	0.4555	0.995	2.555	0.59	0.207	1.013

LRM02300-0020%	WBC(10*3)	RBC(10*6)	HGB(g/dl)	HCT (%)	MCV(C.m)	MCH(mmg)	MCHC(%)
01 1082	14.9	7.41	21.0	47.2	65	27.9	43.9
02 1084	6.9	6.32	15.8	31.8	51	24.9	49.5
03 1085	5.5	6.97	15.8	36.3	53	22.6	43.4
04 1097	7.4	7.66	18.4	41.8	56	23.9	43.7
05 1099	10.2	6.81	16.4	37.8	56	24.0	43.1
N	5	5	5	5	5	5	5
SX1	44.9	35.17	87.4	194.9	281	123.3	223.6
X	8.98	7.034	17.48	38.98	56.2	24.66	44.72
S2	13.8670	0.274330	5.0120	33.9120	28.70	3.9530	7.2320
S	3.723	0.5237	2.239	5.823	5.35	1.989	2.689
SX2	1.665	0.2343	1.001	2.605	2.39	0.889	1.203
F	3.77	3.78	1.01	1.03	16.88	18.55	1.41
t	0.4	0.0	1.2	0.4	0.7	2.1	1.8

Fig. 10 血清生化学的および血液学的検査の報告書

TP：総タンパク，GLU：グルコース，UN：尿素窒素，GPT：トランスアミナーゼ，ALP：アルカリフォスファターゼ，CHO：コレステロール，GOT：トランスアミナーゼ，WBC：白血球，RBC：赤血球，HGB：ヘモグロビン，HCT：ヘマトクリット，MCV：平均赤血球容積，MCH：平均赤血球ヘモグロビン，MCHC：平均赤血球ヘモグロビン濃度

それらが使えなければならない．そこで毒性試験の省力化を前提として，機器的なシステムとプログラムについて検討した．

①体重計量：前に述べたように，体重の計量は生きた動物を扱うため天秤の指示値がなかなか安定しない．そこでこの解決策として，(a)動物を天秤に乗せ，運動が止むまで計量を待つ．(b)動物を天秤に乗せ，一定時間後に計量する．(c)あるいは一定時間内に数回計量しそれらの平均値をとる．などが考えられる．(a)に関しては正確な体重値が得られるが，計量に時間がかかり省力上に問題が残る．しかし当研究所では現在この方法を用いている．(b)および(c)は計量時間を一定にすることによりその短縮が可能となるが，体重値の正確性と再現性を高めることはむずかしく，機器的あ

るいはプログラム的にたとえば積分回路などを加えて検討する必要がある．

② 体重および給餌量などの計量作業：多数の動物を使用する長期毒性試験では，かなりの時間がこれにとられる．動物は多量に空間的に広がって飼育されているため，固定した天秤に動物を運搬して計量するより，天秤を一定方向へ移動させながら検体を計量することが，時間的に省力化される．しかし天秤の移動はそれに付随したオペレーターコンソールやデジタル信号用の太いケーブルを引きずらなければならない．そこで作業を簡略化するためオペレーターコンソールを一ヵ所に固定し，アナログ出力が可能な天秤をこれとオンラインで結んだ．これによりデジタル出力では42本の信号ケーブルが必要であるが，アナログ出力では4本の信号ケーブルですみ，ケーブル自体が軽量化される．天秤からの情報はオペレーターコンソールに入力され，デジタル信号に変換後，計算機へ転送される．この方法により体重などの計量が作業的に省力化されると思われる．

③ 情報の記録とエラーチェック

体重，摂餌量および臓器重量などの計量は，計量項目と SEQ No. を確認しながらオペレーターコンソールより計算機へ転送しなければならない．計算機からの記憶完了の信号は，オペレーターコンソール上のランプが点灯することにより確認できるが，実際の情報がいかなるものかはこれだけでは明らかでない．そこでこのシステム部に，自動分析装置と同様にプリンターを設ければ，情報のモニターと正誤のチェックが同時にでき，正確な情報が得られると思われる．

④ 報告書作成：集積された情報から目的とする情報を取り出し，実験計画に合わせて統計演算することは，電子計算機の本質的な機能に負うところである．一台の計算機に多くの人が接し，また他の実験者が収集した情報をも利用することから，システムのプログラムに指令する操作は，単純明解であることが必要である．報告書の作成は，まずカセットテープの情報が引き出されてから中央処理装置で演算されるため，情報の読み取りに比較的時間がかかる．しかしこの読み取り作業は速度的に限られているため，報告書作成のため計算機に接して行なう作業を一時的にまとめて取ることにより時間的な省力化を図った．すなわち，あらかじめ計算機に作成しようとする報告書の情報をデータータイプライターからまとめて入力させ，以後同一のカセットテープから順次情報を引き出し，演算処理後，各種の報告書をインパクトプリンターで作成させた．これにより報告書作成の待ち時間がかなり短縮された．

⑤ 毒性試験は以上述べてきた一般毒性試験の他に，催奇形成や発癌性試験などの特殊毒性試験がある．これらの試験や病理組織学的検索に電子計算機を導入して情報収集や統計演算などを試みる場合，システムプログラムの変更や追加を考慮しなければならない．そのため実験系別に編集されたプログラムをカセット磁気テープ等から計算機へ入力できれば，毒性試験における電子計算機の用途が固定化されず多角的に広がると思われる．

5. 結　語

膨大な数の実験動物を使う毒性試験において，動物の体重や給餌量などの計量は作業のかなりの部分を占め，用手法に代わって機械化することは極めて困難である．これらの情報と自動分析装置の導入にともなうその情報の収集，統計演算そして報告書の作成は，精度的，作業的および時間的にも電子計算機の導入による省力化の対象にある．実際にある化合物の慢性毒性試験にこのシステムを適用して約一年間経過したが，初期の机上のプログラムでは満足できない個所が現われたり，また逆に作業が増加した個所もあった．これらは結果的には毒性試験システムにおける障害であり，そのため数度のプログラムの修正や追加を試み一応の成果を得ているが，いまだ未解決の部分がいくつか残っている．今後これらに対して検討を続け，機器やプログラムの追加修正が順次なされ，毒性試験システム全体の機能が発揮されれば，電子計算機が毒性研究の発展にさらに寄与すると期待している．

「謝辞」

本システムのプログラム作成に多大なる援助をいただいた日立製作所の山本誠氏に感謝の意を表します．

参考文献

1) Procedures for the testing of international food additives to establish their safty for use, by Second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (試験法として)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 527 — 534, 1974

自家製造固型飼料とそのラット飼育効率について

池田虎雄* 水尾昭江* 久保喜一* 林田志信*
小林博義* 平賀興吾*

Effects of Our Laboratory Made Pelleted Foods on Growth in Rats

TORAO IKEDA*, AKIE MIZUO*, YOSHIKAZU KUBO*, SHINOBU HAYASHIDA,*
HIROYOSHI KOBAYASHI* AND KOGO HIRAGA*

食品添加物，農薬，環境汚染物質その他食事とともに経口摂取される化学物質の安全性を検討する毒性試験においては，当該物質を飲料水あるいは飼料に添加して試験動物に与え，その影響を観察する方法が多く用いられる．

この際，飼料には粉末のものと固型のものとがあるが，粉末のものは試験物質の添加が容易であり，固型飼料製造時にみられるような加熱等による添加物質の変性を考慮する必要はないが，試験動物がこれを摂取するのに困難がある．また，粉末の気道内吸引により肺炎を起す危険性があり，熱その他により不安定なものを試験する以外は固型化された添加飼料が用いられる．当部においても食品添加物等の毒性試験に当っては多くの場合固型添加飼料を用いるため，このたび，固型飼料製造装置を設備した．この装置は，飼料混合機，固型飼料成形機および飼料乾燥機から成っており，飼料混合機は飼料原末と添加物とを混合すると同時に成形時に必要な湿度を与えるための添加水をよく混和させるものである．成形機は混合加湿した飼料末を圧縮し径13mmの3コのノズルにより円柱状に成形し，回転式カッターによって一定の長さに切断するものである．なお，本成形機では，圧縮過程で発生する熱を抑えるため水冷式冷却装置が取付けられている．乾燥機は，成形された飼料は多量の水分を含んでおり，これを一定の水分にまで乾燥させるもので，機内は左右各10段に飼料受皿があり，成形飼料の原末40 kg相当分が収納される．

今回，本装置により添加飼料を製造するに際し基礎的に知る必要のある次の諸点について試験した．

1. 成形に必要な飼料原末への至適加湿．
2. 成形時の飼料の長さおよび温度．
3. 乾燥時間と飼料中水分含有量との関係．
4. 飼料中水分含有量とラット飼育効率．
5. 同一飼料原末より製造した自家製造飼料と従来使用の市販工場生産飼料とのラット飼育効率の比較．
6. 固型飼料製造各工程における細菌の消長．

試験方法および結果と考按

1. 飼料原末への至適加湿について

飼料原末は日本クレア飼料CE—2を用いた．この原末は抜きとり検査の結果平均6.8%（標準偏差0.44）の水分を含有するもので，混合機にて1,000 g当り，360，355，350乃至345 mlの水道水を加え30分間よく攪拌混和後，成形機に移し，成形射出する飼料の状態および形状を観察した．その結果，水360および355 ml付加の場合は成形能率は良好であったが成形物の表面に割れ目（ささくれ）ができた．350 ml添加の場合は成形能率はやや前2者より劣ったが，成形物の形状は良好であった．345 ml付加の場合は成形機への負荷が大きく，使用にたえなかった．

350 ml添加の場合，混合機で30分攪拌後の飼料原末の水分含有量は30.0%（標準偏差0.14%）であり，

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

成形後の水分含有量は29.9%（標準偏差0.22%）であった．

以上の結果より以下の試験はすべて原粉（クレアCE－2）1,000 g 当り水道水 350 ml 添加（水分含有量30.0%）のものを使用することとした．

2. 成形時の飼料の長さおよび温度について

飼料の長さは，動物の摂飼に影響があるかもしれないが，ここでは一応従来使用の市販品と同じの22—23 cm になるようにした．飼料の長さは成形機のカッターの回転速度と原末加湿度によってきまるが，加湿度が一定であるので，カッターの回転速度を調整した．その結果，カッター回転速度 24 rpm が適当であることがわかり，1,000個の平均は 2.23±0.29 cm となった．その長さの分布は Fig. 1 上段に示す通りで，平均値に相当する長さの部分が陥没する2峰性となった（Fig. 1 下段は工場製品の長さの分布である）．

添加飼料にはできるだけ温度を加えないのが理想であるが，飼料成形の圧縮工程での発熱は止むを得ないところで，本機では圧縮部分を水冷式冷却を行ない熱上昇を抑えているが，成形射出時にどのような温度を

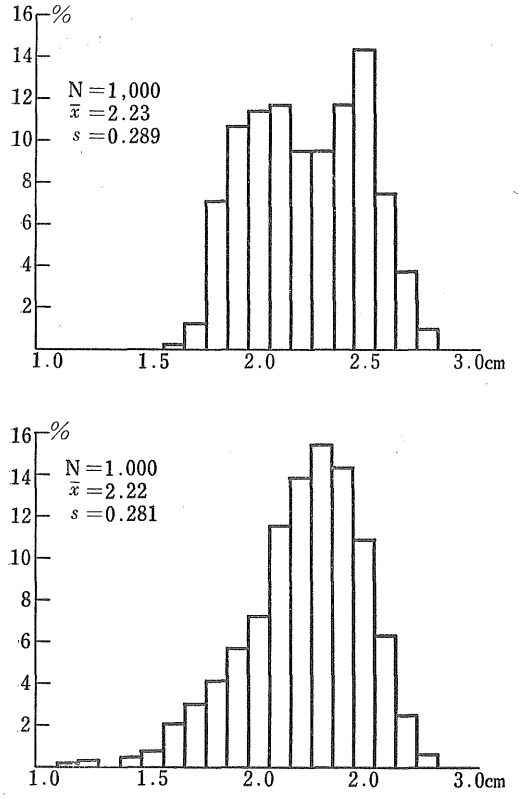


Fig. 1 固型飼料の長さの分布（上段：自家製品，下段：市販工場生産品）

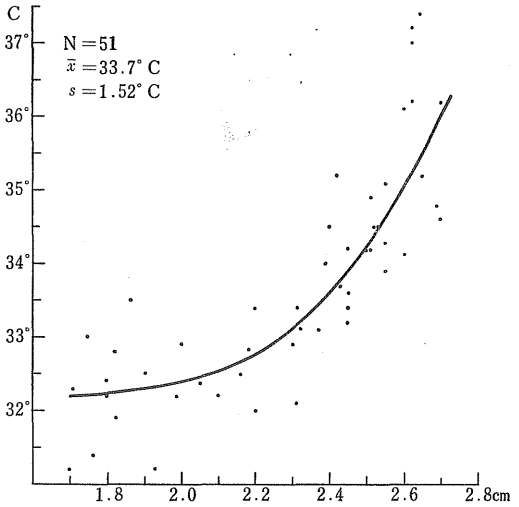


Fig. 2 成形時の成形飼料の温度

示すかを，検温計のプローブを成形飼料中に挿入して調べた．

結果は Fig. 2 に示すように平均は 33.7°±1.52°であったが，成形飼料の長さと関係し，長い程高温で，2.6～2.7 cm 付近では最高37.4°を示した．

3. 乾燥時間と飼料中水分含有量の関係について

飼料成形時の水分含有量は約30%で，脆弱であり実際の使用および保存にたえないので水分を一定度まで減少させる必要がある．

保存性からみると水分含有量が低い方がよいが，動物の成育に与える影響も考慮する必要がある．そこで，市販飼料の水分含有量が8.4～8.7%であったことを参考として，水分含有量が10%から5%前後のものを作って動物成育への影響をみることとした（4の項）．

そこで，まず，乾燥温度と乾燥時間と乾燥度の関係を次のようにして測定した．

乾燥機の温度は添加物への影響を考慮してできるだけ低く50°前後を目標にした．

乾燥機の温度指示計と機内温度は必ずしも一致しないので機内左右の中央に寒暖計を吊して実際の温度の変動をみた．結果は，

	乾燥機温度指示計	水銀寒暖計 左	水銀寒暖計 右
ヒーター	ON→47°	40°	41°
	49°	55°	64°
ヒーター	OFF→51°	52°	59°
	51°	45°	46°

ヒーター	ON→47°	40°*	40°*
	平均	48	52
	総平均	50.0° (*除外)	

であった．なお，加熱終了後の余熱の持続は Fig. 3 に示すように室温22°～23.5°で約5時間であった．

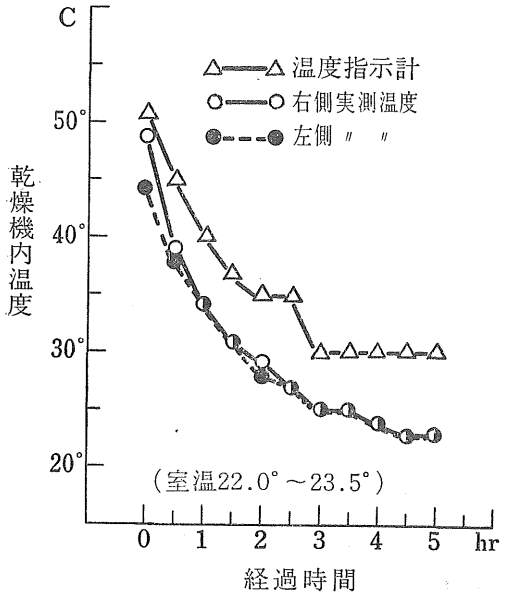


Fig. 3　乾燥機の余熱持続時間

以上の加熱条件で 14(C_1)，12(C_2)，11(C_3) および 8(C_4) 時間（余熱時間を含まず）成形飼料を乾燥した場合の水分含有量を測定した．

飼料原末重量 40kg 分の成形飼料を製造し，飼料受皿右(B_1)，左(B_2)それぞれ最上段(A_1)，第3段(A_2)，第7段（A_3）および最下段（A_4）のものを4等分に区

	左 (B_2)		右 (B_1)	
最上段 (A_1)	C_4	C_2	C_3	C_1
	C_3	C_1	C_4	C_2
第三段 (A_2)	C_1	C_3	C_4	C_2
	C_4	C_2	C_1	C_3
第七段 (A_3)	C_2	C_4	C_1	C_3
	C_1	C_3	C_2	C_4
最下段 (A_4)	C_3	C_1	C_2	C_4
	C_2	C_4	C_3	C_1

C_1…14時間，C_2…12時間
C_3…10時間，C_4…8時間

Table 1　成形飼料の乾燥時間と水分含有量（%）

乾燥機		乾燥時間				AB	A
段	右左	C_1	C_2	C_3	C_4		
A_1	B_1	4.0	4.5	4.8	5.6	18.9	40.5
	B_2	4.2	4.9	6.0	6.5	21.6	
A_2	B_1	5.7	9.1	10.1	10.0	34.9	70.5
	B_2	8.6	7.2	9.0	10.8	35.6	
A_3	B_1	9.1	10.8	8.7	11.3	39.9	91.9
	B_2	11.5	12.7	13.1	14.7	52.0	
A_4	B_1	3.8	5.3	5.3	6.0	20.4	46.6
	B_2	4.0	7.0	7.5	7.7	26.2	

N：Tatal=32，ABC=1，AB=4，AC=2，BC=4
A=8，B=16，C=8

AC	C_1	C_2	C_3	C_4
A_1	8.2	9.4	10.8	12.1
A_2	14.3	16.3	19.1	20.8
A_3	20.6	23.5	21.8	26.0
A_4	7.8	12.3	12.8	13.7

BC	C_1	C_2	C_3	C_4	B
B_1	22.6	29.7	28.9	32.9	114.1
B_2	28.3	31.8	35.6	39.7	135.4
C	50.9	61.5	64.5	72.6	249.5
mean	6.36±	7.68±	8.06±	9.07±	
SD	2.97	2.96	2.77	3.17	

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	208.13	69.37	82.58	<0.01
B	1	14.14	14.17	15.40	<0.01
C	3	30.18	10.06	10.93	<0.01
A×B	3	9.31	3.10	3.36	>0.05
A×C	9	5.26	0.58	0.63	>0.05
B×C	3	1.84	0.61	0.66	>0.05
Error	9	8.32	0.93		

A_1：最上段，A_2：3段．A_3：7段，A_4：最下段（10段中）
B_1：右側，B_1：左側
C_1：14時間乾燥飼料，C_2：12時間，C_3：10時間，C_4：8時間

切り，乾燥終了時が同一となるよう前頁の図に示す通りに各乾燥時間の成形飼料（C_1, C_2, C_3, C_4）を．予め加温した乾燥機に順次入れ（乱魂法)[1]，乾燥させた．なお，10段2列の飼料受皿には 40 kgの成形飼料が均等に配分され，上記の段のもの以外はすべて14時間乾燥とし水分の測定は行なわなかった．試験飼料の水分含有量は余熱時間終了後に測定した．

結果は Table 1に示すようで，乾燥時間（C），段（A），右左（B）の関係を分析すると[2]，

まず，段（A）によってかなりの差が認められ，最上段が最もよく乾燥し，次いで最下段，第3段，第7段の順であり（$P<0.01$），右左（B）では右側の方がよい乾燥度を示し（$P<0.01$），乾燥時間（C）では当然ながら14時間が最もよく，平均水分含有量は6.36±2.97%であり，12時間では7.68±2.96%，10時間では8.06±2.77%，8時間では9.07±3.17%であった（$P<0.01$）．

段，右左，乾燥時間の相互関係で水分含有量に差の生ずることがわかった．

4. 飼料水分含有量とラットの飼育効率について

3.で製造した 14, 12, 10 および8時間乾燥飼料を用い，ラットの飼料摂取量およびコボシ量，飲水量，発育量，食餌効率を測定した．

ラットは JCL：SD 系4週齢のものを購入，一匹飼いステンレス網ケージに収容し1週間環境順化させた後雌雄（B）それぞれ8匹をえらび，各飼料にそれぞれ2匹を割り当て，さらに表のように各週（A）ごとにこれらのラットに次の飼料（C）を順次割り当てた（交叉試験）．

週 / 餌	A_1(1)	A_2(2)	A_3(3)	A_4(4)
C_1(14)	a[1)]	b	c	d
C_2(12)	b	c	d	a
C_3(10)	c	d	a	b
C_4(8)	d	a	b	c

（ ）週数，餌料乾燥時間 [1)] 雄ラット（B_1），雌ラット（B_2）それぞれ2匹

各飼料は各週の始めより当該ラット群に与え最初3日間を各飼料への順化と前週の餌料の影響除去期間と考え4日目よりの4日間における飼料摂取量，ケージ受皿への飼料コボシ量，飲水量，体重増加量および食餌効率（体重増加量（g）／飼料摂取量（g）×100）を測定し，飼料別(C)，性別(B)，試験日(A)の三元配置の解析法により分散分析を行ない検討した[2]．

Table 2 餌量摂取量（4日間 g）

飼料(C)	性B	試験日(A) A_1	A_2	A_3	A_4	BC	C
C_1	B_1	70.5	86.6	106.1	110.9	751.6	1303.3
		78.5	92.9	99.5	106.6		
	B_2	61.2	55.6	68.2	75.9	551.7	
		67.9	70.3	71.3	81.3		
C_2	B_1	79.2	98.7	102.6	105.1	742.9	1288.3
		71.0	90.1	100.9	95.3		
	B_2	58.3	56.9	69.3	75.3	545.4	
		64.4	63.3	74.6	83.3		
C_3	B_1	103.7	96.1	81.1	114.8	767.8	1295.3
		90.5	83.2	104.6	93.8		
	B_2	66.8	68.9	55.4	66.7	527.5	
		68.0	64.2	63.8	73.7		
C_4	B_1	92.5	101.6	97.9	100.7	766.9	1320.3
		88.2	86.7	93.4	105.9		
	B_2	61.1	63.9	72.2	61.8	553.4	
		66.7	91.7	69.7	66.3		
A		1188.5	1270.7	1330.6	1417.4	Sum	5207.2

A_1：第1週，A_2：第2週，A_3：第3週，A_4：第4週
B_1：雄ラット2匹，B_2：雌ラット2匹
C_1：14時間乾燥飼料，C_2：12時間，C_3：10時間，
C_4：8時間
N：Total=64. ABC=2, AB=8, AC=4, BC=8
A=16, B=32, C=16,
（以上 Table 3, 4, 5, 6に共通）

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	1749	583.2	10.75	<0.01
B	1	11321	11321.0	208.72	<0.01
C	3	35	11.8	0.22	>0.05
A×B	3	318	106.2	1.96	>0.05
A×C	9	1221	135.7	2.50	<0.05
B×C	3	72	24.1	0.44	>0.05
A×B×C	9	598	66.5	1.23	>0.05
Error	32	1735	54.2		

結果は Table 2～6に示す通りである．

飼料摂取量には差を認めることができなかった．しかし飼料(C)×試験日(A)（交互作用）に有意性（$P<0.05$）が認められたが，これは一つのラット群に特に多食のものが含まれていたためと考えられる（Table 2）．

飼料コボシ量は飼料間に差を認められなかった

Table 3　飼料コボシ量（4日間 g）

飼料(C)	性(B)	試験日(A) A_1	A_2	A_3	A_4	BC	C
C_1	B_1	9.5	10.4	11.9	9.1	78.4	126.8
		6.6	11.1	8.5	11.3		
	B_2	5.8	5.5	7.8	4.1	48.4	
		6.2	6.7	4.7	7.6		
C_2	B_1	10.8	11.3	7.4	9.9	79.1	137.8
		9.0	8.9	11.1	10.7		
	B_2	5.7	7.1	4.8	11.7	58.7	
		6.6	5.7	7.5	9.6		
C_3	B_1	10.5	7.4	12.0	9.2	80.8	129.5
		6.8	11.3	10.6	13.0		
	B_2	5.9	5.1	7.9	4.2	48.7	
		5.3	6.3	7.3	6.7		
C_4	B_1	8.3	8.7	7.9	9.2	76.0	128.6
		9.5	8.8	13.4	10.2		
	B_2	6.2	5.1	4.7	7.3	52.6	
		8.0	6.8	8.2	6.3		
A		120.7	126.2	135.7	140.1	Sum	522.7

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	14.60	4.86	1.62	>0.05
B	1	175.23	175.23	58.30	<0.01
C	3	4.46	1.48	0.49	>0.05
A×B	3	3.13	1.04	0.34	>0.05
A×C	9	18.55	2.06	0.68	>0.05
B×C	3	5.65	1.88	0.62	>0.05
A×B×C	9	25.44	2.82	0.94	>0.05
Error	32	96.17	3.00		

Table 4　飲水量（4日間 g）

飼料(C)	性(B)	試験日(A) A_1	A_2	A_3	A_4	BC	C
C_1	B_1	161	135	284	302	1504	2968
		159	139	135	189		
	B_2	106	118	191	358	1464	
		112	102	181	296		
C_2	B_1	157	286	276	161	1471	2779
		126	130	116	219		
	B_2	120	107	289	235	1308	
		106	137	191	126		
C_3	B_1	184	182	159	206	1386	2667
		142	187	149	123		
	B_2	179	210	176	225	1281	
		116	109	108	158		
C_4	B_1	204	207	165	180	1392	2713
		137	141	204	154		
	B_2	107	225	214	172	1321	
		144	223	112	124		
A		2260	2635	2950	3282	Sum	11127

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	35769	11923	4.126	<0.05
B	1	2244	2244	0.777	>0.05
C	3	1433	477	0.165	>0.05
A×B	3	5402	1800	0.623	>0.05
A×C	9	60911	6768	2.342	<0.05
B×C	3	2373	791	0.274	>0.05
A×B×C	9	17356	1928	0.667	>0.05
Error	32	92480	2890		

(Table 3).

飲水量も飼料間に有意な差は認めなかった．しかし飼料摂取量の場合と同様C×Aに有意性（$P<0.05$）が認められた．これも同一のラット群が多飲の傾向をもっていたためと考えられる（Table 4）．

体重増加量も飼料間に有意の差ありとは認められなかったが，水分含有量の少ない飼料ほど増加量が大きい傾向がみうけられた（Table 5）．

（飼料摂取量は週齢とともに漸増しているにかかわらず，体重増加量には，Table 5 A 欄に示されるように，週単位の大小のリズムの存在が感じられた）．

食餌効率は，明らかに水分含有量の低い飼料の方が高かった（$P<0.05$）（Table 6）．

5. 自家製固型飼料と同一の飼料原末より工場生産された市販飼料とによるラットの飼育効率について

クレアCE－2粉末飼料を原末とした自家製12時間乾燥固型飼料と工場生産固型飼料とを，個別飼いステンレス網ケージにて飼育の JCL：SD 系ラット5週齢のものそれぞれ10匹に与え，その摂取量およびコボシ量，飲水量，体重増加量および食餌効率を5週にわたって測定し比較した．

結果は Table 7 および Fig. 4 に示す通りで，摂取量は第1週において自家製造飼料群が多かった（$P<0.05$）が，以降は全く差は認められなかった．

飼料コボシ量は各週を通じて自家製飼料群の方が大

Table 5 体重増加量（4日間 g）

飼料(C)	性(B)	試験日(A) A_1	A_2	A_3	A_4	BC	C
C_1	B_1	35	28	39	29	254	375
		38	27	29	29		
	B_2	19	13	15	13	121	
		24	10	20	7		
C_2	B_1	25	29	39	26	241	368
		38	23	42	19		
	B_2	17	8	18	15	127	
		18	9	24	18		
C_3	B_1	37	28	30	29	238	351
		32	27	36	19		
	B_2	20	14	11	7	113	
		17	12	19	13		
C_4	B_1	38	31	32	20	234	335
		33	24	33	23		
	B_2	13	9	17	9	101	
		17	11	14	11		
A		421	303	418	287	Sum	1429

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	977	325.7	22.98	<0.01
B	1	3984	3984.7	281.21	<0.01
C	3	60	20.1	1.41	>0.05
A×B	3	58	19.4	1.36	>0.05
A×C	9	170	18.9	1.33	>0.05
B×C	3	15	5.0	0.35	>0.05
A×B×C	9	108	12.0	0.85	>0.05
Error	32	453			

Table 6 食餌効率

飼料(C)	性(B)	試験日(A) A_1	A_2	A_3	A_4	BC	C
C_1	B_1	49.7	32.3	36.8	26.1	278.7	470.8
		48.4	29.1	29.1	27.2		
	B_2	31.0	23.4	22.0	17.1	192.1	
		35.4	14.2	28.1	20.9		
C_2	B_1	31.6	29.4	38.0	24.7	263.8	448.9
		53.5	25.5	41.2	19.9		
	B_2	29.2	14.1	26.0	19.9	185.1	
		27.9	14.2	32.2	21.6		
C_3	B_1	35.7	29.1	37.0	25.3	249.6	430.1
		35.4	32.1	34.4	20.3		
	B_2	30.0	29.0	19.9	10.5	180.5	
		25.5	18.7	29.8	17.6		
C_4	B_1	41.1	30.5	32.7	19.8	246.2	394.7
		37.4	27.7	35.3	21.7		
	B_2	21.3	14.8	23.1	14.6	148.5	
		25.5	12.0	20.1	16.6		
A		558.1	376.4	486.2	323.8	Sum	1744.5

変動因	自由度	平方和	分散	分散比	P
A	3	2098	699.3	37.45	<0.01
B	1	1723	1723.2	92.28	<0.01
C	3	194	65.0	3.47	<0.05
A×B	3	132	44.0	2.35	>0.05
A×C	9	330	36.7	1.96	>0.05
B×C	3	27	9.2	0.49	>0.05
A×B×C	9	95	10.5	0.56	>0.05
Error	32	597			

で，第4週ではその差が有意と認められた．

飲水量は各週を通じて自家製飼料群の方がやや大きい値を示し，飼料の水分含有量の差を反映するようにみえたが，有意とは認められなかった．

体重増加量も有意な差はみられなかった．

食餌効率は第1週において有意に工場生産飼料の方が大であったが，以降の各週では有意差は認められず，また各週を通して分散分析を行なったが差は検出できなかった．

ラットの発育曲線は Fig. 4 に示すように，ほとんど差を認めることはできなかった．

6. 固型飼料製造各工程における細菌の消長について

動物実験特に長期にわたる毒性試験において動物の感染については最も意を用いるところで，この防禦について各種の方策が用いられている．現在の管理された飼料よりの感染については，一般的に所謂腸内通過菌で，発症することはないと考えられている．しかし，無菌動物，ノートバイオート動物はいうに及ばず所謂 SPF 動物を barrier system 下に飼育する場合，多くは飼料を加熱あるいは放射線等により完全殺菌したものが用いられる．しかし，薬物添加飼料を用いる場合は，殺菌操作によって添加物の分解あるいは変性のおそれがあるので，一様に殺菌操作を行なえない事情がある．そこで，固型飼料製造各工程の細菌を調べ，今後の製造および使用に当っての問題点を検討した．

飼料原末，原末と水混合物（原末 1,000 g に水350

Table 7　同一原料より製造した自家製飼料と市販工場生産飼料とによるラット飼育効率

週	飼料[a)]	摂飼量(A) g／4日	飼コボシ量 g／4日	飲水量 g／4日	体重増加量(B) g／4日	食餌効率 A／B×100
1	E	60.9±2.9[b)]	8.3±2.5	104.8±15.8	33.5±1.5	55.1±3.1
	C	57.9±3.3*	7.6±2.1	103.3±15.7	34.7±1.6	60.1±3.2*
2	E	83.3±4.6	10.2±1.8*	131.2±11.6	33.6±3.6	40.6±3.2
	C	83.5±4.8	8.0±1.6	127.9±19.9	35.0±3.6	41.9±4.1
3	E	94.4±5.3	10.3±2.7**	153.4±32.3	27.2±5.1**	28.8±5.6**
	C	92.7±6.0	8.5±1.2	145.3±24.3	29.7±2.5	32.1±2.2
4	E	98.1±6.0	10.6±2.0*	162.8±32.6**	30.3±3.6	31.0±4.0
	C	98.5±4.9	8.6±1.7	149.3±21.0	29.6±3.4	30.1±3.4
5	E	96.3±9.2	10.1±2.1	183.6±55.9	24.1±5.7	24.8±5.0
	C	95.0±6.7	8.5±1.5	180.6±54.5	22.6±3.9	23.7±3.1

a) E：自家製飼料，C：市販工場生産飼料　　*：E vs C 平均値 $P<0.05$
b) ラット10匹の平均値±SD　　**：E vs C 分　散 $P<0.05$

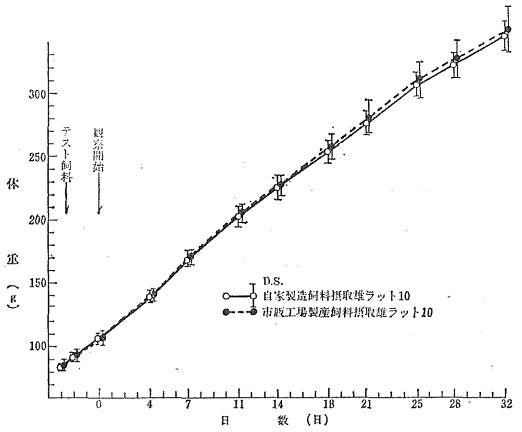


Fig. 4　自家製飼料と市販工場製飼料によるラット発育曲線

m*l* の割に加え混合機にて攪拌），乾燥前成形飼料，50°—12時間乾燥した飼料，製造室に放熱のため24時間置いた乾燥飼料，ビニール袋に密封して1週，2週および3週保存した飼料について，その数ヵ所より1gを採取し，水道水は1分間以上放流後のものを0.2 m*l* 採取し，混合機および成形機（ホッパー部と圧縮部）は数ヵ所の 5 cm 平方を生理食塩水で湿らせたガーゼでふきとり，9 m*l* の生理食塩水で洗滌し，それを原液とし，法に従って20～48時間，37° で培養した．使用した培地は血液寒天培地，DHL寒天培地（腸内細菌類），ポテトデキストロース培地（真菌類），マンニット食塩培地（ブドー球菌）である．

結果は Table 8 に示す通りである．血液寒天培地での菌数は原末より乾燥まで変動は認められなかったが，乾燥後放熱のため製造室に放置した時点で採取個所により菌数の多いものがみられた．保存においては菌数の増減はないようであった．水道水では検出されず，機械部分では小数ながら検出されたので今後消毒方法を工夫する必要がある．

DHL寒天培地では，原末において極く少ないが検出され，以降の飼料製造工程でも同数のものが検出された．なお，水および機械部分では検出されなかった．

ポテトデキストロース培地では，乾燥前の成形飼料とこれ以降の工程で僅かに検出された．

マンニット食塩培地では，混合機において検出され，以降の製造飼料ですべて検出された．ここでも製造機の消毒管理に工夫の必要が認められた．

ここで製造した飼料と同一原末から工場生産された固型飼料（クレアCE—2）を検索した結果は Table 8 の最下段に示した通りで，血液寒天では，自家製造飼料より菌数はやや少なく，他の培地では全く検出されず，集落の形態から大部分の菌がグラム陽性の桿菌，Bacillus であろうと考えられた．

工場生産の方式は詳らかではないが，製造工程において高圧蒸気による加湿，圧縮成形過程で発生する高熱，乾燥時の高温等に加え閉鎖的に大量生産されることが自家生産飼料よりきれいである原因の一つと考えられる．

目的が添加飼料の製造にあるので各工程で高温をさけることは絶体条件であり，消毒殺菌のための薬物が少しでも飼料に混入することは許されない．今後は，飼料原末の殺菌を考えるとともに，製造従事者を含め

Table 8 飼料製造工程における細菌の消長

製造工程	培地			
	血液寒天	DHL寒天（腸内細菌類）	マンニット食塩（ブドー球菌）	ポテトデキストロース（真菌類）
飼料原末（g）	4.63±0.13[a]	1.85±0.22	N	N
水道水（0.2 ml）	N[b]	N	N	N
混合機（25 cm²）	2.31±0.48	N	0.98±1.38	N
原末・水混合（g）	4.52±0.10	1.00±1.41	3.85±0.11	N
成形機 ホッパー（25 cm²）	N	N	N	N
成形機 圧縮部（25 cm²）	1.77±2.50	N	N	N
成形飼料（乾燥前）（g）	4.53±0.09	1.57±2.21	3.72±0.04	0.85±1.20
乾燥飼料（g）	4.43±0.11	0.85±1.20	3.70±0.56	0.85±1.20
製造室放置（g）	4.92±0.54	1.00±1.41	3.89±0.16	N
保存 1週（g）	4.51±0.07	N	3.24±0.08	0.85±1.20
保存 2週（g）	4.56±0.14	0.85±1.20	3.90±0.97	N
保存 3週（g）	4.79±0.26	0.85±1.20	3.09±0.12	N
クレアCE—2飼料	4.01±0.23	N	N	N

a) 対　数　　b) 検出せず

た製造全工程の細菌学的管理に一層の工夫を加える必要がある．

まとめ

毒性試験に必要な試料添加固型飼料を自家製造するに当って基礎となる，製造装置の性能，製造上の問題点，製造した飼料特に水分含有量の差によるラットの飼育効率，製造全工程における細菌の消長について検討し，同一原料により工場生産された市販飼料とによるラット飼育効率を比較した．

1. 固型飼料製造に当っての原料末への加湿度は30％が最適であった．

2. 飼料成形時の長さは 16 cm から 28 cm の間に分布し，平均 2.2 cm であり，温度は30°から38°で，平均33.7°であった．

3. 乾燥温度を（平均）50°とし，乾燥時間を 14，12，10および8時間とした場合の飼料中水分含有量の平均は6.36％，7.68％，8.06％および9.07％であったが，乾燥機内の位置により変動が大きかった．

4. 乾燥度の高い飼料の方がラットの食餌効率が良かった．

5. 飼料製造工程中，細菌の混入があったと考えられ，今後細菌学的管理について工夫する必要が認められた．

6. 市販飼料と比較して，自家製飼料はラット摂餌時のコボシ量が多かったが，発育その他には差を認めなかった．

文献

1) 佐藤　信：推計学の手ほどき　7版(昭和44年) 南江堂，東京

2) 五十嵐俊二：臨床薬理，1，59—63（1970）

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 535 — 539, 1974

急性毒性に関する研究（第2報）* 亜硝酸塩（Na, K）ならびに硝酸塩（Na, K）の急性毒性の比較検討

市川久次** 小林博義** 矢野範男** 神谷信行**
吉田誠二** 平賀興吾**

Studies on Acute Toxicites (II) Comparison of Acute Toxicities of Nitrite (Na, K) and Nitrate (Na, K)

HISATSUGU ICHIKAWA**, HIROYOSHI KOBAYASHI**, NORIO YANO**, NOBUYUKI KAMIYA**, SEIJI YOSHIDA** AND KOGO HIRAGA**

Acute oral toxicities of nitrites (Na, K) and nitrates (Na, K) were examined and compared in mice (ddY/S and JCL-ICR) and in rats (Wistar, SLC-Wistar (SPF) and JCL-SD), and the following results were obtained.

1) LD_{50} values of nitrites (Na, K) were significantly differed from each other and sodium salt is stronger than potassium salt.

2) LD_{50} values of nitrates (Na, K) were significantly differed from each other and potassium salt was stroger than sodium salt.

3) Degree of acute oral toxicities of nitrites and nitrates were moderately toxic (nitrites) and slightly toxic (nitrates) following the classification by Hodge *et al.*

4) Sience slopes of dose-lethal rate curves (slope function by Litchfield *et al.*) of nitrites(Na, K) were nearly equal, but those of nitrates (Na, K) were different from each other considerably, it is appeared that the lethal action of nitrites depends on the common factor, nitrite ion, and that of nitrates depends on uncommon factors, sodium ion or potassium ion.

要　約

亜硝酸塩（Na, K：昭和45年5月29日削除）ならびに硝酸塩（Na, K）は，ハム，ソーセージ等の肉の発色剤として食品添加物公定書に掲載され，使用が許可されている．しかしその安全性については発癌等の問題より再び注目されつつある[1]．著者らはこれまで多くの化合物について急性毒性の検討を行ってきたが，食品添加物公定書注解の毒性の項によると，亜硝酸塩ならびに硝酸塩いづれにおいても，Na 塩とK塩の間に差はないものと解釈しても，さしつかえないように記載されているが，今回著者らの行なった実験結果より，明らかにそれらの急性毒性（LD_{50} 値）に差異があり，しかもその強弱が亜硝酸塩と硝酸塩（Na, K）において逆転することを見い出した．さらに加えて，系統の異なる動物を使用し検討を加え急性毒性（LD_{50} 値）の差異について若干の考察を加えたので報告する．

実験材料ならびに実験方法

1) 試験化合物

亜硝酸ナトリウム，亜硝酸カリウム，硝酸ナトリウム，硝酸カリウム（和光純薬，国産化学製の JIS 規格試薬特級）

2) 実験動物

ラット：船橋農場生産 Wistrar 系ならびに静岡県実験動物農業協同組合および日本クレアにおいて

* 合成洗剤の毒性に関する研究（I）を急性毒性に関する研究（第1報）とする．

** 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
** Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

barrier system 下に生産された (SPF) SLC-Wistar および JCL-SD 系の雌雄を使用した.

マウス：静岡県実験動物農業協同組合生産の ddY/S ならびに日本クレア生産の JCL-SD 系雌雄を使用した. 動物は室温25±1°C, 湿度55—65%, 照明を午前6時より午後6時までに制御した環境下で JCL—生産動物については日本クレア製固型飼料CE—2, 他は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.

3) 実験方法：試料の投与用量は公比1.12～1.2の割合で, 増量し, 5～10用量を用いた. 各用量 (有効成分量) は投与容量が 10 or 15 ml/kg となるように精製水に溶解し, 胃ゾンデにて経口投与した.

動物は一群 (一用量) 8～10匹とし, 実験前日の午後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時間後再び餌を与えて以後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, Lichfield and Wilcoxson[2] 法により50%致死量 (LD_{50} 値) を算定するとともに, 用量致死率勾配 (Slope function), 信頼限界 (Confidence limits) についても算出し, さらに異なる物質を同時に投与した場合には, 用量致死率直線の勾配ならびに LD_{50} 値の有意差 ($p=0.05$) の検定を行った.

実験結果

亜硝酸ナトリウム ($NaNO_2$), 亜硝酸カリウム (KNO_2), 硝酸ナトリウム ($NaNO_3$), 硝酸カリウム (KNO_3) の経口急性毒性 (LD_{50} 値) について, マウスならびにラットを用いて検討し, 次の結果を得た.

1) マウスにおける亜硝酸ナトリウム ($NaNO_2$), 亜硝酸カリウム (KNO_2) の経口急性毒性 (LD_{50} 値)

Table Ⅰに示した如く, 亜硝酸ナトリウムの方が亜硝酸カリウムよりも LD_{50} 値が小さい. すなわち急性毒性が強いことが認められた. とくに, 同時投与にて得た, ○印 (246 mg/kg と 299 mg/kg) ならびに△印 (283 mg/kg 327 mg/kg) とには有意なる差異があることが統計的にも確認され, マウスにおいては亜硝酸塩 (Na, K) の経口急性毒性 (LD_{50}値) には差異のあることを認めた.

2) ラットにおける亜硝酸ナトリウム ($NaNO_2$) と亜硝酸カリウム (KNO_2) の経口急性毒性 (LD_{50}値)

Table Ⅱに示したごとく, 亜硝酸ナトリウムの方が亜硝酸カリウムよりも急性毒性 (LD_{50}値) が強いことが認められ, とくに同時投与にて得た○印(128と173) △印 (128と176), □印 (66と95) ならびに×印 (70と113) においては, それぞれ有意なる差 ($p<0.05$) があることが確認され, ラットにおいても亜硝酸塩の経口急性毒性 (LD_{50}値) に差異があることを認めた. さらに体重との関係については亜硝酸ナトリウム, 亜

Table Ⅰ Acute Toxicity Study of Nitrite in Mice[a)]

Material	SEX	Mean B.W. ±S.D. (g)	Slope function[b)]	LD_{50} mg/kg B.W. (p.o.)	Confidence limits at p=0.05 (mg/kg B.W.)
$NaNO_2$	♂	23.90±1.56	1.302	246 ○	223.8—270.4
	♀	20.14±1.42	1.365	283 △	257.3—311.3
	♂	29.39±1.92	1.353	260	234.2—288.6
	♀	24.39±1.80	1.353	260	234.2—288.6
	♂	30.28±1.53	1.201	250	231.5—270.0
	♀	24.74±1.34	1.201	260	240.7—280.0
	♂	30.30±2.43	1.228	220	188.0—254.9
	♀	27.35±3.57	1.313	220	196.4—246.4
KNO_2	♂	23.78±1.48	1.234	299 ○	274.1—326.2
	♀	19.93±1.59	1.198	327 △	303.6—352.2
	♂	25.32±1.55	1.271	330	292,3—372.6
	♀	20.93±1.22	1.220	339	306.5—374.9
	♂	27.28±2.14	1.177	302	282.4—323.0
	♀	21.86±1.36	1.285	318	290.8—347.8

a) : ddY/S strain ○, △ : simultaneously administration and significantly ($p<0.05$)
b) : A factor of slope of dose-lethal rate curve

Table Ⅱ Acute Toxicity Study of Nitrite in Rats[a)]

Material	SEX	Mean B.W. ±S.D. (g)	Slope function[c)]	LD_{50} mg/kg B.W. (p.o.)	Confidence limits at p=0.05(mg/kg B.W.)
$NaNO_2$	♂	142.02± 7.11	1.206	128 ○	114.1—143.6
	♀	116.78± 8.02	1.206	128 △	114.1—143.0
	♂	176.76±17.41	1.228	95	86.0—105.5
	♀	126.66± 9.07	1.228	95	86.0—105.5
	♂	192.33±18.24	1.133	94	88.2—100.1
	♀	121.52±10.59	1.150	96	89.9—102.4
	♂	364.08±56.74	1.200	75	68.5— 82.1
	♀	197.82±25.61	1.215	74	67.3— 81.4
	♂	453.81±12.09	1.254	66 □	55.9— 77.9
	♀	233.52±11.65[b)]	1.225	70 ×	57.1— 85.8
KNO_2	♂	131.25±11.74	1.302	154	136.3—174.0
	♀	105.19± 6.68	1.202	172	158.1—187.1
	♂	143.40± 9.72	1.177	173 ○	158.8—187.3
	♀	118.80± 8.82	1.254	176 △	157.1—179.1
	♂	159.57±10.57	1.161	148	136.0—161.0
	♀	120.02± 6.81	1.232	153	136.0—172.1
	♂	451.00±11.79	1.274	95 □	77.7—116.2
	♀	241.84±4.69[b)]	1.212	113 ×	93.2—137.0

a) : Wistar b) : SLC-Wistar

○, △, □, × : simultaneously administration and significantly ($p<0.05$)

c) : A facior of slope of dose-lethal rate curve

硝酸カリウムともに体重が大きくなると急性毒性は強く (LD_{50}値が小) なる傾向が認められた. また, マウスにおいてもラットにおいても亜硝酸塩 (Na, K) においては, 用量致死率直線の勾配 (Slope function) ほぼ一致していた.

3) マウスにおける硝酸ナトリウム ($NaNO_3$) と硝酸カリウム (KNO_3) の経口急性毒性 (LD_{50}値)

Table Ⅲに示したごとく, 硝酸カリウムの方が硝酸ナトリウムより急性毒性 (LD_{50}値) の強いことが認められ, 亜硝酸塩において得た結果 (急性毒性の強さ Na 塩>K塩) とは逆の結果を得た. とくに同時投与によって得た○印 (4760と3400), △印 (500と2770) □印 (5200と3400) ならびに×印 (5200と3850) においては有意なる差 ($P<0.05$) があることが確認され, マウスにおいて硝酸塩の経口急性毒性 (LD_{50}値) に差異のあることが認められた. さらに有意なる差異こそ認められないが, 薬物の作用の質の差異を意味する用量致死率直線の勾配(Slope function)についてみると, 明らかに硝酸カリウムの方が硝酸ナトリウムよりもつねに大である傾向が認められ, マウスの場合, 硝酸塩 (Na, K) においては急性毒性 (LD_{50}値) に差異があること, ならびにそれらの致死作用の質において若干差があることを推定させる結果を得た.

4) ラットにおける硝酸ナトリウム ($NaNO_3$) と硝酸カリウム (KNO_3) の経口急性毒性 (LD_{50}値)

Table Ⅳに示したごとく, マウスにおいてと同様に, 硝酸カリウムの方が硝酸ナトリウムよりも急性毒性 (LD_{50}値) が強いことが認められ, ラットにおいても亜硝酸塩で得た結果 (Na 塩>K塩) とは逆結果が得られた. とくに同時投与により得た, ○印 (2900と2100), △印 (2790と2120), □印 (4,000と2850) ならびに×印 (3900と2850) ☆印 (2875と2375) においては有意なる差異 ($p<0.05$) があることが確認され, ラットの硝酸塩の経口急性毒性 (LD_{50}値) に差異のあることを認めた. しかしながら, Table Ⅲのマウスにおいて認められたような Slope function の差異はラットにおいてはほとんど認められなかった.

考 察

亜硝酸塩 (Na 塩ならびにK塩：昭和45年に削除), 硝酸塩 (Na 塩ならびにK塩) は食品添加物公定書に掲載され, 使用が許可されているが, その毒性の項を食品添加物公定書注解にて見ると, マウス, ラットに

Table Ⅲ Acute Toxicity Study of Nitrite in Rats[a)]

Material	SEX	Mean B.W. ±SD., (g)	Slope function[c)]	LD_{50} mg/kg B.W. (p.o.)	Confidence limits at p=0.05(mg/kg B.W.)
$NaNO_3$	♀	20.38±1.19	1.210	4700	4177−5286
	♂	25.05±1.54	1.119	4760○	4542−4988
	♀	21.07±1.72	1.295	5000△	4690−5330
	♂	39.17±0.47	1.168	5200□	4763−5768
	♀	28.55±0.50[b)]	1.168	5200×	4763−5768
KNO_3	♂	23.62±1.54	1.471	2750	2400−3160
	♀	20.51±1.12	1.310	2750	2142−3097
	♂	25.73±1.60	1.200	2520	2220−2860
	♀	21.36±1.46	1.321	2840	2598−3104
	♂	29.19±1.94	1.466	2770○	2370−3240
	♀	22.90±1.31	1.466	2770△	2450−3130
	♂	41.40±0.49	1.396	3400□	2815−4106
	♀	28.97±0.5[b)]	1.350	3850×	3249−4563

a) : ddY/S Strain b) : JCL-ICR Strain

○, △, □, × : simultaneavsly administration and significantly ($P<0.05$)

c) : A factor of slope of dose-lethal rate curve

Table Ⅳ Acute Toxicity Study of Nitrite in Rats[a)]

Material	SEX	Mean B.W. ±S.D. (g)	Slope function[c)]	LD_{50} mg/kg B.W. (p.o.)	Confidence limits at p=0.05(mg/kg B.W.)
$NaNO_3$	♂	116.42± 8.27	1.166	2900○	2688−3135
	♀	117.24± 4.47	1.149	2790△	2423−3206
	♂	142.02±14.29	1.253	2875☆	2562−3226
	♀	120.22±15.58	—	<3030	—
	♂	160.70± 6.33	1.245	4480	4010−5010
	♀	119.51± 5.44	1.208	3800	3450−4180
	♂	264.95± 2.83	1.259	4000□	3413−4688
	♀	178.32± 1.76[b)]	1.241	3900×	3225−4715
KNO_3	♂	149.8±25.16	1.253	2375☆	2072−2722
	♀	114.0± 4.72	1.379	2100	1721−8562
	♂	155.65±9.58	1.22	3350	3020−3710
	♂	122.0 ±7.76	1.23	2780	2150−3580
	♂	105.32±7.76	1.207	2120○	1927−2332
	♀	117.02±4.14	1.207	2120△	1927−2332
	♂	275.6 ±2.38	1.270	2850□	2417−2360
	♀	179.7 ±2.28[b)]	1.240	2850×	2758−3712

a) : Wistar b) : JCL—SD

○, △, □, ×, ☆ : simultaneously administrtion and significantly ($p<0.05$)

c) : A factor of slope of dose-lethal rate

ついては亜硝酸塩の経口 LD_{50} はマウス 220 mg/kg，マウス（雌）175 mg/kg，ラット 85 mg/kg（硝酸ナトリウムの項），硝酸塩については，ラットに対する経口 LD_{50}は3.236 mg/kg，亜硝酸ナトリウムおよび硝酸カリウム参照のこと（硝酸ナトリウムの項）と記載されており，亜硝酸塩，硝酸塩のそれぞれナトリウム塩とカリウム塩は同様に取扱れているが，今回著者らの行った実験より，Table Ⅰ. Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ に示したごとく，経口急性毒性（LD_{50}値）について，亜硝酸塩においては，マウス，ラットともに有意なる差異があり（$p<0.05$），その強弱は，Na 塩の方がK塩よりも強い（Na＜K）という結果が得られたのに対し，硝酸塩においては，マウス，ラットともに同じ傾向ではあるが，亜硝塩とは逆にK塩の方が Na 塩よりも強い（K＜Na）という結果を得た．このことから，単に Na 塩と K 塩の違いというだけにうけとらず，安易に取扱うべきことは避けなければならないといえる．

前報[3]において，著者らは体重と急性毒性（LD_{50} mg/kg B.W.）の関係について，逆比例の関係があることを明らかにしたが，今回行った実験結果においても，TableⅡに示したごとく，亜硝酸ナトリウムにおいて，同様な関係が認められた．急性毒性（LD_{50}値）の表示の方法を現在は重量法 mg/kg で表わしているが，この点についてはさらに詳細なる検討，考按を要する問題点であると考えられる．

亜硝酸塩（Na, K）ならびに硝酸塩（Na, K）の経口急性毒性の強弱の傾向は，動物の種差，系統差という観点からみても，マウスとラットの間，ddY/S 系と JCL-ICR 系あるいは Wistar と JCL-SD 系との間に差異はないものと考えられる．一方，Hodge ら[4]の経口毒性の分類によれば，亜硝酸塩は中等度の毒性，硝酸塩は小程度の毒性をもつということができよう．

亜硝酸塩においては，Na 塩とK塩の間に用量致死率直線の勾配（Slope function）にほとんど差がなく，ほぼ一致していたのに対し，硝酸塩においては，TableⅢに示したごとく，特にマウスにおいて，有意差こそ検出されなかったが，Na 塩とK塩の間に（K＞Na という傾向をもって）かなりの差が認められ，このことから，亜硝酸塩の致死作用は共通の因子である NO_2^- が作用しているものと考えられ，化学量論的に考察すれば，急性毒性の強弱が Na＞K であることは容易に推察できる．一方硝酸塩の場合には，その致死作用が非共通の因子である，Na^+ と K^+ にもとづいているものと推察できる．

結　論

亜硝酸塩（Na, K），硝酸塩（Na, K）について，マウスならびにラットを用いて，その経口急性毒性について比較検討し，次の結論を得た．

1. 亜硝酸塩（Na, K）の経口急性毒性（LD_{50}値）には，マウス，ラットともに差異があり，その強弱は亜硝酸ナトリウムの方が亜硝酸カリウムよりも強かった（$NaNO_2 > KNO_2$）（$p<0.05$）

2. 硝酸塩（Na, K）の経口急性毒性（LD_{50}値）には，マウス，ラットともに差異があり，その強弱は硝酸カリウムの方が硝酸ナトリウムよりも強かった（$KNO_3 > NaNO_3$）（$p>0.05$）

3. Hodge らの分類における，亜硝酸塩（Na, K）硝酸塩（Na, K）の経口急性毒性の程度は，亜硝酸塩は中等度，硝酸塩は小程度であった．

4. 用量致死率直線の勾配（Litchfield and Wilcoxson らの Slope function）について，亜硝酸塩においては，ほぼ一致したが，硝酸塩（マウス）において，有意差こそ検出されなかかたがかなりの差が認められたことにより，亜硝酸塩においては共通の因子として NO_2^- が作用し，硝酸塩においては非共通因子である Na^+ と K^+ が致死に作用していることを推定した．

文　献

1) Kermode, G. O.: *Scientic American*, 226(3) 15—21 (1972)

2) Litchifield, J. T., J. R., and Wilcoxson, F.: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 66—113 (1947)

3) 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：都衛研年報，24, 397—408 (1973)

4) Hodge, H. C. and Ttener, J. H.: *Am. Ind. Hyg. Assoc., Qurt.* 10, 93—96 (1949)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 541 — 545, 1974

メトヘモグロビン生成を指標とした亜硝酸塩，硝酸塩のNa塩とK塩の毒性の差異

伊川三枝子* 市川久次* 小林博義* 吉田誠二*
中尾順子* 平賀興吾*

Methemoglobin Formation and the Toxicity of Sodium Nitrite, Potassium Nitrite, Sodium Nitrate and Potassium Nitrate

MIEKO IKAWA*, HISATSUGU ICHIKAWA*, HIROYOSHI KOBAYASHI*, SEIJI YOSHIDA*, TOSHIKO NAKAO* AND KOGO HIRAGA*

先の事業月報[1,2]において報告した様に，重量当りで比較した場合，亜硝酸塩（ナトリウム塩とカリウム塩）と，硝酸塩（ナトリウム塩とカリウム塩）の急性毒性試験における LD_{50} 値が塩を形成している金属イオン（ナトリウムとカリウム）の違いによって差があるように考えられた．つまり，亜硝酸塩においては，ナトリウム塩の方がカリウム塩よりも毒性が強く，硝酸塩においてはカリウム塩の方がナトリウム塩よりも毒性が強いとされている．実際に亜硝酸ナトリウム1gは，血中のヘモグロビン1.855gをメトヘモグロビンに変化して，メトヘモグロビン血症をおこす．また生成したメトヘモグロビンは酸素の交換ができなくなるので呼吸機能が悪くなることが知られている．従って多量の亜硝酸塩が一度に投与されて，メトヘモグロビン濃度が高くなると組織呼吸の低下がおこり死亡の原因となる[3]．この実験では，メトヘモグロビンの血中濃度を指標として，亜硝酸塩の毒性の強さを測定し，ナトリウム塩とカリウム塩の間に差があるかどうかを調べた．

硝酸塩の LD_{50} 値は，ラットにおいて2g/kg以上という非常に高い値を示した．人間において知られているナトリウム，カリウムの耐性の違いが示すように，分子中のナトリウムイオン，カリウムイオンそのものの毒性作用が強く働いていると考えられる．塩化ナトリウム，塩化カリウムのラット，マウスにおける急性毒性試験も併せて行った．

また，LD_{50} 値による急性毒性の強さを比較検討する際に，ほとんどの場合（毒性部における今までのデータもしかり）mg(g)/kgというような重量単位で比較している．しかし，ヘモグロビンと反応して死因と考えられるメトヘモグロビンを形成するのは，亜硝酸イオンであるから亜硝酸イオンそのものの濃度を考えるために今までに出された亜硝酸塩および硝酸塩の LD_{50} 値をモル数の単位になおして検討してみた．

実験方法

（Ⅰ） 亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムの経口投与によるメトヘモグロビン生成量と時間の関係

クレアSD系ラットに，亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムを 5.8×10^{-4}mol/kg B.Wづつ経口投与して，その後すぐに，ネンブタール注射液を腹腔注射し麻酔下に薬物投与後一定時間ごとに頸静脈より血液採取下記の方法によりメトヘモグロビン量を測定した．

（Ⅱ） 亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムの投与量とメトヘモグロビン量の関係

クレアSD系ラットに，亜硝酸ナトリウム 0.36×10^{-3}mol/kg B.W，0.72×10^{-3}mol/kg B.W，1.09×10^{-3}mol/kg B.W，1.45×10^{-3}mol/kg. B.W. を経口投与して，ネンブタールを腹腔注射し麻酔下で一定時間後に頸静脈より採血し，メトヘモグロビン量を測定した．亜硝酸カリウムも等濃度に投与し，同様にメトヘ

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

モグロビン量を測定した．

また，赤血球と亜硝酸塩を直接反応させてメトヘモグロビン量測定[4]するために次のようにして赤血球懸濁液を作成した．ラット頸静脈より，クエン酸ナトリウム処理をした注射筒で血液を採取し，2100 g で10分間遠心分離して，血漿はすてる．赤血球は4倍量の isotonic glucose bufter (Krebs original phosphate で glucose の濃度が 12 mM/liter pH 7.4 になるよう調製したもの）で3回洗い，ほぼ同量の isotonic glucose bufter で懸濁させる．この懸濁液 1 ml に亜硝酸ナトリウムを1.5×10^{-3}mol, 5.8×10^{-3}mol, 7.2×10^{-3}mol と加えて 37°C で1時間 incubate する．isotonic glucose bufter で3回洗浄し，その後 isotonic glucose bufter で懸濁して，メトヘモグロビン量を測定した．亜硝酸カリウムも亜硝酸ナトリウムと同量添加してメトヘモグロビンを測定した．

（Ⅲ） 塩化ナトリウムと塩化カリウムの急性毒性試験

○使用動物

・マウス：JCL—ICR マウス

ラット：Wistar 系ラット

○体　重

・マウス：雄—23 g　雌—20 g

・ラット：雄—122 g　雌—111 g

○投与方法

試料の投与用量は公比 1.3(KCl)，1.1(NaCl) の割合で増量し，各用量は投与量がラット，マウスともに 20 ml/kg B.W.となるように精製水に溶解調製し，胃ゾンデにて投与した．

○メトヘモグロビン測定法[5]

クエン酸ナトリウム処理した血液（または赤血球の懸濁液）を200 μl 遠沈管にとり，再蒸留水 550 μl 加えてよく混和し十分に溶血させる．5分後に phosphate buffer 250 μl を加えて再び混合する．30分以内に試験が終らない場合は phosphato buffer を加えた試料を2°C で保存しておく．10000 rpm で15分間遠沈した後，上澄をパスツールピペットで試験管に移す．上澄の600 μl を2つのマイクロキュベットのうちの（Ⅰ）に入れる．マイクロキュベット（Ⅱ）には，上澄50 μl を入れ，ferricyanide-phosphate mixture 550 μl を加えて混和する．この段階でマイクロキュベット（Ⅱ）の全ヘモグロビンはメトヘモグロビンに酸化されている．メトヘモグロビン固有の吸収帯を示す632mμでマイクロキュベット（Ⅰ）と（Ⅱ）の吸光度を測定し，A_1, A_2 とする．次にそれぞれのマイクロキュベットに中性シアン化溶液を 20 μl 加え混合する．メトヘモグロビンにシアン化ナトリウムを加えるとシアンメトヘモグロビンに変り，メトヘモグロビン固有の 632 mμ での吸収は消失する．1分間放置後，再びそれぞれの吸光度を測定し，A_3, A_4 とする．632 mμ における吸光度の差はメトヘモグロビン濃度に比例するので下のような計算式によりメトヘモグロビン量を求める．

$$\frac{A_1-A_3}{(A_2-A_4)\times12}\times100=\text{methemoglobin in percent of total hemoglobin}$$

・試薬（メトヘモグロビン測定）

1. 5％フェリシアン化カリウム溶液・毎月調製
2. Phosphate buffer—0.5M pH 7.2
3. Ferricyanide-Phosphate mixture—5 ％フェリシアン化ナトリウム溶液0.2 ml, phosphate buffer 2.5 ml を加え蒸留水を加えて 10 ml にする．毎日調製．
4. 10%シアン化ナトリウム溶液・毎月調製
5. 中性シアン化溶液—10%シアン化ナトリウム溶液1.0 ml と12%(v/v)酢酸 0.9 ml を混合調製，6時間以内に使用．

実験結果

（Ⅰ） 亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムの経口投与によるメトヘモグロビン量と時間の関係

亜硝酸塩と経口投与したラットのメトヘモグロビン量は，Fig. Ⅰ が示すように，ナトリウム塩においてもカリウム塩においても一時間後にピークがあらわれて，その後徐々に減少した．

（Ⅱ） 亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムの投与量メトヘモグロビンと量の関係

ラットに同モル量の亜硝酸ナトリウム，亜硝酸カリウムを経口投与したメトヘモグロビン量を，投与後一時間で測定した結果を Fig. Ⅱ に示した．

血中のメトヘモグロビン量は，亜硝酸ナトリウム，亜硝酸カリウムとも個体差が大きくばらつきが大きいが，投与量が増加するとメトヘモグロビン量は増加の傾向にある．しかし，メトヘモグロビン生成に関しては，ナトリウム塩とカリウム塩の間に差は認められなかった．

また，ラット赤血球 isotonic glucose buffer 濁液懸に直接亜硝酸塩を添加した場合にも，添加量が増加すればメトヘモグロビン量は増加するが，ナトリウム塩とカリウム塩の差はなかった．（Fig. Ⅲ）

（Ⅲ） 塩化ナトリウムと塩化カリウムの急性毒性試験

マウス，ラットにおける LD_{50} 値は table Ⅰ に示す

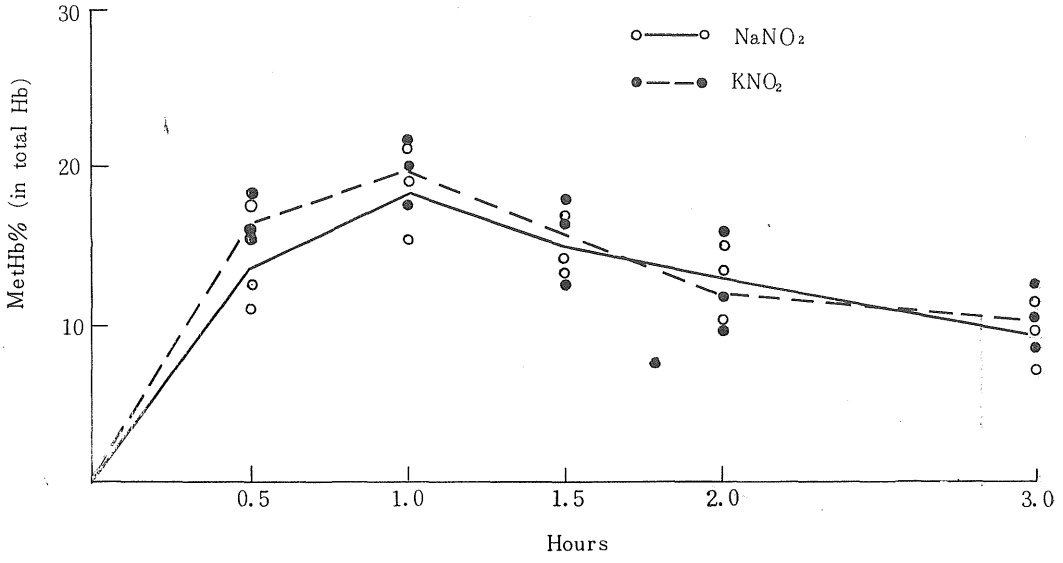


Fig. Ⅰ $NaNO_2$ KNO_2 投与による MetHb 量と時間の関係

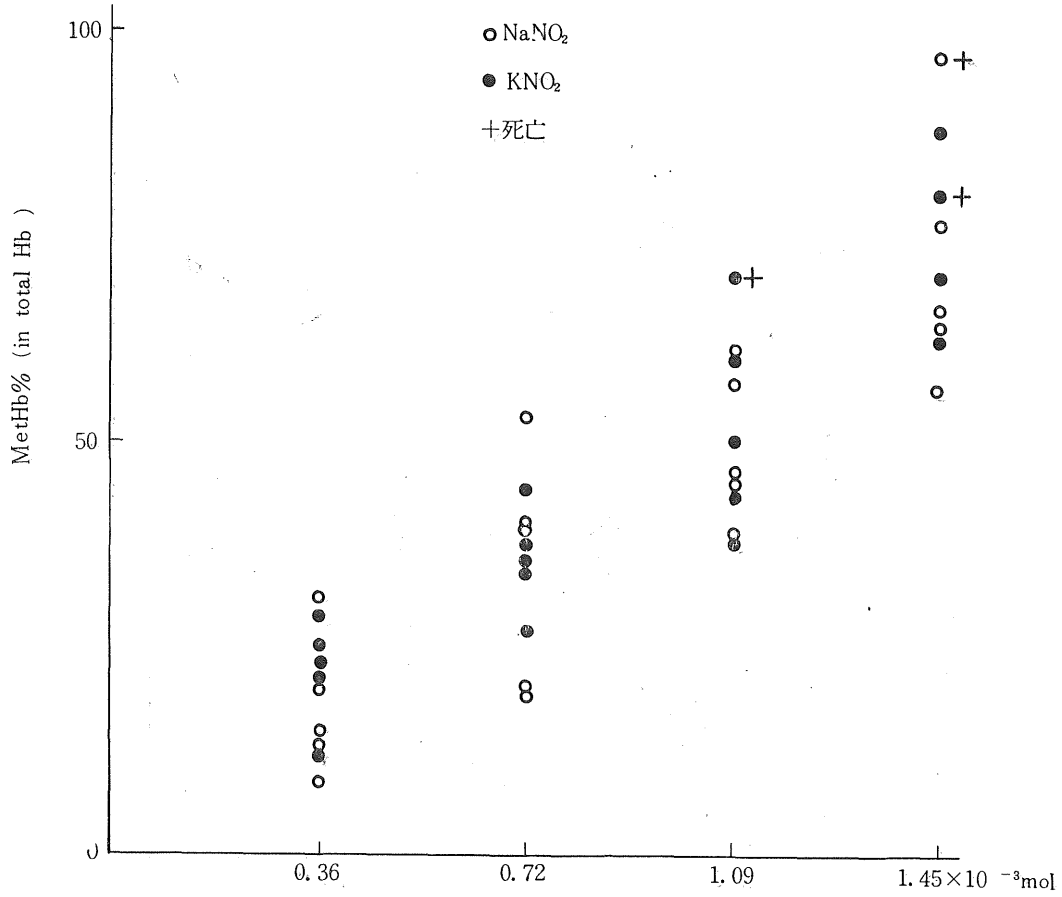


Fig. Ⅱ $NaNO_2$ KNO_2 の投与量と MetHb 量の関係

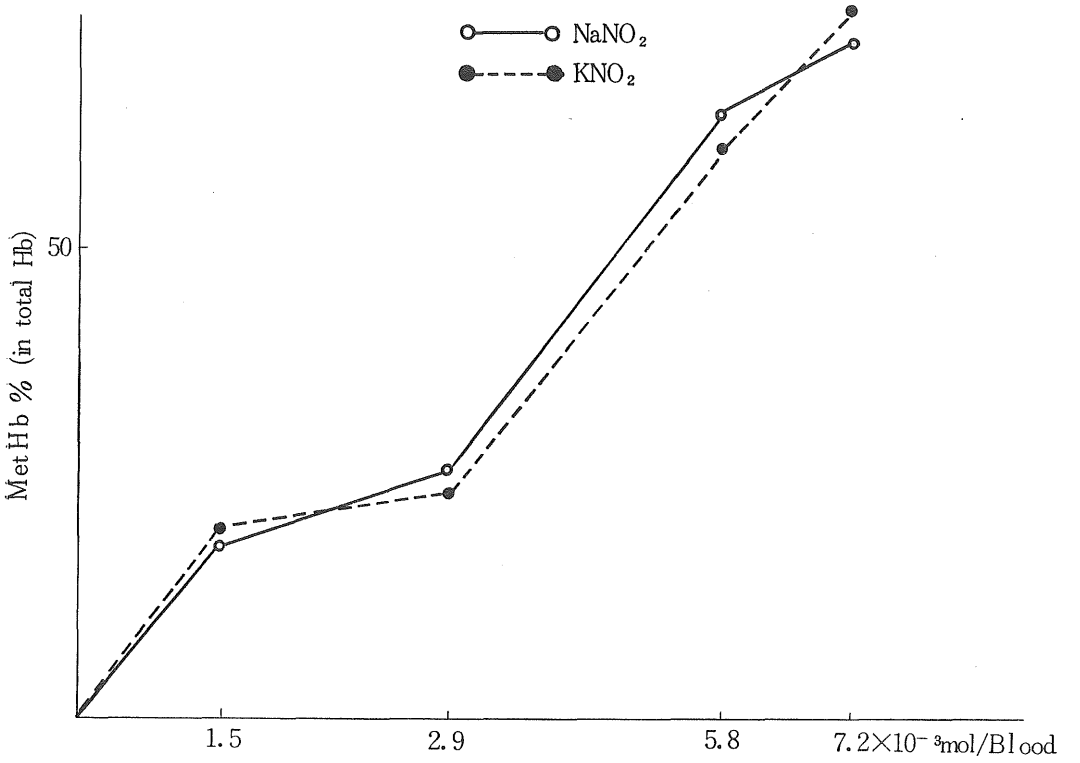


Fig. Ⅲ $NaNO_2$ KNO_2 による MetHb 生成量 (in vitro)

とうりである.

Animal	Material	Sex	LD_{50} g/kg	Confidence Interval atP=0.05 g/kg
Mice	NaCl	♂	—	—
		♀	4.20	3.878−4.548
	KCl	♂	2.25	1.701−2.875
		♀	—	—
Rats	NaCl	♂	4.32	3.943−4.733
		♀	4.32	3.943−4.733
	KCl	♂	2.80	2.204−3.557
		♀	3.85	3.153−4.691

Table Ⅰ NaCl, KCl のマウス，ラットにおける LD_{50}

マウスにおいてもラットにおいても塩化カリウムの方が塩化ナトリウムよりも毒性が強い結果が出たが，これはナトリウムイオンより，カリウムイオンの方が毒性が強いことによると思われる.

まとめ

亜硝酸塩において，ナトリウム塩の方がカリウム塩より LD_{50} 値が低い（毒性が強い）という報告にもとづいて，メトヘモグロビン量を指標としたナトリウム塩とカリウム塩の相関関係を調べた結果，ナトリウム塩もカリウム塩も濃度が高くなるにしたがってメトヘモグロビン量は増加するが，等モルのナトリウム塩とカリウム塩を投与した場合のメトヘモグロビン量は個体差が大きいが両者に毒性の差はなかった．また，亜硝酸塩の LD_{50} 値を検討すると，体重（年令）によって大きで違いがあらわれている.

先に報告された LD_{50} 値をグラム単位にはなくモル単位になおして検討しなおしてみると Table Ⅱ のようになる．マウスの亜硝酸ナトリウムと亜硝酸カリウムの LD_{50} 値の差異を mg/kg で検討した場合には，有意な差（$P<0.05$）があったにもかかわらず，mol/kg

Animal	Material	Sex	LD_{50} mg/kg	LD_{50} mol/kg
Rats	$NaNO_2$	♂	128.0	1.86×10^{-3}
		♀	128.0	1.86×10^{-3}
	KNO_2	♂	172.5	2.03×10^{-3}
		♀	176.0	2.07×10^{-3}
Mice	$NaNO_2$	♂	246.0	3.57×10^{-3}
		♀	283.0	4.10×10^{-3}
	KNO_2	♂	299.0	3.51×10^{-3}
		♀	327.0	3.84×10^{-3}

Table Ⅱ $NaNO_2$, KNO_2 のラット，マウスにおける LD_{50}

Animal	SEX	LD_{50} g/kg (LD_{50} mol/kg)			
		$NaNO_3$	NaCl	KNO_3	KCl
Mice	♂	4.76(5.6×10^{-2})	—	2.52(2.5×10^{-2})	2.25(3.0×10^{-2})
	♀	5.00(5.9×10^{-2})	4.20(7.2×10^{-2})	2.84(2.8×10^{-2})	—
Rats	♂	2.90(3.4×10^{-2})	4.32(7.4×10^{-2})	2.12(2.1×10^{-2})	2.80(3.8×10^{-2})
	♀	2.79(3.2×10^{-2})	4.32(7.4×10^{-2})	2.12(2.1×10^{-2})	3.85(5.2×10^{-2})

Table Ⅲ $NaNo_3$, KNO_3, NaCl, KCl のラット，マウスにおける LD_{50}

で検討した場合には有意な差がなくなってしまった．

硝酸塩の LD_{50} 値 (Table Ⅲ) については，重量当りでも，モル当りに換算した場合にもナトリウム塩とカリウム塩の間に有意な差 ($P<0.05$) があった．硝酸塩におけるナトリウム塩とカリウム塩の差は，生体におけるナトリウムとカリウムの耐性の差異によるものと考えられる．

以上の実験結果が示すように LD_{50} 値の差異の比較検討をおこなう場合に，重量単位で比較することは，毒性をもつイオンの数と侵襲をうけるサイトの数という考え方から考察すると，塩を形成しているものの分子量によって値が変ってくるので判断をあやまって導く．従って毒性の表現には分子の数を表わすモル数であらわした方がよりよいと考えられる．

文　献

1) 事業月報272号，都立衛生研究所　S 46
2) 事業月報274号 S 47
3) Wolff, I.A. and Wasserman, A.E. Science 177, 15 (1972)
4) John. D. H. and Alvin, M. M., Blood, 16, 1722, (1960)
5) Hegesh, E., Gruener, N., Clin. Chim. Acta. 30, 679 (1970)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 547 — 555, 1974

クロムの毒性に関する研究 72 ppm 六価クロムの毒性について

藤井 孝* 坂本義光* 中川好男* 福森信隆*
三栗谷久敏* 福田向江* 阿部幸恵* 矢野範男*
湯沢勝広*, 平賀興吾*

Toxicological Studies of Chromium
Toxicity Test of 72 ppm Chromium (VI) Soloution

TAKASHI FUJII*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, YOSHIO NAKAGAWA*,
NOBUTAKA FUKUMORI*, HISATOSHI MIKURIYA*, HISAE FUKUDA*,
YUKIE ABE*, NORIO YANO*, KATSUHIRO YUZAWA* AND
KOGO HIRAGA*

Adulteration of Tokyo metropolitan city water with 72 ppm of chromium (VI) was found. As one of the subjects in toxicological study of chromium, eye-irritation test of 72 ppm of chromium (VI) solution by rat were carried out. As a result, no toxicological change was observed in both tests. It seems that 72 ppm of chromium (VI) solution has no effect on rabbit eye mucosa and rat organs.

1. 緒 言

東京都水道局管内の水道水中に六価クロムが72ppmの濃度で混入していた事実があったので，クロムの毒性研究の一環として，今回，この 72 ppm の濃度の六価クロム水道水溶液を中心として，ウサギの眼を用いた眼粘膜刺激試験およびラットにおける 72 ppm 溶液の1回投与実験を行ない，六価クロムの生体に対する影響について検討した．眼粘膜刺激試験の方法については，Draize ら，[1] Battista ら，[2] 小倉ら[3] の方法があるが，ここでは初期炎症の検索に適している小倉法と1週間の観察により刺激を定量的に評価できる Draize 法とを併用して試験を行なった．

2. 実験材料および実験方法

2.1 検 体

煮沸後，冷却した水道水を溶媒として，無水クロム酸 (CrO_3) を，六価クロム〔Cr(VI)〕がそれぞれ，72, 720, 7200, 72000 ppm となるように溶解したものを用いた．対照としては，両実験とも溶媒に用いた水道水を使用した．また眼粘膜試験では，水道水の影響を観察するために，生理食塩水を対照として用いた．

尚，これらの検体，水道水，生理食塩水の pH は次に示す通りである．

検 体	Cr(VI) 72 ppm	Cr(VI) 720 ppm	Cr(VI) 7200 ppm	Cr(VI) 72000 ppm	生理食塩水	水道水*
pH	2.7	1.7	0.7	—	5.6	8.2

* 煮沸冷却後の水道水　Cr(VI)：六価クロム
cf：72000 ppm の pH は測定できなかった．

2.2 実験動物

1) 眼粘膜刺激試験

白色家兎（日本在来種）雄，平均体重2.66 kg

2) 72 ppm 1回投与実験

Wistar 系ラット雄（120～130 g）雌（110～130 g）各96匹

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

2.3 実験方法

1) 眼粘膜刺激試験

ウサギの左眼に各濃度のクロム水溶液を各々 0.1 m*l* づつ滅菌済の 1 m*l* 注射筒を用いて，下眼瞼をつまみ上げ結膜嚢をつくり，この中に点眼し，その後閉眼させて1分間軽く按摩した．点眼後，10，20，30分1，2時間の5回を小倉法[3]1，2，3，4，7日の5回をDraize法[1]で評価した．また右眼は対照として水道水を点眼し，さらに水道水の影響を見るために左眼に生理食塩水を0.1 m*l* づつ点眼した．検体と動物数の関係は次のようである．

検体						
	左眼	Cr(VI) 72 ppm	Cr(VI) 720 ppm	Cr(VI) 7200 ppm	Cr(VI) 72000 ppm	*
	右眼	*	*	*	*	生理食塩水
使用動物数		6	3	2	2	1

* 煮沸冷却後の水道水

またクロム水溶液を点眼した眼について Lillie の緩衝ホルマリン液で固定後，セロイジンーパラフィン包埋，薄切，Hematoxylin-Eosin 染色を行ない．顕微鏡標本を作製した．

2) 72 ppm 1回投与実験

検体の投与24時間前より絶食させた動物に 72 ppm クロム水溶液および対照として水道水を体重 kg 当り 5 m*l*，および 20 m*l* を胃ゾンデを用いて投与した．投与後，水道水および普通飼料を自由に摂取させ実験終了日まで毎朝体重を測定した．投与量と動物数の関係は次の通りである．

投与量 m*l*/kg 体重		動物数 ♂	動物数 ♀
水道水（対照）	5 m*l*	24	24
検体	5 m*l*	24	24
水道水（対照）	20 m*l*	24	24
検体	20 m*l*	24	24

ラットは投与群，対照群とも投与後 1，3，7，14日目に各6匹づつ断頭，放血屠殺し，次の諸項について検討した．

1) 血液学的検査

断頭により放血させた血液をヘパリン処理した試験管に採り，Coulter Counter Model'S を用いて赤血球数，白血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，平均赤血球容積について測定した．

2) 血清生化学的検査

ラットの断頭により得た血液をガラス製の遠沈管に採り，室温で30分間静置後，遠心分離(0°C, 3000 rpm, 10分間）して調整した血清について，日立自動分析装置 'M—400 を用いて，GOT, GPT 活性 (Reitman-Frankel 法)，ロイシンアミノペプチターゼ (LAP) 活性（竹中，高橋法)，コリンエステラーゼ (ChE) 活性（ΔpH 法)，アルカリホスファターゼ (AlP) 活性 (Kind-King変法) 尿素窒素量 (Urease-Indophenol 法）を測定した．

3) 剖　検

肉眼的所見

4) 臓器重量の測定

下垂体，甲状腺，心臓，脾臓，肝臓，腎臓，副腎を，附着する血液，脂肪組織等を除去した後測定し

Table I. Evaluation by Ogura and Draize method

Concentration of Sample	Number of Animals	Evaluation by Ogura method	Evaluation by Draize method: Time after instillation (hr) 24	48	72	96	168
72 ppm	6	A	0	0	0	0	0
720 ppm	3	B	0	0	0	0	0
7200 ppm	2	C	14	24	21	10	2
72000 ppm	2	D	85	88	110	110	110
Control	1	A	0	0	0	0	0

た.

5) 組織学的検索

重量測定臓器および胃，小腸，大腸，膵臓，精巣，子宮，について Lillie の緩衝ホルマリン液で固定後，パラフィン包埋，薄切，Hematoxylin-Eosin 染色，PAS 反応，その他必要に応じて特殊染色を行ない鏡検した.

3. 実験結果

3.1 眼粘膜刺激試験

1) 小倉法，Draize 法による評価結果

Table Ⅰに示すように水道水，72 ppm 群ではいずれも何ら変化を示さなかった.

720 ppm 群では点眼後10分で眼球結膜の角膜周囲の血管拡張が明瞭となり，瞬膜でも血管拡張が著明に見られた．眼瞼結膜は，軽度の充血だった．瞬膜は30分後，眼球結膜は3時間後に変化が軽度となり，24時間目以後には共に変化は見られなかった．また，睫毛反射，角膜反射は点眼後も正常であり瞳孔の大きさにも異常はなかった.

7200 ppm 群では点眼後10分で睫毛反射は鈍くなった．眼球・眼瞼結膜は赤色の度合が強くなり血管の拡張も著明になった．瞬膜も血管の怒張が著しかった．30分後には睫毛反射は正常となったが，眼球・眼瞼結膜は浮腫を生じ，充血も続き，1時間後には眼瞼結膜に凝固蛋白のような白濁した偽膜様の分泌物が見られた．結膜の充血は2～3日後，浮腫は5日後，分泌物は2～3日後がピークで5日目以降は殆んど変化が見られなかった．2～3日目に角膜は限局された部分で混濁していたが虹彩は細部までよく見る事ができた．この混濁も4日目以降は見られなかった．2～4日目にかけて虹彩にうっ血が見られたが7日後には見られなかった.

72000 ppm 群では点眼直後，2，3回激しく暴れて眼は閉じたままとなり，涙液の分泌が顕著であった．点眼後10分，観察のため開眼させると瞬膜で角膜の半分以上を覆ってしまい観察に支障をきたした位であった．点眼後10分で眼瞼・眼球結膜，瞬膜は強度の充血，浮腫が見られ角膜は表面に偽膜のようなものを形成しており角膜反応も殆んど無かった.

閉眼状態の眼瞼は対照と比較して外見からも顕著に膨隆していてその周囲は広範囲に亘って被毛が湿っていた．20分後には光に対しても何ら反応を示さず，凝固蛋白様の分泌物が増加していた．角膜の混濁も顕著であり，反射も消失していた．点眼後3日目には全ての変化が最高値を示し，以後回復の兆候は見られなかった.

2) 組織学的検索

72 ppm 群では著明な変化は認められず，720 ppm 群で眼球結膜，角膜縁に軽度の充血と細胞浸潤が見られた．顕著な変化を示したのは 72000 ppm 群で結膜，角膜に強い炎症像を呈し角膜上皮細胞の壊死も認められた.

3.2 72 ppm 1回投与実験

1) 体重の推移および一般症状

14日間生存したラットの体重の推移は，Fig. 1, 2に示したように検体の投与量に関係なく良好な増加を示し，対照群と比べて差は認められなかった.

一般症状は，検体投与群においても特に認むべきものはなかった.

2) 血液学的検査

結果は Table Ⅱに示す通りで，5 m*l* 投与群雄の投与後1日目の白血球数，および投与後7日目の赤血球数，ヘマトクリット値の有意な低下を示した他は雌雄とも，いずれも変化が認められなかった.

3) 血清生化学的検査

Table Ⅲに示す通り，5 m*l* 投与群雄の1，3，14日目で GOT 活性値が有意な低下を示した．また LAP 活性値は 5 m*l* 投与群雄で 3，14日目で有意な低下を示し，7日目で有意な増加を示した．また 20m*l* 投与群雄の1日目で有意な低下が見られた．その他 GPT，AlP 活性値および UN 量は特に変化はなかった.

4) 臓器重量

各臓器の絶対重量ならびに体重 100 g あたりの比重量は Table Ⅳ～Ⅶに示した通りで，各投与群で特に著明な変動はなかった.

5) 剖検所見

解剖時に，投与群，対照群共に腎水腫およびまれに心臓の表面に白色斑が見られたが，他の臓器に関しては特に変化はなかった.

6) 組織学的検索

特に著変を示した臓器は見られず，いずれも軽度な変化であったが，腎臓皮質部尿細管の限局性壊死，肝臓肝細胞の腫脹，胃粘膜粘液層の剝離および上皮細胞の扁平化，一部の心筋がエオジンに濃染する像などが対照群，投与群を問わず散見された．また剖検の際に腎水腫が見られた腎臓では皮質に嚢胞が見られ，心臓の白色斑は心筋の限局性の壊死巣として見られた.

4. 考 察

六価クロム水道水溶液を用いて，兎眼粘膜試験およびラットにおける1回経口投与実験を行い，六価クロ

ムの生体におよぼす影響を検討した．眼粘膜刺激試験には，72，720，7200，72000 ppm の濃度の各溶液を用い，その結果を小倉法，Draize 法によって評価した．ラットにおける試験では 72 ppm の濃度の溶液を1回投与し，投与後 1，3，7，14日目の動物につい液て通常の毒性試験の検査項目を適用して行なった．

兎眼粘膜刺激試験の結果から判断して，72 ppm の六価クロム水溶液の眼粘膜への作用は全くなく，さらに 720 ppm の濃度においても，初期に軽度な炎症を起すのみで24時間後には回復しており，それ以後も変化は見られなかった．また眼球，眼粘膜の病理組織学的検索からも特に著変は見られなかった．

ラットにおける 72 ppm 溶液の経口投与実験では検体投与後，嘔吐，下痢などの症状も見られず体重，臓器重量も投与後良好な増加を示し，その推移に著変はなかった．また雄の投与群では，白血球数，赤血球数ヘマトクリット値が 5 ml 投与群で一時的な減少を示したが．投与量との相関は見られず，また経時的な増減傾向も示さないことから，特にクロムによる変化ではないと思われる．

また投与群の雄では，GOT, LAP, ChE，雌では LAP, ChE，の活性に変化がみられたが，投与量との相関，および経時的変化の傾向を示さず，GOT, GPT 活性も低下していることなどから，直接肝障害を示唆したものとは思われなかった．

さらにラットの各臓器も特に著変のあったものはなかった．六価クロムは，クロム酸塩，重クロム酸塩として粘膜に対して局部的な腐触作用があり，それらの微粒子による皮膚，鼻粘膜などの炎症，潰瘍が職業病[4~6]としておこることが知られており，今回ウサギの眼粘膜と同様，消化管の粘膜に対する影響に注目したが，胃に見られた粘液層の剝離，粘膜上皮細胞の扁平化は，対照群にも共通して見られたもので，特に72ppm 六価クロム溶液によって助長された傾向もないことから，72 ppm 溶液の1回投与によって生体に顕著な影響をおよぼすことはないと考えられる．

5. 結　語

六価クロム水道水溶液の家兎眼粘膜への影響およびラットに1回経口投与した場合の全身的影響を検索したが，何ら認むべき影響を検出できなかった．

文　献

1) Draize, J. H. Woodward, G., and Calvery, H. O. : *J. Pharmacol.* 82, 377 (1944)
2) Battista, P. M. S, and Mcsweeney, E. S. : *J. Soc. Cosmetic Chemists* 16, 119 (1965)
3) 小倉保己，田村順子：医学と生物 76, 292 (1968)
4) Lumio, J. S. : *Nord Hyg. Tidskr* 34, 86 (Biological Absiract 28, 13680 (1954))
5) Miller, J. B. : Arch. *Otolaryngol.* 58, 171 (1953) (Biological Abstract 28, 13682 (1954))
6) Horiguchi S : *J. Osaka City Med. Center* 8, 1671 (1959) (Biological Abstract)

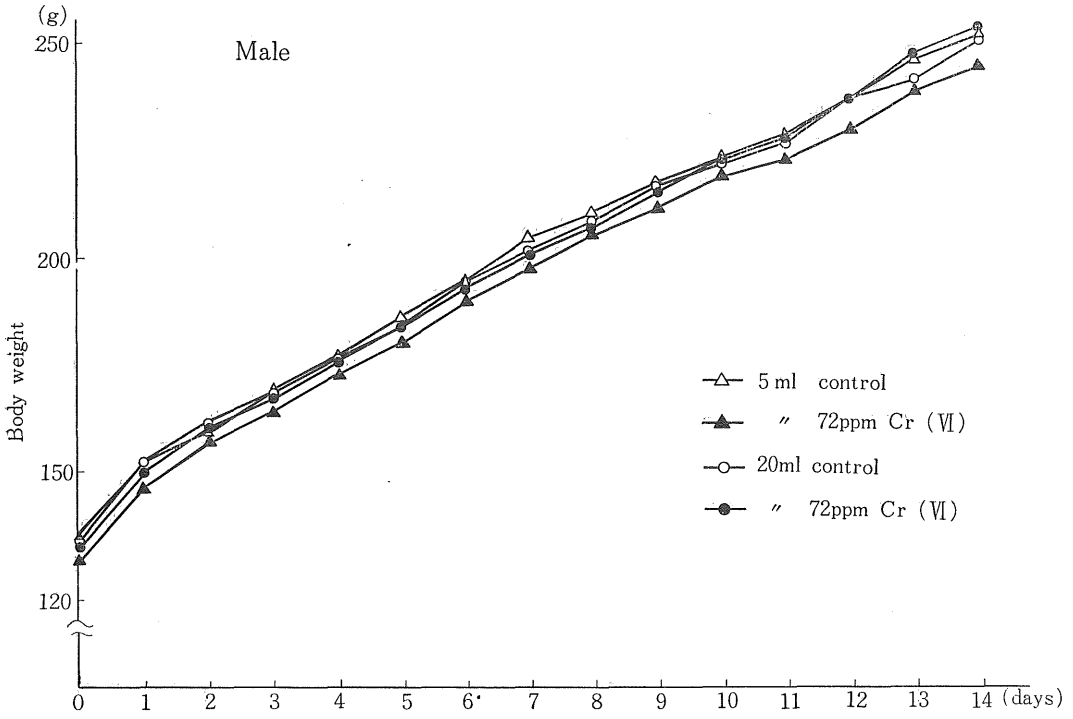


Fig. 1 Curve of increasing body weight

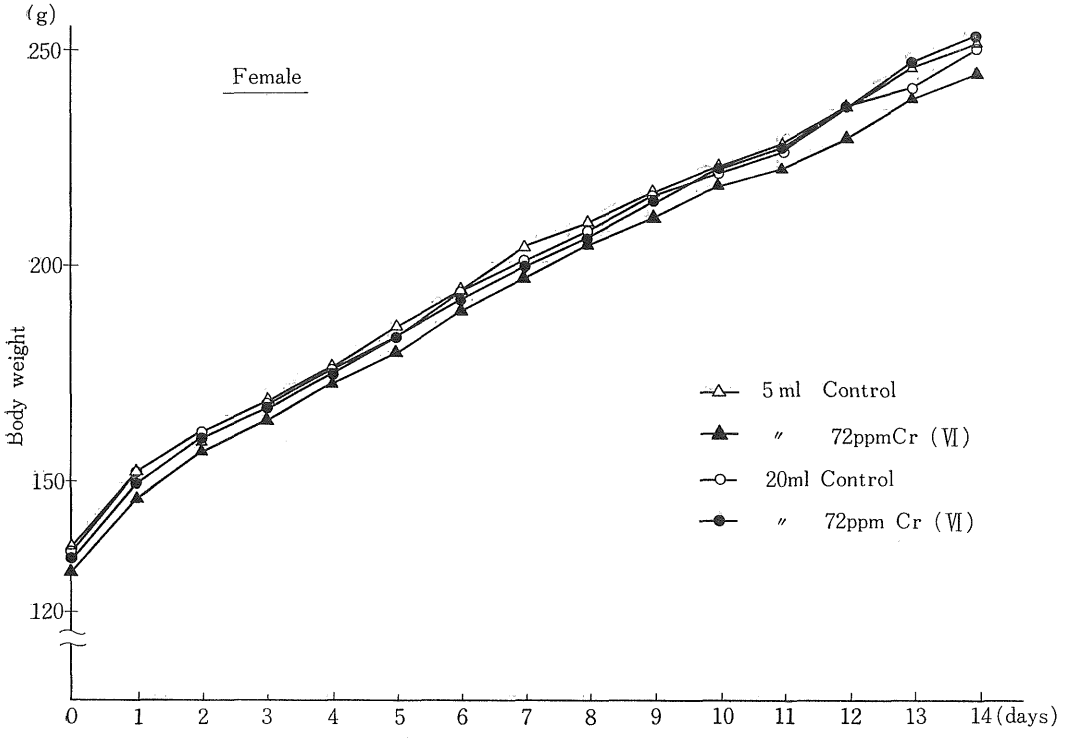


Fig. 2 Curve of increasing body weight

Table Ⅱ. Hematology

	Dose level ml/kg B.W.	Group Cont./Treat	Male Days after administration 1	3	7	14	Female Days after administration 1	3	7	14
WBC ($\times 10^3$cells/mm^3)	5	C	5.11±0.71[a)]	6.38±1.63	6.20±1.55	7.53±2.26	4.83±1.64	6.20±1.56	5.65±1.15	5.20±1.08
		T	3.93±0.88*	5.16±1.18	7.46±2.12	7.85±1.00	5.38±1.35	6.00±2.24	4.71±0.54	5.01±0.60
	20	C	4.98±0.67	5.86±1.33	7.58±1.51	6.56±0.76	5.33±1.74	4.50±0.62	5.25±0.85	5.61±1.69
		T	4.73±0.59	4.98±0.72	7.51±1.11	6.71±1.45	4.45±0.71	4.73±0.92	6.90±1.72	5.78±0.84
RBC ($\times 10^6$cells/mm^3)	5	C	6.01±0.37	6.16±0.17	6.42±0.24	6.87±0.42	6.14±0.29	6.21±0.54	6.53±0.31	7.17±0.32
		T	6.06±0.31	5.82±0.43	5.99±0.17*	6.63±0.38	6.41±0.24	6.20±0.34	6.56±0.32	6.86±0.35
	20	C	6.24±0.27	5.83±0.32	6.17±0.26	6.83±0.27	6.54±0.25	6.17±0.37	6.48±0.36	6.88±0.38
		T	5.98±0.43	5.86±0.27	6.02±0.13	6.59±0.18	6.39±0.17	6.08±0.28	6.60±0.47	6.84±0.19
Hgb (g/dl)	5	C	13.2±0.8	12.4±0.6	13.4±0.4	14.4±0.8	13.9±0.6	13.4±1.0	13.9±0.6	15.1±0.5
		T	13.0±0.6	12.1±0.9	13.0±1.3	14.4±0.6	14.0±0.7	13.5±0.4	13.9±0.6	14.5±0.8
	20	C	13.6±0.7	12.6±0.8	13.1±0.6	14.0±0.5	14.6±0.9	13.1±0.6	14.1±0.9	14.6±0.6
		T	12.8±1.2	12.2±0.7	12.6±0.5	14.1±0.5	13.7±0.6	12.7±0.8	14.1±0.6	14.6±0.4
Hct (%)	5	C	35.5±1.5	34.4±1.6	36.4±1.3	38.4±0.7	36.3±1.6	35.9±3.1	36.7±1.7	38.9±2.2
		T	35.7±1.6	33.0±2.7	32.8±1.6**	38.1±2.8	36.9±2.3	35.4±1.6	36.1±1.6	37.4±2.0
	20	C	36.2±1.8	34.0±1.0	35.3±1.1	37.6±1.2	37.5±1.0	35.1±2.1	36.4±1.5	37.2±1.7
		T	34.9±2.5	33.6±2.1	34.3±1.6	36.7±1.6	36.4±1.7	34.2±2.1	37.6±1.8	37.9±0.9
MCV (μ^3)	5	C	59.5±1.5	56.2±1.9	57.3±1.2	55.2±1.3	59.3±0.8	58.5±1.4	56.7±1.6	55.0±1.0
		T	59.3±1.5	56.8±1.2	56.0±2.2	57.8±1.2**	57.8±2.2	57.5±1.0	55.6±1.1	55.0±1.3
	20	C	58.3±1.8	57.8±1.0	57.5±0.8	55.3±2.2	57.8±1.7	57.5±1.0	56.3±1.8	54.7±1.2
		T	58.3±1.8	57.5±2.6	57.2±1.7	56.3±2.1	57.2±1.7	56.5±2.1	5.74±3.2	55.8±1.5

a) : Mean±SD　　* $P < 0.05$　　** $P < 0.01$

Table Ⅲ Serum biochemistry

	Dose level ml/kg B.W.	Group Cont. / Treat.	Male Days after administration 1	3	7	14	Female Days after administration 1	3	7	14
GOT (K-U/ml)	5	C	133.7±11.6[a)]	121.5± 5.5	119.7± 6.8	111.7± 8.8	121.8±10.0	111.0±12.6	112.7±13.4	107.0± 5.6
		T	118.8± 8.2*	111.3± 7.7*	115.3±19.3	93.7±10.5**	123.5± 8.3	109.0± 9.6	122.5±15.2	100.3± 9.8
	20	C	120.7±13.7	115.0± 9.2	117.7±10.8	105.0± 7.3	121.7±17.5	104.8± 7.3	110.7± 5.3	113.3±10.6
		T	120.4± 8.8	113.3± 7.8	110.7± 9.9	102.3±10.0	111.7± 8.4	103.2± 6.1	105.6±12.2	93.5±17.3
GPT (K-U/ml)	5	C	40.2± 9.7	36.7± 2.3	35.5± 2.8	29.3± 2.9	33.5± 8.4	33.0± 3.0	30.0± 4.6	31.0± 2.0
		T	36.2± 4.8	33.7± 2.4	34.3± 4.0	27.8± 2.7	35.3± 3.4	32.7± 4.5	32.5± 5.7	25.5± 2.9*
	20	C	35.7± 2.4	34.5± 4.4	34.8± 5.0	29.7± 3.6	32.5± 6.4	32.3± 2.7	29.2± 4.4	28.2± 4.0
		T	38.3± 2.0	33.3± 3.4	30.7± 2.7	27.7± 2.3	34.0± 1.8	31.5± 5.8	31.2± 3.3	21.7± 3.1*
ALP (K-A-U/dl)	5	C	65.2±14.2	64.8±15.9	63.5±12.8	48.8± 7.4	61.7± 9.8	60.2± 9.7	55.7± 7.4	48.7±14.3
		T	68.8±14.2	58.5± 4.7	60.3±14.1	52.8±13.2	62.5± 9.9	53.0±13.3	56.5±12.1	52.0±13.5
	20	C	55.8±12.2	46.2± 9.9	42.5±10.4	33.0±13.9	65.5± 6.2	52.2±14.3	46.0±11.4	41.8±11.1
		T	51.0± 9.8	46.3± 9.8	45.5± 6.6	36.2± 6.9	55.7±15.7	47.3±10.8	44.8± 6.2	31.2±10.3
LAP (G-U/ml)	5	C	132.2±10.4	129.5±25.6	102.3±14.3	135.2±13.9	133.7±21.2	92.8±29.6	122.3±25.8	132.0±14.0
		T	137.0±16.7	95.2±15.1*	141.7±19.0**	112.0±18.9*	140.0±19.7	105.8±13.4	89.3±31.4	123.2±20.4
	20	C	117.8±16.0	101.5±16.4	117.5±24.8	104.0±18.4	136.0±34.3	89.7± 7.8	119.2±43.7	105.7±13.0
		T	136.5±19.3	96.0±13.2	122.3±25.3	98.3±19.0	106.2±21.2**	80.8±17.0	97.2±23.5	100.2±13.0
ChE (⊿pH)	5	C	0.12±0.07	0.15±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.24±0.03	0.25±0.06	0.34±0.13	0.39±0.12
		T	0.10±0.01**	0.12±0.01**	0.13±0.02	0.16±0.09	0.17±0.04**	0.27±0.05	0.37±0.13	0.45±0.15
	20	C	0.09±0.03	0.14±0.01	0.14±0.02	0.13±0.02	0.23±0.06	0.26±0.05	0.32±0.06	0.42±0.07
		T	0.10±0.02	0.14±0.03	0.12±0.02	0.16±0.02	0.18±0.02	0.26±0.07	0.31±0.03	0.41±0.05
UN (mg/dl)	5	C	18.7±2.0	18.5±1.9	20.8±1.5	19.8±1.0	19.2±1.5	19.7±1.4	19.8±2.9	19.7±1.2
		T	17.7±3.6	17.3±0.8	20.8±1.3	19.5±1.4	18.8±3.1	19.7±2.8	21.3±2.0	20.3±3.1
	20	C	16.2±1.9	14.3±6.4	19.5±2.9	19.5±3.4	17.7±2.1	19.3±2.3	22.0±4.3	18.8±1.3
		T	16.8±1.8	16.0±1.4	16.7±1.4	18.5±1.5	17.3±2.9	18.7±2.7	23.0±1.6	17.2±2.7

a) : Mean±SD Significanty different from control, * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

Table Ⅳ. Organ weght (5 m*l* Male)

days	treat	Heart mg[1] / mg/100g[2]	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Kidney(R) mg / mg/100g	Kidney(L) mg / mg/100g	Suprarenal gland(R+L) mg / mg/100g
1	control	606±13[3] / 397±19	506±45 / 332±35	517±67 / 340±52	8.71±0.81 / 5.70±0.31	734±38 / 481±22	700±46 / 459±16	37.6±4.33 / 24.6±2.87
	72 ppm Cr(Ⅵ)	621±25 / 414±14	544±86 / 363±56	481±38 / 322±29	8.46±0.89 / 5.65±0.51	718±70 / 479±42	699±53 / 467±33	38.8±4.95 / 25.8±2.88
3	control	656±33 / 386±17	617±94 / 362±50	513±110 / 302±69	8.48±0.41 / 4.98±0.15	798±52 / 469±28	777±50 / 456±18	36.5±3.88 / 21.4±2.55
	72 ppm Cr(Ⅵ)	655±34 / 400±55	671±59 / 395±32	477±82 / 281±50	8.30±0.56 / 4.88±0.20	841±59 / 495±22	804±43 / 473±11	38.0±3.40 / 22.3+2.03
7	control	794±39 / 397±26	718±49 / 359±20	664±77 / 333±50	10.00±0.77 / 4.99±0.26	970±82 / 485±36	914±71 / 457±31	42.0±5.40 / 20.9±2.23
	72 ppm Cr(Ⅵ)	840±43 / 407±25	724±83 / 351±40	660±97 / 320±47	10.51±0.68 / 5.09±0.29	1014±41 / 491±26	984±64 / 477±33	41.1±6.88 / 19.9±3.22
14	control	974±81 / 388±41	706±74 / 281±34	689±39 / 275±27	12.52±1.41 / 4.98±0.55	1147±139 / 456±52	1143±140 / 454±47	46.6±7.63 / 18.6±3.42
	72 ppm Cr(Ⅵ)	911±47 / 373±15	686±50 / 280±18	675±91 / 276±34	11.92±0.90 / 4.87±0.29	1135±107 / 464±38	1122±112 / 459±41	46.0±10.05 / 18.8±4.22

1) Absolute wt. 2) mg/100 g Body wt. 3) mean ± SD

Table Ⅴ. Organ weight (5 m*l* Female)

days	treat	Heart mg[1] / mg/100g[2]	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Kidney(R) mg / mg/100g	Kidney(L) mg / mg/100g	Suprarenal gland(R+L) mg / mg/100g
1	control	586±43[3] / 436±9	466±41 / 347±28	493±93 / 365±56	7.86±0.33 / 5.85±0.15	693±49 / 517±39	681±52 / 507±35	42.0±8.74 / 31.1±5.71
	72 ppm Cr(Ⅵ)	566±16 / 423±15	480±43 / 357±21	474±90 / 351±52	7.92±0.88 / 5.89±0.46	702±48 / 522±15	683±47 / 309±12	45.3±4.67 / 33.8±4.33
3	control	575±47 / 405±29	545±69 / 383±37	479±95 / 340±81	6.93±0.96 / 4.86±0.34	697±70 / 491±35	682±86 / 479±38	42.5±5.46 / 29.8±2.82
	72 ppm Cr(Ⅵ)	584±42 / 398±29	514±42 / 351±24	469±38 / 320±29	6.92±0.67 / 4.72±0.38	715±50 / 487±15	695±52 / 474±25	41.6±5.24 / 28.4±4.10
7	control	668±41 / 428±32	503±52 / 322±36	483±69 / 308±29	7.59±0.66 / 4.85±0.29	819±38 / 524±18	781±52 / 500±25	49.1±7.08 / 31.5±5.44
	72 ppm Cr(Ⅵ)	667±29 / 416±20	532±69 / 330±33	590±87 / 366±43	7.64±0.54 / 4.75±0.24	826±86 / 513±31	790±87 / 491±38	46.3±6.34 / 28.7±3.03
14	control	714±21 / 388±18	499±34 / 271±13	555±52 / 301±26	8.47±0.66 / 4.60±0.32	849±18 / 461±11	825±20 / 448±10	58.5±10.53 / 31.7±5.23
	72 ppm Cr(Ⅵ)	715±51 / 391±23	515±90 / 280±39	529±52 / 290±32	7.80±0.3 / 4.26±0.16	842±51 / 461±39	824±33 / 451±26	59.3±7.47 / 32.3±3.48

1) Absolute wt. 2) mg/100 g Body wt. 3) mean±S.D.

Table Ⅵ. Organ weight (20 m*l* Male)

days	treat	Heart mg[1] / mg/100g[2]	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Kidney(R) mg / mg/100g	Kidney(L) mg / mg/100g	Suprarenal gland(R+L) mg / mg/100g
1	control	611±47[3] / 414±34	541±66 / 366±41	520±81 / 352±52	7.77±0.24 / 5.27±0.27	721±26 / 488±11	689±33 / 466±18	36.1±6.14 / 24.4±3.98
	72 ppm Cr(Ⅵ)	625±39 / 412±15	543±81 / 358±49	524±86 / 346±55	8.27±0.88 / 5.74±0.34	730±82 / 480±33	702±71 / 462±26	40.0±1.26 / 26.4±1.88
3	control	678±41 / 397±11	621±48 / 365±30	476±77 / 279±45	8.41±0.63 / 4.93±0.26	815±65 / 478±24	805±43 / 472±15	36.8±5.11 / 21.6±3.00
	72 ppm Cr(Ⅵ)	682±43 / 405±21	651±99 / 386±54	532±50 / 316±32	8.12±0.37 / 4.83±0.21	808±48 / 480±21	799±61 / 475±28	39.8±3.60 / 23.7±2.64
7	control	797±25 / 399±14	779±50 / 390±23	653±41 / 327±19	9.96±0.80 / 4.98±0.34	943±94 / 466±37	900±85 / 450±33	38.3±7.03 / 19.2±3.82
	72 ppm Cr(Ⅵ)	799±53 / 396±23	817±54 / 405±28	668±63 / 331±29	10.00±0.47 / 4.95±0.22	979±30 / 485±21	938±38 / 465±24	44.0±3.74 / 21.7±1.62
14	control	911±70 / 364±27	708±52 / 283±16	632±80 / 253±33	11.99±0.96 / 4.79±0.29	1132±102 / 452±25	1090±72 / 435±19	49.1±4.40 / 19.6±2.06
	72 ppm Cr(Ⅵ)	949±72 / 374±17	718±64 / 283±18	627±159 / 246±54	11.97±0.71 / 4.72±0.14	1144±54 / 452±10	1095±50 / 432±19	50.8±6.43 / 20.0±2.43

Table Ⅶ. Organ weight (20 m*l* Female)

days	treat	Heart mg[1] / mg/100g[2]	Spleen mg / mg/100g	Thymus mg / mg/100g	Liver g / g/100g	Kidney(R) mg / mg/100g	Kidney(L) mg / mg/100g	Suprarenal gland(R+L) mg / mg/100g
1	control	543±36[3] / 403±11	440±15 / 327±19	467±30 / 348±36	7.23±0.65 / 5.43±0.29	682±76 / 506±43	643±47 / 477±17	42.1±3.25 / 31.3±1.76
	72 ppm Cr(Ⅵ)	539±42 / 396±11	443±44 / 325±13	451±49 / 331±25	7.23±0.23 / 5.31±0.26	665±44 / 489±12	633±50 / 465±26	42.6±5.78 / 31.2±2.67
3	control	596±44 / 397±21	531±61 / 354±39	482±71 / 320±35	7.01±0.70 / 4.66±0.18	717±66 / 478±33	636±57 / 457±26	40.1±9.21 / 26.6±5.41
	72 ppm Cr(Ⅵ)	573±39 / 406±24	500±46 / 353±23	483±67 / 342±43	6.75±0.71 / 4.64±0.39	702±51 / 496±24	660±51 / 466±30	42.6±5.27 / 30.2±3.99
7	control	662±48 / 400±21	548±93 / 329±37	542±69 / 327±36	7.78±0.95 / 4.68±0.33	758±38 / 458±12	743±46 / 449±14	53.8±4.11 / 32.5±2.12
	72 ppm Cr(Ⅵ)	647±45 / 419±28	492±93 / 317±44	526±46 / 340±31	6.84±0.57 / 4.42±0.18	743±65 / 481±38	707±46 / 457±28	52.2±5.84 / 33.8±4.41
14	control	710±16 / 382±27	562±38 / 302±21	551±72 / 296±39	7.97±0.67 / 4.27±0.20	830±86 / 444±19	825±71 / 442±20	52.8±6.04 / 28.4±3.91
	72 ppm Cr(Ⅵ)	746±35 / 421±8	567±76 / 319±29	520±68 / 293±28	7.97±0.82 / 4.49±0.21	844±111 / 475±37	809±89 / 456±35	63.3±4.71 / 35.8±2.55

1) Absolute wt. 2) mg/100 g Body wt. 3) mean±S.D.

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 557 — 576, 1974

毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究

I. 生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に体重について

福森信隆* 水尾昭江* 市川久次*
小林博義* 平賀興吾*

Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches

I. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Body Weight Changes

NOBUTAKA FUKUMORI*, AKIE MIZUO*, HISATSUGU ICHIKAWA*,
HIROYOSHI KOBAYASHI* AND KOGO HIRAGA*

As one of studies on the physiological properties of rats used for toxicological researches, an investigation was made on comparison of (a) the physiological properties of JCL-SD rats and those of SLC-SD rats, and (b) the reaction of JCL-SD rats and that of SLC-SD rats on treatment with dibutyl hydroxy toluene (BHT). Examinations were made on body weight, organ weight, hematological and serum biochemical changes and morphological changes in both groups of rats, and following results were obtained. 1) In both groups of rats treated with BHT, one-half of male JCL-SD rats died during the experimental period, but none of SLC-SD rats died. 2) In both males and females, body weight of SLC-SD rats increased more than that of JCL-SD rats, but body weight gain was greater in JCL-SD rats than in SLC-SD rats. In both groups of rats treated with BHT, body weight gain of JCL-SD rats was inhibited strongly in comparison with that of SLC-SD rats. 3) Weight of some organs in SLC-SD rats increased more than in JCL-SD rats during 2 weeks of examination, but growth rate of organ weight in JCL-SD rats was greater than that of SLC-SD rats. In both groups of rats treated with BHT, increasing rate of organ weight of JCL-SD rats was inhibited more than that of SLC-SD rats. 4) No difference in properties of blood was found in both JCL-SD and SLC-SD rats during the experimental period, in both groups of rats treated with BHT, properties of blood in JCL-SD rats were changed more than that in SLC-SD rats. 5) In anatomical changes, internal hemorrhage in thymus, testis, and epididymis was seen in both groups of rats treated with BHT, and the changes were more severe in JCL-SD than in SLC-SD rats. 6) In histological changes, beginning of spermatogenesis was seen in 4-week-old male SLC-SD rats and 5-week-old male JCL-SD rats. 7) In histological changes, swelling and vacuolation in liver cells were seen in both groups of rats treated with BHT, and it was seen in SLC-SD earlier than in JCL-SD rats. These results suggest that the responses differ according to growth of the animals, and that response of the animals differ accordring to the period of administration, and it is important to grasp the variation in growth of the animals in toxicological studies.

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

本研究は第Ⅰ報～第Ⅳ報で構成し，次の諸項の検索を実施した．

1) 序　論
2) 実験材料および実験方法
3) 一般症状観察および死亡率

4) 体　　重
5) 飼料消費量，飼料摂取量，飼料効率
6) 剖　　検
7) 臓器重量
8) 細菌学的検査
9) 血液学的検査
10) 血清生化学的検査
11) 酵素組織化学的検査
12) 解剖，組織学的検査
13) 結　　論

上記，1)～5)，8) を第Ⅰ報，7) を第Ⅱ報，9)～11) を第Ⅲ報，6)，12)，13)を第Ⅳ報に記載した．

序　論

毒性研究は，化学物質が生物体に与える影響を観察し，種々の生体情報から総合的にその作用を把握する必要がある．化学物質の生体作用を検索する上で，実験動物は不可欠であり，その実験動物が試験研究の結果に重要な役割を果している．

最近，所謂正常ラットに腎水腫，大腿筋出血等の多発知見が観察され，その原因が動物生育場由来か，飼育後の環境因子によるか明らかでない．また，不顕性の遺伝因子が何んらかの刺激で顕性化し，後発的な他因子と併合発症すると，その両者の区別が困難となる．これらは毒性研究の実験結果を検索する上で好ましくない影響を与える．

本来，実験動物は化学物質感受性の安定した再現性と均一性を維持する必要があるが，起源，生育場の種々の飼育環境因子の相違により必ずしも満足する結果を得ていない．

それらを考慮することにより，毒性研究は実験動物の性状変化を詳細に捉え，成長過程の推移を正確に観察することが，化学物質の生物体に対する作用を検討する際に有意義な示唆を与える．

また，研究目的に応じて動物種，系統差等を実験者自らが適切に選択し，実験結果に動物体の具有する性状をも考慮に加え検討することが理想的である．

それらの理由から，今回毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究の一環として，同一系である JCL-SD 系，SLC-SD 系の生育場を異にする barrier-system 生育下のラットを用い，一定期間当研究所内にて飼育観察し，両者の成長過程での性状変化を多方面から比較検討した．飼育観察期間は成長初期での性状推移を重視することから5週とし，所謂正常動物の性状観察と同時に化学物質を負荷して感受性をも比較した．

本実験により，毒性研究に使用する動物選択および実験結果の評価に少なからぬ知見を得たので報告する．

1. 緒　　言

実験動物における体重変動は，生物体の発育過程を包括的に把握した現象で，その増減が個体内での生理代謝機能変化に重要な指標を提供する．また，飼料および腸内菌分布が栄養要求に関与し，体重変動に直接的影響を与える場合もある．かような観点から，本稿では成長過程における要因のうち，主として体重，飼料，腸内菌分布を中心に生育場を異にする JCL-SD 系（以下Ｊ群と略す）と SLC-SD 系（以下Ｓ群と略す）ラットの経時的推移を比較検討した．

2. 実験材料および実験方法

異なる生育場育成の体重65ｇ前後の４週齢 specific pathogen free の JCL-SD 系（昭和48年９月17日～19日出生）と SLC-SD 系（昭和48年９月19日～20日出生）のラットを用い，１ケージに５匹ずつ乱数表で分け，日本クレア製の飼育用固型飼料（CE—2）および水道水を自由に摂取できるようにし，室温 25°Ｃ±1°Ｃ，温度50%±５%，照明時間午前９時から午後５時とした環境下の一般飼育室にて飼育観察した．飼育期間は，Ｊ群，Ｓ群とも飼育１日，１週，２週，５週後の４回に分けて検査に供し，また飼育１週後から同時に当部で毒性試験を実施している dibutyl hydroxy toluene（以下 BHT と略す）を 1.5% 濃度で飼料へ混合し，普通飼料と同様に固型化したものを自由摂取させた．

なお，下表のように実験群を分け，略号を記した．

動物 ＼ 期間	ＪＣＬ—ＳＤ系		ＳＬＣ—ＳＤ系	
	普通飼料	1.5% ＢＨＴ飼料	普通飼料	1.5% ＢＨＴ飼料
飼育　１日	０・Ｊ群		０・Ｓ群	
飼育　１週（７日）	１・Ｊ群		１・Ｓ群	
飼育　２週（14日）	２・Ｊ群	２・Ｊ・Ｔ群（負荷１週）	２・Ｓ群	２・Ｓ・Ｔ群（負荷１週）
飼育　５週（35日）	５・Ｊ群	５・Ｊ・Ｔ群（負荷４週）	５・Ｓ群	５・Ｓ・Ｔ群（負荷４週）

各群とも雌雄各10匹（ただし２・Ｓ，２・Ｓ・Ｔ群雄のみ５匹）とし，一般症状を毎日観察するとともに飼育５週群のみ１日おきに体重を，週２回飼料消費量を測定した．ＢＨＴ負荷後，飼育３週目（飼育17日～20日後，ＢＨＴ負荷10日～13日後）と飼育５週目（飼育29日～32日後，ＢＨＴ負荷22日～25日後）の２回一

定期間飼料のこぼし量をも測定し，平均させ1日飼料摂取量を求め，飼料消費量の変動との関係を調べるとともに，これらの期間の飼料効率を算出した．また，全群とも入室時と屠殺時の体重を測定し，体重増加率を得た．実験結果は可能なものについて統計学的検討を加えた．

細菌学的検査

開腹後，すみやかに盲腸部を摘出し，滅菌シャーレに保存した．盲腸内容物に20倍量の滅菌希釈液（KH_2PO_4 4.5 g, Na_2HPO_4 6.0 g, agar 1.0 g, sodium thioglycollate 0.5 g, 精製水1,000 m*l*, pH 7.0）を加えて乳鉢で磨砕し，これを希釈原液とした．この原液の適当希釈液0.05 m*l* を各選択培地に接種し，発育した集落数から盲腸内容物1 g当りの菌数（対数値）を算定した．選択培地，培養条件は下記に示したとおりで，前島ら[1]の方法に準じて行なった．同時に，内容物も含めた盲腸重量をも測定した．なお，細菌学的検査は飼育1日後雌雄各5匹，飼育2週，5週後それぞれ各4匹について検索を行なった．

Materials and method for the check of bacterial flora

(Object)	(Medium)	(Incubations, 37°C)
Enteric bacteria	DHL agar (Eiken)	aerobic, for 20 hrs
Streptococci	mannite salt agar (Eiken)	aerobic, for 48 hrs
Staphylococci	〃	〃
Bacillus	SF agar	〃
Fungi	potato dextrose agar (Eiken)	〃
Lactobacilli	LBS agar(BBL)	anaerobic, for 72 hrs
Bacteroides	modified NBGT blood agar	〃
Clostridia	NN agar	〃

3. 実験結果

1) 一般症状

全体に1.5%ＢＨＴ添加飼料飼育群（以下ＢＨＴ負荷群と略す）を除いて著明な差は認め難かった．ＢＨＴ負荷群では，添加飼料摂取後すでに報告[2]したように尿の赤変がみられ，下肢部被毛，尾に着色が認められた．しかしながら，ＢＨＴ負荷25日後では軽度の赤変が認められたにすぎなかった．また，るい痩著明で被毛の光沢なく自発運動が抑制され，特にＪ群の飼育5週ＢＨＴ負荷群において全期間中雄5例，雌1例が死亡し，死亡前に皮膚および眼球蒼白，顕著な自発運動抑制，歩行失調，伏臥，意識呼吸が観察され，口，鼻，眼瞼周囲に血痕が付着していた．

入室時，Ｊ，Ｓ群とも下痢軟便症状を呈し，Ｊ群では自発運動昂進，軽度の立毛かつやや疎剛，Ｓ群では動作緩慢がみられたが，翌日には下痢軟便症状は，少例に認められたにすぎなかった．

飼育2週目頃，首周囲，肩甲部，前肢等に限局的脱毛がＪ群の飼育2週ＢＨＴ負荷群雌に3例，Ｓ群の飼育5週ＢＨＴ負荷群雌に5例，Ｓ群の飼育5週ＢＨＴ負荷群雄に2例観察されたが，時間経過とともに回復した．

同じ頃，普通飼料飼育群（以下普通飼料群と略す），ＢＨＴ負荷群のＪ群ラット尾周囲に凹凸の環状隆起が認められ，特に雄では多く約半数にみられたが，この症状も時間経過につれ顕著でなくなった．

普通飼料群は他に特記すべき所見は認められなかった．

2) 死亡時期および死亡率

途中死亡は，全期間でＪ群の飼育5週ＢＨＴ負荷群10例中雄に5例，同群雌に1例みられた（Table Ⅰ）．

Table Ⅰ. The number of deaths and mortality

Group	Death date (days)		Mortality (%)
	Breeding	Loading	
5・J・T・♂	21	13	50
	23	15	
	28	20	
	33	25	
	34	26	
5・J・T・♀	16	8	10

3) 体　重

全群の屠殺時の体重および体重増加率を Fig. 1, Table Ⅱに示した．

体重は，全群雌雄ともＳ群がＪ群を上まわっており，体重増加率では逆を呈した．体重増加は，普通飼料群でＪ，Ｓ群を比較すると雌雄ともＳ群が優位であり，雌では時間経過につれあまり顕著ではなくなった．普通飼料群に対するＢＨＴ負荷群雄は，飼育2週後でＪ群の抑制がＳ群の抑制より強く認められた．雌でも，飼育2週，5週後ともＪ群が強く抑制し，特に2週後では著明な抑制を示した．

体重増加率は普通飼料群雄でＪ群とＳ群を比較すると，飼育1日，1週後まで両群に差を認めないが，飼

育2週，5週後ではJ群が有意に増加していた．雌では飼育1日後，ほぼ同程度の増加率を示したが，時間経過につれ有意にJ群が高率を呈した．普通飼料群に対するBHT負荷群雄は，飼育2週後，J群25,6%，S群18.8%の抑制を示し，飼育5週後でJ群，S群それぞれ34.6%，29.7%の抑制があり，ともに抑制率はJ群が強い傾向を示した．また雌では，飼育2週後のJ群18.4%，S群7.4%，飼育5週後J群13.1%，S群9.4%の抑制率を示し，ともにJ群の抑制が強く飼育2週後で著しかった．

成長過程を経時的に詳細に検討するため，飼育5週群の発育曲線を Fig. 2, Table Ⅲ に示した．体重増加率は，入室時を基準として Fig. 3, Table Ⅳ に記し，飼育1週後を基準とした増加率を Fig. 4, Table Ⅴに示した．

体重増加曲線は，普通飼料群雄でJ，S群を比較すると，S群がJ群を上まわっており，成長につれやや増加差が大きくなる傾向を示した．雄に対し雌では，S群が優位であるが，その差は成長につれ，次第に接近していた．普通飼料群に対するBHT負荷群雌雄とも負荷時より体重増加抑制が著明であり，雄ではJ，S群とも時間経過につれ抑制差が増大したが，雌では負荷時強い抑制を呈し，その後，わずかに増加傾向がみられ，普通飼料群との一定差を保持し続けた．

入室時基準の体重増加率曲線は，普通飼料群雄でJS群を比較すると，飼育3週後まで，ほぼ同程度の増加傾向を呈したが，以後J群の増加率が次第に上まわった．雌はJ群が成長につれS群より大きく増大した．普通飼料群に対するBHT負荷群は，J，S群雌雄とも負荷時から顕著に抑制し，屠殺時の抑制率はJ群が大きかった．両曲線の推移は，時間経過につれ雄で抑制率を大きくしたのに比べ雌はほぼ平行関係を保持していた．

飼育1週後基準の体重増加率曲線は，普通飼料群雄でJ，S群の差異は飼育3週後まで認められないが，その後次第に差を大きくした．雌はJ群がS群を上まわり，飼育2週後から著明な差が認められた．普通飼料群に対するBHT負荷群雄は，J，S群とも抑制が著しく飼育5週後でJ群30.6%，S群28.1%の抑制率を呈した．雌では，雄ほど強い抑制を認めず，普通飼料群とほぼ平行的増加傾向を示し，5週後の抑制率はJ群9.1%，S群6.5%であった．飼育1週後までの増加率は，J，S群に著しい差異を認めなかったが，入室時雌で両群に有意な差がみられた．

4) 飼料消費量，飼料摂取量，飼料効率

本実験では，飼料消費量と飼料摂取量（消費量からこぼし量を減じた量）を区別し，飼料効率は飼料摂取量から求めた．

飼育5週群の飼料消費量変動を1日平均量として，Fig.5, TableⅥ に示した．

普通飼料群は，J，S群とも同程度の消費量増加を認め，雌に比べ雄の消費量が上まわっていた．普通飼料群に対するBHT負荷群は，J，S群雌雄とも摂取後減少がみられBHT負荷1週後で激増し，以後次第に普通飼料群とほぼ同傾向を示した．

飼料消費量を体重比で換算し，Fig. 6, Table Ⅵに示した．

普通飼料群のJ，S群を比較すると，雌雄とも全期間を通じJ群がやや上まわっており，飼育初期では差が大きく漸次両群とも同程度の傾向を示した．一方，BHT負荷群は添加飼料摂取後J，S群雌雄とも一時的に減少したが，その後増加著明で飼育4週後になり普通飼料群と同傾向を認めた．また，J群のBHT負荷群雄の体重比飼料消費量は，負荷2週後まで著しい増加がみられた．

Table Ⅶ は，成長過程での一定期日の体重，飼料，飼料効率を比較したもので，飼料は摂取量で表わし，飼料効率を求めた．

飼育3週目（飼育17日～20日後）雄の飼料摂取量は，J，S群ともそれぞれ普通飼料群とBHT負荷群に差が認められないが，J群よりS群がやや上まわっていた．体重比摂取量は，J，S群のBHT負荷群とも増加しており，J，S群間に差はみられなかった．飼料効率は，普通飼料群でJ，S群を比較するとS群が効率よく，しかしながらBHT負荷群は普通飼料群に比べ抑制がみられたがJ，S群では差が認められなかった．

飼育3週目雌の飼料摂取量は，普通飼料群でJ，S群の差異を認めないが，BHT負荷群でJ，S群とも増加し，特にS群が大きかった．体重比摂取量では，BHT負荷群がJ，S群とも明らかに増加し，飼料効率はJ群がS群に比べ，普通飼料群，BHT負荷群とも高かった．

飼育5週目（飼育29日～32日後）雄の飼料摂取量は，普通飼料群，BHT負荷群ともJ，S群に差を認めないが，J，S群ともBHT負荷群が，わずかに減少し，体重比摂取量では，逆にBHT負荷群が普通飼料群に比べ増加を示した．飼料効率は，J，S群ともBHT負荷群が普通飼料群に比べ減少し，J群では激減した．

飼育5週目雌の飼料摂取量は，全群ともほぼ同量摂取しており，体重比摂取量では，J，S群間に差はなくともにBHT負荷群が軽度の増加を示した．飼料効率は，著しい変動がみられず，しかしながらS群の普通飼料群にわずかな減少を認めたにすぎなかった．

5) 細菌学的検査

盲腸内容物の細菌学的検査の成績をTable Ⅷに示した．

盲腸内細菌叢の検索で，*Fungi*, *Closteridia* はいずれも検出されなかった．また．*Enteric bacteria* は *Coliform* の他に *Proteus*, *Klebsiella* が一部検出されたが，例数が少ないため *Coliform* のみ示した．普通飼料群のJ，S群を比較すると，*Lactobacilli*, *Staphylococci* は飼育1日後でJ群よりS群にわずかに多く検出されたが，雌雄差はみられなかった．*Bacteroides* は，J，S群とも飼育2週，5週後で増加傾向を示した．また *Staphylococci* は，J群に検出されない例が多く，飼育5週後でもその傾向がみられた．BHT負荷群の影響は，普通飼育群に比べ雌雄とも *Coliforms*, *Bacteroides* のグラム陰性桿菌が増加し，*Staphylococci*, *Streptococci* のグラム陽性球菌が減少する傾向がみられた．*Coliforms*, *Bacteroides* ともJ，S群で著明な差異を認めないが，*Bacteroides* は飼育5週後のBHT負荷群で増加がみられた．なお *Staphylococci*, *Streptococci* はともにJ，S群間で差異を認めなかった．盲腸の体重に対する重量比（内容物を含む）は，普通飼料群，BHT負荷群ともJ，S群で差を認めないが，飼育2週後でBHT負荷群の重量がやや減少し，その後飼育5週で増加する傾向を示すのもあった．なお性差は認められなかった．

4. 小括および考察

本報では，毒性研究に汎用されるラットの成長発育過程における種々の性状変化について異なる生育場動物で比較し，その経時的推移を検索した．異なる飼育環境条件下での成長の比較[3]，異なる系での成長発育を比較した報告はみられるが，生育場を異にした同一系ラットを同一環境下で飼育し，動物の性状と生育場段階の両者を関連づけた報告は皆無である．

入室時，体重は雌雄ともS群がJ群をやや全体に上まわっており，運動性の相違も認められた．S群は昭和48年9月19日～20日出生，J群は昭和48年9月17日～19日出生と誕生に若干ずれがあるが，S群の体重が上まわっていることは，離乳時期，飼料，他の生育環境等の相違によるのか，それぞれの動物の本質的な性状か，生育場における抽出基準の作為的差異か明らかでない．入室時の体重から，J，S群の比較は困難であり，また重大な意味も有しないと考える．

一般症状観察で入室時，J，S群とも下痢軟便症状を呈し両群に運動性の差異が認められたことは，動物輸送の所要時間，振動，空調等の輸送環境によると推察される．事実，下痢軟便症状は翌日に軽減していたことから，J，S群の入室後の環境適応性の差異は認め難いと思われる．飼育2週目に脱毛と尾の環状隆起がみられ，前者はBHT負荷群に，後者はJ群のみ呈したのは甚だ興味ある．脱毛は，J，S群ともBHT負荷群にみられたことから，BHTの刺激により誘発されたと考えられるが明らかでない．また，尾の外観変化は寄生害虫等発見されず，散発的であるためJ群特有に具有する性状ではないかと思われる．ともに，成長につれ症状の回復がみられたことから推定すると，成長過程での発育段階に関与する一徴候と考えられる．BHT負荷動物は，J群で雄5例，雌1例が死亡し，死亡前に皮膚，耳殻，眼球蒼白，自発運動抑制，伏臥体位，意識呼吸が観察され，床敷にはほとんどみられなかったが動物の口，鼻，眼瞼周囲に血液の付着が認められた．しかしながら，S群では死亡例を認めず，これらの症状も顕著でなかった．これは明らかにJ，S群間に薬物反応性の差異があり，種々要因の終局的現象として死亡率の差を導いたのであろう．

体重増加は，普通飼料群のJ，S群を比較するとS群が上まわっており，雄では成長につれてやや増加差が大となり，雌では逆を呈していたが，ほぼ両群とも平行的関係であった．体重増加率は，普通飼料群雄で飼育初期のJ，S群に同傾向の増加率を認めたが，雌雄ともJ群が上まわっており，特に雌では増加率差が次第に大きくなった．体重増加率は，比較基準体重と発育曲線の傾きに影響され，絶対重量が上まわっていても一定期間内での増加率を検索すると，明らかにJ群が優位を示すため，体重に関する成長率推移はJ群が大きいと推察される．普通飼料群に対するBHT負荷群のJ，S群を比較すると，ともに強く体重増加，体重増加率を抑制した．体重増加は，雄でJ，S群に著しい抑制差はみられないが，雌はJ群の抑制が強かった．体重増加率で示すと，より明確になり雌雄ともBHT負荷群の抑制率はJ群が強いことから，J群が強い反応性を有していると思われる．

飼料摂取と体重変動との関係を明らかにするため，一定期日内で測定を試みた．普通飼料群でJ，S群を比較すると，雄は3週目（飼育17日～20日後）でS群が飼料効率がよく，これはこの区間での体重増加に基

く可能性を示唆していた．しかしながら，5週目（飼育29日～32日後）ではJ群の飼料効率がわずかではあるがよく，雌においては両区間ともJ群の飼料効率が良であった．これは，成長に関する体重増加率曲線の傾向と一致すると思われる．また，普通飼料群に対するBHT負荷群のJ，S群を比較すると，雄では3週目，5週目ともBHT負荷群の飼料効率が普通飼料群に比べ悪く，3週目ではJ，S群ともほぼ同程度であるが，特に5週目ではJ群が強い抑制を示した．これに対し雌の飼料効率は，3週目のJ群でBHT負荷群が普通飼料群より効率がよかったが，S群では低下し5週目では大差を認めなかった．飼料効率で性差について言及すると，普通飼料群ではJ，S群とも雄が優位であり，BHT負荷時の反応は雄が何れも抑制するのに対し，雌は顕著でなく逆に増加する群もみられた．体重比摂取量で表わすと，普通飼料群ではJ，S群雌雄とも大差なく，BHT負荷群が体重の割に飼料を多量に摂取していた．これは飼料摂取量よりも体重抑制に起因しており，飼料効率と密接な関係があると思われる．これらの知見から体重変動と飼料摂取の関係は，普通飼料群でS群雄3週目が飼料効率よく，5週目および雌ではJ群の成長発育がよいことを推察できる．BHT負荷の影響は，雌でJ群3週目を除いて大差なく，雄はJ，S群とも飼料効率低下し，特に3週目でS群，5週目でJ群のBHT負荷に対し強い抑制率をみせた．

飼料消費量の変動は，一定環境下での動物の嗜好，習性の特徴をも加味したものである．普通飼料群では，J，S群雌雄ともほぼ同量の消費がみられたが，体重比消費量では，J群が飼育初期において多く消費していた．BHT負荷群は，負荷後一時的に消費量が低下し，その後2週間消費量の増加がみられた．これらの変動のうちBHT負荷群の一時的低下は，普通飼料からBHT添加飼料に交換したための嗜好をも加味した生理的欲求に起因すると思われ，また消費量増加はほとんどこぼし量によることから，動物の探索行動の影響とみられる．そしてJ，S群間に質的変動差異はみられず，次第に普通飼料群と同程度の消費量を示して，順応化の一現象と解される．

腸内細菌叢は宿主と密接に関係し，主にvitamin B群[4]，Kの合成[5]，感染防禦等有用な役割を司どる．これらの細菌叢の変化で，*Staphylococci* と *Lactobacilli* は雌雄ともS群に比べJ群でわずかに少ない傾向がみられたが，菌種，菌数とも大差を認め難く生育場由来か明らかでない．また，BHT負荷群でグラム陰性桿菌の増加，グラム陽性球菌の減少，盲腸重量の軽度な変動が認められたが，J，S群間の差異はほとんどないと思われる．

以上の観点から，J，S群間の成長初期における発育の相違および差異をより著明に顕性化させるためBHT負荷を行ない，それらの反応性差異について検討した．普通飼料群は生理的状態での比較であり，成長発育に関して得た統括的知見は，程度の差はあれ，4～9週齢で雌雄ともにJ群の成長発育が旺盛であると推測される．しかしながら，雄では飼育初期で顕著でなかったことから，S群の発育がJ群より早期であり経時的差異が想定される．それらはBHT負荷時の抑制の強さからも明らかである．また，J群に特発した尾の外観変化は発育に関与していると思われる．一般に，ラットのWistar系に比べSD系の発育が活発で大型化していることは，周知の事実である．本実験が示す同一SD系ラットでの若干の発育差異は，甚だ興味あり一考を要するものと思われる．

毒性研究で化学物質の作用およびその発現機序を解明するにあたり，ラット，マウス等の小動物を使用することが多い．これら小動物を屠殺せずに外観的手法により動物個体の変動を把握し，継続的観察を行ない，およそ生体に対する物質の影響を推察することが必要である．本報では，かような外観的手法を一般症状，体重変動，飼料要求，死亡率等について論じた．特に全体としての個体を注視した時，毒性発現が成長発育に及ぼす影響は大きい．一般に幼若動物は成熟動物に比べ，化学物質感受性が高いといわれていることから，J群，S群の反応性の差異は，生育場由来の本質的な特徴より，成長発育のわずかな時期的相違による可能性が示唆される．さらに成熟期前から化学物質を連続投与した時，動物体の内的発育に及ぼす影響は大きく，それ故成熟期の差異が異なる反応性をもたらしたのであろう．したがって単に生育場由来の感受性の相違と考えられるには，成長発育と化学物質の適用時期についてさらに詳細に検索する必要性があると思われる．

成長発育を個体変動の重要な指標とした時，性成熟とともに諸器官の発達をも考慮しなければならない．ラットは生後約3週で離乳し，その間に諸器官の発達はほぼ完成する．それ故，毒性研究に用いるラットの場合，特に性成熟の差異が問題になるであろう．

成長過程の推移は，主に発育曲線および体重増加率曲線で示される．成長発育の目安は何で言及され，各曲線は何を意味するのか．今回の実験でも明らかなよ

うに，発育曲線と体重増加率曲線の優位群は一致していない．したがって，成長発育の比較は両曲線から検討せねばならず，単に発育曲線の傾きで成長発育の大小を視覚的に決定することは困難である．たとえば，絶対重量で示されている発育曲線が明らかに下まわっているJ群で，体重増加率曲線を描くとJ群が上まわり，特に雌のほぼ平行関係と思われる発育曲線では，増加率の差がJ，S群間で顕著に表現されている．そのため，発育曲線の微細な変化が体重増加率の推移に大きく関与すると考えられる．また体重増加率を同程度保持するためには，発育曲線の差が次第に広がる傾向が必要である．発育曲線を検討するにあたり，比較する2曲線の傾きと同時に，基準点の数値をも考慮し，その数値の大小ではなく数値間の差が増加率曲線を決定することを忘れてはならない．Fig. 3, Fig. 4は基準点の1週間の差であるが，それらの増加率曲線の推移を比べると明らかに異なる印象を与えるであろう．かように増加率等を算定する時，基準点の決定意義を明確にし，経時的推移をも考慮する必要がある．

勿論，飼料摂取量の測定が飼料効率を算出する上で重要であり，効率の依存が体重増加によるか，飼料摂取に基づくか検索することも，成長発育を論ずる際に大切である．

加齢に伴い，器官本来の増加でなく，脂肪沈着傾向からも成長発育を捉え，臓器重量等との関連を明らかにするとともに，体重のみの指標にとらわれず，動物の体表面積から成長発育を検索することも今後の課題であろう．

成長発育を身近な見地より述べたが，動物個体の全体的反応としての重要性を一層認識すると同時に，一般症状，体重変動，飼料効率等から有機的な観察が必要である．

さらに毒性研究を実施する際問題になるのは，化学物質感受性の優劣である．生体反応の再現性と均一性を重視する毒性研究[6]では，本実験の如く，ほぼ同週齢の同一系動物を同一環境下で飼育したにもかかわらず，BHT負荷群にJ，S群間で死亡例の差が顕著に認められたことは，動物間の成長発育変動の差によると示唆されるが，重大な意味を含蓄させていることと確信する．

今後，生育場から移動後の環境適応の相違，化学物質の適用時期，種々の負荷試験での反応性の差異をも比較検討し，最良の生体反応の再現性，均一性を得るために実験動物，化学物質の適用時期等を考慮することを余儀なくされるだろう．また，個体差に避け難い必然性を有する生物実験において，実験結果の評価を厳格に注視せねばならないと思われる．

参考文献

1) 前島一叔，前島房子，武田善直，田嶋嘉雄：実験動物，15，54—67 (1966)

2) 平賀興吾，林田志信，市川久次，米山允子，藤井孝，池田虎雄，矢野範男：東京都立衛生研究年報，22，231—249 (1970)

3) 遠藤信夫，小林富士男，藤井治，名古屋隆生，白鳥陽子：実験動物，20，7—13(1971)

4) Wostmann, B. S., Knight P. L. : *J. Nutr*, 74, 103—110 (1961)

5) Gustafsson, B. E. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 78, 166—174 (1959)

6) 柳田知司：東京医学，81，320—323 (1973)

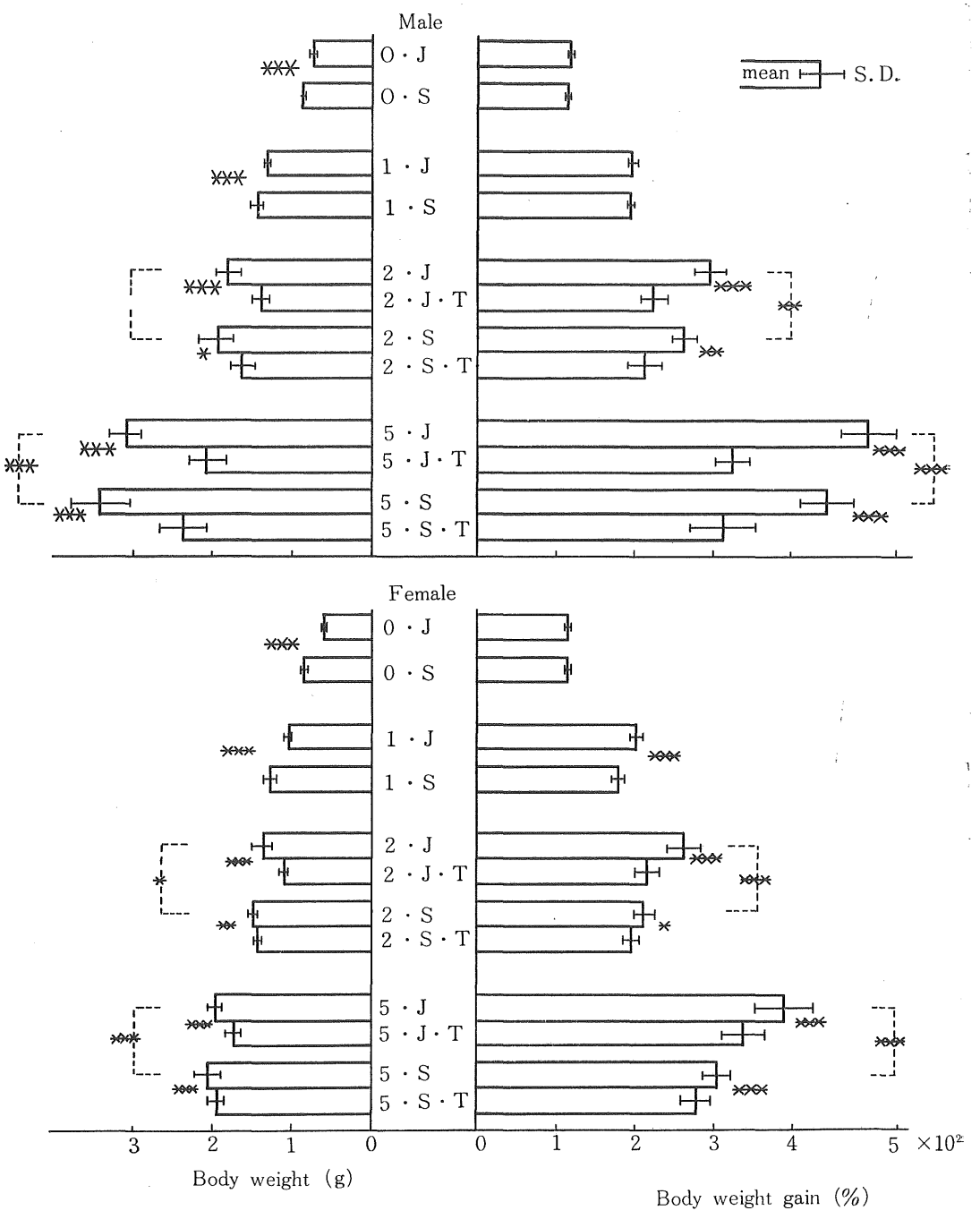


Fig. 1. Relationship between body weight and body weight gain in all groups
* indicates significant difference ($P < 0.05$)
** indicates significant difference ($P < 0.01$)
*** indicates significant difference ($P < 0.001$)

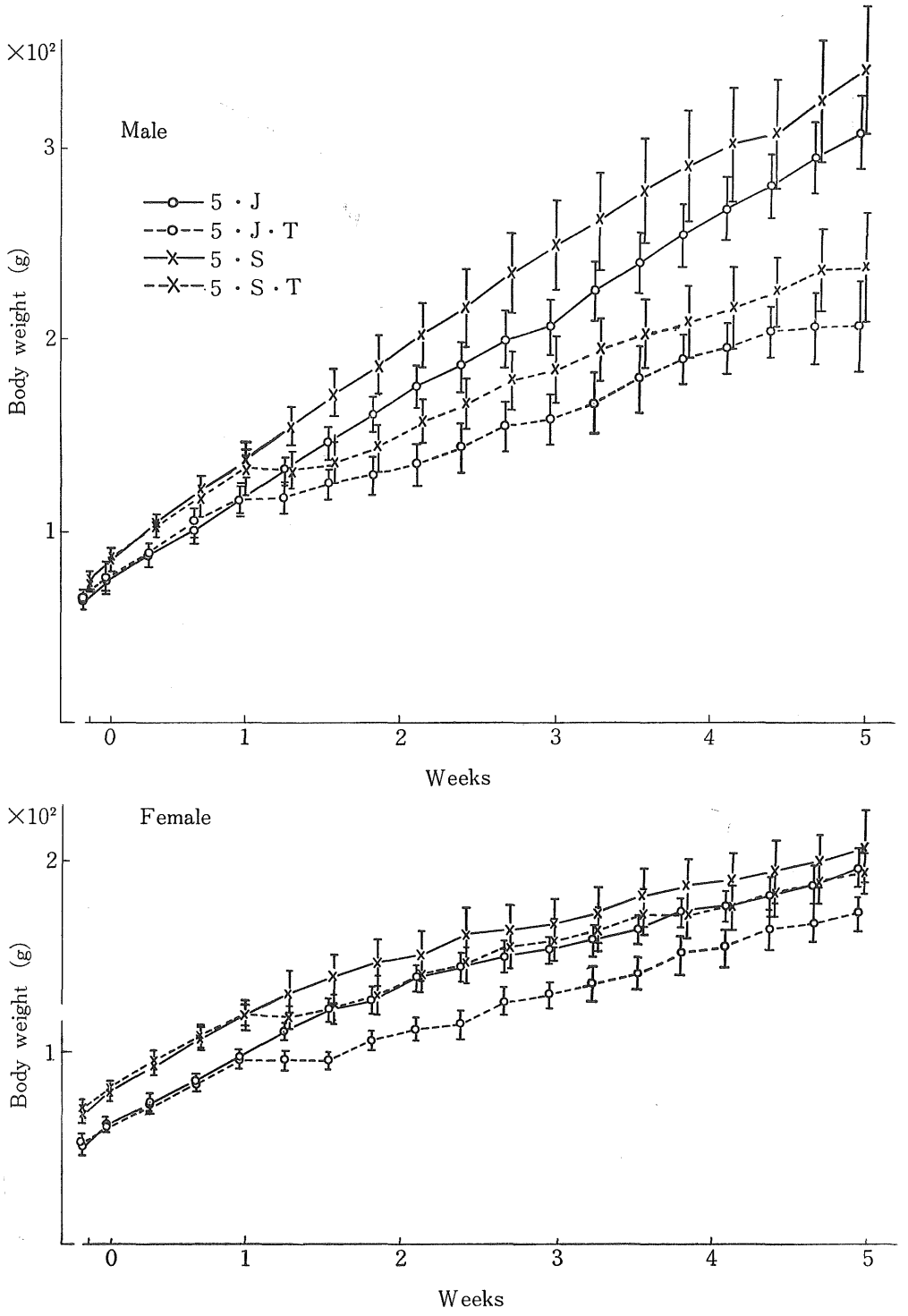


Fig. 2. Curves of increasing body weight

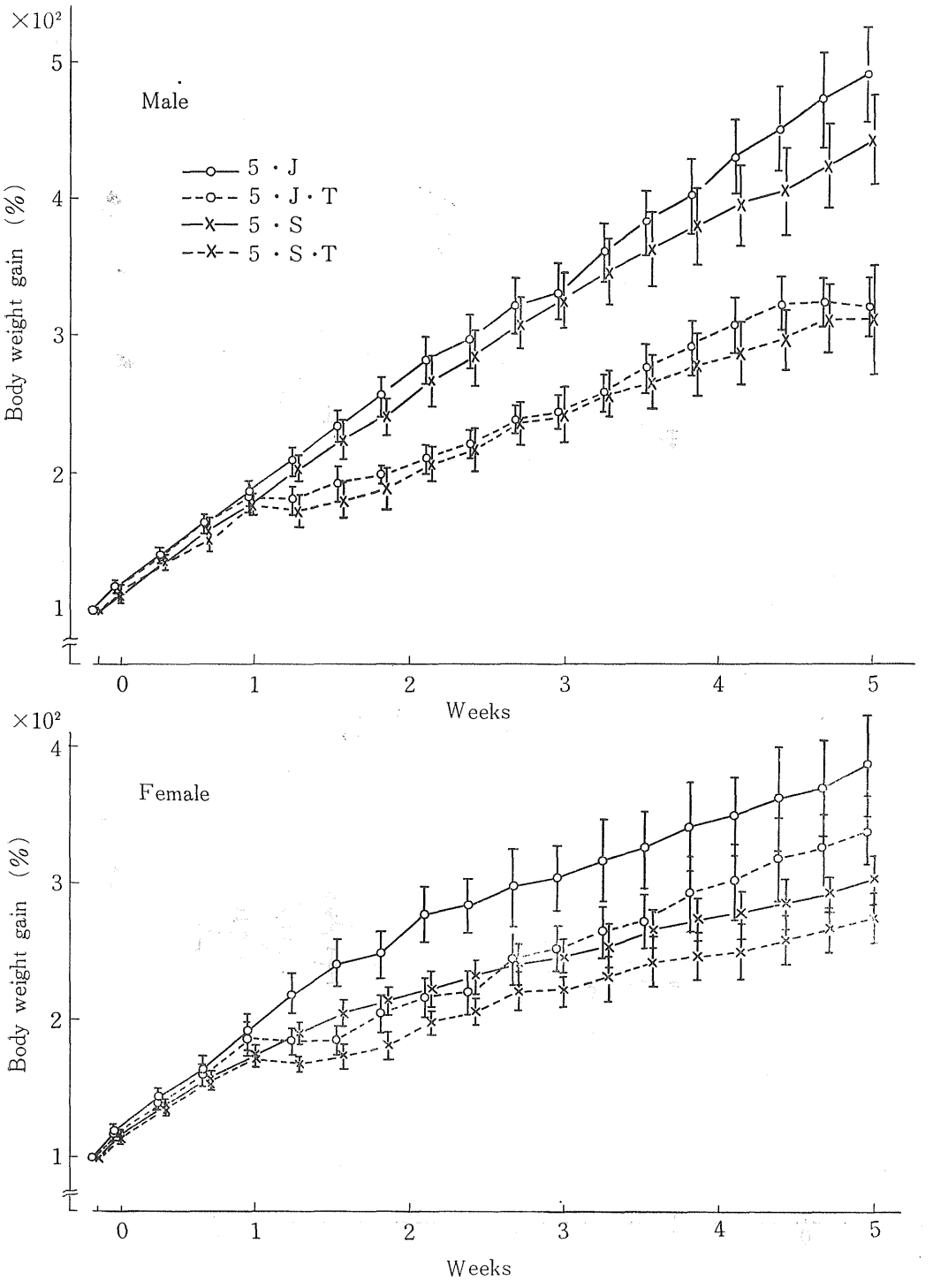


Fig. 3. Changes of body weight gain as compared with initial body weight

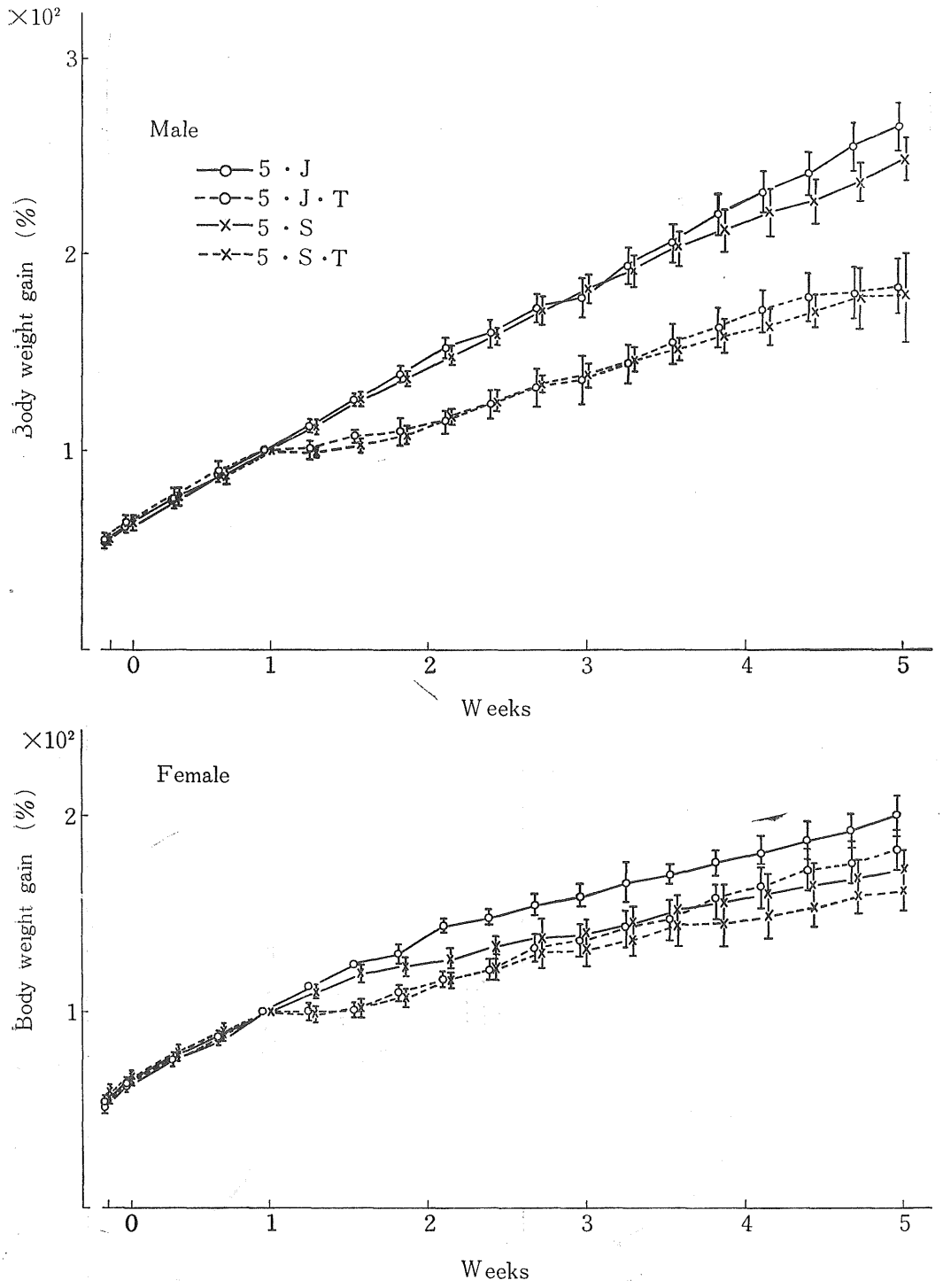


Fig. 4. Changes of body weight gain as compared with 1 week body weight

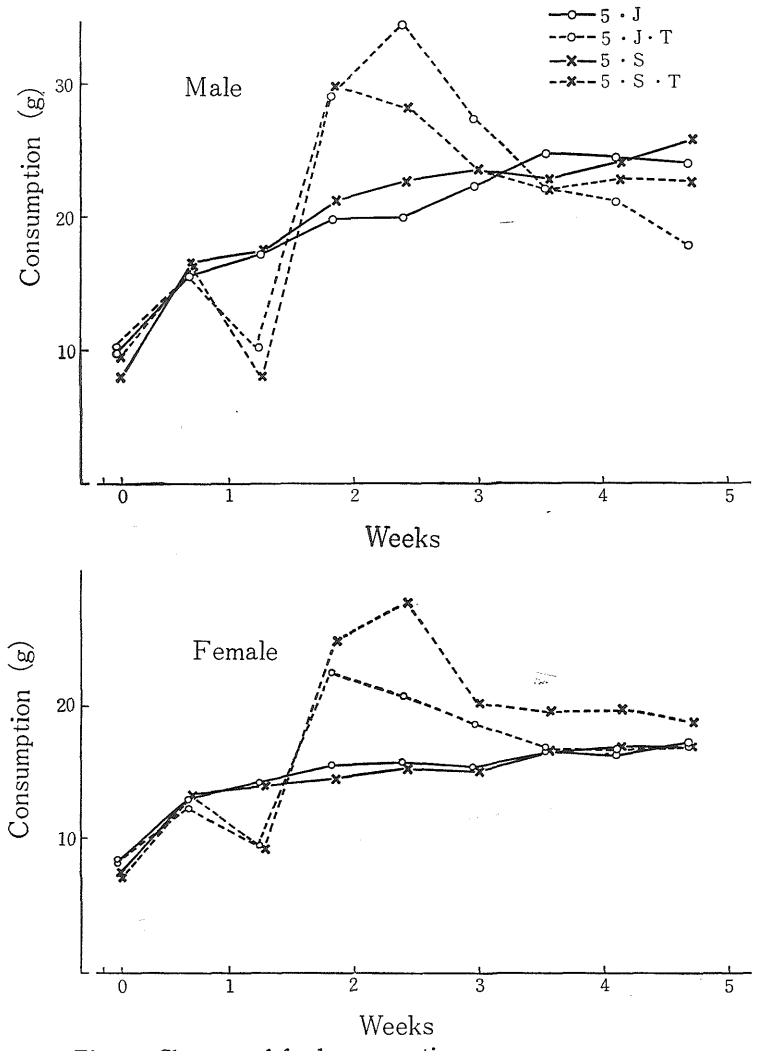


Fig. 5. Changes of food consumption

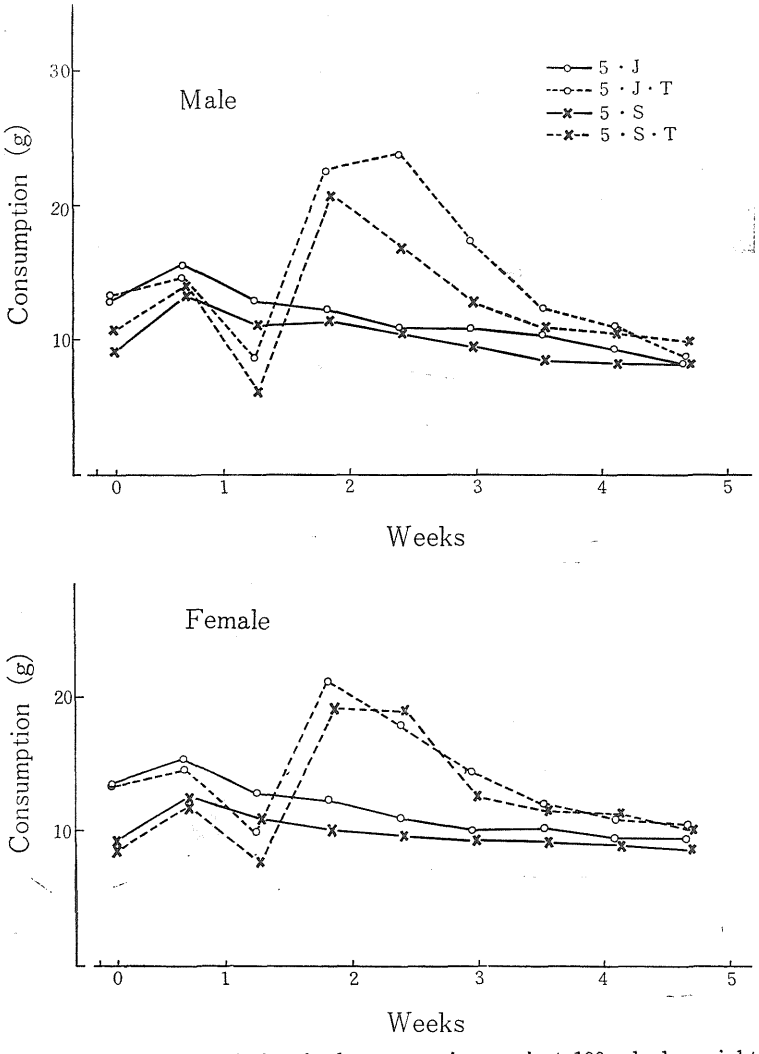


Fig. 6. Changes of relative food consumption against 100 g body weight

Table Ⅱ. Relationship among initial body weight, final body weight and body weight gain in all groups

Group		Male				Female			
		No. of rats	Initial body wt. (g)	Final body wt. (g)	Body wt. gain (%)	No. of rats	Initial body wt. (g)	Final body wt. (g)	Body wt. gain (%)
JCL—SD	0・J	10	63.0±3.58[a)]	73.8± 4.61	117.1± 3.30	10	51.0±2.96	60.6± 2.17	118.9± 4.67
	1・J	10	64.9±2.99	127.9± 3.95	197.3± 7.75	10	50.4±3.80	101.8± 4.77	202.3± 9.45
	2・J	10	61.2±2.81	181.4±13.69	296.4±18.75	10	52.6±4.64	137.7±11.85	262.6±21.94
	2・J・T	10	63.6±3.74	140.0±11.90	220.4±17.92	10	51.3±3.49	109.8± 6.10	214.4±15.01
	5・J	10	62.4±2.67	309.0±18.89	495.8±34.39	10	50.6±3.80	195.6±10.39	388.8±39.50
	5・J・T	10→5	64.7±5.81	206.4±24.04	324.3±20.89	10→9	51.8±2.28	174.0± 8.73	338.0±27.57
SLC—SD	0・S	10	75.2±4.39	87.1± 4.99	115.8± 2.66	10	69.7±2.58	82.0± 3.05	117.6± 3.32
	1・S	10	74.3±5.05	144.7± 9.12	194.8± 5.36	10	70.2±3.48	126.6± 8.07	180.3± 7.74
	2・S	5	73.4±3.71	193.4±19.65	263.2±18.51	10	70.8±3.99	150.4± 7.41	212.9±14.03
	2・S・T	5	76.6±3.43	163.4±13.48	213.8±22.33	10	71.6±4.62	140.8± 5.13	197.1±11.12
	5・S	10	76.6±4.24	341.4±34.15	445.5±34.22	10	68.2±4.21	206.4±17.85	302.7±19.21
	5・S・T	10	76.1±4.31	237.8±29.97	313.2±42.27	10	71.0±3.94	194.5±12.75	274.5±19.22

a) mean ± S.D. Statistical consideration is shown in Table Ⅸ.

Table Ⅲ. Changes of body weight increase

Group		No. of rats	Day 0	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35
Male	5·J	10	62.4 a)	72.9	87.1	100.8	116.3	131.9	146.2	161.6	176.6	186.4	201.5	207.1	226.5	240.0	257.1	270.6	280.6	296.7	309.0
			±2.67	± 3.84	± 4.62	± 5.45	± 7.03	± 7.89	± 8.31	± 8.90	±11.38	±11.73	±14.74	±14.58	±15.26	±16.13	±17.08	±16.74	±17.13	±19.16	±18.89
	5·J·T	10→5	64.7	75.7	89.6	105.3	116.9	118.6	124.4	129.4	135.0	144.6	154.7	158.8	168.0	180.0	188.8	195.7	204.4	206.0	206.4
			±5.81	± 7.60	± 8.04	± 8.16	± 9.02	± 9.15	± 8.07	±10.13	±11.24	±12.21	±12.59	±12.05	±16.42	±17.62	±12.54	±13.11	±12.81	±18.47	±24.04
	5·S	10	76.6	85.5	103.9	120.8	137.4	155.9	172.8	186.4	203.3	218.8	236.0	251.4	264.9	279.6	292.0	304.0	311.1	327.7	341.4
			±4.24	±5.75	± 6.96	± 8.12	± 9.41	±11.12	±13.40	±15.26	±19.27	±20.76	±22.50	±23.57	±26.15	±28.09	±29.29	±31.28	±31.42	±32.28	±34.15
	5·S·T	10	76.1	86.6	103.4	115.4	133.8	132.2	136.1	144.2	157.8	167.3	179.9	185.4	196.4	203.4	211.5	218.9	228.2	237.7	237.8
			±4.31	± 5.14	± 6.63	±11.07	±10.87	±10.69	±10.52	±11.79	±11.29	±13.38	±14.70	±17.68	±16.64	±17.87	±19.20	±20.43	±19.07	±21.82	±29.97
Female	5·J	10	50.6	60.7	73.6	83.5	97.4	110.9	121.7	126.2	139.9	144.3	150.1	153.5	159.4	165.0	172.1	176.4	182.4	187.0	195.6
			±3.80	± 2.98	± 3.56	± 3.56	± 3.86	± 5.06	± 5.71	± 7.19	± 6.95	± 7.03	± 8.17	± 7.45	± 8.53	± 7.63	± 7.72	± 8.22	±10.73	± 9.35	±10.39
	5·J·T	10→9	51.8	60.6	72.3	82.8	95.7	95.8	96.1	106.0	111.9	114.6	126.4	129.7	136.5	141.0	151.6	156.3	164.3	167.3	174.0
			±2.28	± 1.42	± 3.19	± 2.85	± 3.12	± 4.84	± 4.25	± 4.80	± 6.04	± 7.61	± 7.22	± 8.08	±10.46	± 8.84	±10.61	± 9.96	±10.55	±10.65	± 8.73
	5·S	10	68.2	80.0	93.6	107.1	119.2	130.9	140.0	146.6	151.2	158.9	164.0	166.6	172.8	180.7	186.5	190.2	195.0	199.9	206.4
			±4.21	± 5.29	± 5.36	± 6.74	± 7.84	± 9.10	± 9.56	±12.27	±13.55	±14.30	±13.50	±13.55	±14.47	±16.72	±15.40	±14.41	±17.60	±14.29	±17.85
	5·S·T	10	71.0	82.1	95.9	108.7	120.2	119.4	123.0	130.0	141.1	147.3	157.0	158.4	164.6	172.6	173.3	177.9	183.7	190.0	194.5
			±3.94	± 5.02	± 5.20	± 5.69	± 5.95	± 5.73	± 7.22	± 9.45	± 9.55	±10.17	±12.27	±11.22	±11.37	±12.22	±12.65	±13.52	±11.84	±11.68	±12.75

a) mean(g)
±S.D.

Table Ⅳ. Changes of body weight gain as compared with initial body weight

Group		No. of rats	Day 0	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35
Male	5·J	10	100	a) 116.8	139.6	161.5	186.4	211.3	234.4	259.1	283.1	299.0	323.1	332.0	363.1	384.9	412.3	434.1	450.1	476.0	495.8
				± 2.81	± 5.16	± 6.44	± 9.14	± 9.25	±11.88	±14.17	±16.63	±19.82	±23.35	±21.10	±22.61	±25.43	±28.01	±29.37	±28.78	±34.62	±34.39
	5·J·T	10→5	100	116.8	138.4	162.8	181.0	183.5	192.8	200.0	208.7	223.6	239.3	247.4	259.0	277.7	292.2	311.4	325.3	327.1	324.3
				± 2.70	± 4.08	± 4.83	±12.25	±10.42	±12.87	± 5.70	±10.03	±10.00	±11.58	±12.65	±14.22	±16.22	±21.95	±21.66	±21.43	±19.57	±20.89
	5·S	10	100	111.5	135.6	157.7	179.3	203.6	225.6	243.3	265.3	285.5	307.9	328.1	345.8	364.8	381.0	396.7	406.0	427.6	445.5
				± 2.37	± 4.21	± 6.38	± 7.60	±11.26	±13.27	±15.20	±19.40	±20.45	±22.29	±23.89	±26.80	±28.20	±29.13	±31.37	±31.86	±31.44	±34.22
	5·S·T	10	100	113.7	135.8	151.8	175.7	173.6	178.9	189.5	207.4	219.8	236.4	243.6	258.1	267.2	278.0	287.7	299.8	312.2	313.2
				± 4.17	± 5.43	±13.81	±10.90	±10.98	±12.69	±14.46	±13.65	±15.29	±16.49	±20.88	±18.68	±20.16	±23.62	±24.77	±21.42	±24.29	±42.27
Female	5·J	10	100	120.1	145.8	165.5	193.2	219.9	241.5	250.2	277.6	286.3	298.2	304.8	316.7	327.8	342.1	350.4	362.6	371.6	388.8
				± 4.06	± 6.77	± 9.35	±13.32	±14.85	±18.22	±17.53	±22.22	±21.56	±28.46	±27.02	±31.49	±29.81	±34.00	±31.05	±38.49	±36.09	±39.50
	5·J·T	10→9	100	116.9	139.5	160.0	184.8	185.0	185.6	204.7	216.0	222.6	245.5	252.1	264.9	273.6	294.6	304.0	319.2	325.2	338.0
				± 3.20	± 6.37	± 6.83	± 8.78	± 8.95	±10.96	±11.65	±12.64	±16.03	±19.52	±18.80	±22.46	±19.51	±27.86	±27.16	±29.35	±27.37	±27.57
	5·S	10	100	117.3	137.4	157.1	174.8	192.0	205.3	214.8	221.6	232.8	240.6	244.2	253.4	264.7	273.6	279.1	285.9	293.2	302.7
				± 4.31	± 4.19	± 5.54	± 6.00	± 7.90	± 9.26	±10.08	±12.99	±12.38	±14.97	±12.33	±15.60	±14.84	±17.23	±17.59	±18.92	±14.43	±19.21
	5·S·T	10	100	115.6	135.1	153.1	169.3	168.2	173.4	183.1	198.7	207.5	221.2	223.2	232.2	243.4	244.5	251.0	259.2	267.0	274.3
				± 3.81	± 2.70	± 3.79	± 3.90	± 4.30	± 8.69	±10.13	± 8.47	±10.48	±13.69	±13.85	±16.83	±17.89	±19.50	±20.28	±18.71	±16.65	±19.22

a) mean (%)
±S.D.

Table V. Changes of body weight gain as compared with 1 week body weight

Group		No. of rats	Day 0	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35
Male	5·J	10	53.7 a)	62.7	74.9	86.7	100	113.4	125.7	139.0	151.8	160.3	173.2	178.2	194.8	206.4	221.1	232.8	241.4	255.3	265.9
			±2.62	± 2.22	± 1.29	± 1.21		± 1.78	± 2.23	± 3.31	± 4.29	± 6.16	± 7.41	± 9.65	± 9.21	± 9.86	± 9.80	±10.53	±11.09	±12.06	±12.00
	5·J·T	10→5	55.4	64.8	76.7	90.2	100	101.5	106.5	110.8	115.5	123.8	132.6	136.4	144.9	155.3	163.1	171.7	179.5	180.5	183.7
			±3.80	± 4.60	± 5.24	± 5.04		± 4.40	± 1.99	± 6.42	± 5.44	± 7.65	± 9.32	±12.60	±10.24	±10.65	±10.05	±10.98	±12.88	±12.67	±14.83
	5·S	10	55.8	62.2	75.6	87.9	100	113.4	125.0	135.5	147.7	159.0	171.5	182.7	192.5	203.2	212.2	220.9	226.1	238.1	248.1
			±2.40	± 2.04	± 1.27	± 1.10		± 2.11	± 3.17	± 3.70	± 5.31	± 5.59	± 6.42	± 6.86	± 8.69	± 9.62	± 9.83	±11.26	±11.02	±10.44	±11.50
	5·S·T	10	57.1	64.8	77.4	86.2	100	98.8	101.7	107.8	118.0	125.1	134.4	138.5	146.7	152.0	158.1	163.7	170.6	178.1	178.4
			±3.85	±2.07	± 3.29	± 4.76		± 1.61	± 2.90	± 3.68	± 3.11	± 4.06	± 3.03	± 5.75	± 5.90	± 5.90	± 8.02	± 9.99	± 8.30	±16.74	±22.74
Female	5·J	10	51.9	62.3	75.5	85.7	100	113.8	124.9	129.5	143.6	148.1	154.1	157.5	165.8	169.4	176.8	181.1	187.3	192.1	200.9
			±3.64	± 2.90	± 2.41	± 1.27		± 1.08	± 1.96	± 4.58	± 3.13	± 4.16	± 6.40	± 4.19	±11.70	± 5.69	± 7.64	± 6.57	± 9.72	± 8.82	±11.04
	5·J·T	10→9	54.2	63.3	75.5	86.5	100	100.0	100.3	110.7	116.8	120.1	132.6	136.1	143.3	148.0	159.1	164.0	172.4	175.5	182.6
			±2.58	± 2.08	± 2.90	± 1.50		± 2.59	± 2.02	± 3.09	± 4.11	± 4.96	± 6.09	± 8.62	±10.97	± 9.41	±11.47	±10.53	±10.75	±11.02	±10.18
	5·S	10	57.2	67.1	78.6	89.8	100	109.8	117.4	122.9	126.7	133.2	137.6	139.7	144.9	151.5	156.5	159.7	163.6	167.8	173.2
			±1.97	± 1.94	± 1.77	± 2.39		± 2.65	± 3.80	± 4.75	± 6.45	± 6.41	± 7.89	± 6.60	± 8.77	± 8.25	± 9.79	± 9.42	±10.98	± 9.01	±11.68
	5·S·T	10	59.0	68.2	79.7	90.4	100	99.3	102.3	108.0	117.3	122.4	130.5	131.7	137.0	143.6	144.2	148.1	152.9	158.1	161.9
			±1.35	± 1.65	± 1.45	± 1.78		± 2.22	± 3.32	± 4.07	± 3.32	± 4.22	± 6.46	± 6.58	± 8.33	± 9.08	± 9.73	±10.09	± 9.28	± 7.82	± 9.12

a) mean (%)
±S.D.

Statistical consideration is shown in Table IX.

Table VI. Changes of food consumption and relative food consumption

Group		No. of rats	Days								
			1	5	6	13	17	21	25	29	33
Male	5・J	10	9.7[a)]	15.6	17.0	19.8	19.8	22.3	24.7	24.4	24.0
			13.3	15.4	12.8	12.2	10.6	10.7	10.2	9.0	8.0
	5・J・T	10→5	10.2	15.6	10.1	29.0	34.4	27.2	22.1	21.2	17.8
			13.4	14.8	8.5	22.4	23.7	17.1	12.2	10.8	8.6
	5・S	10	7.9	16.5	17.4	21.1	22.9	23.6	22.8	24.1	25.7
			9.2	13.6	11.1	11.3	10.4	9.3	8.1	7.9	7.8
	5・S・T	10	9.3	16.3	7.9	29.9	28.2	23.4	21.9	22.6	22.7
			10.7	14.1	5.9	20.7	16.8	12.6	10.7	10.3	9.5
Female	5・J	10	8.3	12.9	14.1	15.5	15.7	15.3	16.5	16.3	17.1
			13.6	15.4	12.7	12.2	10.8	9.9	10.0	9.2	9.1
	5・J・T	10→9	8.2	12.1	9.4	22.5	20.7	18.7	16.8	16.7	16.9
			13.5	14.6	9.8	21.2	18.0	14.4	11.9	10.6	10.1
	5・S	10	7.3	13.3	14.0	14.4	15.2	15.1	16.6	16.9	16.9
			9.1	12.4	10.7	9.8	9.5	9.0	9.1	8.8	8.4
	5・S・T	10	7.0	13.1	9.1	25.0	27.9	20.1	19.6	19.9	18.9
			8.5	12.0	7.6	19.2	18.9	12.6	11.3	11.1	9.9

a) $\frac{\text{mean consumption(g)/rat /day}}{\text{mean consumption(g)/100 g rat B.W./day}}$

Table Ⅶ. Relationship among body weight, body weight gain and food intake

Group		No. of rats	Body wt. (g)			Body wt. gain (%)		Food intake rat/day(g)		Food intake 100g B.W./day(g)		17 days～20 days			29 days～32 days		
			Initial	17days	29 days	17days	29days	17days	29 days	17days	29days	Gained B.W.(g)	Food intake (g)	Food efficiency (%)	Gained B.W.(g)	Food intake (g)	Food efficiency (%)
Male	5・J	10	62.4[a)] ±2.67	186.4 ±11.73	270.6 ±16.74	299.0 ±19.82	434.1 ±29.37	17.9	21.1	9.6	7.8	20.7	71.6	28.9	26.1	84.4	30.9
	5・J・T	10→7	64.7 ±5.81	144.6 ±12.21	195.7 ±13.11	223.6 ±10.00	311.4 ±21.66	17.5	18.1	12.1	9.2	14.2	70.0	20.2	10.3	72.4	14.2
	5・S	10	76.6 ±4.24	218.8 ±20.76	304.0 ±31.28	285.5 ±20.45	396.7 ±31.37	20.7	21.2	9.4	6.9	32.6	82.8	39.3	23.7	84.8	27.9
	5・S・T	10	76.1 ±4.31	167.3 ±13.38	218.9 ±20.43	219.8 ±15.29	287.7 ±24.77	21.9	18.7	13.0	8.5	18.1	87.6	20.6	18.8	74.8	25.1
Female	5・J	10	50.6 ±3.80	144.3 ±7.03	176.4 ±8.22	286.3 ±21.56	350.4 ±31.05	13.5	14.5	9.3	8.2	9.2	54.0	17.0	10.6	58.0	18.2
	5・J・T	10→9	51.8 ±2.28	114.6 ±7.61	156.3 ±9.96	222.6 ±16.03	304.0 ±27.16	15.1	14.9	13.1	9.5	15.1	60.4	25.0	11.0	59.6	18.4
	5・S	10	68.2 ±4.21	158.9 ±14.30	190.2 ±14.41	232.8 ±12.38	279.1 ±17.59	13.8	15.0	8.6	7.8	7.7	55.2	13.9	9.7	60.0	16.1
	5・S・T	10	70.0 ±3.94	147.3 ±10.17	177.9 ±13.52	207.5 ±10.48	251.0 ±20.28	22.9	16.0	15.5	8.9	11.1	91.6	12.1	12.1	64.0	18.9

a) mean ±S.D.

Statistical consideration is shown in Table IX.

Table Ⅷ . Bacterial flora of the cecal contents

	Group	No. of sample	Cecal weight g/100g B.W.	*Coliforms*	*Streptococci*	*Staphylococci*	*Bacillus*	*Lactobacilli*	*Bacteroides*
Male	0・J	5	1.7±0.6[a]	6.9±1.1	4.9±0.3	4.0±0.6	4.5±0.3	8.3±0.4	7.9±6.0
	0・S	5	2.6±0.7	6.7±1.7	4.9±0.7	4.3±0.7	4.4±0.5	9.2±0.4	7.5±0.2
	2・S	4	1.8±0.7	6.4±0.5	4.3±0.4	3.5±0.0[b](2)	4.2±0.1	9.0±0.3	8.6±0.5
	2・J・T	4	1.6±0.2	6.9±0.5	3.8±0.3(3)	3.3 (1)	4.3±0.2	9.1±0.4	8.8±0.5
	2・S	4	2.3±0.6	5.1±1.2	4.3±0.7	5.2±1.0	4.1±0.9	9.3±0.1	8.2±0.2
	2・S・T	4	2.2±0.4	6.9±1.5	4.3±0.7	3.9±0.5	4.1±0.2	8.9±0.4	8.5±0.3
	5・J	4	1.7±0.2	6.2±0.4	4.7±0.5	5.4±0.5	5.4±0.2(3)	8.9±0.4	8.5±0.3
	5・J・T	4	2.3±0.7	6.8±0.9	4.4±0.7	3.9±0.2	5.3±0.2	8.6±0.6	9.1±0.4
	5・S	4	1.8±0.3	6.1±0.6(3)	5.0±0.7	5.2±0.7	4.9±0.6	9.3±0.1	7.9±0.4
	5・S・T	4	2.4±0.6	7.4±1.3	4.5±0.5	3.9±0.7	4.4±1.2	8.6±0.3	9.2±0.4
Female	0・J	5	1.5±0.4	6.8±0.7	4.8±0.3	3.2±0.0(2)	4.5±0.5	8.5±0.3	7.9±0.5
	0・S	5	1.7±0.2	6.3±1.2(4)	5.1±0.6	4.2±0.1	4.0±0.4	9.1±0.3	7.5±0.2
	2・J	4	2.0±0.8	6.1±0.5	3.7±0.9	<4×10^{-2}[c]	5.2±0.6	9.1±0.2	8.7±0.1
	2・J・T	4	1.7±0.4	6.9±1.0	3.9±0.0	<4×10^{-2}	4.5±0.6	9.0±0.3	8.7±0.4
	2・S	4	1.8±0.3	5.9±0.7	5.3±0.9	4.1±0.7	4.0±0.3	8.9±0.3	8.3±0.1
	2・S・T	4	2.4±0.3	5.5±0.5(3)	4.0±0.6(2)	4.0±0.6(3)	4.3±0.3	9.3±0.3	8.8±0.1
	5・J	4	1.9±0.4	6.3±0.2	5.0±0.3	3.8 (1)	5.3±0.1	8.5±0.6	8.5±0.8
	5・J・T	4	3.2±1.1	7.4±0.8	4.5±0.3	3.2±0.4(3)	4.3±0.8	8.6±0.3	9.1±0.3
	5・S	4	1.9±0.2	6.2±0.3	5.6±0.3	4.2±0.2	4.8±0.8	9.0±0.4	8.4±0.2
	5・S・T	4	2.9±0.2	7.1±1.4	4.6±0.2(3)	3.8±0.7	4.9±0.4	8.7±0.4	9.2±0.2

a) Mean of logarithmic count per g cecal contents with S.D.
b) No. of positive culture in 4×10^{-2} g cecal contents
c) Negative in 4×10^{-2}g cecal contents of all rats

Table Ⅸ. Statistical consideration of Table Ⅱ and Table Ⅶ

	Comparative groups	Initial B. W.	17 days B.W.	17 days B.W. gain	29 days B.W.	29 days B.W. gain	Final B.W.	Final B.W. 8 M
Male	0・J—0・S	* * *					* * *	
	1・J—1・S	* * *					* * *	
	2・J—2・S	* * *						* *
	2・J—2・J・T						* * *	* * *
	2・S—2・S・T						*	* *
	5・J—5・S	* * *	* * *		*	*	* * *	* * *
	5・J—5・J・T		* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
	5・S—5・S・T		* * *	* * *	* * *	* * *	* * *	* * *
Female	0・J—0・S	* * *					* * *	
	1・J—1・S	* * *					* * *	
	2・J—2・S	* * *					*	
	2・J—2・J・T						* * *	* * *
	2・S—2・S・T						* *	* * *
	5・J—5・S	* * *	*	* * *	*	* * *	* * *	* * *
	5・J—5・J・T		* * *	* * *	* * *	* *	* * *	*
	5・S—5・S・T			* * *		* *	* * *	* * *

Statistical consideration of Table Ⅴ

	Comparative groups	Initial B.W.gain	Final B.W. gain
Male	5・J—5・S		* *
	5・J—5・J・T		* * *
	5・S—5・S・T		* * *
Female	5・J—5・S	* * *	* * *
	5・J—5・J・T		* *
	5・S—5・S・T	*	*

* indicates significant difference ($p<0.05$)

* * indicates significant difference ($p<0.01$)

* * * indicates significant difference ($p<0.001$)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 577 — 598, 1974

毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究

II. 生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に臓器重量について

坂本義光* 三栗谷久敏* 矢野範男* 吉田誠二* 平賀興吾*

Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches

II. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Organ Weight Changes

YOSHIMITSU SAKAMOTO*, HISATOSHI MIKURIYA*, NORIO YANO*, SEIJI YOSHIDA* AND KOGO HIRAGA*

1. 緒　言

第Ⅰ報序論で述べたように，今回異った生育場から得られた同一系のラットの成育過程での基礎的性状について多方面から検索した．

本報ではその一環として毒性実験によって得られる結果のうち，最も基本的な臓器重量について，その動物の成長に伴なう推移のパターンおよび薬物の負荷によるその変動のしかたを，2種の生育場のラットについて比較検討することによって，日常実験に使用するラットの性格をよりよく知り，動物実験の計画実施および結果の判定の参考にしたいと考えた．

2. 実験方法

普通飼料によって飼育した JCL-SD系 および SLC-SD 系の雌雄（各4週齢）のラット（以後これらをまとめて普通飼料群と略す）を，飼育1日，および1, 2, 5週間後に，各々断頭，放血屠殺し，解剖，剖検後，各臓器重量を測定した．

また飼育1週間後より BHT を負荷し，負荷1週間，4週間後の各ラットについて普通飼料群と同様に臓器重量の測定を行い，各々，普通飼料飼育2週間および5週間のラットを対照群として比較した．

飼育期間と，各群の関係は次のとおりである．

	群の略号	飼育期間	群の略号（普通飼料群）	飼育期間負荷期間	群の略号
JCL—SD系	J 群	1日間	0・J		
		1週間	1・J		
		2週間	2・J	2週間 1週間	2・J・T
		5週間	5・J	5週間 4週間	5・J・T
SLC—SD系	S 群	1日間	0・S		
		1週間	1・S		
		2週間	2・S	2週間 1週間	2・S・T
		5週間	5・S	5週間 4週間	5・S・T

なお，飼育条件，実験条件の詳細は第Ⅰ報にゆずる．

重量を測定した臓器は，脳，下垂体，胸腺，心，肝，肺，腎，脾，副腎，精巣，卵巣で，絶対重量，さらに各屠殺時の体重および脳重量にもとづき，100 g 体重当りと100 g 脳重量当りの重量を求めた．

なお普通飼料群の臓器重量の推移は，Fig. 1～Fig.

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

20に示した．さらにＢＨＴ負荷群の臓器重量は Fig. 21～Fig. 31 に示し，両群の各数値は Table Ⅰ～Ⅷ にまとめて示し，結果にはすべて推計学的検討を加えた．

3. 実験結果

1) 普通飼料群の臓器重量

脳．Fig. 1, 2 に示すように雌雄の脳重量の推移は他の臓器に比べ，その重量増加曲線の傾きは小さく漸次水平に近づく傾向を示した．体重比は飼育後１日から２週間までに大きく下降した．Table Ⅰ～Ⅷに示すようにＳ群の飼育後１日目および１週間後の絶対重量は，Ｊ群に比べ大きく，特にＳ群雌ではほぼ全期間を通して大きかった．体重比は飼育後１日および１週間までは雌雄ともＪ群で大きかったが，２週間以後は，Ｊ群，Ｓ群には雌雄とも差がみられなかった．

心臓，肺，肝臓，腎臓，精巣・Fig. 3～10および Fig. 19に示すように雄の各臓器は絶対重量が，ほぼ直線的に増加する傾向を示し，肺では，飼育２週間以後，その割合は減少する傾向を示した．体重比は，肝臓，腎臓，心臓では経時的に減少する傾向を示したが，肺では，特にそれが顕著であった．精巣は２週間以後やや減少する傾向を示した．また雌の各臓器の絶対重量の推移は，Ｊ群，Ｓ群とも，雄に比べ飼育１日後から漸次，その増加の割合は減少する傾向を示し，体重比は雄同様やや下降するパターンを示した．

脳重量比の推移は雌雄とも絶対重量に比べその傾きはやや小さいが，ほぼ絶対重量の増加曲線と相似なパターンを示した．

Ｊ群とＳ群を比較すると，Table Ⅰ～Ⅷに示すように，雄の心臓，雌の心臓，肝臓では，体重比では差がなかったが，絶対重量はＪ群ではＳ群に比べ小さかった．しかし各図に示されるように飼育１日目から１週間後までの，増加曲線の傾きがＳ群に比べＪ群で大きく，飼育後１週間の体重比でも，Ｓ群に比べ大きな値を示し，肺でも同様な傾向を示した．しかし飼育後１週間から２週間までの雄の心臓，肺，雌の肝臓の体重比の推移は，Ｊ群で減少の傾向を示したのに対しＳ群では変化がなく曲線の傾きは水平であった．また雌の心臓，肺でも体重比は減少の傾向を示すがＳ群に比べＪ群では絶対重量の推移がほぼＳ群に等しいが減少の傾向を示した．さらに２週間以後，雌雄の肺，雄の心臓では，絶対重量の推移が，Ｓ群に比べＪ群で増加の傾向を示した．

雄の肝臓（Fig. 7），精巣（Fig. 19），および雌雄の腎臓（Fig. 9, 10）では，飼育後１日および１週間後では，体重比に差がなかったが絶対重量はＳ群に比べＪ群で小さかったが，２週間後までにその差はなくなった．肝臓では，２週以後Ｓ群でその絶対重量が増加する傾向を示した．

脾臓．Fig. 11に示すように雄の脾臓は，飼育１日後から２週間までの絶対重量の推移の傾向は，前述の臓器と同様の傾向であるが，その後，重量増加は，ほとんど見られず，雌でも Fig. 12 に示すように同様の傾向であった．またＪ群では，雌雄ともＳ群に比べ，飼育１日後および１週間後の絶対重量および体重比が大きかった．しかしＳ群では雌雄とも１週間から２週間にかけての絶対量重の増加が大きく２週間でＪ群と等しくなった．また体重比はＪ群で減少したのに対し，Ｓ群では，変化がなかった．飼育後２週間以後は，Ｊ群，Ｓ群に差はみられなかった．

胸腺．Fig. 13, 14 に示すように，重量の推移の傾向は脾臓のそれに似ているが，雌雄の臓器の飼育後１日の絶対重量は．Ｓ群に比べＪ群で小さかったが，飼育後１週間から２週間までの増加の割合が大きく，１週間目の体重はＳ群に比べＪ群で有意に大きく，絶対重量も大きな傾向を示した．さらに雄では飼育１週間後から２週間までの増加の割合が，Ｓ群で大きく，体重比もＪ群では減少したのに対し，Ｓ群では増加の傾向を示し，２週間目の絶対重量でも大きな傾向を示した．また雌では体重比は，両群とも減少しているが，その割合はＪ群で大きかった．

下垂体，副腎，卵巣．Fig. 15～18および Fig. 20に示すように，これらの臓器の重量の推移の傾向は他の臓器と異った傾向を示した．経時的に重量増加はしているが飼育後１週間から２週間までの絶対重量の増加曲線の傾きが，他の期間に比べ大きく，特に雌では，この期間の推移が顕著であって，２週間目および５週間目の絶対重量は雄に比べ大きかった．また雌の下垂体，副腎の絶対重量は，飼育後１日では，Ｓ群に比べＪ群で小さかったが１週間目までの増加曲線の傾きはＪ群で大きく，特に下垂体では，飼育後１週間の絶対重量はＳ群と等しく，体重比はＳ群で減少したがＪ群ではその割合が小さかった．副腎では体重比には差がなかった．

さらに雌の副腎，下垂体では，飼育後１週間から２週間ではＳ群の絶対重量および体重比の推移は増加の傾向を示し，卵巣でも同様な傾向を示した．また雄の各臓器の推移のパターンはＳ群雄の心臓，肺の重量の推移と似ていた．

2) ＢＨＴ負荷群の臓器重量

脳．Fig. 21 に示すようにJ群雄ではBHT負荷1週間および4週間後の絶対重量が各対照群に比べ有意に小さく，S群雄での同様の傾向を示した．体重比は，両群とも各BHT負荷群で対照群に比べ，極めて大きい値を示し，特に1週間負荷J群ではS群に比べその割合が大きかった．雌では，J群，S群ともに対照群に比べ絶対重量は小さいが，その差は雄より少なく，4週間負荷群のJ群のみが有意であった．体重比は，1，4週間負荷群で，J群が有意に大きく，S群でも大きい傾向を示したが有意ではなかった．体重比の増大の割合は，雄と同様，1週間負荷群のJ群でS群に比べ大きく，雌雄ともS群に比べ体重の減少が大きいことが考えられた．

心臓．Fig. 22 に示すように雌雄とも絶対重量，脳重量比が対照群に比べ，有意に小さく，その程度はJ群で大きかった．体重比は，1週間負荷群の両群の雄では，対照群に比べ小さい傾向を示し，4週間負荷群では，わずかに大きい傾向を示した．また雌の各群では対照群に比べ小さい傾向を示した．BHT負荷群の体重比の値はJ群とS群では差が見られなかった．

脾臓．Fig. 23 に示すように，負荷1週間の両群雄では，絶対重量，脳重量比が対照群に比べ有意に小さく，体重比でも小さい傾向を示し，特にJ群では有意であった．4週間負荷群では各々1週間負荷群に比べ重量の減少の程度は小さく，体重比は各対照群に比べ，やや大きな値を示した．また1週間および4週間負荷群のJ群雌では，絶対重量，脳重量比で有意に小さく，S群でも同様な傾向を示したが有意ではなかった．体重比は1週間負荷J群，S群で，対照群に比べ小さい傾向を示し，4週間負荷群では変化がなかった．各負荷群の体重比，脳重量比はJ群とS群には差がなかった．

胸腺．Fig. 24 に示すように1週間負荷J群，S群の雄では絶対重量，脳重量比および体重比とも著明に小さかったが，絶対重量の差の割合はS群でやや大きかった．また4週間負荷J群，S群では絶対重量，脳重量比は対照群に比べ大差なく体重比は両群とも大きい傾向を示した．1週間負荷J群雌では絶対重量および脳重量比が対照群に比べ有意に小さく，S群でも同様な傾向を示したが，その割合はJ群より小さかった．4週間負荷J群，S群では対照群に比べ差がなかった．1週間負荷群の体重比の値はS群に比べJ群の方が大きい傾向を示した．

肺．Fig. 25 に示したように，1週間負荷J群，S群の雄では，絶対重量および脳重量比が各対照群に比べ有意に小さく，体重比は，J群では対照群に比べやや大きく，S群ではやや小さな値を示した．4週間負荷群でも同様に小さい値を示し，S群では絶対重量，脳重量比が有意に小さかった．体重比は両群とも対照群に比べ有意に大きかった．また負荷1週間の雌では，J群で絶対重量，脳重量比が，有意に小さかったが，1週S群および4週J群，S群では各々対照群に比べ有意差は認められなかった．各BHT負荷群の体重比は，1週間負荷雄でJ群がS群に比べやや大きな値を示した他はJ群，S群で差はなかった．

脳下垂体．Fig. 26 に示したように，1週間負荷S群雄の絶対重量，脳重量比は対照群に比べ小さい傾向を示したが，J群では差がなかった．体重比は対照群に比べJ群では大きい，S群では小さい値を示したがいずれも，有意な差とは認められなかった．また4週間負荷J群およびS群では対照群に比べ変化なく体重比は大きい傾向を示した．また雌では1週間負荷J群の絶対重量，脳重量比が対照群に比べ有意に小さく，S群でも同様な傾向を示した．体重比は両群とも対照群に比べ小さい傾向を示し，負荷群の体重比，脳重量比の値はJ群とS群で等しかった．さらに4週間負荷J群では1週間負荷群と同様の傾向を示したが，S群は対照群に比べ差は認められなかった．

腎臓．Fig. 27 に示すように，J群およびS群の雌雄とも，対照群に比べ絶対重量，脳重量比が小さく，その程度は雄では4週間負荷群では1週間負荷群に比べより大きく，また雌ではより小さい傾向を示した．体重比は，雄の1週間負荷群では対照群に比べて大きく，4週間負荷群では更により大きい差を示した．また雌では対照群に比べ大差なく負荷1週間のS群のみ有意に小さかった．1週間負荷J群の雌雄で対照群との絶対重量，脳重量比の差の程度はS群に比べ大きかったが，体重比の値は差がなかった．

副腎．Fig. 28 に示すように，雄の1週間負荷J群，S群とも，絶対重量は小さい傾向を示し，脳重量比では大差なく，体重比は大きい傾向を示したがいずれも有意とはいえなかった．また4週間負荷J群の絶対重量，脳重量比は対照群と差がなかったが，S群では体重比はJ群同様有意に大きかったが，絶対重量，脳重量比は有意に小さかった．4週間負荷群の体重比，脳重量比の値はJ群に比べS群で小さかった．雌では1週間負荷J群，S群とも，絶対重量，脳重量比が対照群に比べ有意に小さく，体重比はJ群では対照群に比べ差がなく，S群では，減少の傾向を示した．4週間負荷群ではJ群の絶対重量，脳重量比が対照群に比べ

有意に小さく，体重比もその傾向を示したがS群では差は少なかった．雌では，1週間および4週間負荷群ともに，絶対重量はいずれも小さいがその差の程度はJ群で大きくまた脳重量比の値もS群に比べJ群で小さい傾向を示したが，体重比の値は，1週間負荷群ではS群に比べJ群で小さい傾向を示した．

卵巣．Fig.30に示すように，J群では1週間および4週間負荷群で絶対重量，脳重量比が対照群に比べ有意に小さく体重比も小さい傾向を示した．対照群に対する絶対重量の減少の割合は，1週間負荷群と4週間負荷群でほぼ等しかった．またS群でも同様な傾向にあったが，各値はいずれも有意な差ではなかった．1週間負荷J群の体重比および脳重量比は，S群に比べてやや小さく，4週間負荷群では差がなかった．

精巣．Fig. 29に示すように，1週間および4週間負荷J群で，絶対重量が対照群に比べ小さい傾向を示し，脳重量比は差がなく，体重比は有意に大きく，S群では，1週間負荷群で絶対重量，脳重量比および体重比が対照群に比べ有意に大きく，体重比の値はJ群と比べ大きかった．4週間負荷群では体重比のみが有意に大きかったが，他は対照群と比べ変化がなかった．

肝臓．Fig. 31 に示すように雄では，1週間負荷S群の絶対重量が対照群に比べて有意に大きく両群とも，脳重量比，体重比が対照群に比べ有意に大きかった．また4週間負荷群ではJ，S群とも，体重比が有意に大きかったが，他は対照群と比べて差がなかった．また雌では雄に比べ重量増加が顕著で，1週間負荷群に比べ，4週間負荷群で，より大きな増加をした．増加の割合は雌雄ともJ群に比べS群で大きかった．各負荷群の体重比の値は，J群とS群で差がなかった．

4. 小括および考察

JCL-SD 系および SLC-SD 系の雌雄のラット（各4週齢）を用い，普通飼料による35日間の飼育期間，すなわち4週齢から9週齢における臓器重量を，飼育1日後および1，2，5週間後の臓器について測定し，その推移を2ヶ所の生育場から得られたラット（S群およびJ群）について比較検討した．また各々のラットにBHTを負荷し，薬物に対する感受性を臓器重量の増減から比較検討した．

I 普通飼料群の推移

1) 脳は雌雄とも絶対重量はS群に比べJ群で小さかったが，体重比は飼育後1日および1週間目のJ群で大きく，2週間目から差がなくなり，この期間におけるJ群の体重増加の割合からS群より大きいと考えられ，またJ群では雌雄とも脳の発育の割には4週齢以前の体重の増加が遅いと考えられた．

2) 雄雌の心臓，胸腺，肺および雌の肝臓，下垂体，副腎の飼育1日目の重量は，体重比ではJ群とS群とで差はなかったが，絶対重量では，S群に比べJ群で小さく，体重に比例した重量を示した．また副腎，下垂体以外の臓器では，飼育1日後から1週間後にかけての絶対重量の増加曲線の傾きがJ群で大きく，飼育後1週間目の絶対重量はJ群とS群では大差なかったがJ群の体重比はS群に比べ大きな値を示した．胸腺は，特にこの傾向が顕著であった．

さらに，以上の臓器では，飼育後1週間から2週間までの絶対重量の増加曲線の傾きはS群でわずかに大きく，体重比の推移はJ群で減少したのに対し，S群では変化なかった．すなわちS群では，ほぼ体重の増加と等しい割合で重量が増加したことを示しているが，J群では体重は増加しているが，臓器の重量増加はそれに伴っていないと考えられる．S群の胸腺では特に増加の割合が大きかった．

3) 雌雄の脳，腎臓および雄の肝臓，精巣の飼育後1日から1週間までの絶対重量はS群に比べJ群で小さいが，脳，精巣以外の臓器では体重比では差がなく，体重に伴なった重量を示した．J群のこれらの臓器では，飼育後2週間目までに徐々に体重の増加に伴って臓器重量が増加しS群の重量のレベルに近づく傾向を示した．またJ群の精巣は，飼育1週間後までに体重の増加以上の割合で増加する傾向を示した．

4) J群の脾臓は，雌雄とも飼育後1日および1週間目の絶対重量および体重比で大きく，S群に比べ臓器自体が大きいことが考えられた．

5) 雄の副腎，下垂体の重量の推移の傾向は，J群とS群で差はなかった．

雌の副腎，下垂体は飼育1日後から1週間後までの絶対重量の増加の割合がJ群ではS群に比べ大きな傾向を示した．飼育後1週間から2週間では，S群で重量増加の割合が大きく副腎では顕著であった．雌のこれらの臓器の重量推移の傾向は特に性成熟との関係が考えられる．

6) 各臓器の2週間以後の重量の推移は，両群の各増加曲線が平行になるか，または一致する傾向を示し，絶対重量が一致する雄の副腎，下垂体，雌の腎臓などでは，体重比はJ群がS群よりわずかに低い値で平行しており，体重比が一致する雄の腎臓，及び卵巣などでは絶対重量の増加曲線はJ群がS群より低い値

で平行している．このことは，J群とS群の体重に差があり，両群の体重は全く一致しない事を示していると思われる．また2週間目の絶対重量でS群で大きな値を示した雄の胸腺も飼育5週間後には，両群で差はなくなった．

Ⅱ　BHT負荷群の臓器重量

雄では雌に比べ4週間負荷群の体重の減少が大きく各臓器の体重比は対照群に比べ大きな傾向を示した．

1) 雄の胸腺，心臓，脾臓はBHT1週間負荷群で，体重の減少より大きな割合で，重量の減少を示した．その程度は，胸腺ではS群がやや大きく，心臓，脾臓ではJ群が大きかった．

2) 雌の心臓，腎臓，脾臓，胸腺，下垂体，卵巣は，1週間負荷群で，体重の減少以上の割合で重量が減少する傾向を示した．心臓，腎臓は，J群，S群とも絶対重量が有意に小さく，その割合はJ群で大きかった．胸腺，脾臓，下垂体，卵巣はJ群のみで絶対重量が有意に小さかった．

3) 雄の肺，下垂体および雌の副腎は，1週間負荷群で絶対重量の減少またはその傾向を示し，その割合は，J群では体重の減少の割合より小さく，S群では大きかった．絶対重量の減少の程度は雄の肺，下垂体ではJ群，S群で差がなかったが，雌の副腎ではJ群で大きかった．

4) 雄の脳，腎臓，副腎および雌の脳は1週間負荷群で絶対重量の減少の割合は体重の減少の割合より小さかった．雌雄の脳，雄の腎臓では，絶対重量の対照群に対する減少の程度はJ群で大きかった．

5) 雄の心臓，腎臓，肺，脳では4週間負荷群でも，1週間負荷群とほぼ同様な割合で絶対重量が減少した．心臓以外は，絶対重量の減少の割合が体重の減少の割合より小さかった．

6) 雌の心臓，卵巣，副腎，腎臓も4週間負荷群の絶対重量の減少は，1週間負荷群と同様な割合であった．腎臓以外は絶対重量の減少が体重の減少の割合より大きく，その程度は各臓器ともJ群で大きい傾向を示した．

7) 雌雄の胸腺，脾臓，下垂体，および雌の肺は4週間負荷群における絶対重量の減少の程度は，1週間負荷群に比べて小さく，雌の脾臓，下垂体では，4週間負荷群における絶対重量の減少の程度はJ群で大きかった．

8) 肝臓は，BHT負荷群で重量増加を示し，その割合は，体重の減少とほぼ反比例し，雄に比べ雌で大きく，J群に比べS群で大きかった．薬物に対する感受性の差および性差が考えられるが，増大の本態については，病理組織および血清生化学的検査の結果と合せて検討したい．

9) 脾臓はS群に比べJ群で重量が大きかった唯一の臓器であったがBHT負荷によって，他の臓器と同様，絶対重量の減少の割合はJ群で大きく，J群とS群で特に顕著な差は認められなかった．

10) 脾臓および胸腺は，4週間負荷J群およびS群で，対照群の絶対重量が1週間負荷群のそれに比べ全く差がないが，負荷群の絶対重量は1週間負荷群に比べ増加の傾向を示し他の臓器とは異った変化を示した．

11) 絶対重量を体重比および脳重量比で比較したが，脳重量は臓器の中で，最もその重量の変動が少なく，脳重量比の対照群と負荷群の関係は，結局，絶対重量のそれらの関係と同じであり．特に脳重量比で表わす必要はないと思われる．

Ⅲ　考　察

以上，2ヶ所の生育場で育成されたSD系ラット(JおよびS)の4週齢から9週齢にわたる成長に伴う臓器重量の増加，およびBHT負荷による臓器重量の変動について得られた結果をまとめると，飼育後1日目のJ群の臓器重量は脾臓を除きS群に比べ小さかったが，飼育後2週間までの増加の割合がS群に比べ大きく，J群とS群では，その発育の程度に差があると考えられた．成長に伴う各臓器の重量増加の推移の様式に関してはWiddowsonら[1]の報告があるが，さらに今回の実験から見出された推移に関する多くの差から成長に伴う増加の推移にはリズムがあり，BHT負荷による両群の重量の差にも影響していると考えられた．

すなわち雌雄の心臓，肺，胸腺，雌の肝臓の重量の推移は，発育に伴い増加しているが，その体重の増加に対する割合が，各期間によってJ群とS群で異っていた．つまり飼育1日後から1週間後までは，重量増加はJ群で大きくその体重比の推移は変化がなく，S群の体重比は減少している．また飼育1週間後から2週間後でややS群の重量は，増加が大きく体重比の推移は変化がなく，J群の体重比は減少している．このことはJ群とS群の重量の推移パターンの差や，環境の変化に対する反応性の差などではなく，J群とS群の各臓器に共通した推移のパターンが時期的にずれているために，このような差が表われたと考えられた．すなわち臓器は，その重量増加は重量完成時まで，全く直線的ではなく増加の割合の大きい期間と低い期間

をくり返して，さらに体重の増加とあいまって重量が増加していくものと思われる．つまりあるリズムをもって重量が増加すると考えられ，さらに図に見られる各臓器の推移からも明らかなように，それらの重量増加のリズムの大きさは加齢とともに変化していくものと思われる．またこのようなリズムは，臓器だけではなく体重の増加についてもあると考えられるが，臓器によっては，それらが体重の推移と一致しないものと，腎臓などのようにほぼ一致するものもあり，各臓器に，各々その性質にもとづいたリズムがあると考えられた．さらにＢＨＴ負荷群の両群における臓器重量の差は大きくはＢＨＴによる発育の抑制の差，つまり４週齢から６週齢にかけての成育の割合が大きい群でより抑制されたことに由来すると考えられるが，その場合，各臓器のＢＨＴ負荷前から続く一連のリズムには，成育の差によるずれがあるために，両群のＢＨＴ負荷による臓器重量の変化の受け方に差が生じ，結果的に，Ｊ群とＳ群の重量の差に影響したと思われる．つまり重量増加の推移のリズムが臓器重量の変動の割合を支配していると推測された．

今回の実験では，２ヶ所の生育場からのラットの成長の度合に差があったために，両群の重量増加のリズムにずれが生じ，また４週齢から６週齢という，特に臓器重量の増加が大きい期間では各臓器のリズムも大きく，そのため特に雄の心臓，胸腺の重量の推移にそれが明瞭に示されたものと思われる．

文　献

1) Widdowson, E. M., McCance, R. E., *Proc. Roy. Soc. B*, 152 188～206, 1960

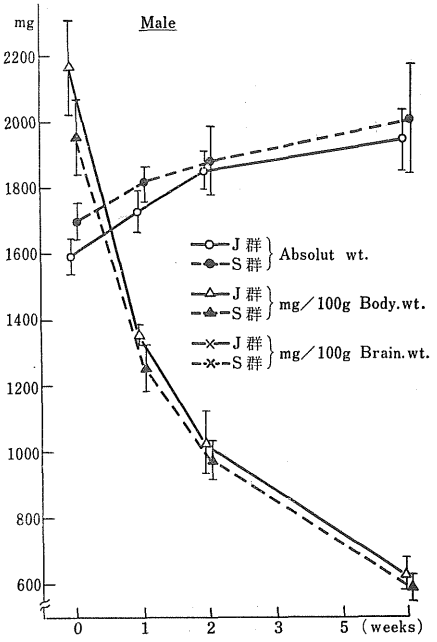


Fig. 1 Brain weight

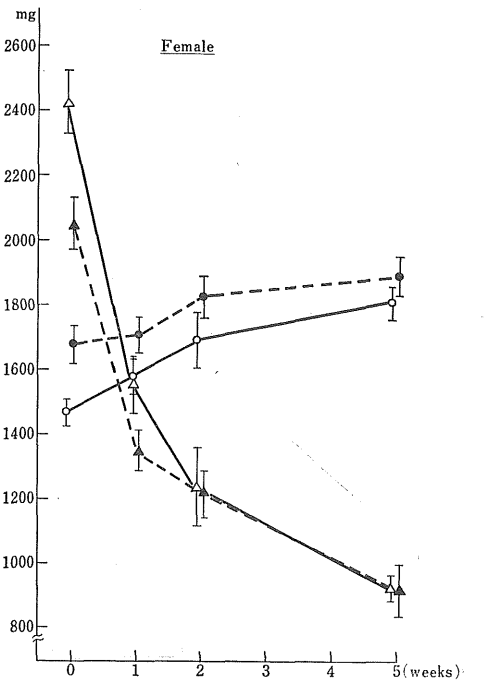


Fig. 2 Brain weight

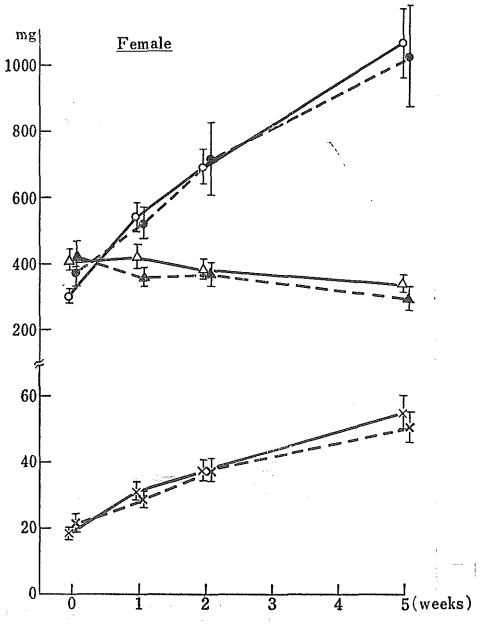


Fig. 3 Heart weight

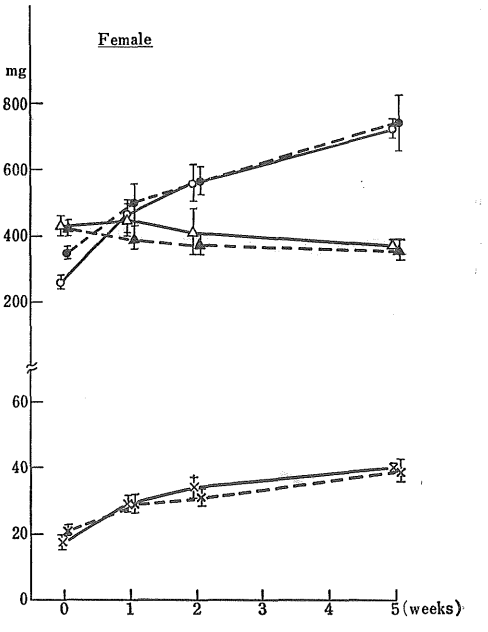


Fig. 4 Heart weight

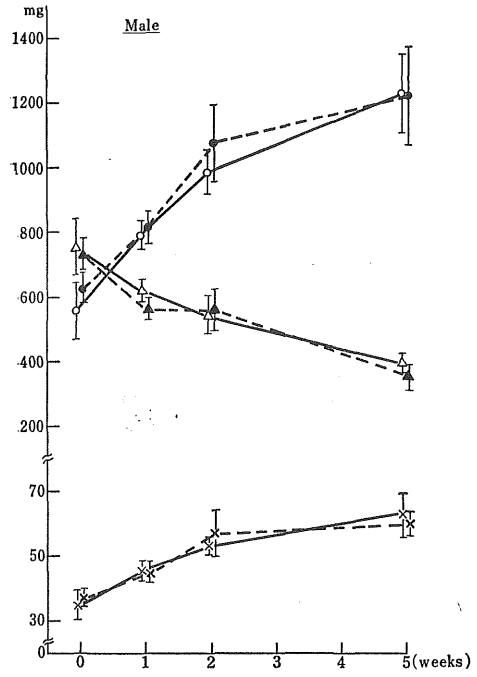


Fig. 5 Lung weight

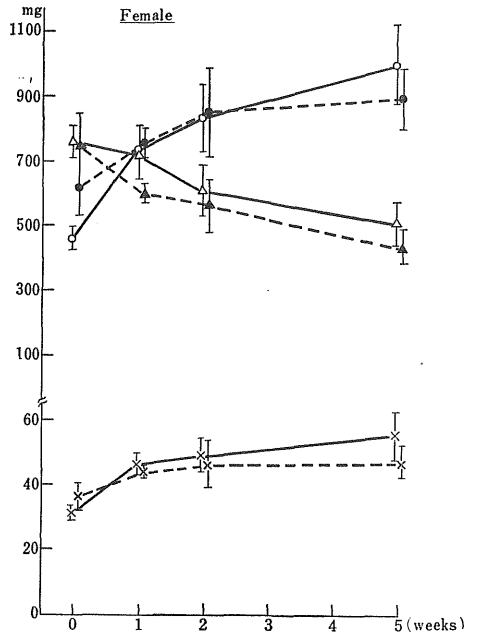


Fig. 6 Lung weight

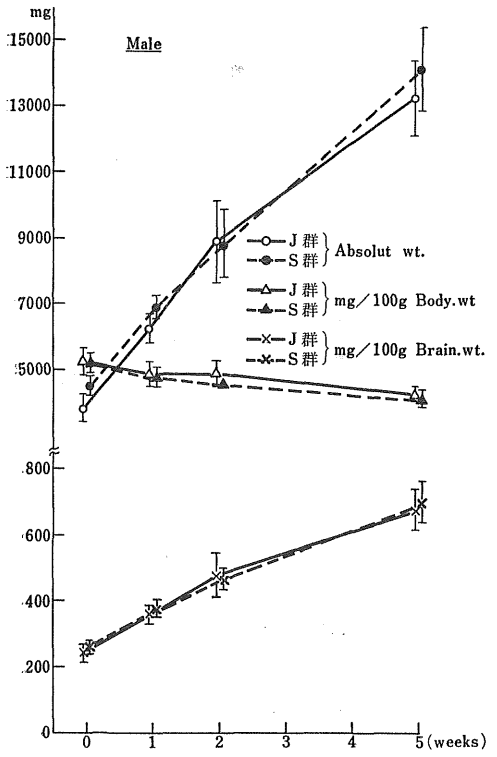


Fig. 7 Liver weight

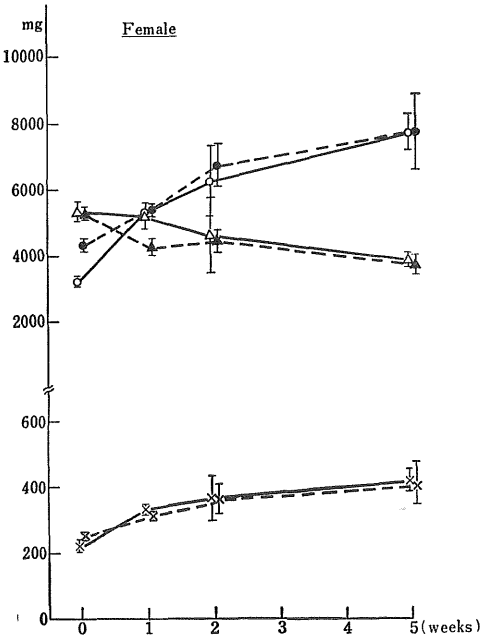


Fig. 8 Liver weight

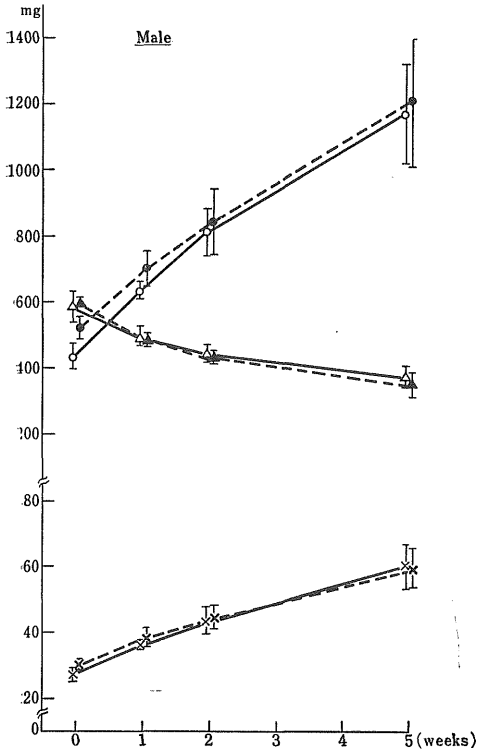


Fig. 9 Kidney weight

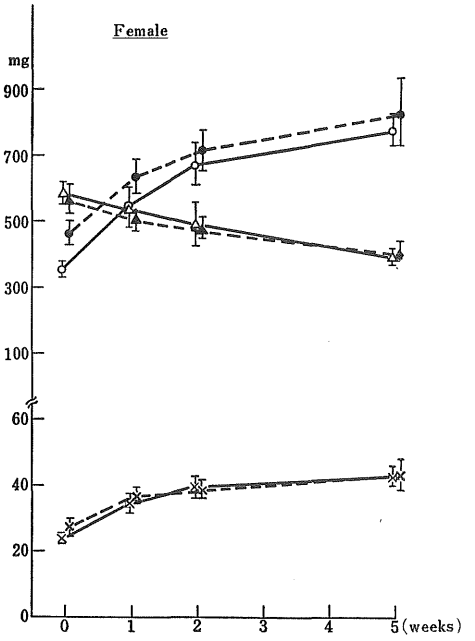


Fig. 10 Kidney weight

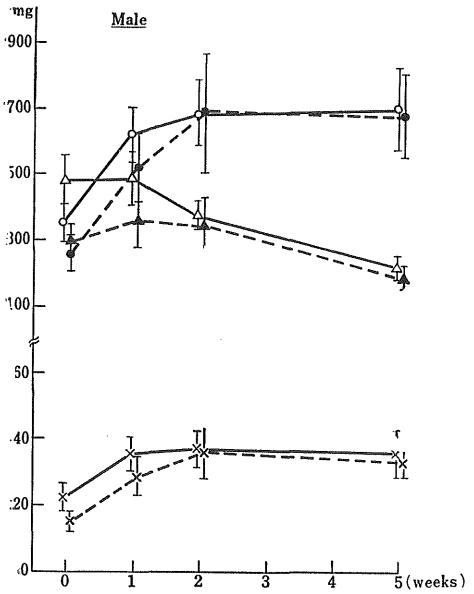


Fig. 11 Spleen weight

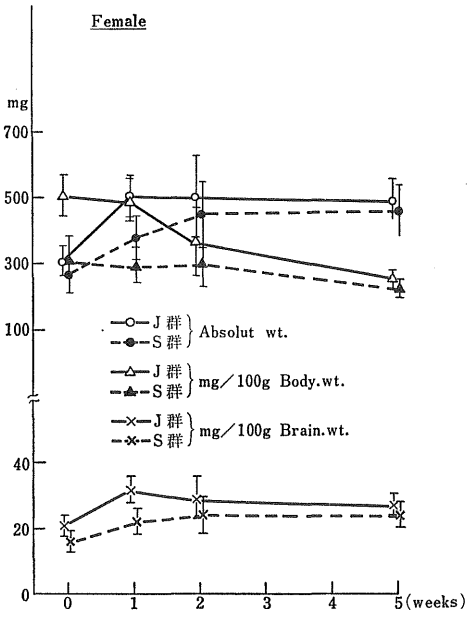


Fig. 12 Spleen weight

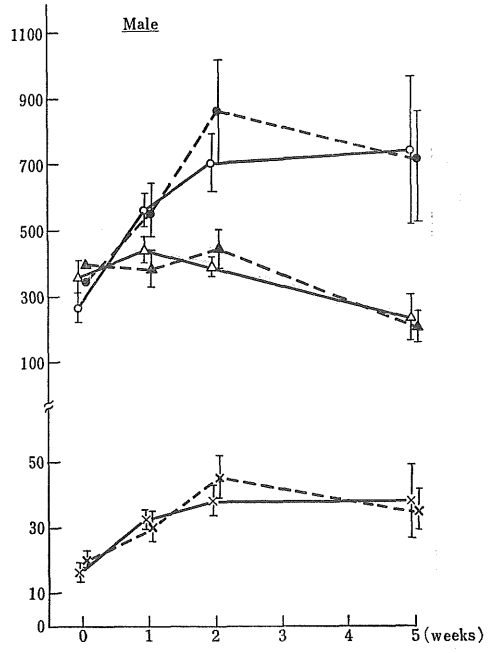


Fig. 13 Thymus weight

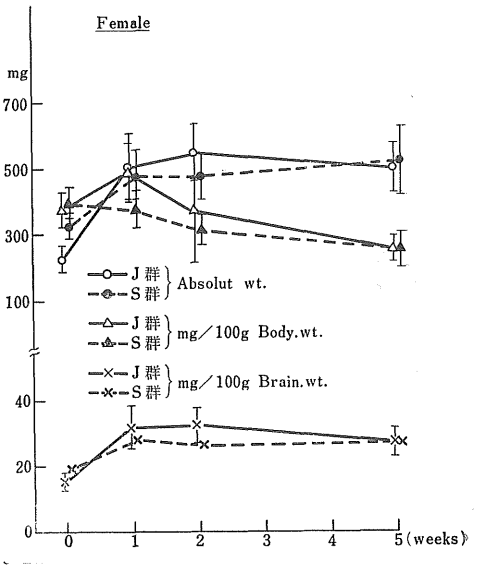


Fig. 14 Thymus weight

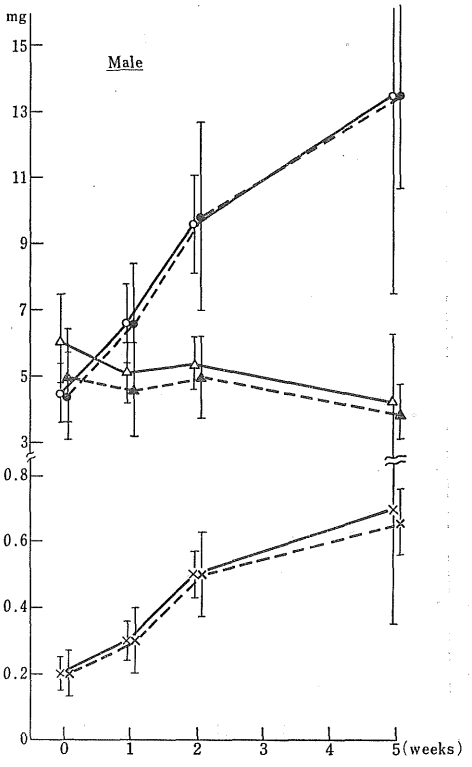


Fig. 15 Hypophysis weight

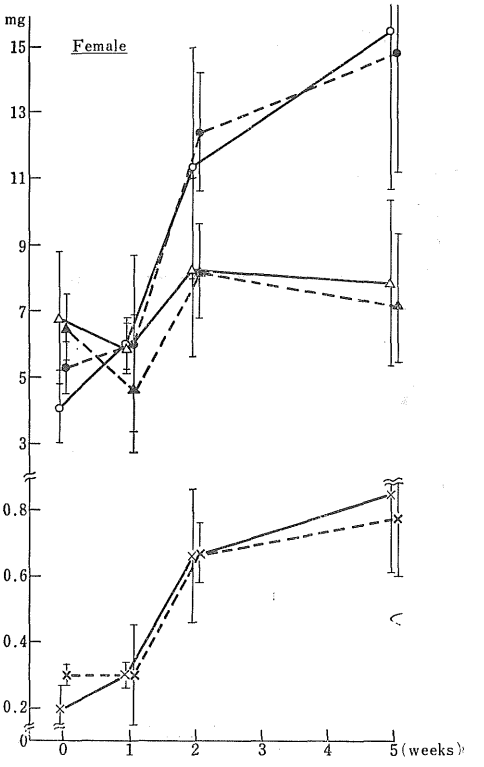


Fig. 16 Hypophysis weight

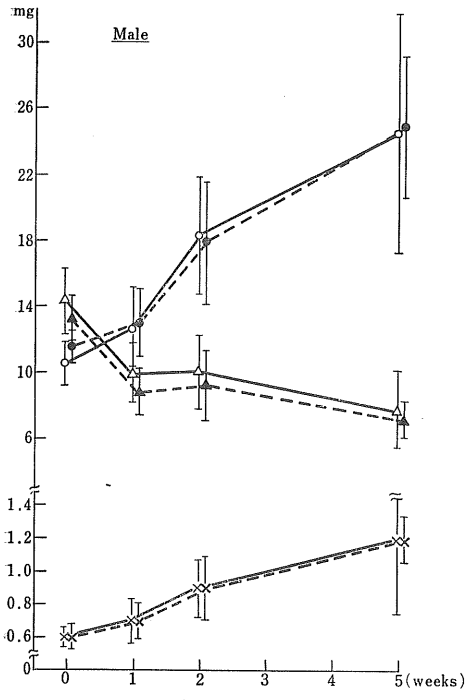


Fig. 17 Suprarenal gland weight

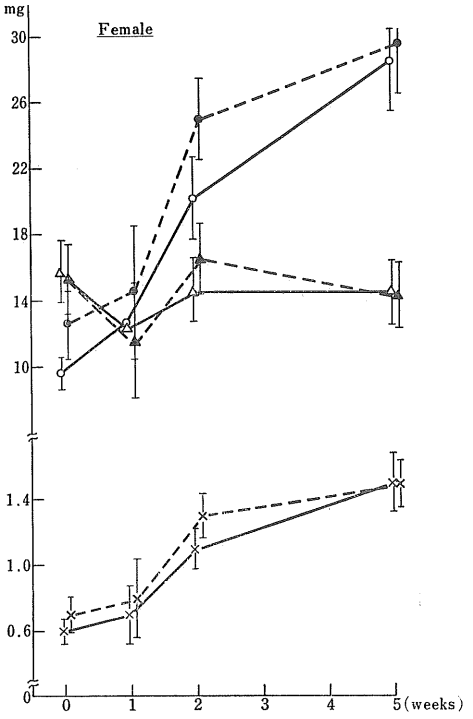


Fig. 18 Suprarenal gland weight

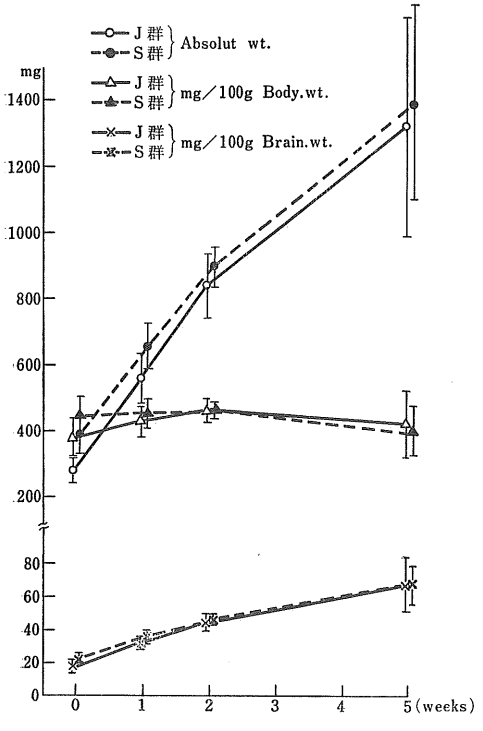


Fig. 19 Testis weight

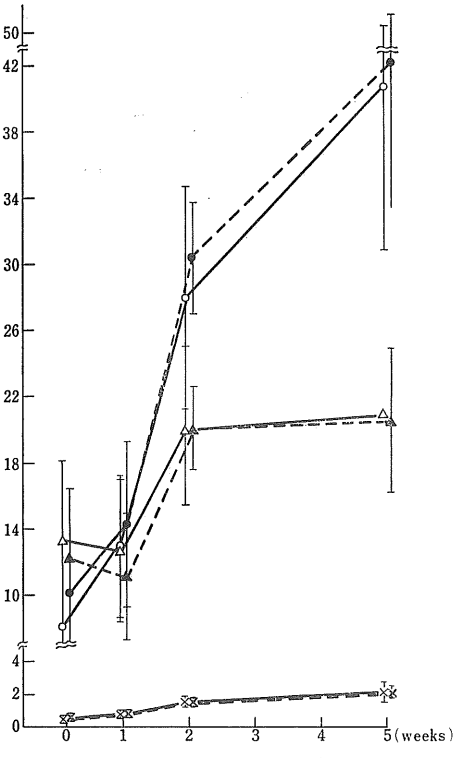


Fig. 20 Ovary weight

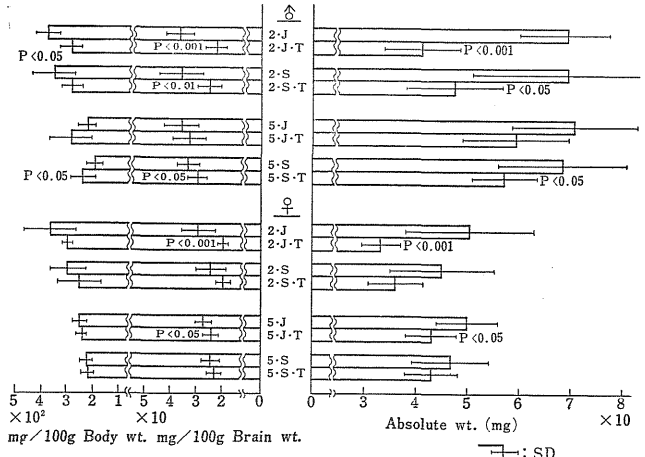


Fig. 23 Spleen Weight of BHT Treated Rats

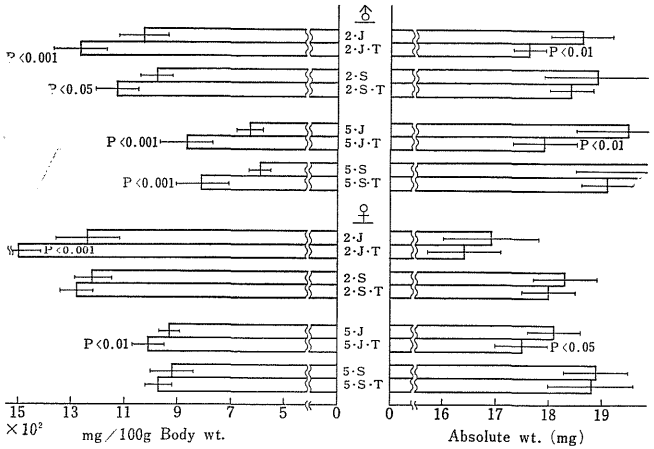


Fig. 21 Brain Weight of BHT Treated Rats

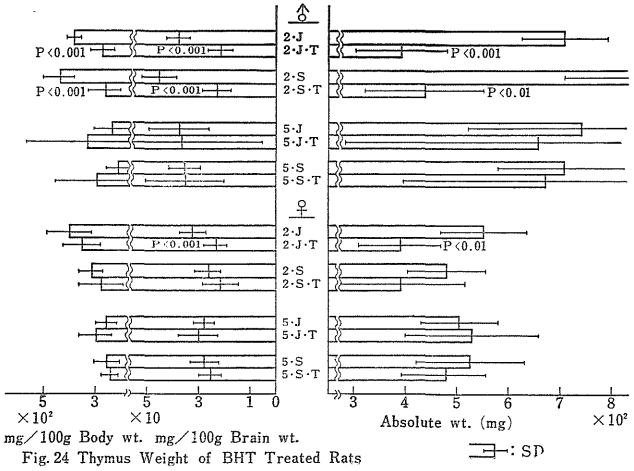


Fig. 24 Thymus Weight of BHT Treated Rats

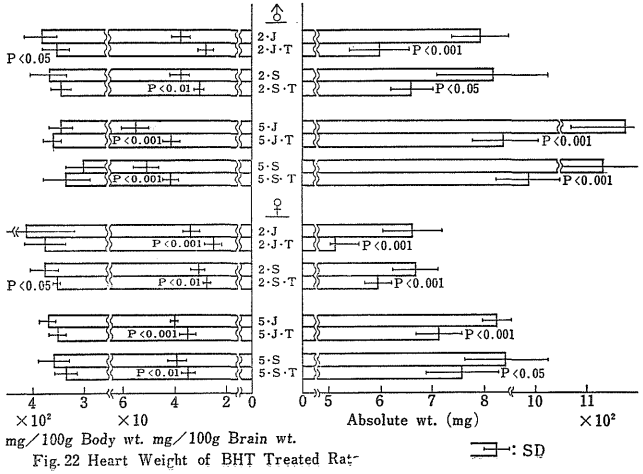
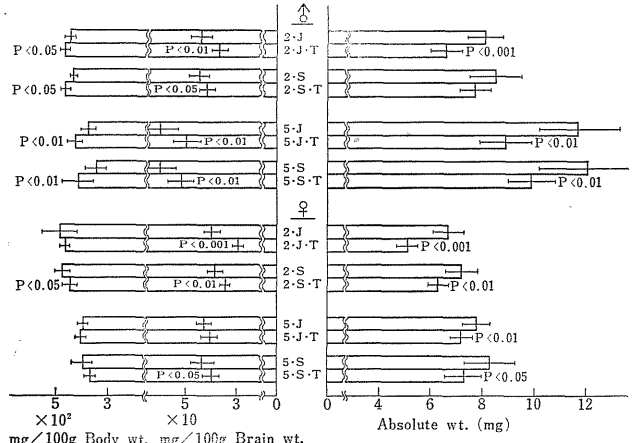
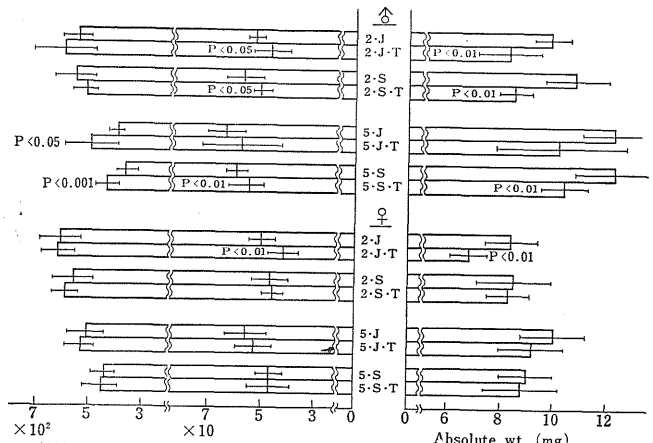


Fig. 22 Heart Weight of BHT Treated Rats



mg／100g Body wt. mg／100g Brain wt.

Fig. 27 Kidney (R) Weight of BHT Treated Rats



mg／100g Body wt. mg／100g Brain wt.

Fig. 25 Lung Weight of BHT Treated Rats

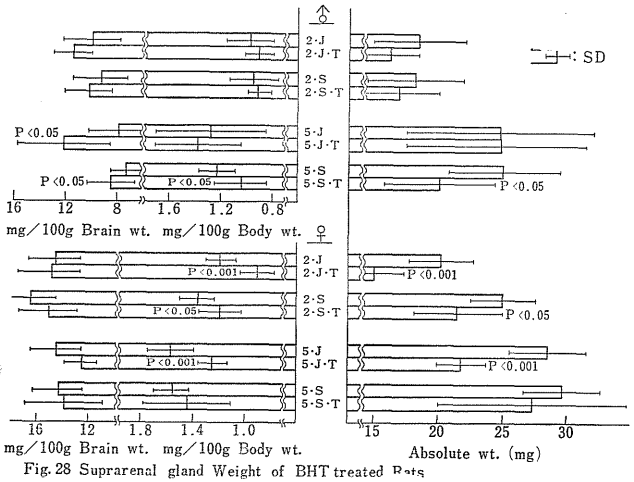


Fig. 28 Suprarenal gland Weight of BHT treated Rats

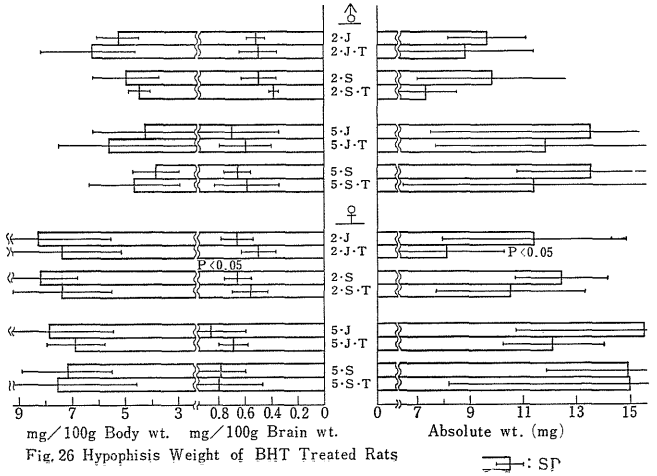


Fig. 26 Hypophisis Weight of BHT Treated Rats

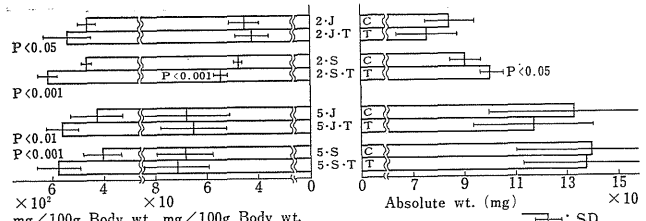


Fig. 29 Ovary (R) Weight of BHT Treated Rats

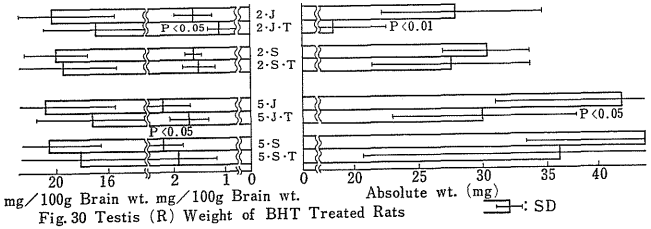


Fig. 30 Testis (R) Weight of BHT Treated Rats

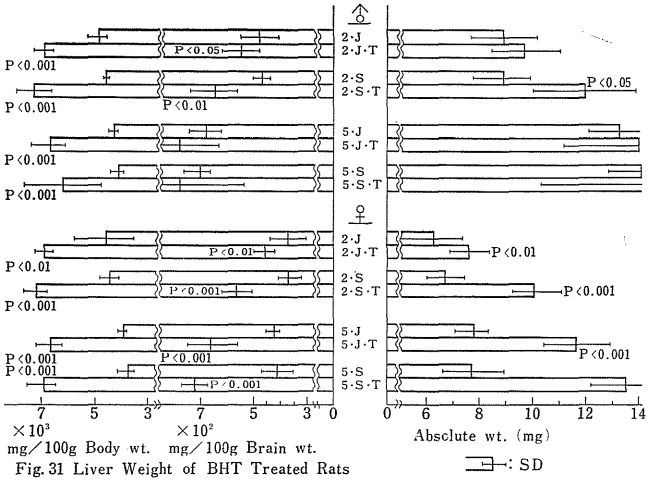


Fig. 31 Liver Weight of BHT Treated Rats

Table I Organ weight (JCL—SD : Male—1)

	Heart	Spleen	Thymus	Liver	Lung	Kidney (R)	Kidney (L)
0・J (10)	302±23[1)]†	358±58†	268±45†	3,887±411†	560±89†	434±30†	437±24†
	410±23[2)]	485±72†	362±48	5,263±391	756±87†	590±46	594±40
	18.9±1.24[3)]†	22.5±4.11†	16.8±2.68†	244±29.7	35.0±4.82	27.2±2.47†	27.4±1.87†
1・J (10)	542±44	623±83†	565±51	6,251±473†	793±46	634±25†[(9)]	632±38†[(9)]
	423±33†	489±77†	441±35†	4,890±381	621±41†	496±27	495±37
	31.3±2.84	36.0±5.51†	32.6±2.88	360±27.7	45.8±2.60	36.5±1.71†	36.5±2.48
2・J (10)	696±53	689±87	707±84	8,904±1,246	989±70	814±1.70	822±82
	385±32	380±43	389±28	4,892±376	548±58	448±22	453±31
	37.5±3.47	37.2±5.52	38.1±4.65†	480±71.6	53.2±2.84	43.9±4.42	44.3±5.06
2・J—T(10)	498±58†*	410±73*	390±88†	9,730±1,301†	831±120*	660±13*†	645±62*†
	355±26*	292±42*	277±47†	6,925±358*	600±119	473±18*	462±17
	28.2±3.11*	23.2±4.14*	22.1±4.88*	551±69.2†*	47.1±6.82*	37.4±3.25*	36.6±3.28*
5・J (10)	1,076±104	706±123	742±222	13,271±1,155	1,230±121	1,175±149	1,158±150
	347±23†	227±30	240±72	4,920±169	398±30†	379±30	373±31
	55.3±5.41†	36.4±6.70	38.1±11.4	682±63.2	63.5±6.56	60.4±7.08	59.5±6.70
5・J—T(5)	742±64*	594±104	654±372	14,014±2,815	1,024±254	886±99*	836±103†*
	361±19	293±81	334±238	6,733±674*	495±98*	430±30*	406±35
	41.5±3.32*	33.3±6.44	36.8±21.7	783±150	57.5±15.4	49.5±4.94*	46.8±5.55*

1) Absolute weight (mg) : mean±S.D. 2) mg/100 g Body weight 3) mg/100 g Brain weight
statistical significance : J vs S, J-T vs S-T † $P < 0.05$
: J vs J-T, S vs S-T * $P < 0.05$

Table Ⅱ Organ weight (JCL-SD : Male-2)

	Hypophysis	Suprarenal gland (R)	Suprarenal gland (L)	Testis (R)	Testis (L)	Brain
0 • J (10)	4.54±0.91	10.6±1.34	11.2±1.54	281±41†	278±44†	1,595±52†
	6.18±1.37	14.4±2.06	15.2±2.30	382±58†	377±61†	2,169±143†
	0.28±0.05	0.66±0.06	0.70±2.30	17.6±2.66†	17.4±2.78†	
1 • J (10)	6.62±1.20	12.8±2.39	13.4±1.89	561± 80†	566± 71†	1,732± 64†
	5.16±0.94	10.0±1.84	10.4±1.56†	437± 53	441± 46	1,354± 33†
	0.37±0.06	0.73±0.13	0.77±0.10	32.3±4.19†	32.6±3.54	
2 • J (10)	9.63±1.50	18.3±3.59	19.2±2.82	844± 97	845± 100	1,856± 61
	5.32±0.78	10.1±2.22	10.6±1.89	465± 35	465± 33	1,029± 92
	0.52±0.07	0.98±0.18	1.03±0.14	45.5±5.70	45.5±5.84	
2 • J • T (10)	8.86±2.55	16.1±2.23	16.6±2.45	753± 118†	758±116†	1,763± 33†*
	6.35±1.90	11.5±1.52	11.8±1.70†	541± 94*	544± 90*	1,267± 97†*
	0.50±0.14	0.91±0.11	0.94±0.13	42.6±6.41†	42.9±6.25†	
5 • J (10)	13.5±6.04	24.7±7.25	25.6±6.94	1,328± 333	1,344± 342	1,946± 96
	4.37±1.95	7.99±2.33	8.3±2.28	429± 103	434± 106	631± 45
	0.70±0.35	1.28±0.48	1.32±0.41	68.0±16.7	68.8±17.3	
5 • J • T (5)	11.8±4.14	24.8±6.49	27.2±6.61	1,168± 233	1,353± 386	1,786± 56†*
	5.77±1.86	12.2±3.60*	13.3±3.26†*	562± 62	671± 264	874± 98*
	0.65±0.20	1.38±0.33†	1.51±0.32†	65.4±12.9	76.0± 264	

Table Ⅲ Organ weight (SLC-SD : Male-1)

	Heart	Spleen	Thymus	Liver	Lung	Kidney (R)	Kidney (L)
0 S (10)	373± 43† 428± 38 21.9±2.62†	263± 51† 301± 50† 15.4±2.88†	347± 38† 399± 39 20.4±2.22†	4,527± 278† 5,201± 227 266±19.5	638± 37† 734± 47† 37.6±2.71	521± 35† 598± 16 36.0±2.01†	503± 42† 577± 27 29.6±2.56†
1 S (10)	525± 52 363± 27† 28.9±2.57	525± 105† 364± 80† 29.0±6.30†	558± 84 386± 55† 30.7±4.30	6,929± 363† 4,798± 269 382±23.5	817± 50 565± 38† 45.0±3.35	703± 53† 485± 20 38.7±2.58†	695± 45† 480± 18 38.3±2.40
2 S (5)	718± 107 371± 35 37.9±3.87	693± 183 356± 79 36.5±8.53	865± 158 446± 62 45.6±6.56†	8,854±1,075 4,570± 102 468±33.8	1,079± 118 560± 67 57.3±7.37	846± 102 436± 14 44.7±3.50	830± 102 428± 14 43.9±3.71
2 S・T (5)	562± 42†* 345± 19 30.5±1.98*	474± 93* 288± 41 25.6±4.68*	436± 116* 265± 59* 23.5±5.77*	11,996±1,927†* 7,306± 667* 649±92.6†*	848± 63* 521± 47 46.0±3.40*	767± 58† 470± 19* 41.6±2.48†	728± 28† 447± 25 39.4±1.24*
5 S (10)	1,034± 157 302± 34† 51.2±4.67†	684± 125 199± 30 33.8±4.43	719± 141 212± 48 35.7±6.21	14,134±1,281 4,149± 244 705±61.5	1,225± 152 359± 35† 60.7±3.98	1,213± 194 354± 38 60.0±6.11	1,197± 226 348± 43 59.1±7.63
5 S・T (10)	789± 63* 336± 44 41.3±3.10*	571± 63* 244± 49* 29.9±3.51*	673± 276 295± 160 35.4±15.1	14,940±4,600 6,221±1,456* 783± 245	1,042± 88* 442± 51* 54.5±4.82*	990± 88* 421± 56* 51.8±4.70*	987± 107†* 418± 51* 51.6±5.11*

1) Absolute weight (mg) : mean±S.D. 2) mg/100 g Body weight 3) mg/100 g Brain weight
statistical significance : J vs S, J-T vs S-T, † $P < 0.05$
: J vs J-T, S vs S-T * $P < 0.05$

Table Ⅳ Organ weight (SLC-SD : Male-2)

	Hypophyysis	Suprarenal gland (R)	Suprarenal gland (L)	Testis (R)	Testis (L)	Brain
0 S (10)	4.42±1.31	11.6±0.96	12.2±1.47	393± 57†	402± 53†	1,699± 57†
	5.05±1.44	13.3±1.42	14.0±1.97	450± 54†	461± 51†	1,956± 117†
	0.26±0.07	0.68±0.07	0.72±0.10	23.1±3.26†	23.6±3.21†	
1 S (10)	6.67±1.83	13.0±2.00	12.6±1.83	659± 67†	663± 72†	1,814± 55†
	4.66±1.43	8.99±1.38	8.72±1.26†	456± 42	458± 45	1,257± 69†
	0.36±0.10	0.71±0.11	0.69±1.26	36.3±3.72†	36.5±3.91	
2 S (5)	9.84±2.85	18.0±3.74	19.2±3.11	904± 60	929± 66	1,886± 104
	5.05±1.24	9.37±2.15	9.93±1.34	468± 18	481± 18	979± 57
	0.51±0.13	0.95±0.19	1.01±1.34	47.9±1.56	49.2±1.83	
2 S・T (5)	7.38±1.12	16.8±3.11	15.8±1.92	1,005± 45†*	1,001± 32†	1,844± 41†
	4.50±0.40	10.3±1.83	9.69±1.12†	617± 39*	616± 52*	1,134± 88†*
	0.39±0.04	0.92±0.10	0.85±0.10	54.5±2.64†*	54.3±2.35†*	
5 S (10)	13.5±2.78	25.0±4.26	26.8±5.39	1,395± 293	1,400± 288	2,009± 162
	3.97±0.88	7.31±1.10	7.81±1.20	407± 75	408± 72	590± 42
	0.66±0.10	1.23±0.14	1.32±0.21	68.7±11.1	69.0±10.6	
5 S・T (10)	11.4±4.98	20.0±4.26*	22.1±5.48	1,374± 247	1,532± 275	1,909± 48†
	4.73±1.69	8.48±1.84*	9.34±2.22†	577± 83*	654± 163*	814± 100*
	0.59±0.24	1.04±0.20†*	1.15±0.26†	71.8±12.5	80.2±14.6	

( ) : No of Rats

Table V Organ weight (JCL-SD Female-1)

	Heart	Spleen	Thymus	Liver	Lung	Kidney (R)	Kidney (L)
0 J (10)	262± 18[1)]†	309± 45	229± 38†	3,243± 168†	459± 36†	355± 23†	343± 31†
	432± 31[2)]	509± 64†	378± 52	5,355± 301	758± 50	586± 30	565± 35
	17.8±1.26[3)]†	21.0±3.26†	15.6±2.56†	220.9±16.3†	31.2±2.34†	24.1±1.65†	24.0±1.96
1 J (10)	460± 48	505± 63†	506± 105	5,302± 263	735± 74	548± 53†	521± 40†
	452± 43†	497± 66†	494± 85†	5,218± 359†	723± 77†	539± 58	513± 41
	29.1±2.43	31.9±3.77†	32.0±6.47	335.7±18.2†	46.4±3.52	34.6±3.01	33.0±2.22†
2 J (10)	563± 57	504± 125	551± 84	6,286±1076	835± 105	673± 67	655± 74
	413± 70	369± 102	404± 87†	4,634±1,122	609± 79	493± 64	479± 69
	33.8±3.51	29.6±6.63	32.6±5.34†	371.2±63.7	49.3±5.32	39.7±3.43	38.6±3.75
2 J・T (10)	413± 46*†	332± 35*	390± 78*	7,616± 731†*	684± 79†*	514± 37†*	487± 43†*
	377± 40	302± 20†	355± 69†	6,925± 329*	623± 61	468± 21	443± 27
	25.2±3.37*	20.2±1.96*	23.7±4.51*	463.5±40.5†*	41.7±5.65*	30.9±2.48†*	29.6±2.29†*
5 J (10)	727± 29	499± 60	505± 77	7,746± 569	1,002± 124	777± 47	741± 55
	372± 15	255± 28†	258± 38	3,957± 153†	513± 71†	398± 23	379± 28
	40.2±1.32	27.5±3.18	27.8±4.13	427.9±26.3	55.5±7.78†	43.0±3.00	40.9±2.80
5 J・T (9)	613± 44*	430± 48*	528± 129	11,648±1,222†*	922± 124	717± 39*	685± 44*
	352± 17	247± 20†	302± 66†	6,687± 495*	529± 64†	412± 24†	394± 25†
	35.1±3.18*	24.6±2.97	30.2±7.62	667.9±83.5*	52.7±7.14	41.0±2.98	39.2±3.13

1) Absolute weight (mg) : mean±S.D. 2) mg/100 g Body weight 3) mg/100 g Brain weight
statistical significance : J vs S, J-T vs S-T, † $P < 0.05$
: J vs J-T, S vs S-T, * $P < 0.05$

Table VI Organ weight (JCL-SD Female-2)

	Hypophysis	Suprarenal gland (R)	Suprarenal gland (L)	Ovary (R)	Ovary (L)	Brain
0 J (10)	4.12±1.11†	9.60±1.07†	9.70±0.94†	8.14±2.91(7)	8.14±3.53(7)	1,470± 42†
	6.82±1.90	15.8±1.92	16.0±1.69	13.3±4.77	13.2±5.43	2,428± 97†
	0.28±0.07	0.65±0.07	0.65±0.06	0.54±0.18	0.54±0.24	
1 J (10)	6.03±0.77(9)	12.5±2.35(9)	12.4±2.29(9)	13.0±4.24(9)	12.2±4.71(9)	1,580± 59†
	5.90±0.77	12.3±2.68	12.2±2.59	12.7±4.32	12.0±5.14	1,555± 88†
	0.38±0.04	0.79±0.14	0.79±0.14	0.82±0.27	0.77±0.29	
2 J (10)	11.4±3.47	20.2±2.52†	20.1±3.84†	28.0±6.66	26.4±7.47†	1,694± 88†
	8.38±2.73	14.7±1.95†	14.6±2.93	20.3±.4.83	19.3±5.99	1,238± 120
	0.66±0.18	1.19±0.12†	1.18±0.21†	1.64±0.36	1.55±0.43	
2 J・T (10)	8.14±2.11†*	15.0±2.30†*	16.2±3.25†*	18.5±4.06†*	18.6±3.59†*	1,643± 71†
	7.49±2.26	13.7±2.46	14.8±3.08	16.9±4.04	17.0±3.55†	1,499± 75†*
	0.49±0.13*	0.91±0.13†*	0.98±0.18†*	1.12±0.23†*	1.13±0.19†*	
5 J (10)	15.5±4.79	28.5±2.91	32.7±5.14	40.8±9.76	42.0±9.62	1,890± 53†
	7.93±2.45	14.6±1.95	16.7±2.92	20.9±5.45	21.4±4.70	926± 41
	0.85±0.26	1.57±0.18	1.81±0.30	2.25±0.56	2.32±0.54	
5 J・T (9)	12.1±1.92	21.8±1.90*	22.8±2.31†*	30.1±7.11*	30.0±4.69*	1,748± 49†*
	6.95±1.10	12.6±1.34	13.2±1.68*	17.3±4.06	17.2±2.78*	1,007± 62*
	0.69±0.11	1.25±0.11*	1.30±0.12†*	1.71±0.38*	1.71±0.25*	

( ) : No of Rats

Table Ⅶ Organ weight (SLC-SD Female-1)

	Heart	Spleen	Thymus	Liver	Lung	Kidney (R)	Kidney (L)
0 S (10)	347± 18†	265± 55	328± 37†	4,340± 191†	615± 82†	462± 37†	440± 41†
	424± 23	323± 64†	400± 45	5,294± 194	750± 100	563± 44	537± 51
	20.7±1.37†	15.7±3.11	19.5±2.04†	258.4±7.40†	36.6±4.43	27.5±2.59†	26.2±2.91
1 S (10)	497± 58	378± 67†	481± 72	5,419± 133	757± 45	634± 51†	615± 70†
	392± 26†	299± 50†	380± 54†	4,292± 229†	598± 28†	501± 32	486± 39
	29.0±2.89	22.1±3.93†	28.2±4.53	317.4±12.9†	44.2±1.80	37.1±2.50	36.0±3.43†
2 S (10)	568± 44	450± 101	480± 76	6,710± 696	850± 137	715± 60	689± 61
	378± 28	300± 69	319± 47†	4,457± 346	564± 81	475± 31	475± 32
	31.1±2.64	24.7±5.88	26.4±4.92†	367.9±45.3	46.5±7.48	39.1±3.07	37.6±3.13
2 S・T (10)	497± 25†*	360± 53*	393± 121	10,178± 895†*	827± 79†	629± 41†*	609± 58†*
	353± 9*	255± 34†	279± 85†	7,220± 459*	587± 48	446± 25*	432± 35
	27.6±1.52*	20.0±2.76*	21.9±7.01	566.9±53.2†*	46.0±3.99	35.0±2.14†*	33.9±2.91†*
5 S (10)	744± 81	467± 74	526± 104	7,773±1,133	901± 95	828± 101	809± 96
	360± 28	226± 26†	255± 50	3,750± 266†	439± 52†	401± 38	392± 37
	39.3±3.74	24.7±3.83	27.8±5.61	410.9±61.9	47.6±4.84†	43.7±4.77	42.7±4.47
5 S・T (10)	658± 70*	431± 51	478± 85	13,531±1,313†*	884± 142	729± 71*	722± 70*
	337± 19	222± 25†	244± 33†	6,962± 564*	455± 72†	374± 24†	371± 20†
	35.0±2.49*	23.0±2.68*	25.5±4.50	720.4±51.4*	47.2±8.26	38.8±3.29*	38.4±2.98*

1) Absolute weight (mg) : mean±S.D. 2) mg/100 g Body weight 3) mg/100 g Brain weight
statistical significance : J vs S, J-T vs S-T † $P < 0.05$
: J vs J-T, S vs S-T * $P < 0.05$

Table Ⅷ Organ weight (SLC-SD Female-2)

	Hypophysis	Suprarenal gland (R)	Suprarenal gland (L)	Ovary (R)	Ovary (L)	Brain
0 S (10)	5.37±0.77†	12.6±2.06†	12.3±2.11†	10.2±3.55	9.60±2.71	1,679± 58†
	6.55±0.97	15.3±2.12	14.9±2.35	12.3±4.21	11.6±2.92	2,049± 80†
	0.31±0.03	0.74±0.11	0.73±0.12	0.60±0.20	0.56±0.14	
1 S (10)	6.01±2.67	14.6±4.08	14.8±3.64	14.3±5.00(9)	16.1±5.94(9)	1,708± 55†
	4.76±2.19	11.6±3.49	11.7±3.12	11.2±3.77	12.6±4.51	1,352± 64†
	0.35±0.15	0.85±0.24	0.86±0.22	0.83±0.27	0.93±0.33	
2 S (10)	12.4±1.76	25.0±2.53†	25.4±3.37†	30.4±3.43(9)	33.2±4.32†(9)	1,827± 64†
	8.28±1.37	16.6±2.01†	16.8±2.23	20.1±2.48	21.9±2.32	1,217± 72
	0.67±0.09	1.36±0.13†	1.38±0.18†	1.65±0.16	1.80±0.21	
2 S・T (10)	10.5±2.80†	21.5±3.37†*	22.3±4.44†	27.6±6.07†	29.7±6.83†	1,796± 50†
	7.46±1.88	15.2±2.34	15.8±3.11	19.5±4.10	21.0±4.65†	1,277± 58†
	0.58±0.14	1.19±0.16†*	1.23±0.22†	1.53±0.32†	1.64±0.34†	
5 S (10)	14.9±3.63(9)	29.6±2.98	33.5±6.00	42.3±8.90	43.8±18.0	1,891± 59†
	7.21±1.71	14.4±1.97	16.2±2.62	20.6±4.33	21.5±9.69	922± 78
	0.78±0.18	1.56±0.14	1.77±0.30	2.22±0.40	2.31±0.93	
5 S・T (10)	14.9±6.75	27.3±7.28	29.0±5.27†	36.0±15.2	36.6±15.4	1,876± 78†
	7.61±3.06	13.9±3.17	14.8±2.17	18.2±7.02	18.5±6.90	967± 54
	0.79±0.33	1.44±0.34	1.53±0.22†	1.90±0.76	1.93±0.75	

( ) : No of Rats

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 599 — 607, 1974

毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究

III. 生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に血清生化学的検索と血液学的検索について

中川好男* 福田向江* 柴 英子* 平賀興吾*

Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches

III. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Serum Biochemical and Hematological Examinations

YOSHIO NAKAGAWA*, HISAE FUKUDA*, HIDEKO SHIBA* AND KOGO HIRAGA*

1. 緒　言

前報のⅠおよびⅡに引き継ぎ，本報では，ＪＣＬ—ＳＤ系ラット（以下Ｊ群ラットと略す）とＳＬＣ—ＳＤ系ラット（以下Ｓ群ラットと略す）の血液学的検索の結果について報告する．

第Ⅰ報の序論でも述べたごとく，化学物質の安全性評価のために用いる実験動物は，その生理的な性状を理解して使用されねばならない．しかしながら動物の性状は飼育状態のさまざまな環境因子により複雑な影響[1]をうけて変化することが知られている．

そこで異なった生育場から購入した同系統の２群のラットを，当研究所の同一環境内で飼育して，これら両群の性状を血清生化学および血液学の面から検索した．またこれらの動物を毒性試験に使用した場合，両群の刺激負荷（今回は抗酸化剤であるＢＨＴを使用した）に対する感受性の差について，血液学的および生化学的検査と酵素組織化学的検索から検討した．

2. 実験材料および実験方法

1) 実験動物：第Ⅰ報の通り４週齢の雌雄のJCL—SD系ラット（Ｊ群ラット）とSLC—SD系ラット（Ｓ群ラット）を，以下の実験に使用した．

2) 実験方報：

① 飼育方法，飼育環境，および刺激負荷に用いた化学物質については第Ⅰ報の通りである．

② 血清の調製：剖検時，ラットを断頭したさい放出する血液をガラス製の遠心管に取り，遠心管に蓋をしてから室温で30分間，引き続いて氷冷中で60分間放置した．その後，冷却遠心分離機（Tomy Seiko, RS—71A型 Swing Rotor）で4°C 3000 rpm 10 分間の遠心分離[2]を行ない，その上清を血清生化学検査に使用した．

③ 血球用試料の調製：ラットを断頭したさい放出する血液（0.5 m*l* 位）をヘパリンナイリウム（100 units）を塗布したガラス製の遠心管に取り，軽く振盪後 44.7 m*l* を希釈液（ISOTON：Coulter Counter 用血球希釈液）で 10 m*l* に定量（Automatic diluter LD-1：York 社）して血液学的検査に使用した．

④ 血清生化学検査：上記の方法により調製した血清を自動分析装置（Hitachi M-400 Automatic Analyther)[3]を用いて以下の８成分について測定した．

a) 総タンパク質量（以下 TP と略す)—Biuret 法 b) グルコース量(GLU)—Glucose-oxidase 変法 c)総コレステロール量 (CHO)—Liberman-Burchard 法

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

d) 尿素窒素量 (UN)-Urease-Indophenol 法 e) トランスアミナーゼ活性 (GOT, および GPT)—Reitman・Frankel 変法 f) アルカリホスファターゼ活性 (ALP)—Kind-King 変法 g) コリンエステラーゼ活性 (ChE)—Takahashi-Shibata 変法

なお測定用試薬はアナセラムシリーズ (第一化学薬品) を使用し, 測定条件の精度管理に凍結プール血清 (コンセーラ：日水製薬) を用いた.

⑤ 血液学検査：上記の方法により調製した希釈血液は Coulter Counter Model—S[4] (Coulter electronic INC) を用いて以下の7成分について測定した. a) 白血球数 (以下 WBC と略す) b) 赤血球数 (RBC) c) ヘモグロビン量 (Hgb) d) ヘマトクリット(Hct) e) 平均赤血球容積 (MCV) f) 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) g) 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) なお測定条件の精度管理は標準血液 (4C ; Coulter INC) を使用して行なった.

⑥ 血液凝固時間の測定法：ラットを断頭したさい放出する最初の血液を時計皿に滴下しSahli-Fonio[5]法により血液凝固時間を測定した.

⑦ 酵素組織学的検索 (肝 ALP 活性の検出)

2×5×5 mm 大に細切した肝臓 (方形葉) を 4°C10% のホルモールカルシウム (pH 7.2～7.3)[8] 液中で一晩固定した後, クリオスタットで切片を調製し Burstone-Watanabe 変法[9]で組織の ALP 活性を染色した.

3. 実験結果

1) J群ラットとS群ラット (：正常群ラット) の血清生化学検査

生育場の異なる同系統の2群ラットを4週齢以降9週齢まで飼育し, この両群の血液学的な挙動について観察した.

J群ラットとS群ラットの血清成分の経時的な変化は, 入室後5週間まで雌雄ともに比較的類似した挙動を示した. (Fig.1) この両群の血清成分を各時点で比較すると, 入室1日後では雌雄の TP, 雌の CHO と UN および雄の GPT 活性に差が認められたが, その後成長とともにこれら成分には差がみられなくなり, 2週間後ではこれらは同量, あるいは同じ活性値を示した. この期間における両群の血清成分の量的あるいは活性的な比較では, 雌雄の TP と雌の CHO がS群ラットに高く, 雌の UN と雄の GPT ではJ群ラットに高く現われた. しかし入室5週間後では雌雄ラットともS群の GOT 活性がJ群より低くあらわれた.

次に両群に共通した各血清成分の挙動を個体の生長の面から観察すると, 週齢に伴って TP と UN が雌雄ラットとも増加したが GOT 活性は減少した. 雄の ALP 活性が入室2週間後に一時的な活性の上昇を示したが, 雌では認められなかった. ChE 活性は雄では週齢にかかわらずほぼ一定の値を示したが, 雌では入室1週間以後, 急速に活性が上昇し, 5週間後では4倍の活性値を示した. CHO, GLU, および GPT 活性については実験期間中に顕著な変化が見られなかった.

2) J群ラットとS群ラット (：正常群ラット) の血液学検査

4週齢以降9週齢までの両群ラットの血液成分は Fig. 2 に経時的に示した. 両群の血液成分は雌雄とも経時的に類似した挙動を示した. WBC に関しては雌雄両群とも有意な差は認められなかった. 両群雄の RBC は実験期間中, 有意な差が見られなかったが, 雌群では入室直後から2週間までJ群ラットに RBC が継続的に低くあらわれた. またこの時期にこれと並行して Hgb と Hct が同じ挙動を示したが, 5週間後にこれらの3成分には差がなくなった. 雄群の Hgb, Hct および MCV は入室直後にJ群ラットに低くあらわれたが, 1週間以降両群ラットにはこれらの差が見られなかった. Fig. 2 には示していないが両群雌雄の MCH と MCHC は全期間それぞれ 21±2 μμg と 37±2%の範囲を示し有意な差は認められなかった.

次に両群に共通して各成分の挙動を, 個体の成長の面から観察すると, 週齢に伴って RBC, Hgb および Hct は増加したが, MCV は逆に減少した. MCH と MCHC は前述したごとく, 各々一定した値を示した. WBC に関しては雄では2週間以後増加する傾向を示したが, 雌ではJ群ラットが一時的な上昇を示しその後, 以前の範囲に戻った.

3) BHT を負荷したJ群ラットとS群ラットの血清生化学および血液学検査

J群およびS群ラットにBHT (1.5%) を加えた餌を入室後1週間目から4週間にわたって自由に摂取させ, この化学物質に対する両群ラットの反応を血液学的に検索した. Table Ⅰに血清生化学検査の結果を, TableⅡに血球数などに関した血液学検査の結果を示した. 表中の↑は対照群 (正常飼料飼育群) に比べて有意に増加した処理群の成分を示し, この逆は↓で示した. TableⅠに示したように投与1週間後から両群の血清成分は複雑な変化を示した. 投与1週間後

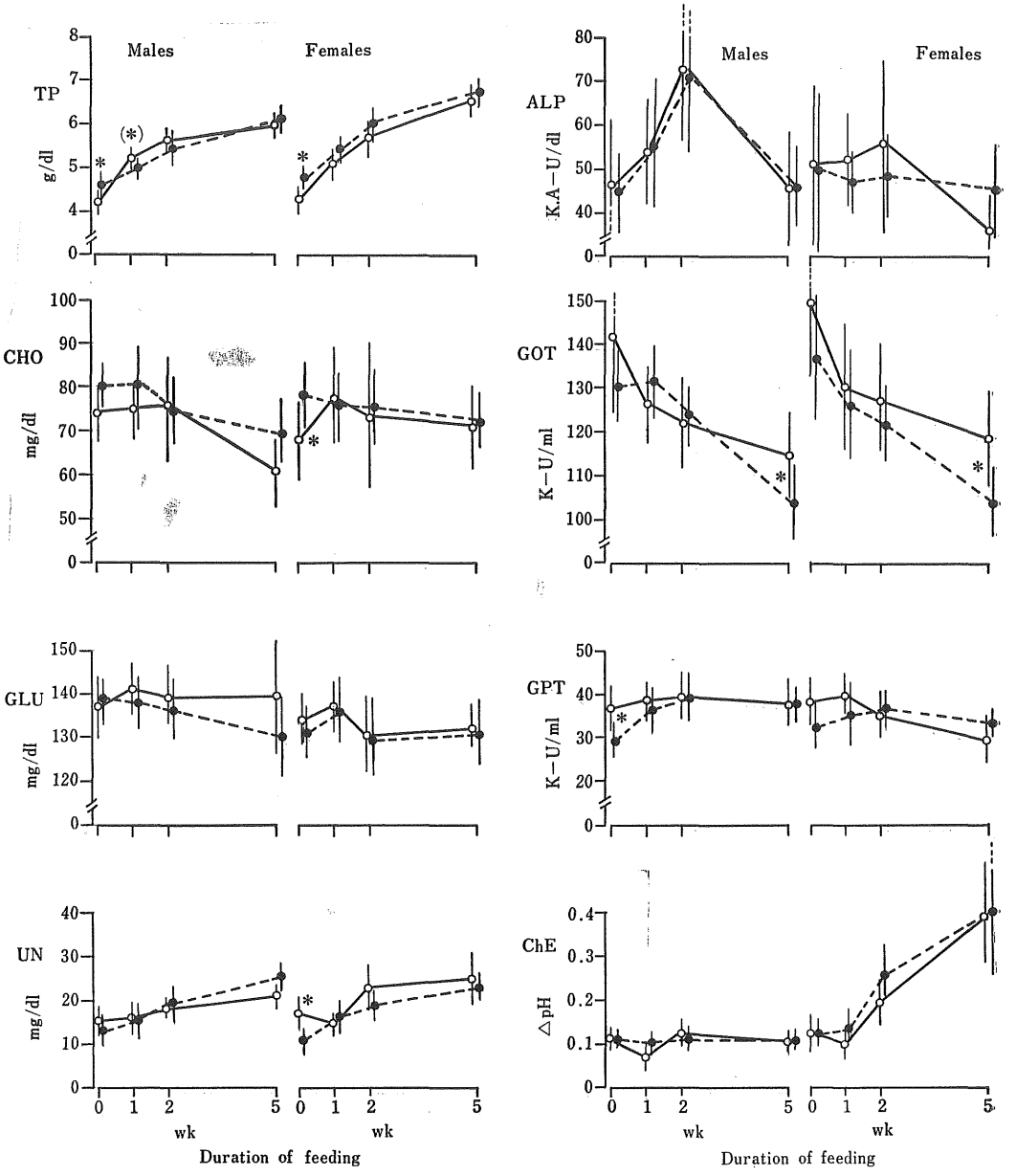


Fig. 1 Blood biochemical changes of normal rats
○——○ J-Rats ●·····● S-Rats
Points indicate means±SD
* $P < 0.01$ (*) $P < 0.05$

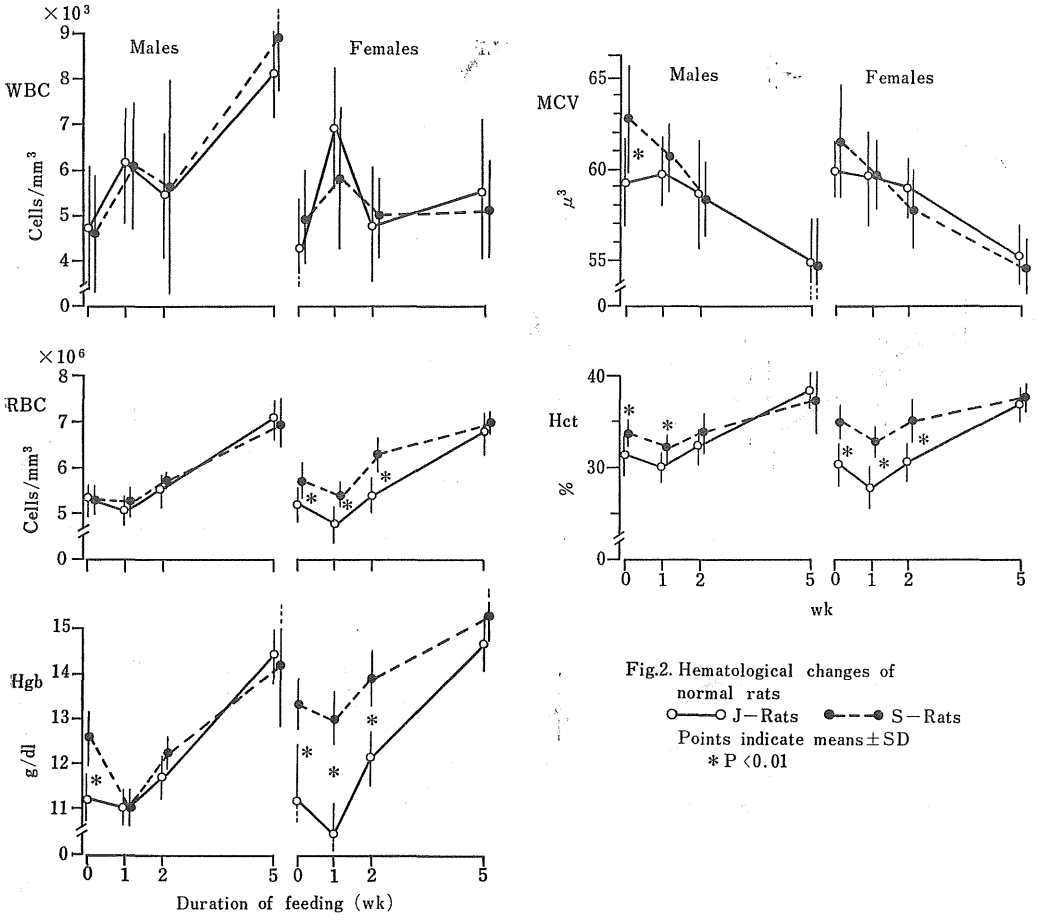


Fig.2. Hematological changes of normal rats
○—○ J−Rats ●- - -● S−Rats
Points indicate means±SD
＊P<0.01

のＪ群ラット雄の血清成分は，Ｓ群ラット雄に比べ多成分に反応が現われたが，４週間後では逆にＳ群ラット雄の方が多成分にわたり反応した．雌ラットでは両群とも反応のあらわれ方が投与４週間後より１週間後において強く認められた．

次に両群雌雄における血清各成分の変化をみると，ＴＰは投与１週間後のＪ群ラット雌雄とＳ一群ラット雌で減少したが４週間後ではこれらすべてが対照群の値に戻った．CHO は４週間後のＪ群ラット雌雄で増加したが，Ｓ群ラット雌雄では１週間後から増加した．ＧＬＵは両群とも実験期間中減少した．ＵＮは４週間後の両群雄にのみ増加がみられた．血清酵素については，ＡＬＰ活性は１週間後のＪ群ラット雄で，また４週間後のＳ群ラット雄で増加した．雌では両群とも全期間にわたり増加していたが４週間後のＡＬＰ活性に増加の抑制が認められた．ＧＯＴおよびＧＰＴ活性は１週間後のＪ群ラット雌雄で同時に増加し，４週間後に減少した。一方Ｓ群ラットでは，ＧＯＴ活性が１週間目の雌にのみ増加した。ＧＰＴ活性は雌雄とも全期間で増加していたが４週間後の活性に増加の抑制が認められた。ChE 活性は両群の雌にのみ減少を示した．

血球数およびその成分に関しては，Table Ⅱ に示すように両群雌雄とも血清成分に比べ顕著な変化は見られなかった．ＢＨＴ負荷１週間後のＳ群ラット雌と４週間後のＪ群ラット雌においてＷＢＣが増加した．ま

Table Ⅰ. Results of blood biochemical examinations in rats fed on diets containing 1.5% BHT for 1 or 4 weeks

		J-Rat				S-Rat			
		Males		Females		Males		Females	
		1 wk(Ⅲ-J)	4 wk(Ⅳ-J)	1 wk(Ⅲ-J)	4 wk(Ⅳ-J)	1 wk(Ⅲ-S)	4 wk(Ⅳ-S)	1 wk(Ⅲ-S)	4 wk(Ⅳ-S)
TP	C	5.6±0.2 ↓	6.0±0.3	5.7±0.5 ↓	6.6±0.3	5.4±0.3	6.1±0.3	6.0±0.4 ↓	6.7±0.3
g/dℓ	T	5.0±0.3 **	6.1±0.1	5.4±0.2 *	6.4±0.4	5.4±0.2	6.2±0.5	5.3±0.3 **	6.6±0.3
CHO	C	75±12	61± 7 ↑	73±17	71± 9 ↑	74± 8 ↑	69± 8 ↑	75± 9 ↑	72± 6 ↑
mg/dℓ	T	84±12	107±18 **	86±17	90±15 *	101±12 **	101±20 **	93±11 **	115±10 **
GLU	C	139± 7 ↓	139+13 ↓	131± 8 ↓	132± 5 ↓	136± 7 ↓	129± 9 ↓	129±10 ↓	131± 8 ↓
mg/dℓ	T	115± 7 **	116± 8 *	109± 9 **	123± 8 *	115± 7 *	114± 4 **	115± 6 *	114± 5 **
UN	C	18± 2	21± 2 ↑	23± 6	25± 6	19± 4	19± 2 ↑	19± 4	24± 6
mg/dℓ	T	21± 2	29± 8 *	25± 3	24± 3	22± 2	25± 3 *	20± 3	23± 3
ALP	C	72±17 ↑	46±13	55±20 ↑	35± 9 ↑	70±16	46± 9 ↑	48± 9 ↑	45±11 ↑
U/dℓ	T	88±12 (*)	56±28	82±19 *	53±12 *	91±24	72±17 **	75±20 *	58±14 (*)
GOT	C	122±11 ↑	115± 9	127±13 ↑	117±11	123± 7	103± 9	121± 9 ↑	104± 8
U/mℓ	T	146±13 **	123±15	142+ 9 *	118± 5	131±11	109±11	135±13 (*)	104±11
GPT	C	38± 6 ↑	37± 6	35± 5 ↑	31± 6	39± 6 ↑	37± 3 ↑	36± 4 ↑	33± 3 ↑
U/mℓ	T	55± 5 **	47±13	64± 9 **	37± 6	66±14 *	53± 8 **	71±15 **	40± 8 *
ChE	C	0.12±0.02	0.10±0.01	0.19±0.05	0.38±0.11 ↓	0.10±0.01	0.10±0.02	0.25±0.07 ↓	0.49±0.05 ↓
ΔpH	T	0.13±0.01	0.10±0.02	0.15±0.02	0.24±0.07 *	0.12±0.02	0.11±0.02	0.14±0.02 **	0.24±0.06 **

Table II. Results of hematological examinations in rats fed on diets containing 1.5% BHT for 1 or 4 weeks

		J-Rat				S-Rat			
		Males		Females		Males		Females	
		1 wk (III-J)	4 wk (IV-J)	1 wk (III-J)	4 wk (IV-J)	1 wk (III-S)	4 wk (IV-S)	1 wk (III-S)	4 wk (IV-S)
WBC	C	5.5±1.4	8.0±1.0	4.7±1.2	5.4±1.6 ↑	5.5±1.4	8.9±1.3	5.0±0.9 ↑	5.1±1.2
$10^3/mm^3$	T	5.2±1.1	14.8±14.0	5.7±0.8	7.3±0.8 *	6.8±2.4	12.0±12.1	7.4±1.4 **	6.7±2.4
RBC	C	5.5±0.2	7.1±0.4	5.3±0.4	6.8±0.3	5.7±0.1	6.9±0.7	6.2±0.4	6.9±0.2
$10^6/mm^3$	T	5.5±0.3	6.4±1.4	5.4±0.6	6.5±0.4	5.1±0.5	6.3±1.4	6.0±0.2	6.7±0.4
Hgb	C	11.7±0.5	14.3±0.6	12.1±0.6	14.5±0.5 ↓	12.3±0.4	14.1±1.5	13.9±0.8	15.1±0.5 ↓
g/dℓ	T	12.2±0.8	13.3±1.9	12.5±0.6	13.8±0.7 (*)	11.1±3.0	13.6±2.3	13.4±0.6	14.6±0.5 (*)
Hct	C	32.0±1.4	38.3±1.8	31.3±1.7	37.2±1.8	33.1±1.1	37.3±4.5	35.7±2.3	37.8±1.4
%	T	31.6±1.4	33.9±5.4	31.5±0.9	35.5±2.2	29.3±8.5	34.8±6.8	34.2±1.3	36.2±1.5
MCV	C	58.4±2.5	55.0±1.9	58.9±1.1	55.2±1.2	58.2±1.4	54.7±2.7	57.6±1.8	54.7±1.4
μ^3	T	58.0±1.3	56.2±4.6	57.2±1.4	54.9±2.1	57.6±1.8	55.7±2.3	56.8±1.1	54.7±1.1
MCH	C	21.3±1.2	20.2±0.9	22.6±1.0	21.3±0.3	21.5±0.6	20.4±1.2	22.0±0.6	21.6±0.8
pg	T	22.1±1.2	21.6±1.5	22.3±0.6	21.0±0.6	22.0+1.3	21.5±1.3	22.2±0.5	21.7±0.7
MCHC	C	36.7±1.0	37.1±0.8 ↓	38.6±1.3	38.9±0.7	37.0±0.6	37.7±1.5	38.6±0.8	39.9±1.7
%	T	38.3±2.3	39.3±1.8 *	39.7±1.5	38.7±0.7	38.1±1.3	38.9±0.9	39.2±0.9	40.1±0.9

C : Control T : Treated

Values indicate means ± standard deviation and those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from their corresponding controls.: (*) $P<0.05$, *$P<0.01$, **$P<0.001$,

Toble Ⅲ. whole blood coagulation time

Sex			J-Rat Beginning a)	J-Rat Ending b)	S-Rat: Beginning	S-Rat: Ending
Males	1 wk	C	0.93±0.26 c)	1.73±0.43	1.16±0.27	2.06±0.42
		T	3.59±1.09 **	5.62±2.07 **	1.94±0.58 (*)	3.35±0.98 (*)
	4 wk	C	1.23±0.33	1.76±0.36	0.88±0.41	1.58±0.55
		T	2.56±1.52 (*)	4.71±1.99 *	1.77±0.43 **	3.08±0.95 **
Females	1 wk	C	1.33±0.35	2.20±0.57	1.04±0.31	1.88±0.44
		T	3.09±1.73 (*)	5.37±2.77 *	1.98±0.58 **	3.45±1.03 **
	4 wk	C	1.22±0.42	1.86±0.57	0.98±0.53	1.79±0.60
		T	1.59±0.31	2.99±0.79	1.13±0.37	2.27±0.67

C : Control T : Treated
a).b), Min c) Mean±SD,
Significantly different from control, (*) P<0.05 * P<0.01 ** P<0.001

Table Ⅳ. ALP activity of bile canaliculi of J-Rat.

group / No. of preparations / portion of lobule / sex		1 wk-C * (3)			1 wk-T ** (3)			4 wk-C (3)			4 wk-T (4)		
Male	P	±	+	−	++	++	++	+	+′	±	++	++′	+
	M	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+′	±
	C	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Female	P	−	−	−	++′	++	+	−	−	−	±	++′	±
	M	−	−	−	+′	+	−	−	−	−	−	±	−
	C	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

: portior of lobule : P : perypheral, M : midozoral, C : central
: grade of activity : −<±<+′<+<++′<++
* Control **Treated

Table Ⅴ. ALP activity of bile caneliculi of S−Rat.

group / No. of preparation / portion of lobule / sex		1 wk-C * (3)			1 wk-T ** (4)				4 wk-C (3)			4 wk-T (4)			
Male	P	+′	±	+′	++	++′	++′	+++′	++′	+′	+′	±	++′	++′	+′
	M	−	−	−	+	+′	+	++′	±	−	−	−	+	+′	+′
	C	−	−	−	+′	−	±	±	+	−	−	−	−	−	−
Female	P	+′	−	−	+	+′	++′	+	−	−	−	−	+′	−	−
	M	−	−	−	−	−	+	+′	−	−	−	−	−	−	−
	C	−	−	−	−	−	+′	−	−	−	−	−	−	−	−

: portion of lobule P : perypheral, M : midzonal, C : central
: grade of activity : −<±<+′<+<++′<++<+++′
* Control ** Treated

た両群の雌は4週間後に Hgb 量の減少を示した．雄ではJ群ラットが4週間後に MCHC の減少を示した．

TableⅢはＢＨＴ負荷による両群ラットの血液凝固時間の測定結果である．凝固時間の延長は雌雄両群のラットに認められたが，4週間後の両群雌では凝固時間が同週齢の無負荷対照群とほぼ同値であった．

4) 肝 ALP の酵素組織学的検索

ＢＨＴ負荷により毛細胆管のＡＬＰ活性の増加が顕著に見られ，その結果を Table Ⅳ，Ⅴに示した．ＡＬＰ活性は，グリソン鞘を中心とする小葉周辺部の毛細胆管で強く，さらに活性の強い場合には，小葉の中間部の毛細胆管にも認められ，活性の検出される範囲が広がった．表に示すようにＢＨＴ負荷1週間後の両群は，各々の無負荷群に比べ，より強い活性が認められ，特に雄では両群とも顕著であった．

また，ＢＨＴ負荷4週間後の両群では，1週間負荷群に比べ，活性は低下しており，特に雌ではこの傾向が強く，Ｓ群ラットの負荷群では，無負荷群と同様ほとんど活性は認められなかった．

また，雄の無負荷群では小葉周辺部に活性が認められたが，雌の無負荷群では全く活性は認められなかった．

4. 総括と考察

1) 正常群ラットの血清生化学的，血液学的性状

血中に存在するさまざまな生体成分は，個体の成長にともなって一定の挙動を示すことが知られている[6]．今回使用した生後4週齢以降の無処置ラットの血清成分，血液成分にも以下にのべるような傾向を認めた．ＴＰとＵＮは成長（第Ⅰ報 Fig. 2）とともに増加し，逆に GOT 活性は減少した．ChE 活性は5週齢以後性差が顕著になり，9週齢で雌の活性値は雄の4倍を示した．その他の4成分は4週齢以降9週齢までほぼ一定したレベルを維持した．RBC，Hgb および Hct は成長とともに増加した．これらに対し MCV は減少する傾向を示し，これは RBC の加齢にみられる容積の縮小と一致する[7]．MCH と MCHC は両群雌雄とも，それぞれ 21±2 pg と37±2%の範囲で期間内一定した値を維持した．WBC は入室後2週間まで両群雌雄とも，ほぼ同値を示したのが，5週間後，雄が雌より上昇し，この成分に性差のあることが示唆された．

次にＪ群ラットとＳ群ラットの血清成分と血球成分の量的あるいは活性的なひらきを検索した．入室1日後に認められた両雌群，両雄群のＴＰ，および両雌群の CHO, UN, GPT などの各成分の差は，飼育1週間後に雄のＴＰを除いてなくなり，またＴＰの差も2週間後になくなり，以後これらの成分は経時的に両群とも同じパターンを示した．入室後初期にみられたこれら成分のひらきは，生育場からの移動にともなった環境からの諸因子による影響が考えられるが，飼育終了期に認められた GOT 活性のひらきは，両群ラットが当研究所の環境下で飼育された際，成長とともに現われてきた性状の本質的な差と推定される．両群の血球成分を比較すると，入室2週間まで RBC, Hgb および Hct の各成分が雌群にのみ顕著なひらきを示した．Ｓ群ラットに比べ低値を示したＪ群ラットのこれらの成分は，成長とともに増加し，5週間後には両群に差が認められなくなった．雄群で入室一日後にみられた Hgb, Hct および MCV のひらきも同様な経過を示した．初期にみられたこれら血球成分のひらきは血清成分の場合と同様に入室前後に作用した種々の環境因子による両群の感受性のあらわれ方と思われる．しかし，両群を同条件で飼育すると，血中成分は量的，あるいは活性的に一部の成分を除いてほとんど差がなくなり，同系統のラットを生育場別に，血液成分的に特徴づける性状的要素が少ないことが示唆される．

2) ＢＨＴ負荷群ラットの血清生化学的，血液学的性状

ＢＨＴ(1.5%)を含有させた餌を，入室1週間後から4週間自由に摂取させた．投与1週間後から両群の体重増加は抑制（第Ⅰ報 Fig. 1）され，負荷試験の終了時までに，Ｊ群ラット雄が50%の死亡率を，雌が10%の死亡率を示した．（Table Ⅵ参照）しかし，Ｓ群ラットでは雌雄とも死亡率は皆無であった．この個体レベルで観察した両群のＢＨＴに対する感受性は，Ｓ群ラットよりＪ群ラットに顕著に現われ，Ｊ群ラッ

Table Ⅵ. Cumulative death record of rats fed BHT at dietary levels of 1.5% for 4weeks

wk	Cumulative mortality J-Rats Male	J-Rats Female	S-Rats Male *	S-Rats Female
1	0	0	0	0
2	0	1	0	0
3	3	1	0	0
4	5	1	0	0

Figures represent the number of rats dead from groups of 10, *5.

トでも雌より雄に現われた．そこでＢＨＴの負荷により，両ラットの血液成分がいかに変化するか検討した．Table. Ⅱに示したように血球成分より血清成分に変化が顕著にあらわれ，投与１週間後，両群雌雄ともGOT, GPTおよびALP活性などが上昇したことから，全処置群が程度の差はあるが急性の肝障害を起こしたものと推定される．両群の雄および雌どうしを血清成分の変化からみると，投与１週間後のＪ群ラット雄は，Ｓ群ラット雄に比べ多成分に変化がみられた．しかしＳ群ラット雄も４週間後において多くの成分に変化があらわれており，経時的に障害が進んでいることが示唆される．雌では両群とも投与１週間後から，Ｊ群ラット雄以上に変化がみられ，また実験期間を通してＳ群ラット雌に若干強い感受性がみられた．腎機能障害の指標成分の一つであるＵＮは投与４週間後の両群雄にのみ増加した．また雌では，ChE活性の低下がみられ，BHTに対して感受性に性差があり，投与期間の延長により多方面に反応が進んでいることが示唆される．

血球成分では両群雌に変化があらわれ，WBCの増加とHgbの低下を示した．血液凝固時間に関しては，投与１週間後の両群雌雄と４週間後の両群雄に時間の延長がみられたが，４週間後の両群雌では無処置群と差がなくなり，にＢＨＴ対して性差が経時的にあらわれてきたものと思われる．

3) 肝ＡＬＰ活性の酵素組織学的検索

ＢＨＴ１週間負荷および４週間負荷群のラットについて，肝臓のＡＬＰ活性を酵素組織学的な手法により検出し，血清ＡＬＰ活性と合せて検討したが，ＡＬＰ活性は肝臓では，グリソン鞘の胆管上皮，動脈外壁および増生している線維芽細胞に見られ，また毛細胆管の活性は，ウサギ，イヌなどでは規則的に見られるが，正常ラットでは，弱い活性が小葉周辺帯に見られることが知られている．今回用いたＪ群，Ｓ群のラットでも，雄では普通飼料飼育群（無負荷群）で，グリソン鞘を中心とする小葉周辺帯の毛細胆管で，その活性が認められたが，雌では全くその活性が認められず，毛細胆管の活性には血清ＡＬＰと同様，雌雄の差があると思われる．また，ＢＨＴ負荷によって雌雄とも，毛細胆管のＡＬＰ活性が増加し，ＢＨＴ負荷による影響が考えられ，また血清ＡＬＰ活性は，GPT, ChEの活性の変化から考えて，やはりＢＨＴ負荷による肝機能の変化を意味し，この点では酵素組織学的に得られた結果と一致すると思われる．しかし，血清ＡＬＰはＪ群雄で１週間負荷群で増加し，Ｓ群雄では４週間負荷群で増加しており，両群に差が認められたが，毛細胆管のＡＬＰ活性は，Ｓ群雄でその小葉における局在がＪ群に比べやや広がったものの，４週間負荷群では両群とも活性の低下を示し，活性の強さには差が認められなかった．また，雌では４週間負荷群で，血清活性は有意に増加したのに対し，毛細胆管の活性は，全く認められず，両方法によって得られた結果は，肝機能の変化を反映したが，一致しない点もみられた．この点に関して，血清ＡＬＰには，肝以外の臓器に由来するＡＬＰが存在することが知られており，血清のALPのisoenzymeパターンなどについても合せて検討する必要があると思われる．また従来，毛細胆管のＡＬＰ活性については，肝硬変や，胆管閉塞などによる胆汁うっ滞時に，血清ＡＬＰの活性の増加が認められ，その場合に毛細胆管の活性も増加し，これが血清ＡＬＰに反映していることが知られているが，その機能については不明な点が多く，今回ＢＨＴによって増加した毛細胆管のＡＬＰ活性および血清ＡＬＰ活性が，どのような機転によるものかは，さらに検討を必要とするところである．

文　献

1) Paget, G. E., *Methods in Toxicology* 11～48, Blacwell Scientific Publications.
2) 金井　泉：臨床検査法提要　金原出版（1968）
3) 奥田　清：臨床検査，17(11)24～36
4) 服部理男：臨床検査，17(11)143～148
5) 金井　泉：臨体検査法提要Ⅳ～80（1968）
6) 長場一雄：生長の生化学（1966）医学書院
7) Kugelmass, I. N., *Biochemistry of Blood in Health and Disease*, (1959), Thomas, Sprinfield
8) 鈴木　裕：臨体検査　17(2)133～146
9) 渡辺慶一，鈴木　裕：モダンメディア　17(4)149～161

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 609 — 629, 1974

毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究

IV. 生育場を異にする同系統ラットの成長発育における比較からみた性状の研究，特に解剖組織学的変化について

藤井　孝*　阿部幸恵*　湯沢勝広*　平賀興吾*

Fundamental Studies on Physiological Properties of Rats used in Toxicological Researches

IV. Comparison of Growth in the Same Strain Rats from Different Breeders with Special Reference to Anatomical and Histological Changes

TAKASHI FUJII*, YUKIE ABE*, KATSUHIRO YUZAWA*, AND KOGO HIRAGA*

1. 緒　言

先に序論で述べた如く，今回 "毒性研究に用いるラットの性状に関する基礎的研究" の一環として生育場の異なる同一系統のラットの性状を比較検討する事にした．本報告はこの両者の性状を解剖組織学的にとらえたものである．

2. 実験材料および実験方法

ラットの群別，飼育方法その他詳細は "第1報" で述べた如くなので，ここではラットの群別と群の略号を示す表を掲げるのみに止める．

各群のラットは断頭，放血屠殺後解剖し，脳，下垂体，胸腺，心臓，肺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，精巣卵巣は摘出し秤量を行なった後，その他，胃，小腸，大腸，膵臓，精巣上体，前立腺，子宮は摘出後，それぞれ直ちに Lillie の緩衝ホルマリン液に入れ，振盪器で約21時間，途中で1回，液交換を行なって振盪，固定した．その後，定法に従ってパラフィン切片を作製し，Hematoxylin-Eosin 染色，PAS 反応，必要に応じて Azan-Mallory 染色，Elastica-van Gieson 染色を施し，また凍結切片を用い Sudan Ⅳ によって脂肪染色を行ない，これらの組織標本について光学顕微鏡下での検索を行なった．

	群の略号	飼育期間	群の略号	飼育期間 負荷期間	群の略号
JCL—SD系	J 群	1日間	0・J		
		1週間	1・J		
		2週間	2・J	2週間 1週間	2・J・T
		5週間	5・J	5週間 4週間	5・J・T
SLC—SD系	S 群	1日間	0・S		
		1週間	1・S		
		2週間	2・S	2週間 1週間	2・S・T
		5週間	5・S	5週間 4週間	5・S・T

3. 観察結果

1) 解剖学的所見

解剖時の肉眼的異常所見は Table Ⅲ に示した通りであるが，詳述すると次の如くである．

① 背部の脊椎と接する部位の皮下組織の点状出血：

これは JCL-SD 系（以下J群と略す）で飼育1週

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan.

間，2週間の群の雄各10例中5例づつ見られ，またSLC—SD系（以下S群と略す）で飼育1週間，2週間の群の雄にもそれぞれ10例中4例と3例見られた．J，S群共，雌は雄よりも出現例数が少なかった．

dibutyl hydroxy toluene（以下BHTと略す）を負荷したJ群とS群では雌に1例もなく，雄では負荷1週間のJ群に1例，また負荷4週間ではJ，S群とも3例づつ見られた．

② 胸側部皮下組織の点状出血：

これはJ群では雌雄の出現例数が同じであったのに対し，S群では雌に多く見られた．J，S群間で出現例数に差は無かった．BHT負荷による出現例数の増減は見られなかった．

③ 下腹部白線附近の腹直筋の斑状出血：

これはJ，S群共に雄にのみ見られ，S群にJ群より多かった．

④ 胸腔内に少量の粘稠度の低い血液が貯留していた：

これはBHT負荷4週間のJ群雄で5例中2例見られ，他群では見られなかった．

⑤ 胸腺の一葉が黒色を呈して膨満し，割を入れると凝固不完全な血液が流出し，またその短軸方向の割面は長円形を呈していた．残りの一葉は殆んど変化していなかった：

これはいずれもBHT負荷4週間の群で見られ，J群雌雄で各2例，S群雄で1例見られた．

尚，J群雄の2例は前述の胸腔内に血液が貯留していたのといずれも同一個体であった．

⑥ 精巣が赤紫色の液体で膨満し被膜も緊張し，両側の精巣に見られた例で片側の被膜を除去したところ，上述の胸腺の変化で見られたと同じような血液が流出した：

これはいずれもBHT負荷4週間の群で見られJ群では両側に見られたもの1例，片側のみに見られたもの1例，S群で片側のみに見られたもの1例であった．尚，これらはJ群雄の1例を除いていずれも上述の胸腺での変化を示したのと同一個体であった．

⑦ 精巣上体頭および体部が赤紫色を呈し，割を入れると前述の胸腺，精巣で見られたと同様の血液が貯留していた：

これはいずれもBHT負荷群で見られ，負荷1週間のJ群で10例中両側に見られたもの3例，片側にのみ見られたもの2例計5例，負荷4週間のJ群で5例中両側に見られたもの3例，S群で10例中片側のみに見られたもの2例であった．尚，これらのうち負荷4週間のJ群の全例，S群の1例は前項⑥での変化を示したのと同一個体であった．

⑧ 腎臓にケシ粒大～米粒大の水胞が表面では稍々隆起して点在し，割面では皮質被膜直下によく見られ，その他皮質髄質にも散在していた：

これはJ群の特に雄に多く見られS群では少なかった．BHT負荷による出現例数の増減などの変化は見られなかった．

2） 組織学的所見

組織変化を顕著に示したのは，肝臓，腎臓，胸腺，膵臓，精巣，精巣上体であった．肝臓，腎臓の変化はTable Ⅳ，Ⅴにそれぞれ示した通りであるが，その他の臓器も含めて詳述すると次の如くである．

① 肝臓に円形または楕円形で約$25\times10^4\mu^2$からその1/4位まで，大小種々の限局性壊死巣が散在して見られ，この巣の周囲には有糸分裂を示す肝細胞があり，巣の外層は細胞質が好塩基性，好酸性を強く呈し，核は濃縮の傾向を示す細胞境界不明瞭な肝細胞より成っていた．この層から中心部にかけて好酸性小体が散在しており，中心部には様々な変性，崩壊像を示す肝細胞やその残渣，単核細胞などが見られ，変化の強いものではこの部位の肝細胞が殆んど崩壊脱落して間質の網状構造が著明になっていた．（Fig. 1）

またこの近傍のグリソン鞘が拡大して間葉系細胞などが増生している像も散見された．この変化の強弱は巣の大きさ，数，中心部の網状構造の著明さなどから判定した：

以上の像はJ群の飼育1日の群に最も多く見られ程度も強かったのに対し，S群の飼育1日の群では1例も見られず，また全経過を通してみてもJ群に多く強く見られた．BHT負荷による出現例数の増減，程度の変化は見られなかった．

②肝臓に，リンパ球，単核細胞の小集簇を中心に好塩基性，好酸性を強く呈し，稍々不整形で細胞境界不明瞭になっている肝細胞の小巣が散在的に見られた．（Fig. 2）これらの巣は殆んどが前述の壊死巣の最小のものの1/2～1/4位の大きさだった．変化の強弱は巣の数によって表わしたがいずれも3個以内であり，全て軽度と判断した：

以上の像はJ群により多く見られたが，両群とも雌に雄より多く見られた．またJ群では飼育1日と5週間の群の雌で多かったのに対し，S群では飼育1日の群の雌に多かったのみで，以後は減少し飼育5週間の群の雌では見られなかった．BHT負荷による出現例数の増減，程度の変化は見られなかった．

③ 肝臓に，巣状散在性にリンパ球，単核細胞，間葉系細胞などの小集簇が見られた．(Fig. 3) これは前述の壊死巣の最小のものの1/5～1/10位の大きさであった．変化の強弱は巣の数によって表わし，標本に7個以上見られた例を強いと判断し，3個以下を弱いとした：

以上の像はJ，S両群で出現例数は同じ位であり，共に飼育5週間の群で多く強く見られたが，S群では飼育2週間の群の雌でも多かった．BHT負荷群では負荷しない群と比べて負荷4週間のJ群は出現例数少なく程度も弱かったのに対し，S群では出現例数は顕著に増加していないが程度は強くなっていた．

④ 肝臓のグリソン鞘内の主として胆管周囲にリンパ球，単核細胞の浸潤，間葉系細胞の増殖が見られ，顕著な例ではグリソン鞘が拡張していた．(Fig. 4) 変化の強弱は変化を示すグリソン鞘の数と浸潤，増殖の程度によって判断した：

この所見はJ群に多く見られ程度も強かった．J，S群共に雌雄での差は見られなかったが飼育5週間の群は飼育0～2週間の群より，出現例数少なく程度も弱かった．BHT負荷による出現例数の増減，程度の変化はあまり見られなかった．

⑤ 肝臓の小葉中間帯の肝細胞の細胞質がエオジン淡染の微細顆粒状を呈し，細胞の大きさを増し核が不鮮明になっていたり膨化している像が多く見られたが，小葉中心部では顕著ではなく (Fig. 5, 6) またこの変化はび慢性に起こっていた．変化の強弱は一定面積当り ($250\times250\ \mu^2$) の細胞数を数え，雄では106個雌では111個以上であれば変化なしとし，雄では85個，雌では90個以下で細胞質が明調になっていれば変化は強いと判定した：

以上の所見はBHT負荷群にのみ見られた変化で，負荷1週間と4週間では変化を示す例数は同じだがその変化の程度は4週間で強かった．この傾向はJ，S群とも雌に強かった．

⑥ 肝臓の主として小葉中間帯の肝細胞の細胞質中の好塩基性物質（ヘマトキシリンで好染する物質）が(1)粗大顆粒状から凝集して小塊状になり，次いで(2)細胞膜周辺に集まって，核の周囲にはエオジン淡染の微細顆粒状の細胞質のみが残っているのが，前項で述べた腫脹と併行して見られた．(Fig. 6, 7, 8) また，この部位から小葉周辺部にかけて2～4個の核小体をもつ肝細胞が見られた．変化の強弱は前述の(1)を弱い(2)を稍々強いとして判定した：

この所見はBHT負荷群にのみ見られた変化でJ，S群とも雌よりも雄に多く強く見られ，雄では負荷期間に比例して多く強く見られたのに対し雌では稍々逆の傾向を示した．

⑦ 肝臓にび慢性に小葉中心部の肝細胞の細胞質に脂肪染色陰性の稍々粗大な空胞が生じているのが見られた．(Fig. 9) 空胞の数が増した細胞は核が濃縮し，エオジン濃染の均質化した滴状を呈し細胞はその大きさを減じていた．細胞に空胞のみ見られる場合は弱いとし，それに加えて核濃縮，細胞質の均質化が顕著なものを強い変化とした：

以上はBHT負荷群にのみ見られた変化でJ，S両群とも雄に多く見られ程度も強かった．S群では雌に出現例なく雄に多く強く見られたためS群の雌雄差はJ群のそれより顕著になっていた．またJ，S群雄では負荷期間に比例して多く強く見られた．

⑧ 肝臓ではJ，S群にうっ血が見られたが，両群に差は見られず共に雌に多かった．BHT負荷による出現例数の増減，程度の変化は見られなかった．

⑨ 腎臓の皮質から髄質外帯にかけて，$30\times10^3\mu^2$ からその30倍位の面積のもの迄，大小の嚢状の空間が生じているのが見られた．その嚢中にはエオジン淡染の液体が見られたり，内容物が不染のものも見られた他，剝離変性した尿細管上皮細胞も見られた．嚢胞の壁は尿細管上皮細胞の変性したものとその外側の膠原線維の薄い層から成っていた．(Fig. 10) 変化の強弱は嚢胞の大きさと数とによって判断し $30\times10^3\mu^2$ 以下の嚢胞が2個以下の例については殆んどがこれに該当するので変化なしとした．

以上の所見はJ群にS群よりも顕著に多く，程度も強く見られ，J群では雄に多くS群では雌に多かった．またJ，S群共に飼育1日の群で多く強く見られた．BHT負荷群では負荷しない群と比べて，負荷1週間のJ群雌雄，負荷4週間のJ群雌，S群雄で多く強く見られた．ここで嚢胞が見られた例を，その出現部位が皮質か髄質かによって分けてみると Table I に示すようになった．0.5とあるのは嚢胞が皮質，髄質の双方に見られた例である．

J群の飼育1日の群で見られた嚢胞は全て皮質にあり雄では飼育2週間，雌では飼育1週間の群で皮質より数は少ないが髄質にも見られ，雄では飼育5週間の群で皮質より髄質に多く見られた．S群ではこのような傾向は見られなかったが飼育5週間の雌の嚢胞は全て皮質にあった．BHT負荷1週間のJ群雄では負荷しない群と比べて，髄質の嚢胞が増加し皮質よりも多くなっていた．BHT負荷4週間のJ群雌雄，S群雌

Table I

	JCL—SD												SLC—SD											
	Male						Female						Male						Female					
	0	1	2	2・T	5	5・T	0	1	2	2・T	5	5・T	0	1	2	2・T	5	5・T	0	1	2	2・T	5	5・T
Cortex	5	1	2	1	1	0	4	3	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1.5	1	0.5	0	0	0
Medulla	0	0	1	3	3	2	0	1	0	4	0	4	1	0	0	1	0	1	1.5	0	0.5	1	3	2
Sum	5	1	3	4	4	2	4	4	0	5	0	4	2	0	0	1	1	2	3	1	1	1	3	2

では皮質の嚢胞は見られず髄質でのみ見られた．

⑩ 腎臓に細胞残渣，剝離細胞を含みエオジンで極く淡染の液体を容れた嚢状の空間を囲んで膠原線維の増殖がみられ（Fig. 11）その大きさは膠原線維層を含めて$50\times10^3\mu^2$からその10倍位の面積のもの迄あり，線維層の面積は嚢状空間と同じか，あるいは稍々大きかった．またこれは殆んど髄質で見られ皮質では少数であった．強弱の程度は大きさと数によって判断した：

以上の所見はJ群にS群よりも多く，程度も強く見られ，J群では雌に多くS群では雌雄同じであった．最も多く見られたのは飼育2週間のJ群雌で4例，最も大きな変化巣は飼育5週間のJ群雄で見られた．BHT負荷による出現数の増減程度の差はなかった．

⑪ 腎臓の皮質に，弱拡大で好塩基性の強い帯状または円形の$50\times10^3\mu^2$からその5倍位の面積の実質細胞の変性巣が限局性に見られた．この部位では，糸球体の貧血，萎縮，尿細管上皮細胞の腫脹，細胞質の好塩基性増加，核の膨化，基底膜の肥厚，間質結合織の増生などが見られた．（Fig. 12）変化の強いものでは糸球体，尿細管の崩壊が起こっており間質結合織の増生と共に小嚢胞形成，瘢痕化していた．強弱の程度は上述の変化の程度に変性巣の大きさ，数を考慮して判断した：

J，S両群の間に出現例数の合計，程度に顕著な差はなかったが，両群共雌に稍々多く見られた．J群では雌雄共，飼育1日の群に多かったのに対し，S群では飼育5週間の群の雌に多く強かった．BHT負荷群では負荷しない群に比べて，J，S群共雄では顕著な差は見られなかったが，雌では負荷1週間のJ群，4週間のJ，S群でそれぞれ出現例数多く，程度も強くなっていた．

⑫ 腎臓皮質の主として血管周囲の間質に，リンパ球を主体とする限局性の細胞浸潤が散在性に見られた．（Fig. 13）程度の強さは巣の大きさによって判断した：

これはJ群雌で多く見られS群雌は少なく程度も弱かった．J，S群雄は出現数の合計は同じであるがJ群では飼育5週間，S群では飼育1週間の群で多く強く見られた．また雌は，J群では飼育1週間，S群では5週間の群で顕著だった．BHT負荷群は負荷しない群と比べて，いずれも出現例数少なく変化も弱かった．

⑬ 腎臓髄質の主としてヘンレ係蹄上行脚部の尿細管上皮細胞の核が濃縮しているのが，限局性に数多く散在して見られ，核濃縮を起こした細胞の中には細胞質がエオジンに濃染して管腔中に剝離しているのも見られた．（Fig. 14）変化の強弱は核濃縮している尿細管が髄質外帯中に占める割合で判定した．

以上の所見はJ，S群にも見られたが，特にBHT負荷群では出現例数多く，程度も強かった．負荷1週間のJ，S群，負荷4週間のJ群雌，S群雄は顕著に多く程度も強かった．

⑭ 腎臓の近位尿細管上皮細胞が腫脹し細胞質は明調化，核は稍々膨化，PAS反応では刷子縁の増殖しているのが見られた．（Fig. 15）変化は限局性で散在的に現われているので，変化巣の多少によって強弱の判断を行なった．変化はJ，S群共に雄よりも雌に多く見られ程度も強く，また飼育後1週間以上の群で顕著になっていたのに対し，雄では飼育1日のS群で多いが，他に顕著な群はなかった．BHT負荷群は負荷しない群と比べて，J群では負荷1週間の雄で多く強くなり，また雌でもその傾向を示したが，負荷4週間では雌雄とも逆に，負荷しない群に多く，強く見られた．またS群では負荷1週間の雄では差がなかったが，雌では変化の程度，出現例数が軽減しており，負荷4週間では雌雄ともにこの傾向を示した．

⑮ 腎臓の近位尿細管，主として主部の直部の上皮細胞の基底部細胞質に，核の1/5～1/1程度の大きさの空胞が生じているのが見られた．（Fig. 16）強弱の

程度は空胞出現の度合と変化尿細管の多少によって判断した：

飼育5週間のJ群では雄で1例見られたのみだったが，S群では雄に2例，雌に4例見られ程度の強いものもあった．BHT負荷群では負荷しない群よりも多く強く見られ，また雌に多く強かった．負荷1週間のJ，S群では顕著に多く強く見られ，負荷4週間の群と比べても多く強く見られたが，雄ではこのような傾向は示さず負荷期間の長短による差は判然としなかった．

⑯ 腎臓皮質に限局性のうっ血が見られた：J群にS群より稍々多く見られ，J群では飼育2週間の群でS群では飼育1週間の群の雄，2週間の群の雌に多く見られた．BHT負荷による出現例数の増化，程度の変化は見られなかった．

⑰ 腎臓ではその他に，尿細管上皮細胞の剝離，尿細管上皮細胞の扁平化，尿細管腔の拡張，糸球体の融解，萎縮などの変化が限局性に散在しているのが各群に見られた：

J，S群間に顕著な差は見られず，BHT負荷による出現例数の増加，程度の変化もなかった．

⑱ 胸腺がその大きさを増しており，また肉眼で組織標本を観察すると全体が赤く見え，その中に青い小巣が少数点在しており，鏡検すると変化は同一胸腺でも小葉によって異なるが，弱いものでは中隔から皮質にかけて赤血球が見られ，強いものでは赤血球が小葉全体を満たし実質細胞は殆んど見られなくなっていた（Fig.17）また赤血球が見られない小葉では線維細胞の増殖と貪食細胞の集簇が見られた：

これはBHT負荷群にのみ見られた変化で，負荷4週間のJ群雄で5例中2例，雌で9例中2例，S群雄で9例中1例，いずれも顕著な変化を示し，J群雄で2例軽度な変化を示すものが見られた．この他胸腺の各小葉が皮質髄質の割合はそのままに全体が縮小していたのが，BHT負荷1週間のJ，S群雄に見られた．

⑲ 上述の胸腺と同じく，精巣に赤血球が充満しており多形核白血球の集簇も顕著であった．精細管は様々な変性を示し崩壊しているものも多く見られた（Fig. 18）：

これはBHT負荷4週間の群でのみ見られ，J群で5例中3例，そのうちの2例は両側に変化が見られた．またS群では9例中1例で片側の精巣にのみ見られた．変化はいずれも顕著であった．

⑳ 上述の精巣と同じく精巣上体に赤血球が見られたが，精巣，胸腺よりは軽度であった．しかし間質の増生と浮腫性拡張，貪食系細胞の集簇は，精巣，胸腺よりも顕著であり，精巣上体管も所々で崩壊していた．尚，胸腺，精巣，精巣上体の血管壁の異常は認められなかった（Fig. 19）

これはBHT負荷群のみに見られ負荷1週間のS群で7例中5例，4週間のJ群で5例中3例，S群で9例中2例見られた．負荷1週間のJ群，4週間のJ群の例に比べて，負荷4週間のJ群の例は間質の増生が顕著だった．

㉑ 膵臓で小葉単位に間質の拡張，結合織の増生が見られ変化の強い部位では外分泌腺，ランゲルハンス島の壊死，崩壊，瘢痕化の様相を呈していた．赤血球は血管内には充満していたが管外では少なかった．また小葉間結合織も一部増生しており，その中にはヘモジデリンを胞体内に含む貪食系細胞が多数見られた．（Fig.20）：

この変化はBHT負荷4週間のJ群雄で5例中3例，雌で9例中2例見られ，そのうちの雌での1例は2個の小葉が壊死しており他の例はこれより弱い変化だった．その他の各群では変化が見られなかった．

㉒ 脾臓の赤脾髄中で最も巨核細胞が多く見られる部位を10×20の倍率の視野で把え，その視野内での巨核細胞の核を測定した：

結果は Table Ⅱ. のようであった．

これは巨核細胞の出現の推移の一応の目安としたものであって，それ以上のものではないが表に示したように，その経過はS群では飼育1日の群が最も多く以後減少していき，飼育5週間の群が最も少なくなったのに対しJ群では，飼育1週間の群が最も多く，以後減少していき5週間の群が最も少なくなった．

またJ，S群ともにBHT負荷によって減少する傾向を示した．

㉓ 精巣の変化のうち精子形成に着目して，J，S群雄で精細管を観察した：

飼育1日のJ群では全例，S群では9例中6例で，精子，精子細胞，ともに見られず，S群の3例で精子細胞のみが見られた．飼育1週間のJ群では8例中6例，S群では9例中2例で精子細胞は見られたが精子は見られず，J群では8例中2例，S群では9例中7例で精子が見られた．他の各群では全例で精細管中に精子が見られた．尚BHT負荷群においても，精子は形成されていた．

3) 途中死亡例の検索

実験途中での死亡例は，BHT負荷4週間のJ群に

		0	1	2	2・T	5	5・T
Male	J	12.0±2.7	21.5±4.5	13.0±3.0	9.8±3.8	4.2±2.1	2.0±1.4
	S	17.0±4.6	14.0±3.1	10.0±4.2	6.8±1.0	2.6±1.3	2.6±1.1
Female	J	13.5±3.0	23.2±7.7	16.1±5.1	10.0±3.0	3.6±1.7	3.0±1.0
	S	14.0±5.5	10.1±3.0	10.8±4.7	6.0±3.8	4.2±2.1	1.5±0.5

のみ見られ，雄で5例，雌で1例であった．死亡迄の飼育日数，BHT負荷日数，死亡前の状態観察については"第Ⅰ報"に記載したので割愛する．

死亡時は口，鼻の周囲に血液が黒くなって付着しており，雄では陰嚢が黒紫色を呈していた．剖検では量の多少はあったが，いずれの例にも，鼻腔，胸腔，胃内に血液の貯留が見られ，胸腺は稍々凝固した血液が充満していて大きさを増していた．また胃内の血液は黒く凝固した塊状であったが，鼻腔，胸腔の血液は凝固しておらず稍々粘稠度が低かった．肝臓は全例で，程度の強弱はあったが黄褐色で黄色味が強く大きさを増していた．この他，雄では精巣，精巣上体内に出血が見られた．組織所見では，胸腺，精巣，精巣上体の間質への出血が見られ実質組織の壊死が顕著だった．

また肝臓での変化が強かった例では，び慢性に小葉中心部の肝細胞の凝固壊死が顕著に見られた．

4. 小括および考察

観察結果をJ，S群の相違点，類似点に分けて小括すると次の如くである．

相違点

a）解剖学的所見

① J群にS群よりも腎水胞が多く，J群雄にS群雄よりも背部皮下点状出血が多かった．

② J群では雄に雌よりも腎水胞が多かったがS群では差が明らかではなかった．

③ BHT負荷4週間のJ群雄にのみ胸腔内出血が見られた．またBHT負荷4週間のJ群雌で，胸腺内出血が見られたがS群雌では見られなかった．

④ BHT負荷1週間のJ群雄で精巣上体内出血が見られたがS群雄では見られなかった．

b）組織学的所見

① J群ではS群よりも，肝臓の限局性巣状壊死，グリソン鞘内細胞浸潤，腎臓の嚢胞，被包が顕著に見られた．J群雄にS群雄よりも腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮が，J群雌にS群雌よりも腎臓の限局性細胞浸潤がそれぞれ顕著だった．S群ではJ群よりも腎臓の尿細管上皮細胞の腫脹，空胞が顕著だった．S群雄では飼育1週間5週齢から精子形成が明らかになるが，J群雄はこの時期には著明ではなかった．S群雌にJ群雌よりも肝臓の限局性細胞浸潤，腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮が稍々顕著に見られた．

② J群では肝臓の限局性巣状壊死が飼育1日の群で特に多く見られた．またJ群雄では腎臓の限局性細胞浸潤が飼育期間に比例して顕著になる傾向を示した．S群では腎臓の限局性変性巣が飼育期間に比例して多くなる傾向を示した．またS群では脾臓の巨核細胞数が飼育期間に比例して減少する傾向だったがJ群では飼育1週間の群で急激に増加していた．

③ BHT負荷1週間のJ群雄では，負荷しない群よりも腎臓の尿細管上皮細胞の腫脹が，またBHT負荷の雌では腎臓の嚢胞，限局性変性が顕著だった．BHT負荷のS群雄では，負荷しない群よりも肝臓の限局性巣状壊死が，同じく雌では肝臓のグリソン鞘内細胞浸潤が稍々顕著だった．BHT負荷によってS群では腎臓の尿細管上皮細胞の腫脹が軽減される傾向を示した．

④ BHT負荷によってJ，S群共に腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮が著明になるが，これはJ群では雌でS群では雄で顕著になっていた．

⑤ BHT負荷群のみに見られた変化では，胸腺，精巣，精巣上体の出血性壊死，瘢痕化などがJ群にS群よりも多く見られ，脾臓の限局性壊死はJ群にのみ見られた．肝細胞細胞質中の好塩基性物質の凝集，空胞は，雄ではS群に稍々顕著だが雌ではJ群に顕著だった．

⑥ J群では雄に雌よりも腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮が稍々顕著に，腎臓の嚢胞が顕著に見られたが，S群では全く逆に，雌に雄よりも著明に見られた．またJ群では雌に雄よりも肝臓の限局性巣状壊死，限局性変性が稍々顕著だったがS群では判然とせず，腎臓の限局性細胞浸潤もJ群では雌に雄よりも，S群では逆に雄に雌よりも顕著だった．

⑦ ＢＨＴ負荷群にのみ見られた変化のうち，肝細胞の腫脹は，Ｊ群雄では負荷期間に比例して顕著になっていたのに対し，Ｓ群雄では逆の傾向を示した．また肝細胞の空胞は負荷１週間ではＳ群雄で顕著だが，負荷４週間では逆にＪ群雄で顕著になっていた．

ｃ） 途中死亡例の検索

死亡例はＢＨＴ負荷４週間の群のみに見られ，雄に多かった．

類似点

ａ） 解剖学的所見

① 雄に雌よりも背部皮下点状出血が見られ，腹直筋の斑状出血は雄のみに見られた．

② ＢＨＴ負荷群にのみ胸腔内出血，胸腺，精巣，精巣上体内出血が見られ，そのうち精巣上体内出血は負荷１週間の群でも見られたが，他は負荷４週間の群でのみ見られた．

ｂ） 組織学的所見

① 雄で雌よりも肝臓の限局性細胞浸潤，グリソン鞘内細胞浸潤が著明に見られ，腎臓の尿細管上皮細胞の腫脹は雌で顕著だった．

② ＢＨＴ負荷群にのみ，胸腺，精巣，精巣上体の出血性壊死，肝細胞の腫脹，細胞質中の好塩基性物質の凝集，空胞が見られ，また負荷群では負荷しない群と比べて，腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮，空胞が特に著明に見られ，負荷群雄では腎臓の嚢胞，雌では負荷４週間の群で腎臓の限局性変性巣が顕著だった．またＢＨＴ負荷によって変化が軽減される傾向を示したのは腎臓の限局性細胞浸潤，負荷４週間の腎臓尿細管上皮細胞の腫脹であり，雄での肝臓の限局性変性，限局性細胞浸潤，グリソン鞘内細胞浸潤だった．

③ ＢＨＴ負荷群にのみ見られた変化のうちで，肝細胞，細胞質中の好塩基性物質の凝集，空胞は雄に雌よりも特に顕著に見られた．

④ 飼育期間に比例して腎臓の尿細管上皮細胞の核濃縮は著明になる傾向を示し，肝臓の限局性細胞浸潤はＢＨＴの負荷の如何に拘らず，雄では顕著に，雌では稍々顕著になっていく傾向を示した．

⑤ ＢＨＴ負荷群にのみ見られた変化のうち，負荷期間と比例して顕著になる傾向を示したのは，雄では肝細胞細胞質中の好塩基性物質の凝集，空胞，雌では肝細胞の腫脹だった．負荷期間と比例して変化が軽減する傾向は，雌での肝細胞細胞質中の好塩基性物質の凝集であり，雄では見られなかった．

以上の如くＪ，Ｓ群間に解剖組織学的所見に相違が見られたが，これらの相違が生じた原因を，精子形成，脾臓の巨核細胞数の推移，ＢＨＴ負荷時の反応の差異から推定してみる事にする．精子形成を４～６週齢にかけての雄の成長の一側面として把えると，４週齢時Ｊ群に精子細胞が見られず，Ｓ群に９例中３例見られ，５週齢時Ｊ群では８例中２例，Ｓ群では９例中７例で精子が見られ，６週齢時Ｊ，Ｓ週群共に全例で精子が見られた事から考えてＪ群では５～６週齢にかけて急激に，Ｓ群は４～６週齢にかけて稍々緩やかに成長したと思われる．つまりＪ群はＳ群より時期的に遅れて成長が始まり急速に，Ｓ群はＪ群より早く始まり稍々緩やかに進むというように，４～６週齢にかけての時期，雄ではＪ，Ｓ群間で成長様式に差があったのではないかと思われる．また脾臓の巨核細胞数の推移をみると，Ｓ群では４週齢から９週齢にかけて一様に減少を続けたのに対し，Ｊ群では４週齢から５週齢にかけて急増し，６週齢で急減した．つまりＪ，Ｓ群間には４～６週齢にかけての時期，脾臓での成長，発達様式に差があったのではないかと思われる．しかしこの点については精子形成についてと同じく，更に体重，臓器重量，血液学的変化などでの検討が必要である事は言う迄もない．ＢＨＴ負荷時の反応について胸腺での変化を見ると，Ｊ群に多く強く，雄に雌よりも顕著だった．負荷１週間，６週令のＪ，Ｓ群雄の組織所見では萎縮が見られ，負荷１週間の群の途中死亡例の剖検では顕著な内出血と胸腔内への出血が見られた．負荷４週間９週齢の剖検所見では，Ｊ群の雄に５例中２例，雌に９例中２例，Ｓ群雄で10例中１例に重度の内出血が見られ，Ｊ群雄での２例は軽度な胸腔内への出血も見られた．出血が胸腺に好発するのは胸腺がこの時期に顕著に発達する臓器であり，形態的，機能的に変化が大きいためではないかと考えられる．この推定に立脚するとＳ群よりＪ群に，雌よりも雄に顕著だったのはＢＨＴの負荷がそれぞれの胸腺の，特に発達の顕著な時期に行なわれた事によると考えられる．次にＢＨＴ負荷時の肝細胞の変化をみると，始めに小葉中間部での腫脹，稍々遅れて細胞質中の好塩基性物質の凝集がおこり，次いで小葉中心部で空胞変性がおこる．この変化はＪ，Ｓ群ともに雌では腫脹以外は顕著ではなく，雄では変化が著明であり，Ｊ，Ｓ群間で変化の発現する時期に差が見られた．雄での変化は負荷１週間６週齢で，Ｓ群に腫脹，細胞質中の好塩基性物質の凝集，空胞がＪ群よりも多く見られ，負荷４週間９週齢では腫脹はＪ群に顕著だったが他の変化はＳ群で顕著だった．Ｊ，Ｓ群ともに負荷期間に比例して変化は腫脹から空胞変性へと移る傾向を示した

事からも，負荷1週間の時点でS群に空胞変性の例が多かった事は，S群がJ群よりも早くBHTに反応していた事を示すと思われる．J群では負荷4週間の群で途中死亡例が多いため，負荷期間による変化の推移が判然としないが，S群よりも反応を示すのが遅れたとは言える．この変化の発現時期の差は，肝臓の機能的発達の差による所が大であろうと思われる．雌雄差はこの発達の差に，いわゆる性差を併わせて考えるべきだと思う．今回の実験で JCL-SD 系，SLC-SD 系の間に見られた種々の解剖組織学的変化の相異からは両系統間の本質的な差は見られず，この相異は4週齢から9週齢にかけての成長，発達の様式が異なるという点に発していると思われる．同一系統，同一週令，同性であってもその形態的機能的な成長，発達の様式に個体差があるのは周知の事であるが，それが集団として一定の成長，発達様式を示し，その様式が遺伝的にも固定したものであればこの特徴を考慮した実験を行なうのは当然であり，毒性研究も実験動物を用いて行なわれる以上，今後，各動物の成長，発達様式を種々の面から検討する必要があると思われる．

結　論

毒性研究に適する良質な動物の選択と使用される動物の性状を正確に把握することを目的とした研究の一環として本実験を行なった．

系統，週令，飼育条件を一定にし，異なる生育場由来のJ群およびS群ラットを用い，本来通常実験で確認され得ない性状変化を生後4～9週の間において微細に促え，成長に伴う経時的推移を重視して比較検討した．同時に負荷に対する反応性を検討する目的でBHTを使用した．BHTは当部で毒性研究を続行している食品添加物の酸化防止剤で，肝重量の増大，腎障害，出血傾向等を起こす作用が知られている[1]．

検索の結果，J群とS群の間には性状に多くの差異が見られた．これらは生育場間の本質的な差というよりは，成長発育に時期的相違があり，そのずれが反応性に影響を与えたためと推察される．即ち体重は絶体重量でS群が終始大きかったが，体重増加率ではJ群がS群より大きく，発育促進があるようであり，臓器重量の増加の割合もJ群に大きく見られた．また精子形成はS群が早く起り，ゆっくりであるのに比べ，J群は遅れてかつ急激に見られたことから，S群の発育はJ群に先行していたと考えられる．血液成分については臓器重量等の変化が大きい時期に，量的あるいは活性的にも変動していたのは成長の程度を反映していると思われる．

次にBHT負荷により両群にみられた差について検討すると，体重と臓器重量はJ群に強い増加抑制がみられた．またJ群雄では胸腔内出血に起因する死亡例が顕著に見られ，血液性状の変化もJ群に強く認められた．これらは成長発育の著しいJ群が強く影響を受けたためと考えられる．

動物体の反応性に影響を及ぼす因子のうち，環境，飼料を一定に維持し，実験目的で種，性を選択すると他に考慮を要する主な因子は，遺伝形質と加令である．生体の反応を Russell と Burch の分類[2]に従うと，飼育後の動物実験で得られる反応はすべて dramatype であり，遺伝因子は発育環境や近隣環境に影響され，様々な反応の仕方を呈する．そこには多くの不顕性化された性状もあり，実験時の化学物質の刺激によりあるいは飼育環境の相違によりそれらの性状は様々の異なった生物反応を示すこともある．

次に加齢であるが，今回の実験でも明らかなように経時のみ指標とするのではなく，成長発育様式をも加味して考慮すべきで，作用を規定する発現因子として重要なのはむしろ成長発育の推移様式である．日頃，動物体の成長は週齢，日齢に重点がおかれているが，発育の旺盛な成長初期では，軽微な発育の相違が比較的大きな生体反応差として表われてくる．更に成長発育には二次的に性成熟や順応化等が関与しており，飼料とともに今後の検索を待たねばならない．

毒性評価を意義づける諸種の検索は，機能，形態，酵素，そして全体としての個体，という概念から相互に密接な関連を有するが，反応は必ずしも一致するとは限らない．ここには動物実験の難解さがあり，全ての因果関係を連結するにはあまりにも種々の影響を動物体に与える変動因子が多く存在している．それらの因子に対し，積極的に臨み，各因子の相関を掌握しようとする基本的態度こそ，今後の毒性研究の検索に有意義な方向性を示唆することであろう．

今回得られた総括的知見から，同一週齢，同一系動物でも成長発育の経時的ずれにより反応性が異なり，刺激（薬物）負荷時期が生体反応を大きく規定しており，反応の評価に際しては，それを推移として捉える必要性がある事を一層認識した．

「謝辞」本研究に多大の援助をいただいた毒生部諸氏に感謝の意を表します．

参考文献

1) 平賀興吾，東京都立衛生研究所年報，22, 231—249 (1970)
2) Russel, W.H.S., Burch, R.L.: *The Principles of Human Experimental* Technique, 105～133 (1959), Methuen, London.

Table III. Summary of macroscopic changes

Macroscopic changes	JCL–SD												SLC–SD											
Sex	Male						Female						Male						Female					
Group	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T
No. of rats	10	10	10	10	10	5	10	10	10	10	10	9	10	10	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10
Petechia in dorsi–mesal subcutaneous tissue	1	5	5	1	4	3	1	0	2	0	2	0	0	4	3	0	1	3	2	0	2	0	1	0
Petechia in thoracic subcutaneous tissue	2	2	0	1	1	0	0	4	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	3	2	1	1
Ecchymoses in musculus rectus abdominis	0	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemothorax	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage in thymus	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Hemorrhage in testis	0	0	0	0	0	3							0	0	0	0	0	1						
Hemorrhage in epididymis	0	0	0	5	0	3							0	0	0	0	0	2						
Hydro–cyst in kidney	3	1	3	2	2	1	3	2	0	2	0	2	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0

Table Ⅳ. Summary of microscopic changes in liver

Microscopic changes		JCL–SD												SLC–SD											
Sex		Male						Female						Male						Female					
Group		0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T
**		9	8	9	7	9	5	9	10	8	9	10	9	9	9	5	5	7	9	10	10	9	9	8	8
Focal necrosis	SL	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
	MO	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	SE	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Focal degeneration	SL	1	2	0	0	1	0	3	1	1	0	4	1	1	0	0	0	2	1	3	1	1	1	0	0
	MO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Focal cell–infiltration	SL	0	2	2	2	2	2	0	2	1	5	8	5	0	3	3	2	5	3	1	2	6	3	3	2
	MO	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
	SE	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	1
cell–infiltration in Glisson's capusle	SL	2	3	6	0	1	0	1	8	1	3	2	1	2	4	0	0	0	2	2	1	0	3	0	2
	MO	1	3	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SE	1	0	1	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Swelling in liver cells	SL	0	0	0	4	0	3	0	0	0	3	0	3	0	0	0	3	0	3	0	0	0	1	0	1
	MO	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3	0	2	0	0	0	2	0	2	0	0	0	3	0	2
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Aggregation of basoplasm of liver cells	SL	0	0	0	5	0	2	0	0	0	6	0	5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	3	0	4
	MO	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	8	0	0	0	1	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolation in liver cells	SL	0	0	0	2	0	3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	4	0	3	0	0	0	0	0	0
	MO	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* SE : Severe, MO : Moderate, SL : Slight

** NO.of Preparations

Table V. Summary of microscopic changes in kidney

Microscopic changes		JCL-SD												SLC-SD											
Sex		Male						Female						Male						Female					
Group		0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T	0	1	2	2T	5	5T
**		9	8	9	7	9	5	9	10	8	9	10	9	9	9	5	5	7	9	10	10	9	9	8	8
Cystic degeneration	SL	1	0	3	2	3	1	3	2	0	3	0	2	1	0	0	1	1	0	2	0	1	1	3	2
	MO	2	1	0	2	1	0	0	2	0	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
	SE	2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Encapuslation	SL	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
	MO	1	0	0	0	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SE	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Focal degeneration	SL	4	1	3	2	1	0	4	3	2	1	4	4	2	2	2	3	3	2	2	2	2	0	3	4
	MO	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Focal cell-infiltration	SL	0	1	3	2	1	0	3	4	0	0	1	3	1	1	1	1	1	0	1	2	1	0	4	2
	MO	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyknosis in epithelium of urinary tubules	SL	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	2	4	0	1	2	1	4	2
	MO	0	0	2	4	3	4	0	0	1	6	1	3	0	0	0	4	0	2	0	0	2	6	0	1
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Swelling in epithelium of urinary tubules	SL	3	0	3	4	0	1	2	1	2	1	4	6	3	3	2	2	2	1	2	2	3	4	5	2
	MO	0	1	0	3	3	1	0	1	2	3	4	1	2	0	0	0	0	0	0	3	4	1	2	0
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolation in epithelium of urinary tubules	SL	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	4	2	2
	MO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	4	0	2
	SE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* SE : Severe, MO : Moderate, SL : Slight

** NO.of preparations

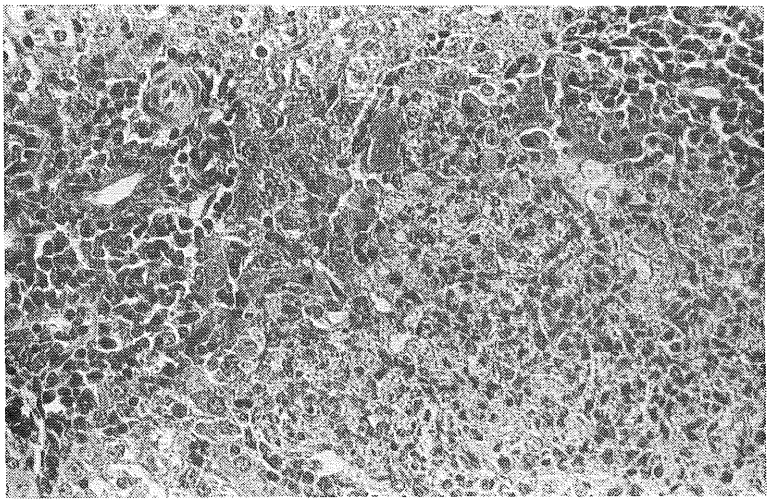


Fig. 1 Focal necrosis in liver of male JCL-SD rat. H. E. stain. Original magnification×200.

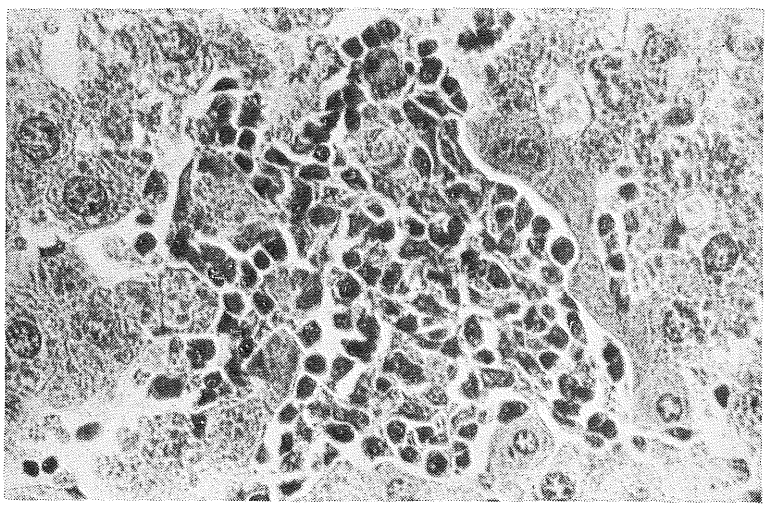


Fig. 2 Focal degeneration in liver of female JCL-SD rat. H. E. stain. Original magnification×400.

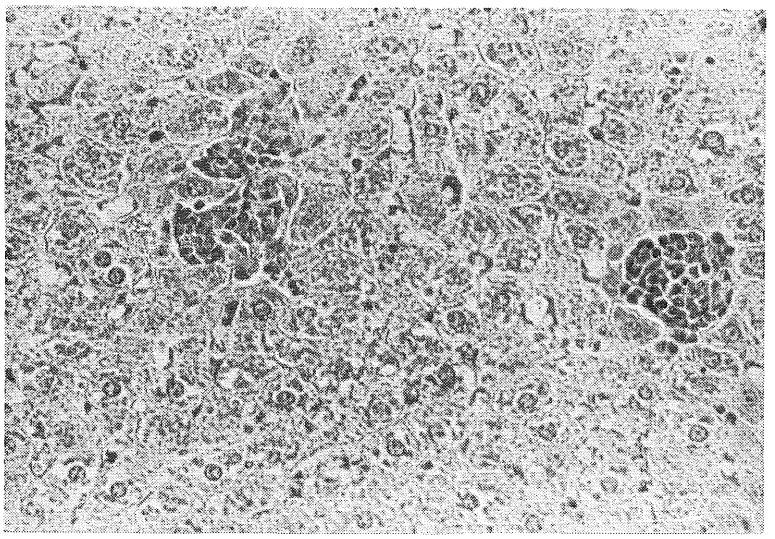


Fig. 3 Focal cell-infiltration in liver of male JCL-SD rat. H.E. stain. Original magnification×200.

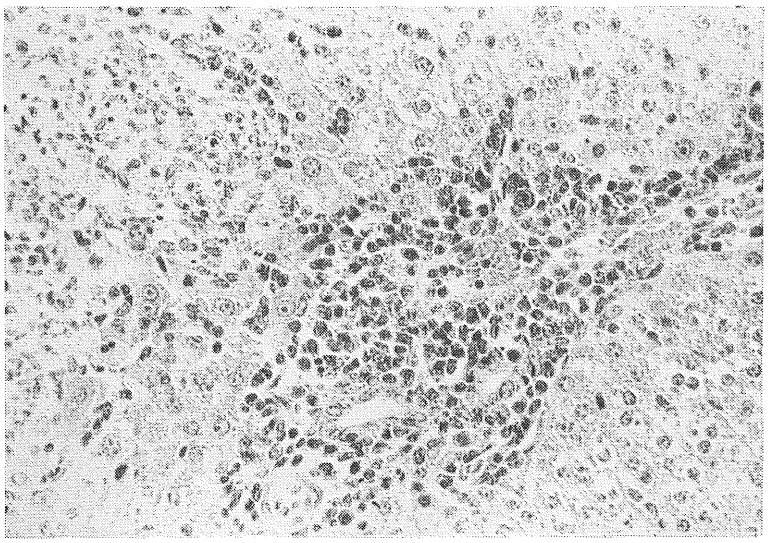


Fig. 4 Cell-infiltration in Glisson's capusle of liver of male JCL-SD rat. H. E. stain. Original magnification. ×200.

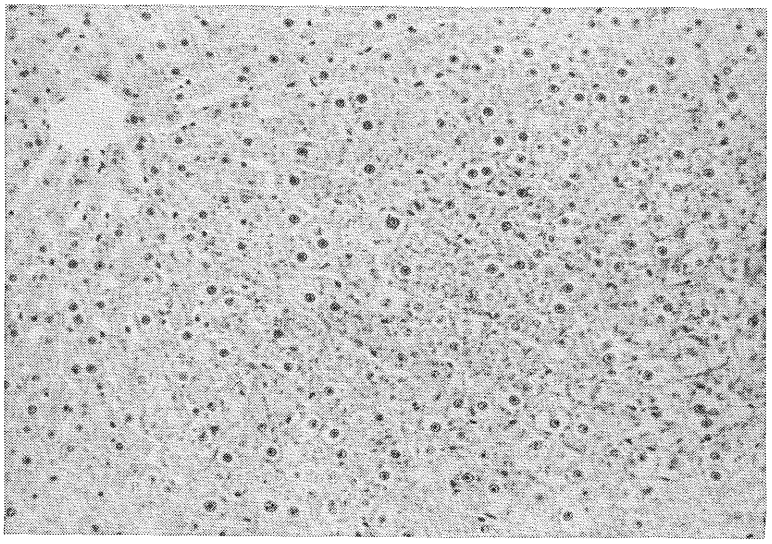


Fig. 5 Swelling in liver cells of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification×100.

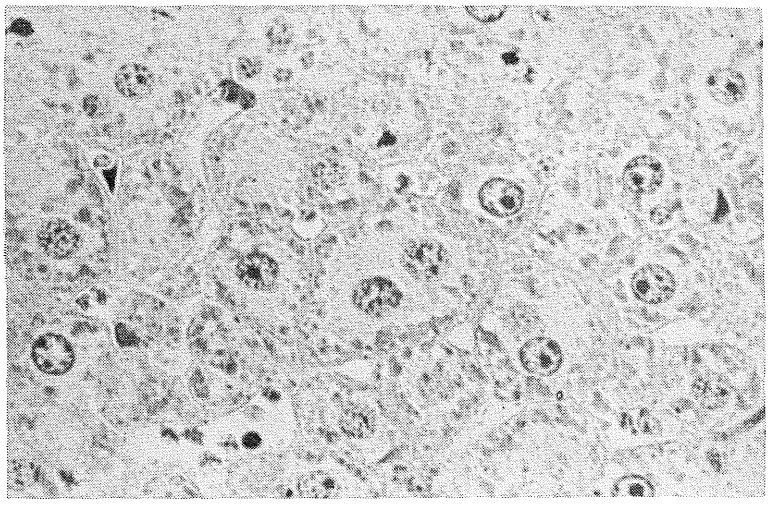


Fig. 6 Swelling and slight aggregation of basoplasm in liver cells of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification×400.

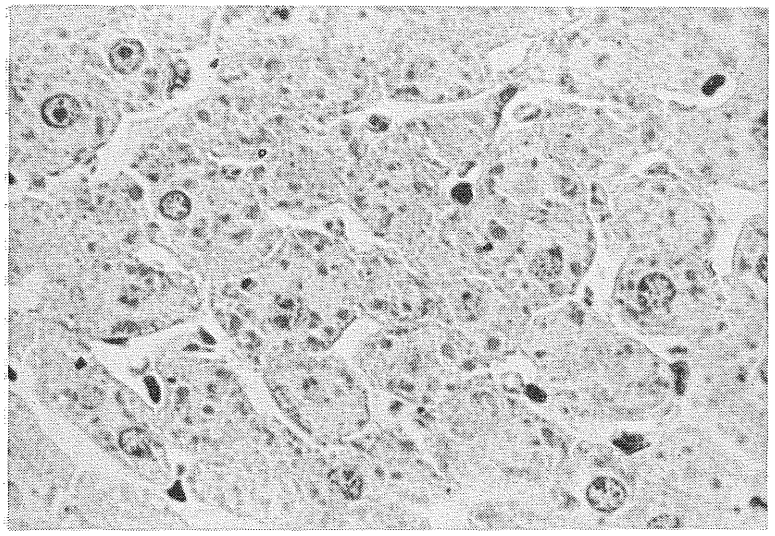


Fig. 7 Slight aggregation of basoplasm in liver cells of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification ×400.

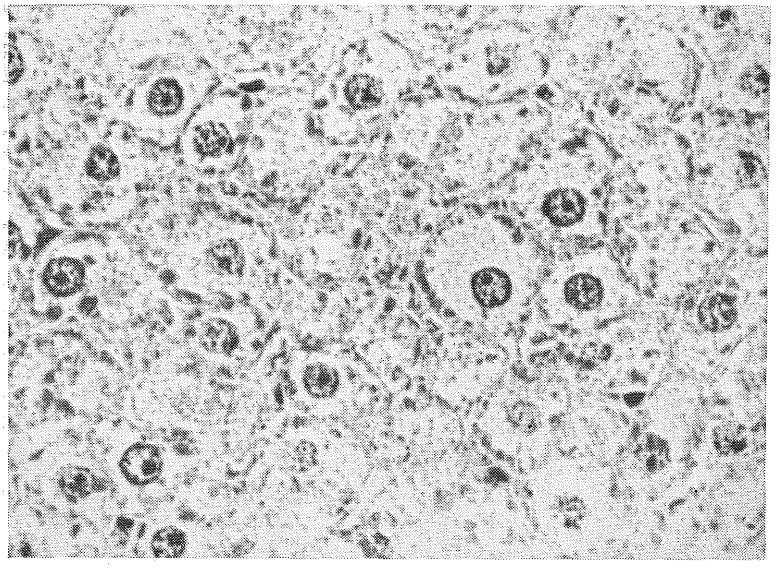


Fig. 8 Moderate aggregation of basoplasm in liver cells of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H. E. stain. Original magnification ×400.

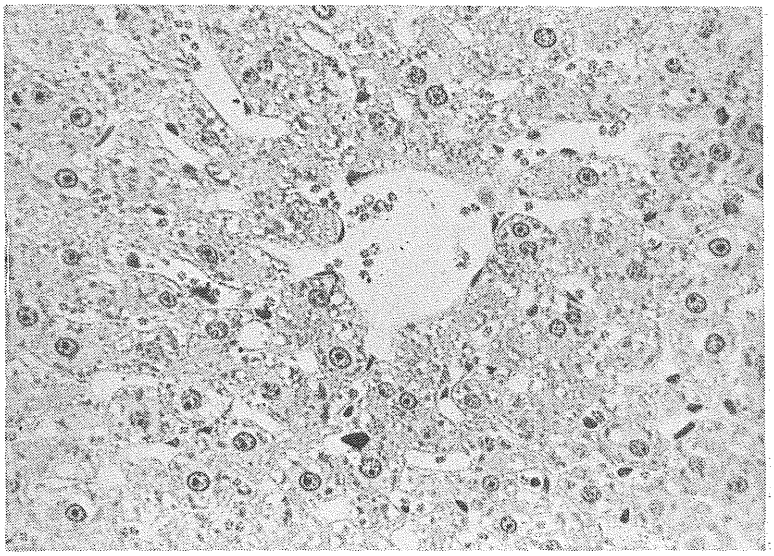


Fig. 9 Vacuolation in liver cells of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H. E. stain. Original magnification×200.

Fig. 10 Cystic degeneration in kidney of male JCL-SD rat. H.E. stain. Original magnification×100.

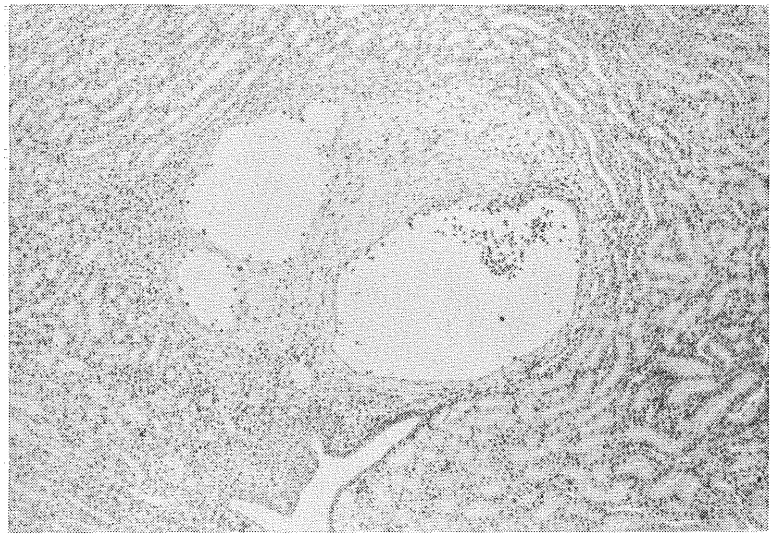


Fig. 11 Encapuslation in kidney of male JCL-SD rat. H. E. stain. Original magnification×40.

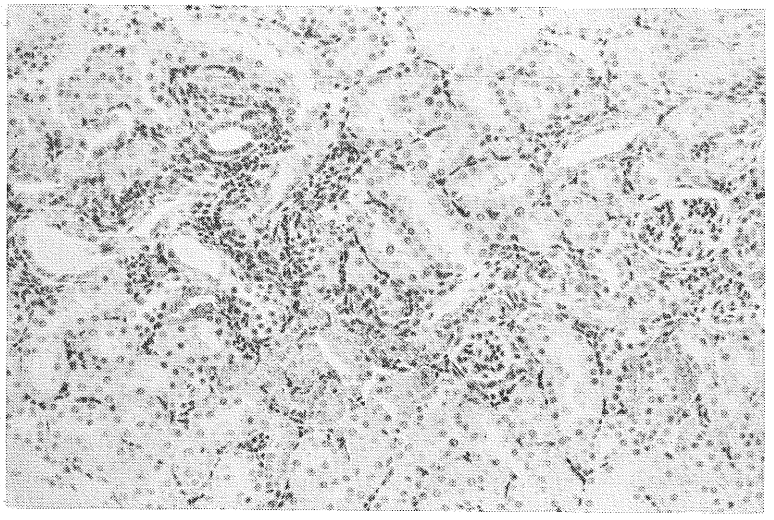


Fig. 12 Focal degeneration in kidney of male JCL-SD rat. H.E. stain. Original magnification×100.

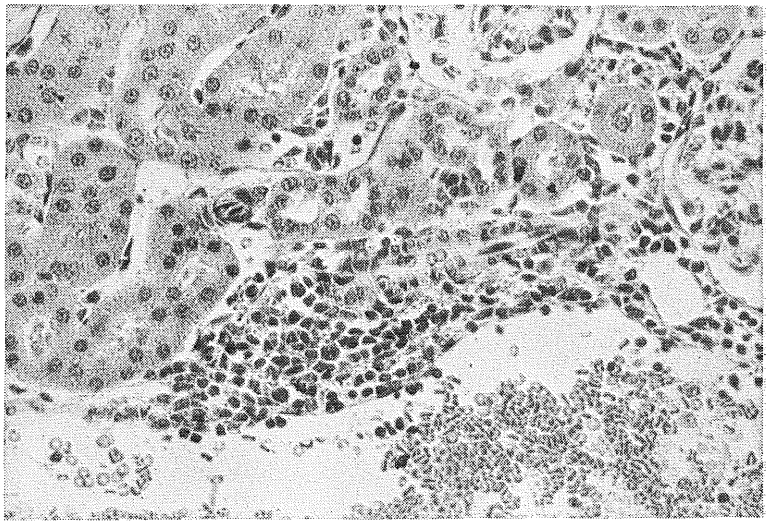


Fig. 13 Focal cell-infiltration in kidney of male SLC-SD rat. H.E. stain. Original magnification×200.

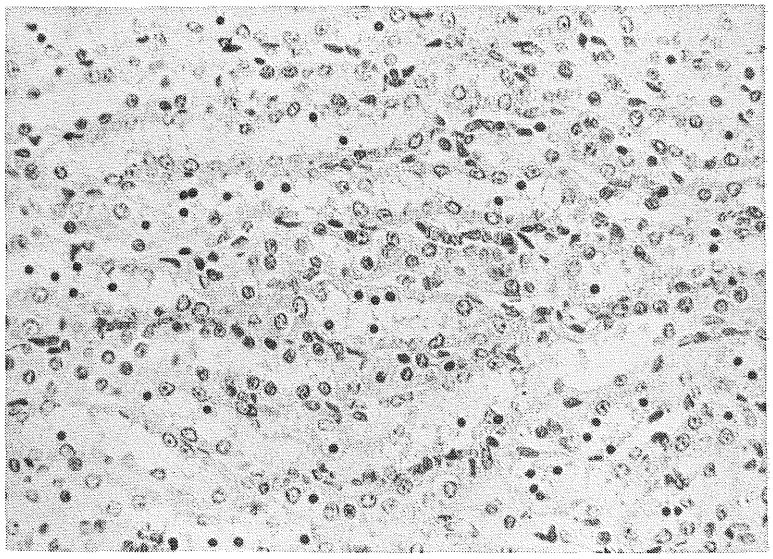


Fig. 14 Pyknosis in epithelium of urinary tubules in kidney of female JCL-SD rat treated with BHT for a week. H.E. stain. Original magnification×200.

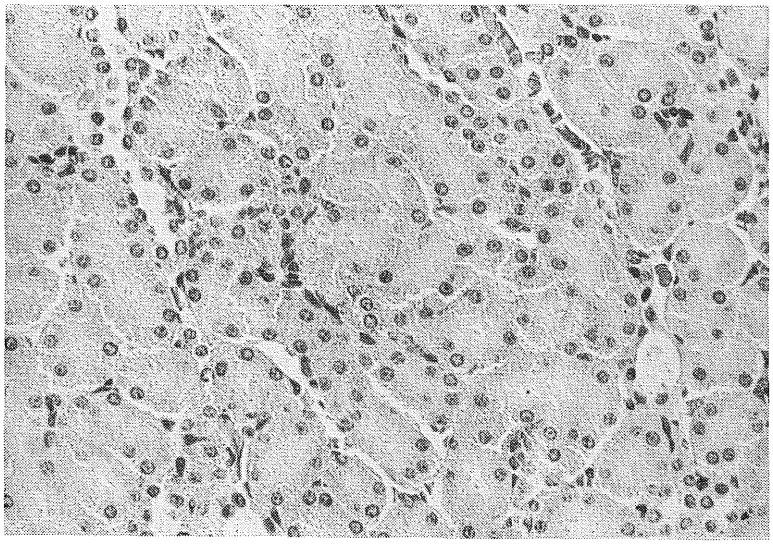


Fig. 15 Swelling in epithelium of urinary tubules in kidney of female JCL-SD rat treated with BHT for a week. H.E. stain. Original magnification×200.

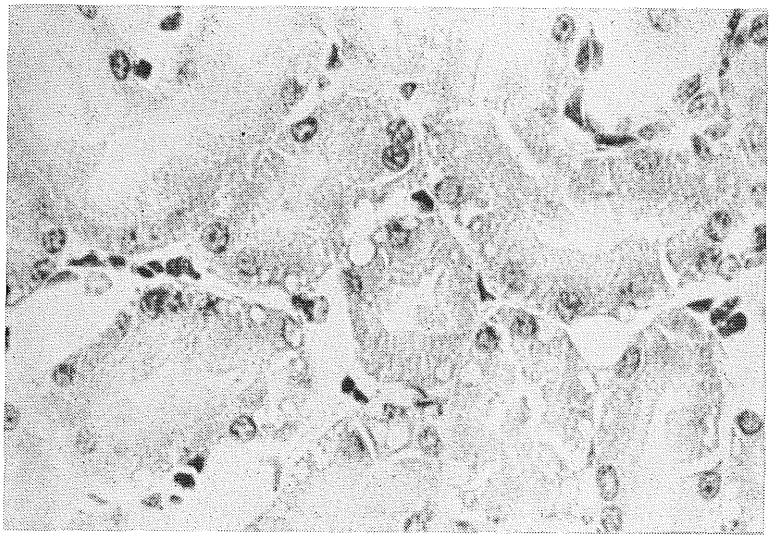


Fig. 16 Vacuolation in epithelium of urinary tubules in kidney of female JCL-SD rat treated with BHT for a week. H. E. stain. Original magnification×400.

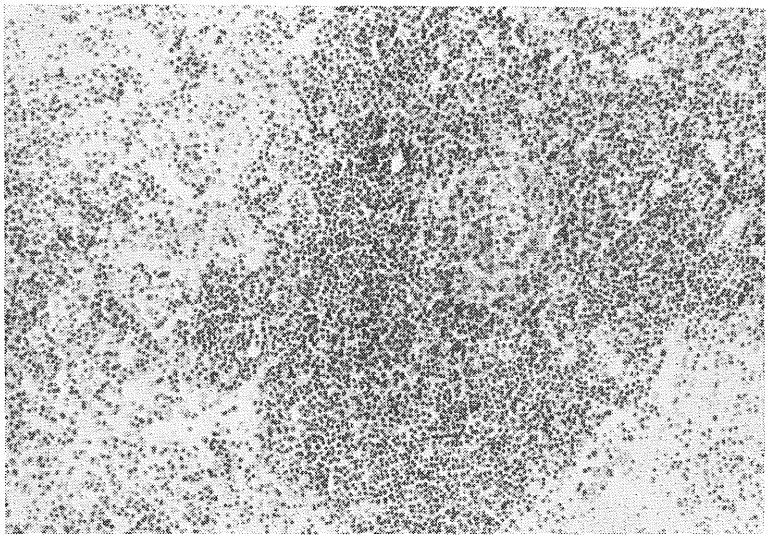


Fig. 17 Internal hemorrhage in thymus of female JCL-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification×100.

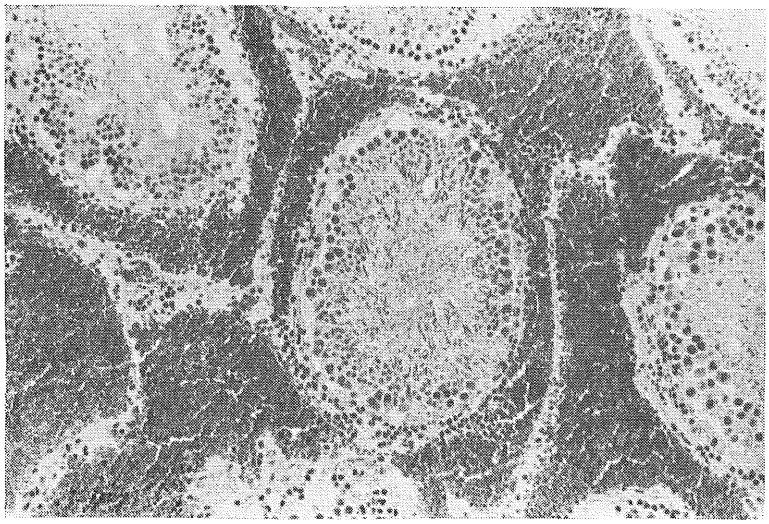


Fig. 18 Internal hemorrhage in testis of male SLC-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification×100.

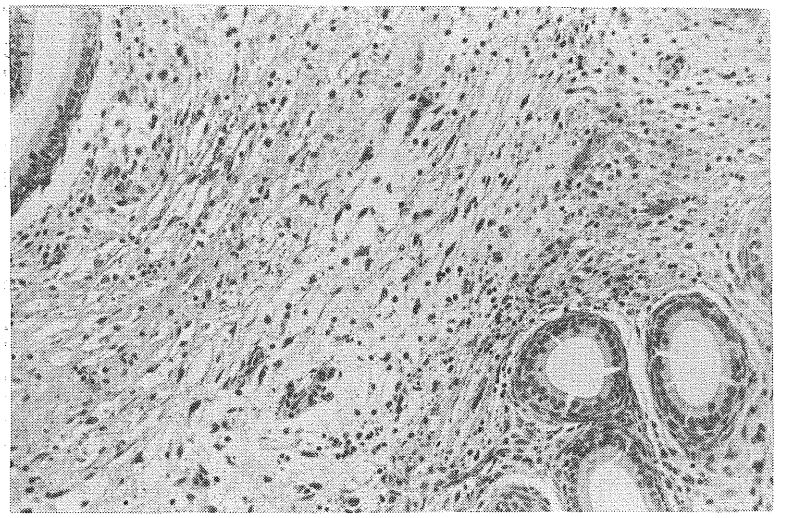


Fig. 19 Internal hemorrhage and proliferation of connective tissues in epididymis of male JCL-SD rat treated with BHT for a week. H.E. stain. Original magnification×100.

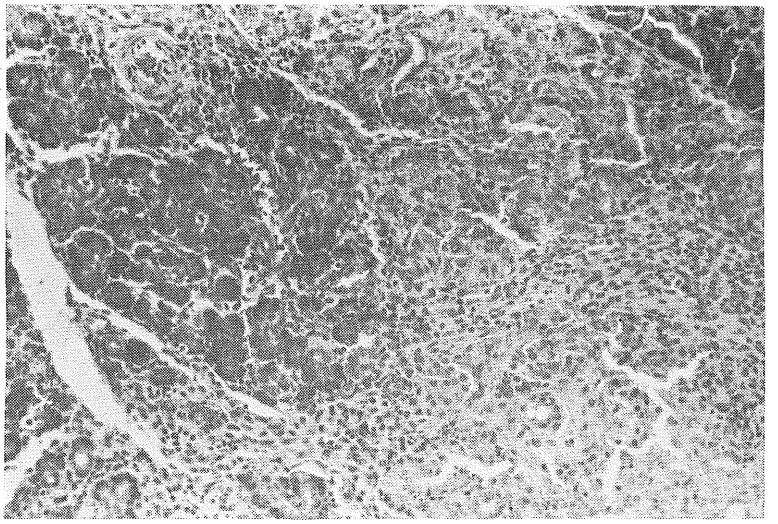


Fig. 20 Focal necrosis in pancreas of female JCL-SD rat treated with BHT for 4 weeks. H.E. stain. Original magnification×100.

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 631 — 635, 1974

Butyl hydroxy toluene (BHT) と Linear alkyl benzen sulfonate (LAS) 併用飼料で飼育のラットにみられた出血傾向の確認

平賀興吾* 柴 英子* 藤井 孝* 米山允子*
坂本義光* 伊川三枝子* 市川久次* 矢野範男*

Confirmation of Haemorrhagic Tendency in Rat Fed Butyl Hydroxy Toluene and Linear Alkylbenzene Sulfonate in the Diet

KOGO HIRAGA*, HIDEKO SIBA*, TAKASHI FUJII*, MASAKO YONEYAMA*, YOSHIMITSU SAKAMOTO*, MIEKO IKAWA*, HISATSUGU ICHIKAWA*, AND NORIO YANO*

先に，食品添加物で油脂類の酸化防止剤として使用される BHT (dibutyl hydroxy toluene) と洗剤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) とを0.8%と0.2乃至0.07%の割合で飼料に添加し，ラットに与えたところ70日目頃より雄において陰嚢内，腹腔内等に出血をきたして死亡するものがあったことを報告した[1]．

この出血は，ジクマロールをラットに投与したときにみられる出血の所見に似ていたこととLASの添加濃度と出血発症匹数との関連がみられなかったこと等より飼料中へ血液凝固阻止物質の混入ということも考えられたので，新らたに添加飼料を作り，雄ラットを用いて追試するとともに，Vitamin K の効果を検討した．

試験材料および検査方法

試料：1）ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)—和光純薬工業株式会社製 Lot No. DG 1870, mp 69.5

2）直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム (LAS)—花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60, Lot No. 127 (C_{10}-17.6%, C_{11}-34.1%, C_{12}-27.7%, C_{13}-19.0%, C_{14}-8.7%, 有効成分60±2%, 未反応油分1.5%以下, 無機塩類4.0%以下, 水分38% pH (1%) 7.1, 平均分子量 345.8)

1）2）試料を次の割合で船橋農場製ラット・マウス用飼料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与えた．なお，対照用固型飼料も同一飼料原末より製造した．

BHT 0.8%+LAS 0.2% (LT-1 飼料)

BHT 0.8%+LAS 0.07% (LT-2 飼料)

試験動物：Wistar SLC 系ラット (SPF) 雄の4週齢のものを静岡県実験動物農業協同組合より購入，1週間一般飼料 (F Ⅱ) にて飼育後試験飼料を与えた．

飼育環境は，25±1°，湿度55～65%，照明時間を午前6時から午後6時までとし，5匹ずつ同一ステンレス金網ケージに収容飼育した．

検査：

1. 血液学的検査[2]； a) 赤血球数 (RBC), b) ヘモグロビン (Ht, シャンメトヘモグロビン法), c) ヘマトクリット (Ht), d) 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), e) 平均赤血球容積 (MCV), f) 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCC), g) 白血球数 (WBC), h) 血小板数 (Fonio 法), i) 血液凝固時間 (Sahli-Fanio 法), j) プロトロンビン時間 (Quick 1段法), k) 部分トロンボプラスチン時間 (P.T.T.) l) プロトロンビン消費試験.

a) より h) までは大伏在静脈より，i) から l) では心臓穿刺あるいは外頸静脈より，更に i) は断頭時放出する血液より血液を採取し検査した．

2. 血清生化学的検査[2]； a) GOT (Retman-Frankel 法), b) ALP (Kind-Armstrong 法), c) LAP (竹中らの法), d) 総蛋白量 (エルマ蛋白計)[2]

以上は断頭時放出する血液を直接ポリエチレン製遠心管に採取，30分間室温放置後 2° 冷却遠心機を用い 3,000 rpm, 15分間遠心後採取した血清を用い検査した．

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho, 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

Table Ⅰ LT-1, LT-2 飼料飼育6週間目ラットのプロトロンビン時間（心臓血）

飼料	ラット数	プロトロンビン時間 平均±SD（秒）
対照	4	19.8± 2.06
LT-1	5	43.6±16.00*
LT-2	3	21.3± 1.52

* $P<0.05$

Table Ⅱ LT-1, LT-2 飼料飼育7週間目ラットの血液凝固，プロトロンビン時間およびプロトロンビン消費試験（外頸静脈血）

飼料	ラット数	血液凝固時間 平均±SD（分）	プロトロンビン時間 平均±SD（秒）	プロトロンビン消費試験平均 ±SD(秒)
対照	5	4.4±1.9	16.6± 2.6	54.7±19.6
LT-1	5	5.6±1.8	40.6±13.1**	84.1±40.6
LT-2	5	5.0±1.1	24.8± 2.3**	80.7±17.7

** $P<0.01$

試験およびその結果

1. 試験飼料（LT-1, LT-2）により飼育を開始して6週間目のラットのプロトロンビン時間を，それぞれ5匹についてエーテル麻酔下心臓穿刺により採血して検査した．

対照群の1匹およびLT-2群の2匹は溶血により測定不能で結果はTableⅠのようになった．

すなわち，対照では平均19.8秒であったのに対しLT-1群は43.6秒で明らかな延長が認められたが，LT-2群は21.3秒で有意の延長ではなかった．この際対照は採血手技の失敗で一匹死亡したが，LT-1群では4匹，LT-2群は全例1時間から24時間以内に胸腔内出血により死亡し，血液凝固能の異常がうかがわれた．

2. 試験飼料による飼育開始後7週目のラットの血液凝固時間，プロトロンビン時間およびプロトロンビン消費試験を，無麻酔下に外頸静脈より採血して検査した．

結果はTableⅡに示すようで，LT-1群，LT-2群ともに，血液凝固時間は有意な延長はみられなかったが，プロトロンビン時間は明らかな延長で，6週の場合と同様にLAS含有量の多いLT-1飼料群において顕著であった．プロトロンビン消費時間は変動が大きかったが，延長傾向が強かった．

3. 試験飼料により飼育開始して51日目から鼻腔，陰嚢その他に前回報告したと同様な出血をきたすラットがみられるようになった．この出血は比較的急激におき死の機転をとる場合が多いため発見と同時に行なうので十分な検査はできなかったが，その結果はTableⅢのようで，出血はLT-1飼料群にのみみられた．出血の大きかったものは著明に赤血球数，ヘマトクリット，ヘモグロビンが減少し，プロトロンビン時間，血液凝固時間（完結）が測定不能であった．その他でもプロトロンビンおよび血液凝固時間の延長が顕著であった．

4. LT-1飼料により11週間飼育したラットにVitamin Kを投与して，血液学的，血清生化学的および臓器重量的影響をみた．

Vitamin K（和光純薬 Lot No. TPE 7742）50 mgを10%アラビアゴム液（局方）1 mlに懸濁，午前9時と午後8時の2回，腹腔内乃至経口投与して翌朝9時より検査を，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット，血小板数および白血球数測定用血液は大伏在静脈より，プロトロンビン時間測定用血液は外頸静脈より，血液凝固時間および血清生化学検査（GOT, ALP, LAP, 総蛋白量）用血液は解剖のための断頭時血液より採取して行ない，臓器は心臓，肝臓，腎臓および脾臓を摘出し，重量を測定した．

結果はTableⅣ（血液学的検査成績），Ⅴ（血清生

Table Ⅲ 試験飼料による飼育で出血がみられたラットの血液学的所見

飼育開始後の日数（日）	飼料	RBC $\times10^6/mm^3$	Ht (%)	Hb (g/100 ml)	プロトロンビン時間（秒）	血液凝固時間（分）	WBC $\times10^2/mm^3$
51	LT-1	1.58	13.0	4.0	∝	∝	146
63	LT-1	8.91	45.0	—	80	23.0	114
64	LT-1	—	—	—	65	16.4	—
65	LT-1	8.08	30.0	11.2	65	9.5	120
69	LT-1	0.77	7.5	3.2	∝	∝	2.5
参考	Control	8.41	53.5	19.6	15	1.5	101

Table Ⅳ　LT-1 飼料[a]による11週間飼育ラットの血液学的所見と Vitamin K の効果

試験飼料 処置	ラット数	RBC ×10⁴ /mm³	Hb g/dl	Ht %	MCH γγ	MCV μ³	MCC %	血小板数 ×10⁴ /mm³	プロトロンビン時間 (秒)	血液凝固時間 (完結) (分)	WBC ×10² /mm²
対照 —	7	952 ±63[c]	19.7 ±0.3	53.9 ±1.0	20.8 ±1.5	56.8 ±4.1	36.6 ±0.3	76.5 ±16.2	18.7^{++} ±4.5	1.28 ±0.27	110 ±13
LT-1 —	6	941 ±108	18.2 ±0.5**	50.3 ±1.5**	19.5 ±2.4	54.3 ±7.9	36.2 ±0.9	93.9 ±19.3	40.2 ±11.5**	2.50 ±0.32**	118 ±23
LT-1 VK[b] p.o.	7	958 ±62	18.0 ±0.4**	49.9 ±1.2**	18.9 ±0.5*	52.3 ±3.2	36.1 ±0.6	95.2 ±10.9*	18.9^{++} ±3.8	2.28 ±0.86	101 ±17
LT-1 VK i.p.	6	859 ±101	16.9 ±1.4**	47.5 ±2.8**	19.9 ±0.9	55.8 ±5.9	35.7^{+} ±2.0	80.1 ±14.4	13.5^{++} ±1.5	2.95 ±0.75**	88 ±24

a) BHT 0.8%, LAS 0.2% 併用添加飼料
b) Vitamin K 50 mg を2回投与後14時間
c) 平均±SD

対照に対して：* $P<0.05$
** $P<0.01$
LT-1に対して：$^{++}$ $P<0.01$

Table Ⅴ　LT-1 飼料[a]による11週間飼育ラットの血清生化学的所見と Vitamin K の効果

試験飼料 処置	ラット数	総蛋白量 g/dl	GOT K unit/dl	ALP K-A unit/ml	LAP G-R unit/dl
対照 —	7	6.60±0.16[c]$^{++}$	175.3±18.2^{+}	32.4±3.0	206.4±38.2^{+}
LT-1 —	6	7.91±0.16**	212.5±32.7*	33.7±4.5	274.1±57.2*
LT-1 VK[b] p.o.	7	7.77±0.37**	189.9±12.5	35.8±7.1	180.0±61.5^{+}
LT-1 VK i.p.	6	7.53±0.68*	194.0±21.2	35.6±6.1	195.7±36.9^{+}

a) BHT 0.8%, LAS 0.2% 併用添加飼料
b) Vitamin K 50 mg 2回投与後14時間
c) 平均±SD

対照に対して
* $P<0.05$
** $P<0.01$
LT-1 に対して
$^{+}$ $P<0.05$
$^{++}$ $P<0.01$

化学的検査成績）およびⅥ（臓器重量）に示す通りである．

LT-1 飼料飼育11週間ラット（無処置群）は普通飼料飼育ラット（対照群）と比べて赤血球数（RBC）に差はみられなかったがヘモグロビン量（Hb），ヘマトクリット値（Ht）が明らかに低下，したがって平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）および平均赤血球容積（MCV）の低下傾向がみられた．平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCC）には差なく，血小板数は増加傾向がみられたが有意とはいえなかった．プロトロンビン時間は著明な延長が，また血液凝固時間（完結）も明らかな遅延がみられた．白血球数には全く差がみられなかった．

以上の無処置群に対し Vitamin K を経口乃至腹腔内投与した処置群では，RBC, Hb, Ht, MCH, MCV, MCC 血小板，血液凝固時間，白血球数においては全く差を示さなかったが，プロトロンビン時間のみは著明に短縮し，対照群と同じあるいはより小さい値を示した．すなわちプロトロンビン時間は回復したが，血液凝固時間は回復しなかった．

血清生化学的検査成績では，無処置群は対照群に比べ総蛋白量，GOT, LAP ともに上昇がみられた．これに対し Vitamin K を経口乃至腹腔内投与した処置群では総蛋白量は無処置群と同じ高い値を示したが

Table Ⅵ LT-1 飼料[a] による11週間飼育ラットの臓器重量と Vitamin K の効果

試験飼料 処置	ラット数	Heart mg±SD mg/100g±SD	Liver g±SD g/100g±SD	*l*-Kidney mg±SD mg/100g±SD	Spleen mg±SD mg/100g±SD
対照	7	832.3±22.5	9.63±0.51	867±56	555±30
—		292.7± 8.6	3.42±0.14	308±10	197±10
LT-1	6	766.6±31.0	14.97±1.12**	911±62	493±42*
—		288.9± 9.3	5.62±0.15**	342±9**	185± 7*
LT-1	7	772.8±61.0	14.85±1.19**	929±101	520±48
VK[b] p.o.		294.5± 6.4	5.66±0.18**	354±18**	199±18
LT-1	6	823.1±75.1	14.28±1.06**	971±96*	567±87
VK i.P.		318.6±29.4	5.52±0.26**	375±28**	220±41

a) BHT 0.8%, LAS 0.2% 併用添加飼料　　対照に対して　* $P<0.05$
b) Vitamin K 50 mg 2回投与後14時間　　** $P<0.01$

Table Ⅶ LT-2 飼料[a] による17週間飼育ラットの血液学的所見と Vitamin K の効果

試験飼料 処置	ラット数	RBC ×10⁴/mm²	Hb g/d*l*	Ht %	プロトロンビン時間（秒）	プロトロンビン消費試験（秒）	部分トロンボプラスチン時間（秒）	血液凝固時間（完結）（分）	WBC 10²/mm³
対照	9	884	17.3	52.4	30.6	57.7	4.0	1.82	103
—		±40.9[c]	±0.43	±1.14	±13.8	±12.4	±2.9	±0.65	±5.7
対照	8	893	17.2	51.8	25.0	56.1	3.3	1.57	106
V.K. i.p.[b]		±104.5	±0.45	±1.28	±7.8	±4.8	±3.5	±0.56	±12.6
LT-2	11	922	16.5	50.2	35.6	138.7	7.7	1.80	103
—		±58.9	±0.19	±1.59	±16.6	±64.0	±5.0	±0.47	±12.0
LT-2	13	894	16.6	52.4	30.6	29.5	2.0	1.84	99
V.K. i.p.		±47.8	±0.57	±1.34	±31.5	±6.9	±1.8	±0.35	±11.5

a) BHT 0.8%, LAS 0.07% 併用添加飼料
b) Vitamin K 5 mg 1回投与 24時間後
c) 平均±SD

GOT および LAP は対照群に近いあるいはより低い値を示した．すなわち GOT および LAP は Vitamin K により回復したといえる結果であった．

臓器重量において，無処置群では肝臓が，実重量および 100 g 体重比重量ともに著明な増加を示し，腎臓が比重量において有意な増加が，脾臓においては実重量および比重量とが有意な減少がみられた．これに対し処置群では，肝臓および腎臓の重量は無処置群と同じであったが，脾臓重量は対照のそれと近い値を示した．すなわち脾臓は Vitamin K 投与により重量が回復するようにみえた．

5. LT-2 飼料により17週間飼育したラットの血液学的検査とこれに対す Vitamin K 投与の影響をみた．

Vitamin K 5 mg を 10% アラビアゴム液0.5m*l* に懸濁させて腹腔内に投与24時間後に，赤血球数，ヘモグロビン量，ヘマトクリット，白血球数を大伏在静脈より，プロトロンビン時間，プロトロンビン消費時間，部分トロンボプラスチン時間は外頸静脈より，血液凝固時間は断頭血より採血して検査した．

結果は Table Ⅶ に示す通りで，4. の項 LT-1 飼料飼育の場合にみられたような大きい変化はみられなかったが，LT-2飼料飼育17週ラット（無処置群）では

プロトロンビン消費試験の，変動が大きいが，明らかな延長とプロトロンビン時間および部分トロンボプラスチン時間の僅かな延長傾向がみられた．これに対しVitamin K投与によって対照群または対照にVitamin K を投与した群と同等あるは以下の値を示した．

総括と考按

ラットにおいて BHT と LAS との相乗毒性の検討を行なう亜急性試験中，雄性ラットに鼻腔や陰嚢等に出血をきたし致死するものがあらわれ，6月後の試験終了時の検査で，生存ラットにおいては血液凝固時間の延長がみられた．

この際，BHT 単独投与のラットにおいても血液凝固時間の延長の傾向が認められたが，LAS 単独投与ラットでは大量でも全く認めることができなかった[1)3)]．

今回は，BHT と LAS 併用投与によるラットの出血傾向とこれに LAS 関与の程度を確認することおよびVitamin K の影響をみるため，上述の試験の場合と全く同じように BHT 0.8%と LAS 0.2% (LT-1) および BHT 0.8%と LAS 0.07% (LT-2) を含有する固型飼料2種をつくり，雄性ラットに与え，飼育した．

1. LT 飼料によりプロトロンビン時間の延長をきたし，その程度には LAS 添加濃度との関連がみられ LT-1 の方が LT-2 より強かった．

2. LT-1 飼料飼育ラットに，飼育開始51日目より自然出血をきたすものがみられた．

3. LT-1 飼料飼育11週のラットではヘモグロビン，ヘマトクリットの減少，プロトロンビン時間，血液凝固時間の延長，血清の総蛋白量の増加，GOT, LAP の活性の上昇，肝臓，腎臓の重量の増加，脾臓重量の減少がみられた．

これに対し Vitamin K 50 mg，2回投与で，プロトロンビン時間，GOT，LAP 活性および脾臓重量が回復したが，血液凝固時間は回復しなかった．

4. LT-2 飼料飼育17週のラットではプロトロンビン時間，プロトロンビン消費時間，部分トロンボプラスチン時間が僅かに延長し，これに対し，Vitamin K 5 mg 1回投与で回復がみられた．

以上により BHT と LAS 併用によりラットに出血傾向を起させ，それに LAS の関与していることを確認できた．

また，Vitamin K により直ちにプロトロンビン時間は回復するが，血液凝固時間は回復しないことから出血傾向を起させる機作には少なくとも二つ以上あることが考えられた．その一つは Vitamin K を介するプロトロンビンの生成の抑制であろうが Vitamin K に BHT と LAS がどのようなからみで，どこのレベルで関与しているか，また他の血液凝固時間を抑制する機作は何か，今後吟味を続け，BHT および LAS の毒性評価の一助としたい．

文　献

1）米山允子ら：都衛研年報 24, 449-465(1972)
2）金井泉，金井正光：臨床検査法提要 25, 1970 版，金原出版，東京
3）米山允子ら：都衛研年報 24, 409-440 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 637 — 645, 1974

直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムのトロンビン阻害作用について

高橋 省*　柴 英子*　中尾順子*　平賀興吾*

Inhibition of Thrombin by Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)

OSAMU TAKAHASHI*, HIDEKO SHIBA*, TOSHIKO NAKAO*, AND KOGO HIRAGA*

柴らによって示されたように，直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）およびジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を，それぞれ0.2および0.8%，同時にラットに投与することにより，短期間のうちに，凝固時間，プロトロンビン時間の延長，ならびに，自然出血による致死が起る[1]．この機作を考察する場合，とくに血液凝固の反応系に関しては，次の二つの可能性が考えられる．1）凝固反応の阻害物質が血中に存在するため．2）凝固因子（フィブリノーゲン，プロトロンビン，第Ⅶ因子等）が減少したり，欠如したりしているため．柴らは，第2番目の可能性について検討を加え，BHT 単独投与で血漿中のプロトロンビン，第Ⅶ因子の減少がみられることを示している[1]．本報ではもっぱら，第1番目の可能性について検討を加えた．

実験方法

1. LAS, BHT, 基質，酵素，試薬類および分析機器

LAS—実験Ⅰおよび実験Ⅲに用いた LAS は，花王アトラス株式会社製ネオペレックス F-60, Lot No. 127 である[2]．実験Ⅱおよび実験Ⅳに用いた LAS はライオン油脂株式会社研究所製のものを精製して用いた．

BHT—実験Ⅰおよび実験Ⅲに用いた BHT は，和光純薬製のものを[3]，実験Ⅱ，実験Ⅳでは，上記のものを，エタノール中で2回再結晶して用いた．

フィブリン—生化学工業のウシフィブリンを用いた．フィブリノーゲン—和光純薬製のウシフィブリノーゲンを用いた．*p*-トシルアルギニンメチルエステル（TAME)—Sigma のものを用いた．トロンボプラスチン—Warner-Lambert Co. 製の Simplastin A（トロンボプラスチン，Ca^{2+}，第Ⅴ因子，フィブリノーゲン）を用いた．トロンビン—持田製薬ウシトロンビンを用いた．ウシ血清アルブミン；Sigma，オリーブ油；日本薬局方，ローダミン B；E. Merck，シリカゲル G（薄層クロマトグラフィー用）；E. Merck.

機器—分光光度計（日立 124），螢光分光光度計（日立 MPF-4)

2. プロトロンビン，トロンビン時間の測定

プロトロンビン時間は，0.1 M クエン酸ナトリウム溶液1に対し，ラット静脈血9の割合で採血し遠心分離して血漿を得たのち，37° で血漿 100 μl に対し，Simplastin A を0.2 ml 添加後フィブリン塊の生じるまでの時間を Quick の方法[4]に従って測定した．トロンビン時間は，血漿 100 μl にトロンビンを 50μl（5 NIH units）添加し，25° で，フィブリン塊の生じるまでの時間を測定した[5]．

3. LAS の定量

LAS は紫外部に特徴的な吸収ピークを持つ（λ_{max} 261 nm）ので，261 nmの吸収と，吸光係数より求めた．少なくとも，ラウリルベンゼンスルホネートとして，0.05から0.5 mM まで直線的であった．また，LAS はメチレンブルーと特異的に結合するので，SLA 溶液 1.0 ml に1%メチレンブルー水溶液を加え，混和後，クロロホルムを 2.0 ml 加えた．マグミキサーで10回混和し，上層を洗浄しながら除去後，クロロホルム層について，550 nm で比色した[6]この方法で0.1から 1.0 mM まで直線的であった．なお，高濃度のリン脂質，トリグリセリドが，同様に結合した．

4. 蛋白質の定量

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

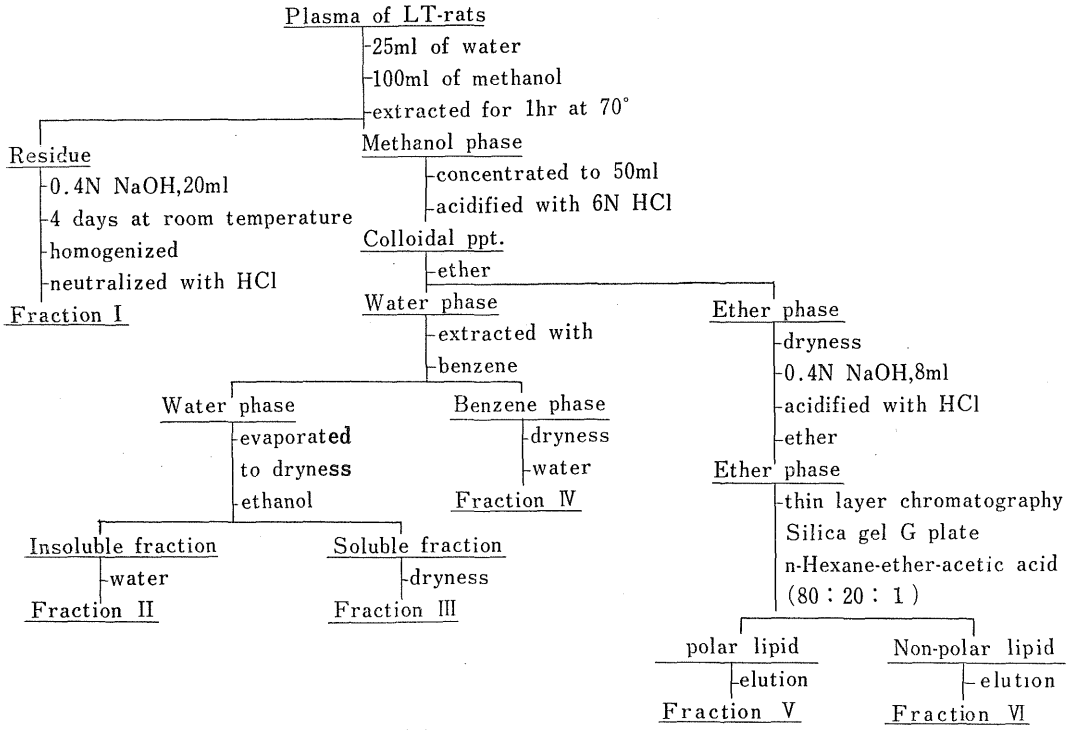


Fig. 1. Extraction of blood clotting inhibitor from LT-rat plasma

蛋白質は，目的に応じて，ビウレット法[7]，Lowry法[8]，アミドブラック法[9]を用いた．

実験Ⅰ　LAS，BHT を同時に投与したラット（LT-投与ラット）の血漿中における，凝固阻害物質の存在性の検討

動物；SD 系の雄ラットを用い，0.8% BHT，0.2% LAS を添加した飼料（船橋農場 F-Ⅱ，粗蛋白量21.3%）を自由摂取させた．投与後，24日で自然出血し，致死直前のラットの頸静脈から採血し，血漿を得て実験に供した．その血漿のプロトロンビン時間は，5分以上に延長していた．

実験；SD 系の雄ラット正常血漿 20 μl に上記 LT-血漿を 0.9%塩化ナトリウム溶液でさまざまに希釈し 100 μl を加え，それについて，プロトロンビン時間を測定した．

実験Ⅱ　LAS および BHT の凝固反応への作用

プロトロンビン時間への影響；SD 系の雄ラット正常血漿 10 μl に LAS 溶液あるいは，BHT 乳濁液を加え，それについて，プロトロンビン時間を測定した．BHT はオリーブ油にとかし，ウシ血清アルブミンを加えた後，ポリトロンにより乳濁して用いた．（オリーブ油5 % v/v，ウシ血清アルブミン 2 % w/v）

フィブリンの溶解；フィブリンの懸濁液に LAS を加え，25°で30分間放置し，600 nm の濁度の減少を測定した．フィブリン濃度，4.84×10^{-2} %，反応混液，3.0 ml.

トロンビン反応への影響；1 %フィブリノーゲン 100 μl に，0.025 M トリス緩衝液 100 μl および LAS 溶液 100 μl を加え，トロンビン 10 μl (10 NIH units) を添加して，フィブリン塊の生成する時間を測定した．また，トロンビンのエステラーゼ活性に対する作用をみるため，トロンビン 10 μl，0.0009%フェノールレッド溶液 (0.025 M トリス緩衝液，pH 8.2) 3.4 ml，0.17 M p-トシル-L-アルギニンメチルエステル (0.025 M トリス緩衝液，さらに pH 調製して pH 8.2) 0.4 ml に，LAS を加え，全量 4.0 ml とし，37°，30分間反応させ，565 nm の吸光度の減少[10]に対する LAS の阻害効果をみた．なお，反応はすべて，基質を添加して開始させた．

実験Ⅲ　LT-投与ラットの血漿中からの阻害物質の抽出

LT-血漿，25 ml に水 25 ml を加えた後，メタノ

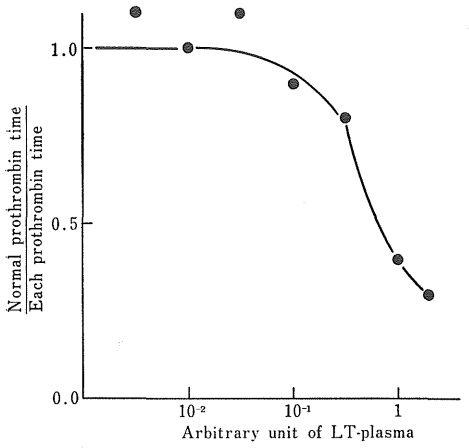


Fig 2. Inhibitory effect of LT-plasma on blood clotting

ール 100 m*l* を混和し，1時間還流した．残渣は，0.4 N 水酸化ナトリウム 20 m*l* を加え，1昼夜放置後，ホモジナイズし，塩酸で中和後分画Ⅰとした．抽出液は 50 m*l* まで減圧濃縮し，6 N 塩酸で酸性にしエーテルを加え分液操作を行なった．水相は，中和後トロンビン阻害作用を有していたので，再び6 N 塩酸を加え酸性とした後，ベンゼンを加え分液操作を行なった．水相は減圧乾固後，エタノールを添加し，エタノール不溶分画（分画Ⅱ）と可溶分画（分画Ⅲ）に分離した．ベンゼン相は乾固後，水に乳濁し，分画Ⅳとした．エーテル相は乾固後，水酸化ナトリウム水溶液を加え，再び塩酸酸性の条件でエーテル抽出を行なった．抽出物は，シリカゲル G 薄層（5 cm×20 cm, 0.75 mm）により，*n*-ヘキサン-エーテル-酢酸（80 : 20 : 1）で展開し，原点に止まる極性脂質の部分（分画Ⅴ）と，それ以外の脂質部分（分画Ⅵ）に分離した（Fig. 1.）．各分画は，1％フィブリノーゲン，0.5 m*l*，トロンビン 0.1 m*l* (100 NIH units), 0.002 M 酢酸緩衝液 pH 7.4, 0.1 m*l* の反応系への阻害効果をみることにより，阻害物質の存在性を検討した．さらに，阻害効果のみられた分画について，紫外部の吸収パターンを描き，LAS との同一性を検討した．なお，標準の LAS はウシ血清アルブミンとの混合液から，熱メタノール抽出により，91.8％，LAS 水溶液を塩酸酸性にして，エーテルで抽出した場合には，91.5％の回収率を得ている．

実験Ⅳ　BHT, LAS および LT 投与ラット血漿のプロトロンビン，トロンビン時間およびフィブリノーゲン

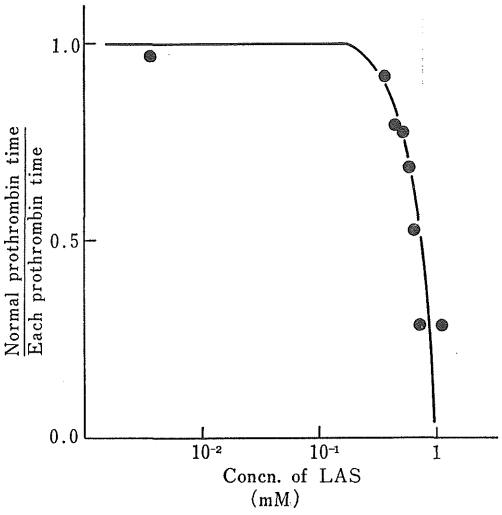


Fig. 3. Prolongation of prothrombin time by LAS

動物；SD-JCL 系，雄ラットを用いた．ラットは次の群に分けた；

Ⅰ群，基本飼料[11]＋1.0％ BHT

Ⅱ群，基本飼料＋0.3％ LAS

Ⅲ群，基本飼料＋1.0％ BHT＋0.3％ LAS

各群は5頭とした．10日間の飼育後，採血した．各群について，プロトロンビン，トロンビン時間，血漿蛋白量および血漿にトロンビンを加え10分間放置後，析出したフィブリン塊を洗浄し定量した．

結　果

実験Ⅰ　LT-投与ラットの血漿中に存在する血液凝固阻害物質

Fig. 2. において，横軸は，LT-血漿の添加量であり，1は，採取血漿そのものを添加した場合を示し，10^{-1}, 10^{-2} は0.9％塩化ナトリウム溶液で希釈した相対濃度を示している．縦軸は，LT-血漿の代りに 0.9％塩化ナトリウムを加えた対照のプロトロンビン時間を，それぞれのプロトロンビン時間で割った値を示している．これは，コントロールを1とした相対的な反応速度を示すものと考えられる．したがって，LT-血漿の添加により，プロトロンビン時間の延長，すなわち，反応速度の低下がみられる．これは，LT-血漿中に，血液凝固の阻害物質が存在することを示すものである．この阻害効果は，LT-血漿を 100 °C で2分間処理しても失活せず，熱メタノールあるいは水で抽出可能であった．

実験Ⅱ　LAS および BHT の凝固反応への作用

Fig. 3. は LAS によるプロトロンビン時間の延長

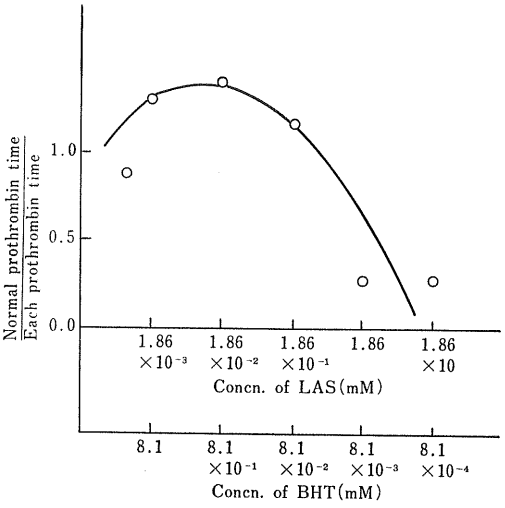


Fig. 4. Effects of LAS and BHT on prothrombin time

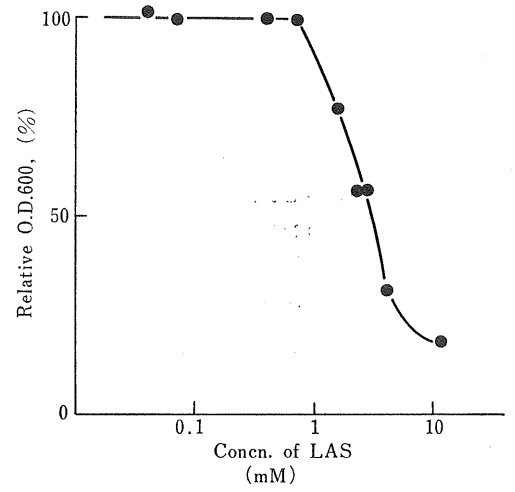


Fig. 5. Solubilization of fibrin by LAS

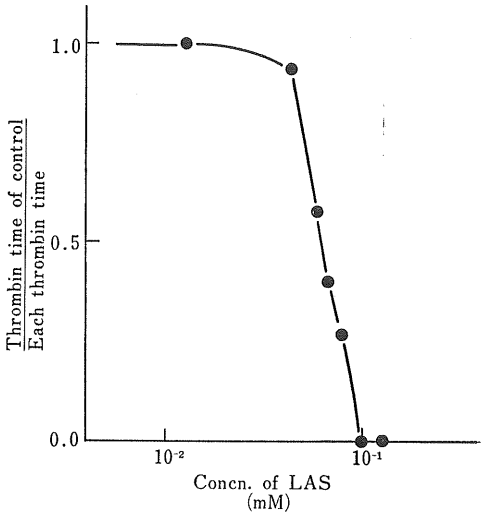


Fig. 6. Inhibition of thrombin by LAS

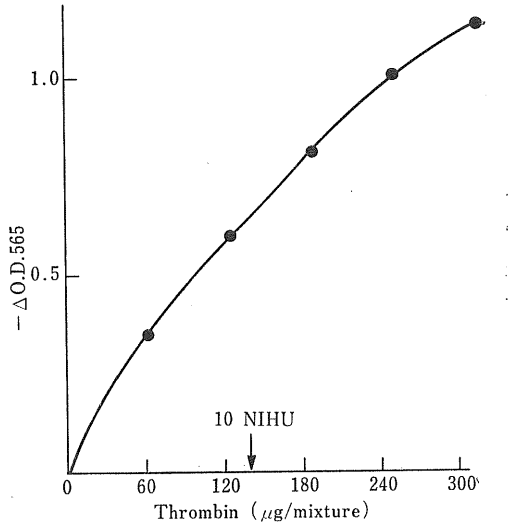


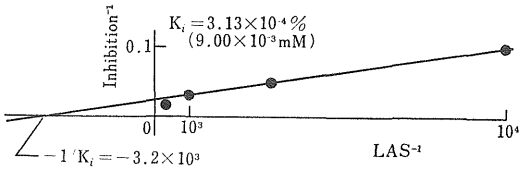
Fig. 7A. Relationship between thrombin concentration and H^+ release

を示すグラフである．LAS 添加により，速度の低下が起っていることがわかり，0.6 mM 付近で 50%の阻害が起っている．なお，BHT は少なくとも 10 mM までは阻害効果を示さなかった．次に，LAS と BHT が正常凝固反応過程に対して，相乗的に阻害効果を示す可能性を検討するため，両方を同時に加えた系で，プロトロンビン時間の変化をみた．Fig. 4. で，相対的な速度の低下は LAS にのみ由来し BHT に関与することはなかった．

LAS によるプロトロンビン時間の延長作用については，少なくとも，フィブリンの重合過程，トロンビンによるフィブリノーゲンからフィブリンへの転換過程，第X因子による，プロトロンビンからトロンビンへの転換過程という三つの段階への作用に分けて考えることができる．

可溶性フィブリンからフィブリン塊の生成する LAS 過程に対するの作用については，不溶性フィブリンの LAS による可溶化の程度をみて，その可能性を類推するに止めた．Fig. 5. は LAS によるフィブリン懸濁液の濁度の低下を示したもので，1.0 mM 以上で 0.0 の低下がみられる．

Fig. 6. はトロンビンの反応に対する LAS の効果を示したものである．それによると，LAS の添加に



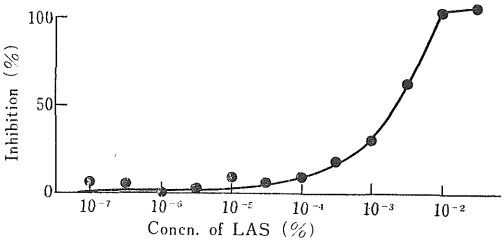
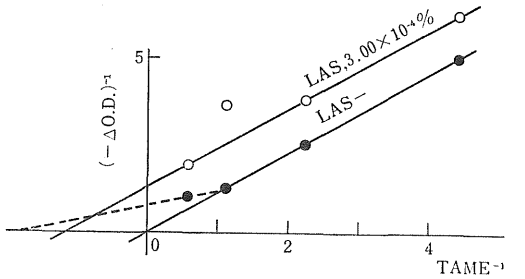


Fig. 7B. Inhibition of thrombin-esterase activity by LAS (1)



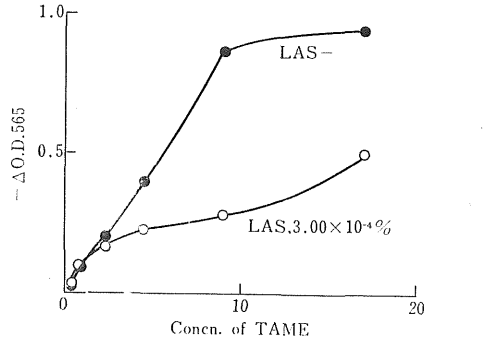


Fig. 8. Inhibition of thrombin-esterase activity by LAS (2)

より，明らかなトロンビン阻害が起り，50％阻害の LAS 濃は0.05 mM 付近であった．Fig. 7 B. は TAME を基質としたトロンビンのエステラーゼ活性への影響をみたものである．LAS の添加により，トロンビンの反応が阻害され，Ki 値は 9.0 μM であった．Fig. 8. は Lineweaver-Burk プロットであるが，このエステラーゼ反応は低濃度の基質で V_{max}, Km 値とも∞を示し，高濃度の基質に至り，決った V_{max} 値を示す．そこで，その V_{max}, Km 値と LAS 添加後の V_{max} Km 値を比較することにより，この阻害では非拮抗阻害と拮抗阻害がともに起っているといえる．

Table Ⅰ Assay for each fraction.

Fraction	Thrombin time of control / Each thrombin time
—	1.0
Ⅰ	1.1
Ⅱ	0.3
Ⅲ	0.0
Ⅳ	0.5
Ⅴ	0.0
Ⅵ	1.3

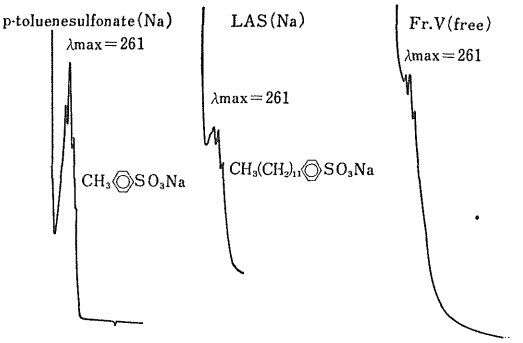


Fig. 9. UV-absorption of fr. V

実験Ⅲ　LT-投与のラット血漿中に存在する凝固阻害物質と LAS との関係

実験方法の項で述べたような手順に従って阻害物質を抽出した．実験Ⅰの最後に触れたように，この物質が蛋白質等の高分子ではないこと，有機溶媒にとける等の性質をもとにした抽出法である．分画Ⅰから Ⅳのトロンビンへの作用を示したのが Table. Ⅰ である．対照（阻害物質の代りに水を加えた）の相対的速度 1.0に対し，分画Ⅴ，Ⅲ，Ⅱ，Ⅳが阻害効果を示した．分画Ⅳは分画Ⅴのコンタミと考えられる．分画Ⅱは，高濃度に塩化ナトリウムを含む分画であり，塩化ナトリウムが高濃度でフィブリン塊生成を阻害することから，もっぱら，Ⅴ，Ⅲが問題となる．分画Ⅲは正常ラットの血漿からも同様の操作で得られた．Fig. 9. は分画Ⅴの紫外部の吸収パターンを示したものである．*p*-トルエンスルホン酸が LAS とほぼ同様のパターンを示すことから，LAS の吸収が，少なくとも，ベンゼンスルホネートに由来するものであることがわかる．分画Ⅴはメタノール中で図 9 のようなパターンを示し，LAS と，ほぼ同一の構造を持つと考えられた．また，分画Ⅴは，LAS 同様，メチレンブルーと複合

Table Ⅱ Prothrombin, thrombin index and fibrin concentration of rats fed on diets containing BHT, LAS and LT

	Group Ⅰ	Group Ⅱ	Group Ⅲ
Prothrombin index	33±4	72±3**	44±6
Thrombin index	86±6**	39±12	61±2
Fibrin (mg/ml plasma)	3.27±0.22	3.14±0.08	2.78±0.14
Fibrin/Total protein (%)	2.24±0.12	2.13±0.04	2.01±0.11

The results are given as mean values±S.E.M. for five rats.**P<0.01 (vesus Group Ⅲ).

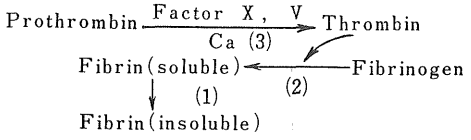


Fig. 10. Schema of coagulation

体を作った．分画Ⅲは，260 nm 付近に吸収を持たなかった．

実験Ⅳ BHT, LAS および LT-投与のラット血漿のトロンビン時間

実験方法の項で述べたような条件で動物を飼育した．10日目のプロトロンビン指数，トロンビン指数，フィブリン量，フィブリンの血漿蛋白に対する割合を，Table. Ⅱ に示す．データは，平均値に標準誤差を付記して示してある．プロトロンビン指数は，Ⅰ，Ⅲ群がⅡ群に対し有意に低く（P<0.01），Ⅰ，Ⅲ群間では有意差がなく，柴らの結果と一致していた．トロンビン指数は，Ⅱ，Ⅲ群がⅠ群に対して有意に低く（P<0.01），Ⅱ，Ⅲ群間に有意差はなかった．フィブリン量は，血漿 1 ml あたりでも，総血漿蛋白に対する割合でも有意差はなかった．

考　察

実験Ⅰの結果が示すように，LT 投与ラットの血漿中には血液凝固阻害物質が存在する．Fig. 1. にみられるように，阻害曲線の勾配が急であるから，阻害の発現に，かなり多数の阻害物質が関係していると考えられる．この傾向は，4° で長期間（半年間）保存した LT 血漿については，さらに大きく，Fig. 2. の相対濃度で表現して，10^{-1} ぐらいのところから阻害が開始され，1 では完全な阻害がかかり，相対速度は 0.0 となる．これは，新鮮血漿では，阻害効果がある程度マスクされていることを示すものであり，一般的に考えて，変性しやすい高分子のある部分がその役割を担っているのではないかと思われる．

実験Ⅱによって示されたように，LAS はプロトロンビン時間を延長させる（Fig. 3.）．そして，BHT は直接的な意味では，プロトロンビン時間の延長には，作用していないように思われる（Fig. 4.）．Fig. 2. と Fig. 3. を比較すると，急勾配であるという点などで，かなり良く似た曲線であることがわかる．これは，4 °C で長期間保存した LT-血漿について，考慮すれば，さらに，良く似ていることがわかる．LAS のプロトロンビン時間延長効果については Fig. 10. に示した（1），（2），（3）のいずれかの段階への作用に分離して考えることができる[12]．（1）はフィブリンの重合過程，（2）はトロンビンによるフィブリノーゲンの加水分解過程であり，（3）は第X因子によるプロトロンビンの加水分解過程である．本報では，（1）および（2）について検討を加えたが，Fig. 5., Fig. 6. を比較して（2）の段階すなわち，トロンビンに対する阻害が（1）の反応すなわち，重合阻害に比して大きいように思われる．Fig. 3. と Fig. 6. を比較したとき，プロトロンビン時間の延長に関して50%の阻害を起こす LAS の濃度は 0.6 mM 付近であり，トロンビンの50%阻害濃度は 0.05mM 付近であるから，1 桁の違いがあることになる．（3）の可能性，つまり第X因子への作用については不明であるが，桁数にして，トロンビン以上の阻害がおこるとすれば，プロトロンビン時間の延長作用と比較して，あまりにもかけはなれた結果になり矛盾を生じるから，阻害があるとしても，たかだか，トロンビンと同じレベルであろうと思われる．また，1 unit の第X因子は，50 NIH units のトロンビンを生じる[12]ことを考えれば，LAS の濃度として，トロンビンに対してと同じレベルの阻害をしたのでは，プロトロンビン時間への影響は，トロンビン阻害よりはるかに大きくなるし，さらに，トロンビンへの阻害が相乗されるのであるから，第X因子の素過程への作用は，もしあるとすれば，かなり高濃度の LAS でおこるとしなければ，説明がつかないことになる．したがって，もっとも低濃度で阻害がかかるのは，トロンビンに対してではないかと考えられ

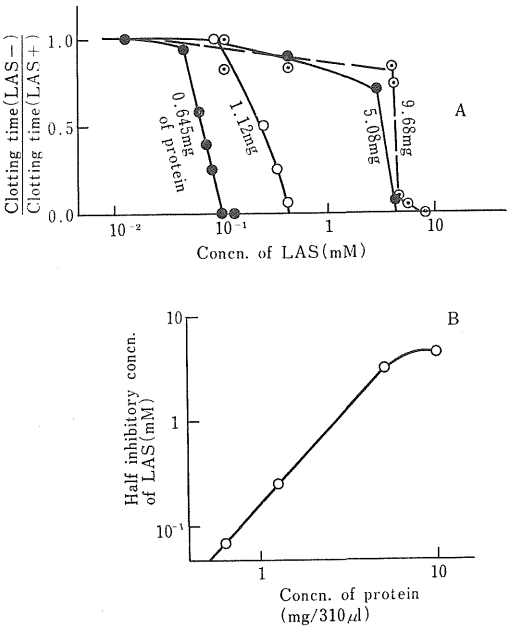


Fig. 11. Effect of bovine serum albumin on thrombin-inhibition by LAS

る．TAME に対するエステラーゼ活性の阻害については，Ki 値が 9.0 μM であり，フィブリノーゲンを基質とした場合の約 1/5 となる．この阻害は V_{max} の低下，Km 値の上昇を伴うので，非拮抗型と拮抗型の両者が同時に起っていると思われる．V_{max} の低下は，酵素蛋白が何らかの構造変化をうけたためと考えられるし，Km 値の上昇は酵素と基質の結合関係が競争的に阻害されているためである．LAS と TAME は共存すると白濁するので，なんらかのコンプレックスを作るようであり，おそらく，基質自体への影響が強いのではないかと思われる．したがって，むしろ酵素と LAS があとから入ってくる基質を奪いあうのではないかと思われる．この反応がフィブリノーゲンを基質にした場合と，本質的に同じかどうかは検討の余地がある[14]．

トロンビンの50%阻害濃度とプロトロンビン時間に関する50%阻害濃度のくいちがいを説明する方策として，反応系の蛋白質濃度の違いがあげられる．トロンビンの触媒する反応系に，ウシ血清アルブミンを添加した場合の LAS による阻害曲線を Fig. 11. に示す．反応系の蛋白濃度が上昇するにつれて，50 % 阻害の LAS 度が上昇することがわかり，その上昇のし方は Fig. 11. B のとおりである．この考え方でいくと，TAME に対するエステラーゼ反応も，この直線の延長線上に乗ってくる．

この関係は蛋白質と LAS が Freundlich 型の吸着を行なうと考えれば説明できる．Freundlich によれば，溶質の平衡吸着量と溶液の濃度との間には，つぎの関係があるという[16]．

$$w/m = ac^{1/n}$$

ここで，吸着体を蛋白質，吸着物質を LAS と考え Freundlich 型の吸着式が成り立つと考えれば，つぎのようになる．

$$w_L/m_p = a'c_L^{1/n}$$

ここで，w_L は吸着した LAS のモル数，m_p は蛋白質の量，c_L は吸着平衡にある LAS の濃度 (mM) a' および n は定数である．いま，m_p の値を与えてやり，w_L を求めると，

$$w_L = a' \cdot m_{op} \cdot c_L^{1/n}$$

である．ここで，m_{op} は定数．

$$\therefore w_L/m_p = a' \cdot m_{op} \cdot c_L^{1/n}/m_p$$

いま，蛋白質が，蛋白質の量にかかわらず，吸着物質によって，ある一定の状態におかれるとする．つまり，この場合には，LAS は蛋白質に無差別に吸着し，阻害剤無添加時の速度の 1/2 を与えるように吸着したとすれば，そのとき，

$$w_L/m_p = K \text{ (一定)}$$

と考えられる．また，そのとき，

$$c_L = K_i \quad (K_i\text{；50\%阻害の LAS 濃度})$$

である．したがって，

$$a' \cdot m_{op} \cdot K_i^{1/n}/m_p = K$$

$$\therefore K_i^{1/n} = K' \cdot m_p$$

$$1/n \log K_i = \log K' + \log m_p$$

$$\therefore \log K_i = a \cdot \log m_p + b \quad (a, b\text{；定数})$$

となり，図の直線部分の式が導けた．

したがって，蛋白質濃度を考慮すると，プロトロンビン時間の延長と，トロンビンの阻害は同等のものであろうと推測される．Fig. 12. は，ローダミン B に対する LAS の吸着様式の違いによる螢光の違いを螢光光度計で測定したもので，0.546 mM に限界ミセル濃度を持つ．したがって，トロンビン阻害，プロトロンビン時間延長等に関して，ミセル効果が重要な影響を及ぼしていることが予想される．

陰イオン界面活性剤（とくに，硫酸根を持つもの）は，非イオン，陽イオン異面活性剤に比べて，トロンビン阻害の濃度が，はるかに低いので[17]，ミセル形成と同時に官能器どおしの作用も考えられ，トロンビンがフィブリノーゲン中の Arg-Gly，Lys-Ala 等を切

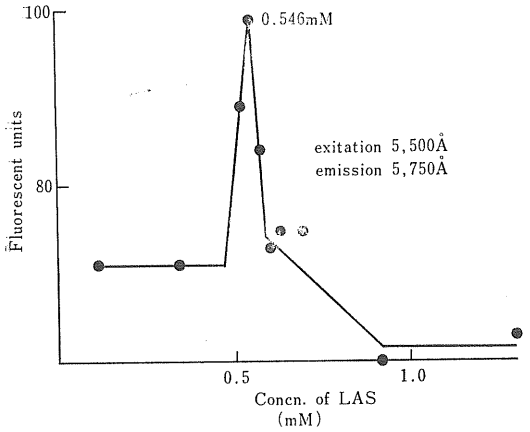


Fig. 12. Critical micelle contration of LAS

断するセリンプロテアーゼであることも併せて[18]，硫酸根とのつながりが重視されてくるように思える．*p*-トシルベンゼンスルホネートは，フィブリノーゲン-トロンビン反応を阻害しないから[17]，単に一分子の作用ではなく，多数分子の協同作用であると考えられる．

実験Ⅲによって示されたように，LT-血漿中の血液凝固阻害物質は，LAS そのものであると考えられる．抽出操作過程で得られた分画Ⅲは 261 nm 付近に吸収パターンを持たないから，短鎖のアルキルベンゼンスルホネートである可能性や類似の代謝産物である可能性は否定される．正常ラットから得られる分画Ⅲを，10倍容のアセトンにより，上清と沈渣（III_c）に分け，さらに上清を濃縮して，さらにアセトン処理し，上清（III_a）と沈渣（III_b）に分ける．フィブリノーゲン-トロンビン反応で，阻害剤を加えないときの相対的な反応速度を 1.0 とすれば，III_a，III_b，III_c の添加により，その速度は 0.6，3.1，1.1 となる．したがって，III_a のみがわずかに阻害活性を有し，III_b，III_c は，全く阻害効果を持たない．この三者を合せると，速度は0.0となり，再び阻害活性が現われる．この物質が何であり，どのようにして生じるかは不明であるが，いずれにしても，LT の問題と直接には関係がないようである．

以上のようなことから，LAS が血液凝固に阻害的に働くことは間違いないのであるが，ラットに0.2％の LAS を単独投与しても，凝固の延長はみられない．このことに関しては，単に凝固系の問題だけに，しぼって考えたとしても，次のような可能性が考えられる．それは，LAS 投与によって，LAS のトロンビン阻害効果が，潜在的に保持されていたとしても，さまざまな要因でそれが表面化してこない場合であり，それが BHT 等の影響により，プロトロンビン量，第Ⅳ因子の低下に加えて，さらに，他の血液成分の変化をもたらし，結果的に LAS のトロンビン阻害効果も表面化してくるという具合である．実験Ⅳで示されたように，LAS 単独投与のラット血漿もトロンビン時間の延長を示す．フィブリノーゲン量は，絶対量でも，血漿蛋白に対する割合でも変りがないと考えられるから，この延長がもっぱら，阻害物質の作用によっていることがわかる．

別に，LAS 投与のラットと BHT をさらに加えたラットとでは肝臓脂質に成分的な変化がみられるから[11]，血中の脂質にも変化が起っている可能性がある．したがって，さまざまな脂質成分と凝固能の関係についても，今後，検討する価値があると思われる．

要　約

BHT, LAS を同時投与（LT 投与）しておこる血液凝固の阻害について，凝固阻害物質の存在性を検討した．それによって，LT 投与のラット血漿中には，血液凝固阻害物質が存在し，もっぱら，トロンビンの作用を阻害すること，そして，その物質が LAS そのものであることを確認した．

（本研究の概要は，日本薬理学会第47回総会昭和49年4月1日および日本薬理学会第50回関東部会昭和49年6月1日で発表した．）

文　献

1) 柴英子他：日本薬理学会第47回大会口演要旨集，p. 38 (1974)
2) 小林博義他：都立衛生研年報，24，397 (1972)
3) 平賀興吾他：都立衛生研年報，22，231 (1970)
4) Quick, A. J., Stanley-Brown, M. and Bancroft F. W.: *Am. J. Med. Sci.*, 190, 571—511 (1935)
5) 河合忠：血液凝固第2版（小酒井望編：日常検査法シリーズ2）p. 38 (1973) 医学書院
6) Flynn, J. M. *et al J. Am. Water Works Assoc.*, 50, 1551—1562 (1958)
7) Gornall, A. G., Bardawill, C. S., David, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 177, 751—756 (1949)
8) Lowry, O. H., Rosebrough, Farr, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265—272 (1951)
9) 中尾順子他：生化学，45，466—466 (1973)
10) Hough, D. A., Lyons, L. V.. Koppel, J. L. and Olwin, J. H.: *J. Am. Med. Assoc.*, 188, 207—211 (1964)

11) 高橋省：都立衛研年報，25，　(1974)
12) 安部英：臨床科学，9, 539—546 (1973)
13) 田中健一他：臨床科学，9，598—604 (1973)
14) Mann, K. G., Heldebrant, C. M. and Fass, D. N.：*J. Biol. Chem.*, 246, 6106—6114 (1971)
15) Pitt-Rivers, R. and Impiombato, F. S. A：*Biochem. J*, 109, 825—830 (1968)
16) 松浦良平，佐々木恒孝：実験化学講座 7 （日本化学会編）p. 49 (1956) 丸善
17) 高橋省，平賀興吾：日本薬理学会第 51 回関東部会口演要旨集，p. 35
18) 岩永貞昭，中村伸：臨床科学，9, 605—619(1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 647 — 653, 1974

脂質の系統分析法の検討と肝臓脂質分析への応用——直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）とジブチルヒドロキシトルエン（BHT）を同時投与したラットの場合——

高橋　省*

Studies on Systematic Analysis of Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) and Butylated Hydroxy Toluene (BHT) on Hepatic Lipids in Rats

OSAMU TAKAHASHI*

肝臓の脂質組成は，栄養条件や薬物の投与などにより，変化しやすい[1-7]．各種薬物によって惹き起こされる脂質代謝異常は，代謝調節の研究に興味ある材料を提供するとともに，薬物のさまざまな評価に対する根拠のひとつとなる．脂質代謝の仕事をする場合，臓器等の脂質組成を知ることが何よりもまず必要であり，したがって，抽出，分離，定量法の三つが確立されねばならない．ここでは，もっぱら，肝臓脂質を分析する目的で，現在，広く行なわれている方法を多少検討改良して，実験に使用できるようにした．さらに，LAS および BHT を同時投与したラット[8]の肝臓脂質について分析を行ない考察した．

実験方法

抽出操作　抽出操作は，おおむね，Folch らの方法[9]に従った．＜試薬＞クロロホルム-メタノール混合溶媒（2：1 v/v），0.04%塩化カルシウム溶液，洗浄液；0.04%塩化カルシウム溶液とクロロホルム-メタノール混液を（1：5 v/v）に混合し，平衡に達した時の水層を分取したもの．＜操作＞湿肝臓2.0 g にメタノール 15 m*l* を加え，Potter-Elvehjem テフロンホモジナイザーで磨砕し，三角フラスコに移し，器内をクロロホルム-メタノール混液，5 m*l* で洗浄し，洗液を加え，最終的にクロロホルム 30 m*l* を添加して攪拌し24時間室温で抽出する．抽出液に0.04%塩化カルシウム溶液を10 m*l* 加え攪拌し，24時間放置する吸引しながら上層を除き，洗浄液で3回洗浄する．減圧乾固後，これを肝臓の総脂質とする．(Fig. 1.)

糖脂質は牧田の方法[10]により抽出した．すなわち，湿肝臓 2.0 g をアセトン 20 m*l* とともに磨砕し，室温で24時間放置し，遠沈により，アセトン粉末を得る．アセトン粉末をメタノール—エーテル（1：1 v/v）20 m*l*，クロロホルム-メタノール（2：1v/v)20 m*l* で一昼夜ずつ，連続的に抽出し，抽出液を合わせて乾固後，クロロホルム-水系で Folch の方法に従って洗浄し，クロロホルム層を糖脂質画分とした．なお，アセトン可溶部については，小原らの方法[11]に従い，クロロホルム-メターノール（2：1 v/v）抽出乾固後，*n*-ヘプタン-95 % メタノール（1：1 v/v）系で，メタノール層をとり，さらに，クロロホルム-水系で Folch の方法に従って洗浄後，クロロホルム層について，糖脂質の存否を検討した．(Fig. 2.)

薄層クロマトグラフィー　小椋らの方法[12]に従い，0.75 mm×20 cm×20 cm のシリカゲルGプレートを用い，大量の抽出脂質をスポットし *n*-ヘキサン-エーテル-酢酸（80：20：1）で展開した．硝酸銀薄層クロマトグラフィーは Kaufmann らの方法[13]に従った．発色は目的に応じて，ヨード蒸気，0.2%2′，7′-ジクロルフルオレセイン-エタノール溶液，50%硫酸，アントロン-硫酸を用いた．

各脂質成分の定量　総脂質は重量法により測定した．（1）**エステル型コレステロール（CE），コレステロール（CH）の定量**　Zak 法[14]を一部改変して用いた．＜試薬＞1.332 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ に氷酢酸100 m*l* を加える．これを10倍に希釈したものをAとする．B；特級硫酸．＜手順＞薄層クロマトグラフィーにより分離した，CE，CH を試験管に移し，窒素気流下，微

* 東京都立衛生研究所毒性部
160　東京都新宿区百人町3－24－1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japán

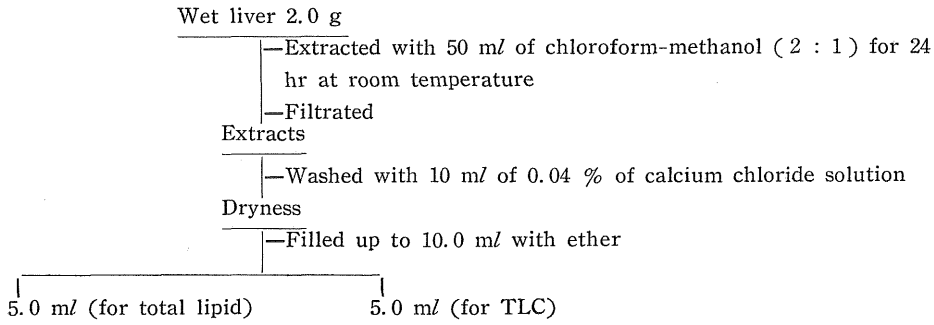


Fig. 1. Extraction process for liver lipid

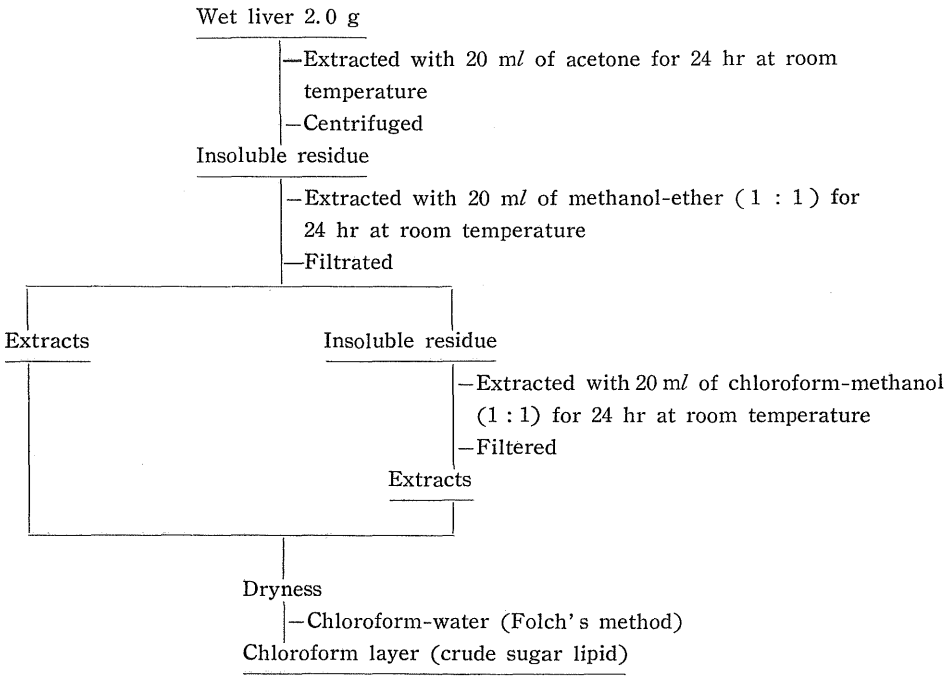


Fig. 2. Extraction process for sugar lipid

量濃縮装置にて乾固し，Aを2.0 ml加え，50° で5分間，加温振盪する[15]．Bを1.5 ml ずつ管壁に沿って注ぎ込み，ボルテックスミキサーで，10回攪拌し，5分後560 nm で比色する．CE の標準物質としては，コレステロールパルミテートを用いた．（測定範囲，10～100 μg）（2）**トリグリセリド（TG）の定量** Fletcher 法[16] に準じた．＜試薬＞5％水酸化カリウム，イソプロパノール-水（40：60）をA，0.025 Mメタ過ヨーソ酸ナトリウム-1.0 N酢酸，12 ml を使用時15分前に，イソプロパノール20 ml と混和し，1.0 N酢酸で100 ml にしたものをB，0.75 ml の2,4-ペンタンジオンと 2.5 ml のイソプロパノールを2 Mの酢酸アンモニウム（pH 6.0）100 ml にとかしたもの（氷室で1ヵ月ぐらいは安定）をCとする．＜手順＞TG 溶液（イソプロパノール）2.0 ml にAを0.6 ml 加え，65° で30分間鹸化する．水中で冷却後，Bを1.0 ml 加え，さらにCを0.5 ml 加え充分混和し，50° で30分反応後，405 nm で比色する．標準物質として，トリオレイン，トリパルミチンを用いた．（測定範囲，10～200 μg/2.0 ml）（3）**ジグリセリド（DG）の定量** TG と同様，Fletcher 法を用いた．標準物質として，ジオレインを用いた．（4）**遊離型長鎖脂肪酸（FFA）の定量** Duncombe の方法[17] に従った．＜試薬＞銅試薬；1 M トリエタノールアミン，1 N酢酸，6.45%

Table I Extraction of lipids by the Folch's method

	CE	TG	FFA	CH	DG	PL
First extracts						
mg/g liver	> 1.21	6.37	7.87	1.47	0.66	11.51
%	>96.8	97.4	99.4	97.0	84.9	97.9
Second extracts						
μg/g liver	<10	58	68	20	34	119
%	—	0.9	0.4	1.3	4.4	1.0
Third extracts						
μg/g liver	<10	22	6	9	23	42
%	—	0.3	0.0	0.6	3.0	0.4
First water layer						
μg/g liver	<10	46	9	9	19	73
%	—	0.7	0.1	0.6	2.4	0.6
Residue						
μg/g liver	<10	48	12	8	41	8
%	—	0.7	0.1	0.5	5.3	0.1

$Cu(NO_3)3H_2O$（9：1：$10^V/_V$）で混和したものをAとする．ジエチルジチオカルバメート試薬；0.1％ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液（*n*-ブタノール；原報では再留ブタン-2-オール）をBとする．A，Bは氷室保存し，長期保存は不可能．＜手順＞ FFA 溶液（クロロホルム）5.0 m*l*を10 m*l* の共栓遠沈管に入れ，Aを2.5 m*l* 加え，正確に2分間振盪する．器壁を洗いながら上層に水を注ぎ，吸引しながら上層を除く．低速遠心し，上層を完全に除く．遠沈管内壁にピペットが触れぬようにして，クロロホルム層を3.0 m*l* とり，比色管に移し，Bを0.5 m*l* 加え，440 nm で比色する．標準物質としては，パルミチン酸を用いた．（測定範囲，25～150 mμmole パルミチン酸/5 m*l*）（5）**リン脂質の定量** Pi 値に25を乗じて求めた．Pi は脂質を過塩素酸で灰化後，Allen-中村の変法[18]により測定した．（6）糖脂質の定量，ガラクトース値に4.6を乗じて求めた．ガラクトースはアントロン硫酸法で[19]測定した．

Folch 法に対する検討 船橋農場の固型飼料 F Ⅱ（粗蛋白21.3％）で飼育した Wistar-SLC の雄ラット（体重381.0 g）を断頭放血後，肝臓を摘出した（肝重量 13.2 g）．抽出操作のところで述べた方法に従って脂質を抽出したが，残渣を同様の方法で，さらに2回抽出を行ない，それぞれ抽出物1，2，3とした．抽出物1の抽出操作過程で生じた洗液のすべてを回収し，乾固後エーテルで抽出したものを，第1回水層とした．最終的残渣は5％ KOH 40 m*l* を加え，50°C で1時間処理，さらに室温で24時間放置後，エーテル抽出を行ない，残渣画分とした．各抽出物の成分は Table I のとおりである．第1回の操作で DG 以外の大部分が96％以上抽出でき，水層への移行も少なく，1回の抽出操作で充分満足し得る結果が得られる．なお，重量法による総脂質は，湿肝臓に対し，5.34％であった．

糖脂質の抽出法について 同様の飼育条件にある Wistar-SLC の雄ラット（体重315.0 g，肝重量10.8g）について，前述の方法で抽出を行なった．肝臓においては，アセトン可溶分画には糖脂質の存在は認められず，不可溶部のみに認められ，肝臓1 g あたり16.28 mg であった．

LAS および BHT を同時投与したラット肝臓の脂質分析

動物，食餌条件

実験Ⅰ 動物は4週齢 Wistar-SLC の雄ラットを用いた．飼料組成は米山ら[8]に従った．Ⅰ群は船橋農場の固型飼料 F Ⅱを与え対照群とし，Ⅱ群はその基本飼料に，0.2％ LAS，0.8％ BHT を加えたものを与え，実験群とした．各群はそれぞれ，4および5頭とし10週間，自由摂取させた[20]．動物は断頭放血後，肝臓を摘出し，脂質分析を行なった．

実験Ⅱ BHT は和光純薬製のものを，エタノール中より2回再結晶して用いた．LAS は有効成分 99.5％のものを用いた[21]．動物は SD-JCL の雄ラット120 g のものを用いた．予備飼育には，日本クレアのCLEA-CE 2（粗蛋白24.00％）を与えた．本実験で用いた基

Table Ⅱ Body weight, liver weight and liver lipid

Group	body weight g	liver weight g	liver lipid wet %	liver lipid mg
Ⅰ	324.5±30.7	11.20±1.16	5.22±0.53	600±117
Ⅱ	327.4±29.7	17.62±1.61*	4.74±0.19	835±78

The results are given as mean values ± S.E.M. for four or five rats.
* $P<0.05$ (vesus Group Ⅰ)

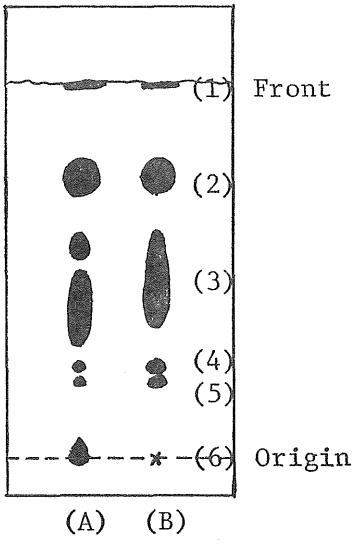


Fig. 3. Thin layer chromatogram of liver lipid classes in rats fed on LAS, BHT mixing diets

The lipids were developed on silica gel G plate with n-hexane-ether-acetic acid (80 : 20 : 1). A; liver lipid, B; standard. (1) CE, (2) TG, (3) FFA, (4) CH or DG, (5) DG, (6) PL.

本飼料の組成は次のとおりである. ; 24.00 % カゼイン, 5.00%大豆油, 4.00%塩混合, 0.45%ビタミン混合, 0.15%塩化コリンおよびシュクローズ (なお, シュクローズは, 薬物を添加後, 全体が100.00%になるように加えた). ビタミン混合は武田薬品の調剤用パンビタン末を使い, それ以外の成分は, 田辺アミノ酸研究基金のものを用いた. ラットは次の3群に分けた.

Ⅰ群, 基本飼料+1.0% BHT
Ⅱ群, 基本飼料+0.3% LAS
Ⅲ群, 基本飼料+1.0% BHT+0.3% LAS

各群は5頭とした. 10日間の飼育後, 断頭放血し, 肝臓を摘出, 以後の実験に供した.

結果および考察

実験Ⅰ BHT, LAS同時投与の体重, 肝臓重量および肝臓総脂質への影響は, Table. Ⅱ に示した. 肝重量に増加が認められたが, 総脂質量に有意差はなかった. Ⅱ群における肝臓脂質の薄層クロマトグラムの一例を Fig. 3. に示す. 肝臓脂質の組成は Table. Ⅲ に示した. Ⅱ群の動物はⅠ群と比較して, 総脂質に対する割合 (%) において, トリグリセリドの低下 ($P<0.01$) とリン脂質の増加 ($P<0.05$) が認められた. リン脂質の増加は, トリグリセリドの量的低下に伴う相対的なものとして説明される. なお, 肝臓1 gあたりの重量で低下を伴うものとして, エステル型コレステロール ($P<0.05$), 遊離型脂肪酸 ($P<0.05$) があるが, 総脂質に対するバランスを変化させるものではない. Table. Ⅱ の結果より, たとえ, 肝臓重量の増加を考慮しても, 全肝臓のトリグリセリドは低下していると考えられる.

Table Ⅲ Composition of liver lipids

	Group Ⅰ	Group Ⅱ
CE mg/g liver	0.97±0.24	0.39±0.04*
%	4.65±0.60	3.06±0.71
TG mg/g liver	4.98±1.01	0.85±0.10**
%	24.24±2.39	6.48±0.94**
FFA mg/g liver	5.60±0.83	2.99±0.45*
%	28.03±1.59	21.53±2.36
CH mg/g liver	1.26±0.19	1.36±0.32
%	6.56±1.42	9.46±1.81
DG mg/g liver	1.00±0.14	0.82±0.08
%	5.51±1.24	6.09±0.68
PL mg/g liver	6.65±1.86	8.64±2.83
%	31.02±4.46	53.38±4.46*

The results are given as man values±S.E.M. for foul or five rats.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ (vesus Group Ⅰ)

実験Ⅱ BHT, LAS 投与の体重増減, 肝臓重量および肝臓総脂質への影響は, Table. Ⅳ に示した. 体重増減はⅠ, Ⅲ, 群間に有意差はなく, Ⅱ, Ⅲ群に有意差があり ($P<0.01$), Ⅱ群の飼料に対し, BHT を上

Table Ⅳ Body gain, liver weight and liver lipid

Group	body gain g	liver weight g	wet %	liver lipid mg
Ⅰ	−0.8±4.4	10.78±0.86	3.65±0.13	393.3±34.3
Ⅱ	21.8±5.2**	11.45±0.38*	9.77±3.21	1147.4±416.2
Ⅲ	−3.0±4,5	8.50±0.66	5.14±0.78	489.6±84.1

The results are given as mean values ± S.E.M. for five rats.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ (vesus Group Ⅲ)

のせすることにより，BHT 単独と同じレベルの変化に解消されることを示唆している．肝臓重量もⅠ，Ⅲ群間に有意差がなく，Ⅱ，Ⅲ群間に有意差がある（$P<0.05$）．しかし，体重を考慮すると，肝臓重量は，3群とも差がなくなるから，この変化は，体重変化と並行したものと思われる．肝臓脂質は，分散が大きいため，有意差が認められなかったが，Ⅱ群が，Ⅰ，Ⅲ群に対し，明らかな高値を示し，剖検および肝臓切片の組織像でも明らかな脂肪肝と考えられた[22]．肝臓脂質の薄層クロマトグラムの三例を Fig.4. に示す．肝臓脂質の組成は Table Ⅴ に示した．Ⅲ群の動物は，総脂質に対する割合で，エステル型コレステロールが，Ⅰ，Ⅱ群に対し，有意な上昇を示した（$P<0.01$，$P<0.05$）．トリグリセリドについては，Ⅰ群に対し上昇を（$P<0.05$），Ⅱ群に対しては有意な低下（$P<0.01$）を示した．また，リン脂質は，Ⅰ，Ⅱ群に対し有意な低下を示した（$P<0.05$，$P<0.01$）．これらのうち，Ⅰ群との比較でのリン脂質，Ⅱ群との比較でのエステル型コレステロール，コレステロール，リン脂質は，必ずしも実質的な変化を伴わない相対的なものと考えられる．したがって，脂質組成への LAS の影響に対する BHT の効果は，トリグリセリドの低下に現われていると考えられる．また，エステル型コレステロールについては，LAS の効果を BHT が変更できないことを示しているようにも思われる．次に，Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ群のトリグリセリドについての，硝酸銀薄層クロマトグラムのパターンの代表例を Fig.5. に示す．定性的ながら，Ⅱ群において，Ⅰ，Ⅲ群と比較して，不飽和度の高いトリグリセリドの相対的低下と不飽和度の低いトリグリセリドの相対的上昇がみられ，Ⅱ群のトリグリセリドのみが，室温で白色に析出してくる，イソプロパノールへの溶解性が悪い，薄層上で，ヨード蒸気による発色が悪い等の知見と併せて，脂肪酸組成の変化が起っている可能性が示唆され，これについては，今後の検討が必要と思われる．

実験Ⅰでのトリグリセリドの低下は，実験Ⅱの結果から，LAS の作用ではなく，むしろ BHT によるものであると考えられ，BHT が，肝臓で，自然蓄積および LAS により異常蓄積するトリグリセリドを低下させる作用を持つことを示唆していると考えられる．

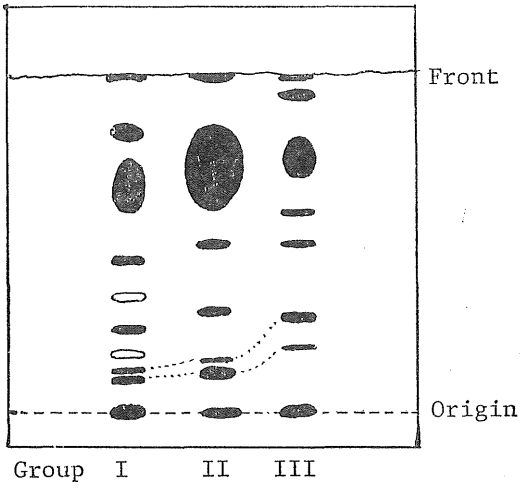


Fig.4. Thin layer chromatogram of liver lipid classes in rats fed on BHT, LAS and mixing diets
The lipids were developed on silica gel G plates with n-hexane-ether-acetic acid (80 : 20 : 1).

要約

肝臓脂質の系統分析を行なう目的で，従来の方法を整理検討した．次いで，BHT，LAS を同時投与したラットの肝臓について，その方法を応用した．それによって，BHT が肝臓でのトリグリセリドの蓄積を阻害する可能性が示唆された．

文献

1) Bortz, w., Abraham, S., and Chaikoff, I.L.: J. *Biol. Chem.*, 238, 1266−1272 (1963)
2) Tinoco, J., Shannon, A., Miljanch, P., Babcock, R., and Lyman, R.: *Biochem. J.*, 94, 751—754 (1965)

Table Ⅴ Composition of liver lipids

	Group Ⅰ	Group Ⅱ	Group Ⅲ
CE mg per g of liver	0.34±0.03**	1.09±0.16	0.80±0.09
%	3.55±0.28**	4.72±0.62*	7.14±0.81
TG mg per g of liver	1.37±0.13*	18.41±7.46	2.64±0.41
%	14.4 ±1.4*	62.8 ±8.1**	23.3 ±3.3
FFA mg per g of liver	0.15±0.02	0.19±0.04	0.16±0.02
%	1.54±0.18	0.94±0.30	1.98±0.55
CH mg per g of liver	0.80±0.05	0.83±0.04	1.03±0.11
%	8.57±0.98	3.97±0.81*	9.61±1.73
DG mg per g of liver	0.40±0.06	1.26±0.39	0.50±0.04
%	4.20±0.66	4.73±0.24	4.44±0.35
PL mg per g of liver	6.69±0.63	4.58±0.71	6.31±1.16
%	69.6 ±2.8*	22.9 ±6.6**	54.1 ±3.9

The results are given as mean values ± S.E.M. for five rats.
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ (vesus Group Ⅲ)

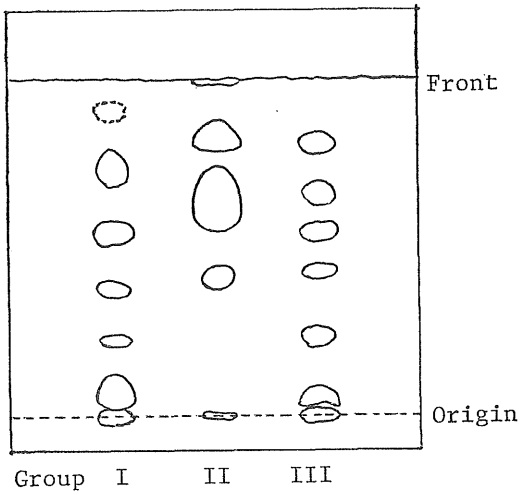


Fig. 5. Thin layer chromatogram of liver triglyceride classesn

Triglycerides were developed on silver nitrate impregnated silica gel G plates (microslide plates) with benzene-ether (8 : 2).

The degree of unsaturation is lower from origin to front.

3) 鈴木和彦, 岡田美津子：ビタミン, 47, 318—318 (1973)
4) 青山頼孝, 吉田昭：化学と生物, 11, 168−175, (1973)
5) Isselbacher, K. J.：日本肝臓学会第9回総会特別講演 (1973)
6) Roheim, R. S., Biempica, L., Eddstein, P. and Kosower, N. S. : *J. Lipid Res.*, 12, 76—82 (1971)
7) 山本章他：蛋白質, 核酸, 酵素, 19, 275−293 (1974)
8) 米山允子他：都立衛生研年報, 24, 449−465 (1972)
9) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. : *J. Biol. Chem.*, 226, 497−509 (1957)
10) Makita, A. : *J. Biochem.*, 55, 269−276 (1964)
11) 小原哲二郎, 木原浩：農化, 47, 231, 236 (1973)
12) Ogura, M., Tanaka, H., and Honda, H. : *Agr. Biol. Chem.*, 35, 370−376 (1971)
13) Kanfmann, H. P., and Wessels, H. : *Fette Seifen Anstrichmittel*, 66, 81−85 (1964)
14) Zak, B. : *Am. J. Chin.*, 27, 583−592 (1957)
15) 高杉佑一：ホルモンと臨床, 12, 967−974 (1964)
16) Fletcher, M. J. : *Chin. Chim. Acta*, 22, 393—403 (1968)
17) Duncombe, W. G. : *Biochem. J.*, 88, 7—10 (1963)
18) 中村道徳：農化, 24, 1−5 (1950)
19) 牧田章：蛋白質, 核酸, 酵素別冊, 脂質実験法,

p. 108 (1967)
20) 柴英子他：第47回日本薬理学会大会 (1974)
21) 小林博義他：都立衛生研年報，24. 397－408
(1972)
22) 藤井孝：私信

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 655 — 658, 1974

アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム投与ラットの血清アルカリフォスファターゼ上昇とその臓器由来について

1) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析

米山允子* 伊川三枝子* 中尾順子*

Origins of Increased Serum Alkaline Phosphatase in Rats fed on Alkylbenzene Sulfonates

I. Analysis by SDS-polyacrylamide-gel Electrophoresis

MASAKO YONEYAMA*, MIEKO IKAWA* AND TOSHIKO NAKAO*

緒　論

血清アルカリフォスファターゼアイソザイムは臨床分析化学的に肝，胆道，骨疾患および悪性腫瘍の発生やその転移等の診断に重要な指標となることは周知の如くである．

毒性研究においても血清アルカリフォスファターゼアイソザイムは毒性発現の指標として重要な手段と考えられる．検出の方法として現在行なわれている寒天電気泳動による追跡はその分解が充分ではないので方法の改善を行なった．アクリルアミドディスク電気泳動[1]は既に報告があるが，単純な DISC 法では本酵素の分子量から考えてアクリルアミドの濃度を5％以下に抑えなければならず，したがって，分離が悪いという欠点がある．われわれは SDS ポリアクリルアミド電気泳動法によって，この欠点を補うことによりアイソザイムを明瞭に分離することができた．さらに，本法の利点は活性を持った酵素の分子量が同時に測定できることである．ABS（分技型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム），LAS（直鎖型アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム）の投与によりラット血清アルカリフォスファターゼ活性の上昇を認めたことは既に報告した[2]．肝，腎，骨，小腸から抽出した酵素を本法で分離するとおのおの特長あるパターンを示した．このパターンによって血清中のアイソザイムを同定した結果，ABS, LAS による血清アルカリフォスファターゼの上昇は小腸および腎由来と考えられる．

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

実験材料および方法

ABS は和光純薬 K.K. Lot No. TG8232, LAS は花王アトラス K.K. Lot No. 141 のものをおのおの1.8％濃度になるように餌に混和し SLC Wister 系ラット雄雌5週齢に1ヵ月自由摂取させた．飼育後，断頭により採血し 3000 rpm で10分間遠心して血清を採取した．同時に肝，腎，骨，小腸粘膜を摘出し各臓器のアルカリフォスファターゼは Morton の法に従い，0.1Mバルビタール緩衝液 pH 8.6中で5分間ホモジナイズし，同量の *n*-ブチルアルコールで抽出後，37°C で30分間インキュベーションし 10000 rpm で遠心分離し水層をビスキングチューブ中でバッファーに対し1夜透析を行なった．透析液は 3000 rpm で15分遠心し透明な上清を酵素として使用した．

ポリアクリルアミド電気泳動は Weber-osbon[3] の系を用い，SDS 濃度は0.2％，アクリルアミドの終濃度は7.5％，アクリルアミドの終濃度は0.045％としゲルの長さは 13 cm とした．泳動用緩衝液は0.1Mトリスバッファー pH 8.6 を使用し，4 mA/ゲルの電流を流しマーカーとしての BPB の移動距離が 11 cm の所で泳動を止め，1 mM ・ナフチル ASMX フォスム

	Average of Body Weight (g)	No. of Rats	Alkaline Phosphatase activity Cumoles PN/min				
			Serum	Intestine	Kidney	Liver	Bone
Control	272	10	0.35	1.00	2.30	0.15	2.55
ABS	138	10	0.53	3.55	3.40	0.13	1.15
LAS	248	10	0.45	1.55	3.00	0.15	1.90

Table I Enzyme Activity of Serum and *n*-Butanol Extracts from Tissues

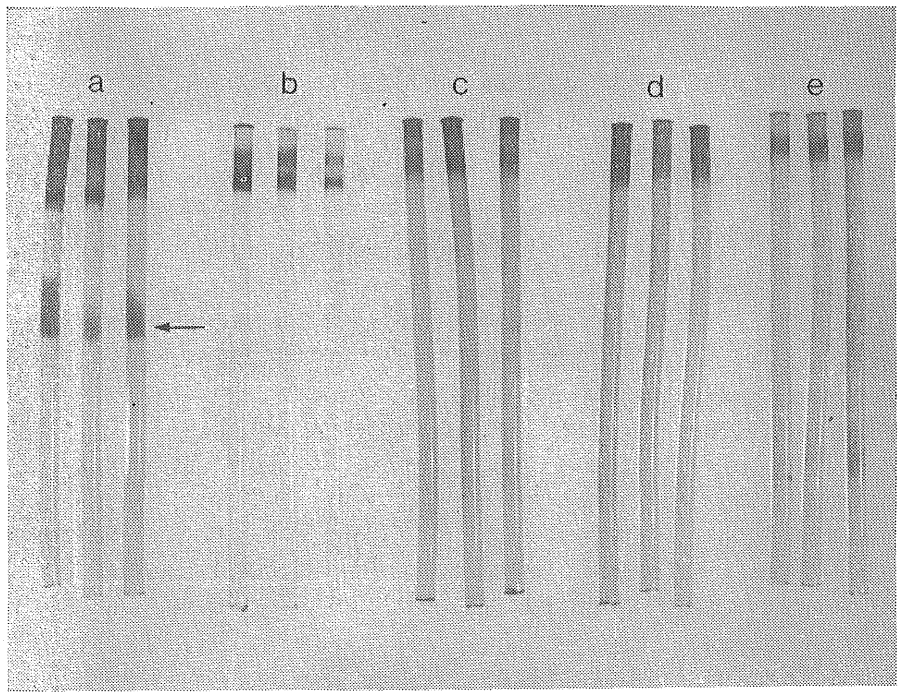


Fig. 1 SDS-gel electrophoresis of Serum and *n*-Butanol extracts from Tissues
a : Serum b : Intestine c : Kidney d : bone e : Liver ← : Albumine
control (left) LAS (middle) ABS (right)

ェト (Sigma) を基質としてトリスバッファー中で Fast Blue B.B. とともに約1時間インキュベーションをした. ゲルを水道水で洗浄後デンシトメーターを用い 620 mμ で活性部位の吸収を測定した.

結　果

0.2%SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって分離した血清, 肝, 腎, 骨, 小腸粘膜のアルカリフォスファターゼアイソザイムは活性部位に青色のバンドを示す. Fig. 1 に示す如く, 血清アルカリフォスファターゼは3本のバンドを示し, control に比べて, LAS 投与血清では陽極から1と2番目にわずかに強い活性が見られ, ABS 投与血清では陽極から1番目に強い活性がみられる. 小腸粘膜, 腎では二つのバンド, 骨では三つのバンド, 肝では一つのバンドを示している. Table. 1 の如く, LAS, ABS 投与の血清アルカリフォスファターゼは *p*-ニトロフェニルフォスフェトを基質にして測定した時 control に比べて 1.3 から 1.5 倍の値を示し, 小腸粘膜, 腎臓の酵素についても同様に高い値を示している. Fig. 1, Fig. 2 に示すようにゲル上でもその差はあらわれ, 各臓器の酵素活性部位と比較検討した結果 ABS 投与の血清アルカリフォスファターゼの強い活性は見かけ上腎由来, LAS の場

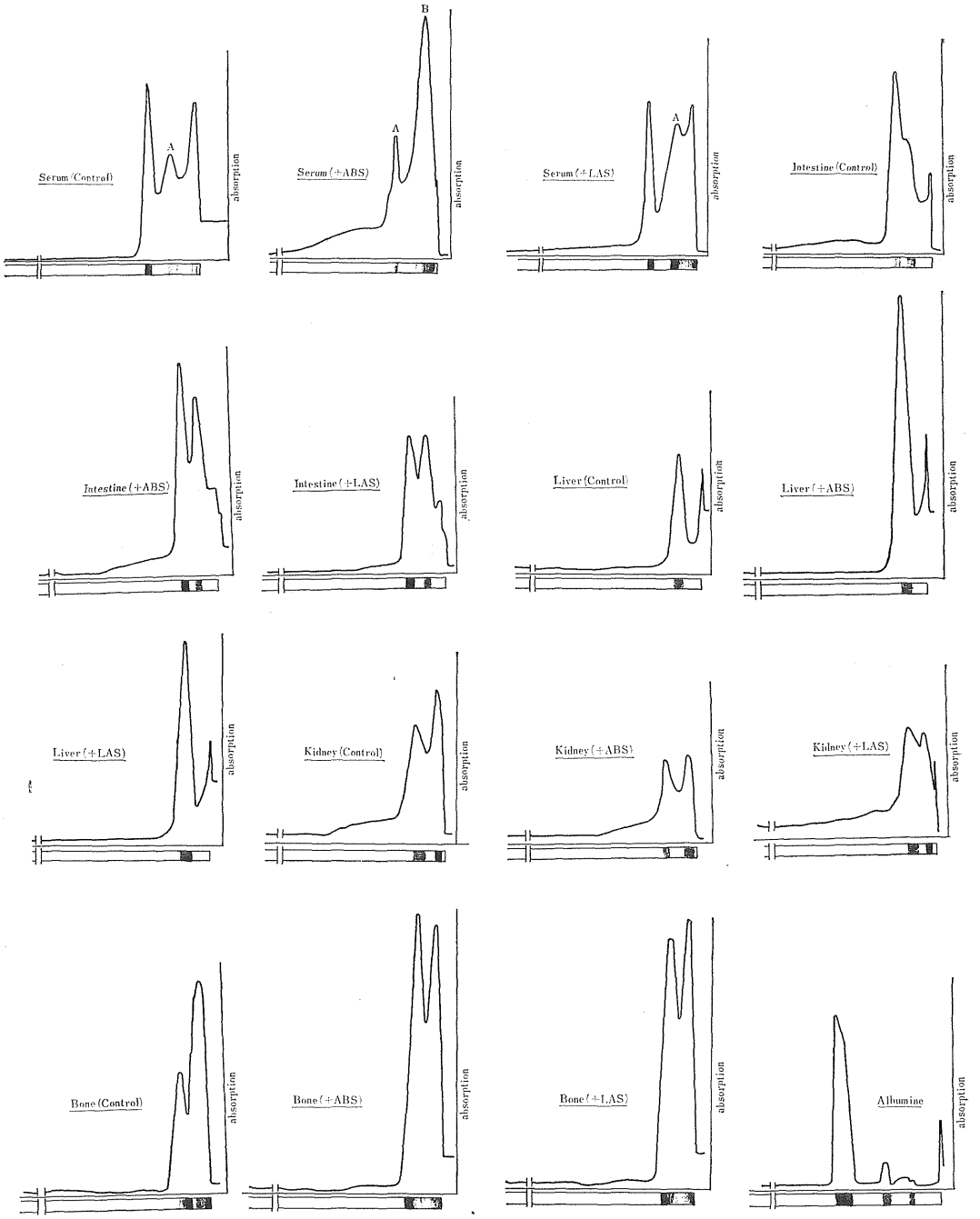


Fig. 2 Densitometry Pattern of Alkaline phosphatases isoenzymes in acrylamidegel which activity are stained with Fast Blue B. B. with the exception of Albumine staining with Coomassie Brilliant Blue. The position of peak A correspond to Intestine Alkaline phosphatase and peak B conespond to Kidney Alkaline phosphatase. At the bottom are shown a pattern of the stained acrylamide-gel.

合は小腸由来と考えられる．正常のラット血清中の酵素は小腸由来と考えられる．雌の場合も同様の結果が得られた．

考　察

血清アルカリフォスファターゼの分離にはデンプン，寒天電気泳動法等々が試みられている．われわれは0.2%SDS を含む7.5%ポリアクリルアミド電気泳動法により分離した結果，酵素活性も低下せず明瞭なバンドが得られた．アクリルアミドの終濃度7.5% が適当と考えられ，6.5% ではゲルの取り扱いが不便なことと酵素活性のバンドの広がりが不明瞭であった．正常血清アルカリフォスファターゼは肝，小腸，骨由来と一般に知られている．本実験でも小腸由来と考えられるバンドが存在し，各臓器の酵素も含めてその分子量は既知の蛋白をスタンダードにして計算すると約10万を最小としそれ以上のものである．LAS 投与血清におけるコントロール実験よりわずかに強い活性を持つバンドは小腸由来と考えられる．前報[2]にも報告したように LAS, ABS 投与による病理所見として絨毛部先端の融解と血管の拡張が見られた．LAS の界面活性剤作用によりアルカリフォスファターゼが小腸粘膜の細胞膜から遊離し Posen[4]等が述べているように胸管を通じて血液中に流出されると推定される．ABS 投与血清の腎由来と見かけ上考えられる酵素は前報に述べた ABS による病理組織上の腎障害の所見を裏づける実験結果である．SDS ディスクゲル電気泳動法による血清アルカリフォスファターゼの臓器由来は毒性研究の一つの指標として臓器における病変の検出に有効な手段と考えられる．現在，各臓器より抽出したアイソザイムにより免疫学的手法を用いて臓器酵素と血清パターンとの間の相関についてより正確な同定を進めている．

文　献

1) Johnson R. B. Clin Chem 18, 110—115 1972
2) 米山他　都立衛生研究所年報1974
3) Weber. K. Osbone. M. J.B.C 244, 16, 4406—4412 (1969)
4) Poson. S. Annals of Internal Medicine, 67, 183—203 (1967)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 659 — 662, 1974

ラットにおける断頭時放出する血液の凝固能について

柴　英子*

Coagulation Facility of Blood Collected by Beheading in Rats

HIDEKO SHIBA*

動物実験において動物を致死させる方法として麻酔，頭部の殴打，背椎脱臼，固定後股静脈あるいは頸静脈よりの脱血等が用いられるが，致死方法は，その実験目的によって考慮されなければならない．麻酔による場合は，医化学的，内分泌学的あるいは病理組織学的に大きい影響を与える場合がある．私どもは，ラットやマウスを致死させる場合，影響が比較的少ないと考えられ，また脱血もよく行なえる瞬時断頭法を好んで用いている．

断頭法による場合の問題点は，断頭時に血液を吸引するおそれがあること，甲状腺が断頭部位に接しており，採取に不便である等もあるが，一番は血液で，断頭時放出する血液を採取して利用するが，動静脈血の混合とさらに組織液が混ざるおそれがあることである．そこで，まず今回は，ラットにジクマロールを投与して断頭血液と頸静脈より採取した血液との血液凝固時間を比較する小実験を行なった．なお，この際，頸静脈血による凝固時間とプロトロンビン時間との関係も併せ観察した．

実験材料および実験方法

ラットは静岡県実験動物農業協同組合生育の Wistar-SLC 系および船橋農場生育の Wistar 系のそれぞれ雌を日齢，体重にかかわりなく合計52匹を用い，室温25±1°，湿度55～65%の飼育室で5匹ずつ同一ステンレス製金網ケージに収容し，飼料としては船橋農場製固型飼料FⅡを与え，水とともに自由摂取させた．

* 東京都立衛生研究所毒性部
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

ジクマロール (3,3′-methylene-bis (4-hydroxycoumarin)) は和光純薬製 Lot No. ACG 8431 を用いた．

ジクマロールは1%トラガント液にて0.8%懸濁液となるよう調整し，ラット当り，その 1 m*l* (8 mg) を胃ゾンデにて経口投与した．

ジクマロールのラットへの投与は1回乃至24時間間隔にて2から4回行ない，投与後直ちに，あるいは1から5日間後に採血した．

採血は，ラットを無麻酔下に背位に固定，両側頸静脈を露出，まず1側の静脈に胸筋鎖骨部を介して注射針をさし，凝固時間測定用の血液約 0.5 m*l* を採取し，次いで他側静脈より，予め $^{M}/_{10}$ クエン酸 Na 0.1 m*l* を入れた注射筒を用い，同様にしてプロトロンビン時間測定用血液 0.9m*l* 採取後直ちにラットの固定をとり鋏にて断頭，放出する血液を直接時計皿に約 0.2m*l* をとる方法をとった．この間の所要時間は約4分であった．

血液凝固時間の測定は Sahli-Fonio 法[1]により，外頸静脈血の場合は採血後直ちにストップウオッチを始動させると同時に血液を約10滴（約0.2 m*l*）時計皿にとり法に従って開始時間および完結時間を測定した．断頭血の場合は採取と同時にストップウオッチを始動させ，同様にして測定した．

プロトロンビン時間は Quick 1 段法[2]により測定し，プロトロンビン指数は

$$\frac{\text{標準血漿のプロトロンビン時間（秒）}}{\text{被検血漿のプロトロンビン時間（秒）}} \times 100$$

によって求めた．

実験結果と考按

ジクマロール投与1～2回のラットにおいては，ほ

Table I ジクマロール投与ラットにおける頸静脈血と断頭血との凝固時間および頸動脈血のプロトロンビン時間

ジクマロール[a] 投与回数	投与後日数	血液凝固時間（分） 頸静脈血 開始	頸静脈血 完結	断頭血 開始	断頭血 完結	頸静脈血プロトロンビン 時間（秒）	指数
数	日						
0	0	0.50	2.00	0.40	0.87	20	65.0
		0.92	4.00	0.97	1.87	15	86.7
		0.42	1.83	0.42	0.67	18	72.2
		0.82	6.50	0.70	2.10	30	53.3
		2.92	4.67	1.78	2.75	17	88.2
		0.75	4.42	1.72	2.75	40	37.5
		2.50	4.00	1.12	1.58	18	83.3
1	1	4.58	6.75	1.58	4.25	202	7.4
		4.17	7.67	1.75	3.67	60	26.7
		1.75	6.08	2.08	3.68	160	9.4
		4.42	5.75	1.58	3.68	65	23.1
	2	1.33	2.75	1.17	2.35	67	25.4
		3.33	6.42	0.75	2.27	28	60.7
		1.08	2.58	0.70	1.58	20	85.0
		2.42	4.42	1.35	2.42	22	77.3
		2.50	4.67	1.25	2.83	23	73.9
		2.75	4.50	0.95	1.83	22	77.3
	3	3.42	5.67	1.42	2.33	25	52.0
		0.67	3.42	0.78	1.97	19	68.4
		1.00	3.67	1.42	3.08	15	86.7
		0.75	3.17	0.67	1.17	15	86.7
		2.17	3.67	0.67	1.67	25	52.0
		1.00	4.00	0.58	0.77	20	65.0
2	0	3.17	5.58	3.25	4.67	355	4.2
		2.58	3.83	2.75	3.00	83	18.1
	1	3.92	6.08	1.58	4.07	520	3.3
		3.33	5.25	0.58	1.17	73	23.3
		4.08	6.92	1.75	3.05	100	17.0
		5.17	8.00	3.58	5.83	235	7.2
	2	1.50	6.25	1.18	2.95	54	24.1
		1.75	4.33	0.42	0.58	19	68.4
		∝	∝	3.37	7.85	∝	—
		6.08	11.17	6.45	10.52	115	11.3
		3.92	6.08	1.12	3.25	130	10.0
		13.17	16.67	6.62	9.17	215	6.1
		3.75	8.08	0.57	4.33	145	9.0
		3.83	6.83	1.30	2.77	103	12.6
		7.67	15.00	4.90	7.10	780	1.7
	3	1.17	4.75	0.67	1.58	17	76.5
		0.50	2.67	0.67	1.78	27	48.2
		4.25	5.42	1.53	3.32	20	65.0
		1.00	5.83	1.70	2.93	15	86.7
4	0	13.30	23.17	7.83	26.58	∝	—
	2	0.75	3.92	1.10	2.67	32	50.0
		4.17	∝	3.42	6.32	160	10.0
		5.23	14.75	4.33	8.12	175	9.1
	5	8.67	15.50	2.15	7.08	440	2.9
		14.25	∝	9.67	16.77	∝	—

a) 8 mg/rat/day p.o.

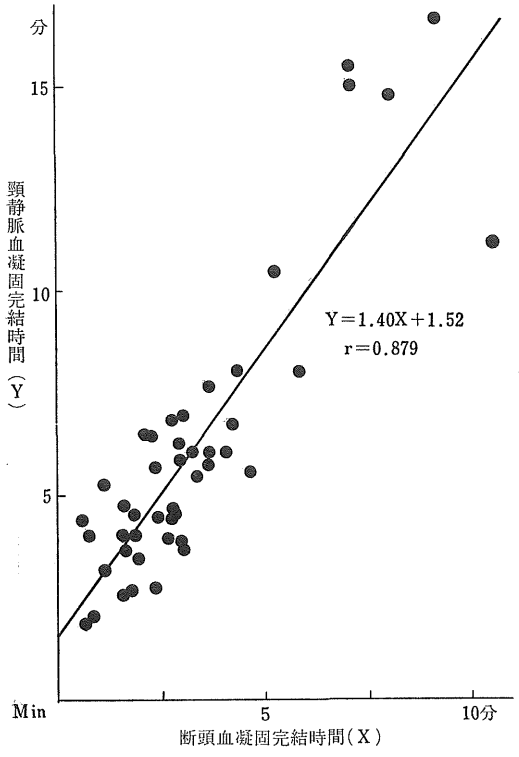


Fig. 1　ジクマロール投与ラットにおける頸静脈血と断頭血との凝固時間の関係

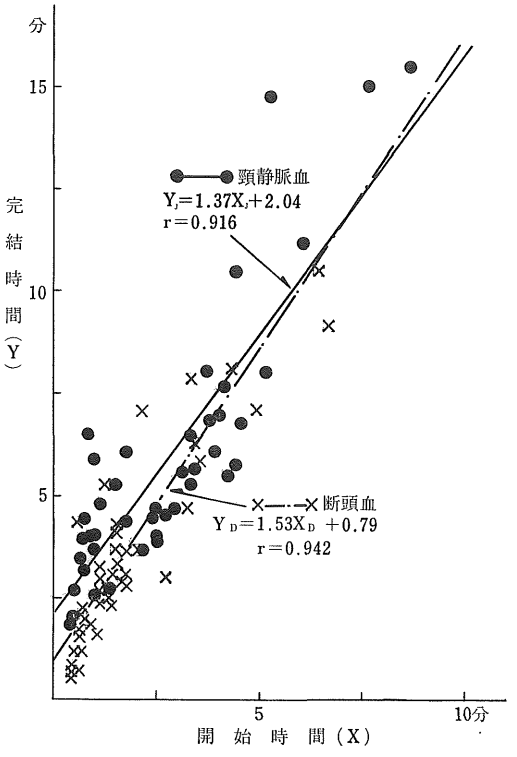


Fig. 2　ジクマロール投与ラットにおける頸静脈血および断頭血の凝固開始時間と完結時間との関係

とんど記すべき症状はみられなかったが，4回投与のものにおいては出血死するものもあった．結果は一括して Table Ⅰに示した．頸静脈血と断頭血の凝固時間を比較すると前者の開始時間0.42分から凝固しないもの（凝固した最高14.25分），完結時間1.83分から凝固しないもの（凝固した最高23.17分）まで，後者では開始時間が0.40分から9.67分，完結時間が0.58分から26.58分までの間に分布し，前者において凝固しなかったのに後者では開始3.37分で完結が7.85分にすぎなかったものや，逆に前者で完結が23.17分であったのに後者では26.58分と延長がみられる場合もあったが，全体的にみると頸静脈血より断頭血の方が凝固時間が早く，両者の関係をみると Fig. 1 のようになり，両者の変動間には一定の関連のあることが示された．

Y（頸静脈血の凝固時間）＝1.40X（断頭血の凝固時間）＋1.52，r（相関係数）＝0.879（$P < 0.01$）．さらに両者それぞれの開始時間と完結時間との相関をみると，頸静脈血では r（相関係数）＝0.916 で Y_J（完結時間）＝$1.37X_J$(開始時間)＋2.04 であり，断頭血では r＝0.942 で $Y_D = 1.53X_D + 0.79$ であり，いずれも開始時間と完結時間はよく関連することがわかり，さらに，両者の回帰線の勾配には有意差は認められなかった．このことからも両者の凝固時間の間には一定のを関数関係があり，断頭血をもって血液の凝固能の動態を知ることができると考えられた．（Fig. 2）

頸動脈血におけるプロトロンビン時間（指数）と凝固時間との関係は Fig. 3 に示すようであり，プロトロンビン指数が15（プロトロンビン時間として120秒前後）以下になると急激な凝固時間の延長が認められ，15以上では余り凝固時間の延長がみられないこと

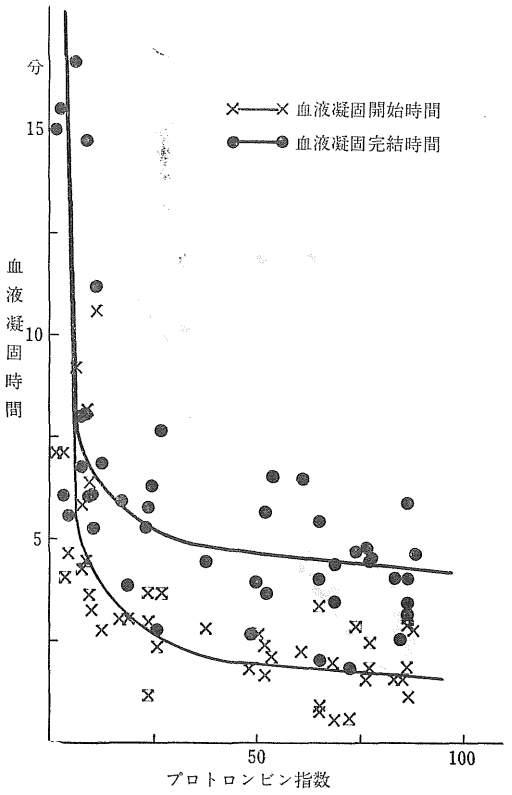


Fig. 3. ラットにおけるプロトロンビン時間（指数）と血液凝固時間との関係（頸静脈血）

がわかった．

ま と め

ラットを断頭致死せしめる際放出する血液を利用して血液の凝固能の動態を知ることができるかを検討する目的で，ジクマロール投与ラットについて断頭血の凝固時間を頸静脈血のそれと比較し，併せて頸静脈血のプロトロンビン時間（指数）と凝固時間との関係をみた．

1. 断頭血と頸静脈血との凝固時間には一定の関数関係が認められた．このことより断頭血により血液凝固能の動態を知ることができると考えた．

2. プロトロンビン時間の延長と血液凝固時間の延長との間には直線的関係は認められず，プロトロンビン指数として15前後までは著明な血液凝固時間の延長はみられず，15以下で急激な延長がみられた．

文 献

1) 金井泉，金井正光：臨床検査法提要，25, VI 80—81 (1970)，金原出版㈱，東京
2) Quick, A. J., Stanley-Brown, M. and Bancroft F. W : *Am. J. Med. Sci.*, 190, 501—511 (1935)
3) Quick, A. J. : *Am. J. Physiol.*, 118, 260—271 (1937)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 663 — 667, 1974

高級アルコール系洗剤の毒性について（I）
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の急性毒性

小林博義* 吉田誠二* 平賀興吾*

Studies on the Toxicity of the Higher Alcoholic Detergents (I)
Acute Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate

HIROYOSHI KOBAYASHI*, SEIJI YOSHIDA* AND KOGO HIRAGA*

Oral acute toxicites of sodium dodecyl sulfate were examined in rats, and following results were obtained.

1) The main symtom observed was diarrhea, the death times were within 27 hours, and the sympoms and body weights were recordered soon in the survival ones.

2) Increase in weights of adrenal and thymus., and dcrease in weights ovary and utelus in rats survived for 23 days after treated were observed.

3) LD_{50} values of sodium dodecyl sulfate in male and female were 640 mg/kg together, and solope function (by Litchfield and Wilcoxson) was 1. 11.

4) Degree of oral acute toxicity of sodium dodecyl sulfate, was same as linear alkylbenzene sulfonate, it was slightly toxic fowlloing the classification by Hodge. *et al.*

先に，家庭用洗剤の主剤として使用されてきた分岐形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（ABS）と直鎖形アルキルベンゼンスルフォン酸ナトリウム（LAS）の急性毒性について詳細を報告した[1]．今回は，これに引続き，同じく陰イオン性界面活性剤で，高級アルコール系洗剤の一つであるドデシル硫酸ナトリウムをとりあげ，その経口急性毒性を観察した．

試験材料ならびに試験方法

1. 試料：ドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulfate, 以下 SDS と略す）は E. Meck 社製 Lot. No. 3949586（SDS 98%, Na_2SO_4 0.5%, NaCl 0.1%, H_2O 1%）を用いた．

2. 試験動物：ラットは静岡実験動物農業協同組合の SLC-Wistar 系雌雄を購入，温度25±1°，湿度55±5%の環境下で5匹ずつ金網ケージに収容，日本クレア固型飼料CE-2 と水道水を自由に与えて飼育した12週齢のものを試験に供した．

3. 試験方法：SDS の濃度段階は，予備試験で 50%致死量が600～700 mg/kg と推定されたので，公比を1.15にとり 400 mg/kg から 925 mg/kg までに設定し，それぞれの投与容量が 10 ml/kg となるよう精製水に溶解調整した．投与は胃ゾンデによる経口投与とし，動物は雌雄とも1用量当り（群）10匹を用いた．試験は，前日午後5時より動物を絶食せしめ，水のみ与えて午前10時より開始した．試料投与終了後2時間目より餌を与え，2週間にわたって症状を観察し，この間の死亡率より50%致死量（LD_{50}）をLichfield-Wilcoxon 法[2]に従って算出した．529, 699および925 mg/kg 投与各群ラットの5匹については，試料投与後24時間まで6時間毎に体重を測定した．群中に死亡例のなかった 529 mg/kg 投与群については，

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

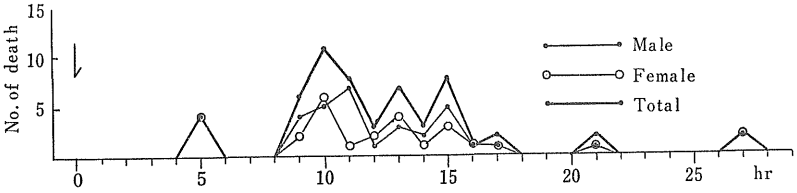


Fig. 1 Distribution of Death After SDS Administration

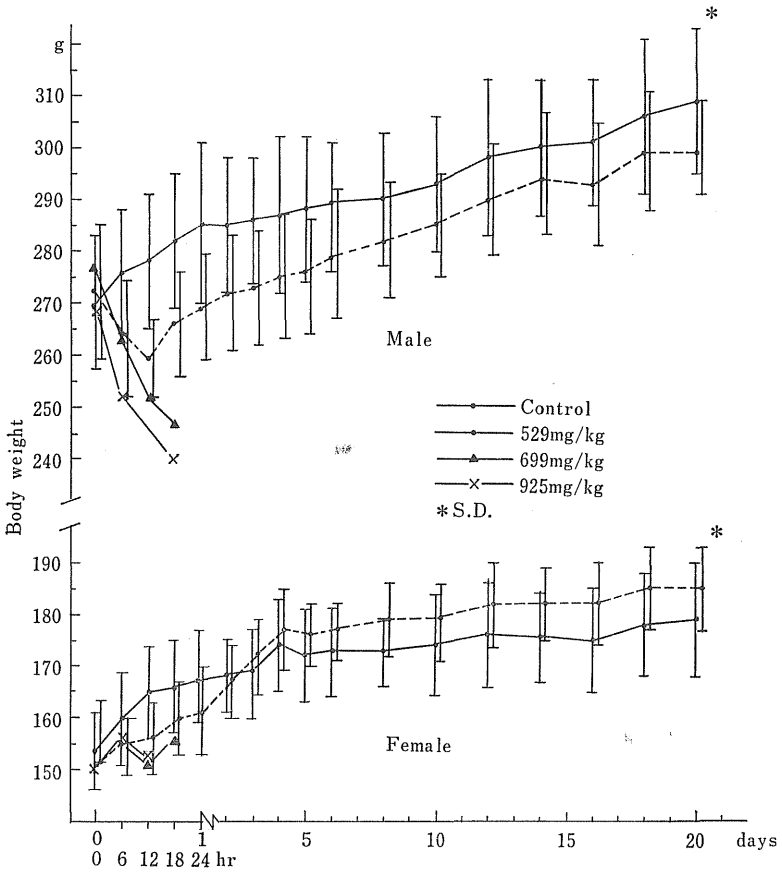


Fig. 2 Changes of Body Weight of Survival Rats Administered Orally with SDS

その後20日間毎日1回体重を測定し，23日目に剖検，主要臓器の重量を測定した．

試験結果

1. **症状**：観察された主症状はゼラチン様の粘液のまざった下痢で，高濃度投（925 mg/kg）与群では約時1間後より立毛，下痢が認められ，2時間目頃より下痢はゼラチン様の粘液となった．他の濃度群においても同様であったが，濃度が低くなるに従って，その程度も軽くなり，529 mg/kg投与群では7～8時間で軟便ながらも糞の形を整えてきた．また，529 mg/kg投与群では3時間頃より摂餌するものがみられ，925 mg/kg 投与群では6時間頃より摂餌様行動を示すものがみられた．一般に，蹲まり，鎮静的であったが，行動の場合はガマ様の歩行であり，6時間目頃一見行動に回復の兆がみられたが，多くの死亡が，その後9時間から15時間の間に体温の下降と，ときに痙攣を伴って観察された．なお，投与後の時間経過と死亡数の関係は Fig. 1 に示す通りで，雌では4時間，雄では9間時目より死亡が始り，最終は雌27時間，雄21時間であった．最多死亡9時間は前述の通り9時間から15時間であった．死亡を免かれたものは24時間以降対照と大差のない行動がみられた．

Table I Organ Weights of Rats After 23 days Administed Orally with SDS

Sex	SDS mg/kg	No. of Rats	Heart mg	Liver g	Kidney(R) mg	Spleen mg	Thymus mg	Suprarenal Gland mg		Testis or Ovary mg		Uterus mg
								R	L	R	L	
Male	0 (Control)	5	807±22(a) 257± 8(b)	9.93±0.21 3.16±0.06	1131±62 357±23	605±27 193±10	161±20 51± 6	15.0±0.7 4.8±0.2	17.6±1.7 5.6±0.6	1525±38 486±14	1582±32 504± 6	—
	529	5	794±13 263± 5	10.1±0.25 3.34±0.07	1082±35 359±13	600±13 199± 5	212±17 70± 5*	15.6±1.2 5.1±0.3	21.8±1.5 7.2±0.3*	1469±74 488±32	1608±19 534±15	—
Female	0 (Control)	5	558±13 318±13	5.21±0.14 2.97±0.14	703±28 402±24	421±12 240±11	201± 9 115± 8	13.8±1.5 7.6±0.8	17.0±1.3 10.1±0.4	56.8±9.3 32.2±4.9	48.6±2.5 27.6±1.2	500±84 286±51
	529	5	536±15 291±13	5.02±0.14 2.73±0.11	684±35 370±21	377±16 204±11	230±13 125± 8	18.8±0.9 10.2±0.5*	20.6±1.4 11.2±0.8	43.0±4.0 23.4±2.6	43.4±1.4 23.5±1.2	318±24 172±13

a) mean organ weight・S.E. * $p < 0.05$

b) mean organ weight to 100 g body wt. ±S.E.

Table Ⅱ Acute Toxicity (LD_{50}) of Sodium Dodecyl Sulfate in Rats

Sex	B. W±SD g	Dead time (hr)			slope function	LD_{50} (p.o.) mg/kg	Confidence limits (p=0.05) mg/kg
		onset	peak	end			
Male	269.7±17.3	9	9—15	21	1.11	640	606～675
Female	178.6±18.9	4	9—15	27	1.11	640	606～675

a) SLC-Wistar Rats, age : 12 weeks

体重は，Fig. 2 に示すように投与後12時間まで減少し，以降回復の傾向を示した．529 mg/kg 投与群で，特に雌では3日目以降対照群の発育とほとんど同等あるいは以上の値を示した．

2. **剖検**：死亡例は，肝臓，腎臓，胃（腺胃部），盲腸が暗赤色を示し，小腸は透明感があった他は著明な変化はみられなかった．

529 mg/kg 投与群で23日目に屠殺し剖検したものでは特に異常所見はなく，臓器重量は Table Ⅰ に示すようで，心臓，肝臓，腎臓および脾臓では対照群のそれと比較して差を認めなかったが，副腎および胸腺の増加と卵巣および子宮の減少乃至減少傾向がみられ，内分泌腺への影響が暗示された．

3. **50%致死量（LD_{50}）**：Table Ⅱ に示すように，雌雄とも640 mg/kg であった．

総括と考察

合成洗剤の毒性に関する研究の一環として，分岐形および直鎖形アルキルベンゼンスルフォネート(ABS, LAS) に引きつづきドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の経口急性毒性をラットについて観察した．

SDS のラットにおける経口急性毒性については古く Smyth (1941)[3]および Woodard (1945)[4] の報告があり，その LD_{50} はそれぞれ 2.730 mg/kg，1,000 mg/kg と記載されている．今回得た LD_{50} 値は雌雄とも 640 mg/kg であった．

LD_{50}値により急性毒性の強弱を判定するに当って常に留意することは，LD_{50}値は試験動物の種，系統，年齢，体重，飼育環境，試験手技等種々の因子により変動が大きいということで，このことの一部についてはABS, LAS の研究の際報告したところであり，今回得た値と文献値とには本質的差はないと考えており，Hodge ら[5]のラットの LD_{50}（経口）値からヒトへの毒性を推定する毒性の強さの分類によると毒性小(slightly toxic：ヒト推定致死量 30～250 g) の 500～5,000 mg/kg の範囲にいずれも入っている．

SDS 経口投与による主症状はゼラチン様物を混じえた下痢で，その他は立毛，蹲り，ガマ様歩等がみられた．体重は投与後減少したが，18時間以降回復に向かった．死亡の多くは9時間から15時間の間にみられ，最後の死亡は27時間目で，以降の生存例の症状の回復は早やかった．

以上のことおよび用量—死亡率曲線の勾配（slope function）も急であった点より SDS の代謝は早やく，作用持続は短いように考えられた．しかしながら，全例死を免れた最高用量 529 mg/kg 投与群の23日目に行なった剖検，臓器重量測定において，心臓，肝臓，腎臓，脾臓は対照と差を認めなかったが，副腎びお胸腺の増大と卵巣および子宮の減少あるいはその傾向がみられ，内分泌腺臓器への影響の持続乃至残存がうかがわれた．SDS が，投与初期の全身的作用により非特異的に副腎の機能亢進を来たし，性腺機能を抑制することは十分考えられ，その結果が臓器重量に反映しているように思われるが，今後の検討にまちたい．

以上の SDS の急性毒性を，ほぼ同一条件で行なったアルキルベンゼンスルフォネート（LAS）の急性[1]毒性と比較してみると，症状，用量致死率曲線の勾配，LD_{50}値等にほとんど相異なく，連続投与試験では量的に LAS より毒性が低いようであるが[6]，急性毒性については量的に，また質的にも余り差がないように考えられる．

要　旨

ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の1回経口投与による急性毒性をラットについて検討した．

1. 主症状は下痢で，死亡は27時間以内にみられ，生存ラットでは症状，体重減少の回復が早やかった．

2. 処置後23日の生存ラットで，副腎および胸腺重量の増大と卵巣および子宮重量の減少乃至その傾向を認めた．

3. 50%致死量は雌雄とも 640 mg/kg, slope fun-

tion (Lichifield-Wilcoxson) は 1.11 であった.

4. 以上の成績にもとづき2, 3の考察を行ない, SDS の急性経口毒性は, アルキルベンゼンスルフォネート (LAS) とほぼ同じで, Hodge らの分類に従って毒性の程度は小 (slightly toxic) と考えた.

文 献

1) 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：都衛研年報, 24, 397—408 (1972)

2) Lichifield, J. J., Jr and Wilcoxson, F. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 23, 478-483 (1941)

3) Smyth, H. F., Jr. Seaton, J. and Fischer, L. : *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 23, 478—483(1941)

4) Woodard, G. and Calvery, H. O. : *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assn.*, 3, 1—4 (1945) (油化学, 11, 138—150 (1967) より引用)

5) Hodge, H. and Sterner, J.H. : *Toxicology of Drus and Chemicals*, by Deichman and Gerade (1969), Academic Press, New York

6) 大石真之, 高橋省, 益渕正典, 福田向江, 神谷信行, 吉田誠二, 三栗谷久敏, 湯沢勝広, 平賀興吾：都衛研年報, 投稿中

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 669 — 675 1974

高級アルコール系洗剤の毒性について (II)
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の亜急性毒性

大石真之* 高橋 省* 益渕正典*
福田向江* 神谷信行* 吉田誠二*
三栗谷久敏* 湯沢勝広* 平賀興吾*

On the Toxicity of the Higher Alcoholic Detergents (II)
Subacute Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate

SHINSHI OISHI*, OSAMU TAKAHASHI*, MASANORI MASUBUCHI*,
HISAE FUKUDA*, NOBUYUKI KAMIYA*, SEIJI YOSHIDA*,
HISATOSHI MIKURIYA*, KATSUHIRO YUZAWA*, AND
KOGO HIRAGA*

家庭用洗剤として使用されてきたアルキルベンゼンスルホン酸塩 (ABS), 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) 等の安全性あるいは, 生分解性[2-3]に疑問がいだかれ, さらに, その催奇形性[4-5]が報告されるとともに, 高級アルコール系洗剤が ABS, LAS にかわって普及しはじめた. 現在使用されている高級アルコール系洗剤の主要基剤であるドデシル硫酸ナトリウムは, 古くよりハミガキ用として使用されておりその安全性についてもいくつか報告されている[6-7]. しかしながら高級アルコール系洗剤の普及とともに, その安全性を疑わせるデータも報告され[8], 早急にその再検討がせまられている. そこで, 今回, われわれは, 高級アルコール系洗剤の主要基剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用い, その毒性の検討を行なった.

実験材料および実験方法

1. 実験動物：Wistar-JCL 系ラットを用い, 実験開始1週間前より体重増加, 一般症状を観察し, 特に異常を認めないラットを実験に供した. 実験開始時の平均体重は, 雄125g, 雌108g (雌雄とも生後5週齢) であった. 飼育条件は, SPF 室内 (室温25°, 湿度55%—60%) で, 1ケージに各1匹ずつ入れて飼育した.

2. 試料：実験に用いたSDSは, E. Merck社 Lot. No. 3949586 (SDS 98%, Na_2SO_4 0.5%, NaCl 0.1%, H_2O 0.1%) を用いた.

3. 投与方法および投与期間：実験には, 日本クレア製飼料 (CE-2, Lot. No. 3740418) を用いた. その組成は, 粗蛋白質24.0%, 粗脂肪3.5%, 粗繊維4.5%, 粗灰分6.0%, 可溶性無窒素物56.0%, Ca 1g/100g, P 1g/100g, Mg 0.23g/100g, Na 0.40g/100g, K 0.63g/100gである. この飼料に SDS を, 0.5%, 1.0%, 2.0%加え, 固型飼料とし, ラットに自由摂取させた. また飲水も自由に行なわせた. 投与期間は, 2週間, 4週間の2組に分け, さらに各添加量および対照群に雌雄各5匹ずつを用いた.

4. 検査方法

(i) ラットは断頭採血後, 解剖を行ない, 肉眼的観察を行なった.

(ii) 臓器重量：脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肺, 心臓, 肝臓, 胃, 脾臓, 副腎, 腎臓, 前立腺, 睾丸, 卵巣, 子宮, 盲腸の重量を秤量し, 組織標本を作製した.

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

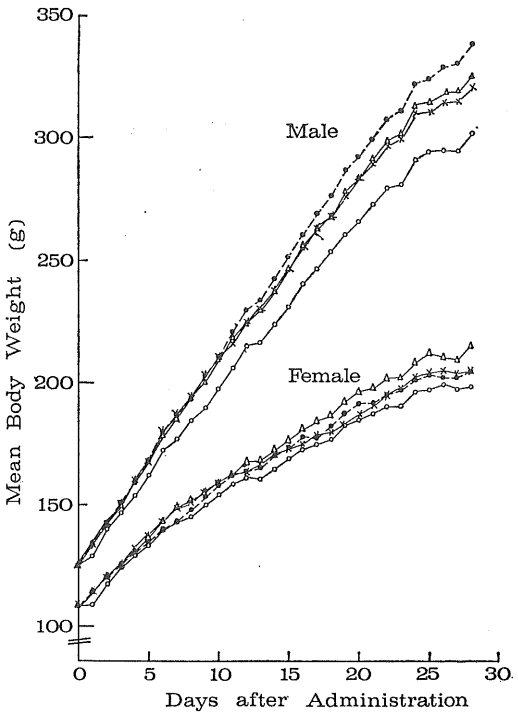


Fig. 1. Changes in the mean body weights of male and female rats after administration of SDS. •——• Control; △——△ 0.5%SDS; ×——× 1.0% SDS; ○——○ 2.0%% SDS

(iii) 血液学的検査：血液は，Coulter Counter Model S により次の項目について測定を行なった．白血球数 (WBC)，赤血球数 (RBC)，血色素濃度 (HGB)，ヘマトクリット(HCT)，平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)，平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)．血液凝固時間は，Sahli-Fonino 法によって測定した．

(iv) 血液生化学的検査：血清は，日立自動分析機M400により，次の項目につき測定を行なった．総タンパク量 (TP，ビュレット法)，グルコース (GLU，グルコースオキシダーゼ法)，尿素窒素 (UN，ウレアーゼインドフェノール法)，コレステロール (CHO，Lieberman-Burchard 法)，グルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素 (GPT，Reitman-Frankel 変法)，グルタミン酸オキザロ酢酸アミノ基転移酵素 (GOT，Reitman-Frankel 変法)，アルカリ性ホスファターゼ (ALP，Kind-King 変法)，コリンエステラーゼ (ChE，△pH法)．

実験結果はすべて，Student's t-test により推計学的に処理した．

実験結果および考察

1. 一般症状：雌雄とも，0.5%，1.0%，2%の各投与群で，対照群に比して，特に異常と思われる一般症状は全く現われなかった．SDS のラットにおけるLD50 値は，ABS，LAS とほぼ同程度とされている[9-10]．ABS，LAS を0.6%以上含む飼料をラットに摂取させた場合，下痢症状を呈することが知られているが[11]，SDS では，2%投与群においても下痢症状は現われなかった．

2. 体重および飼料摂取量：体重および飼料摂取量は Fig. 1 および Table 1 に示すとおりである．2%投与群の雄では，有意に体重の減少が認められた．雌では，逆に0.5% 投与群で体重増加がみられた．この雌にみられた低濃度投与の際の体重増加傾向は，ABS，LAS でも得られている．また，家禽類の成長促進，飼料利用率の向上を計るため，飼料中に界面活性剤を添加している例もある[2-3]．しかし体重増加が，界面活性剤による飼料の吸収増加作用によるのがどうかは不明である．飼料摂取量は，1週，2週，3週，4週とも，各投与群で有意な差は認められなかった．

Table 1. Body weight, its ratio to initial, food and sample consumption on rats after administration of SDS for 2 and 4 weeks

Group		Initial	2 weeks	4 weeks		
		B.W. (g)	B.W. (g)	B.W. (g)	Food Consumption (g/day)	Sample Consumption (mg/kg B.W./day)
Male	Control	125.4±3.7[a] (100)[b]	233.6±17.8 (186)	338.8±13.6 (270)	23.98	0
	0.5%	125.4±3.4 (100)	239.8±5.1 (191)	325.4±14.8 (259)	23.14	381
	1.0%	125.6±3.8 (100)	235.8±9.7 (188)	320.6±13.1 (255)	23.08	769
	2.0%	125.8±4.2 (100)	236.6±9.1 (188)	302.0±19.1** (240)	23.23	1,503
Female	Control	108.4±3.8 (100)	174.3±12.3 (161)	204.4±12.5 (189)	15.20	0
	0.5%	108.6±3.8 (100)	172.4±6.1 (159)	215.0±3.8 (198)	16.06	395
	1.0%	108.6±3.9 (100)	169.8±9.6 (156)	204.6±9.1 (188)	15.53	754
	2.0%	108.6±5.0 (100)	167.4±8.5 (154)	198.4±16.6 (183)	16.12	1,704

a : values are mean±SD. b : ratio to initial body weight
** significantly different from contro $p < 0.01$

3. 剖検所見：雌雄各投与群とも，対照群と比べ，特に異常と思われる所見は見られなかった．

4. 臓器重量：各臓器の絶対重量および体重 100 g 比重量は Table 2, 3 に示すとおりである．

甲状腺は2週間目で，雌雄とも，体重比量重で，2%投与群が有意に増加し，また，雌では0.5% 投与群においても有意な増加が認められたが，4週間目では，いずれも有意な差は認められなかった．

胸腺は，2%投与群の雄で，4週間目に，絶対重量，体重比重量において，有意な減少がみられた．

脾臓は，1%投与群の雌で，4週間目に絶対重量および体重比重量で，有意に減少がみられた．

前立腺は，2週間目の0.5%投与群，2%投与群で，体重比重量において有意差がみられた．さらに，0.5%投与群は絶対重量においても有意差が認められた．

肝臓は，2週間目で，雌雄とも，2%投与群で絶対重量，体重比重量のいずれにおいても，有意な増加が認められたが，4週間目の雄においては，差は認められなかった．雌においては，4週間目では，0.5%，1%，2%の各投与群に有意な差がみられた．

腎臓は，2週間目の雌で，1%および2%投与群に体重比重量で有意な増加がみられ，また，4週間目では，絶対重量で，0.5%および2%，体重比重量では，0.5%，1%，2%の各投与群に，有意な増加が認められた．雄においては，いずれも有意な差はみとめられなかった．

脳，下垂体，肺，心臓，胃，副腎，睾丸，卵巣，子宮，の各臓器では，各投与群とも，2週間目，4週間目のいずれにおいても有意差は認められなかった．特に LAS, ABS で顕著であった盲腸の増加はみられなかった[11]．

5. 血液学的検査 (Table 4)：WBC は，雄において2週間目の0.5% 投与群で有意な下降がみられ，4週間目では，1%投与群に有意な下降がみられたが，雌ではいずれも有意な差は認められなかった．RBC は2週間目で，2%投与群の雌に有意に減少がみられた．HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC はいずれも対照群に比して，有意差を認めなかった．

Table 2. Absolute and relative organ weights in male rats on oral administration of SDS for 2 and 4 weeks

	Organ	2 weeks				4 weeks			
		Control	0.5%	1.0%	2.0%	Control	0.5%	1.0%	2.0%
Absolute organ weights	Brain (g)	1.87±0.16	1.91±0.16	1.95±0.11	1.83±0.15	1.94±0.09	1.92±0.13	1.92±0.05	1.91±0.18
	Hypophysis (mg)	8.8±0.5	7.8±2.2	8.3±2.6	8.8±2.4	8.42±2.37	9.25±1.46	9.50±1.56	9.64±0.88
	Thyroid (mg)	12.3±4.3	18.0±8.5	23.6±5.0	24.0±1.6	21.2±3.7	21.6±3.3	22.7±1.7	21.3±3.3
	Thymus (g)	0.99±0.16	0.93±0.10	0.87±0.12	0.84±0.11	0.78±0.12	0.84±0.14	0.85±0.18	0.60±0.08*
	Lung (g)	1.42±0.22	1.31±0.10	1.40±0.20	1.26±0.18	1.38±0.13	1.32±0.10	1.37±0.04	1.23±0.13
	Heart (g)	0.95±0.08	0.95±0.12	0.87±0.10	0.95±0.06	1.05±0.04	1.05±0.04	1.06±0.06	0.99±0.09
	Liver (g)	11.7±1.8	12.7±0.9	12.6±0.9	14.6±0.4**	15.5±0.6	14.8±1.4	14.7±1.6	14.9±1.6
	Stomach (g)	1.44±0.18	1.49±0.09	1.41±0.17	1.39±0.18	1.49±0.07	1.39±0.14	1.37±0.06	1.35±0.13
	Spleen (g)	0.72±0.09	0.74±0.11	0.71±0.09	0.72±0.07	0.73±0.08	0.76±0.05	0.68±0.08	0.62±0.03
	Adrenal-R (mg)	20.8±4.7	18.0±2.9	23.4±5.5	25.8±4.6	25.1±2.1	21.6±7.1	22.6±4.8	24.7±4.4
	-L (mg)	22.2±3.5	23.3±3.8	23.4±5.0	19.3±4.6	19.8±5.4	21.2±5.9	22.0±8.0	20.7±9.5
	Kidney-R (g)	1.15±0.13	1.16±0.07	1.13±0.10	1.30±0.24	1.45±0.09	1.34±0.14	1.38±0.10	1.28±0.15
	-L (g)	1.28±0.40	1.19±0.12	1.10±0.10	1.21±0.14	1.43±0.10	1.31±0.10	1.36±0.08	1.27±0.14
	Cecum (g)	1.22±0.32	1.29±0.14	1.09±0.17	1.01±0.12	1.16±0.11	1.08±0.06	1.09±0.10	0.94±0.09
	Prostate (mg)	151±23	102±33*	137±34	129±15	246±44	248±27	235±99	275±60
	Testis-R (g)	1.15±0.08	1.13±0.05	1.12±0.04	1.19±0.12	1.62±0.05	1.53±0.05	1.52±0.12	1.56±0.10
	-L (g)	1.20±0.05	1.15±0.05	1.16±0.06	1.22±0.11	1.63±0.08	1.59±0.05	1.58±0.08	1.60±0.14
Relative organ weights	Brain (g/100 g B.W.)	0.80±0.10	0.80±0.07	0.83±0.02	0.78±0.08	0.59±0.02	0.59±0.06	0.60±0.02	0.63±0.04
	Hypophysis (mg/100g B.W.)	3.8±0.4	3.2±0.9	3.5±0.9	3.7±0.9	2.48±0.74	2.86±0.55	2.94±0.45	3.21±0.28
	Thyroid (mg/100g B.W.)	7.45±2.03	7.39±3.23	9.98±1.89	10.3±0.53*	6.27±1.16	6.39±1.21	7.12±0.31	7.12±1.43
	Thymus (g/100g B.W.)	0.42±0.05	0.39±0.04	0.37±0.04	0.36±0.05	0.23±0.03	0.26±0.04	0.27±0.05	0.19±0.02**
	Lung (g/100g B.W.)	0.61±0.14	0.54±0.03	0.60±0.07	0.53±0.06	0.41±0.03	0.40±0.02	0.43±0.02	0.39±0.05
	Heart (g/100g B.W.)	0.40±0.08	0.40±0.05	0.38±0.03	0.40±0.01	0.32±0.02	0.32±0.02	0.33±0.01	0.32±0.02
	Liver (g/100g B.W.)	4.98±0.44	5.28±0.30	5.36±0.18	6.16±0.11***	4.58±0.24	4.54±0.24	4.58±0.30	4.71±0.30
	Stomach (g/100g B.W.)	0.62±0.04	0.62±0.03	0.60±0.05	0.59±0.06	0.44±0.03	0.43±0.04	0.43±0.02	0.45±0.04
	Spleen (g/100g B.W.)	0.31±0.02	0.31±0.04	0.30±0.03	0.30±0.03	0.22±0.02	0.23±0.02	0.21±0.02	0.20±0.02
	Adrenal-R (mg/100g B.W.)	8.90±1.81	7.50±1.20	9.92±2.24	11.0±2.18	7.44±0.89	6.66±2.25	7.06±1.59	8.26±1.68
	-L (mg/100g B.W.)	9.63±2.20	9.66±1.55	9.90±1.90	8.22±2.13	5.86±1.57	6.53±1.90	6.87±2.58	6.90±3.21
	Kidney-R (g/100g B.W.)	0.59±0.03	0.48±0.03	0.48±0.03	0.55±0.08	0.43±0.04	0.41±0.04	0.43±0.02	0.40±0.03
	-L (g/100g B.W.)	0.46±0.01	0.49±0.05	0.47±0.02	0.51±0.04	0.42±0.04	0.40±0.03	0.43±0.02	0.40±0.04
	Cecum (g/100g B.W.)	0.49±0.11	0.54±0.05	0.46±0.06	0.43±0.05	0.34±0.03	0.33±0.02	0.34±0.02	0.31±0.04
	Prostate (mg/100g B.W.)	64.7±6.9	42.5±13.7*	57.9±14.4	54.2±4.4*	73.0±14.7	75.3±8.3	73.4±30.7	91.5±19.1
	Testis-R (g/100g B.W.)	0.49±0.05	0.50±0.02	0.48±0.03	0.50±0.03	0.48±0.02	0.48±0.03	0.47±0.03	0.52±0.05
	-L (g/100g B.W.)	0.52±0.04	0.48±0.02	0.49±0.04	0.52±0.03	0.48±0.03	0.49±0.03	0.49±0.02	0.53±0.05

Values are the mean ± SD. * Significantly differnt from control $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Table 3. Absolute and relative organ weights in female rats on oral administration of SDS for 2 and 4 weeks

	Organ	2 weeks				4 weeks			
		Control	0.5%	1.0%	2.0%	Control	0.5%	1.0%	2.0%
Absolute organ weights	Brain (g)	1.83±0.06	1.75±0.15	1.77±0.06	1.66±0.28	1.84±0.12	1.85±0.11	1.81±0.07	1.84±0.08
	Hypophysis (mg)	6.5±2.1	6.8±1.9	6.8±1.7	9.3±1.1	9.60±1.04	9.88±1.61	8.46±1.07	8.26±1.38
	Thyroid (mg)	13.0±1.4	17.0±0.0	16.0±2.4	16.6±2.2*	16.8±4.3	15.1±2.9	17.3±1.0	19.9±1.9
	Thymus (g)	0.73±0.09	0.65±0.18	0.63±0.09	0.58±0.13	0.53±0.07	0.60±0.11	0.49±0.11	0.56±0.14
	Lung (g)	1.08±0.30	1.09±0.27	1.11±0.18	1.02±0.09	0.99±0.14	1.13±0.11	1.07±0.08	1.05±0.14
	Heart (g)	0.68±0.07	0.68±0.07	0.67±0.05	0.64±0.04	0.73±0.06	0.77±0.04	0.70±0.06	0.72±0.04
	Liver (g)	8.38±1.13	8.80±0.85	9.27±1.34	10.2±0.41**	7.93±0.81	9.18±0.35*	9.29±0.55*	10.3±1.40*
	Stomach (g)	1.09±0.04	1.14±0.11	1.06±0.12	1.06±0.04	1.09±0.08	1.08±0.12	1.07±0.05	1.08±0.07
	Spleen (g)	0.48±0.08	0.49±0.08	0.50±0.11	0.54±0.14	0.54±0.06	0.52±0.05	0.41±0.06*	0.51±0.04
	Adrenal-R (mg)	23.0±3.6	21.6±8.3	20.8±3.3	18.6±4.3	28.8±6.7	21.8±4.9	28.2±7.1	23.4±6.5
	-L (mg)	26.0±4.3	20.6±3.9	18.8±7.7	19.2±5.8	29.2±5.0	31.5±2.2	26.8±8.0	25.8±7.6
	Kidney-R (g)	0.84±0.08	0.86±0.10	0.98±0.20	0.86±0.08	0.83±0.07	0.90±0.06	0.88±0.06	0.88±0.05*
	-L (g)	0.83±0.09	0.80±0.05	0.90±0.07	0.85±0.07	0.81±0.07	0.92±0.03*	0.91±0.07	0.92±0.04*
	Cecum (g)	0.75±0.12	0.82±0.08	0.75±0.10	0.78±0.07	0.82±0.17	0.79±0.13	0.73±0.18	0.73±0.09
	Ovary-R (mg)	42.8±10.2	39.0±7.9	46.2±7.0	40.2±12.2	44.3±9.2	40.8±9.5	44.1±10.4	42.9±5.4
	-L (mg)	39.5±10.7	37.6±11.8	42.0±7.5	41.8±12.0	40.7±9.5	36.7±5.8	37.4±5.6	44.0±2.3
	Uterus (g)	0.38±0.11	0.38±0.14	0.31±0.09	0.36±0.09	0.40±0.08	0.44±0.11	0.35±0.03	0.40±0.12
Relative organ weights	Brain (g/100 g B.W.)	1.05±0.08	1.01±0.08	1.04±0.06	0.99±0.17	0.90±0.01	0.86±0.06	0.89±0.07	0.93±0.08
	Hypophysis (mg/100g B.W.)	3.6±0.9	4.0±1.1	4.0±1.2	5.5±1.5	4.72±0.62	4.60±0.73	4.15±0.65	4.17±0.71
	Thyroid (mg/100g B.W.)	7.20±1.26	9.64±0.42*	9.45±1.19	9.66±0.97*	8.31±1.27	6.98±1.40	8.46±0.32	10.3±0.30
	Thymus (g/100 g B.W.)	0.37±0.07	0.38±0.10	0.37±0.05	0.34±0.08	0.26±0.03	0.28±0.05	0.24±0.05	0.28±0.06
	Lung (g/100g B.W.)	0.61±0.13	0.63±0.16	0.66±0.13	0.61±0.04	0.49±0.08	0.53±0.06	0.52±0.05	0.53±0.10
	Heart (g/100g B.W.)	0.39±0.02	0.39±0.05	0.39±0.02	0.38±0.00	0.36±0.02	0.36±0.02	0.34±0.02	0.36±0.02
	Liver (g/100g B.W.)	4.79±0.32	5.10±0.34	5.44±0.50	6.09±0.17***	3.88±0.24	4.27±0.17*	4.54±0.17***	5.17±0.31***
	Stomach (g/100g B.W.)	0.63±0.04	0.66±0.04	0.62±0.04	0.64±0.02	0.53±0.02	0.50±0.05	0.53±0.03	0.54±0.04
	Spleen (g/100g B.W.)	0.28±0.03	0.28±0.05	0.30±0.07	0.32±0.08	0.27±0.03	0.24±0.02	0.22±0.02*	0.26±0.02
	Adrenal-R (mg/100 g B.W.)	13.2±2.2	12.5±4.8	12.3±2.5	11.5±2.2	14.2±3.3	10.2±2.5	13.8±3.3	11.8±3.0
	-L (mg/100g B.W.)	14.9±1.7	12.0±2.6	11.0±4.4	11.5±3.4	14.3±2.7	14.7±1.2	13.0±3.3	13.0±3.5
	Kidney-R (g/100g B.W.)	0.48±0.02	0.50±0.04	0.58±0.10	0.51±0.02*	0.41±0.01	0.42±0.02	0.43±0.02	0.44±0.02*
	-L (g/100g B.W.)	0.47±0.04	0.47±0.02	0.53±0.03*	0.50±0.02	0.40±0.02	0.43±0.01*	0.45±0.03*	0.46±0.03**
	Cecum (g/100g B.W.)	0.43±0.05	0.46±0.03	0.44±0.05	0.47±0.03	0.400±.07	0.37±0.06	0.45±0.10	0.37±0.06
	Ovary-R (mg/100g B.W.)	24.5±5.5	20.3±3.2	27.3±4.9	24.2±7.8	21.7±4.1	18.9±4.2	21.4±5.2	21.7±3.0
	-L (mg/100g B.W.)	22.7±6.3	18.7±1.4	24.9±5.2	25.2±7.7	20.0±5.0	17.1±2.6	18.2±1.9	22.3±2.2
	Uterus (g/100g B.W.)	0.21±0.05	0.23±0.07	0.18±0.05	0.22±0.05	0.20±0.04	0.20±0.05	0.17±0.01	0.21±0.07

Values are the mean ± SD. * Significantly different from control $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Table. 4. Blood components, biochemical values in serum and coagulation time of rats on administration of SDS for 2 and 4 weeks

		2 weeks				4 weeks			
		Control	0.5%	1.0%	2.0%	Control	0.5%	1.0%	2.0%
Male	WBC ($\times 10^3$)	5.5±0.7	3.7±0.3***	5.7±0.6	4.9±0.9	8.3±0.9	8.2±2.7	6.8±0.8*	7.2±1.5
	RBC ($\times 10^6$)	6.13±0.31	6.02±0.27	6.52±0.42	6.02±0.29	7.0±0.6	7.1±0.3	7.3±0.3	7.2±0.3
	HGB (gm)	14.2±0.3	13.9±1.1	15.0±1.6	13.5±0.7	16.1±1.7	16.1±1.2	16.3±1.1	15.3±1.2
	HCT (%)	36.8±1.3	35.7±1.5	37.9±2.2	35.6±2.1	39.5±4.4	40.7±2.5	39.7±2.3	39.9±2.2
	MCV (μ^3)	61.0±1.4	60.0±4.1	59.2±2.0	59.8±1.9	56.8±1.8	58.4±1.1	55.6±1.7	56.4±1.1
	MCH ($\mu\mu$g)	23.1±0.7	23.1±2.6	22.9±2.1	22.4±0.5	22.8±1.2	22.8±0.5	22.0±0.6	21.3±1.4
	MCHC (%)	38.4±0.5	38.8±1.7	39.2±2.8	38.0±1.0	40.6±1.9	39.8±0.4	40.3±0.9	38.3±2.3
	TP (g/dl)	6.0±0.7	6.0±0.4	6.0±0.3	6.2±0.5	6.8±0.5	8.0±0.9*	8.0±0.3**	6.8±1.3
	GLU (mg/dl)	149±18.0	159±13.5	152±8.3	190±28.4*	165±23.5	183±13.3	170±0.7	164±26.5
	UN (mg/dl)	20.2±5.4	21.0±2.3	19.2±2.8	20.8±2.9	17.8±2.8	19.6±2.7	18.6±0.4	20.2±4.5
	CHO (mg/dl)	77.2±16.7	72.4±15.6	67.2±5.4	61.6±8.3	78.4±9.3	80.4±15.2	74.6±8.4	87.0±22.1
	GOT (K-U)	118±17.4	111±9.4	111±7.9	116±7.7	96.0±11.0	99.6±25.0	120±16.9*	125±13.5**
	GPT (K-U)	30.2±5.1	34.0±4.7	36.2±2.2*	37.0±5.9	35.2±7.0	36.8±3.3	37.6±5.9	42.8±12.1
	ALP (KA-U)	69.0±29.0	62.6±20.2	63.4±18.0	99.2±20.1	53.2±11.6	42.0±7.5	55.0±14.1	67.0±29.2
	ChE (ΔpH)	0.16±0.02	0.16±0.02	0.17±0.02	0.20±0.05	0.07±0.01	0.11±0.03*	0.07±0.01	0.10±0.03
	Coagulation time (sec) Beginning	19.2±7.7	24.0±5.5	22.2±7.6	22.4±9.7	21.6±5.5	21.4±5.9	17.4±3.3	22.6±13.1
	Coagulation time (sec) Ending	35.0±7.9	48.8±13.0	37.4±10.3	43.2±17.2	48.0±16.1	44.6±9.1	36.0±13.9	39.6±15.1
Female	WBC ($\times 10^3$)	4.8±1.1	5.3±1.9	5.4±0.5	3.9±1.0	4.5±0.5	5.4±0.9	4.7±0.9	4.5±0.7
	RBC ($\times 10^6$)	6.73±0.26	6.65±0.35	6.45±0.19	6.30±0.20*	7.7±0.3	7.1±0.5	7.4±0.2	7.4±0.3
	HGB (gm)	15.6±1.1	15.0±1.4	14.9±0.6	14.3±0.7	17.0±0.9	16.4±0.4	15.8±0.8	16.0±1.0
	HCT (%)	39.1±2.2	38.3±2.9	37.6±1.1	35.7±2.2	41.2±2.1	38.9±1.8	40.9±1.8	40.3±1.9
	MCV (μ^3)	59.0±1.4	58.6±1.8	59.6±1.1	58.0±1.6	56.0±1.0	55.8±1.3	56.8±1.3	55.2±0.4
	MCH ($\mu\mu$g)	23.0±0.7	22.5±0.9	23.2±0.4	22.6±0.8	22.1±0.7	22.1±0.8	22.2±0.7	21.4±0.7
	MCHC (%)	39.7±0.9	39.0±1.1	39.4±0.8	40.0±0.7	40.1±1.2	40.3±0.9	39.8±1.9	39.4±0.9
	TP (g/dl)	6.1±0.3	6.8±1.7	5.9±0.5	7.0±2.0	6.7±0.7	7.7±0.8	6.7±1.2	7.7±1.0
	GLU (mg/dl)	135±10.9	170±53.7	131±8.6	166±65.2	158±17.3	191±27.5	174±36.9	210±26.5**
	UN (mg/dl)	19.3±3.5	21.0±2.7	18.4±5.2	19.4±7.6	17.2±5.1	19.6±2.7	20.6±4.5	24.0±4.9
	CHO (mg/dl)	79.5±2.4	84.6±20.4	65.2± 4.1***	74.8±15.4	74.8±6.4	65.2±11.8	83.0±10.4	93.0±24.3
	GOT (K-U)	111±12.1	111±14.6	104±11.5	110±20.5	89.4±18.6	110±10.0	98.0±7.2	114±15.7
	GPT (K-U)	30.0±2.9	33.8±11.5	52.0±27.9	38.0±12.0	29.2±6.4	46.0±10.1*	39.2±10.9	54.0±14.5**
	ALP (KA-U)	45.0±14.0	47.4±14.2	46.2±16.7	60.2±30.7	28.6±11.7	88.8±39.9*	85.6±38.9*	93.0±29.6**
	ChE (ΔpH)	0.46±0.15	0.40±0.09	0.37±0.10	0.43±0.09	0.55±0.13	0.52±0.04	0.48±0.07	0.27±0.19*
	Coagulation time (sec) Beginning	18.0±3.6	27.0±11.5	15.8±2.9	25.4±9.2	17.0±2.7	21.4±7.5	17.8±7.4	16.0±2.2
	Coagulation time (sec) Ending	50.0±13.2	45.0±16.9	39.6±12.2	45.4±14.3	39.0±20.4	41.6±14.8	45.4±18.3	45.0±24.5

Values are the mean ± SD. * significantly different from control $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

6. 血清生化学的検査 (Table 4) : TP は，投与4週間目の雄で1%投与群に有意な上昇がみられた以外有意な差は認められなかった．

GLU は2週間目雄のおよび4週間目の雌で 2%投与群に有意な上昇を認めた．

CHO は，雌の1%投与群に2週間目で有意な減少がみられたが，4週間目では差なはかった．

GOT は，4週間目に雄の1%および2%投与群に有意な上昇がみられた．

GPT は，雄の投与群で，有意な上昇をみた．また，雌では，4週間目に0.5% および 2%投与群で有意な上昇をみた．

ALP は，4週間目の雌で各投与群とも有意な上昇がみられた．

ChE は，雄においては4週間目の投与群で上昇がみられ．一方雌では，2%投与群で下降が認められた．

UN は，各群とも対照群に比して有意差は認められなかった．

7. 血液凝固時間 (Table 4) : 血液凝固時間は各投与群とも，対照群に比して有意差は認められなかった．

今回行なった SDS の亜急性毒性試験の結果を，従来，報告されてきた ABS, LAS の結果[11,14-17]と比較してみると，一般症状は，ABS, LAS より，幾分毒性が少ないように思われるが，臓器，血液学的，血清生化学的変化には，大きな差は認められなかった．現在，SDS の各臓器におよぼす影響を，病理学的，組織学的に究明中であり，それらの結果を待って，今後さらに，検討を加えたい．

要　旨

高級アルコール系洗剤の主要基剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の毒性を検討する目的で，Wistar 系の雌雄ラットを用い，2週間，4週間の亜急性毒性試験を行なった．試験群として，対照群，0.5%，1.0%，2.0%投与群をもうけ，一般症状，剖検所見，臓器重量，血液学的，血清生化学的検査を行なった．

文　献

1) 高橋道人，佐藤寿昌：第26回日本癌学会総会（昭和42年10月）

2) Janicke, W. : *Water Research*, 5, 917—931 (1971)

3) Драчев, С.М., Былинкина, А, А., и Гаршенин, В. Ф. : Технология Вобы 8, 161—166 (1964)

4) 三上美樹，坂井義雄：解剖誌，48，(1973)

5) 三上美樹，坂井義雄，宮本 勇：第13回 日本先天異常学会総会（昭和48年7月）

6) Cascorbi, H. F., Rudo, F. G., and Lu, G.G, : *J. Pharm. Sci.* 52, 803—805 (1963)

7) 原 三郎，平山八彦：東医大誌，27，1—19 (1969)

8) 山地良一：大阪眼科集談会（昭和46年3月）

9) Bormann, G. and Loeser, A : *Fette-Seifen Anstrichmittel*, 63, 938—940 (1961)

10) Olson, K. J, Dupree, R. W., Plomer, E. T and Rowe, U. K. : *J. Soc. Cosmetic Chemists.* 13, 469—479 (1962)

11) 米山允子他：東京都立衛生研究所年報，24, 449—465 (1972)

12) Bolton, W. : *J. Agr. Sci*, 57, 83—86(1961)

13) Knauth, H., : *Wasserwirstch. Wassertech.*, 14, 70—74 (1964)

14) Kay, J.H., Kohn, F.E., and Calndra, J.C. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 812—818(1965)

15) Oser, B.L., and Morgareidge, K. : *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 7, 819—825 (1965)

16) Leuschner, F. Poche, R., and Gloxhuber, C. : *Fette Seifen Anstrichmittel*, 71, 570—580 (1969)

17) Tusing, T.W., Paynter, O. E., Opdyke, D. L., and Snyder, F.H., *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 4, 402—409 (1962)

東京衛研年報
Ann.Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 677 — 684, 1974

培養細胞系を用いての AF 2 *の毒性の検討

川野澄江** 中尾順子** 平賀興吾**

Investigation of Cytotoxicity of AF 2 Using HeLa S 3 Cells in Culture

SUMIE KAWANO**, TOSHIKO NAKAO** AND KOGO HIRAGA**

ニトロフラン誘導体は，一般に，溶原化したプロファージを誘発したり[1]，E. coli[2,3]に突然変異を誘発したり，またラットに腫瘍を形成させたりする[4]ことが知られている．ニトロフラン誘導体の一種である 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid amide (AF 2) はわが国においては食品保存料として広く使用されているが，最近，その遺伝的影響についての疑問が提示されるようになり，種々の角度からの再検討が行なわれつつある．

Tonomura ら[5]は，ヒトのリンパ細胞を用いた *in vitro* の培養系において，AF 2 が染色体異常を起すこと，また，繊維芽細胞において不定期 DNA 合成を誘導することを報告している．また，Kondo ら[6]は，E. coli の *exc*⁻ strain (切除修復不能変異株) を用い，Kada ら[7]は *hcr*⁻ strain (組みかえ修復不能変異株) を用い，両者ともに，AF 2 が高頻度で突然変異を誘発するのを認めている．また黒田[8]もヒト2倍体細胞において，8-azaguanine 耐性変異株の高頻度の出現を報告している．

AF 2 による突然変異誘発性に関するこのようなデータの集積にもかかわらず，動物個体においては，AF 2 は肝臓で速やかに代謝されるため無害であるとされてきた．しかし，最近，里見らは AF 2 をラット肝ホモジネートとインキュベートすると，短時間では逆に AF 2 そのものより毒性の強い物質が生成すると報告している[9]．しかしながら，彼らは AF 2 が肝臓で無毒化される時間を決定することを目的として実験を計画したため，AF 2 単独でもほとんどの細胞が死滅するような高い AF 2 濃度で実験を行なっているなど，実験条件の設定の仕方に問題があるのではないかと考えた．

そこで，本報告では，単独ではそれ程強い細胞毒性を示さないような AF 2 濃度で，ラット肝ホモジネートによる AF 2 の細胞毒性増強効果について検討を行なった．また同時に，AF 2 の細胞毒性と他の保存料の細胞毒性との比較，肝ホモジネートによる高濃度の AF 2 の無毒化についても検討を加えた．本実験はまだ予備的段階にすぎず，反応条件の検討など十分ではないが，一応の結果が得られたので報告する．

実験方法

(1) 培養系

本実験にはすべて HeLa S 3 細胞を使用し，10%または20%の仔牛血清を含む Eagle の MEM 培地中にて培養を行なった．ティシュー・カルチャー・チェンバー・スライド (Miles Lab., Inc., Ill.) および 60 mm または 30 mm のペトリ皿を使用し，CO_2 細胞培養恒温器 (CO_2を5%添加した空気を通気) 内で37°で培養を行なった．

(2) 各種保存料の細胞増殖阻害度の測定

ティシュー・カルチャー・チェンバー・スライドの4個のチェンバーにそれぞれ MEM 培地に溶かした 200, 63, 20 および6.3 μg/ml の濃度の各種保存料溶液を0.5 ml ずつ添加したのち，仔牛血清 20%，ペニシリン200 U/ml，ストレプトマイシン 200 μg/ml を含む MEM 培地に懸濁させた HeLa S 3 細胞 (1×10^5

* 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid amide

** 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

細胞/ml）を0.5 mlずつ各チェンバーに添加した。すなわち，各種保存料の培養液中における最終濃度は，100，32，10および3.2 μg/ml であり，血清濃度は10%である．

試験に供した保存料は，プロピオン酸ナトリウム，デヒドロ酢酸ナトリウム，ソルビン酸カリウム，安息香酸ナトリウム（以上は水またはMEM培地に溶解したのちメンブランフィルターで無菌沪過し，さらにMEM培地で適当な濃度に希釈した.），サリチル酸，パラヒドロキシ安息香酸-エチル，-n-プロピルおよび-n-ブチルならびにAF 2である（以上は，DMSO*に溶解したのちMEM培地で希釈した．DMSOの最終濃度は0.5%以下で，この濃度のDMSOは細胞増殖を阻害しない.）．ただしAF 2のみは最高濃度を10 μg/ml とした．このほか比較のため，ニトロフラゾン，パラヒドロキシ安息香酸についても検討を行なった．

上記のチェンバー・スライドを CO_2 恒温器内で3日間培養したのち，カルノア法で固定し，ヘマトキシリン—エオジン染色し，肉眼的に染色の度合を判定した．保存料無添加時の増殖阻害度を0とし，その1/2，1/4および1/8の増殖を示した場合，それぞれの増殖阻害度を1，2および3とし，完全に細胞が死滅した場合を4とする5段階評価を行なった．

(3) コロニー形成率への保存料の影響

20%の仔牛血清を含むEagleのMEM培地4.8mlを添加した60 mmのペトリ皿に1×10^3個/mlの細胞懸濁液および各種濃度の保存料溶液をそれぞれ0.1 mlずつ添加し，そのまま11日間培養したのち，ホルマリン固定，クリスタルバイオレット染色を行なって生成したコロニーの数を数えた．Table 2およびFig. 2では，保存料を添加した状態で24時間培養したのち培地を捨て，5mlのMEMで1回洗ったのち新たに20%仔牛血清を含む5 mlの培地を添加し，さらに10日間培養を続けた．またFig. 3では短時間処理のAF2の影響をみるため，細胞をまいてから1日間はAF 2無添加で培養し，その後AF 2溶液0.1 mlを加えて1時間培養したのち，再びAF 2無添加培地にきりかえてさらに12日間培養を行なった．

(4) ラット肝ホモジネート15,000× g 上清分画の調製

体重500～600 gのWistar系雄ラットを断頭して殺したのち，速やかに肝臓を摘出した．0.9%の滅菌，氷冷食塩水で灌流したのち3倍量の氷冷0.25Mショ糖溶液（pH 7.0）とともにPotter-Elvehjemホモゲナイザーで磨砕した．ホモジネートを15,000× gで10分間冷却遠心して上清を得た．

(5) ラット肝ホモジネート15,000 g 遠沈上清分画とインキュベートしたAF 2のコロニー形成率への影響

上記の15,000× g遠沈上清を10分間前培養したのちDMSOに溶かしたAF 2をTable 3では50 μg/ml，Table 5では500 μg/mlになるように添加し，振盪培養した．前日100個の細胞をまいておいた60mmのペトリ皿の培地を捨て，上記の反応液を経時的に取り出して37°Cに暖めた20%仔牛血清を含むMEM培地で5倍に希釈したものを5 mlずつ各ペトリ皿に添加した．このペトリ皿を CO_2 恒温器内で1時間培養したのち，反応液を捨て，MEM培地で1回洗ってから新しい培地を5 mlずつ加えてさらに10～12日間培養を続けた．

(6) 増殖速度に対するAF 2の影響

2×10^4個の細胞を含む2 mlの増殖培地（10%の仔牛血清を含有するEagleのMEM培地）を30 mmのペトリ皿に添加し，1～2日間 CO_2 恒温器内で培養した．このあと培地を捨て，各種濃度のAF 2を含む培地，またはAF 2と肝ホモジネートの15,000×g，10分遠沈上清分画との反応液（AF 2 濃度 250 μg/ml）の増殖培地による5倍希釈液を2 ml加えて1時間培養した．その後，再び培地を捨て2 mlのMEMで1回洗ったのち，新しく2 mlの培地を加えて37°Cで培養を行なった．数日間培養後，トリプシン-EDTA処理して細胞をばらばらにし，コールター・カウンター・モデルZ（Coulter Electronics, Inc.）を用いて細胞数を測定した．

実験結果

AF 2とその他の保存料の細胞毒性の比較

(1) HeLa S 3細胞の増殖に対する各種保存料の影響

各種保存料の細胞増殖の阻害について，ティシュー・カルチャー・チェンバー・スライドを用いて検討した結果をFig. 1に示した．多くの保存料，すなわちデヒドロ酢酸ナトリウム，ソルビン酸カリウム，サリチル酸，安息香酸ナトリウム，パラヒデロキシ安息香酸およびプロピオン酸ナトリウムは，100 μg/mlの濃度でも全く増殖の阻害を示さず，パラヒドロキシ安息香酸-エチルおよび-n-プロピルの場合にも100 μg/mlの濃度ではじめて軽微な阻害を示すにすぎなかった．パラヒドロキシ安息香酸-n-ブチルは100 μg/mlでは完全に細胞を死滅させ，32 μg/mlでもわずかながら

* ジメチルスルホキシド

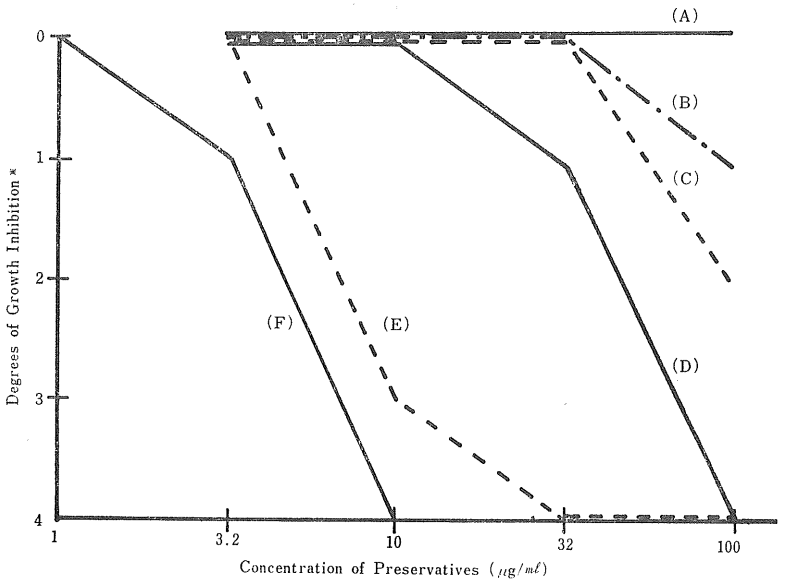


Fig. 1. Effect of Preservatives on the Growth of HeLa S 3 Cells.
(A) Sodium dehydroacetate, potassium sorbate, salicylic acid, sodium benzoate, *p*-hydroxybenzoic acid and sodium propionate ; (B) *p*-hydroxybenzoic acid ethyl ester ; (C) *p*-hydroxybenzoic acid *n*-propyl ester ; (D) *p*-hydroxybenzoic acid *n*-butyl ester ; (E) nitrofurazone.
* See the text.

Table 1. Effect of Preservatives on the Colony Formation of Hela S 3 Cells
——11 Days Treatment——

Group	ID_{50} (μg/ml)*	ID_{50} (μM)
AF 2	0.3	1.2
p-Hydroxybenzoic acid *n*-butyl ester	24	124
p-Hydroxybenzoic acid *n*-propyl ester	100 <	555 <
p-Hydroxybenzoic acid ethyl ester	100 <	602 <
Sodium benzoate	100 <	694 <
Potassium sorbate	100 <	666 <

* Concentrations of preservatives that inhibit 50 % the formation of colonies.

増殖の阻害を示した.

これに比して AF 2 には上記の化合物の10～100倍のきわめて強い増殖阻害効果が認められ,10 μg/ml の濃度で完全に細胞を死滅させた. またニトロフラゾンは, 現在食品添加物としては使用禁止になっているが, AF 2 よりは軽度であるが, やはり強い細胞増殖の阻害を示した.

(2) 培養全期間保存料を添加したときのコロニー形成率の変化 (Table 1)

試験した保存料の中で, パラヒドロキシ安息香酸-エチルおよび-*n*-プロピル, 安息香酸ナトリウムおよびソルビン酸カリウムは, いずれも100 μg/ml の濃度でも対照の50%以上のコロニー形成率を示した. これに比して AF 2 は, きわめて強いコロニー形成率の阻害を示し, AF 2 濃度-コロニー形成率の曲線から50%コロニー形成阻害濃度 (ID_{50}) は0.3μg/ml (1.2 μM) と計算された. また, パラヒドロキシ安息香酸-*n*-ブチルでは中程度の阻害が認められ, ID_{50} は24 μg/ml (124 μM)と計算された.

Fig. 1 から細胞増殖の50%阻害度 (ID_{50}) を求める

Table 2. Effect of Preservatives on the Colony Formation of HeLa S3 Cells
——24 hr Treatment——

Group	No. of colonies*	R.P.E.(%)**
Control (No Addition)	68	100
p-Hydroxybenzoic acid *n*-butyl ester		
100 μg/ml (515 μM)	73	109
50 μg/ml	63	93
25 μg/ml	63	93
Salicylic acid		
100 μg/ml (724 μM)	66	98
50 μg/ml	71	104

* Averages of 4 measurements.

** Relative plating efficiency $= \frac{\text{No. of colonies of test group}}{\text{No. of colonies of control group}}$

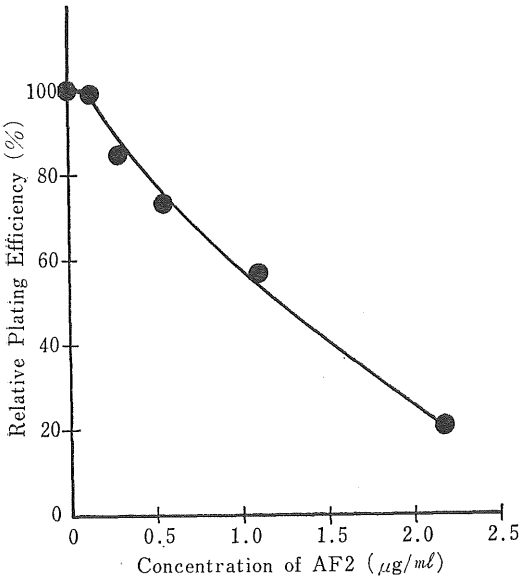


Fig. 2. Effect of AF 2 on the Plating Efficiency of HeLa S3 Cells
——24 hr Treatment——
Each point represents the average of 4 measurements.

と，AF 2では4.5 μg/ml (18.1 μM)，パラヒドロキシ安息香酸-*n*-ブチルでは45 μg/ml (232 μM)，それ以外の保存料では100 μg/ml (480 μM) 以上になる．以上の数値をコロニー形成率に対する ID_{50} の値と比較すると，AF 2の場合には後者の値は前者の値の $^1/_{10}$ 以下の低い値を示したのに対して，その他の保存料では差のあるものでも1/2程度の差にすぎなかった．

(3) 24時間処理保存料のコロニー形成率への影響

パラヒドロキシ安息香酸-*n*-ブチルならびにサリチル酸を24時間処理したときのコロニー形成率を Table 2に示したが，どちらの場合にも 100 μg/ml 以下の濃度ではコロニー形成率の低下は認められなかった．一方，AF 2 24時間処理の場合には，Fig. 2に示したように，0.25～2 μg/ml の濃度範囲でほぼ直線的なコロニー形成率の低下が認められた．ID_{50} は約1.2 μg/ml (4.8 μM) である．

ラット肝ホモジネートの15,000×g，10分遠沈上清分画とインキュベートしたときの AF 2の細胞毒性の変化

(1) コロニー形成率に対する影響

里見ら[9]は，AF 2をラット肝ホモジネート (15,000×g遠沈上清分画) と短時間インキュベートすると細胞毒性が増強されると報告しているが，AF 2 単独でもほとんどコロニーの形成を示さないような高濃度で実験を行なっているため，彼らの実験結果からはそのような結論は導きにくい．そこで著者らは，まずはじめにコロニー形成率の軽微な低下を示すような AF 2 濃度を決定するための実験を行なった．12.5, 25, 50 および 100 μg/ml の濃度の AF 2 を1時間作用させたときのコロニー形成率の変化を Fig. 3に示したが，12.5 μg/ml の濃度でもある程度の増殖阻害を示した．そこで，ラット肝ホモジネートの 15,000×g 遠沈上清分画とインキュベートした AF 2 の影響をみるためには，10 μg/ml の AF 2 濃度を採用した．結果を Table 3に示したが，AF 2のみ，15,000×g 遠沈上清分画のみ，上清分画と AF 2 をそれぞれ 10, 20, 40, 60 および 120 分間インキュベートしたあとの反応液をそれぞれ1時間 HeLa 細胞に作用させたが，いずれの場合にもコロニー形成率の低下は認められなかった．

Table 3. Effect AF 2 Incubated with Rat Liver Postmitochondrial Fraction on the Plating Efficiency of HeLa S 3 Cells

Group		No. of colonies**	R.P.E. (%)***
Control (No addition)		82	100
AF 2 (10 μg/ml)		81	99
Supernatant*		81	99
AF 2 (10 μg/ml)+Supernatant*			
Incubation time	10 min	83	101
	20 min	89	109
	40 min	80	98
	60 min	92	112
	120 min	83	101

* Supernatant after centrifugation at 15,000×g for 10 min.
** Averages of 3 or 4 measurements.
*** Relative plating efficiency.

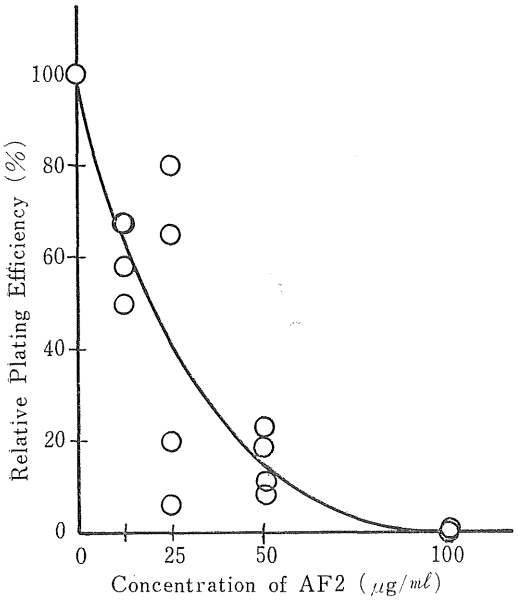


Fig. 3. Effect of AF 2 on the Plating Efficiency of HeLa S 3 Cells
— 60 min Treatment —

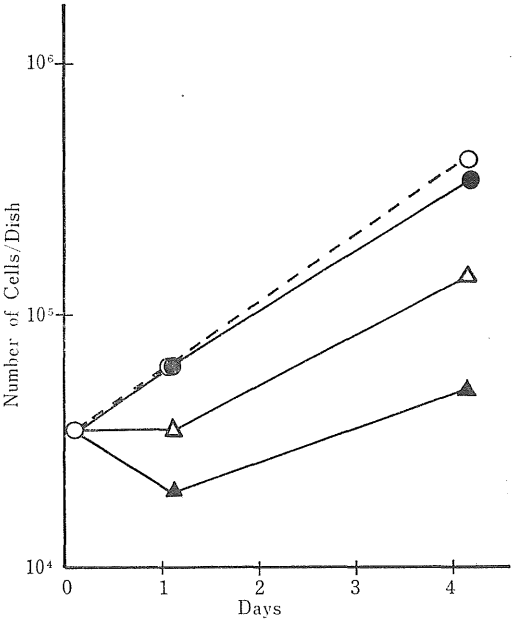


Fig. 4. Effect of AF 2 on the Growth Curve of HeLa S 3 Cells
Each point represents the average of 3 measurements. Concentrations of AF 2 : ○……○, 0 μg/ml ; ●——●, 25 μg/ml ; △——△, 50 μg/ml ; ▲——▲, 100 μg/ml.

(2) 細胞増殖速度への影響

上記の実験では15,000× g 上清分画と10分以上インキュベートした AF 2 の影響についてのみ検討したため，AF 2 が上清分画によって非常に速やかに代謝されてしまい，10分間のインキュベートでは AF 2 より毒性の強い中間体がすでに消失してしまっている可能性を除去しえない．コロニー形成率でみていく場合，最低でも10日以上の日数を要するため，時間の短縮をはかるために細胞増殖速度で検討していくことにした．そこで，まず，25，50および100 μg/ml の AF 2 を1時間作用させたときの細胞増殖曲線への影響を検討した．結果を Fig. 4 に示した．100 μg/ml では1日目に細胞数の減少を来したのちやや緩慢な速度で増殖した．また 25 μg/ml では無添加群とほとんど変らない増殖を示した．一方，50 μg/ml では，1日目にはほとんど増加が認められないが，その後は無添加群

Table 4. Effect of AF 2 Incubated with Rat Liver Postmitochondrial Fraction on the Cell Proliferation of HeLa S 3 Cells

Group		No. of cells/dish*
At the Start of Experiment		0.78×10^5
2 nd Day of Culture		
Control (No addition)		3.17×10^5
Supernatant		3.10×10^5
AF 2 (50 μg/ml)		1.78×10^5
AF 2 (50 μg/ml) +Supernatant		
Incubation time	0 min	2.70×10^5
	10 min	2.81×10^5
	60 min	2.79×10^5

* Averages of 3 measurements.

Table 5. Detoxification of Af 2 by the Incubation with Rat Liver Postmitochondrial Fraction

Group		No. of colonies*	R. P. E. (%)**
Control (No addition)		51	100
Supernatant		59	116
AF 2 (100 μg/ml)		0.3	1
AF 2 (100 μg/ml) +Supernatnat			
Incubation time	30 min	27	53
	60 min	30	59
	120 min	41	82

* Averages of 4 measurements.
** Relative plating efficiency.

に近い速度で増殖した.

以上の結果から，細胞増殖速度に対する15,000×g遠沈上清分画とインキュベートした AF 2の影響について検討するためには，50 μg/ml の AF 2 濃度を採用した．結果を Table 4に示したが，培養2 日目の無添加群の細胞数3.17×10^5個／ペトリ皿に対して，AF 2 50 μg/ml 単独の処理では1.78×10^5個／ペトリ皿と明らかに低下が認められた．しかしながら，15,000×g遠沈上清分画と0，10および60分間インキュベートした場合には，無添加群よりわずかに低下したにすぎなかった．以上のように，細胞増殖速度の場合にもコロニー形成率の場合と同様，肝ホモジネートの15,000×g遠沈上清分画とのインキュベートによるAF 2の細胞毒性の増強効果は認められず，逆に AF 2単独でみられた部分的増殖阻害もほとんど認められなくなった.

(3) 15,000×g 遠沈上清分画による AF 2 の解毒効果

Table 5にコロニー形成をほとんど示さないような高濃度の AF 2 (100 μg/ml) を上清分画とインキュベートしたのちに1時間だけ HeLa 細胞に作用させたときのコロニー形成率の変化を示した．100 μg/ml の AF 2単独では，4枚のペトリ皿のうち1枚にのみ1個のコロニーを形成したにすぎなかった．これに対して上清分画と30，60および120分インキュベートしたあとで培養細胞に作用させたときには明らかにコロニー形成率の増加が認められ，120分では対照の82%にまで回復した.

考　察

以上の実験結果から次のような結論が導かれる．①AF 2は他の保存料に比べてきわめて強い細胞増殖の阻害ならびにコロニー形成率の低下をもたらす．また，その作用はきわめて短時間の処理でも起り，50 μg/ml では1時間の作用でも十分に細胞増殖ならびにコロニー形成率の両者を阻害する．②本実験の結果からは，里見ら[9]が報告したようなラット肝ホモジネ

ートの15,000×g遠沈上清分画による AF 2の細胞毒性の増強効果は認められなかった．③上清分画とのインキュベートにより，細胞をほとんど死滅させるような高濃度の AF 2が，一見，無毒化されるようにみられる結果が得られた．

本実験では里見ら[9]の結論とは相反するような結果が得られたが，これだけの実験では彼らの論拠をくつがえすことはできない．本実験はまだ予備的段階であり，上清分画中で AF 2を代謝させる際の反応条件について未検討である．それゆえ，本実験条件下では AF 2 の中間代謝物が十分に生じていない可能性もあり，今後，実際に代謝生成物を追跡し，酵素反応の至適条件を決定すべきである．また，バクテリアの突然変異に関する研究では，本実験のような crude な系を用いず，ミクロソームと薬剤代謝系に関与する各種の因子を含む系が用いられており[10-12]，培養細胞においてもこのような実験系の開発がのぞまれる．

Table 4および5で，肝ホモジネートの15,000×g遠沈上清分画とインキュベートすると，一見，AF 2が無毒化されるようにみられる結果が得られたが，反応液を培養細胞に作用させる前にインキュベートしない場合にも毒性の低下が認められるため，AF 2 が上清分画によって代謝されて無毒化されたのか，それとも上清の高分子化合物に AF 2が吸着されてしまって細胞に利用されなくなるのか現在の段階では判断できない．熱変性させた上清分画と AF 2を作用させるとか，高濃度の AF 2 (100 μg/ml) と上清分画を混ぜてインキュベートせずに直ちに細胞に作用させるとかすれば，この点は明らかになるかもしれない．

細胞毒性と動物個体レベルの発ガン性との関係について検討がなされつつあるが[13]，炭化水素系の発ガン剤[14]やアセチルアミノフルオレン[15]の場合には動物の肝臓で代謝されてはじめて強力な発ガン性を示すことが知られている．したがって，発ガン性と *in vitro* の細胞毒性とを結びつけるには，本実験のように生体に近い *in vitro* の条件下で代謝を行なわせるような試験法の開発が望まれる．この点に関し，従来は反応系と細胞とを長時間作用させるような方法がとられてきたため，反応系自体の毒性が問題にされていた．本実験の結果，1時間程度の作用では反応系自体の毒性は全く問題にならないことが明らかにされ，この点は今後のこのような実験系の開発に光明を投げかけるかもしれない．

謝　辞

本研究の遂行にあたってご指導，ご助言をいただいた東京大学薬学部山田正篤教授ならびに横浜市立大学医学部助教授梅田誠先生に感謝の意を表します．また，AF 2をご提供いただきました国立衛生研究所の池田良雄部長に感謝いたします．

要　旨

HeLa S 3細胞を用い，AF 2の毒性に関して細胞レベルで検討を行なった．AF 2は，他の保存料と比較して，極めて低濃度で細胞の増殖ならびにコロニー形成率を著しく阻害した．また，その阻害は，きわめて短時間（1時間）の処理によっても認められた．里見らは，ラット肝ホモジネートの15,000×g遠沈上清分画とインキュベートすると，AF 2 の細胞毒性が増強されると報告しているが，今回の実験ではそのような結果は得られなかった．また，上清分画とのインキュベートにより，細胞をほとんど死滅させるような高濃度の AF 2が，一見，無毒化されているようにみられる結果が得られたが，上清分画中の高分子化合物への吸着が，細胞内への AF 2のとりこみまたは細胞膜への作用を妨げている可能性も考えられ，現段階では真に無毒化されているとはいいきれない．

文　献

1) Endo, H., Ishikawa, M, Kamiyama, T. and Kuwano, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 502—505 (1963)
2) Zampieri, A. and Greenberg, J. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 172—176 (1964)
3) Cook, T. M., Gross, W.A. and Deits, W.H. : *J. Bacteriol.*, 91, 780—783 (1966)
4) Stein. R.J., Yost, D., Petroliunas, F. and von Esch, A. : *Federation Proc.*, 25, 291 (1966)
5) Tonomura, A. and Sasaki, M.S. : *Japan. J. Geneties*, 48, 291—294 (1973)
6) Kondo, S. and Ichikawa-ryo, H. : *Japan. J. Genetics*, 48, 295—300 (1973)
7) Kada, T. : *Japan. J. Genetics*, 48, 301—305 (1973)
8) 黒田行昭：日本組織培養学会第37回研究会，講演要旨，p. 22 (1974)
9) 里見　宏，俣野景典，宮木高明：日本食品衛生学会第27回学術講演会，講演要旨，p.32 (1974)
10) Nakajima, T. and Iwahara, S. : *Mutation Res.*, 18, 121—127 (1973)
11) Malling, H.V. : *Mutation Res.*, 13, 425—429 (1971)

12) Slater, E.E., Anderson, M.D. and Rosenkranz, H.S. : *Cancer Res.*, 31, 970—973(1971)
13) 梅田　誠，斉藤　守，乾　直道，山田正篤，大野久子，松下秀鶴：医学のあゆみ，（印刷中）(1974)
14) 黒木登志夫：医学のあゆみ，86，445—450 (1973)
15) Heidelberger, C. : *Federation Proc.*, 32, 2154—2161 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 685 — 690, 1974

遺伝物質に対する微量毒性物質の作用ならびにその障害回復機構の解析

〔I〕細胞性粘菌における毒性解析

金西信次*, 渡部 真**

Analysis of Micro-toxicant Damages on Genetic Substances

I. Analysis in Cellular Slime Mold

NOBUZI KANANISHI* AND MAKOTO WATANABE**

1. 緒 論

現在，医薬品による毒性（副作用）ならびに日常生活において，長期間にわたり，定常的，かつ必然的に摂取される食品添加物や洗剤，各種工業製品もしくは，排棄物などに含まれる体内汚染物質による毒性，またこれらの組合わさった複合毒性についての解明がいそがれており，現在および将来の都民の健康と生活環境とに関して，これらの汚染物質からの環境保護ならびに障害防護を目的とした先見的研究が必要とされている．この方面の研究で，従来重視されながらも，実験による検証が困難なために，現在まで保留されてきた研究課題に次の二つがある．

(1) 微量の毒性物質による遺伝的障害（遺伝子および染色体突然変異），もしくは晩発性障害(発がん，寿命短縮，体質の脆弱化など）の誘発機構，ならびに作用量効果関係の解析．

(2) これらの障害誘発の際に共存する化学物質の共同作用による相乗，相加，あるいは拮抗的効果の機構，ならびに作用量効果関係の解析．

極めて長期間にわたる膨大な動物実験を必要とするこれらの研究課題に対して，われわれは細菌，かび，その他植物細胞から哺乳動物，ヒトにわたる細胞レベルでの培養実験，および染色体ならびに DNA レベルでのミクロの解析を中心として別の方向からの研究を目指している．

特にその生物系の一つである細胞性粘菌は，単細胞生物と多細胞生物，植物と動物，前核生物と真核生物などの過渡型に位置し[1]，突然変異[2,3]，染色体半数化の高い誘発率[4,5]，著しく低いグアニン・シトシン含量（22～25%）[6-9]，アデニン・チミン rich のクラスター[6,8]，真核生物としては核容積に比して著しく少ない DNA 量[10]など多くの特異点を有する．真核生物における DNA 損傷修復機構や，染色体突然変異の分子機構を研究する上で，一つのモデル系としてわれわれはこの細胞性粘菌を選び，多くの点でこれとは対照的な高等動物のリンパ球の系と対比させながら研究を進めている．

DNA ならびに染色体などの遺伝物質に作用する化学物質として，われわれは次の2群の薬剤に注目している[11]．すなわち

(A) 放射線と同一または類似の作用，特に DNA の主鎖切断や，塩基損傷を誘発する化学物質．たとえば直接または生体内で活性化されて後，DNA 分子の一部と共有結合するアルキル化剤（マイトマイシンC，ニトロソ化合物など）．

(B) DNA 損傷から生物効果発現までの過程に，側面から作用をおよぼして，最終効果を見かけ上増幅するように働らく化学物質．たとえば DNA 塩基間に平行に挿入されて，2重らせんを巻きもどし，分子間の歪みや高次のよじれに変化を与えることにより，再結

* 東京都立衛生研究所毒性部
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京都立アイソトープ総合研究所

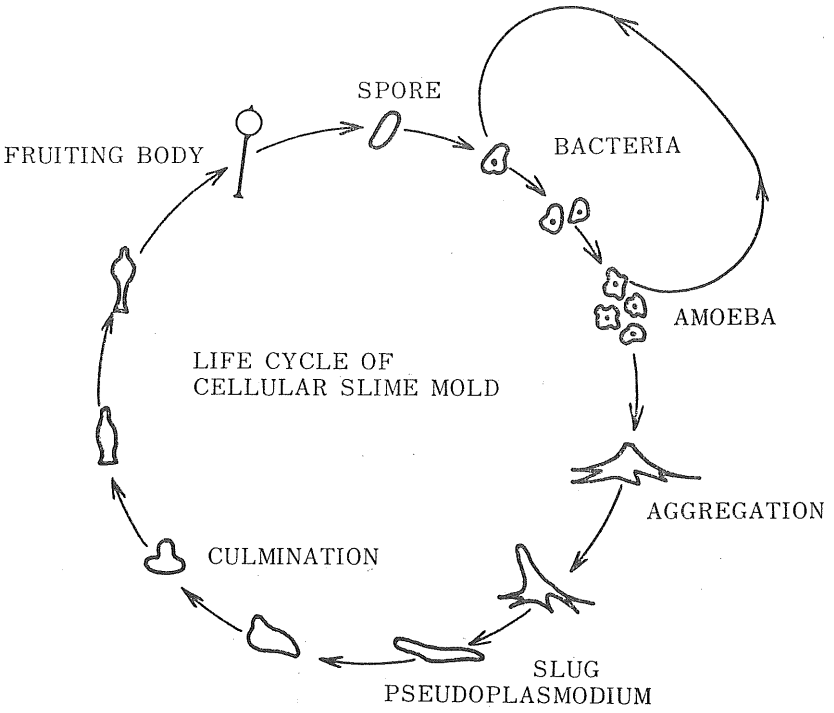


Fig. 1 細胞性粘菌の生活史

合修復や，複製，あるいは転写の過程に影響を及ぼし，その結果，染色体異常率や，突然変異率，細胞致死率を高める薬剤，エチジウムブロマイドや，プロフラビン，アクリジンオレンジなどがそれで，アクチノマイシンDやカフェインにも類似の作用があるのではないかと考えられる．

以上のように毒性を分子レベル・細胞レベルで解析し，遺伝物質に対する毒性物質の作用についていくつかの類型を求めてモデル化し，個体動物での毒性実験の基礎とすることがわれわれの目的である．

今回われわれは(A)に属する作用原として^{60}Co-γ線，N-メチル-N′-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG）を，(B)に属する物質としてカフェインを用いて，細胞性粘菌における障害と回復の機構について調べた．

2. 実験材料および方法

細胞性粘菌

細胞性粘菌（cellular slime mold）は，同じように粘菌とよばれている *Physarum Polycephalum* などの変形菌（真性粘菌—true slime mold）とは生活史が大きく異なり，両者の間には系統的な類縁関係はほとんどないと考えられる．ともに菌類でありながら動物細胞の特徴を有し，ねばねばしているところから粘菌という名がつけられているに過ぎない[1,12,13]．

われわれが用いている細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は，アメーバ状の単細胞生物で，*Aerobacter aerogenes* や *Escherichia coli* などの細菌を捕食して，分裂によって増殖する．栄養分となる細菌がなくなると増殖を停止して集合をはじめ，数千から数十万の細胞が山形の集合塊をつくる．この細胞集合塊の頂点は次第に伸びて指状の突起体となるが，やがて傾いて横たわり，ナメクジ状の細胞集合体となる．この集合体はあたかも多細胞生物であるかのように，光や熱などに走行性を示し，任意の方向に移動して歩くので移動体とも呼ばれる．移動体はしばらく移動するが，やがて停止して再び立上がり，子実体を形成する．子実体は胞子嚢と柄の部分からなっており，胞子嚢には数千個の胞子が漿液中に浮遊している．柄の細胞は死滅するが，胞子は分散し，適当な湿度と細菌が与えられると発芽してアメーバ状の細胞となり，これ

をたべて分裂増殖をくり返す[5] (Fig. 1).

今回の実験に用いたのは，特に細胞性粘菌の NC-4 株，ならびに Ax-2 株である．われわれは1968年以降 NC-4 株を用いてきたが，放射線や化学物質による障害誘発や，障害回復の過程を調べるうえで，細菌を捕食しなければ増殖できないことが大きな障害となっていた．このたび合成培地でも増殖しうる *Dictiostelium discoideum* の突然変異株（Ax—2株）を入手し[14]，NC-4 株と同様に用いることができることを確認したので[15]，この株をも用いた．

培養方法

NC-4 株の培養：液体培地はブドウ糖5.0 g，イーストエキストラクト 0.5 g，プロテオースペプトン 5.0 g，K_2HPO_4 2.436 g，KH_2PO_4 0.816 g，$MgSO_4$ 0.25 g，を蒸留水1000 m*l* に溶かして滅菌したものである．100 m*l* 三角コルベンに 17 m*l* の液体培地と 2 m*l* の細菌懸濁液 (*A. aerogenes*)，1 m*l* の細胞性粘菌の胞子またはアメーバ細胞 ($2\sim20\times10^5$個/m*l*) を入れ22°で振盪培養する．寒天培地は液体培地に寒天末2％を加えたものである．寒天培地に細菌とともに細胞性粘菌の胞子またはアメーバ細胞をまき22° で培養すると，はじめ細菌が増殖して培地の上を一面におおうが，その細菌を餌として増殖し，バクテリオファージの場合と同様のプラーク状のコロニーを形成する．プラークは一つの胞子または一つの細胞起源のクローンに相当し，約40時間の培養でプラークの直径は平均1 mm であるから観察は容易である．

Ax-2 株の培養：細菌を加えない培養液（axenic 培養液）の組成は[14]，ブドウ糖15.4 g，イーストエキストラクト 7.15 g，プロテオースペプトン 14.3 g，$Na_2HPO_4\cdot12\,H_2O$，1.28 g，KH_2PO_4 0.486 g を蒸留水 1000 m*l* に溶かしたものでpH6.7である．Ax-2 株はこの axenic 培養液中で，L字管を用いて振盪培養し，種々の化学物質により処理等を行なうが，コロニー形成能は NC-4 株と同じ寒天培地を用いて細菌とともに培養し，プラーク数により測定した．

細胞数の測定

Thoma 血球計算盤により細胞数を測定した．

δ 線照射

東京都立アイソトープ総合研究所 ^{60}Co, 5000 Ci の hot-cell により照射した．照射時間は1時間とし，線源からの距離によってそれぞれの照射線量を得た．

試　薬

カフェイン：和光純薬工業㈱特級無水物．

MNNG：岩井薬品化学

3. 実験結果

カフェインの細胞増殖に対する影響

液体培地中に細菌とともに NC-4 株の胞子をまき，22°で24時間振盪培養することによって胞子は発芽し，アメーバ細胞となって分裂増殖する．この培養液中に種々の濃度のカフェインを添加後，さらに30時間培養を続け，細胞数を測定した．

Fig. 2 に示すようにカフェインを添加しない培養液中では，約5時間の倍加率 (doubling time) で増殖しているが，2.5 mM 以上の高濃度のカフェインを添加したものは一時的な細胞分裂の阻害があり，その後の分裂もおさえられる．一方，1 mM 以下の濃度では，分裂回数が3回位までは細胞の増殖にほとんど影響を与えない．

細胞性粘菌の放射線抵抗性とカフェインによる増感

細菌を捕食して増殖中の NC-4 株細胞に，種々の線量の γ 線を照射した．照射後ただちに希釈して，0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 mM の各濃度のカフェインを含む寒天培地上に，新しい細菌とともにまいた．22°で4～6日間培養し，プラーク数を測定し，まいた細胞数との比から生存率を求めた．Fig. 3のカフェインを含まない培地で培養したときの生存曲線 (0 mM) が示すように，広い肩をもち，放射線に対して極めて高い抵抗性を有する．この広い肩と高い放射線抵抗性とは，分割照射の実験により亜致死損傷 (sublethal damage) からの効率のよい回復にあることが，Deering ら[16,17]ならびにわれわれ[3]により示されている．そしてこの実験によって，増殖にほとんど影響を与えない濃度のカフェインでさえも生存率を減少させ，γ 線に対する感受性の増感作用があることが確められた．このカフェインによる増感作用は，細菌[18]や哺乳動物の培養細胞[19]に対する紫外線照射によって示されたように，遺伝物質の障害の酵素的回復過程の阻害の結果であると考えられるが，電離放射線による増感作用についてはあまり報告されていない．また Deering ら[17]は同じ NC-4 株に γ 線を照射し，カフェインの効果を報告しているが，5 mM 以上の高濃度でのみ効果があるとしている．

カフェインによる放射線障害からの回復過程の解析

液体培地中で，細菌とともに増殖中の細胞に，2.5×10^5 R の γ 線を照射し，照射後22°で振盪培養する．一定時間毎に，その一部を取り出し細胞数を測定した．また他の一部を希釈して細菌とともに，カフェインを含まない寒天培地と，0.75 mM のカフェインを含む寒天培地にまき，プラーク数を測定した．Fig. 4

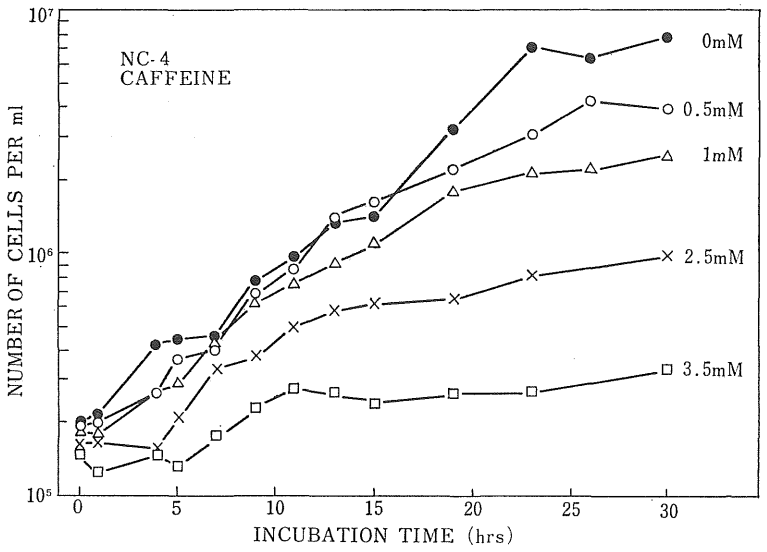


Fig. 2 細胞増殖に対するカフェインの影響

は γ 線照射後の，回復の時間的変化を示してある．CONTROL は γ 線を照射していない細胞の増殖曲線で約5時間の倍加率で増加している．この未処理の細胞はカフェインを含まない寒天培地にまいたものも，0.75 mM のカフェインを含む寒天培地にまいたものも，100%のプラーク形成能を示す．

γ : TOTAL 曲線は γ 線照射後，血球計算盤で測定した細胞数であり，照射により種々な程度に障害をもつ細胞の全数である．増殖中の細胞は γ 線照射によって線量に依存する細胞分裂の一時的停止をおこすが[8]，この照射線量では約8時間の分裂遅延の後，CONTROL とほぼ同じ速度で増殖する．

黒丸（γ : VIABLE,—CAF.）は γ 線照射後，種々の時間毎にそれぞれカフェインを含まない寒天培地にまいて，得られたプラーク数より求めた増殖可能な細胞の数である．この線量では約70～80%の生存率を示し，TOTAL の曲線とほぼ同様な回復曲線となり，25時間以上後には100%の生存率となる．

白丸（γ : VIABLE,+CAF.）は上の場合と同様に，γ 線照射後，異なる時間の後，それぞれカフェインを含む培地にまいて得られたプラーク数より求めた増殖可能な細胞数である．

照射直後にまいたときの生存率は低いが，照射後4時間ほどの比較的短時間の間に，増殖可能な細胞数は増加し，カフェインによる増感効果が減少する．すなわちカフェインで阻害される回復過程があり，比較的短時間で回復される．しかし完全に回復されるのではなく，一部はそのまま残るが，全細胞数による分裂遅

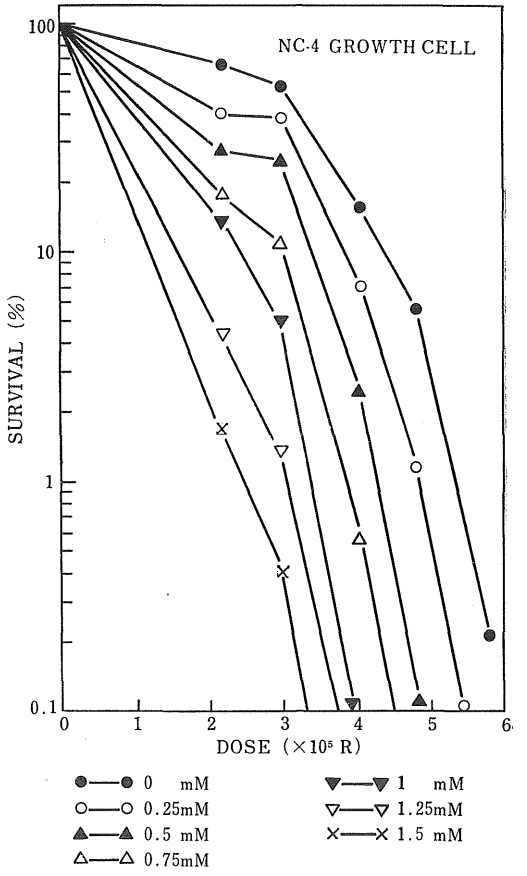


Fig. 3 放射線抵抗性とカフェインによる増感

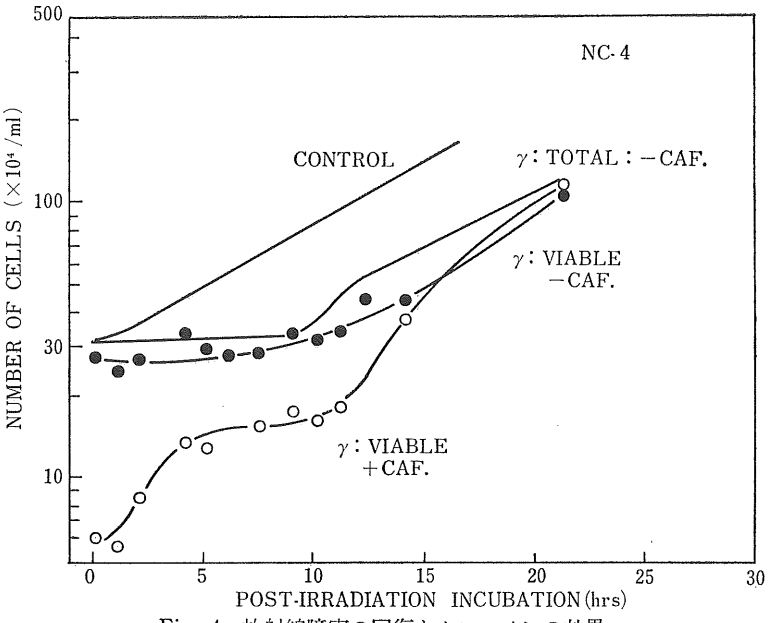


Fig. 4 放射線障害の回復とカフェインの効果

延が終った約10時間後，細胞分裂にともなって再び回復し，ついには100%の生存率となる．

このように細胞性粘菌は γ 線障害から二段階の回復過程をとることがわかった．第一段階の回復は温度依存性を示し，増殖を阻害する濃度（10 μg/ml）のアクチノマイシンDに影響されない．γ：TOTAL の回復曲線は第二段階の回復を反映しているものと考えられるが，増殖を阻害しない濃度（1 μg/ml）のアクチノマイシンDによりγ：TOTAL の回復は阻害される．また第二段階の回復は細胞分裂をともなうので，組換え(recomobination)による回復である可能性が強い[20]．

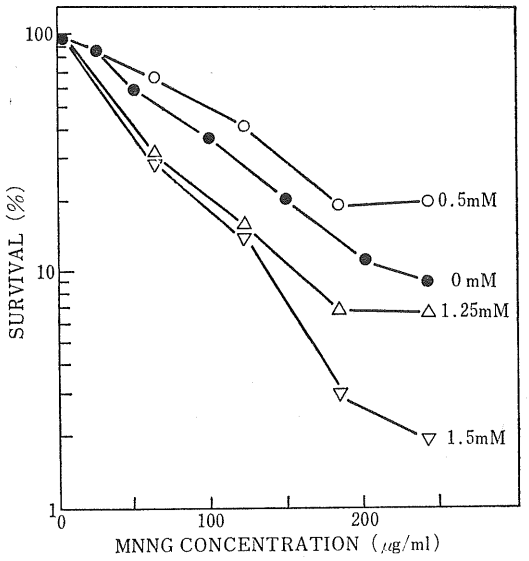


Fig. 5 MNNG 抵抗性とカフェインによる増感

MNNG に対する抵抗性とカフェインの増感

細菌を含まない axenic 液体培地中で増殖中の Ax-2株に，25～250 μg/ml の濃度に MNNG を添加し10分間22°で培養する．MNNG 処理後，遠心分離器を用いて，axenic 液体培地で3回洗い，0～1.5 mM のカフェインを含む寒天培地に細菌とともにまいて，22°で培養した．生存率は NC-4株と同様にプラーク形成能から求めた．低濃度ではかえって生存率が高くなるということもあるが，一般に γ 線障害の場合と同様にカフェインは MNNG による障害の増感作用が認められた．(Fig. 5)

MNNG による障害からの回復に与えるカフェインの効果

axenic 培養液で増殖している Ax-2株を 100 μg/ml の MNNG 中で10分間培養し，処理後遠心器により axenic 培養液で3回洗い，22°で振盪培養した．γ 線の場合と同様に，一定時間毎に一部を取り出して細胞数を測定し，他の一部をカフェインを含まない寒天培地と1.25 mM のカフェインを含む寒天培地にまいて培養し，プラーク数を測定した．100 μg/ml の濃度の MNNG 処理では，全細胞数で約10時間の分裂遅延があり，その後未処理の細胞とほぼ同じ率（倍加率約12時間）で増殖した．増殖可能な細胞の回復曲線は，カフェインを含まない寒天培地にまいたものも，カフェインを含む寒天培地にまいたものも，γ 線の回復とほ

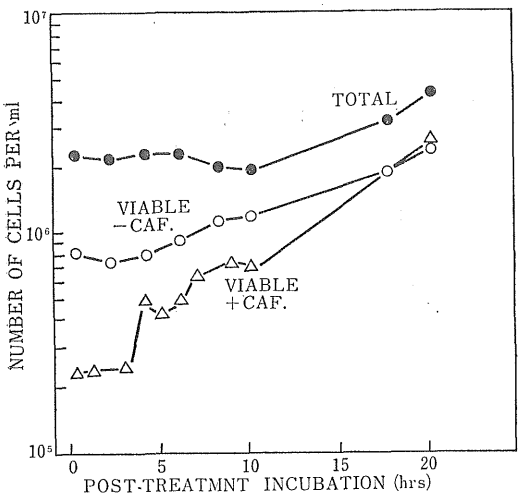


Fig. 6 MNNG障害からの回復とカフェインの効果

ぼ同じパターンを示した. (Fig. 6)

4. 結　論

細胞性粘菌は γ 線に対して極めて高い抵抗性をもち，増殖に影響しない濃度のカフェインで放射線障害が増感される．カフェインの増感作用は回復過程の阻害の結果であり，この回復過程は比較的短時間におこなわれるものと，細胞分裂にともなっておこなわれるものと二段階にわかれて回復する．放射線と類似の作用を有する化学物質 MNNG は同様にカフェインで増感され，γ 線障害と同様な回復のパターンを示した．

細胞性粘菌は単細胞生物で，分裂するとただちに分離して培養液中に分散し，高等動物の培養細胞のように分離のため処理をする必要がなく，顕微鏡を用いた血球計算盤による測定や，比濁法，コールターカウンターによっても細胞数の測定ができる．またプラーク状のコロニーを形成し，化学物質等で処理していないもののプラーク形成能は100% であり，化学物質で処理したもの等種々の状態の細胞の無限増殖能を容易に調べることができる．倍加時間は Ax-2 株で 8～12 時間で手頃である．

このように細胞性粘菌は細菌を取扱う手軽さで，高等動物の細胞と同様に用いることができ，放射線生物学的手法をそのまま使って解析することができる．また放射線と類似の作用をもつ化学物質の作用機構を調べるうえで有用な系である．今後は微量毒性物質の慢性障害ならびに複数作用源の相加的または相乗的効果の研究に関する可能性を検討してゆきたい．

5. 謝　辞

本研究の機会を与えて下さいました平野正先生，平賀興吾先生ならびに中尾順子先生に心から御礼申し上げます．

文　献

1) Bonner, J. T. : in The Cellular Slime Molds 2 nd ed., Princeton University Press. (1966)
2) 柳沢嘉一郎，山田卓三，小野記彦：動物学雑誌 78, 277 (1969)
3) Kananishi, N. and Yanagisawa, K. : *Gamma Field Symposia* 9, 19 (1970)
4) Sussman, R.R. and Sussman M. : *J. Gen. Microbiol.* 28, 417 (1963)
5) 山田卓三，柳沢嘉一郎，小野記彦：植物学雑誌 82, 171 (1969)
6) Kahan, F.M. and Hurwitz J. : *J.Biol. chem.*, 237 3778 (1962)
7) Schildkraut, C.L., Mandel, M., Levisohn, S., Smith-Soneborn, J. E. and Marmer, *J.* : *Nature*, 24, 795 (1962)
8) Hurwitz, J., Evans, A., Babinet, C. and Skaeka, A. : *Cold Spring Harber Symp. Quant. Biol.* 28, 59 (1963)
9) Boswell, V : and Filosa, M.F. : *Cellular Slime Mold Newsletter* 42 (1970)
10) 金西信次，渡部　真：日本放射線影響学会第13回大会，講演要旨 p. 20 (1970)
11) 金西信次，渡部　真：日本放射線影響学会第16回大会，講演要旨 p. 117 (1973)
12) 太田次郎：生物科学 20, 163 (1968)
13) 狩野文雄：東京都立衛生研究所年報： 24, 337 (1972)
14) Watts, D.J. and Ashworth, J.M. : *Biochem. J.* 119, 171 (1970)
15) 金西信次，渡部　真：遺伝学雑誌, 48, 423 (1973)
16) Deering, R.A. : *Science* 162, 1289 (1968)
17) Deering, R.A., Smith, M.S., Thompson. B. K. and Adolf, A.C. : *Rad. Res.* 43, 711(1970)
18) Metzger, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 101 (1964)
19) Domon, M. and Rauth A.M. : *Rad. Res.* 39, 207 (1969)
20) 金西信次，渡部　真，柳沢嘉一郎：遺伝学雑誌 47, 352 (1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 691 — 695, 1974

有機水銀化合物の細胞膜に対する障害作用

I. 能動輸送 Na^+K^+-ATpase の各種標品に対するメチル水銀の阻害作用

矢ケ崎しげ子* 原　　諭　吉** 中　尾　順　子*

Effects Of Organicmercury Compounds on Cell Membrans

I. Inhibition of Several Preparations of Active Cation Transport ATPase by Methylmercury

SHIGEKO YAGASAKI*, YUKICHI HARA** AND TOSHIKO NAKAO*

近来，化学工業，農業において大量かつ多種類の水銀化合物が使用され，蓄積されるに従いこれら水銀化合物の人体に対する作用が問題となってきた．これらの毒性発現機序を分子レベルで明らかにすることは，多種類の水銀剤中毒を系統的に理解し，それによって治療，予防を能率的に進める上で非常に重要なことである．

水銀化合物の作用点はほとんど細胞内であると思われるが，毒物がまず遭遇する細胞小器管はいうまでもなく細胞膜である．細胞膜は細胞内外を区別する境界としてのみならず，選択的透過性，能動輸送，喰喰，喰噉，興奮，分化，増殖の情報，各種ホルモン，薬物のレセプター等の情報およびエネルギー転換機構を保有するものとして近来注目されているが，薬物および毒物の作用機序を考える上で特に，最近の研究の重点とされている．

水銀化合物は，水銀利尿剤として腎細胞膜に作用すると考えられているほか，メチル水銀による各種の神経症状にみられたように[1-5]，細胞膜固有の機能と直接結びついた障害作用がみられるので，細胞膜に対する障害作用を研究することはとり分け重要と考えられる．

第一報ではメチル水銀を取り上げる．メチル水銀は，水俣病の原因物質であることから社会的要請が強いのみでなく，化学的には脂溶性，分子量が小さい，炭素と水銀の結合が強いという特徴を持つことも研究対象として興味深い．無機水銀の塩化第二水銀，および芳香族でかつ最も使用頻度の高いp-chrolomercury-benzoate（以下PCMBと略す）と並べて比較した．

用いた臓器はメチル水銀中毒症で強く障害を受ける脳を材料とした．ここに対象とした Na^+K^+-ATPase は Na^+ と K^+ の交換能動輸送を行なう実体であり，細胞膜を横切って存在することが確実で，また純化の研究の進んだ高等動物で唯一の酵素タンパクである[6]．本研究では精製程度の異なる四種の試料を用いて相互に比較することにより，酵素タンパクの障害作用と無傷細胞膜中における in situ の酵素の障害作用を推定した．

方　法

試薬

$HgCl_2$・（昭和化学，特級，含量99.5%）10^{-3}M水溶液とし，室温で保存した．

PCMB・（東京化成工業，含量98%）0.5N NaCl 中に 10^{-3}M の濃度に溶かし，4°C に保存した．

CH_3HgCl（東京化成工業，含量99.5%）0.9%NaCl 中に 10^{-3}M の濃度に溶かし，4°C に保存した．

酵素標品の調製

Schwartz[7] の方法を改変して用いた．

* 東京都立衛生研究所毒性部
160　東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan
** 東京医科歯科大学医学部生化学教室

①ミクロソーム

ブタ脳灰白質を9倍量の0.25Mショ糖，lmM EDTA PH 7.4 の溶液中でワーリングブレンダーで破砕し，Sorv all, GSA rotor で 10,000 rpm 20分間遠心し，その上清を日立65P. RP42rotor で 30,000rpm40分間遠心した．沈殿を1 mM EDTA に懸濁し，−20°Cに保存した．得られた酵素の比活性は約30，ウワバイン感受性 ATPase は76%であった．

②DOCミクロソーム

SKou[8] の方法を改変して用いた．ブタ脳灰白質を0.25M ショ糖，0.1% sodium deoxycholate, lmM EDTA を含むpH7.4の溶液を組織の9倍量加えてワーリングブレンダーで破砕し，Sorvall, GSA rotor で13,000rpm 20分間遠心した．上澄をさらに日立65P・RP 42rotor 30,000 rpm 30 分間遠心して沈殿を得，それを lmMEDTAで洗い lmMEDTAに懸濁し，−20°Cで保存した．比活性が約90，ウワバイン感受性が90%であった．

③NaI 酵素

中尾[9] の方法に従った．ミクロソームに終濃度が2 MNaI, 15mMTris-HCl (pH8.0), 0.01mM dithiothreitol (以下DTTと略す) になるように加え，O°Cで30分間ときどきゆるく攪拌しながら放置した．1.5倍容の1 mMEDTA を加えて日立 65P・RP42rotor で30000rpm 90分間遠心し，沈殿を 1 mM EDTA で3回洗い1 mM EDTA に濁懸し−20°Cで保存した．比活性は約130，ウワバイン感受性 ATPase は99.9%でウワバイン非感受性の ATPase 活性をほとんど含まない．

④Lubrol 抽出酵素

中尾[9] の方法に従った．精製した0.4% LubrolWX 中で，4 mg/ml の NaI 酵素をテフロン・ペッスルでホモジナイズし日立 65P・RP50rotor 50000rpm 60分間遠心して上澄部分を lubrol 抽出酵素とした．比活性約260，ウワバイン感受性ATPase は 99.9%であった．

酵素活性測定法

中尾[10]の方法に従った．

①Na^+K^+−ATPase 活性測定法

反応液は終濃度 NaCl 140mM, KCl 14mM, $MgCl_2$ 5mM, ATP 3 mM, EDTA 0.5mM, Imidazole-HCl 50mM (pH7.2) を含み全量で1 mlとした．37°C で加温して，遊離した無機りん酸を Fiske-Subbarow の方法[11] で測定した．ただし，lubrol 抽出酵素の場合は，Fiske-Subbarow 法の前に10% $NaHSO_3$ を含む4 % lubrol 溶液を終濃度0.4% になるよう加えた．反応液にウワバインを終濃度 2×10^{-4}M 加え，ウワバイン感受性の活性を Na^+K^+−ATPase 活性とした．

②予備加温

ATP と EDTA を除いた上記反応液に水銀化合物と酵素を加え37°Cで予備加温し，それに ATP を加えて全量1 ml とし活性を測定した．

③蛋白質測定

蛋白質の定量は Lowry ら[12]の方法で行ない．ウシ血清アルブミンを標準物質として用いた．

④比活性は Pi μ moles/mg puotein/h で表示した．

結　果

CH_3HgCl および $HgCl_2$, PCMB の比較的精製度の高い酵素標品に対する阻害を図に示した (Fig. 2). 酵素の蛋白質は各標品ともすべて 8μg/tube であり，ATPを除いた反応液中で37°C 予備加温を，DOC—ミクロソーム，NaI 酵素で5分間，lubrol- 抽出酵素で4分間行ない，ATP を加えて活性の測定を行なった．測定の時間はミクロソーム，NaI 酵素で 37°C 20分間，lubrol 抽出酵素では6分間である．その間の時間経過は直線であった．(Fig. 1) 蛋白質当りの比活性が最も高い lubrol 抽出酵素について三種の水銀剤の阻害をみると (Fig. 2-C) ほぼ同様な阻害曲線を示し，半阻害値も変わらないが，PCMB では低濃度側でやや阻害が強く，高濃度側では阻害がやや弱い．最も精

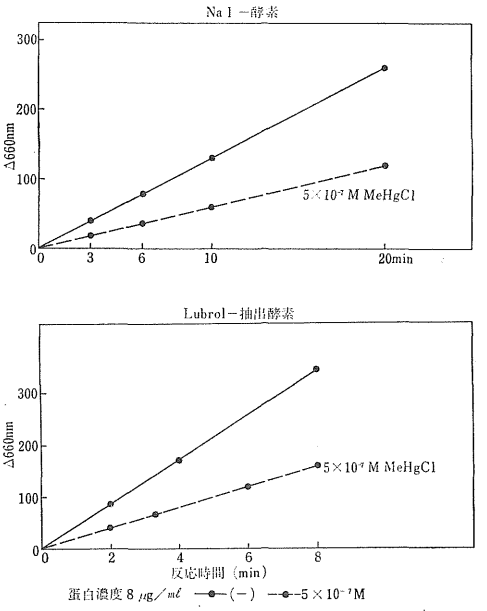
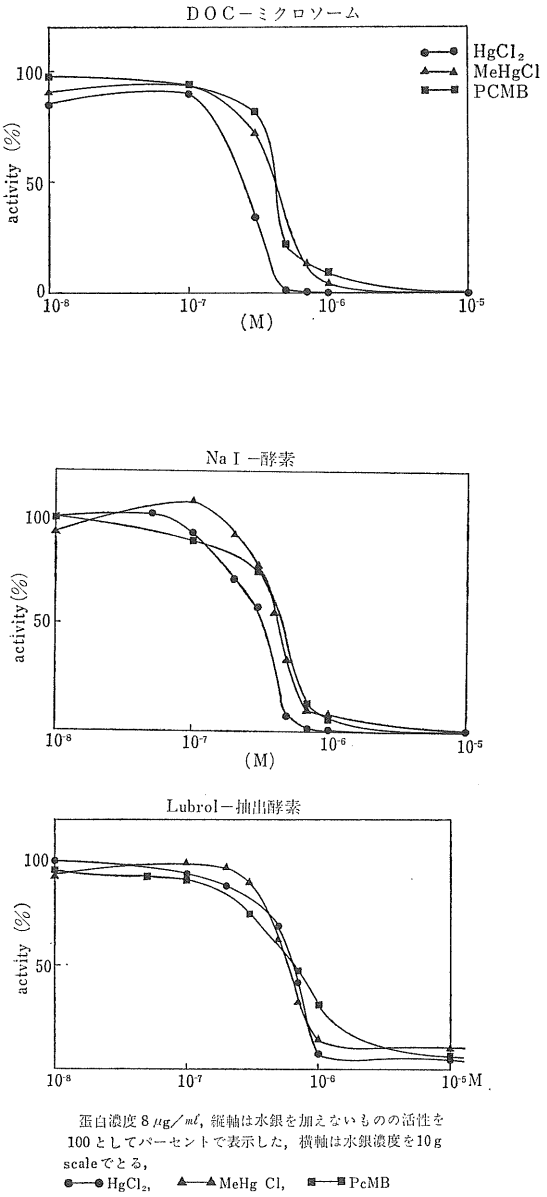


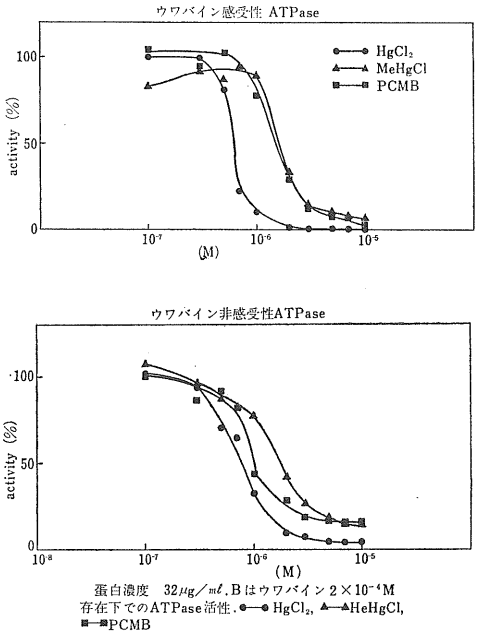
Fig. 1. 反応の時間経過



蛋白濃度 8 μg／mℓ，縦軸は水銀を加えないものの活性を100としてパーセントで表示した，横軸は水銀濃度を10g scaleでとる，
●—● $HgCl_2$，　▲—▲ MeHg Cl，　■—■ PcMB

Fig. 2. 水銀化合物の阻害曲線

製度の低いミクロソームでは CH_3HgCl と PCMB はほぼ同様な阻害曲線を呈する．Fig 3 は予備加温なしに行なった阻害実験の一例である．$HgCl_2$ では曲線が左にずれ 6×10^{-7}M 付近に Ki 値を示すが，CH_3-HgCl，PCMB ではほぼ 1.5×10^{-7}M 付近に Ki 値を示す曲線となっている．同時に存在するウワバイン非感受性の ATPase に対する阻害をFig. 3 -Bに示した．



蛋白濃度　32μg／mℓ．Bはウワバイン 2×10^{-4}M 存在下でのATPase活性．●—● $HgCl_2$，▲—▲HeHgCl，■—■PCMB

Fig. 3. ミクロソームに対する水銀化合物の阻害曲線（予備加温　）

3種の水銀化合物は，それぞれ $Na^+\cdot K^+$-ATPase に類似した阻害曲線を示した．

次に，NaI 酵素を用いて蛋白濃度の影響を調べた．蛋白濃度8μg/ml の時，5×10^{-6}Mの濃度の CH_3HgCl は約70%の阻害を呈する．この CH_3HgCl 対蛋白質濃度比を一定にし，用いる濃度を2倍，5倍に上げて阻害の割合を調べた．表に示すように，この濃度範囲内

Table 1　蛋白質濃度の影響
活性は Control を 100とした．

CH_3HgCl(M)	Enzyme(μg/ml)	activity(%)
5×10^{-7}	8	25.4
10^{-6}	16	27,0
2.5×10^{-6}	40	25,2

では比が一定であれば濃度に関係なくあらわれる阻害の程度は同じであった．また，蛋白質濃度を 8 μg/ml から 80μg/ml と10倍にして Ki 値を求めると，得られた Ki 値もまた 3×10^{-7}M から 2.2×10^{-6}M と酵素蛋白量に比例して増加した．それゆえ，この阻害は酵素反応条件下では事実上不可逆反応である．

次に，CH_3HgCl で阻害された NaI 酵素に EDTA および cysteine，DTT を含む溶液を4倍量加え，

良く攪拌した後日立 65P・RP50 rotor で50000 rpm 30分間遠心し，沈殿を水に懸濁して，その一部を取り活性を測定した．

Table 2 CH_3HgClの阻害に対する EDTA. cysteine, DTT の影響

CH_3HgCl(M)	Washing(mM)	Activity(%)
10^{-5}	—	11.8
	EDTA 1	12.0
	EDTA 1 cys. 1	53.9
	EDTA 1 cys. 10	58.8
	EDTA 1 DTT 10	61.2
※10^{-5}	EDTA 1	2.1
	EDTA 1 DTT 10	93.0

NaI 酵素80μgと上記 CH_3HgCl を加えて全量1 mlとし37°C 5分間予備加温する．10mM imidazole bnffer pH7.2にそれぞれ EDTA, cysteine, DTT を含む溶液4 mlを加える．遠心後，沈殿を1 ml の水に懸濁して活性測定に用いた．※洗液を加えた後37°C 5分間さらに予備加温した．活性は control を100とした．

表2で示すように CH_3HgCl による阻害は 1mM EDTA ではほとんど回復しないが，1mM EDTA にそれぞれ 10mM cysteine, 10mM DTT を加えると約50%の活性の回復がみられた．さらに 10mMDTT を加えた後，37°C 5分間反応させると阻害は90% 回復した．CH_3HgClの阻害はキレート剤である EDTA では減少しないが，SH 剤である cysteine あるいは DTT で活性の回復がみられた．

考　察

表1より，メチル水銀の阻害は SH 剤を含まない条件では不可逆的反応である．

蛋白質を 8 μg/tube にして各精製段階で得られた酵素標品の Ki値を求めると，各標品は比活性が異なるにもかかわらずほぼ同一の Ki 値を示した．このことは，水銀化合物が Na^+K^+-ATPase 標品に結合する場合，本酵素とほぼ同じ親和性で各種の膜タンパクとも結合することを意味し，Na^+K^+-ATPaseであらわれる阻害とほぼ同様の障害を膜に対しても及ぼしている可能性を示している．またこのことは，メチル水銀が低分子量でかつ脂溶性が大きく，立体障害が少ない性質であるため，各種の生体内防御機構や脳血液関門等を容易に突破する可能性が高いことも示している．メチル水銀による阻害はキレート剤である EDTA では回復しないが SH 剤である DTT, cysteine で回復する．cysteine により DTT と同程度によく回復することは，メチル水銀が炭素と水銀の結合の強い安定な一価の試薬として作用していることを示唆している．二価試薬として働く Hg^{++}・Cd^{++}，また二価の試薬とは異なりさらに変化し易い PCMB とも異なる可能性がある．このことは，メチル水銀中毒の予防または治療に SH 基を一個のみ持つ cysteine や penicillamine が有効であるとして実際に使用されてはいるが，ジチオール化合物たとえばＢＡＬのように毒性の強い物質をあえて使用する必要はないとする理論的根拠につながっている．今後検討すべき問題である．

最も精製度の低いミクロソームは，細胞内の細網内皮系 ER が小胞状をなしているが，$HgCl_2$ と PCMB, CH_3HgCl が異なる阻害を示すにもかかわらず，共存したウワバイン非感受性 ATPase に対してもそれぞれ Na^+・K^+-ATPase と同様な Ki 値で阻害する．このことは，酵素活性と関係のあるＳＨ基が両酵素ともそれぞれの水銀化合物に対して同程度の親和性を示す．すなわち，おのおのの水銀化合物は蛋白質のＳＨ基に対してどのＳＨ基にも同様に作用することを示唆している．

また，小胞状の膜にうら，おもてがありウワバイン感受性およびウワバイン非感受性 ATPase ともに膜のうら，おもてに面しているはずであるが，三種の水銀化合物がかなりの速度でその官能基の存在する場所に侵入できたことを示唆している．

メチル水銀中毒は種々の神経症状を呈することが知られている．ところで，水銀化合物は神経細胞膜の Na^+・K^+-ATPase を強く阻害し，また神経の活動には多量のイオンの細胞膜を越えての移動を伴うことを考え合わせると，メチル水銀の神経系への障害の一部は，メチル水銀が神経細胞膜と反応してイオンの能動輸送を阻害することにより引き起こされるのかもしれない．しかし，また前記に提起した如く，メチル水銀が Na^+・K^+-ATPase のＳＨ基と同じように他の蛋白質のＳＨ基にも反応性を示す可能性があることから，細胞内器管のあらゆる部分に侵入して，すべてのSH-蛋白に結合することが，重大な障害を生む原因とも考えられる．

要　約

メチル水銀はブタ脳 Na^+・K^+-ATPase を強く阻害する．蛋白質濃度によって半阻害の値は変化するが，採用した測定条件では10^{-7}Mの桁であった．この価は $HgCl_2$, PCMB の場合と余り異ならない．精製度の比

較的高い，三種の精製段階の異なった酵素標品を比較した場合でも同様な阻害曲線を示した．メチル水銀が立体障害や特定のバリヤーによる侵入障害を受けにくいことおよび他の蛋白質のSH基にもほぼ同様な親和性を示すことが示唆された．最も精製度の低いミクロソームを用いて予備加温なしに行なった実験では，$HgCl_2$ よりもメチル水銀の阻害度はやや悪くなり，PCMB と同程度であった．この標品で $Na^+ \cdot K^+$-ATPase と共存する他の ATPase もほぼ同程度の Ki 値で阻害された．

メチル水銀の阻害は EDTA では回復しないが，DTT, cysteine では回復する．

文　献

1) Hunter, D. and Russel, D. S: *J. Neutrol. Neurosurg. Psychiat.* 17, 235-241, (1954)

2) Takahashi, T., Sato, Y., Shiraki, H.&Ukita, T. : *J.Hyg.Chem.* (Japan) 17, 93—107 (1971)

3) 白木博次：科学，34, 8—17, (1964)

4) "Methylmercury in fish" *Nord. Hyg. Tidsky. Suppl.* 4 (Engl, translation) (1971)

5) Bcikir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N. Y., Tiriti, S., Dhahin, H. I., Clarkson, T. W., Smith, J. C., and Doherty, R. A.: Science, 181, 230—240 (1973)

6) Nakao. : Life Science (in Press)

7) Schwartz. A., Bachelard, H. S., and Mcilwain,H. : *Biochem. J.*, 84, 626—634, (1962)

8) Skou, J. C. : *Biochim. Biophys. Acta.* 58, 314—325, (1962)

9) Nakao, T., Nakao, M., Mizuno, N., Komatzu, Y. and Fujita, M., : J. Biochem., 73, 609—619 (1973)

16) Nakao, T., Tachima, Y., Nagano, K.,and Nakao, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 755—758 (1965)

11) Fiske, C. H. and Subbarrow, Y. H. : J. Biol. Chem., 66, 375—400 (1925)

12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, B. J., : J. Boil. Chem., 193, 265—272 (1951)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 697, — 701, 1974

馬腎精製イオン輸送 ATPase に対する界面活性剤，有機塩素剤および抗酸化剤の作用

厚井麻里* 長井二三子* 中尾順子*

Effects of Surfactants, Chlorinated Hydrocarbons and Antioxidant on Purified Horse Kidney Active Cation Transport ATPase

MARI KOI*, FUMIKO NAGAI* AND TOSHIKO NAKAO*

緒　言

ヒトに対する hexachlorocyclohexane, 2,2—bis (p-chloropheny) -1,1,1-trichloroethane などの中毒症状は神経系に関するものを主症状とし，痙攣毒といわれている．昆虫類に対する作用もヒト同様神経毒といわれている．中枢神経への作用は，神経系に関与する酵素系に対する障害と推定されている[1]．また魚腎に対する障害は，腎 Na^+・K^+—ATPase に対する阻害であるとしている報告もある[2]．

細胞膜に存在し，その細胞膜の一部を構成している酵素である Na^+・K^+—ATPase は，J. C. Skou[3]によってカニの神経膜に存在することが初めて記載され，その後多数の研究の結果から，Na^+, K^+ の濃度勾配を保つための能動輸送の本体であり，神経の興奮伝導に必須の成分であることも明らかになった．また，アミノ酸や糖などもこの酵素によって作られたNa^+の濃度勾配に従って細胞内に取り込まれるということも実験事実がよく証明するところであり，膜を横切って存在し膜の一部を成している酵素としては現在精製が最も進んでいる[4]．上に述べたように，この酵素が有機塩素系化合物の作用点であるという報告は蓄積されつつあるが[5]，何れもが未精製の酵素での実験結果であり，高度に純化された酵素を用いて作用を検討し直すことは毒性研究における作用機序解明のために成されなければならないと考え，既に毒性の知られている化学物質の二，三を取り上げ，馬腎から高度に精製した膜 Na^+・K^+-ATPase への *in vitro* の作用を調べ，実験結果から生体に与えた時の変化と合わせて考察した．

取り上げた化合物は，BHT (butylated hydroxytoluene)，界面活性剤，有機塩素剤である．

材料および実験方法

酵素は馬腎のミクロゾーム分画より中尾の[4]方法を変更して精製した Na^+・K^+－ATPase を用いた（精製法については，他の機会に発表の予定である）．各ステップにおける精製は表に示した．酵素は比活性 300～400μmoles Pi/mgprotein/hr のヨーカナトリウム処理酵素を用いた．活性測定法は中尾の方法に従い，タンパク測定は Lowry 法を用い，結晶アルブミンを標準とした．ウワバイン(強心配糖体)はこの酵素の特異的阻害剤であり，使用した酵素はウワバイン 10^{-4}M で完全に阻害を受け，Ki 値は 10^{-7}M であった．

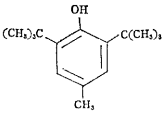
有機塩素剤としてγ-BHC(1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane), p,p′-DDT (2,2-bis(p-chlorophenyl-1,1,1-trichloroethane), PCP (pentachlorophenol) aldrin, endrin, dieldrin は分析用標準品を用いた．界面活性剤として ABS (alkylbenzenesulfonic acid, sodium salt), LAS (linear alkylbenzenesulfonic acid, sodium salt), SDS (sodinm dodecylsulfate), DOC (sodium deoxycholate), lubrol WX を用い，LAS は市販洗剤ネオペレックス F60 から再結，lubrol WX は中尾[4]の方法により精製，他は特級品を用いた．BHT は化成品を用いた．

* 東京都立衛研生究所毒性部薬理研究科
160 東京都新宿区百人町3—24—1
* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24—1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku
Tokyo, 160 Japan

表 1 ウマ腎 $Na^+ \cdot K^+$—ATPase の精製過程

髄質外帯8.2 g から	総タンパク量 mg	総 $Na^+ \cdot K^+$—ATPase 活性量 μmoles Pi/hr	$Na^+ \cdot K^+$—ATPase 比活性 μmoles Pi/mg/hr	ouabain insensitive %
ミクロゾーム分画	31.940	4873.1	139.0	15.0
ヨーカナトリウム処理ミクロゾーム	11.063	4182.2	343.2	3.0
ルブロール処理	2.143	2347.1	1095.1	0
P-セルローズ処理	0.362	944.7	2598.9	0

表2 BHTの性質およびウマ腎$Na^+ \cdot K^+$—ATPase に対する Ki 値

化合物名	構造式	溶解性	LD_{50} mg/kg 経口 ラット	LD_{50} mg/kg 経口 マウス	$Na^+ \cdot K^+$—ATPase Ki, M
BHT		エタノールに易溶（70%），各種有機溶媒に易溶，水に難溶	2000	2400	5.6×10^{-5}

ATP-2Na. は，協和醗酵の製品を用いた．活性測定，タンパク定量用試薬はすべて特級品を用いた．

酵素活性の測定は中尾の方法[4]に従い，ATP-2Na, 3mM, $MgCl_2$ 5mM, NaCl 140mM, EDTA 0.5mM imidazole-HCl buffer, pH7.4 を用い，全量0.5ml で測定した．酵素タンパクは通常 7μg 前後を用い，37°C 5 min, 孵置して遊離してくる無機リンを Fiske&SubbaRow[6]の方法で測定した．ギルフォード300N 分光光度計により660mμでの吸光度を測定した．比活性の単位は，酵素タンパク 1 mg 当り，37°Cで 1 時間反応させた時遊離してくる無機リンのμmole数で示した．

水に不溶，難溶の試薬はエタノールに溶解し，活性測定の時のエタノールの終濃度を 1 %以下として用いた．この濃度では酵素活性の変化は全く認められなかった．$Na^+ \cdot K^+$—ATPase は重金属イオンによって著しく活性を阻害され，活性を失ってしまうので，水の精製は特に注意して行なった．

結果

表 2 は腎臓髄質外帯より精製した酵素に対するＢＨＴの阻害度を示したものである．BHT は LD_{50} 値が示すように，一回投与では弱い毒性しか示さなかったにもかかわらず，酵素活性には強い阻害を示し，50% 阻害濃度（Ki値）は 5×10^{-5} M であった．図 1 に示すように，阻害率は BHT 濃度の対数に比例して増加する．

表 3 に有機塩素剤の阻害を示した．γ-BHC, PCP が他に比べてやや弱く，p, p′-DDT がやや強い阻害を示した．しかし，その差は 5 ～10倍であった．ドリン剤の阻害度は 3 検体とも良く似た値を示した．P,P′-DDT, endrin において阻害度と LD_{50} の逆転がみられた．

表 4 に界面活性剤の阻害を示した．LAS, ABS が阻害度が高く，LAS が ABS よりもやや強い阻害を示した．ソフト型として細菌による分解を受け易く環境の汚染が少ないといわれている LAS は，生体に対する影響の面から見ると，急性毒性試験においてはむしろ ABS より強い毒性を示し，亜急性毒性試験では両者に著明な差がなかったという結果[8]と考え合わせて興味がある．SDS, DOC, lubrol WX など他の界面活性の阻害度は余り高くなかった．

図 1 に示すように，有機塩素剤，界面活性剤においても，阻害率は，検体の濃度の対数に比例して増加する．

考察

馬腎髄質外帯より精製した $Na^+ \cdot K^+$-ATPase は．中尾等の発表[4]した豚脳$Na^+ \cdot K^+$-ATPase と並び，知られる限り最も純化されたものである．髄質外帯は組織学的には細尿管，特にヘンレの係蹄の存在部位に相当し，その部位の選択的分離が超遠心操作により成されたものである．腎臓の $Na^+ \cdot K^+$-ATPase と脳灰白質の $Na^+ \cdot K^+$-ATPase は，酵素作用も SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動上のタンパク部分にも差がなく，臓器による特異性は余りないものと考えられている．神経毒である有機塩素剤は，本報告が示すように腎精製 $Na^+ \cdot K^+$-ATPase にも強い阻害を示した．精製が進むにつれて阻害が強くなることは明らかになっ

表3　有機塩素剤の性質およびウマ腎 $Na^+ \cdot K^+$—ATPase に対する Ki 値

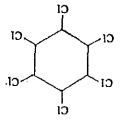
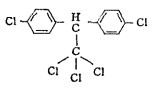
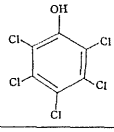
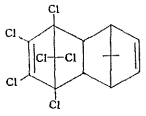
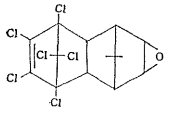
薬剤名		構造式	溶解性	LD_{50} mg/kg 経口 ラット	経口 マウス	経皮	$Na^+ \cdot K^+$—ATPase Ki, M
γ—BHC			エタノールに可溶(速溶), クロロホルム, ベンゼンに可溶, 水に不溶	125	74	140 (マウス)	2.8×10^{-4}
p, p′—DDT			エタノールに可溶(遅溶), 石油エーテルに可溶, 水に不溶	150～250	300～400	1000 (ラット) 250～500 (マウス)	2.5×10^{-5}
PCP			エタノールに易溶, 各種有機溶媒に可溶, 水に難溶	78	82	154 (マウス)	1.4×10^{-4}
ドリン剤	aldrin		エタノールに可溶(5%), アセトン, ベンゼンに可溶, 水に不溶	67～80	50	80 (マウス)	5.8×10^{-5}
	endrin		エタノールに可溶(4%), アセトン, ベンゼンに可溶, 水に不溶	♂ 40 ♀ 10	4～10	94 (ラット) 5～10 (マウス)	9.6×10^{-5}
	dieldrin	endrin と立体異性	エタノールに可溶(遅溶), アセトン, ベンゼン, 四塩化炭素に可溶, 水に不溶	46～87	38	370 (ラット) 76 (マウス)	3.6×10^{-5}

表4　界面活性剤のウマ腎 $Na^+ \cdot K^+$—ATPase に対する Ki 値

界面活性剤名			分子式	LD_{50} mg/kg 経口, ラット ♂	♀	$Na^+ \cdot K^+$—ATPase Ki, M
イオン	陰イオン	ABS	$C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na$	1700	2000	4.7×10^{-5}
		LAS	ABS の直鎖型	1575～1655	1850～1950	1.4×10^{-5}
		SDS	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	—	—	1.1×10^{-4}
		DOC	$C_{24}H_{39}O_4Na$	—	—	4.0×10^{-4}
非イオン		lubrol WX	$R\text{-}O\text{-}(CH_2CH_2O)_{10}OH$	—	—	0.068%
ouabain			$C_{29}H_{44}O_{12} \cdot 8\sim9H_2O$	—	—	2.7×10^{-7}

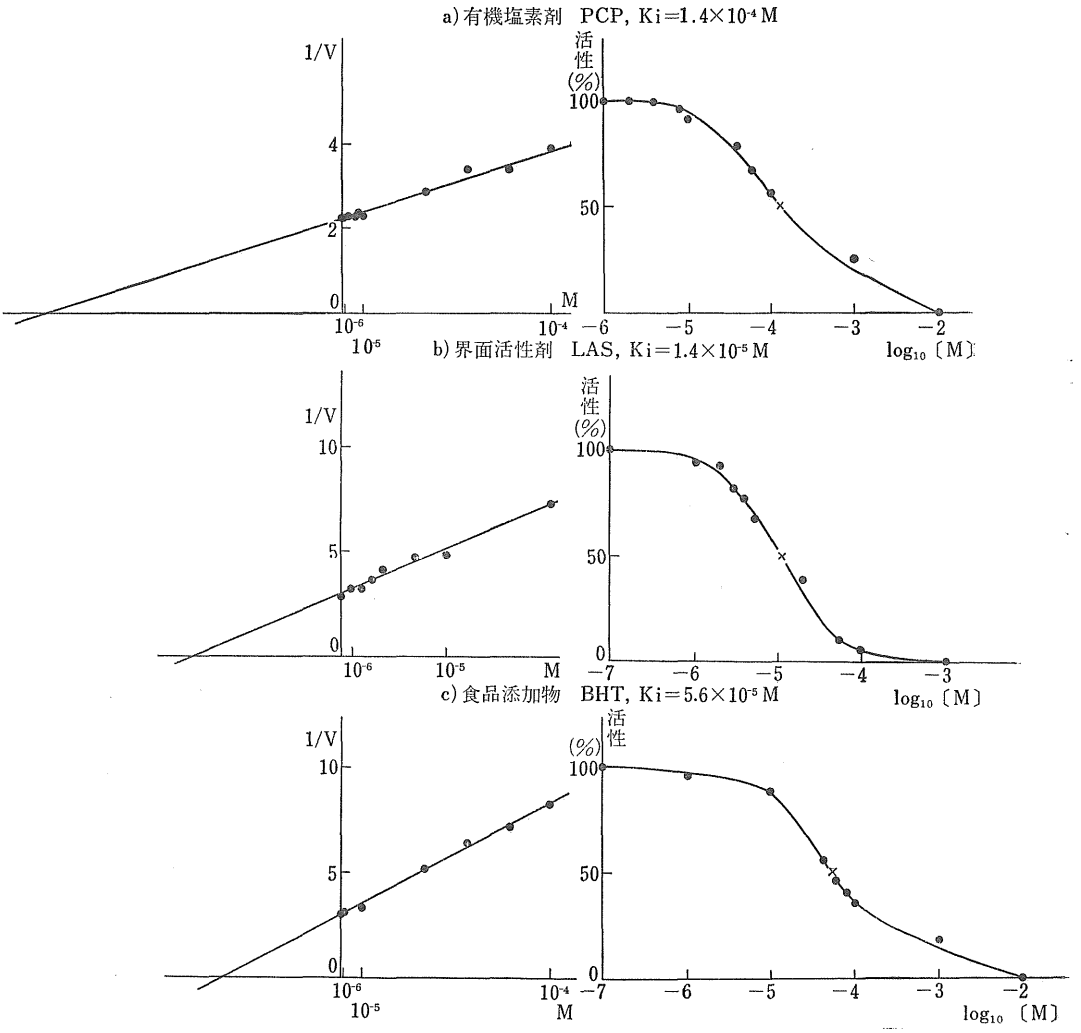


図1 ウマ腎 $Na^+ \cdot K^+$ -ATPase に対する阻害

た[5]．BHTは油類の酸化防止剤であり，われわれが日常摂取する油脂中に存在するものである．脳精製 ATPase に対しては弱い阻害しか示さなかったが[7]，腎精製 ATPase に対してはかなりの阻害を示した．今後，生体投与実験も含めて詳しい検索を必要とするが亜急性毒性試験[8]における腎組織の細尿管部位の障害と合わせて考えると興味ある結果であり，小動物における腎の病変の生化学的検出法の全くない現在，腎に対する障害の新しいスクリーニングの方法として使用できる可能性も考えられる．界面活性剤ＬＡＳの阻害作用は Ki 値が 1×10^{-5}Mであり，ABS の 4.5×10^{-5} に比べてやや高い阻害度を示した．ソフト洗剤については，環境破壊が少ない利点は認められるところであるが，生体に摂取された場合の毒性については ABS よりむしろ LAS の方に高い可能性もあり，この点に関しても今後生体投与と合わせ更に詳細な研究が必要である．

結語

日常生活に関連の深い化学物質についての高度に精製された細胞膜酵素に対する影響は，取り上げた物質が脂溶性のものは急性毒性値と比較した場合，むしろ微量長期間にわたって投与された場合の障害に近い結果を示したのではないかと考えられる．蓄積された毒物が脳，腎などの重要な機能を担っている部分にまで到達した時現われる作用が，この精製され，混在する他の成分を除かれた酵素タンパクに働く時の作用に反映しているのではないかと想像される．今後，広い範囲にわたった毒物によって更に深く検索し，理論の確立と毒性の究明を進めていかなければならない．

謝辞

最後に，馬腎臓を提供して下さった東京都芝浦食肉検査所の方々に感謝致します．

文献

1) Radelefe, R. B. : *Adv. Vet. Sei.*, 4, 265～273 (1958)
2) Yap, H. H., Desaiah, D, L., Cutkomp, K. and Koch, R. B. : *Nature*, 233, 61～62 (1971)
3) Skou, J. C. : *Biochem. Biophys. Acta.*, 23, 394～401 (1957)
4) Nakao, T. : *J. Biochem.*, 73, 609～619 (1973)
5) 科学技術庁研究調整局報告，s. 48
6) Fiske, C. H., SubbaRow : *J. Biol. Chem.*, 66, 375～384 (1925)
7) Kawai, K., Nakao, M., Nakao, T. and Katui, G. : *J. Clinical Inv.* in press
8) 市川久次他：都衛研年報，22, 231～249(1972)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.
25, 703 — 707, 1974

フィチン添加カドミウム食がメスラットに及ぼす影響

大西和夫* 関　博麿* 伊藤元彦*

Effect of Administration Phytin and Cadmium on the Female Rats

KAZUO OHNISHI*, HIROMARO SEKI* AND MOTOHIKO ITO*

Tama Branch Laboratory, ToKyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.

Effect of cadmium on the female rats was investigated with 12 nullipara albino rats about 75 days of age and about 140 g body weight of Wister Imamichi strain fed with diets containing cadmium and phytin as listed in Table 1.

The animals were divided into C and E groups and C group were fed non phytin diet and E group were fed phytin diet.

On 45th day (C group) and 48th day (E group) of experimental, the rats were killed and analysed.

1). The sex cycle of all rats wers abnormal, therefore uterus and ovary were examined with the microscop, but each organ was not marked variation.

2). Cadmium, calcium, magnesium and phosphorus contents in femur, liver and kidney were summarized on Table 2 and 3 from these results, phytin had not any influence on the maldeposit in each organ.

公害病といわれているイタイイタイ病の主原因であるカドミウム（以下 Cd とす）の吸収阻害を目的として，フィチンおよびフィチン酸ナトリウムを用いた透析膜による試験管内の基礎実験では，それらの物質は Cd と結合して，透析阻害にかなりの有効性があることを既に報告した[1]．そこで今回は，ラットにフィチンを含む Cd 食を投与した場合の出納と胎仔におよぼす影響について実験を計画した．

実験方法

使用動物は Wister-Imamichi strain の sister brother mating によって得た自家産白ネズミで，生後75日前後，体重 140 g 前後のメス12匹を，フィチン無添加の対照群と，添加した実験群の２群に分け，１群を６匹とし，１匹ずつ代謝カゴに入れ，Table 1 に示すそれぞれの実験飼料を投与し，飼料および水は自由に摂取させた．実験開始後15日目より♀２，♂１の割合で，夜間のみ同居させ，翌朝スミアをとって妊娠の有無を調べた．実験開始後，対照群は45日目，実験群は49日目に殺し，大腿骨，生殖器，肝臓，腎臓および脾臓をとり，大腿骨および腎臓は Cd, P, Ca および Mg を定量し，その他の臓器は組織学的検索を行なった．Cd, Ca, Mg は Perkin-Elmer 403 原子吸光光度計，Pは比色の Gomori[2] 法によって定量した．

飼料中の Cd 量はいずれも 20mg%，実験群に添加したフィチン0.04%は，Pとして 6,3mg%，Ca 7,5mg %を含んでいる．

結果と考察

体重：Fig 1 に体重曲線を示す，各動物とも，それぞれの飼料を投与した翌日より軟便，つづいてかなり激しい下痢便となって，Cd中毒様症状を呈し[3]，屎，尿とが混じって分離採取することができず，第１の実験目的であった Cd の代謝を観察することを断念しなければならなかった．ラットの外観は阿部らの報告[4]と

* 東京都立衛生研究所　多摩支所
190　東京都立川市紫崎町 3—16—25
* Tama Branch Laboratory,
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16—25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 190 Japan

同じく2週目頃より鼻，口の周辺に出血し，毛並が悪く，赤味を帯び，粗毛が目立ち，骨張り，るいそうを感じさせた．

体重はノコギリの歯のように増減しながらも，一応は増加し，フィチン添加群が対照群よりもやや優位であった．4週における対照群の，また，6週における両群の体重低下は不明であるが，これはCdを添加しない通常の飼料を与えたラットに比べ，両群とも，摂食，吸水量が少なく，Cdの毒性[3-4]のために栄養障害が起こったものと推察される．

3週目より，スミア鏡検によるSpermaの有無を調べたがSpermaは認められず，スミアは性周期の乱れを思わせるような状態であったが，一応6週まで，土，日の夜をのぞいて毎晩交配をはかったが，Spermaを認めることができなかった．子宮，卵巣の肉眼的所見では対照群の卵巣はやや萎縮が見られたが，組織学的所見では，両群の組織破壊は起こっていない，しかし，黄体，子宮の形態からみて，発育した大形の正常卵胞が存在する可能性は極めて薄く，もし正常な性周期を示しているラットならば，解剖至近時の次回排卵にいたると思われる中大形の卵胞の発育が見られるはずであるが，それがなかった．子宮および黄体の所見からしても，両群とも性周期は異常と考えられるが，この休止期が，持続性のものかあるいは一過性のもので，Cd投与を中止し，正常飼料に戻せば，また正常性周期なを示すものかは不明であるが，それについては今後更にたしかめたい．たとえ一過性であっても性周期に異常をきたし，休止期となったことは，何らかの因子が作用するものであろうが，Cd 50 ppmを投与したラットでは妊娠分娩[5]しているし，組織所見から考えても，Cdが不妊の直接原因となったとは考えられない．ただ，交配前に2週間Cd食を与えたこと，飼料の摂取量，吸水量が少ない（おそらくCdの毒性に起因するのであろう）ことから見て，ラットは間接的な給水制限[6]の状態となって栄養障害，代謝障害が起こり，ストレスが加わって，排卵，性周期の異常をきたしたのではないかと考えられる．

骨中のCd，CaおよびP含量：開腹して取り出した両側の大腿骨の筋肉をできる限り取り除き，エーテル還流によって脱脂，風乾したものを脱脂乾燥骨とし，そのg当りのそれぞれの含量をTable 2に示す，450°Cで灰化した灰分%は両群とも差はないが，Cdは当初の予想に反し，フィチン添加群の方が逆に，無添加群よりも多く，Caは添加群の方が少ない．PおよびCa/P比2.1は文献的[7-9]にも異常値とはいえないし，両群間に有意差は認められない．骨中のCd量については多くの報告があるが，Cd塩の形，投与期間および共存ミネラルが関係すると思われるが，阿部[4]らが本実験と同じ組成飼料であるCd 23mg%，Ca 510 mg%，カゼイン20mg%の飼料を4週間投与したものでは，0.36mg%のCd沈着があったが，骨中へのCd蓄積にはたんぱく量の差やCaの有無による影響はないとしている．本実験では両群の出納観察を行なっていないため，フィチン添加がCd，CaおよびPの体内保留および排泄にどの程度効果があったかは不明であるが，骨中のCdおよびCa量を見るとフィチンはCdの骨沈着を促し，その分だけの脱Caを起こしているように見られる．正常食（Ca 0.6%）を投与したラットの脱脂乾燥大腿骨の灰分量64.9%の場合Ca量は27.0%，P量12.1%で，Ca/P比は2.1であったので[8]，この数値を用い本実験値について一つの計算を試みた，本実験の骨灰分量は64.3～65.1%，P量は111.4～111.9mg%，Ca/P比は2.1～2.2で正常食投与の場合とほぼ同一と考えられるから，Cdを添加しない場合の大腿骨中のCa量を27.6%と仮定すると，本実験動物の対照群では270−247=23mgの脱Caが起こり，Cd 1.59μgと交換した．つまりCd 1 μgがCa 14.5μgとexchangeしたと考えてよい．実験群についても同様な計算をすると，270−234=36mgのCaと2.46μg（36/2.46=14.6μg）のCdがexchangeしたと考えられ，骨から溶離するCa量と沈着するCd量との間には量的に関係があることを思わせる．フィチンは一般には難溶性で，体内においても，フィチン酸は2価のミネラルと結合して，難溶性のフィチンとなり，腸管よりの吸収はさまたげられるといわれ，これが教科書的定説になっているが，原料によっては抽出されたフィチンが可溶性のものもあるし[10-11]，前報のin vitro実験ではフィチン酸およびフィチンはCdと結合し，透析を阻害した．しかしin vivoの実験においてフィチン添加の場合はかえってCdを体内に取り込む状態になったが，これはラットはヒトと異なりフィチンを利用する能力がある[12]ためかも知れない．

肝臓および腎臓中のCd，Ca，MgおよびP含量：Table 3にその分析結果を示す．

肝臓：実験群の重量は対照群より少ないが，Cd，およびP量は対照群より多い．肝臓はCdの蓄積部位とされているが，ここでもフィチンの作用が影響して実験群はCa蓄積が少なく，体内におけるCdとCaは種々関係あるが，Mgも Cd との関係は深いようで

Table 1. Diet Composition (%)

	Control group	Experimental group
Starch	39.86	39.82
Glucose	30.00	30.00
Casein	20.00	20.00
Soybean oil	5.00	5.00
Salt mix[1)]	4.00	4.00
Vit mix[2)]	1.00	1.00
Choline chlonide	0.10	0.10
Cadmium chloride	0.04	0.04
Phytin	—	0.04
Cd	20mg%	20 mg%
Ca	528mg%	533 mg%
P	315mg%	321 mg%

1) According to A. E. Harper (J. Nut., 68. 405, 1959)

2) One gram of this mixture contain (in milligram) : thianin nitrate 1.0, riboflavin 1.5, niacin amide 10.0, pyridoxine hydrochloride 1.0, folic acid 0.15, ascorbic acid 37.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin K 0.2, α-tocopherol 1.0, vitamin B_{12} 1γ, vitamin A 2,500 IU, viamin D 200 IU.

Table 2. Cadmium, Calcium and Phosphorus Contens in Femur (per g fat free femur)

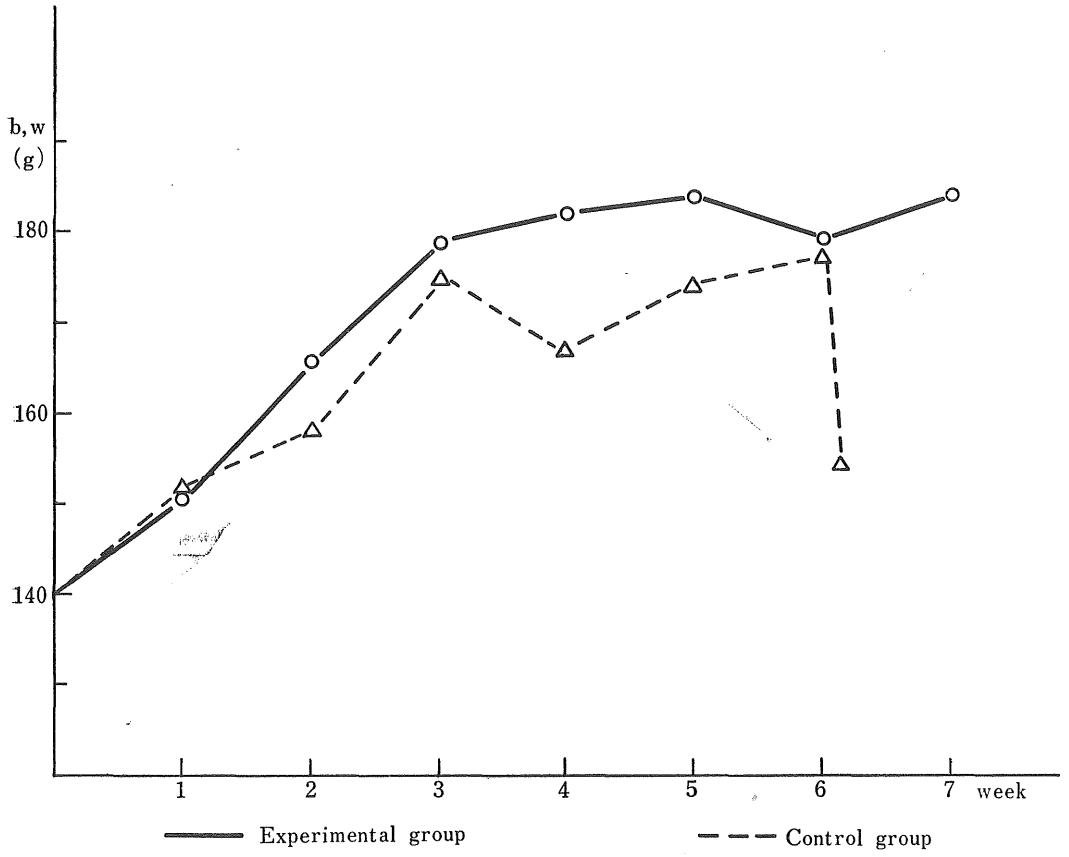
Group	Ash (%)	Cd (μg)	Ca (mg)	P (mg)	(Ca/P)
C	64.31	1.59	246.77	111.37	2.21
E	65.13	2.46	234.17	111.89	2.10

mean of 6 Rats C : Control group E : Experimental group

Table 3. Cadmium, Calcium, Magnesium and Phosphorus Contents in Liver And Kidney (per g of wet tissue)

	Group	Wet weight (%)	Cd (μg)	Ca (μg)	Mg (μg)	P (mg)
Liver	C	9.36 (6.26)*	27.37	46.00	182.84	2.81
	E	8.06 (4.35)*	36.53	23.22	221.55	3.48
Kidney	C	1.32 (0.89)*	59.27	13193	222.78	2.88
	E	1.29 (0.70)*	66.95	170.74	241.45	3.09

mean of 3 Rats C : Control group E : Experimental group * : Percent of body weight



Fig—1 Growth Curve

in vitro では Mg は Ca よりも Cd との親和性は強かった.

腎臓：重量は両群の間に差はないが，ミネラル量は実験群の方が多い．Cd 中毒に関しての実験は数多くあり，そのいずれの報告[13-14]も Cd の体内残留部位は肝臓と腎臓であるとされている．本実験においても実験群の方が，フィチンを適当に利用して Cd を多く取り込んでいる結果となった.

肝臓，腎臓および脾臓の組織学的所見では両群の間に変化の差はなく，組織の破壊は起ていない．関[15]が200ppm の Cd 食を3月間投与したマウスの肝臓，腎臓についても組織に著変が見られなかったと報告しているので，この程度の Cd 量を短期間投与したのでは，組織の破壊は起らないようである.

以上の結果から 200ppm Cd 食を投与したラットは Cd の毒性による栄養，代謝障害，ストレスによって性周期の異常をきたして妊娠しない．大腿骨は脱 Ca を起し両群とも Cd 1 μg と Ca 14.5mg が exchange している.

フィチン添加は Cd の骨，肝臓および腎臓への沈着を促す結果となった,

200ppm 程度の Cd 食ではメスの生殖器，肝臓および腎臓の組織破壊は起らなかった.

要　約

Cd の吸収阻害の目的をもって生後75日前後，体重140 g 前後で妊娠経験のない成熟メスラットにフィチン添加の 200ppm Cd 食を投与し，骨，生殖器，肝臓および腎臓におよぼす影響を観察した.

1) 飼料投与の翌日よりラットは軟便，下痢便となって摂食，吸水量が少なく，体重の増減が激しく，鼻部周辺に出血を見て Cd の毒性による症状を呈した.

2) スミアは性周期の乱れを思わせた．子宮，卵巣の組織は破壊されていないが，黄体，卵胞の正常発育はなく，性周期は正常に return していない.

3) 骨の Cd 沈着はフィチン添加群の方が多く，Cd 1 μg 当りの脱 Ca はいずれも 14.5mg 前後である.

4) 肝臓および腎臓についてもフィチン添加群の方が，Cd の沈着が多かった．しかし，組織に著明な変化は認められなかった．

in vitro においては Cd 透析阻害に有効性があったフィチンも，ラットの体内においては，あまり吸収阻害の有効性を示さず，かえってフィチン態のリンを利用して Cd の蓄積を促したようである．

謝辞

稿を終るに当り，組織標本を作製，検索していただいた多摩食肉衛生検査所渡辺主査に深謝する．子宮，卵巣の組織学的検索および助言を賜わった農林省家畜衛生試験所本間技官に深謝する．

〔付記〕

本研究の概要は第28回日本栄養食糧学会総会昭和49年5月24日に発表した．

文　献

1) 関　博麿，大西和夫：栄養食糧学会第27回総会 48年5月19日発表，栄養と食糧　投稿中
2) Gomori, G.: *J. Lab. Clin. Med.*, 27, 955—958 (1942)
2) Stephens, G. A.: *J. Induster. Hyg.*, 2, 129—132 (1920)
4) 阿部登茂子，田中清介，糸川嘉則：日衛誌，27, 308—315 (1972)
5) 菅原直毅，長野千枝子，照井和幸，岡田　晃：日衛誌，28, 270—275 (1973)
6) 本間　　私信，農林省家畜衛生試験所
7) Likins, R. C., Bavetta, L. A. and Posner, A. S, : *Arch. Biochem., Biophy.*, 70, 401—403 (1957)
8) Gotho, S. and Seki, H. : *Phsiol bohemoslov.*, 15, 538—545 (1966)
9) 沢村経子，五島孜郎：栄養と食糧，25, 597—601 (1972)
10) 森　治夫：栄養と食糧，16, 442—445 (1963)
11) 高橋　　私信，ノートルダム清心女子大
12) 山本美枝子，大井康子，中村亮八郎：栄養と食糧，14, 312—317 (1961)
13) Bonnel, J. A., Ross, J. A. and King, E. : Brit., J. *Industr. Med.*, 17, 69—80 (1960)
14) 小林　純，中原裕子，長谷川利子：日衛誌，26, 401—406 (1971)
15) 関　幸雄：日衛誌，28, 284—293 (1973)

東京衛研年報
Ann. Rep. Tokyo Metr.
Res. Lab. P. H.
25, 709—717, 1974

フレームレス原子吸光法による微量金属の測定法に関する検討

笹野英雄* 押田裕子* 栃本博* 黒田静夫*

Detecting a Trace of Metals by Atomic Absorption Spectrometry using a Graphitd Furnace Atomizer.

HIDEO SASANO*, HIROKO OSHIDA*, HIROSHI TOCHIMOTO* AND SHIZUO KURODA*

The recent development of flameless atomizers in atomic absorption offers the opportunity for the development of a rapid method for the determination of a trace of metals.

The application of the graphite furnace atomizer in atomic absorption technique made a sensitive analytical method, which is highly suitable for the analysis of a trace of metals in water and blood, especially when blood must be drawn from children.

The graphite tube system developed can be used for any of a number of atomic absorption spectrophotometers and is better suited for routine analysis.

In this report, there is described the application of flameless method in extremely small quantites of blood serum.

緒　言

分析の普及により，微量金属の定量が容易に在では炎による原子吸光分析法が広く行なわる．

Graphite tube に電流を流し加熱することにtube に注入した金属元素を原子化するフレー原子吸光分析法[1]が開発された．この方法は中で微量の試料がすべて測定に供されるため，て高感度であり，フレーム法にくらべ比較的干渉ない点から，再現性，感度，干渉など種々の検[2-6]が行なわれている．この方法を用いて，飲料水，水中の微量元素[7]，海水中のカドミウム，血液中[9-12]鉛など種々の微量元素の定量を行なった報告がある．

近年環境汚染等により，水，食品，空気，生体試料（血液，尿等）などの分析試料が増加し，分析時間の短縮（前処理の簡単な方法）化が要望されている．そこでわれわれは工場排水，河川水中および血清（血液）中の微量金属の測定にこの方法を活用するために種々の検討を行なったので報告する．

実験の部

装　置

島津製作所製 AA—610 型原子吸光分光光度計に同社製 GFA—1 を組合せたものおよびパーキンエルマー社製403型原子吸光分光光度計に同社製 HGA—70を組合せたものを使用した．光源にはおのおのの単一中空陰極ランプを用いた．

試薬類

カドミウム，鉛，クロム，銅，亜鉛の標準溶液：和光純薬製原子吸光分析用（1000 ppm）を原液として用いた．

塩酸，硝酸，硫酸：精密分析用（SSG）を用いた．

MIBK：特級試薬に蒸留水を飽和させたものを用いた．

* 東京都立衛生研究所多摩支所
190 東京都立川市柴崎町3—16—25
* Tama Branch Laboratory
Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16—25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, Tokyo, 160 Japan

Table 1-1. Standard Conditions

Element (At. V)	mp (bp)	Instrument	Wave Length (Å)	Lump current mA	Slit	Detection Limit S/N=2	Program
Cd (112.40)	320.9 (767)	AA-610	2283	10	0.1nm (1.9Å)		
		PA-403		8	UV 4		
		GFA-1				1×10^{-12}g	
		HGA-70					4
Cu (63.546)	1083 (2595)	AA-610	3247	10	0.1nm (1.9Å)		
		PA-403		15	UV 4		
		GFA-1				1×10^{-11}g	
		HGA-70					7
Pb (207.2)	327.4 (1750)	AA-610	2833	10	9.1nm (1.9Å)		
		PA-403		35	UV 4		
		GFA-1				1×10^{-10}g	
		HGA-70					5
Cr (51.996)	1905 (2200)	AA-610	3579	10	0.1nm (1.9Å)		
		PA-403		25	UV 4		
		GFA-1				2×10^{-11}g	
		HGA-70				1×10^{-10}g	7
Zn (65.38)	419 (901)	AA-610	2139	10	0.1nm (1.9Å)		
		PA-403		15	UV 4		
		GFA-1				2×10^{-12}g	
		HGA-70				3×10^{-13}g	3

For GFA−1 and HGA−70

Standard Conditions (Solid Sample)				Gas flow	Cooling	Linearity
V	Drying	Ashing	Atomizing	kg/cm²	Method	
				N_2gas 2−3 kg/cm²	H_2O	Cd (0.01 ppm) (5−100 μl) 5×10^{-5}− 1×10^{-3} μg
	3 (40) sec	5 (180)	7 (10)			
6.5	(40)	(180)	(20)			
						Cu (0.1 ppm) (5−100 μl) 5×10^{-4}− 1×10^{-3} μg
	3 (90)	4 (90)	8 (20)			
9	(40)	(90)	(20)			
						Pb (1 ppm) (5×100 μl) 5×10^{-3}− 2×10^{-2} μg
	3 (40)	4 (90)	7 (20)			
9	(40)	(90)	(20)			
						Cr (0.1 ppm) (5×50 μl) 5×10^{-4}− $5\times10^{-3}\mu$g
	3 (90)	4 (90)	8 (20)			
9	(90)	(90)	(20)			
						Zn (0.01 ppm) (0−50 μl) 0−5×10^{-5} μg
	3 (30)	4 (15)	6 (10)			
5	(30)	(15)	(20)			

Table 1—2 Graphite Furnace Atomizer (GFA-1 type)

Curr. Adj. No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Drying	A	4	9	12	17	21	26	31	41	70	100
	V	0.5 ～ 5 V									
Ashing	A	0	8	21	42	62	83	108	131	153	173
	V	1 ～ 15 V									
Atomizing	A	0	22	42	65	157	171	202	232	256	282
	V	2 ～ 20 V									

有機物質：L-グルタミン酸・グルコース等量混合液を用いた．

陰イオン界面活性剤：スルホコハク酸-2-ジエチルヘキシルナトリウムを用いた．

希釈水：蒸留水をイオン交換樹脂に通したもので，フレームレス原子吸光分析法で検討目的金属の空試験結果がピークを示さないものを用いた．

不活性ガス：高純度窒素ガスとレギュラー窒素ガスを比較検討し，差を認めなかったのでレギュラー窒素ガスを用いた．

試料採取

エッペンドルフマイクロピペットとハミルトン製マイクロシリンジを検討し，使用難易度，再現性およびマイクロシリンジの針部分が金属であるところから，エッペンドルフマイクロピペット（チップ併用）を使用した．

分析機器の測定条件

フレームレス原子吸光分析法は，Graphite tube 中に試料を注入し，電流によって加熱し，試料中の金属を原子化する方法であるが，tube の使用度が高くなるにしたがい tube の消耗が進み，同一条件で測定を行なっていても電流値が下ってくる．したがってこの測定条件（Table 1）は Graphite tube が新しい時に検討したものである．

操　作

a）各種酸類の検討

塩酸，硝酸，硫酸の0.5N，1N，2N，4N溶液を用い，Cd 0.01 ppm，Pb 1 ppm, Cu 1 ppm, Zn 0.01 ppm Cr^{6+}0.1 ppm を作成し，Graphite tube 中に 5～10 μl を注入し，おのおの5回繰返し測定を行なった．

b）有機物質の検討

Cd 0.1 ppm 溶液中にグルタミン酸・グルコース等量混合物10，20，30，50，100，200 ppm を添加したものを作成し，Graphite tube 中に5 μl を注入し，おのおの5回繰返し測定を行なった．

c）陰イオン界面活性剤の検討

Cd 0.1 ppm 溶液中にスルホコハク酸-2-ジエチルヘキシルナトリウムを1，3，5，10，20，50 ppm を添加したものを作成し，Graphite tube 中に注入し，おのおの5回繰返し測定を行なった．

e）血清中のカドミウム，鉛の測定法の検討

① 血清 1 ml を電気炉で乾式灰化（450°）したものを 0.5 N-HCl 1 ml に溶解し，ろ紙でろ過した溶液について 10 μl を Graphite tube 中に注入し測定を行なった．

② 血清 1 ml を 50 ml ケルダールフラスコにとり，王水（15 ml）を加え湿式灰化後アンモニア水にて微酸性にしたものを濃縮し，10 ml にメスアップした溶液を tube 中に注入し測定を行なった．

③ 血清を無処理のまま，蒸留水で希釈したものについて 10 ml を Graphite tube 中に注入し測定を行なった．希釈倍数は5，10，20倍の3種類である．

結果および考察

再現性

測定法の検討において最も重要なことはその再現性である．そこで血清およびスタンダード溶液（水溶液，DDTC—MIBK 抽出液）について $1\times10^{-4}\mu$g/10 μl Cd 濃度の溶液を用い再現性の検討を行なった．Fig. 1 は5倍希釈血清溶液に Cd $1\times10^{-4}\mu$g を加えた溶液 10 μl を用いて，9回繰返し測定を行なった時の chart である．その変動係数は0.042すなわち4.2%であった．スタンダード水溶液は変動係数3.4%，DDTC—MIBK 抽出液は Graphite tube が充分に冷却後次の注入を行なえば，水溶液とほぼ同じ結果を得ること

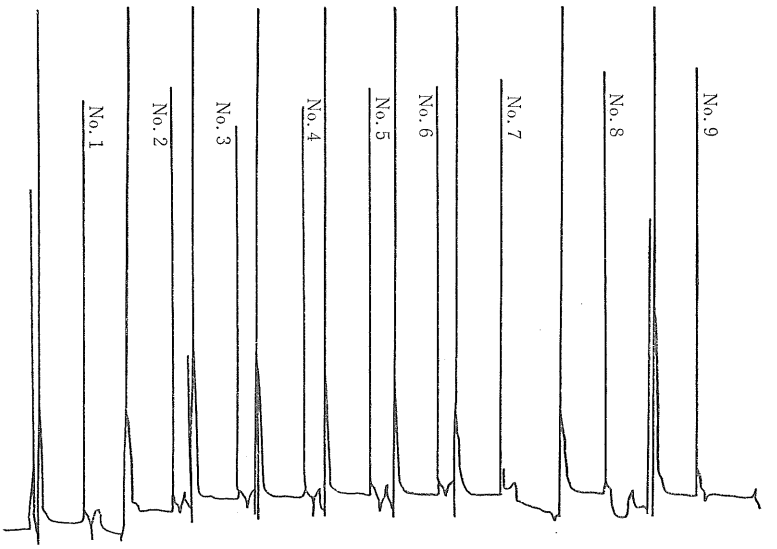


Fig. 1 Redroducibility of the determination of (1-5) serum Cadmiun
Cadmium (0.01 ppm) in the graphite atomizer at 2288Å

血清(×5)+Cd 0.01 ppm	
注入量	10 μl
No. 1	34
2	34
3	30
4	31
5	32
6	33
7	33
8	34
9	34
平均	32.78

変動係数 ($C.\ V$)

$\sqrt{\sum(x_i-m)^2/N}/m=1.307/32.78=0.042$

変　動　$\sum(x_i-m)^2$: 17.55

分　散　$\sum(x_i-m^2)/N$: 1.95

x_i : 各々の値

m : 平均値

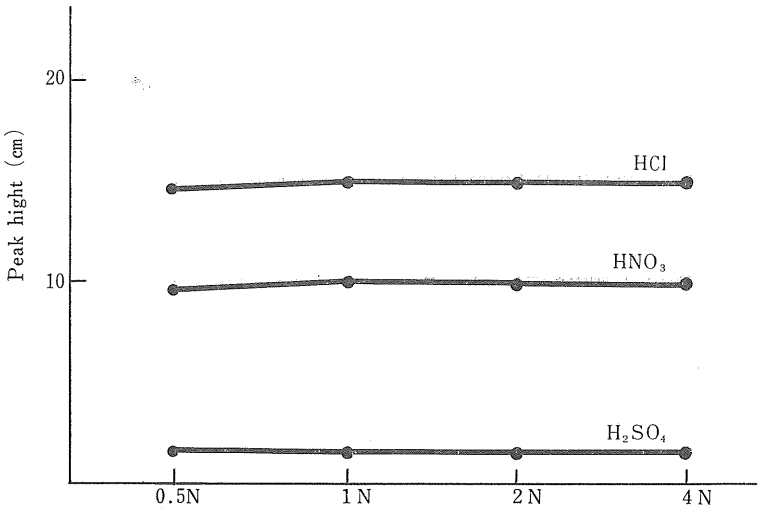


Fig. 2 Interference of acids for flameless atomizer

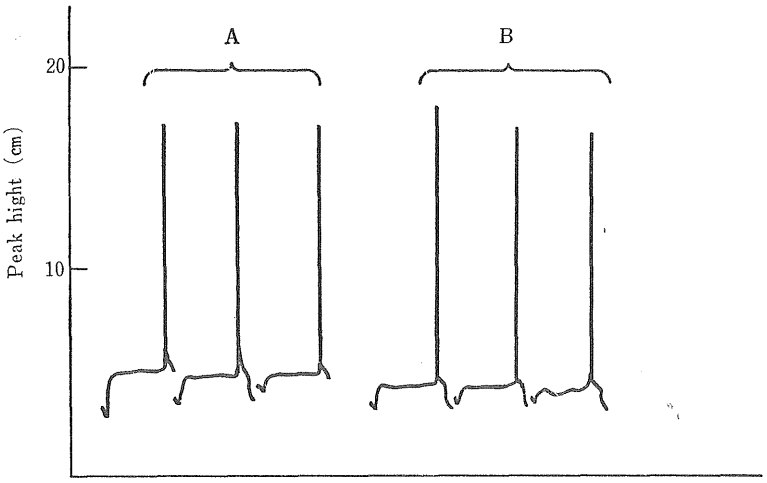


Fig. 3 Effect of solvent extraction on atomization of Cadmium
(A) aqueous solution
(B) organic solvent (MIBK)

ができた.

酸の影響

試料の前処理や採水時に酸を使用する場合が多いので, 0.01 ppm Cd 溶液に塩酸, 硝酸, 硫酸を加え, 酸の濃度と Cd の吸光度との関係を検討した. その結果は Fig. 2 の通り.

塩酸, 硝酸については 4 Nまでは影響がなかった. 硫酸の場合は塩酸, 硝酸にくらべ乾燥, 灰化時における酸の残存量が多くなるため, 原子化時に残煙効果があらわれる. それを除くために灰化時に高熱を加えると再現性はよいが, 原子化前に Cd が揮散するため感度が悪くなっている. なお塩酸と硝酸については, 同条件下では塩酸の方が大きな peak (高感度) を得た.

有機物質の影響

試料を前処理することなしに flameless methbd を利用できるか否かを検討するために, 0.1 pdm Cd 溶液に Glucose-Glutamic acid Mixture 10, 20, 30, 50, 100, 200 ppm を加え, Graphite tube 中に 10μl を注入し, おのおの 5 回繰返し測定を行なった. その結果は 200 ppm までは影響を受けなかった.

陰イオン界面活性剤の影響

洗剤を含有する試料は前処理 (湿式酸分解) 時に発泡し困難をきたす. そこで 0.01 ppm Cd 溶液にスルホコハク酸-2-ジエチルヘキシルナトリウムを 1, 3, 5, 10, 20, 50 ppm 添加した溶液 10 μl を Graphite tube 中に注入し, おのおの 5 回繰返し測定を行なったが, その結果は 50 ppm までは flameless Method に影響を与えなかった.

有機溶媒効果

Graphite Furnace Atomizer はその特徴により試料中の元素100%のを原子化するため, Fig. 3 に示すように MIBK 水溶液, 抽出液とも同じ結果を示している. このことは干渉除去のために抽出を行なう場合を除いては水溶液のまま測定ができるので, 有害有機溶媒を使用せずに測定操作ができることを意味している. (flame Method との相違点)

検量線

Cd 溶液について容量を一定にし濃度を変化させる方法 (Ⅰ) と濃度を一定にし容量を変化させる方法 (Ⅱ) について検量線を作成した. その結果を Fig. 4, Fig. 5 に示す, (Ⅰ) の方法にくらべ, (Ⅱ) の方で法はかなり大きな曲線を示した. この原因は, 試料量が増加すると Graphite tube 中での試料の広がりが大きくなること. 原子化時に tube の中央が高温になり, 末端との温度差ができるため, 原子化率が不均一になり吸光度が低下すること. Cd(Pb) の量が多いときに原子吸光分析装置の記録計の性能が原子化時の大きな吸光に対して応答速度が対応できないためにおこる遅れによること. その他試料量が増加すると溶媒をその分だけ余分にとばすことになり, その際の試料の飛散も大きくなること等も考えられる. 記録計の応答速度を上げるためにはオッシログラフのようなものを使用

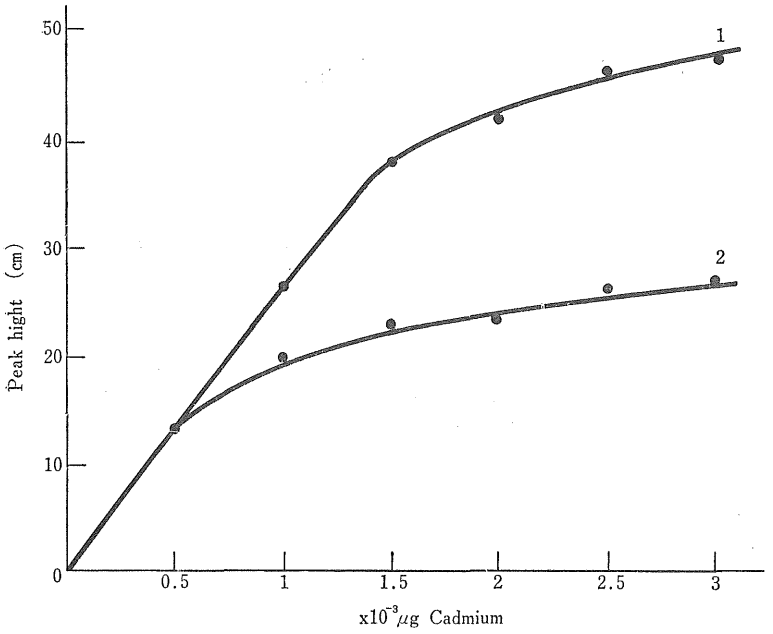


Fig. 4 Calibration curve at constant volume and concentration of Cadmium solution
1) constant volume (5 μl)
2) constant concentration (0.01 μg/ml)

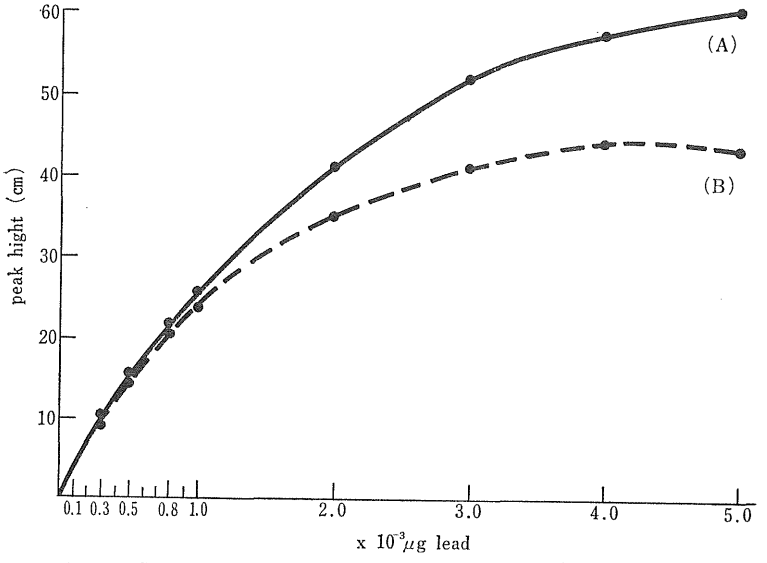


Fig. 5 Calibration curve at constant volume and constant concentration of Lead solution
(A) constant volume (10 μl)
(B) constant concentration (0.5 μg/ml)

Table 2 Determination limit on calibration curve

Element	Determination limit on calibration curve	Sample volume
Cadmium	$5\times10^{-5}\mu g\sim1\times10^{-3}\mu g$	$10\mu l$
Chromium	$5\times10^{-4}\mu g\sim5\times10^{-3}\mu g$	$10\mu l$
Cupper	$5\times10^{-4}\mu g\sim1\times10^{-3}\mu g$	$10\mu l$
Lead	$5\times10^{-3}\mu g\sim2\times10^{-2}\mu g$	$10\mu l$
Zinc	$0\sim5\times10^{-5}\mu g$	$10\mu l$

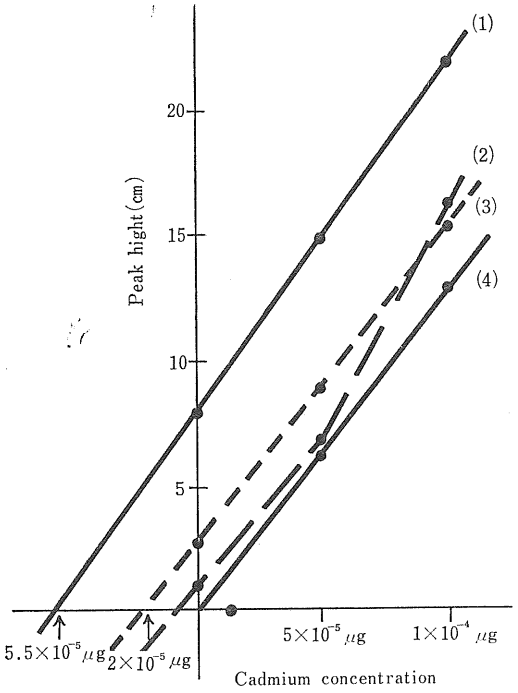


Fig. 6 Caribration curve and analysis of Cadmium in serum by the standard additions method
Dillution (1)× 5 (2)×10 (3)×20
(4) standaed solution

するのも一方法と思われる. なお各元素の直線性については Table. 2 の通りである.

血清中の Cd, Pb の測定への応用について.

血清を Graphite Furnace Atomizer かける場合のに前処理として①乾式灰化(450°)②湿式分解(硫酸-硝酸同時添加+過塩素酸・王水)③蒸留水で希釈する方法④Triton X-100を用い MIBK に抽出する方法, について検討を行なった. その結果①では灰化後もタール様のものが残り, 長時間かけても完全に灰化できず回収率も悪かった. ②でも完全に分解できず, 再現性, 回収率とも不満足な結果であった. ③の方法では Fig. 6 のように5倍, 10倍希釈ともスタンダード溶液の検量線と平行性がよく, 再現性も高かった. ④の Triton X-100 を用いる方法については現在さらに追試中であり, 報告は後日にゆずりたい.

結 論

長 所

1) 金属元素の100%が原子化されるために非常に高感度である.
2) 試料量が少なくてよい.
3) 前処理が不要または簡単である.
4) 溶媒抽出をしなくても済むものが多く, 有害薬品を使用する必要がない.
5) 熱源が電源なので元素によって任意の温度が選べる.

以上のことから今後この方法を最大限に活用する分野は, 試料採取量に制限のあるもの(血液等の生体試料)および金属含有量が低濃度の飲料水等が適しているものと思われる. われわれは現在東京都多摩地区の住民を対象として, 環境汚染物質としての Cd, Pb 等の血中(血清中)濃度について flameless method を用いて調査研究中である.

注意すべき点

この方法は非常に高感度のため, 操作にあたっては試薬および器具の洗浄等からくる Contamination に留意する必要がある. また Graphite tube 中への試料の注入量も 5~50 μl と微量のため3~5, 回程度測定を繰返し, その平均値を出すことが望ましい. また灰化時に出るピークが完全にベースラインに戻ってから原子化に移るような灰化条件を選ぶことが必要である.

謝 辞

今回の実験にあたって血清試料の入手をご配慮下さった多摩支所の西条頼広博士に感謝いたします.

文 献

1) Kirkbright. G.F. : *Analyst* 96, 609—623 (1971)
2) West. T. S. X. K. Williams : *Anal. Chim. Acta* 45, 27—41 (1969)
3) Alder. J. F, West. T. S. : *Anal. Chim. Acta* 51, 365—372 (1970)
4) Agett. J, West. T. S. : *Anal. Chim. Acta* 55, 349—357 (1971)
5) Dipiero. S, Tessari, G. : *Talanta*. 13, 707—716 (1971)
6) Amos. M. D, Bennet. P. A, Brodie. K. G, Lung. P. W. Y and Matousek. J. P. : *Anal.*

Chem 43, 211—215 (1971)
7) 佐藤 彰：第10回全国衛生化学技術協議会総会講演要旨：38 (1973)
8) 重松恒信，松井正和，藤野 浩：分析化学 22 1162—1167 (1973)
9) Norvaland. E, Butler. L. R. P. : *Anal. Chim. Acta*. 58, 47—56 (1972)
10) Hwang. J. Y, Ullucci. P. A, Smith, S. B and Malenfant. A. L. : *Anal. Chem.* 43, 1319—1321 (1971)
11) Hwang. J. Y, Ullucci. P. A. and Mokeler. C. J. : *Anal. Chem.* 45, 795—798 (1973)
12) Brodie. K. G and Matousek : *Anal. Chem.* 43, 1557—1560 (1971)

他誌に発表した論文の要旨

SUMMARIES OF PAPERS IN OTHER PUBLICATIONS

Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* cultures isolated in the United States with those isolated in Japan.

Hiroshi ZEN-YOJI, R. A. LE CLAIR, Kenji OHTA and T. S. MONTAGUE : J. Infect. Dis., 127, 237—241 (1973).

Biologic, biochemical, and serologic characteristics of 79 halophilic vibrios isolated in the United State were studied and compared with 100 isolates of *Vibrio parahaemolyticus* obtained from patients with gastroenteritis. Sixty-three of the isolates were identified as *V. parahaemolyticus*. Eleven of these had combinations of O and K antigens that were previously unreported. They were O 1 : K 5, O 1 : K 33, O 1 : K 37, O 1 : K 44, O 3 : K 25, O 4 : K 37, O 5 : K3, and O 7 : K 39. Whether or not this represents a true geographic variation in the sertotypes of thisbacterium is unknown. The remaining 16 isolatesstudied were not *V. parahaemolyticus*. Six were *Vibrio alginolyticus*, and 10 were related marine vibrios.

Epidemiology of food poisoing due to *Vibrio parahaemolyticus* occurring in Tokyo during the last decade

Yasuo KUDOH, Senzo SAKAI, Hiroshi ZEN-YOJI and Ronald A. LE CLAIR : Proceedings of the 2 nd U.S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms under the UJNR. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. 9—13, (1973).

Vibrio parahaemolyticus caused 62.2% of all reported cases of bacterial food poisoning in the last decade in Tokyo, and about 1,300 patients with *V. parahaemolyticus* infection were reported every year. Raw sea foods have been incriminated as the cause of 472 (77.8%) of 606 outbreaks of food poisoning caused by this bacterium. Among a total of 4,426 strains isolated from the feces of patients with food poisoaing, 3,911 (88.4%) were found to be hemolytic (showing a positive Kanagawa phenomenon), while 795(97.7%) of 814 strains from incriminated foods and from sea water and marine-fish were not hemolytic when tested on modified Wagatsuma's agar. Analysis of the annual distribution and frequency of occurrence of serotypes of strains isolated from the feces of the patients, according to K antigen types, revealed change in the predominant causative K type strains of food poisoning every year or every the other year.

Food poisoning caused by indole-negative strains of *Vibrio parahaemolyticus* in Tokyo

Senzo SAKAI, Yasuo KUDOH and Hiroshi ZEN-YOJI : Proceedings of the 2nd U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms under the UJNR. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. 59—62 (1973).

Up till 1969 all strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the feces of patients with enteritis and from marine materials gave a positive indole test. However, the strains isolated in two outbreaks of food poisoining in Tokyo, in 1970, were unexpectedly composed of indole-negative and-positive strains. In 1971—1972, there were eight outbreaks of food poisoning caused by indole-negative strains. These ten outbreaks involved a total of 204 cases. Two of the outbreaks in 1971 and 1972 were due to indole-negative strains only, while the remaining eight outbreaks were caused by mixed infection with indole-negative and-positive strains. These indole-negative strains confirmed to be causative agents of food poisoning showed typical biological characteristics, except for lack of indole-production. These findinngs suggest that *V. parahaemolyticus* atypical in one or more major biological characteristics may be pathogenic to man.

Purification and identification on enteropathogenic toxins "a" and "a'" produced by *Vibrio parahaemolyticus* and their biological and pathological activities.

Hiroshi ZEN-YOJI, Yasuo KUDOH, Hideo IGARASHI, Kenji OHTA and Koji FUKAI : Proceedings of the 2 nd U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms under the UJNR. International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*. 237—243 (1973).

Enteropathogenic toxins "a" and "a'" were obtained from culture filtrates of *Vibrio parahaemolyticus*. The molecular weights of both toxins were estimated as ca. 45,000. The toxins were both stable on heating at 100 C for 10 min. Toxin "a" was identical with the hemolysin reported previously, while "a'" differed somewhat from "a" in mobility on polyacrylamide gel electrophoresis and in some immunological properties. The LD_{50} of highly purified "a" (HPT—a), obtained by chromatography and Sephadex gel filtration, was ca. 1.5 μg for mice. Toxins "a", "a'" and HPT-a showed the same hemolytic activities, lethality to mice, and actions in tests in guinea pig-skin and rabbit intestinal loops. In tests with two toxins, including HPT-a, pathological findings on both skin responses and loops showing fluid accumulation, were characterized by edema and conspicuous infiltration of neutrophils. From the similarity of these findings to those observed in human cases on autopsy, the toxins seem to be important enteropathogenic factors.

Studies on the toxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in mice

Hiroshi ZEN-YOJI, Yasuo KUDOH and Kenji OHTA : Proceedings of the 8 th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, 124—130, (1972).

We have attempted to demonstrate the existence of an enterotoxic substance(s) in various preparations of *Vibrio parahaemolyticus* strains by means of the intragastric inoculation test in newborn mice.

All the live cell suspensions of *V. parahaemolyticus* strains tested, regardless of their Kanagawa phenomenon, provoked visual fluid accumulation in the small intestines of the tested mice. When the sterile culture filtrates were tested, they manifested more marked edematous response and fluid accumulation in the small intestines of the mice. On the contrary, cell lysates of the bacterium caused neither fluid accumulation nor visible pathological changes in the small intestines of the mice.

Through these findings, it seems likely that *V. parahaemolyticus* produces enterotoxin-like substance(s) similar to that of *Escherichia coli* in the culture filtrates.

細菌性赤痢とその類似疾患に対するリビドマイシンの治療成績—とくに二重盲検法によるカナマイシンとの比較—

善養寺 浩，寺山 武，他

日本感染症学会雑誌，47，35～43 (1973)

アミノ配糖体系抗生剤で結核菌の外，グラム陽性菌，陰性菌に対しても強い抗菌性を示す抗生剤として開発されたリビドマイシンの腸管感染症に対する治療効果を二重盲検法で検討するとともに，分離菌の本剤に対する in

vitro での感受性を，その他の常用抗生剤との比較において検討した．本剤は臨床的には腸管感染症に対し，KMと同程度の効果を示し，in vitro での抗菌性も KM に対するものとほぼ同様な値を示した．

An Outbreak of Enteritis Due to *Yersinia enterocolitica* Occurring at a Junior High School

Hiroshi ZEN-YOJI, Tsutomu MARUYAMA, Senzo SAKAI, Sadao KIMURA, Takashige MIZUNO and Takako MOMOSE : Japan. J. Microbiol. 17, 220—222 (1973)

近年 *Yersinia enterocolitica* によるヒトの感染症例がヨーロッパ諸国を中心として数多くみられ，私どももわが国における最初の本菌感染症例をすでに報告した．しかし，これらは二，三の家族発生も含めていずれも散発発生である．今回私どもは，栃木県下の一中学校の生徒間におきた腸炎の集団発生が *Y. enterocolitica* によるものであることを明らかにし，本菌感染症が食中毒様の集団発生を起こすことを確認した．

本事例は1972年7月14日から21日の8日間にかけて1086名中198名の患者が発生し，主な臨床症状は腹痛，発熱，頭痛，下痢，嘔吐などであった．本事例の感染源，感染経路を明らかにすることはできなかったが，患者ふん便を検査材料として細菌学的検索を行なった結果，既知病原菌はすべて陰性であり，195名中117名から *Y. enterocolitica* を検出した．分離株のO抗原型は3，5および9の3種であり，このうちO：3が95%を占めていた．またO：3とO：9を同時に検出したものが1名あった．約1ヵ月後の再検査では，当初菌を検出した117名からは20名，非発症者であった916

名のうち17名から本菌を検出した．患者のO：3，59血清に対する凝集価はO：3のみに著明な上昇が認められ，一般に発症後14日目に最高値を示した．

Yersinia enterocolitica の生物学的性状と病原性に関する研究　1.　*Y. enterocolitica* の培養温度による発育態度について

丸山　務

日本細菌学雑誌，28，343～349（1973）

Yersinia enterocolitica の各種温度域における発育態度を明らかにする目的で，振とう温度勾配培養装置を用いて，0～50°Cの間の各種培養温度で本菌が示す発育態度を，同属の仮性結核菌，およびサルモネラ，赤痢菌，病原大腸菌などの腸内細菌のそれらと経時的に比較検討したところ，本菌の発育可能温度域は0°Cから44°Cの範囲で，至適発育温度は30°C前後であった．また，最短世代時間の平均は43.5分であり，対照として用いた腸内細菌のそれらの約2倍であった．

なお，本菌の発育態度は仮性結核菌のそれときわめて近似していたが，腸炎起病性のある腸内細菌のそれらとは明らかに異なり，その好冷性状と世代時間の長さは本菌の特性と考えられた．

Yersinia enterocolitica の生物学的性状と病原性に関する研究　2.　*Y. enterocolitica* のサルへの実験的感染とその病理学的所見

丸山　務

日本細菌学雑誌，28，413～421（1973）

Yersinia enterocolitica の病原性と感染病像を明らかにする目的で，本菌をサルに経口的に投与した結果，血中抗体価の上昇，長期間の持続的排菌，腸間膜リンパ節からの菌の検出および一部にみられた粘血性下痢などの所見から，実験的感染に成功した．

感染サルは敗血症などによるへい死例はなかったが，剖検時の肉眼的所見では明瞭な腸間膜リンパ節の腫大がみられた．腸管の所見としては軽度のカタル性変化のみで特異病変は観察されなかった．しかし，排菌期間中にと殺されたサルの腸管内容物ではいずれの部位からも投与菌が検出され，明らかに腸管での定着，増殖が認められた．

組織学的には，病変部は腸管粘膜に最も高度でありリンパ沪胞の反応は明瞭で，そこに一致して巨大な菌集落が認められた．炎性細胞反応は細網細胞と組織球性細胞の増生が著しく，これに好中球浸潤を伴う像であった．これらの特徴は菌投与後1日目から5日目の回腸で最も顕著であり，本実験での主感染部位と特徴ある所見とは剖検例にみられた病変の局在性とかなり相似を示すものであろう．腸間膜リンパ節や脾ではリンパ沪胞の反応と細網細胞の増生がみられたに過ぎなかった．

投与菌に対する血中抗体価は菌投与後5日目で最高凝集素価1：1280を示し，抗体価の測定が本菌感染症の診断的価値のあることを示唆していた．

エルシニア感染症

善養寺　浩

診断と治療，61，41～46（1973）

Yersinia enterocolitica によるヒト感染症では，その病像の多彩なことが次第に明らかにされつつある．これまでの数多くの症例報告から本菌の感染病像を次のごとく5型に分類した．1）虫垂炎，回腸末端炎，腸間膜リンパ節炎型，2）胃腸炎型，3）結節性紅斑型，4）敗血症型，5）関節炎，Reiter 症侯型である．そのおのおのについて文献的考察も加えて解説した．

虫垂炎，末端回腸炎あるいは関節炎などの関連からみた *Yersinia enterocolitica* の感染

善養寺　浩

医学のあゆみ，84，235～243（1973）

最近，著者らはわが国における *Yersinia enterocolitica* による散発例および集団発生例を明らかにし，本菌が新しい感染症の起因菌として重要であることを指摘した．しかし，わが国における本菌の認識はまだ充分でないため，本菌の分類学的位置，性状，および検査法について述べ，病気との関連について概説した．特に当初強調されていた虫垂炎，末端回腸炎，あるいは最近注目されてきた関節炎との関連について考察を試みた．

新しい下痢の病原菌としての *Yersinia enterocolitica*

善養寺　浩

Medical corner（メディカルコーナー）23号，10—16（1973）

Yersinia entercolitica 感染症のなかで，最も発生頻度の高いのは下痢，腸炎の症状である．著者らのわが国における最近の調べでも，赤痢診定患者便から 2/292（0.7%），小児下痢症患者便 3/22（13.6%）の成績を得ており，幼小児下痢症のなかで本菌の重要性を指摘した．さらに，腸管に病変のあった剖検例の腸管

内容物43件から2件（4.7%）本菌を分離し，本菌による腸管感染が回盲部に著変のみられる特徴を明らかにした．

Yersinia enterocolitica の感染：虫垂炎，回腸末端炎，膠原病との関連

善養寺　浩

感染・炎症・免疫，3，1—12（1973）

Yersinia enterocolitica の感染像が多彩なことはすでに指摘されているところであるが，この現象は高年齢層に従ってその傾向が著しい．わが国における本菌感染は，虫垂炎，下痢・腸炎の報告のみで，まだ関節炎，結節性紅斑，Reiter 症などの慢性疾患の確認はない．しかし，本菌感染がリンパ装置との関与が著しいこと，血中抗体価の著明な上昇がみられることからも，今後は膠原病あるいはある種の免疫疾患との関連も注目してゆく必要があり，こうした諸問題について解説した．

Propionylmaridomycin による猩紅熱の治療

中溝　保三，平山　　顕，飯村　　達，中島邦夫，大久保暢夫，柏木　義勝，他

Chemotherapy，22（1），170（1974）

昭和46年秋以来，Propionylmaridomycin(PMDM)を猩紅熱患者43例に用い，同じマクロライド系薬剤であるエリスロマイシン（EM）13例と比較検討した．その結果，PMDM は EM より劣り，その効果は，現状ではあまり期待できないように思われた．

猩紅熱患者分離溶連菌の型別と各種抗生剤に対する感受性について

中島　邦夫，富沢　　功，大久保暢夫，宮本　　泰，永瀬金一郎，中溝　保三，他

Chemotherapy，22（1），105～106（1974）

昭和44年4月から46年3月までの2年間に主として猩紅熱患者から分離されたA群溶連菌2,457株について，その菌型ならびに各種抗生剤に対する MIC を測定した．

菌型はA群4型と12型が最も多く，それぞれ，32.7%，38.2%で，両者併せると70%を占めた．

各種抗生剤に対する感受性のうち，特に顕著なことは，マクロライド系薬剤に対する耐性化が進み，EM では 400 mcg/m*l* という高度耐性株を分離した．また TC については，25 mcg/m*l* 以上の耐性株は1967年には89.2%もみられた．しかし，その後減少して，1969年には11.6%となったが，1970年には再び増加し66.3%も分離された．

最近6年間のA群レンサ球菌の薬剤感受性の推移について（1967～'72年度）

大久保暢夫，柏木　義勝，柴田　　実，徳江シゲ子

感染症学雑誌，47（12），506～509（1973）

最近6ヵ年間に全国の伝染病院で分離されたA群溶連菌3,039株の各種抗生物質に対する感受性を測定した．特にEMに対しての耐性化の傾向は，きわめて急激で，1972年度後半の菌株では約20%が 100 mcg/m*l* 以上の高度耐性を示した．

1973年度猩紅熱患者由来溶連菌の薬剤感受性について

柴田　　実，柏木　義勝，徳江シゲ子，冨永　洋子，大久保暢夫，宮本　　泰，永瀬金一郎

感染症学雑誌，48，臨時増刊号，11（1974）

猩紅熱研究会の分担研究の一部として，1973年度に伝染病院で分離された猩紅熱由来A群溶連菌1,542株の各種抗生物質に対する感受性について検討した．Macrolide（EM，OL）系薬剤は，1,000 mcg/m*l* 以上の高度耐性株が高率に分離され，今後，治療面における薬剤の選択には充分な考慮が必要であると考えられた．

猩紅熱由来溶連菌のA群群別法について

柏木義勝，柴田　実，徳江シゲ子，冨永洋子，大久保暢夫，飯村　　達，永瀬金一郎，他

感染症学雑誌，48，臨時増刊号，9～10（1974）

わが国の研究機関あるいは検査機関において，A群溶連菌の血清学的群別・型別を実施しているところは未だ少ない．今回，猩紅熱患者由来溶連菌および神奈川県衛生研究所より分与されたC群，G群を使用して，バシトラシン感受性試験および小林分類について再検討し，血清学的群別と比較した．

猩紅熱に対する *Propionylmaridomycin* の治療効果

中溝　保三，大久保暢夫，柏木　義勝，柴田　　実，他

Chemotherapy 21（5），1090～1097（1973）

Propionylmaridomycin（PMDM）の試験管内における抗菌力は，LM，JM に近似しており，また，これらと同様に耐性非誘導型抗生物質と考えられている．

1971年秋以来，猩紅熱患者に PMDM を使用し，治療効果を検討した．その結果，PMDM は，対照抗生物質である EM より劣ったが，PMDMの2倍量投与群は通常投与群より遙かにすぐれた成績であった．

昭和46年，47年度の溶連菌の型別と薬剤感受性について

中島　邦夫，大久保暢夫，柏木　義勝，柴田　実他

Chemotherapy 21 (9), 1859 (1973)

菌型：全国各地の伝染病院で分離された猩紅熱由来溶連菌を無作為的に型別したその結果，1971年度においては，分離株274株中，4型66株（24.0%），12型66株（24.0%），6型57株（20.0%）で，以上三者が特に多く，以下1，18，22，3型の分離頻度であった．1972年度では，分離株300株中，12型130株（43.3%）と12型が我国における流行菌型となり，4型は61株(20.3%)，その他の菌型は，ほぼ前年度と同様の傾向を示した．

薬剤感受性：1972年度に分離された1317株について検討した．PC—G は95.7%が0.00625 mcg/m*l* 以下にその MIC があり，最も有効な薬剤であることに変りはなかった．CP は，25 mcg/m*l* 以上の耐性菌が25.7%認められ，特に100 mcg/m*l* MIC のを示す株が7株（0.5%）みられた．TCは5～6年前は耐性菌の出現が非常に著明であったが，72年度では，その MIC が25 mcg/m*l* が48.2%存在したが，その中MIC 100 mcg/m*l* 以上の高度耐性株は，0.3%に過ぎなかった．EM は200 mcg/m*l* 以上の MIC を示すものが18.3%みられ，耐性化への移行傾向がみられた．

患者における尿蛋白の自動定量および臨床における尿の分析に関する研究

根津尚光，他，予防医学ジャーナル，66，18～22，1973

集団尿検査における尿蛋白自動定量の意義について

根津尚光，他，予防医学ジャーナル，66，22～27，1973

1970年末以降東京都内におけるインフルエンザの検索成績

坂井冨士子，藪内　清，伊藤　忠彦，岩崎　謙二　根津　尚光

感染症学雑誌，47，349～350 (1973)

1971年末から1972年初めにかけての集団かぜは71年末については原因を明らかにすることができなかったが，72年初めについてはその主要因がインフルエンザ（以下イと略す）香港ウイルスであることが判明した．また，72年末から73年初めにかけて発生したものについては72年10月にアデノ3型によるものを認め，73年1月以降はイ・A香港型ウイルスによるものであったが，一部にアデノ3型ウイルスの混在を認めた．73年に分離したA香港型ウイルスは，従来の愛知2/68，福島1/70，千葉5/71株とニワトリ免疫血清ならびに香港型初感染と思われる患者ペア血清のHI試験によりよ若干抗原変異のあることが認められた．また，ウイルスを分離した時点における患者の血中HI抗体価とワクチン接種歴との関係について調べたところ72年ではワクチン接種者は愛知2/68株に対し256倍以上が67%，73年では85%もあるのに対し，非接種者は128倍以上でみて72年では46%，73年では54%となっている．抗原を福島1/70株あるいは千葉5/71株とすると，この差はさらに大きく，これらの事実からワクチンによって得られた高い血中HI価と自然感染によって得られたと思われるHI価とでは，質的に何らか異なるものではないかということが示唆された．

今冬期（72年10月～73年3月）東京都内に発生したインフルエンザの検索成績

伊藤　忠彦，坂井冨士子，藪内　清，岩崎　謙二　根津　尚光

東京都衛生局学会誌，(51) 146～147 (1973)

27集団計134件について検査した結果，1972年度に送付された4集団においてはインフルエンザ（以下「イ」と略す）は証明されず，10月の1集団はアデノ3型ウイルスによるものであった．翌73年1月にはいり17集団，2月に5集団，3月に1集団検索したが，これらはすべて「イ」Aホンコン型ウイルスによるものであった．また，Aホンコン型「イ」の流行の中にアデノウイルス感染症が若干あった．

今回分離されたAホンコン型ウイルスはニワトリ免疫血清による交叉HI試験により若干の抗原変異がみとめられた．

1973年4月以降東京都に流行したB型インフルエンザの検索成績について

坂井冨士子，伊藤　忠彦，藪内　清，岩崎　謙二　根津　尚光

東京都衛生局学会誌，(52)，98～99 (1973)

東京都においては本年初頭に流行したA型インフルエンザ（以下「イ」と略す）の終熄後，4月下旬より再び主として学童，中学生の間に集団かぜが多発し始めた．患者材料のウイルス学的，血清学的検査の結果この流行の主原因は「イ」B型ウイルスであることが判明した．すなわち，7月4日までに都内各保健所を通じて送付された20集団の検体につき検査をおこなった．その結果，11集団より計24株の「イ」B型ウイルスを分離した．この分離株のうち1株（B/東京63/73株）はHI試験で従来のB/鹿児島1/68株およびB/大阪2/70株のニワトリ免疫血清によく抑制されたが，他のすべての株はB/鹿児島1/68株の免疫血清には抑制されず，B/大阪2/70株の免疫血清にわずかに抑制される程度であった．そこで分離株の免疫血清の作成を急ぐと同時に1971年に得たB型患者と今回の患者のペア血清について今回分離されたB/東京53/73株，B/東京63/73株とB/鹿児島1/68株およびB/大阪2/70株を用いてHI試験をおこない，その結果，これら分離株が従来のB型株と抗原的に明らかに異なっていることを確認した．

リノール酸メチルの通気酸化と酸化防止剤の影響（第4報）
α-トコフェロールの酸化防止作用と有機酸類のSYNERGISMについて

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）

表題に関する一連の研究中，本報ではリノール酸メチルの通気酸化に際してのα-トコフェロール（VE）の酸化防止効果（synersistic effect）と，有機酸類の相乗効果に関する問題を取上げた．

試料および実験条件は前報に準じ，精製したリノール酸メチルにVEおよび各相乗剤を添加し，定温で酸素を導通して酸化した各試料について過酸化物価を測定した．

その結果を要約するとつぎのようになる．相乗剤を加えない場合はVEの酸化防止効果は105°における酸化では著明でなかったがアスコルビン酸またはクエン酸を添加することにより，その効果は顕著になった．70°での酸化ではVEの効果は相乗剤を添加しなくても著明に認められたが，それらを加えることによりはるかに増大した．

また前報において，その酸化防止効果について報告したブチルヒドロキシアニソール（BHA）とVEの効果を比較したが，BHAの効果はVEに比して著明であり，70°の酸化ではEVの1/2当量を添加した場合でも，顕著であった．さらに16種の有機酸およびその一部のエステルについてVEに対する相乗効果を調査したところその中の8種に相乗効果がみとめられた．すなわちD，L-リンゴ酸，L-酒石酸，オキザル酢酸，マロン酸，クエン酸，L-アスコルビン酸，D，L-グリセリン酸，リンゴ酸ジエチルは有効であり，タートロン酸，プロピオン酸，乳酸，β-オキシ酪酸，ピルビン酸，グルコノラクトン，クエン酸トリエチルは無効，コハク酸は弱（+）であった．

これらの有機酸の相乗効果の機序は一見単純でないが，VEが酸化される過程において，これらの酸から水素供与が行なわれることが推定される．

市販婦人および乳幼児用肌着中のホルマリンについて

吉原　武俊，奥本千代美，福士真知子

東京都衛生局学会誌，(52)，62～63（1973）

近年化学工業の発達により，日常生活に用いる家庭用品に多くの化学製品が使われ，その中には人の健康障害を起こすおそれのあるものが少なくない．最近婦人および乳幼児用肌着による皮膚障害が問題になってきているが，それは防皺または防縮の目的で行なわれている樹脂加工そのものにも一因があると考えられる．そこで市販品について試験法を調査検討し，皮膚障害の原因と推定されるホルムアルデヒドの含有量を調査した結果，主としてホルムアルデヒドが検出されたものは，防皺あるいは防縮等のため樹脂加工された化学製品であり，これに使用される樹脂にはメラミン樹脂，ユリア樹脂等があるが，これらの樹脂が分解してホルムアルデヒドを発生すると考えられる．また水蒸気蒸留法と直接法によるホルムアルデヒド測定値を比較した結果，前者は後者の約2～3倍という測定値が得られた．これは水蒸気蒸留の際に加えたリン酸と加熱によって抽出された低結合の樹脂が分解されてホルムアルデヒドを発生するためと考えられる．調査を行なった123検体のうちで婦人用肌着77検体中51検体から，また乳幼児用肌着46検体中8体検からホルムアルデヒドが検出され，ホルムアルデヒドが検出された婦人用肌着の大部分はファンデーション類で，ベンベルグ製品からは高濃度のホルムアルデヒドが検出され最高値は28.030 μg であった．

工業廃水中に含まれるシアンイオンの実際的分析

栗谷川福子，奥沢　昌子，松本　茂衛

生化学，19，110 (1973)

工業廃水中のシアンイオンの実際的な定量については種々の困難な点が存在する．その解決方法の一つとして，われわれは省令による比色法を行なう際に，シアンメーター（電極法）を併用する分析方法を考案した．

シアンメーターを併用することにより分析の過程をいちじるしく簡易化することができたが，直接工業廃水にシアンメーターを使用した場合は，えられた数値には全く信頼性がないことを知った．

その他，比色法におけるピリジンピラゾロン試薬の安定性を確めたが，本混合試薬は一日以上の保存に耐えないことが判明した．また塩素(Cl_2)，硫化物(S^{--})亜硫酸イオン(SO_3^{--})等はシアンイオン，比色試薬，またはシアンメーターの測定条件等に，それぞれ種々の影響を与えることが明らかになった．

セレンのけい光光度測定法による定量

戸谷　哲也

衛生化学，20，113—115 (1974)

本報は食品，水，土壌等に含有される微量のセレンの定量法を目的とし，日本薬学会，衛生試験法中（有害性元素試験法）として上提，採用されたもので，その試験法の注解について述べてある．

セレンはビルの窓ガラス等の遮光のための着色，ゼログラフィー用感光材料等をはじめ多量に用いられているが，その毒性はヒ素化合物より数倍高く，古くよりセレンの多量摂取による家畜の暈倒病，アルカリ症として知られている．飲料水については WHO 等によって0.01 ppm の基準があるがわが国にはいまだ設けられていない．一方セレンは生体にとって必須元素であることも知られており，ヒトではクアシオコール(Kuashokor) とよばれる小児の発育疾患が報告されている．

従来セレンの定量法としては 3, 3′-Diaminobenzidine による可視部またはけい光光度法 *o*-Phenylene diamine による紫外部吸収法が一般的であるが，妨害イオン，感度等の点から好ましくない．本定量法は Parker (1962), Watkinson (1966) によって開発され，A. O. A. C. に採用されているものを種々検討改良し，より信頼性の高いものとした．本法の骨子は試料を HNO_3 と $HClO_4$ で湿式分解し，セレンを揮発性の低い H_2SeO_4 に酸化後，HCl と加熱することによって H_2SeO_3 に還元する．Se (IV) は2, 3-Diaminonaphthalene と pH 1—1.5 で50°，30分間加温すると，特異的に反応して，発けい光性の 4, 5-Benzopiazselenol を生成するので，酸性でシクロヘキサンに転溶させてけい光強度を測定する．けい光内標準としてウラニンを用い，けい光光度計の感度を調整し，Ex. 378 nm, Em. 520 nm で定量する．Fe^{3+}, Fe^{2+} は Se に対し2千倍の共存で，またCa^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+} などは千倍の共存下で影響がみられなかった．定量限界は試料1 gの場合，約 0.005 μg 空試験値は 0.001 μg であり0.5 μg の Se に対する変動係数は約3.9 %である．

乳製品工業における殺菌と二，三の問題点

春田三佐夫

食品工業における滅菌技術の実際とその問題点（日本工業技術連盟），9—1～9—9 (1973)

牛乳殺菌の意義，方法，殺菌条件の設定，細菌死滅のメカニズム，UHT 滅菌の利点と問題点，UHT 処理の現状等について解説した．

公衆衛生の分野で利用される簡易細菌検査法

春田三佐夫

モダンメディア，19 (9)，457～472 (1973)

今日すでに公衆衛生，特に食品衛生，環境衛生の分野で採用されている，あるいは今後採用しうると思われる簡易な細菌検査法のうち，バクトストリップ法，スタンプスプレード法，アガーソーセージ法およびメンブランフィルター法の4法をとりあげて解説した．

食品衛生検査方法の簡易化に関する開発研究

高野武悦（日本食品衛生協会），坂崎利一(国立予研)，春田三佐夫，松本昌雄，梅木富士郎(都衛研)ほか

昭和47年度食品衛生調査研究報告書

従来のふきとり方式の検査を培地自身によるスタンプ法に改めることを原案として，それに適する生ま培地（ソーセージ法，キャップ型，その他）を開発し，それによる培養方法，判定方法等について既存方法と比較しつつ，最も適した方法の規格化，標準化をはかる意図の下に分担研究を実施した結果を述べたものである．本研究は厚生科学研究費の一部補助を得て実施したものである．

凍結豚肉の細菌汚染状況と分離株菌の生物活性について

小久保弥太郎

東京獣医学畜産学雑誌，19・20合併号，194～190 (1973)

凍結肉の衛生管理上重要な汚染細菌の実態を把握する目的で，国内産，アメリカおよびカナダ産豚の凍結カット肉各10例ずつを対象に，細菌汚染状況と分離菌株の生物活性を検討した．

その結果，国産肉の生菌数は1 g当り10^6～10^7個で輸入肉はそれより2～3オーダー低かった．しかし，菌叢は産地に関係なくグラム陽性菌が陰性菌に比較してやや多く，多数の菌株が低温細菌に属すると考えられた．また，菌株の58%が蛋白を，40%が脂肪を分解し，核酸はRNA，DNAともに半数以上の菌株により分解され，融解後の肉質への影響が大きいと考えられた．

冷凍食品の細菌学的検査法の検討特に畜肉を含む調理冷凍食品について

梅木富士郎，小久保弥太郎，井草　京子，春田三佐夫，四宮　栄

東京獣医学畜産学雑誌，19・20合併号，178～183 (1973)

畜肉を主原料とする調理冷凍食品（以下冷食）の細菌学的検査手技を確立するため，市販冷食48例を対象に混釈培養法と平板塗抹法の優劣および5～37°の間の6段階の培養温度による生菌数測定の難易と優劣を比較検討した．一方，市販冷食24例について，平板塗抹法により25°，48°時間培養法で，それらの細菌汚染の実態を調査した．

その結果，平板塗抹法は出現した細菌集落が大きく算定が容易かつ正確であった．また，25°，48時間培養において，冷食中に存在した中温細菌および低温細菌の両者を十分に効果的に検出し得ることが判明した．

市販冷食の調査結果を総合すると，加熱冷食の53%が1 g当り1,000以下の生菌数であり，かなり良い成績を示したが，未加熱冷食では2%が1,000以下を示したのみで，両者の間には生菌数分布の点で異なった様相が認められた．

解凍豚肉を低温貯蔵した場合における細菌叢および肉質の変化

小久保弥太郎

食衛誌，14，448～451 (1973)

凍結豚カット肉試料を解凍後，2°と10°に貯蔵し，細菌叢および肉質の変化を検討した．

その結果，2°貯蔵例の菌叢変化は3日目まで顕著でなく，7日目以降に認められ，10日目に85%が*Pseudomonas*となった．10°貯蔵例は3日目ですでに著明に変化し，2°の場合より早く*Pseudomonas*の独占状態が現われた．pHと揮発性塩基性窒素量は貯蔵温度に関係なく3日目まで変化せず，2°で10日目，10°で7日目に，その値は当初よりかなり上昇した．

市販ひき肉の細菌汚染の実態

梅木富士郎，小久保弥太郎，春田三佐夫，四宮　栄

日獣会誌，26，20～23 (1973)

都内で市販されている各種ひき肉286例を対象に，生菌数，大便汚染指標菌，サルモネラ，黄色ブドウ球菌などの細菌汚染状況を調査した．

その結果，生菌数は全試料とも1 g当り10^5個以上のオーダーで検出され，その80%は10^7個以上であった．しかも，生菌数のほぼ10%は蛋白分解菌で占められた．サルモネラは17%に検出され，豚肉の汚染度が最も高く，菌種では*Salmonella typhimurium*が多かった．また，高率に大腸菌群および大腸菌が検出されたが，それらとサルモネラの間には必ずしも相関性は認められなかった．黄色ブドウ球菌は71%の試料から検出され，特に鶏肉の汚染度が高かった．

鉄細菌のスライムの組成と培養について

松本　昌雄

水質科学研究会誌，3・4，34～40 (1973)

上水道や工業用水道の代表的な障害鉄細菌の一つにLeptothrixがある．そこでLeptothrixによって形成されたスライムについて，その化学的組成を明らかにし，同時にLeptothrixの発育増殖条件について検討を行なった．その結果，Leptothrixの増菌培地の合成ならびに培養の可能性について示唆をあたえた．

鉄細菌による障害と除鉄について

松本　昌雄

水と人，3，13～15，(1974)

近年，上水，工業用水などの使用量が，年々急増するに及んで水不足が深刻になり水の有効的使用という観点から障害細菌が注目されるに至った．上水道や工業用水道における代表的な障害細菌として鉄細菌がよく知られている．そこで，わが国の代表的な鉄細菌をあげて，それらによるいろいろな障害例について述べた一方，鉄細菌を逆に利用して水中の鉄分を除去する方法とその応用実例を紹介し，鉄細菌による除鉄効果

と利用性について述べた．

サルモネラによる環境汚染
春田三佐夫
衛生局報，第114号，2，昭和49年1月31日発行

昨今，産業廃棄物あるいは食糧生産などに由来する水銀，カドミウム，有機塩素系農薬，PCB などの化学物質による環境汚染問題については異常なまでの関心が寄せられているが，微生物による環境汚染についてはややもすれば軽視されがちな傾向にある．そこで，世界的にも注目されているサルモネラによる環境汚染問題をとりあげ，わが国のサルモネラ汚染の主たる由来源，汚染の現状の概略に触れ，サルモネラ汚染防止対策に関する私見を述べた．

乳製品製造業の公害防止技術対策研究
春田三佐夫（都衛研），三村秀一（都衛研），
山崎堅吉（都衛研），松本昌雄（都衛研），
松井武夫（公衛院），恩田　博（全乳協）
昭和48年度農林水産関係業種公害防止技術対策研究委託事業報告書（乳製品製造業）昭和49年3月

本調査は，都下ならびに近県所在の中小乳業工場4個所を対象に，それらが現に実施している排水処理の実態について全国牛乳協会との協力のもとに実施したものである．本調査を通じて中小企業に属する乳業工場はすべてその立地条件，経営規模の点で十分な処理機能を期待することが困難な状況にあり，今後なお検討すべき点が多々あることを知った．

生乳の細菌汚染と対策
春田三佐夫
畜産の研究，28 (1)，221～226 (1974)

近年，公衆衛生上および産業助成の立場から乳質改善（the betterment of milkquality）の重要性が声を大にさけばれている．乳質改善とはそもそも食品としての安全かつ健全な乳を生産するとともに積極的にその品質保持（Keeping quality）をはかるための努力であると定義されており，対象としては乳房炎予防，低無脂乳固形分乳の改良，環境汚染防止など検討改良すべき重要な問題がいくつか含まれているが，ここでは従来から問題視されてた微生物学的品質低下の問題をとりあげ，それがどのような原因により招来されるか，またそれらの微生物汚染を防止するに必要な基本的な事項について論述した．

しょうがに添加されたスルファミン酸の検出法に関する検討
西島　基弘，冠　政光，高橋　尚子，上村　尚
中里　光男，木村　康夫
食品衛生学雑誌，15 (1)，43～47 (1974)

輸入しょうがづけに発色の目的でスルファミン酸が添加される場合がある．しかしスルファミン酸の検出法は確立されていない．そこでわれわれは，イ）ロ紙電気泳動法，ロ）ペーパークロマトグラフィーならびに，ハ）薄層クロマトグラフィーの3法をとりあげ，実施にあたり必要なそれぞれの条件につき検討した．その結果，イ）では東洋濾紙 No.50 を用い電解液は pH4.0の酢酸緩衝液，1 mA/cm で約1時間泳動，ロ）ではイ）と同様東洋濾紙 No.50を用い，展開剤はエチルアルコール：水＝7：3，展開距離約15 cm，ハ）では DC-Fertiglatten Kiesslgel 60 を用い，展開剤はエチルアルコール：20%酢酸＝8：2，展開距離約15 cm の各条件で泳動または展開し *p*-ジメチルアミノベンツアルデヒドなどの発色剤で処理することにより，スルファミン酸の存在を確認することができた．

食品用容器包装の衛生問題
藤居　瑛
公衆衛生，37，673～681 (1973)

食品用の容器包装について，包装の目的，包装材料の具備すべき諸条件，原材料素材，および食品衛生関係法令について述べ，消費者からの苦情検体の実例ならびに不良，有害な容器包装の問題点など，検査成績を挙げながら記述した．

「食品公害」レポート
相磯和嘉（千葉大），上田喜一（東歯大），
大森義仁（国立衛試），小谷新太郎（順天堂大），
竹内端弥（女子栄養大），武田明治（国立衛試），
谷村顕雄（国立衛試），藤居　瑛（都衛研）
女子栄養大学出版部，1973年11月20日発行

「食品公害」の正しい理解のために，環境汚染と食品汚染，食品の農薬汚染，食品添加物の問題，台所用洗剤，容器包装の安全性，台所の食品衛生などについて，理性的な情報と現状報告をとりまとめたレポート集で，食品の安全性と危険性，問題点をとりあげ，食品衛生のあり方，考え方について平易に解説している．

特殊栄養食品の収去・検査に基づく違反内容につ

いての改善指導の効果と今後の課題

可児　利朗，友成　正臣，塚越　ヤス，古内　正孝
春日仁　志，染谷　愛子，三村三智子，伊藤　勲
中原　澄男

東京都衛生局学会誌，(51)，132 (1973)

新らたに特別用途食品の基準が規定され，今後これらの食品類の品質チェックの資料とするため，これまで収去検査を行なってきた特殊栄養食品の違反内容をまとめた．

検査成績を要約すると，昭和37，38年度と昭和46，47年度の含量不適正の比は，ビタミンB_1 100：12，ビタミンB_2 100：12，ビタミンC 100：20 となりいずれも後者がはるかに成績がよく違反率の減少が明らかに認められる．昭和46，47年度の2年間における経由別の比較では，都経由が許可量で3.7%，標示適合では18.3%，適正では21.7%それぞれ上廻っている．しかしなお，10%に近い不適正があり，今後さらにキメ細かい指導を必要とする点であろう．

渡来したコウノトリの有機塩素系農薬およびPCB蓄積量

道口　正雄，牛尾　房雄

山階鳥類研究所研究報告，7，202～206 (1973)

外地より飛来後間もなく射殺されたコウノトリについて PCB および農薬蓄積量を測定した．本試料の示す PCB のガスクロパターンは，日本在来のコサギとは異なり，比較的低塩化ビフェニルが多く，また農薬蓄積量より PCB のそれのほうが多いことを認みた．

Chlorinated Hydrocarbons in the Environment in the Kanto Plain and Tokyo Bay, as Reflected in Fishes, Birds and Man

Masao DOGUCHI

New Methods in Environmental Chemistry and Toxicology,

269—289 (1973), International Academic Printing Co.,

Described principally in this paper the results made by our group of the chlorinated hydrocarbons in the samples collected from the environment around the Megaropolis Tokyo to demonstrate the state of pollution in this particular area.

The studies made by other investigators engaging in this field of work are also recapitulated in this paper, in order to outline the sate of pollution not only in the Tokyo area but also in in Japan as a whole.

CHROMOGENIC REACTIONS OF STEROIDS WITH STRONG ACIDS. IV. SPECIFICITY OF THE KOBER REACTION

Michiya KIMURA[1], Meiji KAWATA[1], Kazuyuki AKIYAMA[2], Kazuaki HARITA[1], and Toshiaki MIURA[1]: Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 21, 1720—1726 (1973)

The structural requirements were investigated for the Kober reation of the steroidal molecules. On the basis of the data given by the ninety-four specimens of phenolic steroid or related substance, a compound will give the positive Kober reaction when the following features are wholly present in its molecule : 1) steroidal ring system, 2) phenolic ring A, 3) double bond or oxygen function in ring D, 4) angular methyl groupe at C_{13}, and 5) angular hydrogen atom.

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

2) Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

CHROMOGENIC REACTIONS OF STEROIDS WITH STRONG ACIDS. V. PRODUCTS IN THE KOBER REACTION OF STEROIDAL ESTROGENS

Michiya KIMURA[1], Meiji KATA[1], Kazuyuki AKIYAMA[2], Kazuaki HARITA[1], and Toshiaki MIURA[1] : Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 21, 1741—1746 (1973)

Formation and chemical structures of some products were studied in the Kober color reactions of estradiol 3-methyl ether(Ⅰ) and of estrone methyl other(Ⅱ), After heating 1 or 11 with 78 % (w/w) sulfuric acid at 100° for about half-hour, extraction of the reaction-mixture with benzene left Kober-pigment in the acidic layer, which was collected in a reddish purple resin and was instablein a neutral or alkaline aqueous solution. In this reaction, were produced 3-methoxy-17 ξ-methyl-8 ξ, 9 ξ, 13 ξ, 14 ξ-18-norestra-1, 3, 5(10)-

triene (Ⅲ), 3-methyl-7-methoxy-1, 2-cyclopenteno-9, 10-dihydrophenanhrene(Ⅳ), 3-methyl-7-methoxy-1, 2-cyclopente-nophenan-threne(V), 3-methoxy-17 ξ-methyl-13 ξ, 14 ξ-18-norestra-1, 3, 5(10), 8-tetraene (Ⅵ), and 3-methoxy-17ξ-methyl -13 ξ, 14 ξ-18-norestra-1, 3,5(10), 6, 8-pentaene(Ⅶ) from 1. The same reaction of 11 gave these compounds(III～VII) and the new products, methyl 3-methyl-7-methoxy-1, 2-cyclopenteno-9, 10-dihydrophenanthrene-6-sulfonate(Ⅷ). and 3 methyl-7-methoxy-1, 2-cyclo-pentadieno-9, 10-dihydrophenanthrene(Ⅸ). Thus it was demonstrated that both of disproportionation and dehydrogenation reaction with sulfuric acid occurred.

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
2) Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

CHROMOGENIC REACTIONS OF STEROIDS WITH STRONG ACIDS. VI.
BEHAVIOR OF PHENOLIC STEROIDS IN CONCENTRATED
SULFURIC ACID

Michiya KIMURA[1], Kazuyuki AKIYAMA[2], and Toshiaki MIURA[1] : Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 22, 643—649 (1974)

Behavior of various 3-methoxylated phenolic steroids in conc. H_2SO_4 was studied, in particular relation to the earlier period of the Kobe reaction. Alteration of the light absorptions at the maxima of 432, 465, and 515 nm was detected to be varied with the concentrations of H_2SO_4. The maximum absorption at 372 nm was observed in the mixture of estradiol 3-methyl ether with 97.2%H_2SO_4, which appeared, on the contray, immediately after mixing these corresponding isomeric olefins with the same acid. Nuclear magnetic resonance study on the solutions of these olefins in the acid suggested that the solutions of these olefins in the acid suggested that the absorption at 372 nm is due to the carbocation, the conjugate acid produced. As for the Kober reaction of steroidal estrogens, it was postulated that the carbocation initially formed is oxidized into the characteristic chromophores χ-465 and χ-515, through which the highly dehydrogenated steroidal olefins are finally produced.

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University
2) Department of Environmental Health, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

ＰＣＢの生物学的影響
そのいくつかの側面をめぐって

大井　玄，食衛誌，13 (6) 499—508(1972)

ＰＣＢの生物影響について，その免疫学的影響，食物連鎖の起点となるプランクトンに及ぼす効果，胎盤母乳を通しての移行，他環境汚染物質との複合影響についてレヴューした．

ＰＣＢによるニワトリヒナの腎病変

大井　玄，前田ヒロ子，北川知行
医学のあゆみ，86-5)265～266(1973)

ＰＣＢによるニワトリヒナの腎病変は活発に形成されつつある subcapsular nephrogenous zone に限局されている．

Recent Progress in the Studies of Lead Poisoning

Osamu WADA, Gen OHI
Reviews on Environmental Health(1)75—111(1972

鉛中毒の血液学的機序，知能に及ぼす影響腎臓への慢性的影響等の最新の進歩のレヴューを行なった．

Pigeons Sensor of Lead Pollution

Gen OHI, Hironobu SEKI, Kazuyuki AKIYAMA, Hiroshi YAGYU
Bull. Environm. Contam. Toxicol. 12 : 1(1974)

Determination of lead levels of the blood, femur, and Kidney and δ-aminolevulinic acid dehydrase activity of red blood cells made with adult street pigeons (total of 179) of locations in both downtown and suburban Tokyo demonstrated highly significant regional differences. It appears that the street pigeons are a handy and sensitive indicator of regional satunine pollution.

環境汚染分析法　9　ＰＣＢ

竹下　隆三，武田　明治，土屋　悦輝著

大日本図書㈱　1973年７月１日発行

本書は環境汚染物質ＰＣＢ分析法を記したもので，1.影響編，2.分析法，3.データ集という構成よりなっており，影響編はＰＣＢの性状，用途，環境汚染，人体に対する影響などの概要をわかりやすく述べている．分析法は食品，水，土壌，紙等の分析法を述べ多種類のカラムにより，有機塩素剤のピークパターンの実例を示し，さらに分析上の注意事項として試薬，器具などに由来するバックグランドの実例を多数示し，また特殊な試料のクリーンアップ法など筆者らが実際に試料を分析するに当って検討したものについて，詳細に記してある．データ集では自分で行なった分析値がどのあたりに位置づけられるかを知ることができるように，食品，環境中等の分析データを豊富に記した．単に分析法としての本だけではなく環境汚染物質としてのＰＣＢについて理解し，正しい評価を与えるために本書が役立つと思われる．

Evidence of Early Replicating DNA in Heterochromatin

Masanori MASUBUCHI

Bot. Mag. Tokyo 86 : 319—322 (1973)

Although it is known genetically that the heterochromatin replicates its DNA later than the euchromatin, recently some exceptional cases have been reported (Tatuo et al., 1970 ; Masubuchi, 1971, 1973). In this paper, the timing of DNA replication of heterochromatin was investigated by the use of the ^{3}H-thymidine autoradiography in some species of liverworts female *Pallavicinia longispina*, $n=8$; female *Pallavicinia lyellii*, $n=8$; male and female *Pellia neesiana*, $n=9$; *Plagiochila japonica*, $n=9$). Observations with the 4 species described above indicate that there are some cases of early completion of DNA replication in heterochromation.

Early Replicating DNA in Heterochromatin of *Plagiochila ovalifolia* (Liverworts)

Masanori MASUBUCHI

Bot. Mag. Tokyo 87 : 229—235(1974)

The timing of DNA replication of heterochromatin in male *Plagiochila ovalifolia* was investigated by the use of the ^{3}H-thymidine autoradiography. The estimated duration of mitotic cycle were as follows : S period, 19 hr ; G_2+prophase, 10 hr ; G_1+meta-, ana-, telophase, 5 hr ; total mitotic cycle 34 hr. The first appearance of the eilver grains over the chromosomes was observed at 8 hr after the beginning of the pulse labelling at which time the silver grains were only over the euchromatic regions not over the heterochromatic regions This labelling pattern was also observed at 10 to 15 hr. On the other hand, at 20, 25 hr, the heterochromatic regions were observed to have more grains than the euchromatic regions. These results show that the heterochromatin of this species synthesizes its DNA earlier than the euchromatin.

1973年に行なった学会発表演題

THEMES PRESENTED AT CONFERENCES AND SOCIETY MEETINGS

1) Hiroshi ZEN-YOJI, Yasuo KUDOH, Hideo IGARASHI, Kenji OHTA and Koji FUKAI : Purification and characterization of enteropathog enic toxins "a" and "a'" produced by *Vibrio parahaemolyticus* and their biological and pathological activities.

The 9 th Joint Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera Panel, Grand Canyon, U.S.A., Octover 3, 1973.

2) Yasuo KUDOH, Senzo SAKAI, Hiroshi ZEN-YOJI, and Ronald A. LE CLAIR : Epidemiology of food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus* occurring in Tokyo during the last decade.

International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, September 17, 1973.

3) Senzo SAKAI, Yasuo KUDOH and Hiroshi ZEN-YOJI : Food poisoning caused by indole-negative strains of *Vibrio parahaemolyticus* in Tokyo.

International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, September 17, 1973.

4) Hiroshi ZEN-YOJI, Yasuo KUDOH, Hideo IGARASHI, Kenji OHTA and Koji FUKAI : Purification and identification on enteropathogenic toxins "a" and "a'" produced by *Vibrio parahaemolyticus* and their biological and pathological activities.

International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, September 17, 1973.

5) Takeshi TERAYAMA : The status of staphylococcal food poisoning in Japan.

Forthcoming Conference "Staphylococci in food", The Pennsylvania State University, Pennsylvania, U.S.A., March 18, 1973.

6) Hiroshi ZEN-YOJI, et al. : Biochemical and pathogenic aspects of untypable *Vibrio parahaemolyticus*.

The Annual Meeting of American Society for Microbiology, U. S. A., May, 1973.

7) Hiroshi ZEN-YOJI, et al. : Significance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from Japanese natural sources.

The Annual Meeting of American Society for Microbiology, U. S. A., May, 1973.

8) 善養寺 浩, 太田 建爾, 五十嵐英夫, 工藤 泰雄： 腸炎ビブリオの腸炎起病性毒素の精製およびその生物活性.

第30回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 1973. 11. 14.

9) 善養寺 浩, 寺山 武, 池島 伸至： 実験的マウスのサルモネラ症に対する各種薬剤の治療効果.

第47回日本伝染病学会総会, 京都, 1973. 4. 6.

10) 寺山 武, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 善養寺 浩： 剝脱性皮膚炎（ＴＥＮ）および膿痂疹由来ブドウ球菌のコアグラーゼ型と生化学的性状について.

第29回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 1973. 6. 22.

11) 寺山 武： ブドウ球菌エンテロトキシンの精製.

第26回日本細菌学会関西支部総会, 京都, 1973. 11. 9.

12) 寺山 武, 潮田 弘, 五十嵐英夫, 稲葉美佐子, 善養寺 浩： 黄色ブドウ球菌の新抗原型コアグラーゼⅧ型について.

第30回日本細菌学会関東支部総会, 東京 1973. 11. 14.

13) 坂井 千三, 伊藤 武, 津野 正朗, 岡沢久美子, 善養寺 浩：*Salmonella kottbus* と *Salmonella kasenyi* の混合感染によると推定される集団食中毒例について.

第25回日本食品衛生学会, 東京, 1973. 5. 18.

14) 坂井 千三, 伊藤 武, 津野 正朗, 岡沢久美子, 善養寺 浩： *Salmonella typhi-murium* の生物型とファージ型について.

第29回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 1973. 6. 22.

15) 伊藤　武，坂井　千三，上村　知雄，加藤　俊子，中村　義：　サルモネラの生態に関する研究，カメのサルモネラ保菌について
第76回日本獣医学会，鹿児島，1973. 10. 15.

16) 一言　広，諸角　聖，和宇慶朝昭，善養寺　浩：　食品の糸状菌汚染に関する研究，ゴマおよびその加工品について。
第25回日本食品衛生学会，東京，1973. 5. 18.

17) 諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，善養寺　浩：　食品の糸状菌汚染に関する研究，日本茶について。
第26回日本食品衛生学会，名古屋，1973. 11. 8.

18) 諸角　聖，一言　広，和宇慶朝昭，善養寺　浩：　食品の糸状菌汚染に関する研究，ひき肉について。
第51回東京都衛生局学会，東京，1973. 7. 11.

19) 善養寺　浩，坂井　千三，丸山　務，柳川　義勢，岡沢久美子：*Yersinia* の生態に関する研究，1）と畜からの分離成績と分離菌の性状について.
第46回日本細菌学会総会，東京，1973. 4. 7.

20) 丸山　務，善養寺　浩：　*Yersinia enterocolitica* のサルへの実験的感染について.
第46回日本細菌学会総会，東京，1973. 4. 7.

21) 渡辺　賢哉，木下　正彦，永野清一郎，遠藤　幸男，鈴木　輝康，森脇　康一，加藤　孝雄，松本　栄一，善養寺　浩，坂井　千三，丸山　務，柳川　義勢，岡沢久美子：　と畜からの *Yersinia enterocolitica* と仮性結核菌の分離.
第51回東京都衛生局学会，東京，1973. 7. 11.

22) 丸山　務，柳川　義勢，渡辺　賢哉，木下　正彦，永野清一郎：　*Yersinia* の生態に関する研究 2）ネズミからの分離成績と分離菌の性状について.
第76回日本獣医学会，鹿児島，1973. 10. 15.

23) 坂井冨士子，伊藤　忠彦，藪内　清，岩崎　謙二，根津　尚光：　1973年4月以降東京都に流行したB型インフルエンザの検索成績について.
第22回日本伝染病学会東日本地方会．1973. 10. 27.

24) 観　照雄，鎌田　国広，植田　忠彦，山添　律子，戸谷　哲也：　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
日本薬学会第93年会，東京，1973. 4. 6.

25) 鈴木　助治，山野辺秀夫，大沢　映子，小泉清太郎，戸谷　哲也：　ヒト臓器中のポリ塩化ビフェニル含有量について.
日本薬学会第93年会，東京，1973. 4. 6.

26) 江波戸挙秀，伊藤　弘一，竹内　正博，雨宮　敬，原田　裕文，戸谷　哲也：　有害性元素に関する衛生化学的研究——ヒト臓器中の Cd, Pb, Cu, の含有量について
日本薬学会第93年会，東京，1973. 4. 7.

27) 風間　成孔，水石　和子，中村　義昭，原田　裕文，戸谷　哲也：　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
日本薬学会第93年会，東京，1973. 4. 6.

28) 竹内　正博，江波戸挙秀，伊藤　弘一，雨宮　敬，原田　裕文，戸谷　哲也：　有害性元素に関する衛生化学的研究——アルカリ分解による魚肉中のメチル水銀の定量法
日本分析化学会夏季研究発表会，函館，1973. 7. 26.

29) 雨宮　敬，伊藤　弘一，原田　裕文，戸谷　哲也：　野菜等の重金属含有量について
第10回全国衛生化学技術協議会総会，東京，1973. 9. 26.

30) 観　照雄，植田　忠彦，鎌田　国広，戸谷　哲也：　油脂加工品中からの熱媒体の分析法について
第10回全国衛生化学技術協議会総会，東京，1973 9. 27.

31) 風間　成孔，観　　照雄，植田　忠彦，鎌田　国広，戸谷　哲也：　有機ハロゲン化合物のケイ光反応に関する研究（第2報）
Diphenylamine を用いるＰＣＢ各種単体のケイ光薄層デンシトメトリー
日本分析化学会第22年会，福岡，1973．11．23．

32) 伊藤　弘一，竹内　正博，江波戸挙秀，雨宮　敬，原田　裕文：　アルカリ分解による食肉中のメチル水銀定量法
日本薬学会第94年会，仙台，1974．4．5．

33) 小久保弥太郎：　凍結豚肉由来低温発育細菌の発育温度特性
日本食品衛生学会，第26回学術講演会，1973．11．8．

34) 山岸　達典，堀井　昭三，境野　米子，森本　キミ，竹葉　和江，春田三佐夫：　牛乳中の残留有機塩素系農薬レベルの推移について
第52回東京都衛生局学会，1973．11．7．

35) 松本　昌雄，神保　勝彦，春田三佐夫：　カタラーゼテストによる U．H．T．処理乳中の低温菌の検出法について
日本食品衛生学会，1973．5．17．

36) 梅木富士郎，小久保弥太郎，井草　京子，春田三佐夫，四宮　　栄：　冷凍食品の細菌学的検査法の検討特に畜肉を含む調理冷凍食品について
日本食品衛生学会，1973．5．17．

37) 西垣　　進，田村　行弘，真木　俊夫，山田　洋，嶋村　保洋，鳥羽　啓子，木村　康夫：ジエチルジチオカルバミン酸—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1報）
第25回日本食品衛生学会，1973．5．18．

38) 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：Ｌ—グルタミン酸の多量摂取にに対する衛生学的検討(第3報)
第25回日本食品衛生学会，1973．5．18．

39) 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 抽出を利用する重金属の原子吸光同時分析法の検討（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）
第10回全国衛生化学技術協議会総会，1973．12．7．

40) 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：　マグロ類の水銀調査について（同一魚体の各部位別および同一魚種の個体別並びに海域別差異についての比較検討
第10回全国衛生化学技術協議会総会，1973．12．7．

41) 上田　　工，勝木　康隆，安田　和男，木村　康夫：生あん中のシアンの定性定量法について
第26回日本食品衛生学会，1973．11．9．

42) 鈴木　二郎，友松　俊夫，冠　　政光，押田久美子，片倉　栄一，木村　康夫：シリカゲルとエタノールの相互作用——ジフェニルの TLC 分析に関連して
日本薬学会第93年会，1973．4．6．

43) 遠藤　英美，神蔵美枝子，加藤　三郎：　食品に使用される天然色素について
第10回全国衛生化学技術協議会，1974．12．6．

44) 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（3）一時尿中の鉛とδ-アミノレブリン酸，コプロポルフィリン，ウロビリノーゲンの関係について．
第22回日本衛生検査学会総会，1973．5．12．

45) 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（4）血中鉛と一時尿中の鉛，δ-アミノレブリン酸，コプロポルフィリン，ウロビリノーゲンの関係について．
第22回日本衛生検査学会総会，1973．5．12．

46) 牛尾　房雄，深野　駿一，道口　正雄：PCB 分析の簡易化について．
日本食品衛生学会第25回大会，東京，1973．5．17．

47) 深野　駿一，牛尾　房雄，道口　正雄：多摩川水系魚類中の PCB 蓄積量．
日本生態学会第20回大会，帯広，1973．8．30．

48) 牛尾　房雄，深野駿一，道口　正雄，阿部　学：野生鳥類の PCB 及び有機塩素系農薬の蓄積量
日本生態学会第20回大会，帯広，1973．8．30．

49) 狩野　文雄：　粘菌の生理機能に及ぼすオキシダントの影響（第２報）
第14回大気汚染研究全国協議会大会，1973．11．7．

50) 狩野　文雄：　オゾンに対する粘菌の反応
大気汚染生体影響の実験的研究懇話会，1973．11．6．

51) 秋山　和幸，長嶋　親治，藤谷　和正，高橋利恵子，佐藤　泰仁，溝口　　勲，野牛　　弘，辰市　裕久：清掃工場における PCB 収支試算
第32回日本公衆衛生学会総会，1973．10．13．

52) 二島太一郎，多田　宇宏，野牛　　弘，長崎　護：血液と毛髪の総水銀量について
第43回日本衛生学会，1973．5．6．

53) 二島太一郎，池田　真悟，野牛　　弘，長崎　護　有働　亮治，上条　　宏，三好　千種，中村　洋子：魚介類多食の毛髪及び血液中総水銀量に及ぼす影響
第32回日本公衆衛生学会，1973．10．14．

54) 千種　　翠：ショウジョウバエにおけるオゾンの遺伝的影響について
第25回日本衛生動物学会大会．1973．4．9．

55) 溝口　　勲，牧野　国義，佐藤　泰仁，大沢　誠喜，野牛　　弘：　光化学スモッグに関する自覚症調査について
第32回日本公衆衛生学会総会，1973．10．14．

56) 溝口　　勲，大沢　誠喜，佐藤　泰仁，牧野　国義，野牛　　弘：光化学スモッグと赤血球に関する研究　第１報　赤血球抵抗に及ぼす汚染物質の影響
7．

第14回大気汚染研究全国協議会大会，1973．11．7．

57) 佐藤　泰仁，牧野　国義，大沢　誠喜，溝口　勲：　アクロレイン測定の比較検討について
第14回大気汚染研究全国協議会大会，1973．11．8．

58) 大井　玄，関　比呂伸，前田ヒロ子，野牛　　弘：　各社製品の PCB 比較毒性と，未使用 PCB と回収 PCB との比較毒性実験
第43回日本衛生学会，1973．5．6～7．

59) 大井　玄，福田　雅夫，瀬戸　　博，野牛　弘：PCB による液性抗体産生機能に及ぼす影響
第43回日本衛生学会，1973．5．6～7．

60) 大井　　玄，瀬戸　　博，福田　雅夫，野牛　弘：　PCB の液性免疫機構に及ぼす急性及び亜急性影響
第32回日本公衆衛生学会，1973．10．13～14

61) 大井　　玄，福田　雅夫，瀬戸　　博，野牛　弘：メチル水銀のマウス液性免疫機構に及ぼす影響
第44回日本衛生学会，1974．4．3～4．

62) 中村　　弘，森田　昌敏，三村　秀一：　水中のフタル酸エステルについて
第32回日本公衆衛生学会，1973．10．13．

63) 森田　昌敏，中村　　弘，三村　秀一：　食品中のフタル酸エステルについて
第25回日本食品衛生学会，1973．5．18．

64) 松本　淳彦：東京湾底泥中の硫酸塩還元菌について
第10回日本水処理生物学会，1973．10．9．

65) 松本　淳彦：三宅島新澪のプランクトンと水質
第38回日本陸水学会，1973．10．18．

66) 山崎　洋子：小笠原島の水源中の大腸菌群の IMVic による分類
第10回水処理生物学会，1973．10．8．

67) 土屋　悦輝，小輪瀬　勉，山崎　堅吉，松本　浩

一，三村　秀一：東京湾内底質中のＰＣＢについて
第93年回日本薬学会　1973．4．5.

68) 岡本　寛，笹野　英雄，山崎　堅吉：　放流水の BOD と TOC について
第10回全国衛生化学技術協議会総会，1973．12．7.

69) 柴　英子，米山　允子，藤井　孝，伊川三枝子，平賀　興吾：Butylated hydroxy toluene (BHT) と Alkyl benzene sulfonate(LAS)の相乗毒性に関する研究(2) ラットにおける自然出血について
第47回日本薬理学会総会．1974．4．1.

70) 高橋　省，柴　英子，中尾　順子，平賀　興吾：Butylated hydroxy toluene (BHT) と Alkyl benzene sulfonate(LAS) の相乗毒性に関する研究(3) *in vitro* における血液凝固阻害効果について
第47回日本薬理学会総会　1974．4．1.

71) 高橋　省，平賀　興吾：Butylated hydroxy toluene (BHT) と Alkyl benzene sulfonate (LAS) の相乗毒性に関する研究(4)
血漿中より検出された血液凝固阻害物質と LAS との関連性について
第50回日本薬理学会関東部会　1974．6．1.

72) 大石　真之，影山喜世子，大沢　仲昭：LH-RH 慢性投与時のラット睾丸静脈血中ステロイドの変動について
第46回日本内分泌学会総会，1973．4．10.

73) 大沢　仲昭，大石　真之，山本　慧：ホルモンの episodic secretion に関する研究（第１報），サルにおける Cortisol と 11-deoxy 17KS (free 型) の episodic secretion について
第46回日本内分泌学会総会，1973．4．9.

74) 大石　真之，影山喜世子，大沢　仲昭：　LH および LH-RH　負荷時のラット睾丸におけるテストステロン合成分泌の２相性 Pattern について
第47回日本内分泌学会総会，1974．4．9.

75) 押田　裕子，笹野　英雄，栃本　博：フレームレス原子吸光法による微量金属の測定法（第１報）
第32回日本公衆衛生学会総会，1973.10.4.

76) 新井　輝義，一島　英治：アスペルギルスの酸性カルボキシペプチターゼの蛋白質に対する作用
第46回日本生化学会，1973．9．28.

77) 大西　和夫，関　博麿：フィチン酸によるカドミウムの吸収阻害実験（その１）
第27回日本栄養，食糧学会　1973．5．17.

著　　書

BOOKS

1. 新常用和漢薬集

西川洋一その他7名

南江堂（東京）1973.7.1

従来，和漢薬に関する生薬学的または生薬化学的著書は相当あるが，特に生薬取扱業者の便宜を考慮し，流通市場の現状にそくしたものはほとんどない．そこでこれらの点を勘案して，実務者のハンドブック的な便に重点をおき，現市場の流通品237品目の生薬について生薬名，基原，産地，性状，選品，成分適用，処方例，備考（類似生薬，同類生薬等）の順に解説した．特に局方外生薬124種については，その規格および試験法設定上参考となるものである．

2. 乳質改善ハンドブック

飯塚三善（農林省家畜衛試室長），浜田寛（農林省畜試加工部長），春田三佐夫（都衛研生活科学部長），松井武夫（公衛院衛生獣医学部長），渡辺一男（全国乳質改善協会事務局長）ほか編集，社団法人全国乳質改善協会(地方競馬益金補事業)

1973年9月20日発行

全国乳質改善協会は，現在，都道府県指定生乳生産者団体を中心に全国的にかつ組織的に乳質改善事業を推進しており，その事業推進の一助として，乳質改善指導員を対象に，生乳の品質管理について，体系的にとりまとめて本書を発行したものである．内容としては，正常乳，異常乳，乳質改善，飼養管理および搾乳，洗浄と殺菌，生乳の細菌汚染，生乳の冷却，乳房炎，生乳の検査法等について14名の研究者が分担執筆した．

3. 改訂版　加工食品と食品衛生

河端俊治（予研），菅野三郎（神奈川県公害センター）編集，相磯和嘉（千葉大），粟飯原景昭(予研)，田辺弘也（国立衛試），谷村顕雄（国立衛試），春田三佐夫（都衛研），松本茂（都衛研）ほか分担執筆

新思潮社，1973年12月15日発行

本書は食品技術者，研究者に対して最近の加工食品の食品衛生上の知識を提供して，より安全な食品の生産のための基礎を提供し，同時に衛生行政や食品衛生監視の任に当るもの，さらに食品科学研究者，学生の参考資料にも供しうるよう，食品衛生の概念，食品添加物，食品の加工技術と食品衛生，食品の腐敗と保蔵，加工食品と食品衛生，食品衛生の新しい問題について詳述したものである．458頁．

4. 食品衛生検査指針Ⅰ検査法別

厚生省環境衛生局監修

可児利朗，木村康夫，遠藤英美，春田三佐夫，藤居瑛ほか44名専門委員として分担執筆

日本食品衛生協会，1973年11月15日発行

食品衛生検査指針の最近版が発行されたのは昭和38年1月であるが，その後約10年間そのままに放置された．しかし，その間，つぎつぎと新試験法が開発され食品衛生上新たに検査を必要とする重要事項の急増に直面し，机上に置かれた「指針」の内容があまりにも超時代的であるところから，ここに新たに検査指針を編さんしたものである．

5. 人間と都市

溝口　勲（共著）新日本出版社

1973年3月25日発行

最近の激化する都市問題全般にわたって，それぞれの専門分野（人文，社会，自然科学）の立場から論じている．その中で著者は都市と健康を担当し，公衆衛生学的見地から，大気汚染，都市騒音，職業的有害条件，住居および交通条件などの諸要因と健康の関連を述べている．さらに健康のとらえかた，健康に関する住民運動にも言及している．

6. 環境保健学

溝口　勲（共著）　医歯薬出版株式会社

1973年12月1日発行

新編健康管理シリーズの一巻として環境保健全般を論ずるなかで，著者は大気汚染の理解と管理，環境の諸要因のうちのオキシダントを担当している．都衛研での研究をふまえ大気汚染の概念および防止対策に中心をおいて論じたもので，健康管理にたずさわる医師，保健婦，行政官などを対象とした必携的なものである．

東京都立衛生研究所研究年報の投稿について

1974年8月1日改正
1975年26巻から実施

投　稿　規　定

1. 研究年報は，東京都立衛生研究所において行なった調査研究の業績を掲載する．
投稿者は，本研究所所員に限る．ただし，共著者はこの限りでない．

2. 収載する内容

(1)報　文

ア．独創性に富み，新知見を含むまとまった研究業績

イ．試験検査および調査研究などで，所見を加えて記録しておく必要のあるもの

(2)他誌発表

本研究年報以外の雑誌などに発表したもの

(3)学会発表

学会で発表したもの

3. 用紙および枚数の制限

所定の原稿用紙を用い，横書きで記載する．ただし，欧文は国際判（21×28 cm）タイプ用紙を用い，ダブルスペース打ちとする．

(1)報　文　表，図，チャートおよび写真を含めて刷り上がり6頁（原稿用紙で約36枚）以内

(2)他誌発表　2枚以内

4. 原稿の提出

原稿は所属研究科長の校閲を経て研究年報編集委員会（事務担当：庶務課調査係）へ7月末日まで提出する．

5. 校　正

校正についてはすべて著者の責任とする，ただし原稿の変更は一切認めない．

執　筆　規　定

1. 文　体

現代かなづかい，新送りがな，ひらがなまじり口語文とし，簡潔で理解しやすい表現にする．やむを得ぬ学術用語以外は当用漢字を用いる．必要ならば全文を外国語で書いてもよい．

2. 学術用語

学会の慣例に従う．文中の物質はその名称を記し，化学式を用いない．

3. 略　記

物質名などを略記するとき，和英文とも最初は正式な名称とともに示す．たとえば，ポリ塩化ビフェニール（以下 PCB と略す）とする．

4. 記　号

次の例によるほか，学会の慣例に従う．m, cm, mm, μ, nm, Å, m^2, m^3, l, ml, μl, kg, g, mg, μg, N(normal concentration), M (molar concentration, 絶対量を示すときは mole とする), pH,°(degree celsius, °C としない，例：50°), %, w/v%, Rf, t_R, ppm, ci, mci, μci, mmHg, mp（融点），bp（沸点），dp（分解点），d（比重），n（屈折率），α（旋光度），hr（時間），min（分），sec（秒）（時間は複数のときも s をつけない），λ max（吸収極大），λ min（吸収極小），$E^{1\%}_{1\,cm}$（E 値）

5. 数　字

アラビア数字を用い，千の単位に明瞭にコンマ「，」をつけること．ただし，成語となっている数字は漢字とする．また，分数は 2/3 のごとく行をとび出さないように書くこと．

6. 句読点

，．を用い　、。としない．

7. 書体の指定

印刷時の書体を原稿中で指定するときは，次の記号を例に従って赤で文字の下に書きこむこと．

書体	記号	原稿記載例	刷り上がり
欧文ゴシック	～～～～～～～～	Experimental	**Experimental**
和文ゴシック	～～～～～～～～	実験の部	**実験の部**
イタリック	――――――	Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
イタリックボールド	～～～～～～～～	Staphylococcus aureus	***Staphylococcus aureus***
スモールキャピタル	═══════	t_R	t_R

8. 報文の記載要領

(1)記載順序　8の(2)～(7)の順に書く．

(2)題名，著者名

次の例に従い，表紙（原稿用紙1枚全部）をこれにあてる．題名は和欧文ともゴシック体を指定し，末尾に「．」をつけないこと．

例

市販洋菓子の黄色ブドウ球菌汚染の実態とそれ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（第2報）

佐藤一郎*　鈴木三郎*　山田太郎**

Survey on Contamination of *Staphylococcus aureus* in Commercial Europian Type Cakes and Demonstration of Enterotoxin from Isolates (Ⅱ)

ICHIRO SATO*, SABURO SUZUKI* and TARO YAMADA**

（脚注）

著者の所属および研究所住所を次のとおり＊印をつけて和英文で記載する．

* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科
160 東京都新宿区百人町3－24－1

* Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
24－1, Hyakunincho 3 chome, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan

** 東京都多摩食肉衛生検査所

多摩支所の場合は次のとおりとする．

* 東京都立衛生研究所多摩支所
190 東京都立川市柴崎町3－16－25

* Tama Branch Laboratory, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
16－25, Shibazakicho 3 chome, Tachikawa, 190 Japan

(3)英文要旨

掲載するときは，内容を簡潔にまとめ，参考のために書いた和文を文献のつぎに添える．

(4)本　文

新しい頁から書きはじめる．本文の記載要領はとくに規定しないが，内容の重複をさけ簡潔にする．緒言，実験の部，結果と考察，結論，文献などの大見出しは行の中央に書きゴシック体を指定すること．

表，図，チャートおよび写真などは原稿用紙の右欄外に←―表1のごとく赤で入る位置を示すこと．

(5)謝　辞

見出しをつけて記入する．

(6)付　記

1行あけて改行し，次の例のように（　）を付して記入する．

例ア．当所の調査研究課題に指定されたもの．

（本研究は昭和○○年度当研究所調査研究課題「○○○○に関する研究」として実施したものである）

イ．すでに学会で発表したもの．

（本研究の概要は○○学会第○回○○大会○○○○年○月で発表した．）

ウ．例アおよびイをかねているもの．

（本研究は昭和○○年度当研究所調査研究課題「○○○○に関する研究」として実施し，その概要は○○学会第○回○○大会○○○○年○月で発表した）

(7)文　献

本文の引用個所の右肩に [1], [2,3], [4-7] のように記し，引用順に見出しをつけて書く．記載要領は次の例に従うこと．

ア．雑誌

著者：雑誌名，巻（号），始頁，発表年

欧文の著者名はファミリーネームを先にする．巻数は和欧文ともゴシック体を指定し，欧文の雑誌名はイタリック体を指定すること．月刊雑誌などで通巻頁のあるものは号の記載を省略する．

例　　文　献

1) 鈴木　昭，小沼博隆：食衛誌，12, 9, 1970

2) Suzuki, S. and Sato, I.: *J. Food Hyg. Soc.*, 10, 434, 1469

3) Fischel, G. W., Vedros, N. A. and Rothlauf, M. V.: *J. Infect. Dis.*, 106, 174, 1960

イ．単行本

著者：単行本名，第○版，始頁，発行年，発行所，発行地

欧文の単行本名はイタリック体を指定すること．

例

4) 佐藤一郎：マススペクトル解説，61. 1967, 広川書店

5) Schalon, O. M., Carroll, E. J. and Jain, E. C.: *Bovine Mastitis*, 68, 1976, Fibiger, Philadelphia

6) Rasmussen, A. E.: *The Principle Nervous Pathways*, 4 th Ed., 47, 1960, Macmillan, New York

共著の場合は鈴木ら，または Fischel, G. W., *et al.* としないで原則として共著者全員を記載する．

重版または改訂版のない単行本は第○版の記載は省略する．

単行本の全内容を総括的に引用した場合は，単行本名のみの記載にとどめ頁は省略する．

(8)表，図，チャート，写真

表，図およびチャートは一つごとに別紙（白紙またはあまり濃くない線の方眼紙）に記載し，写真はＢ５版大の白紙にはりつけ，それぞれアラビア数字で一連番号をつける．また各紙の上端に報文の題名および著者名（最初の１名）を鉛筆で記入する．

表題および説明は和英文いずれでも可とする．表の表題はその上に，説明はその下に書き，図およびチャートの表題および説明はその下に書く．

図，チャートおよび写真は刷り上がりのおおよその大きさを別に定めるサイズから著者が指定し，それぞれ各紙の右下に赤で Ａタテ200×ヨコ147 のように記す．

投稿するときは表，図，チャートおよび写真ごとにそれぞれ番号順にまとめ一括して末尾につけ，本文からの通し頁を各紙の右上に鉛筆で記入する．

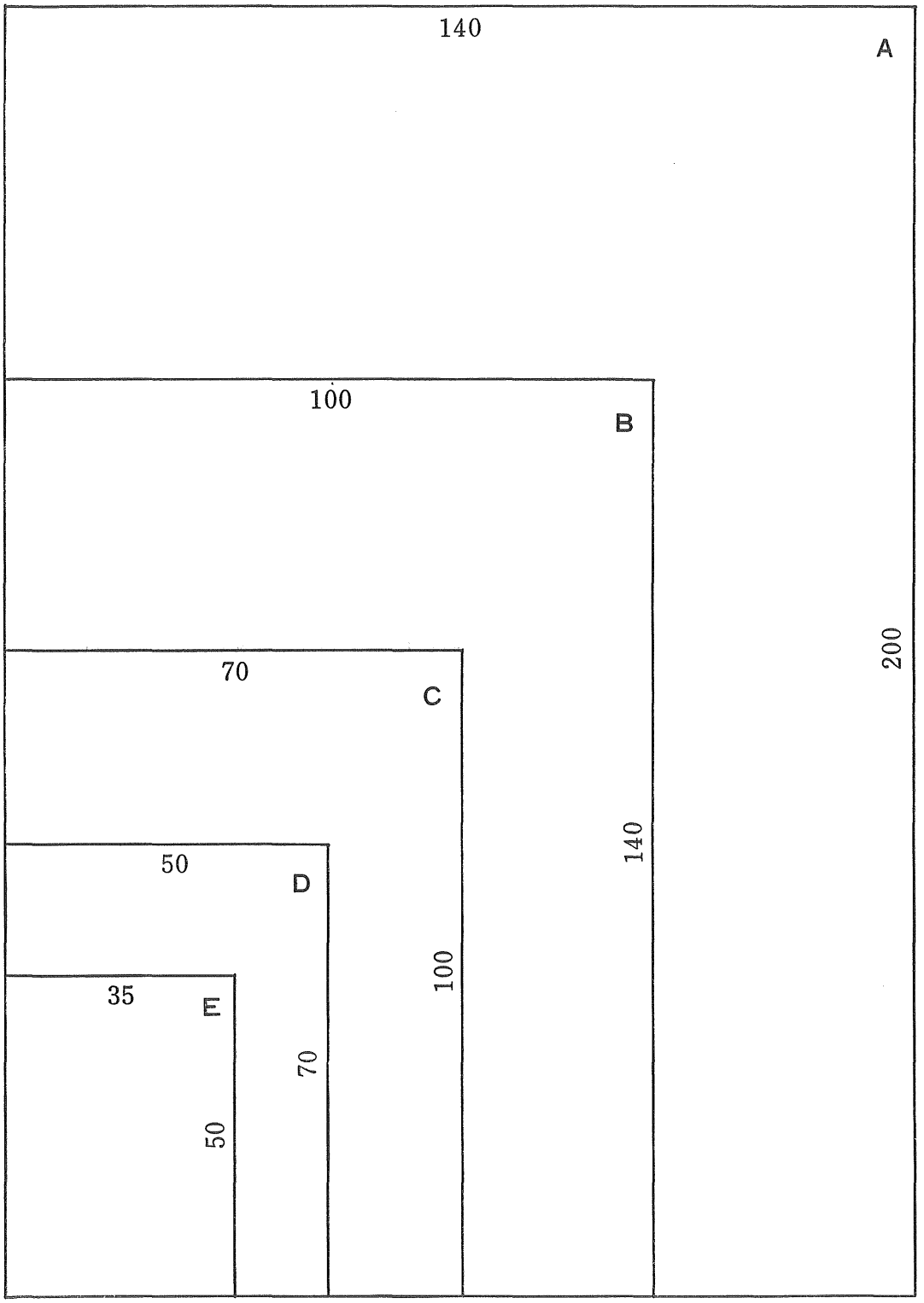
9. 他誌発表の記載要領

題名の次に改行して著者名：誌名，巻（号），頁，発表年の順に書き，さらに改行して報文の要旨を記載する．題名および巻数はゴシック体を指定する．

10 学会発表の記載要領

研究科ごとにまとめ，発表ごとに余白２行をあけ著者名：演題名を書き，改行して学会名（発表年月）を書く，発表年月は（1974. 3）のように書き，演題名はゴシック体を指定する．

（別添）図，チャート，写真のサイズ（mm）



A 200×140, B 140×100, C 100×70, D 70×50, E 50×35

東京都立衛生研究所研究年報編集委員

根津尚光（委員長）
飯田基
西川洋一
春田三佐夫
野牛弘
平賀興吾

昭和49年12月25日　発行

規格表　第２類
印刷番号(49)1533
刊行物番号(H)24

東京都立衛生研究所研究年報 第25号

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—24—1
電話　363—3231（代）

印刷所　東銀座印刷出版株式会社
東京都中央区銀座3—12—6
電話　542—3941（代）